

PCR 기법에 의한 수정란의 성 판별과 체외 수정란의 발생속도가 성비에 미치는 영향

오성종 · 양보석 · 임경순*

축산기술연구소

Sex Determination of Embryos by PCR and Effect of Developmental Rates of Bovine IVF Blastocysts on the Sex Ratio

Oh, S. J, B. S. Yang and K. S. Im*

National Livestock Research Institute

SUMMARY

These studies were conducted to determine the sex of preimplantation Hanwoo embryos produced *in vitro* using polymerase chain reaction(PCR). Y chromosome specific and bovine specific DNA primers were synthesized and tested for embryo sexing. Bovine IVF embryos were produced in TCM 199 and CR1aa medium, and classified by developmental stages on Day 7 to 9. The effects of developmental rates to bovine IVF blastocysts on sex ratio were also investigated using PCR methods.

The results obtained in this study were as follows:

1. Developmental rates to blastocyst from IVM /IVF embryos in TCM 199 and CR1aa medium for 9 days were 23.5 and 30.2%, respectively, and there was significant difference between the media($P < 0.05$).
2. Male to female ratio of early, mid, expanded and hatching blastocyst produced on Day 7 were 0.7:1, 1.4:1, 2.2:1, and 2.5:1, respectively, and male embryos was significantly higher proportion in expanding and hatching blastocysts($P < 0.01$).
3. On Day 8, male to female ratio of early, mid, expanded and hatching blastocysts were 0.6:1, 1:1, 2.5:1, and 2.7:1, respectively. Both expanded and hatching blastocysts obtained a significantly higher proportion of males($P < 0.01$).
4. The male : female ratio of early, mid, expanded and hatching blastocyst produced on Day 9 was 0.6:1, 0.8:1, 1:1, and 2.2:1, respectively. Hatching blastocysts had a significantly higher ratio of males($P < 0.01$).

The developmental rate of IVM /IVF embryos to blastocyst for 9 day culture was higher in CR1aa than that in TCM 199 medium. For the sex ratio by developmental stages of IVF embryos, male ratio was higher in expanded blastocyst but female in early blastocysts.

Key words : bovine IVF embryos, PCR, developmetal stage, sex ratio.

* 서울대학교 생명과학대학 (College of Agriculture and Life Science, Seoul Natonal University)

I. 서론

수정란의 성을 판별하는 방법중 Y-염색체 특이적 DNA primer를 이용한 PCR 기법은 수정란의 성을 정확히 판별할 수는 있지만 수정란에 상처를 주는 단점이 있다. 수정란에 조작을 가하지 않는 비상처성 방법(Non-invasive method)도 있는데 이 방법으로는 아직까지 수정란의 성을 조절하는 좋은 결과를 얻지 못하고 있다. 그러나 최근 소 체외 수정란 생산에 있어서 수정란의 발달속도에 따라 성비가 다르다는 보고가 있다. 즉 빨리 발생한 수정란에는 옹성이 많고, 그 반대로 늦게 발생한 수정란에는 자성이 많다는 연구(Avery 등, 1989, 1991)가 보고되고 있어 non-invasive 방법으로 수정란의 성을 어느정도 가려낼 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다. 옹성 수정란은 빠른 속도로 성장하기 시작하는데 이 경향은 생쥐의 수정란(Tsunoda 등, 1985) 뿐만 아니라 소의 체내 수정란(Avery 등, 1991), 체외 수정란(Avery 등, 1992)에서도 보고되고 있다. Carvalho 등(1995)은 D 7에 생산된 소 IVF 수정란중 배반포 및 확장 배반포에서 옹성 수정란의 비율이 많은 반면 상실배에서는 자성 수정란의 비율이 많아 발육속도에 따라 수정란의 성비가 달라진다고 하였다. Yadav 등(1993)도 소의 체외 수정란에서 초기 발생이 빠른 수정란의 옹성과 자성의 비는 3.6 : 1로 유의적인 차이를 보고하고 있다.

그러나 수정란들의 상이한 발육속도는 수정시기, 초기 난할율(Yadav 등, 1993), 배양조건(Bredbacka와 Bredbacka, 1996) 그리고 첨가물(Rieger, 1992) 등 여러요인들에 의하여 달라질 수 있다고 하였다(Avery 등, 1992). 장기간의 체외배양이 수정란의 성비에는 유의적인 영향을 주지 않는다는 보고도 있으며(King 등, 1991) 또한 수정란의 발달은 성비를 변경시킬 수 있는 성선분화에 관련된 성-특이적 유전자에 의해 조절될지도 모른다고 하였다(Tsunoda 등, 1985; Burgoyne, 1993; Kopenecny와 Niemann, 1993).

본 연구는 태아혈청만을 첨가한 TCM 199 배양액에서 난구세포와의 공배양에 의한 한우의 배반포 수정란을 생산하고 발생일별 발달속도와 발육단계에 따른 수정란의 성비를 PCR기법에 의해 조사하기 위하여 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 체외성숙과 체외수정

1) 난포란의 채란 및 성숙배양

도살된 직후 한우 암소에서 적출한 난소를 penicillin G(100IU/ml)와 streptomycin (100 μ g/ml)이 함유된 생리식염수(25 $^{\circ}$ C)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하여 3~5회 세척한후 18G의 주사침이 부착된 10ml 주사기로 직경이 2~7mm의 난포에서 난자를 흡인채란 하였다. 채란된 난자는 난포란의 세포질이 퇴행한 것을 제외한 모든 난포란을 5%의 FCS가 들어있는 TCM-199배양액으로 3회 세척한 다음 500 μ l의 성숙배양용 drop으로 옮겼다.

25mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)가 존재하는 TCM-199 배양액(Gibco, 미국)에 5%의 FCS를 첨가하여 이용하였다. 체외배양액을 petri dish(Falcon 3001, 미국)에 500 μ l의 drop을 만들어 난자를 각각 70~80개씩을 넣고 20~22시간 동안 2% CO₂배양기에서 성숙배양을 시켰다.

2) 체외수정 및 배양

정자 세척액은 B. O. 액 5mM caffeine-sodium-benzoate(Sigma, 미국)와 10 μ g/ml의 heparin(Sigma, 미국)을 첨가하여 만들었다. 한우 동결정액 2개의 straws를 38 $^{\circ}$ C에서 20초간 용해후 정액 세척용 B. O. 액이 6ml 들어 있는 원심분리관에 넣어 1,800rpm(500g)로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 정자 pellet은 재차 6ml의 B. O. 액으로 부유시켜 원심하여 상층액을 제거하여 정자의 수정능력회득을 유기하였다. 침전된 정자 pellet은 B. O.액에 BSA(2mg/ml)가 첨가된 체외수정용 B. O. 액으로 정자의 최종농도가 5 \times 10⁶/ml되게 희석 조정후 100 μ l drop을 만들었다. 성숙배양된 난자를 drop당 각 20개씩 넣고 2%의 CO₂ 배양기에서 6시간 이상 체외수정을 하였다.

체외수정된 난자는 10%의 FCS가 함유되어 있는 TCM-199 배양액 또는 CR1aa배양액으로 3~4회 세척하여 주변에 붙어 있는 정자세포를 깨끗이 제거하고 체외배양액에서 수정후 9일까지 배양시켰다. 수정란

의 정상 발달을 도와주기 위하여 매 24시간 마다 수정란과 난구세포 monolayer를 분리시켜 주었으며 매 48시간마다 TCM-199 또는 CR1aa배양액의 1/2을 교체하여 주었다.

3) 수정란의 발달단계별 분류

체외수정후 수정란의 발달단계를 매 24시간마다 실제 현미경하에서 확인 하였으며 수정후 7~9일째에 200×의 도립현미경(Nikon, 일본)하에서 초기 배반포, 배반포, 확장 배반포 및 부화배반포배를 형태적으로 분류하였다.

2. 체외수정란의 PCR 기법에 의한 성판별

1) 공시 수정란

체외수정란중 D 7~9에 생산된 초기배반포이상의 수정란을 실제현미경하에서 선발하였고 200×배의 도립현미경(Nikon, 일본)에서 정밀 확인하였다. 수정란의 발달단계는 초기 배반포(Early blastocyst), 배반포(Blastocyst), 확장 배반포(Expanded Blastocyst) 및 부화 배반포(Hatching 혹은 Hatched blastocyst)로 구분하였다(Linder와 Wright, 1983).

2) PCR을 위한 수정란 준비

발달 단계별로 구분된 체외 수정란은 혈청이나 BSA가 첨가되지 않은 PBS로 3회 이상 세척하고 0.2μg/μl의 PK액으로 투명대를 제거하였다. 나화된 수정란은 5μl의 PK가 들어 있는 0.5ml의 eppendorf tube에 각 1개씩을 넣어 56℃에서 1시간 동안 배양하여 불필요한 단백질을 제거하고 98℃에서 10분간 처리하여 PK의 활성을 제거한 후 PCR에 이용하였다. 수정란을 옮길 때 pipette에 수정란의 DNA가 부착오염되는 것을 방지하기 위하여 수정란을 옮길 때마다 100%의 알콜로 pipette를 세척하여 사용하였다.

3) Y 염색체 및 소 특이적 DNA primer 제조

소의 Y-specific DNA primer는 BOV97M인 5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3'과 5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3'(141bp) 그리고 Bovine specific DNA primer는 5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3'과

5'-TCG TCA GAA ACC GCA CAC TG-3'(216bp)을 제조 사용하였다.

수정란의 Y-염색체 특이적 DNA를 증폭시키기 위하여 합성된 소 Y-specific DNA primer는 Thermocyclers(Single Block System, 미국)를 사용하여 증폭하였다.

4) PCR

투명대가 제거된 수정란이 들어 있는 0.5ml의 eppendorf tube에 10× PCR buffer 5μl, 1.25mM dNTPs 8μl, 1.5mM MgCl₂ 3μl, 합성한 primer 각 200ng 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase (Promega, 미국)을 넣고 증류수로 50μl되게 채웠다. PCR 반응액은 vortex로 잘 혼합시키고 8,000rpm으로 원심하여 반응물질을 침전시키고 20μl의 mineral oil(Squib, 미국)을 덮어 PCR중 수분의 증발을 방지하였다.

PCR의 조건은 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초로 30 cycles 증폭시켰다(Table 3). 증폭이 완료된 다음 72℃에서 10분간 정치하였으며 2%의 agarose gel에서 전기영동하여 Y-염색체 특이적 DNA 단편을 판정하였다(Fig. 1.).

3. 통계분석

실험연구의 결과는 χ^2 검정을 하여 처리간의 유의성을 검정하였다.

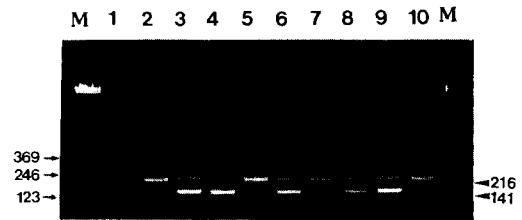


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified on Hanwoo IVF embryos by Two-step PCR methods.

M : DNA size marker

Lane 3, 4, 6, 8 and 9 : Male embryos

Lane 1, 2, 5, 7 and 10 : Female embryos

III. 결과 및 고찰

1. 소 체외 수정란의 생산

소 난포란을 체외성숙 및 수정후 TCM 199 및 CR1aa 배양액에서 배양하면서 7, 8 및 9일의 배반포 발생율을 조사한 결과는 Table 1에서 보는바와 같다.

2세포기 이상 난분할한 수정란의 비율은 TCM-199과 CR1aa 배양액에서 각각 54.6과 55.4%로 배양액간에 차이가 없었다. 난분할한 수정란중 체외수정후 9일까지 배반포이상 발달한 수정란의 비율은 TCM-199에서 23.5% 그리고 CR1aa 배양액에서 30.2%로 두 배양액간에 유의적인 차이가 인정되었다($P < 0.05$). 체외수정후 7일째 배반포 발생율은 TCM 199 배양액에서는 11.1%인 반면 CR1aa구에서는 14.8%로 CR1aa 배양액에서 약간 높은 발생율을 나타냈다. 마찬가지로 D 8 과 9 일째 배반포 발생율도 CR1aa이 TCM-199보다 약간 높았다.

본 연구에서 얻어진 TCM-199과 CR1aa의 난분할율 54.6%과 55.4%는 Yang과 Lu(1990)등의 77.7%와, Rehman 등(1994)의 76.1% 및 Durnford 등(1994)의 75.%보다는 상당히 낮다. 이는 본 연구에서는 1~3등급의 난포란을 사용하였으나 상기 보고자들은 1등급의 난포란만을 사용하는데 기인한 것으로 사료된다. 그러나 Bondioli (1992)는 등급을 가리지 않고 난포란을 배양한 결과 난분할율이 40.0% 였다고 보고하였다. 따라서 난분할율은 배양전의 난포란의 질이 중요한 요인으로 작용한다고 사료된다.

그러나 본 연구의 난분할된 수정란중 배반포로 발달하는 비율은 Goto 등(1988)의 15.1% 와 Durnford 등(1994)이 20%보다는 높았으나 Wiemer 등(1991)의 41.1%보다는 낮은 결과를 얻었다. 본 연구에서 배

반포로 발달한 비율은 CR1aa이 TCM-199보다 높았는데 이는 TCM 199 배양액에는 glucose와 인(phosphorus)이 함유되어 있어 난구세포와 공배양하더라도 ATP 생산이 적은데 기인한 것으로 사료된다(Rieger, 1992).

한편 본 연구에서 체외 수정후 배반포 발생율은 D 7 이 가장 높았고 시일이 경과할 수록 낮아지는 경향이 있었다. 오 등(1993)은 다배란 처리에 의한 D 7의 수정란은 상실배가 25.9% 그리고 배반포가 36.4%로 배반포 이상 출현율이 높았다고 하였으며 Carvalho 등(1996)은 총 473개의 D 7의 IVF 수정란을 발달단계별로 구분한바 상실배가 8%, 초기배반포가 34%, 배반포가 30% 그리고 확장배반포 이상이 28%로 배반포 이상의 출현율이 유의적으로 높았다고 보고하였다. Hasler 등(1994)은 BRL세포와 공배양에 의한 난할란이 배반포로의 발생율이 D 7에 24%, D 8에 33% 그리고 D 9에는 35%였다고 하였고 Hill 등(1994)도 SOF 배양액에서 난할란의 배반포로 발생율은 D 7에 44.9~60.8%로 본 연구의 결과보다 높은 성적을 보고하고 있다. 이와같이 체외 배반포 발생율이 각기 다른 것은 연구자들에 따라 배양액의 종류, 첨가제 및 배양 조건이 다르고 수정란 생산과 관련한 기술수준의 차이에서 오는 것으로 사료된다.

2. D 7에 생산된 체외 수정란의 발생속도와 성비

TCM 199 배양액에서 D 7에 생산된 초기 배반포, 배반포, 확장 배반포 및 부화배반포 이상의 수정란을 Y 염색체 특이적 혹은 소 특이적 DNA primer로 PCR하여 얻어진 성비를 Table 2에 나타냈다.

초기 배반포 43개와 배반포 수정란 41개를 PCR 기법에 의해 성관별한 결과 옹성비가 39.5와 58.5%로 암수의 성비는 1 : 0.7 과 1 : 1.4로 초기 배반포는 옹

Table 1. Effects of two different media on the production of blastocyst embryos matured and fertilized *in vitro*

Medium	No. of oocytes treated	No. of oocytes cleaved	No. (%) of blastocysts produced on			
			Day 7	Day 8	Day 9	Total
TCM-199	724	395(54.6)	44(11.1)	32(8.1)	17(4.3)	93(23.5) ^a
CR1aa	561	311(55.4)	46(14.8)	29(9.3)	19(6.1)	94(30.2) ^b

^{a, b} : Values in the same column with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$)

Table 2. Sex ratio of bovine IVF embryos with different stage on Day 7 in TCM 199 medium

Stage of embryos	No. of embryos	Male (%)	Female(%)	Sex ratio (Male:Female)
Early blastocyst	43	17(39.5) ^c	26(60.5) ^d	0.7:1
Blastocyst	41	24(58.5) ^c	17(41.5) ^d	1.4:1
Expanded blastocyst	29	20(69.0) ^a	9(31.0) ^b	2.2:1
Hatched blastocyst	75.8	5(71.4) ^a	2(28.6) ^b	2.5:1

Values with different superscript letter within row are significantly(c, d : P<0.05, a, b : P<0.01) different.

성비가 유의하게(P<0.05) 낮았으나 배반포에서는 여성비가 유의하게(P<0.05) 높았다. 한편 확장 배반포와 부화 배반포의 여성비는 각각 69.0과 71.4%로 암수의 성비가 1 : 2.2 와 1 : 2.5로 유의적 차(P<0.01)를 나타냈다. 즉 D 7에 생산되는 수정란중 발생이 빠른 배반포, 확장 배반포 및 부화 배반포에서는 여성의 수정란이 많았던 반면 발생 속도가 상대적으로 느린 초기 배반포에서는 자성의 수정란이 많았다.

본 연구에서 D 7에 발생한 배반포중 발육속도가 빠른 확장 배반포 이상에서 여성 수정란의 비율이 높은 것은 Avery 등(1992)이 다배란 처리하여 채란된 D 7의 수정란을 발육속도별로 나누어 이식한 결과 분만한 송아지의 성비는 빠른 발육그룹에서는 68%가 그리고 늦은 그룹에서는 32%가 여성이었다는 보고와 일치되고 있다. Carvalho 등(1995)도 D 7에 생산된 IVF 수정란 235개의 평균 성비는 1 : 1이었으나 배반포와 확장 배반포 이상의 수정란에서는 여성의 비율이 각각 68과 100%였으며 상실배에서는 24%만이 여성으로 확인되었다는 보고와 일치되고 있다. Yadav 등(1993)도 소 체외수정란중 수정후 24 및 30시간에 난분할이 일어나는 수정란은 여성일 확률이 각각 100 및 77%였으나 수정 40시간 이후에 난분할이 일어나는 것은 자성이 많았다고 하여 빨리 발육하는 수정란은 여성일 확률이 높음을 보고하고 있다. 그리고 Carvalho 등(1996)은 D 7의 IVF 수정란의 발육속도를 200×의 현미경하에서 5개 그룹으로 나누어 총 235개의 수정란을 PCR한 결과 발육속도별 성비의 차이는 있었으나 전체 평균 성비는 1 : 1로서 차이가 없었다고 하여 본 연구의 결과와 일치하고 있다.

한편 소 체외수정란 생산시 발육속도는 난자속에 저장되어 있는 maternal RNA에 영향을 받으며 특히 체외수정시 난자는 X-정자 보다는 Y-정자에 호의적이

며 여성이 생존성이 높기 때문에 여성 수정란이 많이 발생하는 것으로 고찰하고 있으나(Yadav 등, 1993) 아직도 발육속도와 수정란의 성비와의 관계를 정확히 구명해내지는 못하고 있다.

3. D 8에 생산된 체외 수정란의 발생속도와 성비

체외 수정후 D 8에 발생한 배반포중 초기 배반포의 여성비는 39.0%로 여성비가 적은 반면 배반포에서는 여성비가 51.5%로 암수의 성비가 1 : 1에 가까웠다. 한편 확장 및 부화 배반포에서는 여성비가 각각 71.4와 72.7%로 유의적(P<0.01)으로 높았다. 따라서 D 8에 생산된 수정란에서도 발생속도가 빠른 확장 배반포 이상의 수정란에서의 성비는 여성이 유의적(P<0.01)으로 많은 반면 발생속도가 느린 초기 배반포에서는 자성비가 높았다(Table 3).

본 시험에서 D 8에 생산된 배반포 이상의 수정란에서 발육속도가 빠른 확장 배반포 이상에서 여성비가 높았던 결과는 Xu 등(1991)이 D 8의 체외 수정란을 발육속도별로 5단계로 나누어 염색체 분석한 결과 발육단계가 빠른 순으로 각각 87, 61, 58, 42 그리고 18%의 여성비를 보고한 결과와 일치하고 있다. Marquant-LeGuinne 등(1992)도 PCR기법으로 D 8에 생산한 수정란의 성비를 조사한 결과 빠른 발육그룹에서는 79%가 그리고 늦게 자라는 그룹에서는 47%가 여성 수정란으로 보고하여 본 연구의 결과와 일치하는 경향을 나타냈다.

4. D 9에 생산된 수정란의 발생속도와 성비

체외에서 배양한 소 체외 수정란중 D 9까지 발생하는 배반포중 발생단계별로 성비를 Y 염색체 특이적 및 소 특이적 DNA primer로 PCR하여 판별한 결과를 Table 4에 나타냈다.

Table 3. Sex ratio of bovine IVF embryos with different stage on Day 8 in TCM medium

Stage of embryos	No. of embryos	Male (%)	Female (%)	Sex ratio(M:F)
Early blastocyst	41	16(39.0) ^c	25(61.0) ^d	0.6:1
Blastocyst	33	17(51.5) ^{NS}	16(48.5) ^{NS}	1:1
Expanded blastocyst	21	15(71.4) ^a	6(28.6) ^b	2.5:1
Hatched blastocyst	11	8(72.7) ^a	3(27.3) ^b	2.7:1

Values with different superscript letter within row are significantly(c, d : P<0.05, a, b : P<0.01) and different NS : Non-significant

Table 4에서 보는바와 같이 초기 배반포 및 배반포의 자성비는 각각 63.6 및 57.1%로 웅성비보다 유의적(P<0.05)으로 높았다. 그러나 확장 배반포의 암수 성비는 1:1로 유의적 차이가 없었으나, 부화배반포에서는 웅성이 68.9%로 자성 29.4%보다 유의적(P<0.01)으로 높았다. 따라서 D 9에 생산된 수정란은 부화 배반포를 제외하고는 자성비가 높은 것이 특징이다. 일반적으로 소 IVF 수정란은 D 8까지의 것만 이식을 하므로 D 9 수정란에 대한 연구보고는 없어 비교 고찰은 곤란하나 본 시험에서 자성 수정란이 늦게 자라는 것은 확인할 수 있었다.

본 연구에서 체외수정후 7일과 8일의 수정란은 확장 배반포 이상의 수정란에서는 웅성비가 유의하게 높았다. 이는 수정란의 성비는 체외수정후 발생속도와 밀접한 관계가 있고 확장 배반포 이상으로 빨리 발육하는 수정란 중에 웅성비가 높다는 결과와 일치하고 있다(Valdivia 등, 1993 ; Yadav 등, 1993). 한편 발육속도가 느린 배반포이하의 수정란은 염색체 이상, 다정자 침입, 혹은 Y 염색체 부재로 성장이 지연되는 것으로 추정하고 있다. 수정후 빨리 자라는 수정란중에 웅성비가 높은 이유에 대해서는 확실히 밝혀지지 않았으나 수정후 3일째부터 성에 대한 gene expression이

일어나며 이때 빨리 발달한 수정란에서는 (8 세포기 이상으로) nucleolar extranucleolar RNA 합성이 재개되기 때문이라 했다(Kopencny와 Niemann, 1993).

Zwingman 등(1993)은 XX와 XY 염색체를 가진 수정란의 발달율의 차이는 testis-determining factors(Sry) 유전자의 존재여부와 유전자 발현 정도에 따라 달라지며 Y 염색체를 가진 수정란이 훨씬 빨리 자란다고 하였다(Tsunoda 등, 1985 ; Burgoyne과 Thornill, 1995). 그러나 아직도 XY 혹은 XX 염색체를 가진 수정란의 발달율의 차이가 Y 염색체 때문인지 아니면 X-linkaged 유전자의 이중발현(double expression) 때문인지는 확실치 않고 있어 앞으로 많은 연구가 필요하다고 사료된다(Guti rrez-Adán 등, 1996). 그리고 수정란을 이식한 경우 산자의 성비가 거의 1:1이 되는 것은 임신기간중 유사산등 태아 흡수등으로 인하여 빨리 자라는 웅성의 수정란이 자궁에서 많이 소실되기 때문이라고 했다(Berg 등, 1992 ; King, 1992).

Totey 등(1996)은 소 체외수정란 생산시 사용하는 종모우의 정액에 따라 생산되는 수정란의 성비가 38.7%에서 64.3%로 유의적으로 다르게 나타난다고 하였

Table 4. Sex ratio of bovine IVF embryos with different stage on Day 9 in TCM medium

Stage of embryos	No. of embryos	Male (%)	Female (%)	Sex ratio(M:F)
Early blastocyst	33	12(36.4) ^c	21(63.6) ^d	0.6:1
Blastocyst	35	15(42.9) ^{NS}	20(57.1) ^{NS}	0.8:1
Expanded blastocyst	23	12(52.2) ^{NS}	11(47.8) ^{NS}	1:1
Hatched blastocyst	16	11(68.9) ^a	5(29.4) ^b	2.2:1

Values with different superscript letter within row are significantly(c, d : P<0.05, a, b : P<0.01) different.

NS : Non-significant

다. 즉, 특정 종모우에서는 2.3 : 1까지 성비의 변화가 심하였다고하여 근후 우리나라에서도 한우 종모우 중 류별 수정란의 성비를 구명할 필요가 있다고 사료된다.

일반적으로 체내·외 수정란 생산에 있어서 빠른 발육속도는 웅성 수정란일 확율이 높다는 보고도 많으나 Grisart 등(1993)은 수정후 6~9일까지 IVF 소 수정란에서 발육속도와 성비와는 아무런 상관이 없다고 하였다. Berg 등(1992)도 발육속도별로 나누어 수정란 이식한 결과 산자의 성비의 변화가 없었다고 하였고 Carvalho 등(1996)은 반복시험시 마다 다소 다른 성비를 나타낼수 있기 때문에 정확한 배양조건이 정립되지 않은 상태에서 선불리 사전에 성을 판단해서는 안 된다고 하였다. 따라서 본연구에 얻어진 수정란의 발육속도별 수정란의 성비 변화는 다른 연구실의 다른 배양조건하에서는 얼마든지 달라 질 수도 있으나 일정한 배양조건을 확립한 다음에 얻어지는 수정란의 성비는 비교적 일정할 것으로 사료된다.

IV. 적 요

한우의 체외 수정란 생산을 위하여 TCM-199과 CR1aa 배양액을 사용하여 9일간 배양하였다. Day 7에서 9까지 발생한 배반포 수정란을 발육속도 및 발달 단계별로 분류하고 Y 염색체 특이적 DNA primer를 이용하여 PCR 기법으로 수정란의 성을 판별하였다.

1. 한우 난포란을 체외성숙 및 수정후 TCM 199과 CR1aa 배양액에서 9일간 배양했을때 배반포의 발달율은 각각 23.5와 30.2%로 배양액간에 유의차($P < 0.05$)가 있었다.
2. 체외수정후 7일째의 초기 배반포, 배반포, 확장 배반포 및 부화 배반포 수정란의 웅성:자성비는 각각 0.7 : 1, 1.4 : 1 및 2.5 : 1로 확장 배반포 이후에서는 웅성 수정란의 비율이 유의적($P < 0.01$)으로 높았다.
3. 체외수정후 8일째 초기 배반포, 배반포, 확장 배반포 및 부화 배반포의 웅성:자성비는 0.6:1, 1:1, 2.5:1 및 2.7:1로 확장 배반포 이후에서는 웅성 수정란의 비율이 유의적($P < 0.01$)으로 높았다.
4. 체외수정후 9일째 초기 배반포, 배반포, 확장 배

반포 및 부화 배반포의 웅성:자성비는 각각 0.6:1, 0.8:1, 1:1 및 2.2:1로 부화 배반포에서만 웅성수정란의 비율이 유의적($P < 0.01$)으로 높았다.

소 난포란을 체외성숙 및 수정후 TCM-199과 CR1aa배양액에서 9일간 배양했을때 배반포의 발생율은 CR1aa 배양액이 TCM-199보다 높았으며 수정란의 발달단계별 성비는 확장 배반포 이상에서는 웅성이 그리고 초기 배반포에서는 자성의 비율이 유의하게 높았다.

V. 인용문헌

1. Avery, B., A. Bak and M. Schmidt. 1989. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology*. 32:139-147.
2. Avery, B., C. B. Jorgensen, V. Madision and T. Greve. 1992. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 32:265-270.
3. Avery, B., V. Madison and T. Greve. 1991. Sex and development in bovine *in-vitro* fertilized embryos. *Theriogenology*. 35:953-963.
4. Berg, U., H. D. Reichenbach, J. Liebrich and G. Brem. 1992. Sex ratio of calves born after transfer of *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*. 37:191(Abstr.).
5. Bondioli, K. 1992. Embryo sexing: A review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *J. Anim. Sci.* 70:19-29.
6. Bredbacka, K. and P. Bredbacka. 1996. Sex-related cleavage rate difference in bovine embryos produced *in vitro* is controlled by glucose. *Theriogenology*. 45:191(Abstr.).
7. Burgoyne, P. S. 1993. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. *Development*. 117:341-345.
8. Burgoyne, P. S. and A. R. Thornhill. 1995. Is Sry responsible for the more advanced de-

- velopment of male embryos compared to female embryos prior to gonadal sex differentiation?. *Genet. Res.* 65:233(Abstr.)
9. Carvalho, R. V., M. R. Del Campo, A. T. Palasz, Y. Plante and R. J. Mapletoft. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on Day 7. *Theriogenology.* 45:489-498.
 10. Carvalho, R. V., M. R. Del Campo, Y. Plante and R. J. Mapletoft. 1995. Effect of stage of development on sex ratio and survival after freezing of Day 7 bovine IVF embryos. *Theriogenology.* 43:183(Abstr.).
 11. Durnford, R., R. B. Stubbings and L. Ainsworth. 1994. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology.* 42:261-272.
 12. Grisart, B. J. Perret, M. Georges, G. Vassart and F. Dessy. 1993. A new quick and reliable sexing method : application to the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. 9th Sci Meet AETE. 204(Abstr.).
 13. Gutierrez-Adana, A., E. Behboodi, G. B. Anderson, J. F. Medrano and J. D. Murray. 1996. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct. *Theriogenology.* 46:515-525.
 14. Hasler, J. F., J. E. Stokes and J. S. Meriton. 1994. Comparison of two different populations of BRL cells in a bovine *in vitro* culture system. *Theriogenology.* 41:214(Abstr.).
 15. Hill, J. L., S. K. Walker and C. D. Nancarrow. 1994. The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on embryo cleavage and blastocyst formation rates. *Theriogenology.* 41:215(Abstr.).
 16. King, W. A., B. R. Yadav, K. P. Xu, L. Picard, M-A. Sirard, A. V. Supplizi and K. J. Betteridge. 1991. The sex ratios of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology.* 36:779-788.
 17. King, W. A., L. Picard, D. Bousquet and A. K. Goff. 1992. Sex dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 96:453-459.
 18. Kopencny, V. and H. Niemann. 1993. Formation of nuclear microarchitecture in the preimplantation bovine embryos at the onset of transcription : implications for biotechnology. *Theriogenology* 39:109-119.
 19. Linder, G. M. and R. W. Wright, Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 20:407-416.
 20. Marquant-Le Guienne, B., M. Nibart, C. Bruyader, G. Kohan, L. Esposito, J. M. Thuard and M. Thibier. 1992. DNA probe sexing of young *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology.* 37:253(Abstr.).
 21. Rehman, N., A. R. Collins, T. K. Suh and R. W. Wright, Jr. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cocultured with buffalo rat liver cells. *Theriogenology.* 41:1453-1462.
 22. Rieger, D. 1992. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology.* 37:75-93.
 23. Totey, S. M., M. Daliri, K. B. C. Appa Rao, C. H. Pawshe, M. Taneja and R. S. Chillar. 1996. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated *in vitro*. *Theriogenology.* 45:521-533.
 24. Tsunoda, Y., T. Tokunaga and T. Sugie. 1985. Altered sex ratio of live young after transfer of fast and slow developing mouse embryos. *Gamete Res.* 12:301-304.
 25. Valdivia, R. P. A., T. Kunieda, S. Azuma

- and T. Toyoda. 1993. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 121-126.
26. Xu, K. P., B. R. Yadav, W. A. King and K. J. Betteridge. 1991. Sex related differences in the development of bovine embryos produced *in vitro*. Biol. Reprod. 44(Suppl 1): 97 Abstr.
27. Yadav, B. R., W. A. King and K. J. Betteridge. 1993. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 36:434-439.
28. Yang, Y. B. and K. H. Lu. 1990. The influence of bovine oocytes type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. Theriogenology. 33:355(Abstr.).
29. Zwingman, T., R. P. Erickson, T. Boyer and A. Ao. 1993. Transcription of the sex-determining genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:814-817.
30. 오성중, 양보석, 이명식, 백광수, 성환후, 정진관, 임경순. 1995. 직접이식을 위한 소 체외수정란의 동결융해후 생존성 및 수태율에 미치는 영향. 가축 번식학회지. 19:49-54.
31. 오성중, 이창수, 양보석, 정진관, 성환후, 임경순. 1993. PCR기법을 이용한 소 Y-염색체 특이적 DNA 단편 증폭에 의한 성관별 연구. 한축지. 35:371-375.
32. 오성중, 양보석, 이명식, 성환후, 정진관, 강홍주. 1993. 수정란 추가이식에 의한 한우 쌍자 생산연구. 농업논문집 35:507-512.