

Mouse 初期胚의 發育속도에 따른 性비에 관한 研究

李常榮 · 梁富根 · 金正翊

江原大學校 農科大學

Study on the Sex-Ratio of Fast- and Slow-Developing Mouse Embryo

Lee, S. Y., B. K. Yang and C. I. Kim

College of Agriculture, Kangweon National University

Summary

This study was conducted using inbred ICR mice to investigate the sex-ratio of preimplantation mouse embryos.

For the investigation of sex-ratio of mouse embryos, the karyotype of embryos collected at 70-72, 74-76, 78-80 and 82-84 hr after HCG injection was analyzed by chromosomal analysis.

Eight-cell embryos were cultured up to blastocyst stage, then divided them into three groups (fast-, intermediate- and slow-) according to the blastocoel formation. The sex-ratio was also investigated by chromosomal analysis.

1. The highest appearance of eight-cell and morula was observed at the embryos collected respectively at 66-68 hr (84.6%) and 82-84 hr (79.3%) compared to any other group.
2. The successful rate of embryos sexing at 4-, 8-cell and morula stage were 23.1% (3/13), 42.1% (138/328) and 32.6% (47/141), respectively. The respective sex ratios (female vs male) of 4-, 8-cell and morula were 66.7:33.3, 49.3:50.7 and 39.5:60.5.
3. Of the 476 eight-cell embryos cultured in vitro, 427 (89.7%) embryos were developed to the blastocysts and the number of fast-, intermediate- and slow-developing embryos were 139, 144 and 144, respectively.
4. Female to male ratios of fast-, intermediate- and slow-developing group were 23.0:77.0, 55.2:44.8 and 73.8:26.2, respectively. Significantly higher ($P<0.05$) number of female (48/65; 73.8%) was observed in the group of slow-developing embryo than that out of total number of embryos (82/188; 43.6%).

I. 緒 論

最近 受精卵移植術의 開發과 普及에 따라 受精卵의 移植前 性判別에 관한 연구가 활발히 進行되고 있다. 수정란의 性判別에는 性染色體의 檢査(Gardner 와 Edwards, 1968), H-Y 抗體處理에 의한 免疫螢光測定(White 등, 1983)과 發育分化能(內海 등, 1981, 1984) 등에 의한 雌雄分離의 연구결과가 보고되어 있다.

Tsunoda 등(1985)은 mouse의 初期胚를 體外培養後 이식하여 産仔의 性을 조사한 결과 發育이 빠른

집단에서 雄性, 늦은 집단에서는 雌性의 出現頻度가 현저하게 증가되어 胚의 發育速度와 性比間에 밀접한 관계가 있음을 보고한 바 있다.

本實驗은 mouse 초기배의 발육속도와 성비에 관한 기초자료를 얻기 위하여 채란후 신선란의 발육 단계별 성비와 체외배양후 포배강의 형성시기가 빠른 집단, 중간집단 및 늦은 집단으로 구분하여 발육속도에 따른 性比를 染色體分析法(Tarkowski, 1966; King 등, 1979)에 의하여 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

近交系 ICR 種의 mouse 를 18~23°C 의 온도와 12 시간 light, 12시간 dark 의 광선 조절하의 plastic cage 에서 사육하였다. 이들의 年齡은 6~8 주령이었으며, 체중이 25~30g 인 雌性 mouse 52頭와 雄性 mouse 10頭를 供試하였다.

2. 供試受精卵

過排卵誘起를 위하여 雌性 mouse 에 PMSG 5 단 위 (IU) 를 1 회 복강내 주사후 48시간에 HCG 5IU 를 동일한 방법으로 주사하였다. HCG 주사와 동시에 雄性 mouse 와 1:1로 合舍하여 交配시킨 후 62~84시간에 卵管과 子宮을 관류하여 수정란을 회수, 실체현미경으로 발육상태를 검사하여 형태적으로 정상인 수정란을 供試하였다.

3. 受精卵의 培養

採卵과 受精卵의 培養은 Brinster (1965) 의 培養液을 사용하였으며, 사용직전에 0.2 μ m 의 membrane filter (Toyo Roshi kaisha Ltd, Japan) 로 濾過除菌한 배양액 0.05ml 를 petridish 의 저면에 부착, 滅菌 paraffin oil 로 덮은 小適培養液을 만들어 CO₂ incubator (5% CO₂ in air, 37°C) 내에서 2시간이상 平衡을 실시하였다. 이어서 채란된 수정란을 배양액내로 옮겨 배양하면서 30분 간격으로 수정란의 발육상태를 관찰, 胞胚腔 (blastocoel) 이 형성되는 시기를 기준으로 발육이 빠르고 느린 집단으로 구분하여 染色體分析에 공용하였다.

4. 染色體分析

수정란의 각 分割球가 세포분열 中期像을 유지하

도록 하기 위하여 colcemid 를 Brinster 배양액에 최종농도가 0.05 μ g/ml (Singh & Hare, 1980) 이 되도록 하여 수정란의 배양방법과 동일한 방법으로 2~6 시간 배양후 Tarkowski (1966) 와 King 등 (1979) 의 실험법을 修正하여 염색체의 核型을 검사하였다 (申과 金, 1986).

III. 結果 및 考察

1. 初期胚의 發育段階

Mouse 에 과배란을 誘起시킨 후 일정시기에 채란한 수정란의 發育段階는 Table 1 과 같다.

HCG 주사후 62~84시간에 8 세포기로 발육한 수정란은 6.3~84.6%였으며, 66~68시간에 채란된 수정란중 8 세포기 수정란이 84.6%로서 여타시간에 채란된 성적보다 높았다. 桑實胚의 출현은 70~72시간 (6.2%) 에 시작하여 82~84시간에 79.3%로 증가되었다. 또한 未受精卵과 형태적 이상란은 7.0%와 6.5%의 성적을 보였다. 이와 같은 결과는 W-hitten 과 Dagg (1961) 의 129계통 자성 mouse 와 B-ALB 계통 웅성 mouse 를 교미한날밤의 중간시간을 기준으로 59½시간에 8 세포기와 5~7 세포기, 4 세포기가 83%와 14%, 3%를 나타낸 성적과 대체로 일치하고 있으며 Tsunoda 등 (1985) 과 Graves 와 Biggers (1970) 가 교미 3 일후와 HCG 를 투여한 다음날을 임신 1 일로 하고 3 일후에 8 세포기의 수정란을 回收한 성적과 배란후 60~70시간에 16 세포기로 발육된다는 보고 (McLaren, 1982) 와도 일치하고 있다.

2. 發育段階別 初期胚의 性比

Table 1. Cleavage stages of mouse embryos collected at various time after HCG injection

Hours after HCG	No. of animals examined	No. of eggs at recovery	Ratio of eggs at recovery				
			4-cell	8-cell	Morula	Unfertilized	Degenerated
62-64	7	153	8(5.2)	113(73.9)	0	8(5.2)	24(15.7)
66-68	7	143	2(1.4)	121(84.6)	0	17(11.9)	3(2.1)
70-72	22	439	13(3.0)	355(80.9)	27(6.2)	25(5.7)	19(4.3)
74-76	5	114	0	85(74.6)	12(10.5)	5(4.4)	12(10.5)
78-80	5	99	0	68(68.7)	17(17.2)	8(8.1)	6(6.1)
82-84	6	111	0	7(6.3)	88(79.3)	11(9.9)	5(4.5)
Total	52	1,059	23(2.2)	749(70.7)	144(13.6)	74(7.0)	69(6.5)

Table 2. Sex-ratio of fresh mouse embryos by chromosomal analysis

Hours after HCG	Stage of embryo	No. of embryos sexed/ No. of embryos recovered	Sexed-ratio of embryos sexed	
			Male	Female
70-72	4-cell	3/13(23.1)	1(33.3)	2(66.7)
	8-cell	84/168(50.0)	45(53.6)	39(46.4)
	Morula	11/27(40.7)	8(72.7)	3(28.6)
74-76	8-cell	31/85(36.5)	14(45.2)	17(54.8)
	Morula	6/12(50.0)	4(66.7)	2(33.3)
78-80	8-cell	21/68(30.9)	10(47.6)	11(52.4)
	Morula	7/17(41.2)	4(57.1)	3(42.9)
82-84	8-cell	2/7(28.6)	1(50.0)	1(50.0)
	Morula	23/88(26.1)	13(56.5)	10(43.5)
Total	4-cell	3/13(23.1)	1(33.3)	2(66.7)
	8-cell	138/328(42.1)	70(50.7)	68(49.3)
	Morula	47/144(32.6)	29(61.7)	18(38.3)

Table 3. Sex-ratio of fast-, intermediate- and slow-cleaving mouse embryo by chromosomal analysis

Initial cell stage	No. of blastocysts developed/ No. of embryos cultured	No. of embryos sexed	Sex-ratio of embryos sexed					
			No. of fast-cleaving embryo		No. of intermediate-cleaving embryo		No. of slow-cleaving embryo	
			Male	Female	Male	Female	Male	Female
8-cell	427/476(89.7)	188(44.0)	57 ¹⁾ (77.0)	17 (23.0)	32 (44.8)	17 (55.2)	17 (26.2)	48 ²⁾ (73.8)

1) Significantly higher number of (P < 0.01) male was observed in the group of fast-cleaving embryo than that out of total male number of embryo (57/100).

2) Significantly higher number of (P < 0.05) female was observed in the group of slow-cleaving embryo than that out of total number of embryos (48/97).

과배란 처리후 일정시간에 채란하여 배양액내에 colcemid (0.05 μg/ml) 를 첨가하여 2~6 시간 體外培養한 후 염색체를 分析하여 얻은 결과를 Table 2 에 요약하였다. HCG 주사후 70~72, 74~76, 78~80시간과 82~84시간에 채란된 8 세포기 受精卵의 암수성비는 각각 46.4 : 53.6, 54.8 : 45.2, 52.4 : 47.6 및 50.0 : 50.0으로 암수의 性比는 대체로 1 : 1로서 차이가 인정되지 않았으나, 4 세포기는 雌性(66.7%), 桑實胚에서는 雄性(61.7%)의 비율이 증가되어 雌性受精卵(XY)의 발육속도가 XX性染色體의 구성을 갖는 雌性受精卵보다 빠른 경향을 나타냈다. 이와 같은 성적은 Tsunoda 등(1985)이 자연교미시킨 mouse의 초기배 발육에 따른 성비의 보

고에서 胚發育이 빠른 수정란의 雌性發生頻도가 높았던 것(71.0 : 29.0)과 유사한 경향을 보이고 있으나 本實驗의 成績에서 雌性의 출현빈도(61.7%)가 이들의 성적(71.0%)보다 다소 낮은 것은 本實驗에 供用된 受精卵이 성선자극 hormone 투여에 따른 過排卵된 것인데 반해, Tsunoda 등은 자연배란된 卵을 供用한데 기인된 것으로 생각된다.

3. 初期胚의 體外發育과 性比

8 세포기의 수정란을 채란하여 Brinster 배양액 내에서 포배강이 형성될 때까지 배양하여 발육속도의 차이에 따라 3 집단으로 구분하여 염색체분석한 결과는 Table 3 과 같다.

8 세포기의 수정란 476개를 배양하여 427(89.7%) 개가 胚盤胞로 발육되었으며, 이와 같은 성적은 Ladd등(1983)의 45.2~65.7%의 성적과 Gray등(1983)이 보고한 78.0%의 성적보다는 높은 경향을 나타냈으나, Tsunoda등(1985)의 95.5% 보다는 다소 낮은 성적을 나타냈다. 한편 체외에서 胚盤胞로 발육속도가 빠른 집단(139개)과 중간집단(144개) 및 늦은 집단(144개)의 性別別率은 각각 53.2, 34.0, 45.1%였으며, 性別別된 수정란중 雌性和 雄性的 性別比는 23.0 : 77.0, 55.2 : 44.8 및 73.8 : 26.2로서 발육속도가 빠른 집단에서는 웅성(77.0%)이, 늦은 집단에서는 雌性(73.8%)의 출현빈도가 현저하게 많은데 반하여, 중간집단에서는 雌性和 雄性的 比率이 55.2 : 44.8로써 거의 1 : 1의 비율을 나타냈다. 발육이 빠른 집단에서 雄性比(57/74 : 77.0%)는 전체 평균의 雌性比(100/197 : 50.8%)보다 유의하게 ($P < 0.01$) 높았으며, 발육이 늦은 집단의 雌性比(48/65 : 73.8%)는 전체 平均의 雌性比(82/188 : 43.6%)보다 유의하게 ($P < 0.05$) 높게 나타났다. 이와 같은 結果는 Tsunoda등(1985)이 自然交尾시킨 mouse에서 8 세포기 수정란을 회수하여 胞胚腔形成을 기준으로 발육이 빠르고 늦음에 따라 3 집단으로 구분하여 移植한 후 産仔의 性別에서 발육이 빠른 집단과 늦은 집단에서 암수의 비율이 각각 29 : 71, 56 : 44, 80 : 20이었다는 성적과 같은 경향을 보였다.

初期胚 발육속도와 性分化的 기작은 정확히 규명되지는 않았으나 Tsunoda등(1985)은 Y-성염색체를 동반하는 정자(Y-bearing sperm)가 X-성염색체를 동반하는 정자(X-bearing sperm)보다 일찍 수정되거나, Y-성염색체를 동반하는 정자와 수정된 수정란이 더 빠른 세포분열을 할 것으로 추측하였다. 염색체의 복제과정에서 X-염색체의 복제가 늦은 것은 염색체의 크기와 DNA 량과 관계가 있는 것으로 추측(Ohno, 1973)되며, 이러한 현상은 哺乳動物의 X-, Y-성염색체중 X-염색체의 크기가 Y-염색체보다 현저하게 크다는 사실(Park 과 Grimm, 1981; Short, 1982)과 일치된다.

본 실험의 결과에서 初期胚의 발육속도가 빠른 집단에서 Y-염색체를 동반하는 雌性受精卵의 출현빈도가 높은 것은 수정란의 세포분열 과정에서 염색체의 크기가 큰 X-염색체를 쌍으로 갖는 雌性受精卵에 비하여 염색체의 복제시간이 단축된 것에 원인

이 있는 것으로 생각된다.

IV. 摘要

Mouse 初期胚의 발육속도에 따른 性別比를 조사하기 위하여 채란후 신선란의 발육단계별 성비와 체외배양후 胞胚腔의 형성시기가 빠른 집단, 중간집단 및 늦은 집단으로 구분하여 염색체분석법으로 性을 性別하였다.

1. 8 세포기와 상실배기 수정란의 채란시기는 각각 66~68시간(84.6%)과 82~84시간(79.3%)이었다.

2. 회수란의 性別別率은 4, 8 세포기와 桑實胚에서 각각 23.1% (3/13), 42.1% (138/328)와 32.6% (47/144)였으며, 性別別卵자의 雌雄性比는 66.7 : 33.3, 49.3 : 50.7 및 38.3 : 61.7이었다.

3. 8 細胞期の 受精卵 476개를 體外培養하여 427(89.7%)개가 배반포로 발육하였으며, 발육이 빠른 집단, 중간집단 및 늦은 집단의 수정란수는 각각 139, 144와 144개였다.

4. 포배강의 형성이 빠른 집단(139개)과 중간집단(144개) 및 늦은 집단(144개)을 구분하여 性染色體의 核型을 分析한 결과 雌雄의 性別比는 각각 23.0 : 77.0과 55.2 : 44.8 및 73.8 : 26.2로서 수정란의 발육속도가 빠른 집단에서 웅성(77.0%)이, 늦은 집단에서는 자성(73.8%)의 출현빈도가 높았다.

V. 引用文獻

1. Brinster, R.L. 1965. Studies on the development of mouse embryo *in vitro*. II. The effect of energy source. *J. Exp. Zool.*, 158:59-68.
2. Gardner, R.L. and R.G. Edwards. 1968. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*, 218:346-348.
3. Graves, C.N. and J.D. Biggers. 1970. Carbon dioxide fixation by mouse embryos prior to implantation. *Science*, 167:1506-1508.
4. Gray, C.O., T.M. Ludwick and D.R. Gray. 1983. Culture of zona-free fractionated

- mouse embryos in medium supplemented with agar. *Theriogenology*, 19:131.
5. King, W.A., T. Linares, I. Gustavaaon and A. Bane. 1979. A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocyst. *Vef Sci. Communi.*, 3:51-56.
 6. Ladd, P.C., J.A. Handcock, B.K. Jones and D.A. Synder. 1983. Development of early mouse embryos in Ham's F-10, BMOG-3 and phosphate-buffered saline media. *Theriogenology*, 19:136.
 7. McLaren, A. 1982. The embryo. In; Embryonic and fetal development. (Eds. Austin, C.R. and R.V. Short) pp.22. Cambridge Univ. Press. New York.
 8. Ohno, S. 1973. Ancient linkage groups and frozen accidents. *Nature*, 244:259-262.
 9. Park, E.H. and H. Grimm. 1981. Distribution of C-band heterochromatin in the ZW sex chromosomes of European and American eels (*Anguillidae*, *Teleostomi*). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 31:167-174.
 10. Singh, E.L. and W.C.D. Hare. 1980. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology*, 14:421-427.
 11. Short, R.V. 1982. Sex determination and differentiation In; Embryonic and fetal development (Eds. Austin, C.R. and R.V. Short) pp.70-113. Cambridge Univ. Press. New York.
 12. Tarkowski, A.K. 1966. An air-drying method chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics*, 5:394-400.
 13. Tsunoda, Y., T. Tokunaka and T. Sugie. 1985. Altered sex ratio of live young after transfer of fast- and slow-developing mouse embryos. *Gamete Res.*, 12:301-304.
 14. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. 10th Int. Cong. on Anim. Reprod. & A.I. pp. 234-235.
 15. White, K.L., G.M. Linder, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*, 19:701-705.
 16. Whitten, W.K. and C.P. Dagg. 1961. Influence of spermatozoa on the cleavage rate of mouse eggs. *J. Exp. Zool.*, 148:173-183.
 17. 内海恭三, 秋山 靖, 湯原正高. 1981. 第22回哺乳動物卵子談話会(要旨), P. 7.
 18. 申鉉東, 金正翊. 1986. 染色體 分析에 의한 생취 初期胚의 性判別에 관한 研究. *家畜繁殖學會誌*. 10(1): 27-35.