

PCR기법에 의한 소 수정란의 성감별

이해이, 조성우, 박기승, 김용수, 정구남, 노수일, 김용준*

전라북도축산진흥연구소, *전북대학교 수의과대학

1. 서론

착상전 수정란의 성을 감별, 이식하여 축산농가가 원하는 성의 산자를 생산할수있다면 이는 가축의 번식효율 및 생산성과 수정란이식 산업화에 크게 기여할 수 있을 것이다

이에 수정란의 성감별에 대한 연구가 많이 이루어졌는데 성염색체 분석(Iwaskai등, 1990), H-Y항체 이용진단법(Avery등, 1989), X-linked enzymes 이용법(Williams, 1986), 수정란의 발달 속도에 의한 구분 방법(Itagaki등, 1995)등이 수행되었으나 정확성과 효율성의 문제로 실용화에는 이르지 못하고 있는 실정이다.

그러나 최근 PCR기술의 도입으로 돼지에서는 Mcglaw등, 사람에서는 Nakahori등, 소에 있어서는 Bondioli등은 Y chromosome specific polynucleotides를 이용한 수정란의 성감별 방법이 개발되었고 수정란 성감별을 위한 Biopsy 방법, 성감별에 필요한 최소 세포양, 적정한 PCR조건등에 관한 연구가 활발이 수행되었다.

이로써 PCR을 이용한 Y chromosome specific DNA 증폭 방법은 수정란 성판정에 있어서 신뢰할만한 지표가 되었고 PCR기법에 의해 성감별된 수정란은 수정란이식을 통해 농가에 실제적으로 적용하여 계획적인 암수송아지의 선별 생산이나, 가축 경제형질의 유전적 개량에도 크게 이바지할것으로 기대된다

이에 본 Workshop에서는 소 수정란의 Biopsy와 PCR기법에 의한 소 수정란의 성감별 기술을 소개하고자 한다

2. PCR기법을 이용한 수정란 성감별

1) 한우 체외수정란 생산

(1) 난포란의 회수 및 체외성숙

도축장에서 도축되는 한우의 난소를 항생제가 첨가된 25℃의 멸균 생리 식염수에 침지하여 3시간 이내에 실험실로 운반하고 난소를 37℃의 멸균 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음 5ml syringe에 3% FCS가 첨가된 D-PBS (Gibco)를 흡입한후 2~7mm의 난포로부터 난포란을 흡인하였다.

실체현미경하에서 난포란을 회수하여 체외성숙용 배양액 즉 10% FCS가 첨가된 TCM 199(Gibco)으로 세척하고 mineral oil이 도포된 체외성숙용 배양액 100 μ l droplet을 만들어 난자 15~20개를 넣은다음 38.5℃, 5%CO₂ 조건하에서 20~22시간동안 체외성숙시켰다.

(2) 체외수정 및 수정란 체외배양

한우 동결정액을 38℃에서 30초간 용해한 후 caffen-sodium benzoate (5mM), Heparin(10 μ g/ μ l)이 첨가된 B·O 액을 이용하여 500g에서 5분간 2회 원심분리하였다.

원심분리후 BSA(10mg/ml)가 첨가된 체외수정용 B·O액으로 정자 최종 농도가 5 \times 10⁶/ml 되도록 조정한다음 100 μ l의 droplet을 만들고 20~22시간 체외성숙시킨 난자를 체외수정용 B·O액으로 2~3회 washing하고 정액 droplet에 넣어 5~6시간 동안 체외수정시켰다.

수정후 난자는 체외성숙용 배양액으로 수회 이상 세척하여 난자 주위의 정자를 깨끗이 씻어주어 난구세포 위에서 공배양하고 배양후 48시간마다 신선한 배양액으로 교환해주면서 38.5℃, 5% CO₂ Incubator에서 7-9일간 배양하였다.

2) 수정란의 생검 및 PCR에 의한 성감별

(1) 수정란의 생검 및 배양

체외수정란을 50 μ l의 PBS(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free, 0.2M sucrose)배지내로 옮겨 Inverted Microscope (Nikon)의 manipulator (Narishige), Bio-cut blade (Feather,일본)를 이용하여 수정란 ICM부분의 반대극에서 10~20%를 절단하여

생검하였다.

수정란생검후 10~20%절단된 부분은 성감별에 공시하고 나머지는 기존의 체외수정란이 배양되었던 TCM199(10%FCS) droplet내에 옮겨 배양하였다.

(2) 수정란의 성감별을 위한 primers

PCR에 의한 소 수정란의 성감별에 사용된 bovine male-specific primers는 BRY₁ (Bovine repeat, Y-associated)으로서 그 염기배열은 forward primer는 5'-GGATCCGAGACACAGAACAG-3', reverse primer는 5'-CAAGCTAATCCATGCATCCT-3'이었다

증폭된 PCR product의 크기는 304 nucleotides이었다.

(3) 소의 genomic DNA 준비

대조군으로 이용된 genomic DNA는 한우 암·수의 경정맥에서 채혈하여 genomic DNA purification kit(Promega)를 이용하여 각각의 male, female genomic DNA를 추출하였다.

또한 UV Spectrophotometer로 260nm에서 흡광도를 측정하여 control로 사용할 DNA농도를 10ng/ μ l이 되도록 희석하였으며 추출한 genomic DNA는 사용전까지 4°C에서 보관하였다.

(4) 수정란의 DNA 추출

성감별에 공시할 생검된 수정란은 4 μ l Embryo Lysis Buffer(20mM Tris, 0.9% Tween 20, 0.9% Tergitol, 0.4mg/ml proteinase K)가 들어있는 PCR tube에 넣어 55°C에서 30분간 처리한후 95°C에서 15분간 처리하여 수정란의 DNA를 추출하였다.

(5) PCR 및 전기영동

PCR을 위한 반응액은 10 \times PCR buffer, 25mM MgCl₂, 25mM dNTPs, 각각의 10pmol primer, 5IU Taq Polymerase(Promega), template를 혼합한후 멸균증류수로 45 μ l 되도록 하였다.

PCR 증폭은 Thermocycler (ERICOMP, 미국)를 이용하여 94°C에서 3분간 primary denaturation을 실시하였고 denaturation, annealing, extension을 각각 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 35cycles 실시하였다

마지막 extension은 72°C에서 10분간 정치하였으며, PCR 반응이 끝난후 2% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 PCR 산물을 ethidium bromide (0.5 μ g

/μl)로 염색하여 UV transilluminator 하에서 관찰하였다.

증폭된 DNA의 크기를 확인하기위하여 male 수정란의 경우 control로서 male blood에서 추출된 genomic DNA의 PCR product의 size인 304bp와 비교, 확인하였다

3. 참고문헌

- 1) Avery B., Bak A., Schmidt M. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology*. 32:139-147, 1989
- 2) Avery B., Schmidt M. Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies. *Acta vet scand* 30: 155-164, 1989
- 3) Bondioli KM, Ellis SB, pryor JH, Williams MV and Harpold MM. The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 31:91-104, 1989
- 4) Bredbacka P., Kankaanpaa A., Peippo J. PCR-sexing of bovine embryos : A simplified protocol. *Theriogenology* 44: 167-176, 1995
- 5) Carbonneau G., Morin N., Durocher J., et al. Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology* 47: 53, 1997
- 6) Hilgers LJ., Herr C. DNA contamination of reagents used in embryo transfer and culture. *Theriogenology* 40: 923-932, 1993
- 7) Itagaki Y., Kimura N., Yamanaka M., et al. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryo generated in vitro *J Mamm Ova Res* 12:73-78, 1995
- 8) Itagaki Y., Kimura N., Yamanaka et al. PCR sexing and survival following embryo biopsy-bisection of in vitro produced bovine embryos. *J Mamm Ova Res* 13:48-51, 1996
- 9) Itagaki Y., Sato S., Shitanaka Y., et al. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. *J. Reprod Dev* 39:65-72, 1993

- 10) Iwaskai S., Nakahara T. 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, 1990
- 11) King W.A., sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 21:7-17, 1984.
- 12) Kudo T. Sato S., Sutou S. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *Reprod Develop* 39: 55-63, 1993.
- 13) McEvoy T.G., Sreenan J.M. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Theriogenology* 33:1245-1253, 1990
- 14) McGlaw RA., Jacobson RJ and Akamatsu M. A male specific repeated DNA sequence in domestic pig. *Nucleic Acids Res.* 16:10389, 1988
- 15) Nakahori Y, Mitami K, Yamada M and Nakagome Y. A Human Y-chromosome specific repeated DNA family(DZY1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* 14:7569-7580, 1986
- 16) Peippo J., Bredbacka P. Fast sample preparation with dithiothreitol for bovine embryo sex determination by the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 47:272, 1997
- 17) Peura T., Hyttinen J.M., Turunen M., et al. Preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35:547-555, 1984
- 18) Thibier M., Nibart M. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43:71-80, 1995
- 19) Williams T.J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology* 25: 733-739, 1986.
- 20) 김현종, 오성종, 김성우 등. PCR 기법에 의한 소 수정란의 음성특이적 DNA Band 출현과 성판별에 관한 연구. *한국수정란이식학회지* 11:3, 283-289, 1996
- 21) 유일정, 김용준, 이경광. 햄스터 H-Y항체와 종합효소연쇄반응을 이용한 소 수정란의 성감별. *대한수의학회지* 39 : (1) 189-203 , 1999
- 22) 황윤식, 한용만, 이철상, 등. PCR 방법을 이용한 소 수정란의 성판별, *한국가축번식학회지* 18: 275-284, 1995.