

## PCR 기법을 이용한 한우 체외수정란의 성판별

조은정 · 박동현 · 박춘근 · 정희태 · 김정익 · 양부근<sup>†</sup>

강원대학교 동물자원과학대학

## Sex Determination of Hanwoo IVM/IVF Embryos by PCR

Cho, E. J., D. H. Park, C. K. Park, H. T. Cheong, C. I. Kim and B. K. Yang<sup>†</sup>

College of Animal Resource Science, Kangwon National University

### ABSTRACT

This study was performed 1) to establish the optimal PCR condition of sex determination in Hanwoo IVM/IVF embryos, 2) to examine the sex determination and sex ratio to the developmental stages of Hanwoo IVM/IVF embryos by two-step PCR method.

The sexing of bovine IVF embryos were accurately determined by PCR methods using Y chromosome specific DNA primer(BOV 97M, 141bp) and bovine specific DNA primer(216bp). The fragment size were shown at 141 and 216 base pairs(bp) in male, and 216 bp in female. Two-steps PCR method in which the samples were amplified by 15 cycles with Y chromosome specific DNA primer and then amplified by additional 30 cycles with bovine specific DNA primer was effective in the sexing of bovine IVF embryos.

The zona-free embryos were more effective than zona-intact embryos in bovine IVF embryo sexing. The appearance of Y chromosome specific band was 45.2% in embryos treated with protease K and 53.3% in embryos treated with freezing and thawing repeatedly. The optimum volume of DNA for sexing of Hanwoo IVF embryos were 2 to 10  $\mu$ l in zona-free embryos and 12 to 13  $\mu$ l in zona-intact embryos.

The sexing rate of bovine IVF embryos by PCR was 96.0% and questionable rate not identified sex was 4.0%, respectively. Among the sexed embryos, the percentage of male and female was 49.7% and 46.3%, respectively, the sex ratio was 1: 1.1. The successful rate of embryo sexing was increased to the developmental stages.

(Key words ; PCR, embryo sexing, Y chromosome specific DNA primer, Bovine specific DNA primer)

### I. 서론

산자의 성을 판별하기 위한 기술은 많은 연구자에 의해 수행되고 있으나, 정확도, 경제성 및 판별 방법에 대하여 해결해야 할 많은 과제를 가지고

있다. 후대의 성을 조절하기 위한 기술로 정자를 중심으로 한 연구는 X 정자와 Y 정자를 분리한 후 인공수정시켜 산자의 성을 조절하는 방법이 보고되고 있으나 아직 많은 문제를 가지고 있으며(Crandall 등, 1996), 수정란을 이용하여 성을 조절하는 방법

<sup>†</sup> Corresponding Author : College of Animal Resource Science, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea, E-mail : bkyang@kangwon.ac.kr

에는 성염색체 분석법(King, 1984), X-linked enzyme activity 측정법(Williams, 1986) 및 H-Y 항체이용법(Wachtel, 1984 ; White 등, 1983) 등이 이용되고 있으나 고도의 기술과 많은 시간이 소모되며 비용이 비싸다는 문제점을 가지고 있다. 또한 이들 기술은 성판별의 정확도가 높지 않고, 성판별된 수정란의 생존율이 낮아 실용화와 산업적 이용에 문제점을 가지고 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 PCR(Polymerase Chain Reaction)기법에 의한 수정란의 성판별 방법이 많이 연구되고 있다(Bradbacka 등, 1996 ; Carvalho 등, 1996).

PCR 기법을 이용한 소 수정란의 성판별은 Y chromosome specific DNA primer를 이용하여 수정란에서 분리된 일부 할구 또는 전체수정란의 DNA 중 Y 염색체 내의 특정 부분을 증폭시켜 성을 판별한다. PCR 기법을 이용한 성판별 방법은 다른 방법에 비해 신속하고 정확하게 수정란의 성을 판별할 수 있을 뿐만 아니라 성판별 후 수정란의 생존성도 크게 향상되고 있으며, PCR기법을 이용한 성판별 기술은 소, 산양 및 돼지 등과 같은 가축과 사람 등에 적용되어 발전되고 있다(Faifar-Whetstone 등, 1993 ; Levinson 등, 1992 ; Peura 등, 1991). 그러나 PCR에 의한 성판별은 보고자마다 방법상의 문제점이 제시되고 있으며, 서로 상이한 결과를 나타내고 있어 앞으로도 많은 연구가 수행되어야 한다.

본 연구는 체내 또는 체외 수정란의 성판별 방법 중 가장 손쉽고 신속하게 수행할 수 있는 PCR

기법에 의한 한우수정란의 성판별방법의 최적 조건을 확립하고, 체외 성숙, 체외 수정된 한우 수정란의 발육 단계별 성판별율과 성비를 검토하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 난포란의 성숙배양, 체외수정 및 체외배양

한우 난포란의 성숙배양 및 체외수정은 양 등(1997)의 방법에 준하여 실시하였다.

간략히 요약하면, 도살장에서 회수한 한우의 난소를 실험실로 운반한 후, 직경이 2~7 mm의 난포로부터 난포란을 회수하여 TC-199에 10%의 자우혈청(fetal bovine serum, Gibco)과 호르몬(FSH 0.5  $\mu$ g/ml, LH 0.5  $\mu$ g/ml 및 estradiol 1  $\mu$ g/ml)이 함유된 성숙배양액에서 20~22시간 성숙배양을 실시하였다.

체외수정은 동결정액을 용해시킨 후 Brackett와 Oliphant배양액(BO배양액, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합, 원심분리하여 정자의 농도가  $2.5 \times 10^6$ 정자/ml가 되도록 정자부유액을 준비하였다. 체외수정액은 BO배양액에 20  $\mu$ g/ml의 heparin과 20 mg/ml BSA(Sigma)을 첨가하여 제조한 후 체외수정을 실시하였다. 체외수정 배양액내의 caffeine, heparin, BSA 및 정자의 최종농도는 5 mM caffeine, 10  $\mu$ g/ml heparin, 10 mg/ml BSA와  $1.25 \times 10^6$ 정자/ml로 조정하였다.

체외수정 후 생산된 체외수정란은 체외수정 후 40~44시간에 난구세포를 제거한 후 CR1aa에 10%

Table 1. Oligonucleotide sequence and fragment size(base pair) of bovine specific and Y chromosome-specific DNA

| Primer   | Sequence                          | Fragment size(bp) |
|--|-----------------------------------|-------------------|
| Bovine specific<br>(Plucienniczak 등, 1982)             | 5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3'  | 216               |
|  | 5'-TCG TCA GAA ACC GCA CAC TG-3'  |                   |
| Bovine Y chromosome(BOV97M)<br>(Miller와 Koopman, 1990) | 5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3' | 141               |
|  | 5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3' |                   |

FBS, 1 ng/ml PDGF 및 2.5 mM taurine을 첨가하여 만든 체외배양액과 39°C, 5% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2~8일간 배양을 실시하면서 생산된 발육단계별 수정란(2세포기~hatching 배반포)을 실험에 공용하였다.

## 2. 소 특이적 primer 및 Y 염색체 특이적 primer의 제조

본 연구에서 사용한 소 특이적 DNA primer (bovine specific DNA primer)와 Y 염색체 특이적 DNA primer(bovine Y chromosome specific DNA primer; BOV97M)는 Bioneer(한국)에 의뢰하여 제조하였으며, 각 primer의 DNA 염기서열과 크기는 Table 1과 같다.

## 3. DNA 추출

### 1) 혈액의 DNA 추출

한우 암·수소의 경정맥에서 약 10 ml의 전혈을 채취한 후 3,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리(Backman, England)하여 buffy coat를 분리하였다. 분리된 buffy coat로부터 genomic DNA 추출은 phenol을 이용한 Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 실시하였다.

분리된 buffy coat로부터 DNA를 추출한 후 멸균증류수로 희석하여 실온에서 24시간 방치한 다음 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 2) 체외수정란에서 DNA추출

수정란의 성판별을 위해 체외수정 40~44시간

후부터 발달단계에 따라 구분하여 형태학적으로 정상인 수정란을 이용하여 DNA를 추출하였다. 수정란의 DNA를 추출하기 위해 투명대가 제거된 embryonic cell을 1×PCR buffer(Promega, U.S.A.)로 2번 세척한 후, 10 μl의 멸균증류수가 담긴 0.5 ml eppendorf tube로 옮긴 후 액체질소(-196°C)에 침적하여 동결하고 항온수조(37°C)에서 용해하는 과정을 3회 반복한 다음 100°C에서 3분간 boiling하고 37°C에서 다시 3분간 정치시키는 과정을 3회 반복하여 DNA를 추출하였다.

또한 proteinase K에 의한 Y 특이적 DNA band의 출현효과를 확인하기 위하여 투명대를 제거한 수정란을 PBS로 세척한 후 0.21 μg/μl proteinase K가 들어 있는 0.5 ml tube로 옮긴 후 56°C에서 1시간 배양한 후 98°C에서 10분간 가열을 하여 DNA를 추출하여 실험에 사용하였다.

## 4. PCR 조건

수정란과 혈액의 genomic DNA를 증폭시키기 위해 합성된 소 Y 염색체 특이적 DNA primer (BOV97M)와 소 특이적 DNA primer를 thermal cycler(GeneAMP PCR System 9600, Perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하여 증폭을 실시하였다.

PCR 반응액은 Pre-mix(Bioneer, 한국)를 사용하였으며, 0.5 ml PCR tube에 투명대를 제거한 수정란의 경우 2 μl와 10 μl, 투명대를 제거하지 않은 수정란의 경우는 12 μl와 13 μl의 DNA를 첨가하고, 혈액 genomic DNA는 50 ng(2 μl)을 첨가하였다. 합성한 primer를 각각 25, 50, 75 및 100pmole를 넣고 멸균 증류수로 최종 20 μl가 되게 조정

**Table 2. Thermal conditions of PCR amplification for sex determination of Hanwoo IVM/IVF embryos**

| Cycle            | Steps        | Temp. | Time   | No. of cycles |
|------------------|--------------|-------|--------|---------------|
| First cycle      | Denaturation | 94°C  | 5 min  | 1             |
|                  | Denaturation | 94°C  | 30 sec |               |
| Subsequent cycle | Annealing    | 56°C  | 30 sec | 15, 30        |
|                  | Extension    | 72°C  | 30 sec |               |
| Last cycle       | Extension    | 72°C  | 10 min | 1             |

하여 vortex mixer로 PCR 반응액을 완전히 혼합한 후 12,000 rpm에서 10~30초간 원심분리하여 PCR 반응액을 침전시켰다.

성판별을 위한 PCR 증폭 온도조건은 Table 2와 같이 실시하였다.

### 5. PCR 산물의 확인

PCR 반응이 끝난 후 수정란의 성판별은 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 산물을 확인하였고, 전기영동이 끝난 gel들은 ethidium bromide (10 mg/ml, Sigma)로 염색하여 UV상에서 band를 확인하였다.

## Ⅲ. 결과 및 고찰

### 1. 한우 체외수정란의 성판별을 위한 PCR 조건 확립

체외수정란의 성을 판별하기 전에 소 특이적 DNA primer와 Y 염색체 특이적 DNA primer로 정확하게 성을 판별할 수 있는가를 확인하기 위하여 암소와 수소의 혈액에서 추출한 genomic DNA를 증폭한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 Lane 1은 음성 혈액 DNA를 Y 염색체 특이적 DNA primer로 증폭한

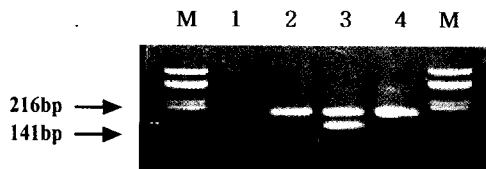


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with bovine Y chromosome-specific DNA primer (BOV97M; 141bp) and bovine specific primer(216bp)

M : DNA size marker( pUC18/Hae III)  
 Lane 1 : Y chromosome-specific DNA primer(BOV97M ; 141bp)  
 Lane 2 : Bovine specific DNA primer(216bp)  
 Lane 3 : Male(141bp, 216bp)  
 Lane 4 : Female(216bp)

결과 141bp에서 정확히 band가 나타났으며, Lane 2는 소 특이적 DNA primer를 증폭시킨 것으로 216bp에서 band가 형성되었다. Lane 3과 4는 수소와 암소 혈액의 genomic DNA를 소 특이적 DNA primer와 소 Y 염색체 특이적 DNA primer를 혼합시킨 후 증폭시킨 결과로서 Lane 3은 141bp와 216bp에서 band가 형성되어 음성으로 확인되었으며, Lane 4는 216bp에서 band가 나타나 자성으로 확인되었다.

본 연구에서 사용한 Y 염색체 특이적 DNA primer와 소 특이적 DNA primer를 이용해 한우의 암소와 수소의 genomic DNA를 분석한 결과 표현형의 성과 일치하여 이들 DNA primer가 소 체외 수정란의 성판별에 적합한 것으로 나타났으며, 이상의 결과는 소 특이적 DNA primer와 Y 염색체 특이적 DNA primer가 음성에서는 141bp와 216bp에서, 자성에서는 216bp에서 특이적 band가 나타났다고 보고한 Miller와 Koopman(1990), Utsumi와 Iritani(1993), Appa Rao 등(1993) 및 오(1997)의 결과와 일치하는 결과를 얻었다.

Two-step PCR 방법으로 소 체외수정란의 성판별을 실시할 경우, 소 특이적 DNA primer의 양과

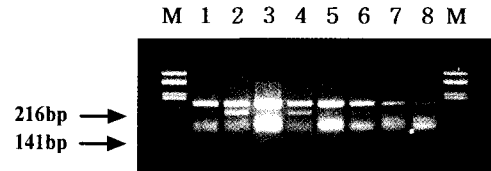


Fig. 2. Two-steps amplification of genomic DNA by bovine specific DNA primer (25~100 pmole) and Y chromosome-specific DNA primer (25~100 pmole)

M : DNA size marker( pUC18/Hae III)  
 Lane 1 : Combine primer(25pmole) ; female  
 Lane 2 : Combine primer(25pmole) ; male  
 Lane 3 : Combine primer(50pmole) ; female  
 Lane 4 : Combine primer(50pmole) ; male  
 Lane 5 : Combine primer(75pmole) ; female  
 Lane 6 : Combine primer(75pmole) ; male  
 Lane 7 : Combine primer(100pmole) ; female  
 Lane 8 : Combine primer(100pmole) ; male

**Table 3. Effect of zona pellucida of bovine IVF embryos sexing by PCR**

| Zona pellucida | No. of embryos | Male (%)  | Female (%) | Questionable (%) | Sex ratio |
|----------------|----------------|-----------|------------|------------------|-----------|
| +              | 113            | 27(23.9)  | 83(73.4)   | 3(2.7)           | 0.3 : 1   |
| -              | 596            | 300(50.3) | 273(45.7)  | 23(3.0)          | 1.1 : 1   |

Y 염색체 특이적 DNA primer의 양이 성판별에 미치는 결과는 Fig. 2와 같다. Y 염색체 특이적 DNA primer를 15 cycle로 증폭시킨 후 소 특이적 DNA primer를 30 cycle로 증폭시키고, primer의 농도를 25pmole에서 100pmole로 단계적으로 변화를 주어 최적의 PCR 산물을 나타내는 primer의 양을 실험한 결과, Lane 1과 2의 25pmole의 소 특이적 DNA primer와 Y 염색체 특이적 DNA primer를 혼합시킨 combine primer를 이용하여 소의 혈액과 수정란을 증폭시킨 실험구가 여타구보다 명확한 band가 나타났다.

소 특이적 DNA primer(216bp)와 Y 염색체 특이적 DNA primer(141bp)를 혼합시킨 후 PCR을 이용하여 증폭을 시킨 결과 옹성의 DNA가 있어도 전기영동시 141bp의 Y 염색체 특이적 DNA band는 보이지 않는 경우가 많아 성판별시 많은 오류가 발생하기도 한다(Kunieda 등, 1992 ; 오 등, 1993). 따라서 정확한 성판별을 위해 Y 염색체 특이적 DNA primer를 넣어 1차로 증폭시킨 후, 소 특이적 DNA primer를 넣어 2차 증폭시키는 two-step PCR을 실시해야 소의 혈액과 수정란의 성판별시 정확한 결과를 얻을 수 있다.

수정란의 성을 정확히 판별하기 위하여 필요한 기질 DNA의 양은 보고자마다 다소 차이가 있으나 5ng 이하에서는 성판별이 되지 않아 inner primer를 넣어 1차 PCR을 실시하고 다시 outer primer를 넣어 PCR을 실시하는 two-step PCR 방법이 수정란의 성판별시 정확한 결과를 얻을 수 있다는 보고들(Bradbury 등, 1990 ; Kunieda 등, 1992 ; 오, 1997)과 본 실험의 결과가 일치하였다.

그러나 소의 genomic DNA와 수정란의 성을 판별하기 위해 사용되는 primer의 양은 최소 100~

200pmole 이상이 필요하다는 보고(오, 1997)와는 다소 차이가 있었다.

따라서 본 실험의 결과로 볼 때, Y 염색체 특이적 DNA primer(141bp)와 소 특이적 DNA primer(216bp)로 PCR 증폭시 primer의 농도는 각각 25pmole이 적당하였으며, 25pmole의 Y 염색체 특이적 DNA primer를 15 cycle 증폭한 다음, 25pmole의 소 특이적 DNA primer로 30 cycle 증폭하는 two-step PCR을 실시하는 것이 소의 혈액과 수정란의 정확한 성판별에 적합하다고 사료된다.

PCR 기법에 의한 소 체외수정란의 성판별시 투명대의 효과를 Table 3에 요약하였다.

Table 3에 나타낸 바와 같이, 투명대를 제거한 수정란(zona-free)과 투명대를 제거하지 않은 수정란(zona-intact)을 이용하여 성판별을 수행한 결과 성판별성공율은 각각 97.3%와 97.0%였으며, 성이 판별되지 않은 questionable율은 각각 2.7%와 3.0%로서 두 처리구간에는 커다란 차이가 인정되지 않았다( $P>0.05$ ). 그러나 옹성과 자성의 성비에 있어서는 투명대를 제거하지 않은 구가 0.3 : 1이고, 투명대 제거구가 1.1 : 1로 나타나 투명대를 제거하지 않은 구에서 암컷의 비율이 높은 것으로 나타났다.

Fuller 등(1993)은 수정란의 투명대는 체외수정 과정에서 수많은 정자가 붙어 있으며, 공동배양시 많은 이물질이 수정란 주위에 부착되어 있기 때문에 PCR에 의한 성판별시 오류를 가져올 수 있으므로 투명대를 깨끗이 제거해야 정확한 성판별 결과를 얻을 수 있다고 보고하였는데, 본 실험의 결과는 Fuller 등(1993)의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 성판별시 투명대를 제거하지 않을 경우 투명대에 붙어있는 정자나 난구세포

**Table 4. Effect of Proteinase K or freezing and thawing treatment of bovine IVF embryos on Y specific band appearance**

| Treatment          | No. of embryos | No. of Y chromosome specific DNA band appeared(%) |
|--------------------|----------------|---|
| Proteinase K       | 42             | 19(45.2)  |
| Freezing & thawing | 30             | 16(53.3)  |

**Table 5. Effect of DNA concentration in bovine IVF embryos sexing by PCR**

| Zona pellucida | DNA con.( $\mu$ l) | No. of embryos | Male (%)  | Female (%) | Questionable (%) | Sex ratio |
|----------------|--------------------|----------------|-----------|------------|------------------|-----------|
| -              | 2                  | 468            | 241(51.5) | 214(45.7)  | 13(2.8)          | 1.1 : 1   |
| -              | 10                 | 128            | 59(46.1)  | 59(46.1)   | 10(7.8)          | 1.0 : 1   |
| +              | 12                 | 47             | 5(10.6)   | 38(80.9)   | 4(8.5)           | 0.1 : 1   |
| +              | 13                 | 47             | 11(23.4)  | 33(70.2)   | 3(6.4)           | 0.3 : 1   |

등의 영향으로 정확하게 성이 판별되지 않을 뿐 아니라, 자성 체세포(난구세포 또는 방사관 세포)의 영향으로 자성이 많이 나타나는 것으로 생각된다.

Y 염색체 특이적 band의 출현에 대한 genomic DNA의 추출시 proteinase K와 반복 동결융해 방법에 대한 결과를 Table 4에 요약하였다.

Table 4에 나타난 바와 같이 proteinase K 처리에 의하여 DNA를 추출한 후 genomic DNA를 PCR을 이용하여 증폭시킨 결과, Y 염색체 특이적 band의 출현은 45.2%(19/42)였으며, 반복 동결융해 방법을 이용한 결과는 53.3(16/30)였다.

Avery 등(1992)과 Fuller 등(1993)은 proteinase K 처리 후 고온 처리한 것이 수정란 성판별의 정확도를 높여 준다고 보고한 반면, Valdivia 등(1993)과 Machaty 등(1993)은 proteinase K 처리없이 동결하고 융해하는 과정을 반복하여 핵속의 DNA를 용출시켜도 수정란의 성판별을 정확히 할 수 있었다고 보고하여, 본 실험의 결과와 일치하였다.

본 실험의 결과로 볼 때 비교적 손쉽고, 경제적인 방법인 반복 동결융해 방법으로 genomic DNA를 추출하여 성판별에 이용하여도 소 수정란의 성

판별 정확도는 떨어지지 않은 것으로 생각된다.

PCR 기법에 의한 소 체외수정란의 성판별시 DNA 농도가 성판별에 미치는 결과를 Table 5에 요약하였다.

Zona-free 수정란은 embryonic DNA 농도가 2 $\mu$ l와 10 $\mu$ l일 경우 성판별율과 자웅성비는 각각 97.2%와 92.2% 및 1.1 : 1과 1.0 : 1로서 처리구간에 커다란 차이가 없었으며, zona-intact 수정란은 12 $\mu$ l와 13 $\mu$ l의 DNA를 첨가하여 분석한 결과, 성판별율과 자웅성비는 91.5%와 93.6% 및 0.1 : 1과 0.3 : 1로서 zona-free 수정란의 결과와 같이 처리구간에 커다란 차이가 나타나지 않았다.

Gutierrez-Adan 등(1996)은 nested-PCR을 수행시 혈액에서는 20 ng의 genomic DNA가 필요하고, 수정란에서는 20 pg의 DNA를 이용하였을 때 정확히 성을 판정할 수 있었다고 보고하여 본 실험의 결과보다는 적은 양의 DNA가 필요한 것으로 나타나 본 실험과는 다소 상이한 결과를 보였다.

본 실험의 결과로 볼 때, zona-free 수정란의 성판별에는 2 $\mu$ l의 DNA가, zona-intact 수정란의 경우는 12 $\mu$ l의 embryonic DNA 첨가로 성판별이 가능하고 적합한 것으로 나타났다.

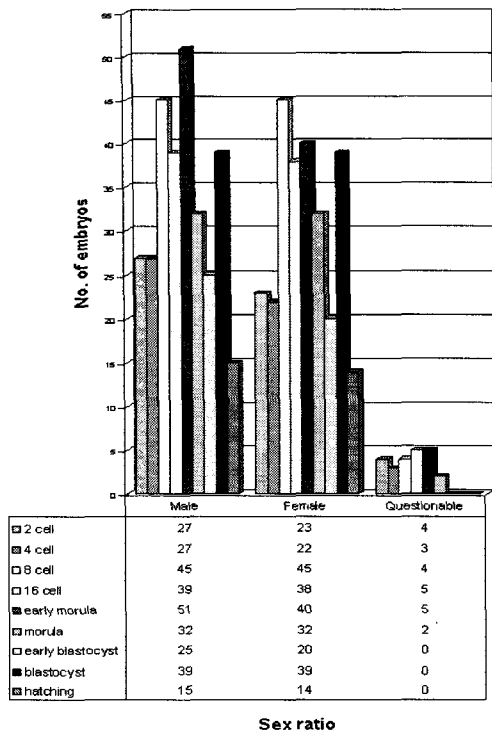


Fig. 3. Sex ratio of bovine IVF embryos by PCR at developmental stages

## 2. 소 체외수정란의 발육 단계에 따른 성판별

PCR 기법에 의한 체외수정란의 발육단계에 따른 수정란의 성판별 결과는 Fig. 3과 같다.

2-, 4-, 8-, 16-세포기, 초기 상실배, 상실배, 초기 배반포, 배반포 및 hatching 배반포기 수정란의 성판별율은 각각 92.6, 94.2, 95.8, 93.9, 94.8, 97.0, 100, 100 및 100%의 성적을 얻었으며, 전체 성판별 성공률은 96.1%(573/596)였고, 성판별할 수 없었던 questionable율은 3.9%(23/596)였다. 한편 성판별된 수정란 중 발육단계별 성비는 1.0~1.3 : 1로서 발육 단계간의 커다란 차이가 인정되지 않았으며, 발육단계가 진행될수록 성판별 성공률은 다소 높아지는 것으로 나타났다.

Berg 등(1992)은 발육속도별로 나누어 수정란이식을 한 결과, 산자의 성비에는 변화가 없었다고 보고하였고, Carvalho 등(1996)은 반복 실험마다 다소 다른 성비를 나타낼 수 있기 때문에 정확한

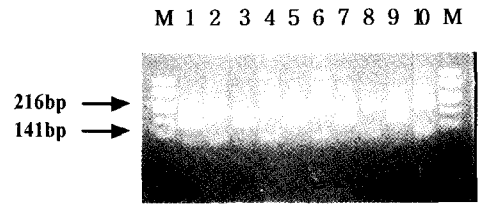


Fig. 4-1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from bovine IVF embryos at various developmental stages

M : DNA size marker( pUC18/Hae III)

Lane 1, 2 : 2 cell(male, female)

Lane 3, 4 : 4 cell(male, female)

Lane 5, 6 : 8 cell(male, female)

Lane 7, 8 : 16 cell(male, female)

Lane 9, 10 : early morula(male, female)

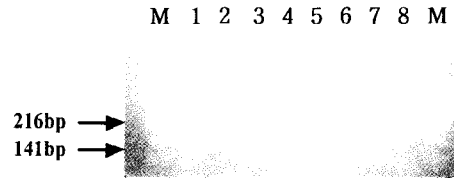


Fig. 4-2. Continued

M : DNA size marker( pUC18/Hae III)

Lane 1, 2 : Morula(male, female)

Lane 3, 4 : Early blastocyst(male, female)

Lane 5, 6 : Blastocyst(male, female)

Lane 7, 8 : Hatching(male, female)

배양 조건이 정립되지 않은 상태에서 성을 판단해서는 안된다고 하여 보고자들간에 발육단계에 따른 성비에는 많은 의견차를 보이고 있다.

본 실험의 결과는 체외수정 후 발육단계(2-세포기~hatching 배반포기)에 따른 성비에는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

발육단계에 따른 체외수정란의 PCR 산물을 전기영동 방법으로 확인한 결과는 Fig. 4와 같다.

발육단계에 따른 체외수정란(2-세포기~hatching 배반포기)의 자성과 응성의 embryonic DNA의 PCR 산물을 agarose gel 전기영동방법으로 확인한 결과,

**Table 6. Sex determination of bovine IVF embryos with different culture days at various developmental stages by PCR**

| Day after IVF | Developmental stage | No. of embryos | Male (%)  | Female (%) | Questionable (%) | Sex ratio |
|---------------|---------------------|----------------|-----------|------------|------------------|-----------|
| 2 Day         | 2 cell              | 38             | 18(47.4)  | 17(44.7)   | 3( 7.9)          | 1.1 : 1   |
|               | 4 cell              | 27             | 14(51.9)  | 12(44.4)   | 1( 3.7)          | 1.2 : 1   |
|               | 8 cell              | 45             | 20(44.4)  | 21(46.7)   | 4( 8.9)          | 1.0 : 1   |
|               | 16 cell             | 18             | 7(38.9)   | 9(50.0)    | 2(11.1)          | 0.8 : 1   |
| 3 Day         | 2 cell              | 16             | 9(56.3)   | 6(37.5)    | 1( 6.2)          | 1.5 : 1   |
|               | 4 cell              | 25             | 11(44.0)  | 12(48.0)   | 2( 8.0)          | 0.9 : 1   |
|               | 8 cell              | 17             | 8(47.1)   | 9(52.9)    | 0( 0)            | 0.9 : 1   |
|               | 16 cell             | 21             | 11(52.4)  | 8(38.1)    | 2( 9.5)          | 1.4 : 1   |
|               | early morula        | 35             | 19(54.3)  | 16(45.3)   | 0( 0)            | 1.2 : 1   |
| 4 Day         | 8 cell              | 25             | 14(56.0)  | 10(44.0)   | 1( 4.0)          | 1.3 : 1   |
|               | 16 cell             | 21             | 10(47.6)  | 10(47.6)   | 1( 4.8)          | 1.0 : 1   |
|               | early morula        | 30             | 16(53.3)  | 11(36.7)   | 3(10.0)          | 1.5 : 1   |
| 5 Day         | 8 cell              | 7              | 3(42.9)   | 4(57.1)    | 0( 0)            | 0.8 : 1   |
|               | 16 cell             | 13             | 5(38.5)   | 8(61.5)    | 0( 0)            | 0.6 : 1   |
|               | early morula        | 16             | 8(50.0)   | 6(37.5)    | 2(12.5)          | 1.3 : 1   |
|               | morula              | 15             | 7(46.7)   | 7(46.7)    | 1( 6.6)          | 1.0 : 1   |
| 6 Day         | 16 cell             | 9              | 4(44.4)   | 5(55.6)    | 0( 0)            | 0.8 : 1   |
|               | early morula        | 15             | 6(40.0)   | 9(60.0)    | 0( 0)            | 0.7 : 1   |
|               | morula              | 25             | 13(52.0)  | 11(44.0)   | 1( 4.0)          | 1.2 : 1   |
|               | early blastocyst    | 13             | 9(69.0)   | 4(31.0)    | 0( 0)            | 2.2 : 1   |
| 7 Day         | morula              | 26             | 13(50.0)  | 13(50.0)   | 0( 0)            | 1.0 : 1   |
|               | early blastocyst    | 32             | 17(53.1)  | 15(46.9)   | 0( 0)            | 1.1 : 1   |
|               | blastocyst          | 41             | 20(48.8)  | 21(51.2)   | 0( 0)            | 1.0 : 1   |
| 8 Day         | blastocyst          | 37             | 19(51.4)  | 18(48.6)   | 0( 0)            | 1.1 : 1   |
|               | hatching            | 29             | 15(51.7)  | 14(48.3)   | 0( 0)            | 1.1 : 1   |
| Total         |                     | 596            | 296(49.7) | 277(46.3)  | 24( 4.0)         | 1.1 : 1   |

응성은 141 bp와 216 bp의 band를 나타냈고, 자성은 216 bp에서 band를 나타내 정확하게 성이 확인되었다.

체외수정 후 체외배양기간에 따라 생산된 발육 단계별 체외수정란의 성판별율과 성비의 결과를 Table 6에 요약하였다.

Table 6에 나타난 것과 같이, 전체 성판별율은 96.0%였고, 성이 확인되지 않은 questionable율은 4.0%로 나타났으며, 성판별된 전체 수정란의 성비

는 1.1 : 1의 성적을 얻었다.

체외수정 후 2일에 생산된 2-, 4-, 8- 및 16-세포기 수정란의 성판별율은 각각 92.1, 96.3, 91.1 및 88.9%로 나타났으며, 체외수정 후 3일에 생산된 2-, 4-, 8-, 16-세포기 및 초기상실배기 수정란에서는 각각 93.8, 92.0, 100, 90.5 및 100%로 나타났다.

체외수정 후 4일에 생산된 8-, 16-세포기 및 초기상실배기 수정란의 성판별 성적은 각각 96.0, 95.2 및 90.0%로 나타났으며, 체외수정 후 5일에



2-, 4-, 8-, 16-세포기 및 초기상실배기 수정란에서는 각각 93.8, 92.0, 100, 90.5 및 100%로 나타났다.

체외수정 후 4일에 생산된 8-, 16-세포기 및 초기상실배기 수정란의 성판별 성적은 각각 96.0, 95.2 및 90.0%로 나타났으며, 체외수정 후 5일에 생산된 8-, 16-세포기, 초기 상실배 및 상실배의 성판별율은 각각 100, 100, 87.5와 93.4%를 나타냈다. 체외수정 후 6일에는 16 세포기, 초기상실배기, 상실배기 및 초기배반포기 수정란의 성판별율은 100, 100, 96.0 및 100%를 나타냈으며, 체외수정 후 7일과 8일에 생산된 배반포와 hatching 배반포기 수정란에서는 100% 성판별 성적을 얻었다.

한편 체외 수정란의 배양기간에 따른 성비는 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8일에 각각 1 : 1, 1.1 : 1, 1.3 : 1, 0.9 : 1, 1.1 : 1, 1 : 1 및 1.1 : 1로서 전체 수정란의 성비는 1.1 : 1이었다.

체내 또는 체외 수정란 생산에 있어서 빠른 발육속도는 옹성 수정란일 확률이 높다는 보고가 많으나(Valdivia 등, 1993 ; Yadav 등, 1993), Grisart 등(1993)은 수정 후 6~9일까지 체외배양한 수정란에서 발육속도와 성비와는 아무런 상관이 없다고 하였다.

본 실험의 결과, 체외 수정란의 발육단계가 진행됨에 따라 성판별율은 증가되었으며, 동일 배양기간에 따른 발육단계간의 성비는 커다란 차이가 인정되지 않았다.

#### IV. 요약

본 연구는 한우 체외수정란의 정확한 성판별을 위한 PCR의 적정조건을 검토하였고, Y 염색체 특이적 DNA primer(BOV97M ; 141bp)와 소 특이적 DNA primer(216bp)를 이용한 2단계 PCR 방법으로 체외수정란의 발육속도에 따른 성판별율과 성비를 검토하였다.

PCR 기법을 이용한 한우 체외수정란의 성판별은 Y 염색체 특이적 DNA primer와 소 특이적 DNA primer로 정확히 성을 판별할 수 있었으며, 옹성 수정란의 경우 141bp와 216bp에서 band가 나타났고, 자성 수정란의 경우 216bp에서 band가

나타났다.

한우 체외수정란의 경우 성판별 정확도를 높이기 위하여 투명대의 제거가 필요하며, 수정란의 DNA 추출방법에 따른 Y 염색체 특이적 band의 출현율은 Proteinase K와 반복 동결용해방법이 각각 45.2 및 53.3%로 나타났다. DNA의 양에 따른 성판별율은 zona free인 경우는 2 $\mu$ l와 10 $\mu$ l에서 각각 97.2%와 92.2%였으며, zona intact의 경우는 12 $\mu$ l와 13 $\mu$ l에서는 각각 91.5%와 93.6%로서 zona free 수정란의 경우 2 $\mu$ l, zona intact의 경우 13 $\mu$ l의 DNA 양으로 성판별이 가능하였다.

한편, PCR 기법에 의한 한우 체외수정란의 성판별율은 96.0%였으며, 정확히 성판별을 할수 없는 비율은 4.0%였다. 성판별 수정란의 자성과 옹성의 비율은 46.3%와 49.7%로서 성비는 1.1 : 1이었으며, 발육단계간 자웅성비는 커다란 차이가 인정되지 않았으며, 발육단계가 진행될수록 성판별 정확도가 증가하였다.

#### V. 인용문헌

1. Appa Rao, K. B. C., Pawshe, C. H. and Totey, S. M. 1993. Sex determination of *in vitro* developed buffalo(*Bubalus bubalis*) embryos by DNA amplification. *Mol. Reprod. Dev.* 36:291-296.
2. Avery, B., Jorgensen, C. B., Madesion, V. and Greve, T. 1992. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 32:265-270.
3. Berg, U., Reichendach, H.D., Liebrich, J. and Brem, G. 1992. Sex ratio of calves born after transfer of *in vitro* produced embryos. *Theor. Appl. Genet.* 37:191(Abstr.).
4. Bradbury, M. W., Isola, S. M. and Gordon, H. W. 1990. Enzymatic amplification of Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 87: 4053-4057.

- embryos: A field trial. *Theriogenology* 45:218 (Abstr.).
7. Carvalho, R. V., Del Campo, M.R., Plante, Y. and Mapletoft, R. J. 1996. Effect of stage of development on sex ratio and survival after freezing of Day 7 bovine IVF embryos. *Theriogenology* 43:183(Abstr.).
  8. Cran, D. G., Cochrane, D. J., Johnson, L. A., Wei, H. L., Lu, H. K. and Polge, C. 1996. Separation of X and Y chromosome bearing bovine sperm by flow cytometry for use in IVF. *Theriogenology* 41:183(Abstr.).
  9. Faifar-Whetstone, C. J., Rayburn, A. L., Schook, L. B. and Wheeler, M. B. 1993. Sex determination of porcine embryos via Y chromosome specific DNA sequences. *Amin. Biotechnol.* 4:183.
  10. Fuller, D. T., Kachevar, D. T., Brumbaugh, G. W., Womack, J. E. and Kraemer, D. C. 1993. Pretreatment of murine embryos prior to the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 39:221(Abstr.).
  11. Grisart, B., Perret, J., Georges, M., Vassart, G. and Dessy, F. 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.).
  12. Gutierrez-Adan, A., Behboodi, E., Anderson, G. B., Medrano, J. F. and Murray, J. D. 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.
  13. Johnson, L. A., Flook, J. P. and Hawk, H. W. 1989. Sex preselection in rabbit.: Live birth from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41:199-203.
  14. King, W. A. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 21:7-17.
  15. Kunieda, T., Xian, M., Kobayashi, E., Imamichi, T., Moriwaki, K. and Toyoda, Y. 1992. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.* 46:692-697.
  16. Levinson, G., Fields, R. A., Harton, G. L., Palmer, F. T., Maddalena, A., Fugger, E. F. and Schulman, J. D. 1992. Reliable gender screening for human preimplantation embryos using multiple DNA target-sequences. *Hum. Reprod.* 7:1304-1313.
  17. Machaty, Z., Paldi, A., Csaki, T., Varga, Z., Kiss, I., Barandi, Z. and Vajta, G. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 98:467-470.
  18. Miller, J. R. and Koopman, M. 1990. Isolation and characterization of two male-specific DNA fragments from the bovine gene. *Anim. Genet.* 21:77-82.
  19. Peura, T., Hyttinen, J. M., Turuned, M. and Janne, J. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35:547-555.
  20. Plucienniczak, A., Skowronski, J. and Jaworski, J. 1982. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to order bovine satellite sequence. *J. Mol. Biol.* 158:239-304.
  21. Sambrook, J. E., Fritsch, F. and Maniatis, T. 1989. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: Sambrook, J. E., Fritsch, F. and Maniatis, T.(eds.). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed. U. S. A. pp.9-14 ~9-23.
  22. Tiffine, G. J., Rieger, D., Betteridge, K. J., Yadav, B. R. and King, K. A. 1991. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in reation to sex and stage of development. *J. Reprod. Fertil.* 93:125-132.
  23. Utsumi, K. and Iritiani, A. 1993. Embryo

- sexing by male specific antibody and by PCR using male specific(SRY) primer. Mol. Reprod. Dev. 36:238-241.
24. Valdivia, P. P. A., Kunieda, T., Azuma, S. and Toyoda, T. 1993. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured *in vitro*. Mol. Reprod. Dev. 36:121-126.
25. Van Vliet, R. A., Verrinder Gibbins, A. M. and Walton, J. S. 1989. Livestock embryos sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. Theriogenology 32:121-126.
26. Wachtel, S. S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and sex ratio. Theriogenology 21:18-28.
27. White, K. L., Linder, G. M., Anderson, G. T. B. and BonDurant, R. H. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen preimplantation mouse embryos. Theriogenology 19:701-705.
28. 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.
29. Yadav, B. R., King, W. A. and Betteridge, K. J. 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.
30. 양부근, 박동현, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1997. Thiol 화합물과 항산화제 첨가배양이 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 효과. I.  $\beta$ -Mercaptoethanol과 Cysteamine 첨가가 소 체외수정란의 체외발육과 세포내 Glutathione 농도 변화에 미치는 영향. 한국가축번식학회지. 21:335-343.
32. 오성중. 1997. 소 체외 수정란에 있어서 PCR 기법에 의한 성판별과 발달단계와 프리마틴 혈청첨가가 성비에 미치는 영향. 서울대학교 박사학위논문.
33. 오성중, 이창수, 양보석, 정진관, 성환후, 임경순. 1993. PCR기법을 이용한 소 Y-염색체 특이적 DNA 단편 증폭에 의한 성판별 연구. 한국가축번식학회지. 35:371-375.
- (접수일자: 2000. 8. 30. / 채택일자: 2000. 9. 20.)