

## 염색체 분석 기법에 의한 소 체외수정란의 성 조절

손시환 · 박충생\* · 송상현\*

진주산업대학교 낙농자원학과

### Sexing by the Chromosome Analysis of *In Vitro* Fertilized Embryos in Cattle

Sohn, S. H., C. S. Park\* and S. H. Song\*

Dept. Dairy Science & Technology Chinju National University,  
Chinju 660-758, Korea

#### SUMMARY

Sexing and developing from splitted embryos which were fertilized *in vitro* implicate a possibility of production of the superior and sex controlled individuals. This study was carried out to investigate the production of transferable late blastocysts from *in vitro* fertilized embryos and to analyze sex by chromosome analysis from same embryos. In results, the ratio of cleavage and fertility of bovine follicular oocytes matured *in vitro* was 90% in co-cultured with granulosa cells. The competence of embryonic development from *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes was 38% in co-cultured with bovine oviductal epithelial cells. To produce a lot of transferable embryos, therefore, the best condition of culture system was co-cultured with granulosa cells for immature bovine oocytes and then co-cultured with bovine oviductal epithelial cells for matured and fertilized oocytes. In chromosome analysis, 93% of *in vitro* fertilized embryos was induced metaphase and 65% of metaphase plates was analyzed sex. The technical factors were very important aspect in chromosome preparation from bovine embryos such as duration of colcemid treatment, weakening of zona pellucida, methods of hypotonic treatment and fixation treatment.

#### I. 서 론

최근 생물공학기술(biotechnology)에 의한 생물체의 근본적 조작으로서 인간에 유용하고 값싼 식량을 공급하고자 하는 많은 연구들이 활발히 수행되고 있다. 이들 중 축산에 있어 대표적인 가축번식학적 활용 기술로서는 체외수정 및 수정란이식 기술을 바탕으로 수정란을 이용한 인위적 조작기술 등이 소개되고 있는

데 특히 수정란을 이용한 재조합 유전자의 이식 기술이라든가 쌍태의 유기, 핵 이식, 키메라의 생산 및 가축의 성(性)을 수정란의 상태에서 인위적으로 조절하고자 하는 연구 등이 지대한 관심을 가지고 진행되고 있다.

가축에 있어 체외수정에 의한 초기배자 상태에서의 성 조절은 수정란의 일부로서 유전적 분석을 수행하여 이들의 유전적 기능은 물론 성을 판별하고, 나머지의 분할란을 어미에 이식하므로써 원하는 성의 개체

이 연구는 1995년도 한국과학재단 연구비 지원 (과제번호 : 951-0609-013-2)에 의한 결과임.

\* 경상대학교 축산학과(Dept. Animal Science, Gyeongsang National University)

뿐만 아니라 유전적으로도 우수한 개체의 생산이 가능하다. 그러나 이러한 기술은 기존 번식학적 첨단기술이라 할 수 있는 체외수정, 수정란의 인위적 분할, 수정란의 저장, 이식 및 유전적 분석기술이 정립되어야 하므로 지극히 어렵고도 많은 노력이 수반되어야만 가능할 것으로 생각된다.

지금까지 이러한 연구들의 동향 및 기술 수준을 살펴보면 난포란의 체외수정에 있어서 난구세포의 역할과 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고(Wiemer 등, 1991), 체외수정을 위한 정자의 다양한 수정능 획득방법도 시도되고 있는 바 최근에는 PAF(platelet activating factor), heparin, caffeine 및 calcium ionophore 등으로 보다 양호한 정자의 수정능 획득 성적을 보여주고 있다. 한편 체외수정란의 배 발생에 있어서는 체내성숙 후 배발생 양상과 체외수정 성숙 후 배발생 양상을 비교하고 이에 대한 원인 규명에 대해서도 많은 보고가 있으며(Iwasaki와 Nakahara, 1990), 또한 체외수정된 배의 cell block화 현상을 극복하는 방법에 대해서도 활발한 연구가 진행되고 있다. 체외수정란의 이식에 의한 산자 생산은 최초로 Goto 등(1988)에 의하여 보고되었고, 국내에서도 황 등(1993), 박 등(1994)에 의하여 한우 체외수정란을 젖소에 이식하여 산자 생산에 성공한 보고가 있다.

수정란의 분할 기술 및 분할 수정란의 생존성과 이식에 관한 연구는 특히 소에 있어 배자의 분열상태에 따른 분할시점이 배자의 생존성에 미치는 연구와 수정란의 양분에 의한 분할란을 어떤 식으로 이식하는 것이 보다 수태율과 태아발달을 향상시킬 수 있는가 하는 연구들이 집중적으로 수행되고 있다(박 등, 1991).

가축의 성 조절을 인위적으로 하고자 하는 연구도 여러 방향에서 진행되고 있는데, 특히 수정란을 인위적으로 조절하는 기술들이 개발됨에 따라 미세조작에 의한 성 감별이 주된 관심사가 되고 있다. 이에 대한 연구들로는 Anderson(1986)과 Williams(1986) 등이 X 염색체와 연관된 특정효소를 이용한 방법을 소개한 바 있고, White 등(1987)은 소와 양의 Y 염색체와 연관된 특정 항원을 이용하여 성의 감별을 소개한 이래 H-Y 항원체에 의한 성 판별에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(박 등, 1996; 정 등, 1991, Utsumi 등, 1991; 고 등, 1989). 최근에는 분자유전학적 기법의 발달로서 Y염색체가 지닌 특정 DNA probe를 이용하

여 성의 판별을 시도하고자 하는 연구들이 가장 활발하게 수행되고 있는 추세이다(Ohh 등, 1996; Kudo 등, 1993; Machaty 등, 1993; Herr과 Reed, 1991; Peura 등, 1991). 그러나 이러한 방법들은 간접적인 성의 확인으로서는 손쉽게 이용되어질 수 있는 장점이 있는 반면 정확성의 결여가 가장 큰 단점으로 남아 있다. 이에 반하여 Moustafa 등(1989), Picard 등(1985)은 세포유전학적 기술로 소와 양의 분할란의 유전 분석으로서 암수 구별의 정확성이 100%임은 물론 유전적 소질도 확인할 수 있음을 밝혔으나 수정란을 이용한 염색체 분석 기술의 까다로운 과정으로 성공율의 저하가 문제로 제시될 수 있다고 하였다.

따라서 체외수정된 난자를 이용하여 분할에 의한 성의 식별은 아직까지 극히 초보적이고 기술적으로 미흡한 상태에서 실용적 단계에는 크게 미치지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 체외수정 기술과 수정란의 미세조작 기술에 유전적 분석 기술을 접목 개발한다면 가축의 성 조절에 획기적 실용화를 더 할 수 있을 것으로 사료되어 본 연구에서는 도축된 암소의 난소로부터 난포란을 채취하여 이를 체외성숙, 수정 및 배 발달시켜 이식 가능한 후기배의 효율적인 생산기법을 제고하고, 이를 이용하여 보다 효과적인 염색체 분석 방법을 개발하여 초기 수정란의 성 감별 및 유전적 분석을 수행코자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 체외성숙

본 연구에 사용된 난소는 경상남도 김해시 덕성산업에서 도살되는 한우 암소에서 채취 공시하였다. 도살 직후 양측 난소를 적출하여 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 포함된 생리식염수(27~30℃)에 넣어 2시간내로 실험실로 운반한 다음, 항생제가 첨가된 생리식염수로 2~3회 세척하고 2~7 mm의 가시난포만을 골라 18 gauge 주사침이 부착된 주사기로 난소실질을 찢러 난포액을 흡입하여 conical tube에 담아 10 분간 정치시켰다. 이후 상층액을 제거하고 하층액만을 흡입하여 60 mm dish에 배양액과 적당히 혼합하여 난포란을 선발하였다. 난포란의 선발은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 도립현미경하에서 4~5층의 난구세포층이 충분하면

서 균일한 세포질을 가진 난포란을 선발하여 실험에 공시하였다.

난포란의 체외성숙 배양액으로는 TCM-199(Earle's salt, Sigma)의 기본배양액에 sodium pyruvate (56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), penicillin G(100 units/ml), streptomycin(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), LH(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), FSH(35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), estradiol-17 $\beta$ (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 FBS(10%; fetal bovine serum, gibco)를 첨가 제조하였다.

난포란의 체외성숙을 위하여 39 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 18시간 이상 평형시킨 미소적배양액으로 4~5회 난포란을 세척한 다음, 500  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 4-well dish에 과립막세포와 난관 상피세포가 첨가되어 있는 체외성숙배양액에 20~25개의 난포란을 주입하여 22~24 시간동안 체외성숙을 유도하였다. 난구세포층이 방사형으로 확장되고 세포질이 균일한 난포란을 성숙된 것으로 판정하여 실험에 공시하였다.

## 2. 정자의 수정능 획득과 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 정소상체 미부정자로써 도축장에서 도살 직후 개체 차이에 의한 수정률을 줄이기 위하여 2 마리의 한우로부터 각각 1 개의 정소를 직출하여 항생제가 첨가된 생리식염수에 담아 30 분 이내에 실험실로 운반하였다. 운반된 정소상체 미부는 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 생리식염수로 2~3 회 세척한 후 표면을 깨끗이 닦은 후 멸균된 가위로 표피를 절개하고 일부분을 채취하여 B.O. medium이 들어있는 dish에서 세절하여 농후정자를 채취하였다. 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 채취된 정자는 caffeine (10 mM)이 첨가된 세척용 B.O. medium으로 98~99% 습도, 39 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 swimming-up을 실시하였다. Swimming-up의 유도는 농후정자와 B.O. medium이 층을 이루도록 B.O. medium을 조심스럽게 분주한 후 45 $^{\circ}$ 의 각도로 눕혀서 1 시간 동안 실시하였다. Swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500 $\times\text{g}$ 에서 1 회 5 분간 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 첨가된 수정용 B.O. medium을 5 ml 첨가하여 다시 500  $\times\text{g}$ 에서 5 분간 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 B.O. medium을 첨가하여  $\text{CO}_2$  incubator에서

10~15 분간 처리하였다.

체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 B.O. medium으로 3~4회 세척한 후 수정용 B.O. medium에 100  $\mu\text{l}$  drop당 15~20개의 난포란을 옮기고 여기에 수정능이 획득된 활력이 좋은 정자를 1~2 $\times 10^6$  cells/ml이 되도록 농도를 조절하여 24 시간 동안 98~99% 습도, 39 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 수정을 유도하였다. 정자의 최종농도는 hemocytometer로 정자의 수를 계산하였다.

## 3. 체외배양

공배양을 위한 난관 상피세포의 준비는 다음과 같이 하였다. 먼저 도축장에서 채취한 난관을 항생제가 들어 있는 생리식염수로 세척한 다음 난관 표면을 닦고 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방덩어리를 완전히 제거하였다. 다시 70% alcohol에서 20 초간 소독을 한 후 항생제가 첨가된 생리식염수로 2~3 회 세척한 다음 오염 가능성이 있는 난관의 양끝 부분을 약 1 cm 정도를 잘라낸다. 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 medium 1 ml이 들어있는 10 ml 주사기로 난관 협부에서 누두부쪽으로 관류시킨 다음 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관 상피세포를 채취하였다. 채취한 난관 상피세포는 500  $\times\text{g}$ 에서 5 분간 원심분리시켜 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분을 2 회 이상 원심분리기로 세척한 다음 22 gauge 주사침으로 난관 상피세포를 잘게 부수었다. 1~2  $\times 10^6$  cells/ml의 최종농도로 조절하여 48 시간 동안 배양시킴으로써 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

과립막세포의 준비를 위하여서는 대난포(10 mm 이상)에서 난포액과 함께 과립막세포를 채취하여 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액으로 500 $\times\text{g}$ 에서 5 분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 남은 pellet을 다시 2 회 이상 세척하여 pellet 부분을 재 부유시켜 난관 상피세포의 준비 과정과 동일한 방법으로 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

체외수정된 수정란은 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 난구세포와 정자를 완전히 제거하고 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액이나 monolayer cells이 형성된 난관 상피세포 또는 과립막 세포에서 공배양을 하였다. 이후 48 시간마다 신선한 배양액으로 교환했으며, 5

일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하였다.

#### 4. 체외수정란의 염색체 분석

배양중인 수정란으로 부터 염색체를 분석하기 위하여 분열 중인 2 cell, morula 및 blastocyst 단계인 수정란을 이용하였다. 분열 중인 수정란으로 부터 중기 상의 유도를 위하여 상기 배양액 1ml당 0.05 g col-

cemid를 첨가하고, 동일 조건으로 6~8시간 더 배양 하였다. 이 후 공시된 수정란들을 D-PBS로 씻고 1% trypsin 또는 0.05% protease에 1~3분 정도 정치시켜 투명대를 연화시켰다. 연이어 이들 수정란들의 세포 팽윤을 위하여 6%의 fetal bovine serum이 함유된 1% sodium citrate 용액으로서 20분간 저장처리 (hypotonic treatment)를 하였다. 저장처리된 수정란은 methanol, 5: acetic acid, 1: distilled water,

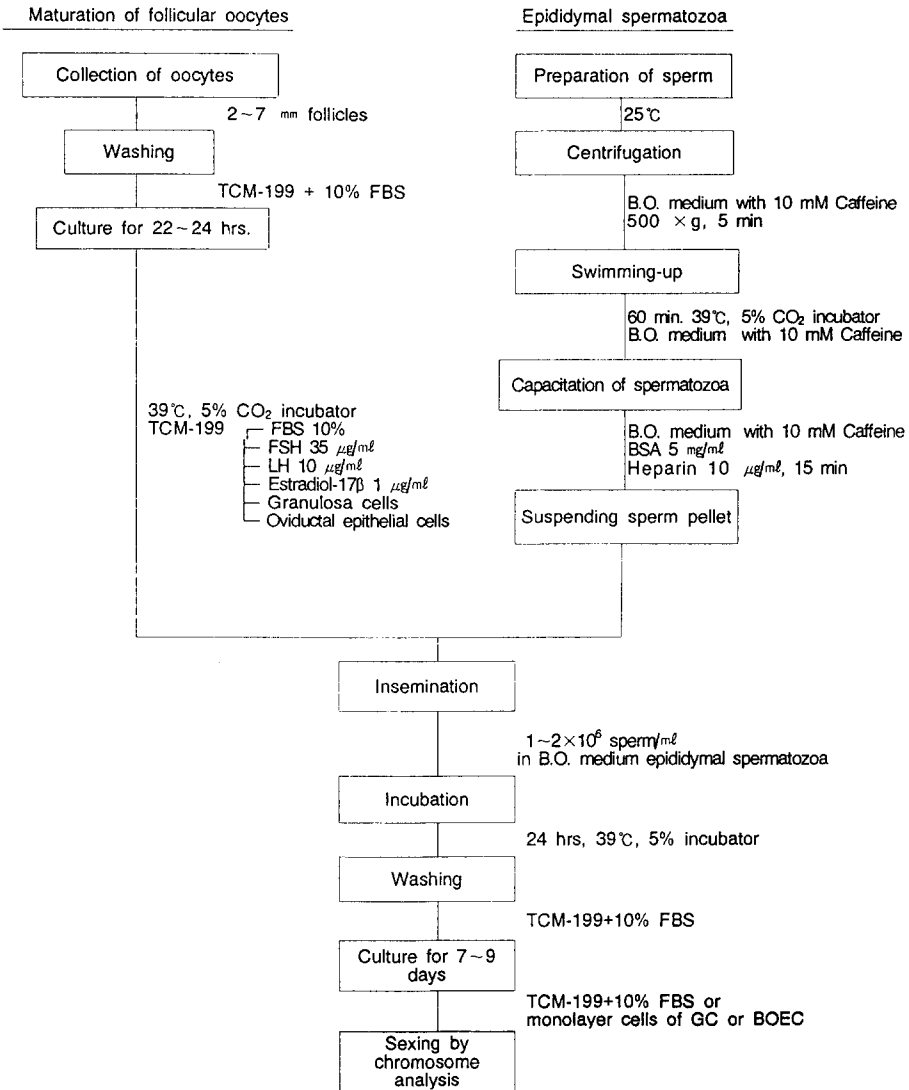


Fig. 1. Diagram of experimental procedure for IVMFC of bovine and sexing of bovine embryos.

4로 조성된 1차 고정액으로 옮겨 4℃에서 약 20분간 고정처리(fixation)시켰다. 다음 각 수정란들을 각각의 slide glass위에 조심스럽게 옮기고 methanol, 3: acetic acid, 1로 조성한 2차 고정액으로 2~3방울 적하시킨 후 과습한 상태 하에서 건조시켰다. 완전히 건조시킨 slide는 다시 2차 고정액으로서 10분간 침지한 후 slide 상에 남은 debris의 제거를 위해 methanol, 4: acetic acid, 3: distilled water, 1의 3차 고정액으로 1분간 재 침지시켰다. 고정 처리가 완료된 slide는 4% Giemsa 용액으로서 5분간 염색하고 수세한 후 자연 건조시켜 광학현미경의 저배율( $\times 100$ )로서 증기상의 유무를 관찰하고, 다시 고배율( $\times 1,000$ )하에서 성 염색체의 확인과 핵형 양상을 검경하였다.

이상의 처리 과정을 도식화하면 Fig. 1과 같다.

### 5. 통계적 분석

실험결과와 통계적 분석은 Microsta computer statistical program package 를 사용하여  $\chi^2$ -test를 실시하여 처리구간의 유의성을 검정하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 체외성숙조건에 따른 난포란의 수정율

회수한 미성숙 난포란을 FSH( $35\mu\text{g/ml}$ ), LH( $10\mu\text{g/ml}$ ), estradiol- $17\beta$ ( $1\mu\text{g/ml}$ )가 들어 있는 TCM-199 배양액을 기본배양액으로 하여 과립막세포 또는 난관 상피세포를 첨가하여 24시간 동안 체외성숙을 유도한 다음, 정소상체 미부정자와 24시간 동안 수정을 유도하여 2세포기 이상의 수정란을 수정된 것으로 판단하여 체외성숙조건에 따른 수정률을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 난관 상피세포 또는 과립막세포와 공배양한 처리구의 수정율이 각각 87.2% (123/141), 90.0%(115/128)로 나타나 공배양을 하지 않은 대조구의 수정율 78.0%(31/40)보다 유의적 ( $P < 0.05$ )으로 높은 수정율을 나타내었다. 따라서 체외수정을 시키기 위한 미성숙 난자의 체외성숙은 과립막세포와 공배양하는 것이 가장 효과적인 것으로 사료된다.

난포란의 수정과 발달능력은 핵과 세포질의 성숙도에 따라 좌우된다. 체외성숙 후 난자의 수정률과 수정란의 발달률은 체내성숙란에 비해 낮은 경향이 있는데

**Table 1. Cleavage of bovine follicular oocytes matured *in vitro* in a culture system supplemented with granulosa cells or bovine epithelial cells**

Condition of maturation	No. of oocytes used	No(%) of oocytes fertilized
Control <sup>1</sup>	40	31(78.0) <sup>a</sup>
BOEC <sup>2</sup>	141	123(87.2) <sup>ab</sup>
GC <sup>3</sup>	128	115(90.0) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Control : TCM-199 with FBS(10%), LH, ( $10\mu\text{g/ml}$ ), FSH( $35\mu\text{g/ml}$ ), estradiol- $17\beta$ ( $1\mu\text{g/ml}$ )

<sup>2</sup> BOEC : Supplemented with bovine oviductal epithelial cells( $1\sim 2 \times 10^6$  cells/ml)

<sup>3</sup> GC : Supplemented with granulosa cells( $1\sim 2 \times 10^6$  cells/ml)

(Leibfreid-Rutledge 등, 1987) 성공적인 난포란의 성숙을 위해서 일반적으로 체외성숙용 배양액에는 growth factor(Das 등, 1991; Dekel과 Sherizly, 1985), serum(Sanbuisno와 Threfull, 1989; Younis 등, 1989), hormones(Brackett 등, 1989; Younis 와 Brackett, 1992), cumulus cells(Goto 등, 1988; Sirard 등, 1989), granulosa cells(Fukui 등, 1991; Xu 등, 1987)와 같은 난포세포들과 공동배양을 하기도 한다. 또한 체외성숙배양액에 FSH, LH 및 estradiol- $17\beta$ 를 첨가하면 수정율이 향상되기도 한다 (Fukui 와 Ono, 1989). Granulosa cells나 cumulus cells와 같은 체세포와 난포란을 공동 배양하여 체외성숙을 유도하면 핵의 성숙뿐만 아니라, 세포질의 성숙에도 좋은 영향을 미치며 수정란의 발달율도 개선된다고 보고한 바(Crister 등, 1986; Lu 등, 1987; Xu 등, 1987), 본 시험에서도 이상의 결과들과 동일 양상을 보임에 따라 이러한 이론적 타당성을 간접적으로 시사한다고 하겠다.

### 2. 체외수정란의 배양방법에 따른 배 발달율

Table 2는 TCM-199 배양액에 FSH( $35\mu\text{g/ml}$ ), LH( $10\mu\text{g/ml}$ ), estradiol- $\beta$ ( $1\mu\text{g/ml}$ )가 들어 있는 배양액에 과립막세포를 첨가하여 성숙된 난자를 체외

**Table 2. *In vitro* developmental competence of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes in different culture systems**

Culture system	No. of oocytes fertilized	No(%) of oocytes cleaved	No(%) of embryos developed to		
			Morula	Blastocysts	Mor. & Blast.
Control <sup>1</sup>	90	76(84.4)	7( 7.8) <sup>a</sup>	1( 1.1) <sup>a</sup>	8( 8.9) <sup>a</sup>
BOEC <sup>2</sup>	120	101(84.1)	30(25.0) <sup>b</sup>	16(13.3) <sup>ab</sup>	46(38.3) <sup>c</sup>
CM <sup>3</sup>	87	72(82.8)	17(19.5) <sup>b</sup>	5(5.8) <sup>a</sup>	22(25.3) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Control : TCM-199 with FBS(10%)

<sup>2</sup> BOEC : Co-cultured with bovine oviductal epithelial cells( $1 \sim 2 \times 10^6$  cells/ml)

<sup>3</sup> CM : Co-cultured with fluids obtained which TCM-199 containing FBS(10%) cultured BOEC for 48 hours

수정이 확인된 수정란만을 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 TCM-199 배양액, TCM-199 배양액에 난관 상피세포와 공배양을 하거나 CM(conditioned medium)에서 7~9일 동안 배양한 결과를 나타낸 표이다. 대조구, 난관 상피세포 및 conditioned medium에서 후기배의 발달율은 각각 8.9%(8/90), 38.3%(46/120) 및 25.3%(22/87)로서 이식 가능한 수정란의 발달율이 난관 상피세포와 공배양한 처리구에서 가장 높게 나타났다( $P < 0.05$ ). Eyestone과 First(1989)는 체외수정란을 난관 상피세포와 conditioned medium에서 배양했을 때 후기배의 발달율이 모두 22%로서 본 실험의 결과보다 다소 낮은 성적을 제시한 바 본 시험에서 후기배 생산을 위한 기술적 처리 과정이 매우 효과적인 것으로 생각된다.

일반적으로 포유동물의 수정란을 체외배양할 경우 특정시기에 발달중지현상이 일어나는데, 소의 경우는 8~16세포기에서 이러한 현상이 일어난다. 따라서 이러한 발달중지현상을 극복하기 위하여 체세포와 공배양을 함으로서 극복할 수 있다고 하였다(Eyestone과 First, 1989). 난관 상피세포와 공배양으로 인한 수정란 발달의 기전에 관해서는 정확하게 알려져 있지 않지만, 난관 상피세포는 배양액내의 독성물질의 제거 또는 영양물질의 제공뿐만 아니라, 난관 상피세포에서 분비되는 단백질, 혈청 albumin과 면역 globulin 등이 배란된 난자의 투명대와 결합하여 위관강내로 전이되어 수정란의 정상적인 발달을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Kapur 와 Johnson, 1986; Brown 과 Cheng, 1986; Kane, 1985). 또한 난관 상피세포는 배양액내의 산소분압을 조절하며(Tervit 등, 1972; Fukui

등, 1991; Voelkel과 Hu, 1992), 수정란과 체세포와 물리적인 접촉을 통해서 수정란의 발달을 촉진한다(Kuzan 과 Wright, 1982; Allen 과 Wright, 1984). 체세포와 공배양은 오염의 가능성이 높으므로 이러한 단점을 보완하기 위해 보다 간편하고 동일 배양조건을 제공하기 위한 체세포와 공배양한 배양액을 이용하는 CM(conditioned medium)법이 개발된 바, 이는 체세포와의 공배양과 거의 동일한 효과를 나타낸다고 보고하였다(Eyestone과 First, 1989). 그러나 본 시험의 결과 난관 상피세포와의 공배양이 CM처리구에 비해 후기 배 발달율에 있어 훨씬 양호한 성적을 나타냄에 따라 CM처리구의 동일 효과에 대해서는 다소의 이견을 가지나 단순 배양한 대조구에 비해서는 월등히 좋은 결과를 보이고 있다.

### 3. 체외수정란을 이용한 염색체 분석

본 시험에서는 소의 체외수정으로 부터 얻은 초기 배자 상태인 2세포기, 상실배(morula) 및 포배기(blastocyst) 배자를 이용하여 이들의 염색체 분석을 통한 배자의 성을 식별하고, 핵형분석을 하고자 하였다.

초기 배자를 이용한 염색체 분리에는 처리 과정상 많은 기술적 요인들이 영향을 미치고 각 요인에 따라 매우 민감한 반응을 보여 도출되는 결과의 양부에 큰 차이를 나타낸다. 이러한 요인들 중 colcemid의 처리 시간, 투명대의 연화 정도, hypotonic의 처리방법 및 fixation의 방법 등이 중기상의 유도 및 모양에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 중기상의 수 및 중기상 분열지수(mitotic index), 그리고 염색체의 응

축 정도는 colcemid의 처리에 따른 절대적 영향을 받는 것으로 나타나는 바 각 수정란으로부터 최적 중기상의 유도 조건으로는 colcemid 농도를 0.05 g/ml의 처리로서 처리 시간은 8시간 정도가 적당하였다. Colcemid의 재배양 시간은 cell cycle과 밀접한 관계를 지니는 것으로 이의 처리 시간을 길게 할수록 중기상의 수는 보다 많이 유도되어지나, 비례적으로 염색체의 응축 정도가 심화되어 형태적 양상(chromosome morphology)이 매우 불량하게 된다. 반면 colcemid의 처리시간이 짧으면 다수의 중기상들이 염색체의 응

축 정도가 상대적으로 덜 진행된 초기 중기 상태(prometaphase)로 유도되어 개개 염색체의 분석은 용이하게 하나 비례적으로 중기상의 수가 적어지게 된다. 이는 손과 정(1994)이 혈액세포를 이용한 염색체 분리 양상에서 나타난 결과와 동일한 결과를 보인다. 한편 hypotonic의 처리는 염색체의 형태와 퍼짐에 직접적인 영향을 미치는 요인으로서 최적의 양상을 얻기 위하여 1% sodium citrate에 6% 정도 calf serum을 포함한 용액으로 20~30분간의 처리가 가장 바람직하였다. 저장처리의 경우 부족한 hypotonic의 경우 염

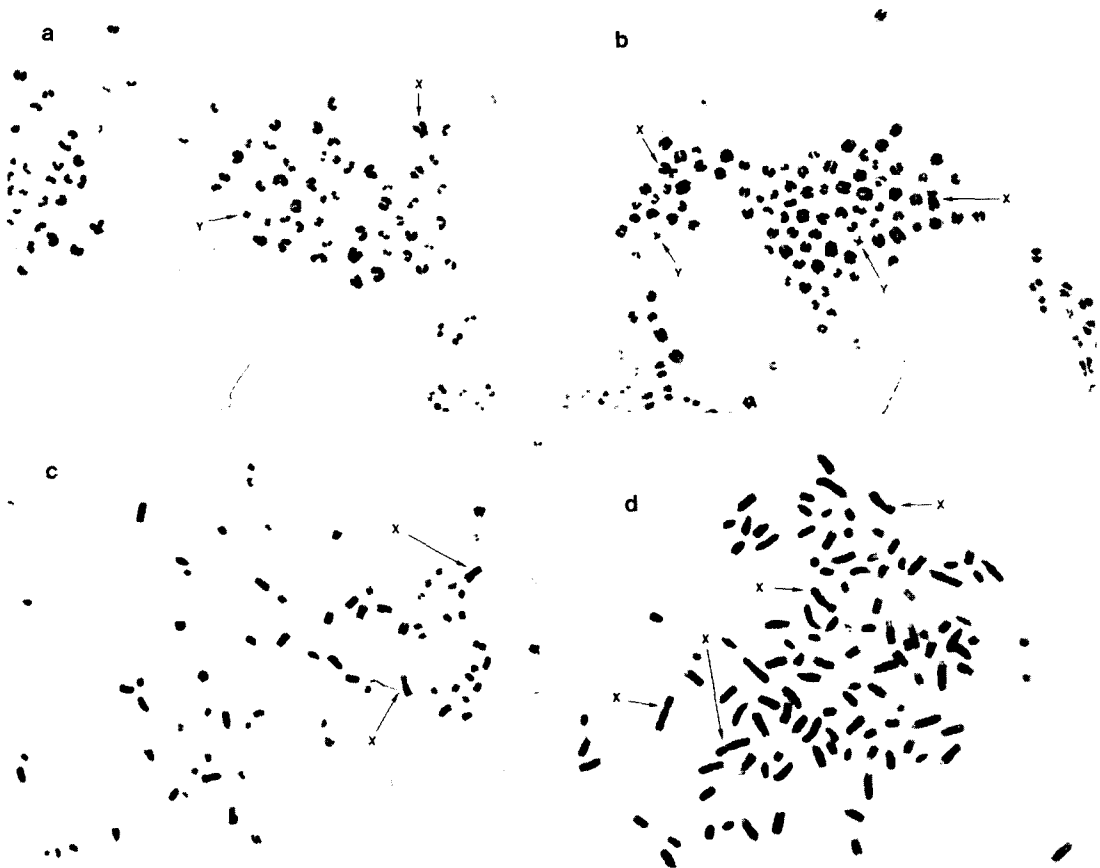


Fig. 2. Chromosome spreads from bovine embryos: (a), (b) male, (c), (d) female.

색체들의 뭉침 현상이 나타나고 또한 염색체의 이면에 세포질의 흔적이 짙게 남아 분석에 어려움을 가져온다. 반면 과도한 저장처리의 경우 염색체의 흩어짐이 심하게 되므로 개개 세포에 대한 핵형 분석이 불가능하게 된다. 적절히 처리된 중기상의 모양을 유지하도록 고정시키는 작업에서 최적의 고정처리방법으로는 우선 methanol과 acetic acid 및 distilled water를 5:1:4로 혼합한 용액으로 1차 처리하고 이후 methanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 고정액으로 2차 처리한 다음, methanol과 acetic acid 및 distilled

water를 4:3:1로 혼합한 고정액으로 마지막 고정처리를 하는 것이 가장 좋은 형태의 결과를 얻을 수 있었다. 여기서 1차 및 2차 고정처리의 경우 세포의 고정 작업이 주된 목적인 반면 3차 고정 작업은 슬라이드상의 이물질(debris)의 제거가 주된 목적이다. 이상의 전 과정은 stereo microscope하에서 할구의 유무를 확인하면서 처리하여야만 세포의 유실을 방지할 수 있다. 이러한 처리 방법으로 유도된 중기상의 양상은 Fig. 2와 같고, 이에 대한 핵형분석은 Fig. 3에 제시된 바와 같다.

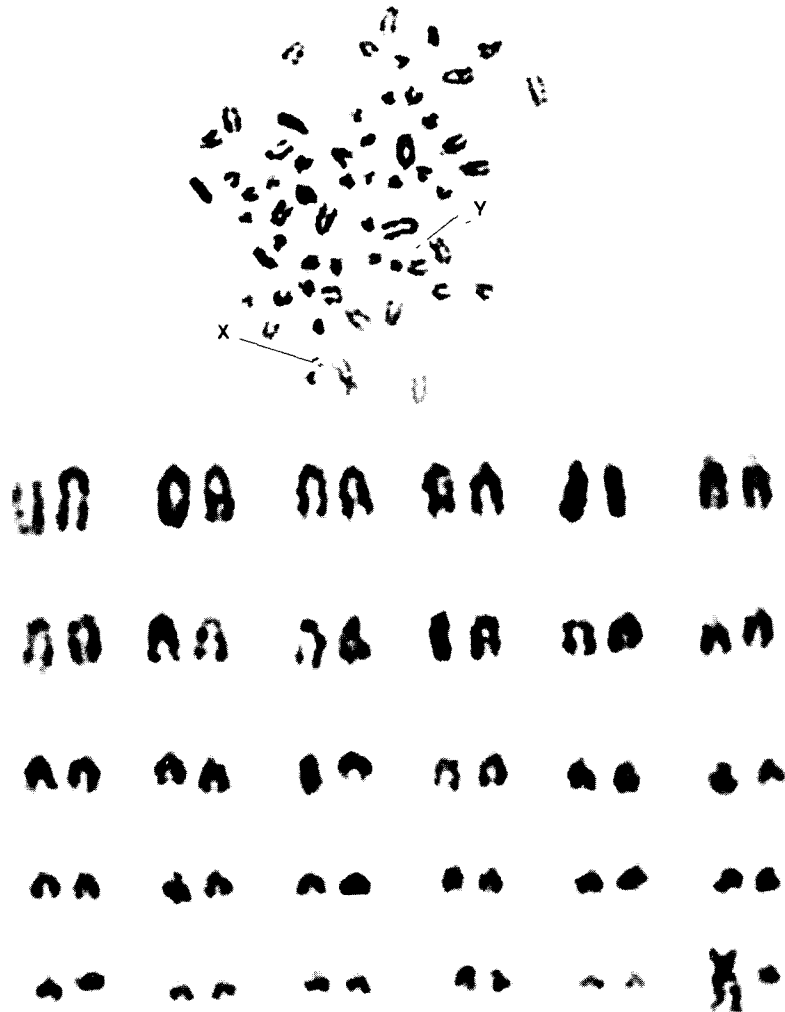


Fig. 3. The karyotype from chromosome spread of bovine embryo.



**Table 3. Chromosome analysis from *in vitro* fertilized bovine embryos**

Embryonic stage	No. of processed embryos	No. of embryos with metaphase plate	No. of embryos with sexing analyzed	Sex ratio XX : XY	Mitotic index
2 Cell	36	34 (94.4%) <sup>1</sup>	18 (52.9%)	6:12 (1:2.0)	69.8±6.2% <sup>1</sup>
Morula	24	20 (83.3%)	14 (70.0%)	10:4 (1:0.4)	23.9±3.8
Blastocyst	24	24 (100%)	19 (79.2%)	9:10 (1:1.1)	32.3±5.1
Total	84	78 (92.9%)	51 (65.4%)	25:26 (1:1.0)	38.5±4.3

<sup>1</sup> Mean ± Standard error

상기 분석 방법을 이용하여 배자의 발달 단계별 분열지수(mitotic index)와 중기상 유도율, 성의 식별이 가능한 중기상의 분석율 및 이들의 성비를 조사 관찰한 바, 이에 대한 결과는 Table 3과 같다. 총 84개의 배자를 이용하여 각 발달 단계별 염색체의 분리를 시도한 바, 90% 이상의 중기상 유도율을 얻을 수 있었으며, blastocyst를 이용할 경우는 100%의 중기상 유도율을 보였다. 또한 염색체 분석으로서 성의 식별이 가능한 중기상 유도의 성공율은 2세포기의 경우 53%, 상실배의 경우 70%, 포배기의 경우 80%로서 Iwasaki(1989)가 보고한 IVF에 의한 2 cell로 부터 염색체 분석에 의한 sexing 성공율 35.7%보다는 현저히 높은 성공율을 나타내었고, 또한 Kanagawa(1989)가 발표한 morula로 부터의 25%, blastocyst로 부터 얻은 38%와도 현저한 차이를 보이고 있다. 이전 다수의 보고들에서도 morula나 blastocyst를 이용한 염색체의 분석에 의한 성의 식별을 30%이하로 보고한 바 (Picard 등, 1985; Moustafa 등, 1989) 본 실험의 결과보다는 현저히 낮은 성공율을 나타내고 있다. 본 시험에서 높은 성의 식별율은 보다 개선된 세포유전학적 분석 방법에 기인 된 것으로 생각되어 염색체 분석에 의한 배자의 조기 성 감별은 처리 과정상 기술적 처리만 잘 해결한다면 기존의 분자유전학적 기법이나 H-Y 항체를 이용한 방법보다 훨씬 효율적이고 성공율이 높은 결과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

한편, 분석된 성비는 XX를 지닌 수정란이 25개, XY를 지닌 수정란이 26개로 자연적 성비와 거의 일치되는 암컷:수컷이 1:1로 나타났다. 수정란을 이용한

소의 핵형 분석은 Fig. 3에 제시된 바와 같이 총 60개의 염색체로 구성되고, 이들 중 58개의 상 염색체는 동원체가 말단부에 위치한 아단염색체(acrocentric chromosome)이고, X 염색체는 아중양염색체(submetacentric chromosome), Y 염색체는 중앙염색체(metacentric chromosome)로서 X 염색체는 거의 1번 크기이고, Y 염색체는 28번 내지 29번 크기이다 (오 등, 1991; 김 등, 1994; 손과 정, 1994). 따라서 소에 있어 성 염색체 X, Y는 상 염색체와 뚜렷이 구별되는 형태적 특징으로 인해 별다른 특별한 처리가 없이도 쉽게 식별이 가능하고, 또한 X와 Y 염색체간에도 형태적 차이가 매우 큼으로서 쉽게 구별이 가능하여 성의 판별을 용이하게 할 수 있다. 반면, 상 염색체간에는 가장 긴 1번 염색체를 제외하고는 상동염색체의 구분에 어려움이 많으므로 상동염색체의 인지나 염색체의 구조적 이상 유무를 판단하기 위하여서는 이들 염색체에 G-banding과 같은 특수 banding기법을 활용하여야만 할 것이다.

#### IV. 적 요

체외수정을 통한 초기배자로부터 분할란의 성 감별과 분할배의 발생 성공은 성은 물론, 유전적으로 우수한 개체의 대량 생산이 가능함을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 도축된 암소의 난소로부터 난포란을 채취하여 이를 체외성숙, 수정 및 배 발달시켜 이식 가능한 후기배의 효율적인 생산기법을 제고하고, 이를 이용하여 염색체 분석으로서 성 감별 및 유전적 분석을 수행

코자 한다. 분석 결과 체외 성숙 조건에 따른 난포란의 수정률은 과립막 세포와 공배양을 하므로서 90%의 수정률을 얻었고, 체외수정란의 배양방법에 따른 배 발달율에 있어서는 난관 상피세포와 공배양을 하므로서 상실배 또는 포배까지 이식 가능한 배 발생율이 38%로 나타났다. 따라서 체외수정을 시키기 위한 미성숙 난자의 체외 성숙 조건으로는 과립막 세포와의 공배양을 하고, 이후 수정란의 배 발달을 위하여서는 난관 상피세포와의 공배양이 가장 효과적인 방법으로 사료된다. 한편, 체외수정란을 이용한 염색체 분석에서는 공시된 수정란의 93%가 중기상의 유도가 가능하였고, 이들 중 65%에서 성의 식별이 가능하였다. 염색체 분석에 의한 배자의 조기 성 감별은 처리 과정상의 기술적 요인들에 의해 매우 큰 영향을 받으므로 colcemid의 처리시간, 투명대의 연화 정도, hypotonic의 처리 방법 및 fixation의 방법을 적절히 처리하므로서 효율적이고 높은 성공률을 기대할 수 있다.

## V. 인용문헌

- Allen, R. L. and R. W. Wright. 1984. *In vitro* development of porcine embryos in co-culture with endometrial cell monolayers of culture supernants. J. Anim. Sci., 59:1657-1661.
- Anderson, G. B. 1986. Identification of sex in mammalian embryos. Genetic Engineering of Animals. Plenum Press, New York pp. 243-250.
- Brackett, B. G., A. I. Younis, and R. A. Frayer-Hosken. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of luteinizing hormone. Fert. Steril., 52:319-324.
- Brown, C. R. and W. K. T. Cheng. 1986. Change in composition of the procrine zona pellucida during development of the oocyte 2-to-4-cell embryo. J. Embryol. Exp. Morph., 92:183-191.
- Crister, E. S., M. L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey, and N. L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology, 25:150.
- Das, K., L. E. Stout, H. C. Hensleigh, G. E. Tagatz, W. R. Phipps, and B. S. Leung. 1991. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. Fertil. Steril., 55:1000-1004.
- Dekel, N. and I. Sherizly. 1985. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. Endocrinol., 116:406-409.
- Eyestone, W. H. and N. L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocysts stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
- Fukui, Y., L. T. McGowan, R. W. James, P. A. Pugh and H. R. Tervit. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert., 92:125-131.
- Fukui, Y. and H. Ono. 1989. Effect of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert., 86:501-506.
- Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakahashi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 83:753-758.
- Herr, C. M. and K. C. Reed. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. Theriogenology, 35:45-54.
- Iwasaki, S. 1989. Sexing of bovine sperm by application of chromosome analysis of embryos fertilized *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod., 35:53-56.

14. Iwasaki, S. and T. Nakahara. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33:669-675.
15. Kanagawa, H. 1989. Sexing of embryos by chromosomal analysis. *Jpn. J. Reprod.*, 35:57-62.
16. Kane, M. T. 1985. A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocysts cell division and expansion *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 73:147-150.
17. Kapur, R. P. and L. V. Johnson. 1986. Selective sequestration of an oviduct fluid glycoprotein in the perivitelline space of mouse oocytes and embryos. *J. Exp. Zool.*, 238:249-260.
18. Kudo, T., S. Sato and 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.
19. Kuzan, F. G. and R. W. Wright. 1982. Observations on the development of bovine morulae on various cellular and non-cellular substance. *J. Anim. Sci.*, 54:811-816.
20. Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Crister, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First. 1987. Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 36:376-383.
21. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallgher and H. McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Vet. Record*, 121:259-260.
22. Machaty, Z., A. Paldi, T. Csake, Z. Varga, I. Kiss, Z. Barandi and G. Vaita. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fert.*, 98:467-470.
23. Moustafa, L. A., J. Hahn and R. Roselius. 1989. Versuche Zur Geschlechtsbestimmung an Tag 6 und 7 alten Rinderembryonen. *Verl. Munch. Tierarztl. Wschr.*, 91:236-238.
24. Ohh, B. K., K. C. Hwang, W. Y. Lee, B. C. Lee, W. S. Hwang and J. Y. Han. 1996. Simple and rapid sex determination of preimplanted bovine embryos with male specific repetitive sequences. *Kor. J. Anim. Sci.*, 38:43-51.
25. 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.
26. Picard, L., W. A. King and K. J. Betleridge. 1985. Production of sexed calves from frozen thawed embryos. *Vet. Rec.*, 117:603-608.
27. Sanbuissno, A. and W. R. Therefull. 1989. The effect of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*, 31:693-699.
28. Sirard, M. A., H. M. Florman, M. L. Leibfried-Rutledge, F. L. Barnes, M. L. Sims and N. L. First. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, 40:1257-1263.
29. Tervit, H. R., D. G. Whittingam and L. R. Rowson. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fert.*, 30:493-497.
30. Utsumi, K., E. Satoh and A. Iritani. 1991. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *J. Exp. Zoology*, 260:99-105.
31. Voelkel, S. A. and Y. X. Hu. 1992. Effects of gas atmosphere on the development of one cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology*, 37:1117-1130.

32. White, K. L., G. B. Anderson and R. H. Bondurant. 1987. Expression of a male specific factor on various stage of preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 37:867-873.
33. Wiemer, K. E., A. J. Watson, V. Polanski and A. I. McKenna. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 30:330-338.
34. Williams, T. J. 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, 25: 733-739.
35. Xu, K. P., T. Greve, H. Challsen and P. Hyttel. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 81:501-504.
36. Younis, A. I., B. G. Brackett, and R. A. Fayer-Hosken. 1989. Influence of serum and hormones on the bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, 23: 189-201.
37. Younis, A. I. and B. G. Brackett. 1992. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Devel.*, 31:144-151.
38. 고팡두, 양부근, 박연수, 김정익. 1989. 면역형광 측정법에 의한 우수 수정란의 성 판별. *한국가축번식학회지*, 13:113-120.
39. 김기원, 손시환, 문집동. 1994. Holstein종의 염색체 분염분석. *진주산업대 농업기술연구소보*, 7:1-11.
40. 박영일, 임경순, 한재용, 남경우, 황규춘, 박화춘. 1996. Y염색체 특이성 DNA분리와 단일 H-Y항체 개발에 의한 토끼의 수정란 성 감별에 관한 연구. I. 정소를 항원으로 한 H-Y항혈청에 의한 토끼 수정란의 성 판별. *한국가축번식학회지*, 20: 53-61.
41. 박충생, 공일근, 노규진, 주영국, 송상현, 황영균, 박준규, 조성근, 전병균, 이경미, 윤희준, 최민철, 광대오, 이효중, 최상용. 1994. 체외성숙, 수정 및 배양된 한우 체외수정란의 유우이식에 의한 산자 생산. *한국가축번식학회지*, 18(1):47-54.
42. 박충생, 최상용, 이효중, 이지삼, 박희성. 1991. 산양의 수정란 이식 및 조작기법 개발에 관한 연구. V. 생쥐 및 산양 분할 수정란의 생존성 및 이식후 수태율의 향상. *한국축산학회지*, 33:342-347.
43. 손시환, 정구민. 1994. 혈액세포를 이용한 염색체 분리분석에 관한 방법적 고찰. *대한불임학회지*, 21:207-214.
44. 오봉국, 여정수, 손시환, 홍영호, 1991. 한우염색체의 Constitutive heterochromatin banding 양상. *한국축산학회지*, 33:359-369.
45. 정장용, 박희성, 박충생. 1991. 흰쥐 H-Y항체에 의한 생쥐 분할란의 성 조절에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 15:179-187.
46. 황우석, 조충호, 이병천, 신태영, 노상호, 김성기, 전병준, 이강남, 신언익, 임홍순. 1993. 한우정액 유래 체외수정 송아지 생산에 관한 연구. *수정란이식학회지*, 8:143-150.