韓國家畜繁殖學會誌 17(4) : 305~310(1993)
Korean J. Animal Reprod.

흰쥐 H-Y 항혈청을 이용한 생쥐배의 성감별에 관한 연구

최화식 · 임경순 · 조병대* · 정진관* · 오성종* · 양보석*
서울대학교 농업생명과학대학

Studies on Sexing of Mouse Embryos with Rat H-Y Antisera

Choi, H.S., K.S. Im, B.D. Jo*, J.K. Jung*, S.J. Oh* and B.S. Yang*
College of Agriculture and Life Science, Seoul National University

SUMMARY

These expriments were carried out to investigate existence of H-Y antibody in the rat serum immunized against H-Y antigen from rat spleen cells and effect of H-Y antiserum on development of mouse male embryos. The results obtained were summerized as follows:

1. When mouse embryos were cultured for 48~72 hrs in the Ham's F10 containing 16% of FBS(fetal bovine serum) or RNS(rat normal serum), percentages of embryos developed from 2, 4, 8 and 16-cell embryo to morulae were 20, 27, 94 and 100%, respectively, in FBS and 8, 7, 94 and 100%, respectively, in RNS. Eight to 16-cell embryos showed no difference in development rate between FBS and RNS
2. When 8~16-cell mouse embryos were cultured for 24~48 hrs in the Ham's F10 containing FBS, RNS+GPC(guinea pig complement) and RAS(rat antiserum)+GPC, proportions of embryos developed to the expanded blastocyst stage were 100, 82.4 and 52.1~53.6%(ave. 52.9), respectively, so that it was suggested that rat antiserum suppressed development of male embryos.
3. When 8~16-cell mouse embryos were cultured for 24~48 hrs in the Ham's F10 containing FBS, RNS, RNS+GPC and RAS+GPC, proportions of embryos developed to the expanded blastocyst stage were 94.5, 90.9, 82.3 and 47%, respectively, and the embryos develped in the medium containing RAS+GPC seemed to be female.

These results indicated that the antisera prepared through immunized against H-Y antigen from rat spleen cell, possessed H-Y antibody which supressed development of male embryos.

(Key words : rat, mouse embryo, H-Y antiserum, sexing)

I. 서 론

생쥐의 피부이식실험에서 조직적합성-Y 항원(histocompatibility-Y antigen : H-Y antigen)을 발견한 이래(Eichwald와 Silmser . 1955), 가축의 번식효율과 생산성을 높이기 위하여 출생전 산자의 성을 인위적으로 조절하려는 연구가 시행되어 왔다. '70년대

본 연구는 1991년도 건국대학교 동물자원연구센터 박사논문 연구 지원비와 농촌진흥청 국산시험장의 협조에 의하여 수행되었음.

* 축산시험장(Livestock Experiment Station O.R.D.)
Corresponding author:K.S. Im, College of Agri. and Life Science, Seoul National Universtiy, Suwon, Korea.

에는 X-, Y-정자의 분리에 관한 연구에 치중하여 오다가, 최근에는 수정란의 성을 면역학적 방법(Bennete와 Boyse, 1973)으로 판별하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 어떤 유전자들은 조직적합성 항원군인 H-Y항원을 생성한다고 보고하고 있으며(Klein, 1979), 정자와 웅성수정란에 존재하는 H-Y항원은 H-Y항혈청에 대하여 특이적으로 반응한다(Goldberg 등, 1971; Wachtel 등, 1974; Zenzers 등, 1978).

이 등(1999)은 흰쥐의 비장세포를 H-Y항원으로 하여 제조한 항혈청으로 생쥐수정란의 토끼수정란을 배양하였을 때 발달한 수정란의 비율은 각각 51과 47%였다고 보고하였다. 생쥐나 흰쥐 등의 H-Y항체는 토끼, Guinea pig 및 사람을 포함한 몇몇 포유동물의 수정란에 교차반응하여 웅성수정란의 발달을 억제 또는 파괴한다고 보고하고 있다(Silver와 Yang, 1973; Wachtel 등, 1974; Silver와 Wachtel, 1977; Utsumi 등, 1985; 고 등, 1986).

Kroc와 Goldberg(1976)는 C_{57}BL계 8~16세포기의 생쥐 수정란을 동종의 H-Y항혈청에서 배양한 결과 수정란의 약 50%가 퇴화되어 성판별 효과가 있다는 것을 시사하였다. 또한 Epstein 등(1980)은 ICR계 생쥐의 8-세포기 수정란을 항혈청과 보체를 포함한 배양액에서 배양하였을 때 약 45%의 수정란이 파괴되거나 발달이 중지되었고 55%의 수정란은 배반포까지 정상적으로 발달하였으며, 발달한 수정란은 염색체 분석에서 92%가 XX형이었다고 보고하였다.

Utsumi 등(1991)은 항혈청을 투석하여 얻은 알부민 fraction을 혼합한 배양액으로 8~16세포기의 생쥐 수정란을 배양하였을 때 53%가 배반포로 발달하였으며, 배반포로 발달한 난자의 90% 이상이 자성이었다고 보고하여 보체를 이용하지 않고도 짧은 배양시간에 난자의 성판별이 가능하다고 보고하였다.

본 연구는 웅성흰쥐의 비장세포를 H-Y항원으로 하여 제조한 혈청이 H-Y항체를 소유하는지 또는 H-Y항체를 소유한 혈청으로 생쥐수정란을 처리하였을 때 발달된 수정란과 발달지연된 수정란의 비율을 검토하여 자웅 수정란의 비율을 추정하기 위해 수행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 공시동물

H-Y항혈청을 생산하기 위하여 체중이 150~200g, 7~8주령인 근교계 SD종 흰쥐를 공시하였다. 수정란 채란을 위하여 4~5주령의 ICR계 자성생쥐를 공시하였다.

2) 배양액

수정란 회수용 관류액은 pH 7.2~7.4, 삼투압 270~285mOsm/kg으로 조정된 m-PBS(Modified Phosphate Buffered Saline;Sigma, 미국)에 0.3% 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, Sigma, 미국)을 첨가하였다.

수정란의 배양액은 pH 7.5, 삼투압 280~285 mOsm/kg인 Ham's F10(Sigma, 미국)에 16% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum:FBS,Gibco, 미국) 혹은 RNS(Rat Normal Serum)을 첨가하였다. 관류액과 배양액은 사용전에 0.2μm millipore fillter (Gelman, 미국)로 여과하여 멸균하였다.

2. 실험방법

1) 다배란 처리 및 수정란 회수

ICR계 자성 생쥐에 RMSG(Sankyo, 일본) 5 IU를 복강내에 주사하고 48시간 후에 hCG(대성미생물, 한국) 5 IU를 복강내 주사한 직후 동일 계통의 웅성생쥐와 1:1로 합사시킨 후 2~3일에 난관 및 자궁을 관류하여 수정란을 회수하였다.

2) 생쥐 수정란의 배양

생쥐 수정란을 Ham' F10+FBS(Fetal Bovine Serum;Sigma, 미국) 혹은 Ham's F10+RNS 배양액 소적 각각 50과 30μl에서 24~72시간 배양하였다.

3) H-Y 항혈청 제조

웅성 흰쥐의 비장을 적출하여 m-PBS로 3회 세척한 후 균질기(Weaton, 미국)로 균질화하였다. 이를 700 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이어 상층액을 제거하고 남은 pellet을 m-PBS로 재부유하여 세

포수를 1 ml당 10^7~10^8되게 조정하였다. 조정된 항원을 동량의 FIA(Freund's Incomplete Adjuvant; Gibco, 미국)와 혼합하여 1주 1회 6주 동안 종종 자성 흰쥐의 복강 내에 1 ml씩 주사하였다. 제1차 처리시에는 FCA(Freund's Complete Adjuvant;Gibco, 미국)을 처리하여 priming을 야기하였다. 마지막 주사 1주 후에 boosting처리를 하고 이 후 3~5일째에 채혈하였다.

4) H-Y항체 생성의 확인

혈청 중에 H-Y항체의 생성을 확인하기 위하여 m-PBS로 5×10^6/ml로 조정한 SD계 웅성흰쥐의 정소상체 정자를 항혈청 및 보체를 함유한 배양액에서 배양한 후 정자사멸율이 60%이상인 혈청을 H-Y항혈청으로 사용하였다.

5) 수정란에 대한 항혈청 처리

BSA가 함유되지 않은 Ham's F-10 배양액에 H-Y 항혈청(10%, v/v)과 보체(20%, v/v)를 혼합한 배양액 30 μl의 소적을 페트리접시에 적하시킨 후, paraffin oil로 덮어 5% CO_2, 95% air, 37℃에서 4시간 이상 평형을 실시하였다. 이어 생쥐 8~16 세포기 수정란을 배양액에 넣어 24~48시간 배양하고 수정란의 발달상태를 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. FBS와 RNS가 2~6세포기 수정란의 발생에 미치는 영향

2~16세포기 생쥐배를 FBS와 RNS가 각각 16% 첨가된 Ham's F10에서 48~72시간을 체외 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

배양 후 상실배 이상으로 발달한 비율은 FBS첨가에서 2-, 4-, 8- 및 16-세포기배가 각각 20, 27, 94 및 100%였고, RNS첨가에서는 각각 8, 7, 94 및 100%로 FBS와 RNS 공히 2~4세포기배가 8~16-세포기배보다 낮았으나 8~16-세포기배에서는 FBS와 RNS간에 차이가 없었다. 그러므로 생쥐 수정란 8-세포기 이상을 배양할 때 FBS와 RNS의 혈청 중 어느 것을 사용하여도 좋을 것으로 동일한 결과를 나타낼 것으로 사료된다.

2~4세포기배의 발달율이 낮은 이유는 생쥐배의 체외 배양시 2- 혹은 4-cell block이 존재하고(Pomp등, 1988; Carroll 등, 1991), 또한 혈청은 초기 발달과정에서는 배아의 발달을 억제하나 부화과정에서는 발달을 촉진하기 때문인 것으로 사료된다(정 등, 1991).

2. 수정란 배양에 의한 H-Y항체의 생성 확인

ICR계 생쥐 8~16세포기 수정란을 H-Y항혈청과 보체가 함유된 배양액에서 24~48시간 배양한 후 발달상태를 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

배양 후 발달한 수정란의 비율은 FBS와 RNS+GPC가 각각 100과 82.4%로 보체 첨가가 무첨가에

Table 1. Effect of FBS and RNS on the developement of 2- to 16-cell mouse embryos *in vitro* culture

Type of serum	Stage of embryo	Culture time (hrs)	No. of embryo examined	No. (%) of embryo developed			
				Ast	16-cell	Mo	Bl
FBS	2-cell	72	10	7(70)	1(10)	2(20)	
	4-cell	72	10	6(40)	5(33)	3(20)	1(7)
	8-cell	48	16		1(6)	1(6)	14(88)
	16-cell	48	6				6(100)
RNS	2-cell	72	12	8(67)	3(25)	1(8)	
	4-cell	72	14	11(79)	2(14)	1(7)	
	8-cell	48	15	1(6)		1(7)	13(87)
	16-cell	48	7				7(100)

FBS:Fetal bovine serum, RNS:Normal rat serum, Ast:Arrested embryo, Mo:Morula, Bl:Blastocyst

비해 약간 낮았다. 한편 배양 후 발달한 수정란의 비율은 항혈청 A, B, C 및 D가 각각 52.6, 52.1, 53.6 및 53.3%(평균 52.9)로 FBS와 RNS+GPC의 100과 82.4%보다 현저하게 낮았다. 본 시험의 결과는 생쥐 수정란을 H-Y항체와 보체 존재하에서 배양했을 때 50% 전후가 발달을 중지한다는 Korc와 Goldberg (1976), Epstein 등(1980)의 보고와 거의 일치하였다. White 등(1983)은 흰쥐의 H-Y항혈청 존재하에서 8~16세포기 ICR계 생쥐 수정란을 배양하였을 때 47.9%가 퇴화하였다고 보고하였다. 본 실험에서 수정란을 항혈청에 노출하였을 때 발달한 수정란은 자성으로, 발달이 지연된 수정란은 웅성으로 추측되며 항혈청은 H-Y항체를 보유하고 있는 것으로 시사된다.

3. H-Y항혈청이 수정란의 발달에 미치는 영향

H-Y항혈청과 보체를 10%와 20%(v/v) 각각 포함된 배양액에서 생쥐 수정란을 24~48시간 배양했을 때 수정란의 발달에 미치는 영향은 Table 3에서 보는 바와 같다.

FBS 또는 RNS 첨가된 배양액에서 생쥐수정란을 배양했을 때 hatching배반포로 발달한 수정란의 비율은 각각 94.5%와 90.9%로 FBS와 RNS간에 차이가 없었다. 또한 RNS와 보체를 첨가한 배양액에 배양하였을 때 발달한 수정란의 비율은 82.3%로 FBS와 RNS보다는 발달율이 약간 떨어졌으나 현저하게 떨어지지는 않았다. 그러나 흰쥐 H-Y항혈청과 보체가 포함된 배양액에서 생쥐 수정란을 배양했을 때는 이중에서 47%가 배반포로 발달하였고, 나머지 53%는 발달이 정지되거나 파괴되었다.

정 등(1989)은 H-Y항혈청과 보체의 존재하에서 생쥐수정란을 배양하였을 때 47~57%의 수정란이 파괴되었다고 보고하였다. Ladd 등(1983)도 H-Y항혈청에서 ICR계 16-세포기 생쥐수정란을 배양하였을 때 자성과 웅성이 47과 53%였다고 보고하였다. Kroc와

Table 2. Detection of H-Y antibody in antiserum by culture of mouse embryos*

Item	FBS	RNS+GPC	Antisera + GPC			
			A	B	C	D
No. of embryo cultured	15	17	19	23	28	15
No.(%) of embryo developed[a]	15 (100.0)	14 (82.4)	10 (52.6)	12 (52.1)	15 (53.6)	8 (53.3)

GPC:Guinea pig complement

* 8~16 cell stage embryos

a:developed to hatching blastocyst.

Table 3. Effect of rat anisterum on *in vitro* development of 8- to 16-cell mouse embryos

Medium	No. of embryos examined			Developed / Total(%)
	Total	Developed	Undeveloped	
Ham's F-10+FBS	37	35	2	94.5
Ham's F-10+RNS	22	20	2	90.9
Ham's F-10+RNS+GPC	17	14	3	82.3
Ham's F-10+RAS+GCP	85	40	45	47.0

RAS:Rat antiserum

Goldberg(1976)는 8~16세포기 생쥐수정란을 보체와 H-Y항혈청이 포함된 배양액에서 배양하였을 때 약 44%의 수정란에서 발달정지 또는 파괴현상이 관찰되었다고 보고하였으며, Utsumi 등(1991)은 DA계통의 흰쥐 비장세포를 항원으로 하여 제조된 H-Y항혈청을 포함한 배양액에서 흰쥐의 상실배를 배양하였을 때 상실배 중 57%가 파괴되었다고 보고하였다. Hood 등(1984)은 H-Y항원을 가지고 있는 웅성수정란의 세포막에 결합된 H-Y항체는 보체의 도움으로 세포막의 선택적 투과성을 가지고 있는 구멍외에 세포막이 통제할 수 없는 새로운 구멍을 만들어 세포외의 용액이 세포질로 유입되어 삼투압의 차이에 의해 할구가 파괴되거나 발달중지 현상이 일어난다고 보고하였다.

Utsumi 등(1983)은 흰쥐 수컷 비장세포를 항원으로 제조된 H-Y항혈청 또는 항혈청과 보체 존재하에서 흰쥐 상실배를 배양하였을 때 상실배의 57% 또는 43%가 파괴되었다고 하였는데 본 실험에서는 항혈청과 보체존재하에서 8~16-세포배를 배양하였을 때 53%가 파괴되었다. 이상의 결과에서 H-Y항체와 보체에 영향을 받아 발달중지 혹은 용해현상을 보인 수정란은 웅성으로, 영향을 받지 않고 정상적으로 발달한 수정란은 자성으로 시사된다.

Ⅳ. 적 요

본 실험은 웅성흰쥐의 비장세포를 H-Y항원으로 제조한 혈청이 H-Y항체를 가지고 있는지, 또는 H-Y항혈청이 웅성수정란의 발달을 저해하는지를 검토하기 위하여 실시하였다. 이 실험에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 2~16-세포기의 생쥐배를 FBS와 RNS를 각각 16% 함유한 Ham's F10에서 48~72시간 배양했을 때 상실배 이상으로 발달한 비율은 FBS에서 2-, 4-, 8- 및 16-세포기배가 각각 20, 27, 94 및 100%였고 RNS에서 각각 8, 7, 94 및 100%로 FBS와 RNS공히 2~4세포기배가 8~16세포기배보다 낮았으나 8~16-세포기배에서는 FBS와 RNS간에 차이가 없었다.
2. 8~16-세포기의 생쥐배를 FBS, RNS+GPC 및 항혈청+GPC가 함유된 Ham's F10에서 24~48시간 배양했을 때 hatching 배반포로 발달한 수정란의 비율은 각각 100, 82.4 및 52.1~53.6%로 RNS+GPC보다 항혈청+GPC에서 현저히 낮아 항혈청+GPC는 웅성수정란의 발달을 억제하는 것으로 시사된다.
3. 8~16 세포기의 생쥐배를 FBS, RNS, RNS+GPC 및 RAS+GPC가 함유된 Ham's F10에서 24~48시간 배양했을 때 hatching 배반포로 발달한 수정란의 비율은 각각 94.5, 90.9, 82.3 및 47%로 RAS+GPC는 약 50%의 수정란이 발달하였으며 발달한 수정란은 자성으로 시사된다. 웅성흰쥐의 비장세포를 H-Y항원으로 하여 제조한 혈청은 웅성수정란의 발달을 억제하는 H-Y항체를 소유하는 것으로 시사된다.

Ⅴ. 인용문헌

1. Bennett. D. and E. A. Boyse. 1973. Sex ratio in pregnancy of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserm. Nature 245:308~309.
2. Carroll, J., D. C. Whittingham and M. J. Wood. 1991. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. J. Reprod. Fert. 93:71~79.
3. Eichwald, E. J. and C. R. Silmser. 1955. United communication. Transplant. Bull. 2:148~149.
4. Epstein, C. J., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Tissue Antigen 15:63~67.
5. Goldberg, E. H., E. A. Boyse, D. Bennett, A. Scheid and E. A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y(male) antigen on mouse sperm. Nature 232: 478~480.
6. Hood, L. E., I. L. Weissman, W. B. Wood and J. H. Wilson. 1984. Immunology. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc., pp. 62~67.

7. Klein, J. 1979. The major histocompatibiltiy complex of the mouse. Science 203: 516~521.
8. Kroc, C. J. and E. H. Godberg. 1975. H-Y (male) antigen detection on eight-cell mouse embryos. Science 193:1134~1135.
9. Ladd, P. C., J. A. Hancock, B. K. Jones and D. A. Synder. 1983. Development of early-mouse embryos in Ham's F10. Bmoc-3 and PBS media. Therio. 19:136.
10. Pomp, D., E. S. Critser and J. J. Rutledge. 1988. Lower sodium lactate in Whitten's medium improves *in vitro* developmental capactiy of one-cell mouse embryos. Theriolgenology 29(5):1019~1025.
11. Silvers, W. K. and S. L. Yang. 1973. Male-specific antigen: It's homology in mice and rats. Science 180:570~572.
12. Silvers, W. K. and S. S. Wachtel. 1977. H-Y antigen:Behavior and function. Science 195:956~960.
13. Utsumi, K., E. Satoh and A. Iritani. 1991. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. J. Exp. Zoo. 260:99~105.
14. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1983. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. J. Reprod. Immunol. Suppl. 59.
15. Utsumi, K., E. Satoh, M. Yuhara and M. Yamada. 1985. Development of sexed goat and cow embryo by H-Y antibody. J. Mamm. Ova. Res. 2:86~89.
16. Wachtel, S. S., G. C. Koo, E. E. Zuckerman, U. Hammerling, M. P. Scheid and E. A. Boyse. 1974. Serological crossrecativity between H-Y(male) antigen of mouse and man. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71:1215~1218.
17. White, K. L., G. W. Linder, G. B. Anderson and R. H. Bnodurant. 1983. Cytolytic and fluorscent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Therio. 19:701~705.
18. Zenzers, M. T., U. Müller, I. Aschmoneit and U. Wolf. 1978. Studies on H-Y antigen negative. Hum. Genet. 45:297~303.
19. 고정재, 심호섭, 김종배, 박홍양, 정길생. 1986. H-Y항체활성의 최적조건과 종간 교차반응. 한국가축번식학회지 10:168~174.
20. 이창규, 정구민, 김수현, 임경순. 1990. H-Y항체에 의한 토끼배의 성조절에 관한 연구. Ⅰ. 배의 발달과 형광 발현에 의한 자·웅 수정란의 분리. 한축지 32(7):377~384.
21. 정구민, 문시용, 이진용, 장윤석. 1991. 인간 양수에 의한 생쥐 전핵기 1-세포배의 체외 발생 촉진 효과에 관한 연구. 대한불임학회지 18(2):173~179.
22. 정장용, 박충생, 박희성. 1989. Rat H-Y 항체에 의한 생쥐 Embryo의 성조절에 관한 연구. Ⅱ. H-Y항체의 처리가 생쥐 Embryo의 발달에 미치는 영향. 한축지. 31(8):497~503.