

## 미세조작 및 PCR 기법을 이용한 성판별 수정란의 생산 및 동결

이홍준 · 서승운 · 김기동 · 이상호<sup>†</sup>  
고려대학교 생명공학원

### Production and Cryopreservation of Sexed Embryos after Micromanipulative Biopsy and PCR

H. J. Lee, S. W. Seo, K. D. Kim and S. H. Lee<sup>1</sup>

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701. Republic of Korea.

#### SUMMARY

The possible use of micromanipulative biopsy and PCR of the biopsied embryonic cells was tested to produce sexed bovine embryos in practical terms. By micromanipulation and PCR techniques, higher survival rate and accurate sexing of demi-embryos were obtained. Bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* were co-cultured with bovine oviductal epithelial cell (BOEC) monolayer in USU-6 medium supplemented with 15% FBS, and the embryos of 37% (327/885) were developed to blastocysts. Among 111 blastocysts produced by *in vitro*, only 7 (6.3%) embryos were found unable to determine their sex, probably due to the loss of cells, since no PCR product was found from those cells. All the remaining 104 (93.7%) demi-embryos survived micromanipulation and demonstrated male-specific product or bovine-specific product alone suggesting that correct sexing of the sample. Forty-three point one percent (25/58) of manipulated and cryopreserved demi-embryos after thawing were survived. Final verification of the sexed embryos is necessary to make sure the same sex in fetus and newborn calf upon embryo transfer. The established sexing method on a large number of bovine embryos from previous and this study suggests that this a could be used practically in the field.

(Key words : Bovine embryo, Sex determination, Micromanipulative biopsy, PCR)

#### 서 론

포유동물의 성결정 유전자의 발견 (Berta 등, 1990; Gubbay 등, 1990; McLaren, 1991)에 의해 다양한 종류의 성조절 유전자에 대한 지식이 축적되어 응용적인 측면 뿐만 아니라 성결정기작 연구에도 큰 기초가 마련되었다. 즉 분자생물학적 기법의 보편화와 더불어 다양한 유전자 및 DNA 절편

들이 성별 특이한 것으로 보고되고 있다(Cooke, 1976, Singh 등, 1980; Bostock 등, 1987). Handyside 등(1990)은 사람에서 성연관 유전적 결병을 검색할 목적으로 DNA probe를 이용하여 biopsy된 소수의 배세포로부터 PCR을 이용하여 성판정 방법을 개발하였으며, 이와 유사한 방법들이 소 초기배의 성판정에 이용되고 있다(Bondioli 등, 1989; Peura 등, 1991; Kudo 등, 1993). 최근의 Y 염색체특이 probe에 의한 초기배의 성판정은 세

본 연구는 1997~1998년도 교육부 유전공학 학술연구조성비 지원사업에 의해 수행되었음(과제번호 학술 81500-57).

<sup>†</sup>Correspondence

포·화학적 기술을 이용할 경우 30시간(Leonard 등, 1987), 방사선 동위원소를 이용할 경우 8일(Bondioli 등, 1989)이 소요되지만 PCR(Herr 등, 1990; Herr와 Reed, 1991; Peura 등, 1991; Rao 등, 1992)을 이용할 경우 수시간 내에 신속정확한 성판정이 가능하게 되었다. 특히 체외에서 초기배의 대량생산이 가능해지고 동결보존 방법 및 수정란 이식 기술 등의 발달 등에 힘입어 PCR을 이용한 가축 초기배의 성판정 연구는 급속한 진전을 보이고 있다. 그러나 대부분의 성판정 연구들이 실험실 내에서만 이루어지고 실질적으로 현장에서 효율적으로 적용되지는 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 수정란 이식기술과 연계하여 직접 현장에서 적용 가능하도록 하기 위하여 수정란의 생산기술을 확립하고 미세조작과 PCR을 이용하여 신속하고 정확한 성판정이 된 소의 수정란을 동결보존 후 융해하여 이식 가능한 성판정된 수정란을 생산하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 체외에서 성숙, 수정, 발생된 소 배반포의 생산

난구세포가 균일한 3~5mm 난포란을 회수하여 TCM 199 (20% FCS + 10IU/ml PMSG +10IU/ml hCG) 배양액에서 22~24시간 동안 체외성숙하였다. 체외성숙 난자 중 난구세포가 잘 퍼져 있는 난자만을 회수하여 300 IU/ml hyaluronidase와 3% sodium citrate로 난구세포를 제거한 후 percoll gradient 방법에 의해 분리한  $1.5 \times 10^6$  cells/ml 농도의 정자를 매정하여 Fert (수정용) 배양액에서 체외수정을 유기하였다. 수정된 초기배는 15% FCS를 함유한 USU-6 배양액 또는 CZB 배양액에서 소 난관상피세포단층과 공배양하여 배반포까지 발생시켰다.

### 2. 미세조작 biopsy와 PCR에 의한 급속 성판정

Seo 등(1997)이 개발한 미세조작기술을 이용하여 배반포기까지 발생한 소 초기배 영양막세포의 일부를 채취하여 이를 PBS + 4 mg/ml BSA 배양액에서 3회 세정한 후 18  $\mu$ l의 증류수를 함유하고

있는 0.5 ml microcentrifuge tube에 넣은 후 동결(-196°C)과 융해(37°C)를 3회 반복하였다. 216 bp의 증폭 산물을 생산하는 소 Y-염색체 특이 primer (Reed 등, 1988)와 301 bp의 증폭산물을 생산하는 소 특이 primer (Plucienniczak 등, 1982)를 각각 사용하여 PCR을 수행하였다. 10 $\times$ PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.9, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 0.1% BSA), 200  $\mu$ M dNTPs(dATP, dCTP, dGTP와 dTTP), 50 pM primers (40 pmol Y 염색체특이 primers와 10 pmol 소 특이 primers), 2.5 U Taq DNA polymerase를 사용하여 95°C에서 5분간 denaturation 한 후 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension으로 구성된 cycle을 40회 반복 수행하여 표적 DNA를 증폭하였다. PCR 증폭산물 중 10  $\mu$ l을 회수하여 2% agarose gel과 1 $\times$  tris-acetate-EDTA (TAE) buffer에서 40분간 전기영동을 실시하였다.

### 3. 미세조작 소 초기배의 동결보존 및 융해

미세 조작된 소 초기배(배반포)를 PBS + 15% FBS 용액과 1.5M ethylene glycol 용액에서 각각 3분간씩 평형 시킨 후 0.25 ml straw에 1개의 초기배를 충전하였다. 충전된 straw는 program된 자동동결기를 사용하여 1°C/min로 -7°C까지 완만 냉각시킨 후 seeding 하여 10분간 정지한 다음 0.3°C/min로 -35°C까지 냉각시킨 후 액체질소 용기에 넣어 동결보존하였다. 초기배의 융해시에는 straw를 실온에서 30초, 30°C 물에서 10초간 정지한 후 PBS + FBS 용액으로 3회 세정한 후 체외에서 24시간 동안 배양하여 생존율을 판정하거나 직접 수정란이식에 사용하였다.

## 결과 및 고찰

1. 안정적인 체외배양체계에 의한 초기배의 생산 소 초기배의 미세조작 biopsy와 PCR에 의한 성판정 연구를 위해서는 안정적인 소 초기배의 공급이 이루어져야 한다. 소 초기배 배양체계를 개선시키기 위해 CZB 또는 USU-6 배양액을 소 난관상피세포단층과 공배양하여 발생능을 비교, 분석하

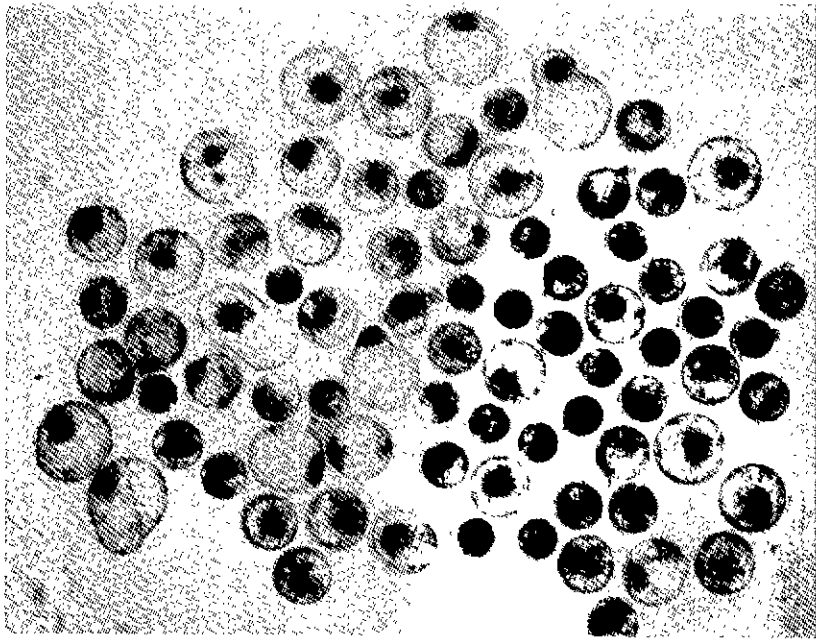


Fig. 1. Bovine embryos produced *in vitro* using USU-6 medium.

였다. 2- 또는 3-세포기까지의 초기 발생은 두 배양액에서 유사한 성적을 나타내었지만, 수정 후 10 일 쯤에 조사한 배반포 및 나화 배반포 형성율의 경우 USU-6 배양액과 CZB 배양액에서 각각 37% (327/885)와 15% (125/835)를 보여 주었다 (Fig. 1; Table 1).

이러한 결과는 체외에서 소 초기배의 안정적이고 지속적인 생산을 위해서 USU-6 배양액에 소 난관상피세포단층과 공배양하여 이용하는 것이 기존에 사용하던 CZB 배양액에 비해 효율적이라는 것

을 제시해 주고 있다.

## 2. 미세조작 biopsy에 의해 분리된 배반포 세포의 성판정

소와 같은 대가축에 있어서 초기배 세포에서 정확한 성판정이 가능하게 되면 경제적으로 유용한 자성축을 선별 생산함으로써 동물육종 및 번식체계의 개선을 도모할 수 있다(Peura 등 1991; Handyside 등 1990). 본 연구에서는 확립된 미세조작기법과 PCR에 의한 성판정 기법을 이용하여 소

Table 1. Improvement of blastocyst production from oocytes matured, fertilized and cultured *in vitro*<sup>1</sup>

Medium <sup>2</sup>	No. of oocytes used	No. of embryos cleaved at 48 hpi <sup>3</sup> (%)	No. of embryos developed to the following stages at			
			48 hpi		240 hpi	
			≤2-cell	≥ 3-cell	Blastocyst	Hatched blastocyst
USU-6	1,158	885 (76.4)	224 (25.3)	661 (74.7)	327 (37.0)	107/327 (32.7)
CZB <sup>3</sup>	993	835 (84.1)	240 (28.7)	595 (71.3)	125 (15.0)	1/125 ( 0.8)

<sup>1</sup> Bovine oocytes were cultured for 24h, and cocubated with capacitated spermatozoa for 18h

<sup>2</sup> Both USU-6 and CZB media contained 15% FCS + BOEC(Bovine Oviductal Epithelial Cells)

<sup>3</sup> hpi, hour postinsemination.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

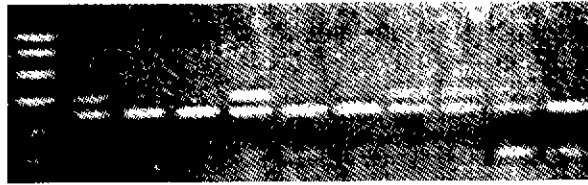


Fig. 2. Amplification of bovine- and Y chromosome-specific sequences in biopsied embryonic cells. Samples showing only one amplified product (216 bp) were identified as female (lanes 3, 5, 6, 9 and 10), while those showing two amplified products (216 and 301 bp) as male (lanes 4, 7 and 8). Lanes 1 and 2 are positive controls with male genomic DNA or female genomic DNA respectively. Lane M; DNA size marker.

초기배의 성판정을 실시하였다. PCR 수행 중 나타날 수 있는 성판정 오류를 최소화하기 위해 소 특이 primer (216 bp)와 소 Y-염색체 특이 primer (301 bp)를 동시에 사용하여 표적 DNA를 증폭하였다 (Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와 같이 용성 초기배세포 (lanes 4, 7과 8)의 경우에는 216 bp의 소 특이 DNA 증폭산물과 301 bp의 소 Y-염색체 특이 DNA 증폭산물이 합성되어지고, 자성 초기배 (lanes 3, 5, 6, 9와 10)의 경우에는 216 bp의 소 특이 DNA 증폭산물만 합성되어졌다. 배반포까지 발생한 소 초기배에서 일부 할구세포(2~10개)를 채취한 후 PCR을 수행한 결과 93.7% (104/111)의 초기배에서 성공적으로 성판정을 수행하였고, 6.3% (7/111)의 초기배의 성판정은 실패하였다.

PCR 증폭에 실패한 초기배의 경우에는 미세조작에 의해 분리된 할구세포의 수가 너무 적거나 세정과정 중 손실에 의한 것으로 사료된다. 성판정된 소 초기배 중 41.3% (43/104)가 용성으로 판정되었으며, 58.7%(61/104)가 자성으로 판정되었다 (Table 2). 본 연구 결과에서 나타난 소 초기배의 성판정 기법은 효과적인 동결 보존 및 수정란 이식 기술과 연계될 경우 경제적으로 유용한 자성축의 선별 생산이 가능할 것으로 사료된다.

### 3. 미세조작 biopsy 후 배반포의 동결보존

초기배의 동결보존을 위해서는 적절한 동결보호제의 이용이 필수적이다. 본 연구에서는 동해방지효과가 높고 수정란이식 시 재수화 과정이 필요 없는 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 미세조작으로 biopsy된 소 초기배를 동결 보존하였다. 동결·용해 후 정상 초기배 및 미세조작 초기배를 24~48시간 동안 체외배양 하여 형태적 차이와 생존율을 검토한 결과 정상 초기배와 미세조작 초기배의 동결·용해 후 회수율은 100%, 투명대의 손상율은 각각 2.4% (1/41)와 5.2% (3/58), 생존율은 각각 60.9% (25/41)와 43.1% (25/58)로 나타났다 (Table 3).

본 실험 결과, 미세조작과 동결보존이 당단백질인 투명대에 미치는 영향은 미미하였으나, 정상 초기배에 비해 미세조작 초기배의 동결보존 후 생존율이 낮게 나타났다. 이는 미세조작에 의한 세포수의 감소와 투명대 손상으로 인한 삼투압 충격 (osmotic shock) 등에 기인하는 것으로 보여진다. 그러나, 미세조작과 동결보존을 거친 초기배가 43%의 생존율을 보여 주어 향후 성판정된 동결수정란의 공급이 가능함을 시사하고 있다.

Table 2. Summary of predetermination of sex in biopsied embryonic cells by PCR after micromanipulation

No of embryos used*	No of embryos sexed as (%)		
	Male	Female	Unable to determine
111	43(38.7)	61(55.0)	7(6.3)

\* Blastocyst stage embryos.

Table 3. Survival of manipulated and cryopreserved demi-embryos after thawing and subsequent culture for 24 to 48hrs

State of embryos	No. of embryos frozen (%)	No. of embryos recovered (%)	No. of embryos damaged in the ZP <sup>1</sup> (%)	No. of embryos survived (%)
Intact-	41	41 (100)	1 (2.4)	25 (60.9)
Biopsied-	58	58 (100)	3 (5.2)	25 (43.1)

<sup>1</sup> ZP, zona pellucida

## 적 요

미세조작 biopsy와 PCR에 의한 소 초기배의 신속하고 정확한 성판정 기법을 현장에서 효율적으로 적용하기 위하여 본 연구를 실시하였다. 확립된 미세조작 및 PCR 기법을 이용하여 미세조작 후 소 초기배의 높은 생존율과 성판정율을 얻을 수 있었다. 체외에서 성숙, 수정 및 배양시킨 소 초기배는 15%의 FBS가 첨가된 USU-6 배양액과 소 난관상 피세포단층을 공배양한 결과 각각 37%(327/885) 및 15%(125/835)의 배반포 형성율을 보여 주었다. 체외에서 생산된 총 111개의 배반포를 미세조작 biopsy와 PCR에 의해 93.5%(104/111)의 초기배에서 성판정이 성공적으로 이루어졌고, 6.3%(7/111)의 초기배에서는 PCR 증폭산물을 얻는 데 실패하였다. 성판정된 소 초기배 중 41.3%(43/104)가 음성으로 판정되었으며, 58.7%(61/104)가 자성으로 판정되었다. 미세조작으로 biopsy한 다음 성감별된 수정란을 동결 보존하고 이를 융해한 결과 43.1%(25/58)의 생존율을 나타내었다. 미세조작 biopsy와 PCR에 의해 성판정된 소 초기배의 최종적인 검증은 수란우내로 이식하여 태아 또는 태어난 산자를 통해 확인해야 할 것이다. 본 연구에서 소 초기배의 성판정과 동결보존법이 수정란 이식 기술과 연계될 경우에는 경제적으로 유용한 자성축의 선별 생산이 향상될 것으로 사료된다.

## 참고문헌

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN and Fellous M.

1990. Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. *Nature*, 348:448-450

Bondioli KR, Ellis SB, Pryor JH, Williams MW and Harpold MM. 1989. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31:95-104.

Bostock CJ, Gosden JR and Mitchell JR. 1987. Localization of a male specific DNA fragment to a sub-region of the human Y-chromosome. *Nature*, 272:324-328.

Cooke H. 1976. Repeated sequence specific to human males. *Nature*, 262:182-186.

Gubbay J, Colligan J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberth A, Vivian N, Goodfellow P and Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346:245-250.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K and Winston RML. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344:768-770.

Herr CM and Reed KC. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35:45

Herr CM, Holt NA, Matthew KJ and Reed KC. 1990. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome detection

- assay. *Theriogenology*, 33:247.
- Kudo T, Sato S and Sutou S. 1993. Sexing of bovine embryo with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *J Reprod. Dev.*, 39:55-63.
- Leonard, M, Kirszenbaun M, Cotinot O, Chesne P, Heyman Y, Stinnakre MG, Bishop C, Delouis C, Vaiman M and Fellous M. 1987. Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology*, 27:248.
- McLaren A. 1991. Sex determination in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 11:1-33.
- Peura T, Hyttinen JM, Turunen M and Janne J. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 35:547-555.
- Plucienniczak A, Skowronski J and Joworski J. 1982. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. *J Mol. Biol.*, 158:293-304.
- Rao KBCA, Verma S, Totcy SM, Verma R, Taneja M, Pawshe CH, Singh G and Talwar GP. 1992. *Bos taurus* Y-specific primer can distinguish sex in buffalo and zebu via polymerase chain reaction: potential for embryo sexing. *Theriogenology*, 37:281.
- Reed KC., Matthews ME and Jones MA. 1988. Sex determination in ruminants using Y chromosome-specific polynucleotides. Patent Cooperation Treaty No. WO88/01300.
- Seo SW, Lee HJ, Kim KD, Park SS and Lec SH. 1996. Applications of PCR and PRINS for the sexing in bovine preimplantation embryos. *Korean J Fertil. Steril.*, 23:341-349.
- Seo SW, Lee HJ, Choi SC, Kim KD and Lec SH. 1997. Predetermination of sex in bovine preimplantation embryos produced *in vitro* using micromanipulative biopsy and PCR. *Korean J Emb. Trans.*, 12:325-333.
- Singh L, Purdon IF and Jones KW. 1980. Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma*, 79:137-157.

---

(접수일: 2000. 7. 19 / 채택일: 2000. 8. 1)