

**Y 염색체 특이성 DNA분리와 단일 H-Y 항체 개발에 의한
토끼의 수정란 성 감별에 관한 연구**
**II. PCR을 이용한 Y 염색체 특이성 DNA의 증폭에 의한
토끼 수정란의 성 감별**

박영일 · 임경순 · 한재용 · 남경우 · 황규춘 · 박화춘
서울대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

**Studies on Isolation of Y-specific DNA Marker and Development of
Monoclonal H-Y Antibody for Embryo Sexing in Rabbit**
**II. Sex Determination of Rabbit Embryo by PCR
Amplified Y-specific DNA**

Park, Y. I., K. S. Im, J. Y. Han, K. W. Nam, K. C. Hwang and H. C. Park

Department of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Science,
Seoul National University, Suweon, 441-744, Korea

SUMMARY

The purpose of this study was to develop the diagnosis techniques for sex determination of rabbit embryos at preimplantation stage. To detect male specific sequences using polymerase chain reaction, two genes functional on sex determination including SRY and ZFX /Y genes were targeted using multiple oligonucleotide primer sets. Three of them for conserved SRY gene were used for appropriate amplification pattern, and then only one primer set #3 proved to be most efficient, showing male-specific strong signal of amplified sequences. Using this male specific 214bp bands, being reinforced to be appropriate system by detecting consensus male specific bands from human, cattle, pig and mouse, the gender of rabbit was determined. As an another system for sex determination system, amplified 910bp fragment from ZFX /Y was digested with several restriction endonuclease and showed gender specific restriction fragments only by Hinf I. Using two different system for sex identification of rabbit in this study, blind tests for 17 samples was conducted and showed identical results from two different methods. And then, amplification limit of PCR reaction for template DNA was estimated using various amounts of DNA for both SRY and ZFX /Y systems, resulted as 20pg and 800pg, respectively. With this results, test for gender identification of rabbit embryos were performed using SRY derived amplification system. From total 22 embryos selected for its developmental state 18 were identified as male embryos, showing significant difference from expected sex ratio 1:1. This biased sex ratio was

interpreted as to have been caused by the fact, reported by several researchers, that male embryos develop more rapidly and are more resistant against the *in vitro* manipulation than female embryos.

I. 서론

가축의 성감별에 의한 산자 생산은 산자의 성별에 따라 생산능력이 차이를 보이기 때문에 많은 연구가 진행되어 왔다. 이를 위한 가장 효율적인 방법으로 성별에 따라 분리된 정자를 이용하여 인공수정을 실시하면 성 지배가 가능하므로 여러 가지 정자의 성별분리법이 시도되어 왔다(Barlow와 Vosa, 1970; Roberts, 1972; Sarkar 등, 1984). 그러나 flow cytometry법을 이용한 정자의 성별분리 방법 이외의 중량이나 표면항원에 의한 분리는 실용적인 적용이 어렵다(Roberts 등, 1972; Johnson 등, 1988). 따라서 정자의 성별분리는 아직 산업적 이용이 불가능한 상태이며, 이러한 방법을 보완하고자 초기 수정란 단계에서의 성감별을 실시하고자 많은 연구가 시도되었다. 이러한 방법에는 세포유전학적 성염색체 검색법(Rall과 Reibo, 1987), 암수 수정란의 대사활성 차이에 의한 특정 효소 역가 측정에 의한 성 감별법(Monk와 Handyside, 1988)과 웅성특이 항원을 이용한 성 감별법(White 등, 1883) 등이 시도되었다. 그러나 염색체를 이용한 방법은 중기 상의 염색체를 분리하기 위해서 수정란 세포의 생김기술이 필요한데 수정란의 발달에 영향을 미치기 때문에 대략 50% 정도의 성공률만을 보이고 있으며, 수정란의 대사 활성 차이를 이용한 방법의 경우는 그 정확도가 낮고 수정란에 독성을 보이기 때문에 실용화가 불가능하다. 웅성 특이 항원을 이용한 성 감별법은 수정란에 손상을 주지 않는 방법으로서 그 이용성이 주목되고 있으나 정확한 수정란 성감별 효율이 87%를 넘지 못하고 있어 그 정확성을 높일 수 있는 새로운 방법의 개발을 필요로 하고 있다.

세포 수준에서의 검색에 의한 수정란의 성감별 기법은 포유동물의 성 결정 유전자인 SRY(sex determining region Y) 유전자와 웅성과 자성에서 차이를 보이는 ZFX/Y 유전자가 개발됨에 따라 이들 유전자를 이용한 DNA 수준의 성감별 기법으로 발달하였다(Sinclair 등, 1990; Page 등, 1987). 또한 기능이 알

려져 있지 않은 Y 염색체 상의 웅성특이적인 반복염기 서열을 이용하여 수정란의 성을 판별하기 위한 기법도 여러 연구자들에 의해 보고되었는데, DNA서열을 직접 혼성화 반응에 의해 수정란의 성을 판별하는 데에는 많은 양의 DNA가 필요하고 성을 결정하는 데에 많은 시간이 걸린다는 단점이 존재한다(West 등, 1987; Leonard 등, 1987; Bondioli 등, 1989). 이러한 Y 염색체 특이 반복 DNA서열을 이용한 성 감별법은 최근의 PCR(Polymerase Chain Reaction) 기술을 도입하여 적은 수의 수정란 세포로부터 용이하게 성감별을 실시할 수 있게 발달되었다(Bradbury 등, 1990; Peura 등, 1991; Handyside 등, 1989). 그러나 Y 염색체 특이 반복서열은 여러 생물종에 공통적으로 존재하는 것이 아니라 각각의 종에 따라 적절한 PCR primer를 선정해야 한다는 번거로움이 존재한다(Schwerin와 Pitra, 1994).

본 연구는 Y 염색체 특이 DNA 부위로서 포유동물의 성 결정에 중요한 기능을 갖는 SRY유전자 부위와 ZFX/Y 유전자 부위를 이용하여 토끼 수정란의 성을 판별할 수 있는 기법을 개발하고자 PCR 증폭기법을 확립하였고, 이를 생검된 수정란 세포에 대한 성감별 기법에 적용하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

DNA 추출을 위해 암수 각 10수의 토끼와 암수 각 2마리의 소, 생쥐, 닭 그리고 남자와 여자의 혈액을 이용하였다. 헤파린이 coating된 주사기를 이용하여 토끼의 귀 정맥에서 15ml 정도의 혈액을 채취하였고 생쥐의 경우는 꼬리 조직을, 소와 돼지의 경우는 경정맥으로부터, 닭의 경우는 익정맥으로부터 혈액을 채취하였다.

2. DNA 추출

채취된 혈액은 원심분리를 통하여 백혈구 세포만 분리하였다(닭의 경우는 모든 혈구세포를 이용할 수 있

었다). 분리된 혈구 세포는 $1 \times \text{SSC}$ 로 2회 정도 세척한 후 lysis buffer와 proteinase K를 사용하여 55°C 정도의 water bath에서 lysis시켰다. Lysis된 백혈구 세포를 동량의 phenol로 2회 처리한 후 phenol:chloroform(1:1)을 2회 처리하여 단백질을 제거하였다. 그리고 chloroform:isoamylalcohol(24:1)을 3회 처리하여 phenol을 제거하였다. 추출된 DNA는 알코올을 이용하여 침전시킨 후 재 용해시키거나 dialysis tubing bag을 이용하여 TE buffer(EDTA 1mM, 10mM Tris-Cl, pH 8.0)에 dialysis시킨 다음 DNA를 회수하였다. 분리된 DNA는 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 순도와 농도를 측정하였다.

3. Oligonucleotide primers

웅성 특이 DNA 부위로 포유동물의 성 결정에 관여하는 SRY 유전자의 중간 진화적 상동부위인 HMG box 부위를 이용하여 토끼의 성 감별에 이용하고자 하였다. SRY 유전자의 590부위에서 804 부위내에서 3쌍의 primer를 작성하였고 각각에 대한 웅성 특이 증폭양상을 비교하였다. 이들 중 가장 적절한 증폭양상을 보이는 primer쌍을 선별하고자 하였다. 또한 ZFX/Y 유전자의 차이에 의한 토끼의 성을 판별하고자 소의 ZFX/Y 유전자의 동물중간의 상동부위를 대상으로 PCR증폭을 시도하였다(Schneider-Gadicke 등, 1989). Table 1에 작성된 primer의 각 유전자에 대한 증폭부위와 염기서열을 제시하였다.

4. 수정란 준비

토끼의 수정란의 준비는 발정후 다배란 처리된지 6~7일된 토끼의 암컷으로부터 uterine-stage에 있는 수정란을 채란하였다. 0.2%(v/v) BSA(bovine serum albumin)을 첨가한 PBS(phosphate buffered saline; pH 7.2~7.4, 삼투압 270~285 mOsm/kg)가 난자 세척에 이용되었고 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum)을 첨가한 Ham's F10(pH 7.5, 삼투압 280~285 mOsm/kg)이 난자의 배양에 사용되었다. 배양액은 사용하기 전에 $0.22\mu\text{m}$ 여과기로 여과하였다.

초기 상실배와 후기 상실배 사이(16~32세포기)에서 우수한 수정란을 biopsy를 위해 선발하고 수정란을 H_2O $10\mu\text{l}$ 가 든 PCR tube에 옮겼다.

5. Polymerase chain reaction

토끼의 암수 DNA를 구별하기 위해 제작된 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. $10 \times \text{PCR buffer}$ (500mM Tris-Cl, pH 8.0, 100mM KCl, 15mM MgCl_2 , 0.1% gelatin, 1% triton X-100) $5\mu\text{l}$, 2.5mM dNTP $4\mu\text{l}$, 각 5~20pmol의 primer, 10~200ng의 DNA를 혼합하고 Taq DNA polymerase 2 unit을 첨가한 후 $50\mu\text{l}$ 로 최종 부피를 조절하여 PCR을 실시하였다. PCR반응 혼합물이 든 tube를 95°C 에서 5분간 denaturation시키고, 94°C 에서 1분, 55°C

Table 1. 유전자와 ZFX/Y 유전자 증폭을 위한 oligonucleotide primer

Primer	Direction	Position(length)	Sequence	References
SRY #1a	Forward	591~610(20mer)	AAGCGACCCATGAACGCATT	Sinclair 등(1990)
SRY #1b	Reverse	763~782(20mer)	GTATTTCTCTCTGTGCATGG	Sinclair 등(1990)
SRY #2a	Forward	639~457(19mer)	AAGGTGGCTCTAGAGAATC	본 실험
SRY #2b	Reverse	742~760(19mer)	AGTAGTCTCTGTGCCCTCT	본 실험
SRY #3a	Forward	591~621(31mer)	AAGCGACCCATGAATGCATTCAT- GGTGTGGT	본 실험
SRY #3b	Reverse	768~804(37mer)	GAGGTCGATACTTATAGTTCG- GGTATTTCTCTCTGTG	본 실험
ZFA	Forward	317~337(21mer)	TGGGAAGCATTCTCCCATGC	Schneider-Gadicke 등(1989)
ZFB	Reverse	1204~1226(23mer)	CATTATGTGCTGGTTCTTTTCTG	Schneider-Gadicke 등(1989)

62℃에서 1~2분, 72℃에서 1분의 반복을 45회 실시하였다. 반응이 끝난 산물은 72℃에서 7분의 마지막 합성을 한 후 전기영동에 이용하였다.

준비된 수정란의 성감별을 위해서는 생검된 수정란 세포를 1× PCR buffer에 2~3회 세척한 후 10μl의 증류수에 넣어 동결하여 보관한 후 실험에 이용하였다. 동결된 수정란 세포를 녹인 후 40μl의 멸균된 mineral oil을 넣은 다음 97℃에서 3분, 55℃에서 3분의 처리를 5회 실시한 다음 PCR반응에 필요한 시약을 넣고 위의 혈액 유래 DNA의 증폭 조건과 동일한 조건 하에서 PCR 증폭 반응을 실시하였다.

6. 전기 영동

PCR반응이 끝난 반응 산물을 관찰하기 위해 1× TBE buffer하에서 6%의 polyacrylamide gel이나 3~4% agarose gel을 이용하여 전기 영동을 실시하였다. 전기 영동이 끝난 gel은 ethidium bromide에 의해 염색한 후 UV transilluminator 하에서 관찰하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 혈액 유래 DNA를 이용한 토끼의 성 감별

1) SRY 유전자를 이용한 토끼의 성 감별

작성된 oligonucleotide primer를 이용하여 토끼의 성감별이 가능한지 여부를 알아보기 위해 PCR반응을 실시하였다. SRY 유전자에 대한 증폭은 62℃에서 primer를 annealing하여 45회의 PCR을 실시하였다. Fig. 1은 토끼의 암수 DNA를 이용하여 실시한 PCR 증폭 산물을 나타내고 있다. Primer SRY #3에 의해 양성인 경우 특이적으로 214bp 크기의 증폭 산물이 나타났으며 (화살표로 표시하였음) 자성의 경우에는 나타나지 않았다. Primer SRY #1과 #2의 경우에도 예상된 양성 특이 증폭 산물을 관찰할 수 있었으나 primer SRY #3에 의한 증폭 산물에 비해 그 증폭량이 적었다. 따라서 이후의 실험에는 SRY #3 primer 쌍을 이용하였다. #3에 의한 양성 특이 증폭 여부를 보다 정확하게 확인하기 위해 토끼 암수 각 6마리에서 증폭 양상을 관찰하였고 그 결과 양성특이적인 증폭양상을 확인할 수 있었다. 따라서, 예상된 증폭 부위에

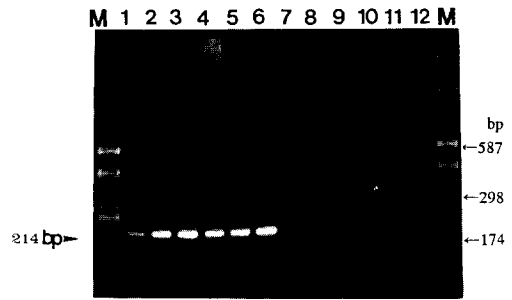


Fig. 1. Amplified sequences from SRY gene for sex determination of rabbit. DNA fragments were analysed in 4% agarose. Lane 1~6: male rabbit, Lane 7~12: female rabbit, M: pUC19 DNA digested with Hae III.

해당하는 크기의 증폭산물을 얻을 수 있었고 여러 개체의 암수를 대상으로 한 경우에도 양성 특이적인 증폭양상을 확인할 수 있었으므로 토끼의 성감별을 위해 이용할 수 있었다(Sinclair, 1990).

또한 본 실험에 이용된 primer쌍에 의한 증폭대상의 SRY 유전자 부위가 여러 동물에서도 양성 특이적인 증폭 양상을 나타내는지 확인하기 위해 사람과 소, 돼지, 생쥐, 닭의 암수 DNA를 이용하여 증폭을 실시하였다(Fig. 2)

사람과 소, 돼지, 토끼, 생쥐의 모든 포유류에서 양성특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었다. 그러나 사람과 생쥐의 경우는 자성에서도 동일한 크기의 band가 약하게 나타나 SRY 유전자와 비슷한 구조의 유전자의 일부가 비 성특이적으로 증폭되었음을 예상할 수 있었다. 이들을 제외한 소와 돼지, 토끼의 경우는 수컷의 경우에만 증폭산물이 나타나 성관별이 가능하였다. 그러나 닭의 경우는 암수 공통으로 해당 크기의 band가 관찰되어 SRY유전자를 이용한 자성의 구분은 불가능하였다. 그러나 증폭된 산물은 닭의 SRY유전자 존재 여부를 검색하기 위한 연구에 이용될 수 있을 것이다.

2) ZFX/ZFY 유전자를 이용한 토끼의 성 감별

Fig. 3A는 ZFX/Y 유전자를 대상으로 한 토끼의 증폭 양상을 보이고 있다. SRY유전자와 동일한 조건

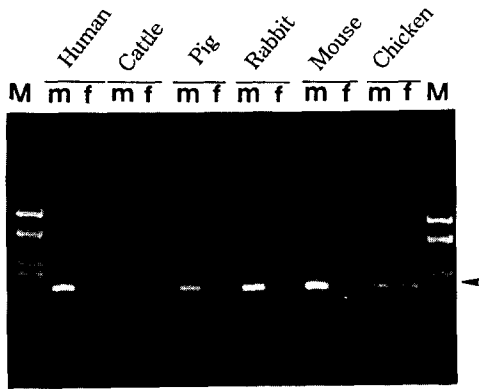


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified SRY fragments from various animals. m: male, f: female. DNA fragments were analysed in 4% agarose gel and stained with EtBr. M: molecular size marker, pUC 19 DNA digested with Hae III.

하에서 증폭되었으며 암수 각각 3마리의 개체에서 공통으로 910bp 크기의 증폭산물을 관찰할 수 있었고, 사람과 소에서도 동일한 크기의 증폭산물을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B). 그러나 생쥐의 경우는 해당 크기의 증폭 산물보다 작은 400bp 크기의 band가 나타났다. 닭의 경우에는 본 실험에 이용된 ZFX/Y에 관련된

유전자 부위가 증폭되지 않아 포유류와 다른 특성을 보였다. 증폭된 산물을 이용하여 암수간의 차이를 파악하고자 사람과 소, 고래, hyena 등에서 다형성이 보고된 EcoR I, Hae III, Hinf I, Pst I, Msp I 등을 이용하여 토끼의 ZFX/Y 유전자의 RFLP양상을 관찰하고자 하였다(Fig. 4)(Aasen과 Medrano, 1990; Pollevick 등, 1992; Palsboll 등, 1992; Schwerin과 Pitra, 1994). 토끼의 경우는 사람과 소, 고래 등과는 달리 Hinf I에 의해 암컷의 경우는 4개의 단편을 수컷의 경우는 7개의 단편을 보여 성 특이 RFLP양상을 나타내었다. 따라서 토끼의 ZFX/Y와 Hinf I을 이용하여 성감별이 가능함을 알 수 있었다.

3) 성 감별의 정확도 검증

토끼의 성 감별을 위해 이용된 SRY 유전자와 ZFX/Y 유전자 유래 증폭산물은 공통적으로 음성 특이적인 band양상을 통해 성 감별을 실시할 수 있으나 이들 방법간의 정확성을 비교하기 위해 18개체의 임의의 토끼 개체들에 대해 서로 다른 두가지 방법을 이용하여 성 감별을 실시하였다. Fig. 5는 SRY유전자를 이용한 성감별과 ZFX/Y를 이용한 성 감별의 일치율을 보여주고 있다. 17개체중 9 마리가 음성특이 SRY유전자의 증폭과 ZFY특이 Hinf I절단양상을 보였다. 따라서 SRY와 ZFX/Y를 이용한 토끼의 성 감별은 실제 수정란을 이용한 경우에도 적용 가능할 것으로 판단되었다.

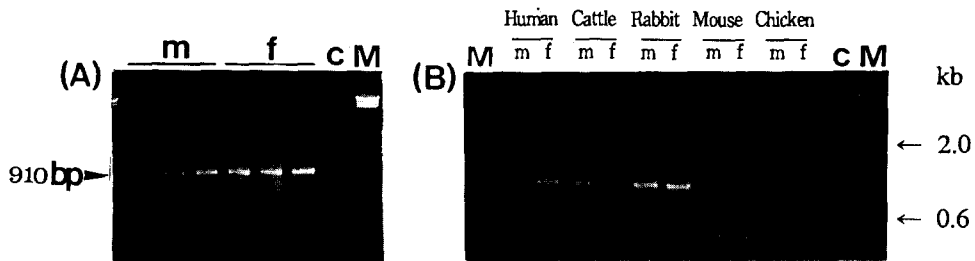


Fig. 3. Amplification of ZFX/Y gene from various animals. Separation of amplified sequences were conducted in 2% agarose gel. (A) Amplified products from each 3 male and female rabbit individuals. (B) Detection of amplified ZFX/Y product from various animals. M: Lambda DNA digested with Hind III. C: Control amplification without genomic DNA.

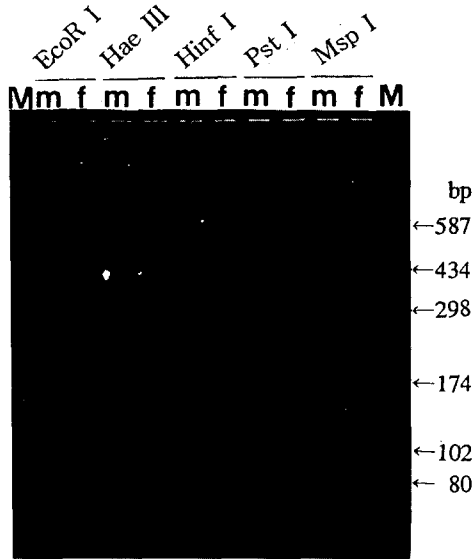


Fig. 4. Identification of Hinf I RFLP in male and female rabbit amplified ZFX/Y sequences. Amplified products were treated with designated restriction endonuclease and separated in 6% polyacrylamide gel. m: male, f: female. M: pUC19 DNA digested with Hae III.

2. 혈액 유래 DNA를 이용한 PCR 증폭조건의 민감도 측정

혈액에서 유래된 DNA를 대상으로 한 토끼의 성감별 기법을 실제 수정란을 대상으로 하여 적용하기 위해서는 적은 수의 생검된 세포로부터 효율적으로 SRY 유전자와 ZFX/Y 유전자 부위를 증폭하는 것이 가능하여야 한다. 따라서 이미 확립된 PCR 증폭 조건의 증폭 한계를 알아보고 보다 효율적인 증폭 조건을 수립하기 위해 PCR 증폭에 이용되는 DNA의 양을 점차적으로 줄여서 그 증폭 한계에 해당하는 DNA량을 점진적으로 줄였다. Fig. 6은 토끼의 웅성 DNA를 대상으로 점차적으로 그 양을 줄여서 실시한 SRY 유전자에 대한 PCR 증폭 양상이다. 위의 결과로써 20pg의 DNA에 대해서 SRY 유전자의 증폭이 가능하였고 10pg에 대해서는 증폭이 되지 않았다. 따라서 본 실험에서 사

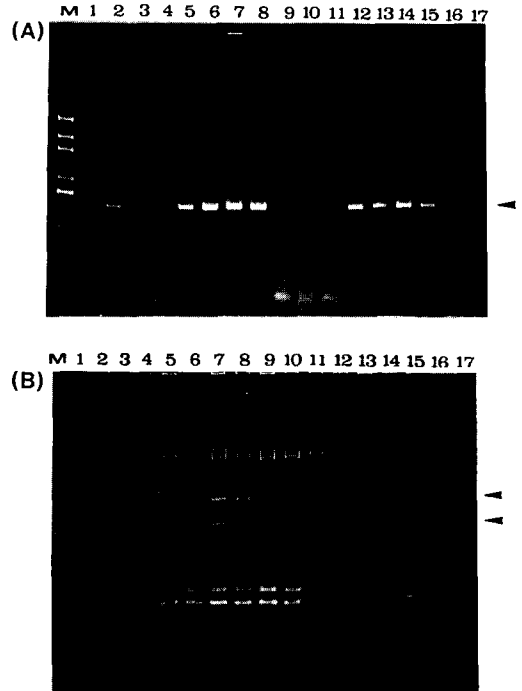


Fig. 5. Identical pattern between SRY and ZFX/Y-Hinf I RFLP for sex determination of 17 rabbit genomic DNA. (A) Sex determination with SRY derived sequence. (B) Sex determination by ZFY specific RFLP pattern. M: pUC19 DNA digested with Hae III.

용된 PCR 증폭 조건의 한계는 10pg과 20pg의 사이에 있는 것으로 판단되었다. 20pg의 DNA는 약 3개의 세포에서 유래된 DNA량에 해당하는 것이며 따라서 상실배의 5~6개의 생검된 세포로부터 충분히 SRY 유전자를 증폭해 낼 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 본 실험의 PCR 조건은 생검된 수정란 세포를 대상으로 하여서도 적용 가능할 것으로 예상되었다.

그러나 ZFX/Y의 경우는 800pg의 DNA를 이용하여서는 증폭 산물을 얻을 수 있었으나 200pg을 이용하여서는 증폭 산물을 관찰할 수 없었다. 이는 30~40개의 세포가 가지는 DNA량에 해당하는 것이며 실제 수정란을 대상으로한 성 감별에의 적용은 불가능한 것으

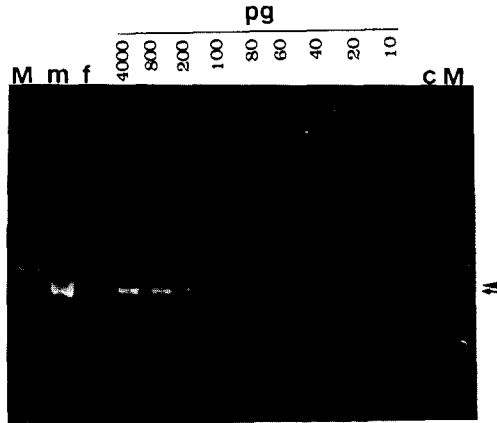


Fig. 6. Gel electrophoresis of PCR products of SRY sequences obtained with various amounts of male genomic DNA. The amount of DNA for each lane was presented in picogram. m: male, f: female, C: control without template DNA, M: pUC 19 DNA digested with Hae III.

로 판단되었다. 따라서 추후의 수정란의 성을 판별하기 위해서는 SRY 유전자 부위를 대상으로 하는 증폭 기법이 이용되었다. 그러나 Fig. 6에서 보는 바와 같이 증폭에 이용된 DNA량이 80~40pg 수준에 있는 경우에는 예상된 124bp보다 작은 band가 추가적으로 증폭되는 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 template DNA량이 80~40pg 수준에서 반복적으로 나타나므로(결과는 제시하지 않음) 이는 primer와 template DNA간의 분자 수의 비율의 변화에 기인하는 것으로 판단되었다. 또한, 이러한 band가 SRY 유전자와 마찬가지로 Y 염색체에서 유래된 것인지 여부를 알아보기 위해 토끼의 암수 DNA를 대상으로 DNA량을 변화시켜 증폭 양상을 관찰하였다(Fig. 7).

암수 각각 400ng에서 100pg까지 DNA량을 달리하여 SRY 유전자를 증폭하였다. 그 결과 Fig. 6과 마찬가지로 음성특이 SRY 유전자 증폭 산물을 관찰할 수 있었으며 자성의 경우는 DNA의 양이 과량으로 존재하는 경우에도 음성에서 나타나는 SRY 유전자의 증폭 산물은 나타나지 않았다. 그러나 400ng과 200ng의

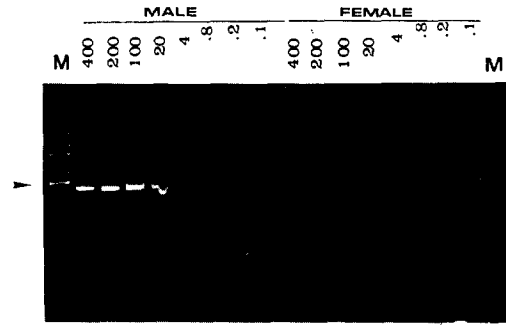


Fig. 7. Comparison between male and female amplification pattern with various amounts of DNA. The amount of incorporated DNA for each amplification was presented in nanogram above the lanes. M: pUC19 DNA digested with Hae III.

경우 Fig. 6에서 나타난 추가적인 작은 band가 약하게 증폭됨을 관찰할 수 있었다. 이는 SRY 유전자가 Y 염색체 상의 음성 특이적인 성 결정에 관련된 유전자 부위 이외에 여러 가지 다른 유전자와 유사한 공통 부위를 가진다는 사실로부터 Y 염색체 이외의 X 염색체나 상동 염색체 부위에 존재하는 부위에서 유래된 증폭 산물로 판단되었다(Coriat 등, 1993). 따라서 수정란을 대상으로 한 SRY 유전자의 증폭시에는 예상되는 124bp 크기의 band가 존재하여야 음성으로 판단할 수 있으며 이보다 작은 추가적인 band의 존재는 수정란의 성 판별과는 무관한 비 성특이적 band로 간주되었다.

3. 수정란을 이용한 토끼의 성 감별

혈액 유래 DNA에 대해 확립된 성 감별 기법을 수정란을 대상으로 하여 그 적용 가능 여부를 알아보기 위해 준비된 상실배 단계(8~16세포)의 수정란을 대상으로 하여 PCR 증폭을 시도하였다. Fig. 8은 수정란을 대상으로 실시된 증폭 양상을 보여주고 있으며 각각의 수정란에 대한 음성 특이적인 증폭 여부를 관찰할 수 있다. Lane 1, 2는 대조구로서 혈액 유래 암수 DNA를 이용한 증폭 양상으로 음성특이 증폭 산물을 볼 수 있으며, Lane 11은 embryo가 포함되지 않은

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M

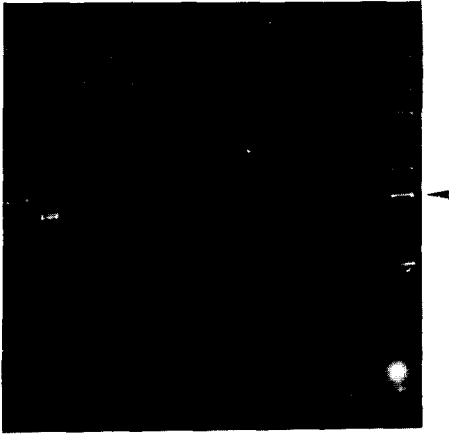


Fig. 8. Sex determination of rabbit embryos using the SRY derived sequences. Lane 1: male, Lane 2: female, Lane 3~10: embryos, Lane 11: control without DNA.

채 PCR반응이 수행된 대조구이다. Lane 3, 5, 10의 경우는 SRY 증폭 산물을 관찰할 수 없어 자성의 수정란으로 판단되었다. 본 연구에서는 22개의 수정란을 대상으로 성 감별을 실시한 결과 18개의 수정란이 옹성으로 판정되어 1:1의 예상된 성비와는 유의적인 차이를 보였다($p < 0.05$). 이러한 차이는 초기수정란의 발달에 있어서 옹성의 수정란이 보다 빠르게 자라며 미세조작, 체외배양 등의 여러 가지 실험조건하에서도 보다 높은 생존율을 보인다는 보고와 같은 경향을 나타내는 것으로(Avery 등, 1989와 1991; Xu 등, 1992) 실험에 이용된 8~16세포단계의 수정란의 선별시에 초기 발달이 빠른 옹성 수정란이 상대적으로 많이 선택되어 이용된 것으로 추측되었다.

IV. 고찰

동물 생산에서의 성 지배 기술은 생산 효율 증진을 위한 매우 혁신적인 기술이며 앞서 살펴본 바와 같이 많은 연구가 오래 전부터 수행되어 왔다(Barlow와 Vosa, 1970; Roberts, 1972; Sarkar 등, 1984; Roberts 등, 1972; Johnson 등, 1988; Rall과 Reibo,

1987; Monk와 Handyside, 1988; White 등, 1883). 이들 방법들 중에서 DNA 서열을 이용한 성의 감별은 수정란 세포 표면의 특성이나 세포내의 효소의 활성, 염색체의 핵형 분석 등의 여러 방법들보다 실용적인 방법으로 평가되고 있다(Thibier와 Nibart, 1995). Y 염색체에 위치하는 여러 DNA 부위는 대부분 X 염색체와 비슷한 특징을 갖으나 특이적인 반복서열과 성 결정에 관여하는 유전자가 존재함이 밝혀져 있다(Page 등, 1987; Sinclair 등, 1990; Bondioli 등, 1989; Kudo 등, 1993). 따라서 PCR기법에 의한 수정란 성 감별기법에 이용할 수 있는 부위는 ZFY/ZFX유전자와 SRY유전자 이외에도 옹성특이 반복서열이 포함된다(Pollewick 등, 1992; Wu, 1993; Bradbury 등, 1990; Handyside 등, 1989). 이들 중에서 Y 염색체에 위치한 옹성 특이 반복서열은 수백번 내지 수천번 반복되어 존재하는 것이 알려져 있기 때문에 적은 수의 세포로부터 용이하게 원하는 부위를 증폭할 수 있어서 성 감별에 유용하다. 그러나 이러한 옹성 특이 반복서열은 절대적으로 Y 염색체 특이적으로 존재하지 않을 수 있어서 몇몇 상동염색체에서도 비슷한 서열이 적은 수로 존재하여 자성의 경우에도 증폭되는 경우도 보고되었다(1990). 또한 반복서열을 이용하여 성 감별을 하는 경우에는 각 동물종에 따라 염기서열이 다르기 때문에 정확하게 염기 서열을 분석한 후에야 적절한 primer를 작성하여 옹성특이 PCR 증폭을 실시할 수 있다. 따라서 옹성 특이 반복서열의 이러한 단점을 극복하기 위해 ZFX/Y유전자의 염수간 차이를 성 감별에 이용하거나 SRY 유전자를 이용한 경우도 보고되었다(Pollewick 등, 1992; Wu, 1993). SRY유전자를 이용한 성 감별 기법은 옹성 특이 반복서열과 비교하여 기능을 갖는 성 결정 유전자의 존재 여부를 바탕으로 하기 때문에 포유동물의 성을 보다 정확하게 파악할 수 있으므로, 증폭 조건의 한계가 극복될 수 있다면 보다 근본적인 성 감별 기법으로 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 포유류의 성 결정에 관여하는 유전자로 알려져 있는 SRY유전자의 중간 상동부위로서 80개의 아미노산을 암호화 하고 있는 SRY 유전자 부위에 대한 PCR 증폭조건을 설정하고 이를 이용하여 토끼 수정란의 성 감별 기법을 확립하였다(Fig. 8). 또한 ZFX/Y유전자를 이용하여 토끼의 염수간의 차이

를 보이는 새로운 RFLP를 개발하여 성 감별에 이용하였다(Fig. 4). 그러나 본 연구에서 이용된 ZFX/Y 유전자에 대한 PCR primer는 적은 수의 수정란을 이용한 수정란의 성 감별에는 적절하지 않았고 SRY 유전자에 대한 증폭이 보다 용이하였다(Fig. 6). 그러나 SRY 유전자와 ZFX/Y 유전자는 포유류의 성 결정에 관여하는 중요한 유전자로 돌연변이에 의한 성 전환 현상이 나타나지 않은 한 개체의 성 감별에 유용한 부위이다. 따라서 이 실험에서 확립된 SRY 유전자를 이용한 성 감별 기법과 더불어 ZFX/Y를 이용한 기법의 개발도 필요하리라 사료되며 보다 민감한 PCR 증폭 기술의 확립이 요구된다. 또한 본 연구에서는 생검된 수정란 세포가 존재하지 않을 경우에 암컷으로 잘못 진단될 수 있는 가능성을 배제하기 위한 장치로써 생검세포를 이용한 PCR 증폭시에 SRY 유전자 이외의 유전자 부위를 암수 공통으로 증폭할 수 있는 기법을 확립하고자 하였다(결과는 제시하지 않았음). 그러나 생검된 세포를 이용한 증폭시에 동시에 두 가지의 PCR primer를 첨가하여 SRY 유전자와 또 다른 상동염색체상의 유전자를 증폭하고자 하였으나 성공적이지 못하였다. 따라서 이러한 목적을 위해 보다 많은 종류의 유전자에 대한 검증이 필요한 것으로 판단되었다. 그러나 SRY 유전자를 단독으로 이용하는 경우에도 수정란 세포의 성을 검증할 수 있었으므로 이 방법을 이용하면 성 감별이 된 산자를 얻을 수 있을 것으로 전망된다.

V. 적 요

본 연구는 토끼 수정란의 성 판별을 위한 DNA 진단 기술을 확립하고자 수행되었다. 웅성 특이적인 유전자 부위를 PCR 증폭하여 개체의 성을 판별하고자 ZFX/Y 와 SRY 유전자를 대상으로 이들 유전자의 동물 종간의 상동 부위에 해당하는 PCR primer들을 작성하였다. SRY 유전자를 대상으로 한 3쌍의 primer중 웅성 특이적이며 가장 높은 증폭 효율을 보이는 primer쌍을 선별하였고 이를 통한 214bp 크기의 웅성 특이 band를 관찰하여 개체의 성을 판별할 수 있었다. 또한 사람과 소, 돼지, 생쥐에서도 동일한 웅성 특이적인 증폭 산물을 관찰할 수 있었으며, 이는 SRY 유전자가 성 결정에 관여하는 웅성 특이 유전자라는 사실과

일치하였다. 또한 ZFX/Y 유전자의 공통 부위에 대해 작성된 primer쌍에 의해 910bp의 증폭 산물을 얻었고 Hinf I 절단에 의해 암수간에 차이를 나타내 토끼 특이적인 RFLP 양상을 발견하였다. 또한 혈액에서 정제된 17마리 토끼 DNA를 대상으로 SRY와 ZFX/Y 유전자 검출에 의한 성 감별을 실시하였고 두 가지 방법에 의한 성 감별 결과가 일치하였다. 확립된 두 가지 성 감별 기법을 적은 수의 생검된 수정란 세포에 적용하기 위해 각 방법의 증폭 민감도를 검증한 결과 SRY와 ZFX/Y에 대해 각각 20pg과 800pg의 증폭한계를 보였다. 따라서 실제 수정란을 대상으로 한 성 감별은 SRY 유전자의 증폭에 의해 수행되었고 22개의 발달 상태가 양호한 수정란을 대상으로 한 결과 18개체가 웅성으로 나타나 예상된 성비 1:1 과는 큰 차이를 보였고 이는 웅성 수정란이 초기 발달에 있어 자성 수정란보다 앞선다는 보고와 일치하는 것이었다.

VI. 인용문헌

1. Aasen, E. and J. F. Medrano, 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8:1279-1281.
2. Avery, B., A. Bak and M. Schmidt, 1989. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology* 32:139-147.
3. Avery, B., C. Madison and T. Greve, 1991. Sex and development in bovine *in vitro* fertilized-embryos. *Theriogenology* 35:953-963.
4. Barlow, P. and C. G. Vosa, 1970. The Y-chromosome in human sperm. *Nature* 226: 961-962.
5. Bondioli, K. R., S. B. Ellis, J. H. Pryor, M. W. Williams and M. M. Harpold, 1989. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31:95-104.
6. Bradbury, M. W., L. M. Isola and J. W. Gordon, 1990. Enzymatic amplification of a Y

- chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:4053-4057.
7. Coriat, A. -M., U. Muller, J. L. Harry, D. Uwanogho and P. T. Sharpe. 1993. PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif. *PCR Method Appl.* 2:218-222.
 8. Handyside, A. H., J. K. Pattinson, R. J. A. Penketh, J. D. A. Delhanty, R. M. L. Winston and E. G. D. Tuddenham. 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* I:347-349.
 9. Johnson, L. A., R. N. Clarke. 1988. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm-activation and pronuclear development of sorted bull, boar and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Res.* 21:335-343.
 10. Kudo, T., S. Sato, S. Sutou. 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *J. Reprod. Dev.* 39:55-63.
 11. Leonard, M., M. Kirszenbaum, C. Cotinot, P. Chesne, Y. Heyman, M. G. Stinnakre, C. Delouis, M. Vaiman and M. Fellous. 1987. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology* 27: 248 abstr.
 12. Monk, M. and A. H. Handyside. 1988. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. *J. Reprod. Fert.* 82:365-368.
 13. Page, D. C., R. Mosher, E. M. Simpson, E. M. C. Fisher, G. Mardon, J. Pollack, B. McGillivray, A. de la Chapelle and L. G. Brown. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104.
 14. Palsboll, P. J., A. Vader, I. Bakke and M. R. El-Gewely. 1992. Determination of gender in cetaceans by the polymerase chain reaction. *Can. J. Zool.* 70:2166-2170.
 15. Peura, T., J.-M. Hyttinen, M. Turunen and J. Janne. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35:547-555.
 16. Pollevick, G. D., S. Giambiagi, S. Mancardi, L. D. Luca, O. Burrone, A. C. C. Frasch, R. A. Ugalde. 1992. Sex determination of bovine embryos by restriction fragment Biot-chnology 40:805-807.
 17. Rall, W. F., S. P. Leibo. 1987. Production of sexed bovine embryos by cytogenetic analysis of cultured demiembryos. *Theriogenology* 27:269
 18. Roberts, A. M. 1972. Gravitational separation of X and Y spermatozoa. *Nature* 238:223-225.
 19. Sarkar, S., D. J. Jolly, T. Friedmann, O. W. Jones. 1984. Swimming behavior of X and Y human sperm. *Differentiation* 27:120-125.
 20. Schneider-Gadicke, A., P. Beer-Romero, L. G. Brown, R. Nussbaum and D. C. Page. 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation.
 21. Schwerin, M. and C. Pitra. 1994. Sex determination in spotted hyena (*Crocuta crocuta*) by restriction fragment length polymorphism of amplified ZFX/ZFY loci. *Theriogenology* 41:553-559.
 22. Seidel, G. E., Jr. 1988. Sexing mammalian sperm and embryos. *Proceedings 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland. Volume 5:136-144.*

23. Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf, R. Lovell-Badge and P. N. Goodfellow. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
24. Thibier, M. and M. Nibart. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43:71-80.
25. West, J. D., J. R. Gosden, R. R. Angell, N. D. Hastie, S. S. Thatcher, A. F. Glasier and D. T. Baird. 1987. Sexing the human pre-embryo by DNA-DNA in-situ hybridization. *Lancet* 2:1345-1347.
26. White, k. L., G. M. Linder, G. B. Anderson, R.H. Bondurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 19:701-705.
27. Wu, B. 1993. Amplification of the sry gene allows identification of the sex of mouse preimplantation embryos. *Theriogenology* 40: 441-452.
28. Xu, K. P., B. R. Yadav, W. A. King and K. J. Betteridge. 1992. Sex-related difference in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 31:249-252.