

## 중합효소연쇄반응을 이용한 돼지 체외수정란의 성감별

강미선 · 김용준<sup>†</sup> · 이해이 · 유일정  
전북대학교 수의과대학

### Sex Determination of Porcine IVF Embryos by Polymerase Chain Reaction (PCR)

M. S. Kang, Y. J. Kim<sup>†</sup>, H. Y. Lee and I. J. Yu  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

#### SUMMARY

This study was carried out to determine sex of porcine embryos produced by *in vitro* fertilization.

Porcine oocyte-cumulus complexes were cultured in BSA-free North Carolina State University (NCSU) 23 medium containing porcine follicular fluid (10%), cystein (0.1 mg/ml) and hormonal supplement (10 IU eCG and 10 IU hCG per ml) for 20 ~ 22 hrs. They were then cultured in the same medium but without hormonal supplement for additional 20 ~ 22 hrs. After culture, cumulus cells were removed and oocytes were co-incubated for 6 hrs with four different concentrations ( $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$  and  $10 \times 10^5$ ) of porcine sperm. After fertilization, oocytes were transferred into NCSU 23 with 0.4% BSA medium. The cleavage and blastocyst formation rates were evaluated at 48 and 144 hrs, respectively. In this study, the polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the sex of porcine embryos in the stage of blastocyst. The PCR was performed using a set of oligonucleotide primers (5'-TCATGGACCAGGTAGGGAAAT-3', 5'-GAAAGACACGTCCTTGGA GA-3') for 491 bp fragment of porcine male-specific DNA sequence. In the four different sperm concentration ( $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$  and  $10 \times 10^5$ ) for fertilization condition, the cleavage rate was 55.95, 67.88, 60.18 and 47.60%, respectively, and the development rate of blastocysts was 16.03, 20.40, 21.41 and 12.37%, respectively. At  $5.0 \times 10^4$  and  $2.5 \times 10^5$  of sperm concentrations per ml cleavage rate and development rate of blastocyst were higher than those of  $5.0 \times 10^4$  and  $10 \times 10^5$  of sperm concentration ( $P < 0.01$ ). The male of porcine embryos was detected at 491 bp by PCR, and 18 of the 31 porcine blastocysts were the male (58.1%) and the rest 13 were the female(41.9%).

(Key words : sex determination, porcine blastocyst, in-vitro fertilization, PCR)

#### 서 론

가축에 있어서 체외수정으로 생산된 수정란의

성조절은 수정란의 일부는 성을 판별하고 나머지의 분할란을 수란동물에 이식함으로써 원하는 성의 개체를 생산함이 가능하다. 이와 같은 기술이 성공적으로 수행되기 위하여 가축번식의 첨단기술

본 연구는 2000년 농림기술개발사업 첨단과제의 연구비(MAF-SGRP, 20000665)로 수행되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : yik@moak.chonbuk.ac.kr

이라 할 수 있는 체외수정, 수정란의 인위적 분할, 수정란의 보존, 이식 등의 기술이 정립되어야 하므로 매우 어렵고 또한 많은 노력이 수반되어야만 가능할 것으로 생각된다. 뿐만 아니라 돼지에서의 체외수정은 Iritani 등(1978)에 의해 최초로 성공된 이래 많은 연구가 수행되고 있으며 돼지 체외수정은 다른 포유동물의 경우보다 난자의 체외성숙배양 및 체외수정에 관한 연구가 다소 늦게 시작되었으나, 최근까지도 돼지의 체외수정에 관한 여러 가지 연구가 계속되고 있다(Ding과 Foxcroft, 1994; Kano 등, 1994; Coy 등, 1993).

돼지의 체외수정시 이용되는 정액은 신선정액(Nagai 등, 1984) 또는 동결정액(Kano 등, 1994; Wang 등, 1991)으로서 수정율은 비슷한 것으로 보고되고 있으나 돼지 체외수정시 다정자 침입의 발생이 문제점으로 남아있다. 다정자 침입이란 수정시 난자의 세포질 내에 2개 이상의 정자가 침입하는 것을 말하며(Hunter, 1991) 수정후 배의 발육이 비정상적으로 일어난다(Birkhead 등, 1993). 이와 같은 다정자의 침입을 막기 위해서 난자와 수정될 때 수정능력을 획득한 정자수의 조절(Abeydeera와 Days, 1997; Hunter, 1984), 돼지 난포액(porcine follicular fluid)의 첨가(Kim 등, 1996; Funahashi 등, 1993), 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)의 첨가(Abeydeera 등, 1997) 등의 많은 연구가 수행되고 있다. 한편, 신생자의 성을 인위적으로 조절하고자 하는 연구도 여러 방향에서 진행되고 있는데 착상전 성감별 방법은 수정전 정자에 대한 성조절로서 X정자와 Y정자를 분리하기 위한 여러 가지 방법(Lu 등, 1999; Brandriff 등, 1986)이 시도되어 왔으나 실용에 다소 어려운 점이 있다. 그러나 수정란에 대한 성감별은 정확하면서 실용이 가능하다고 인정되어 수정란의 성감별에 대한 많은 연구가 수행되었다. 수정란에 대한 성감별 방법은 세포유전학적 성염색체 검사법(Iwaskai와 Nakahara 등, 1990; King, 1984), 암·수 수정란의 대사활성 차이에 의한 특정효소 역가 측정법(Willians, 1986), 응성특이항원(H-Y항원)을 이용한 방법(유일정 등, 1999; Utsumi 등, 1993), 수정란의 발달속도 차이에 의한 방법(Itagaki 등, 1995), Y specific DNA의 검정 (유일정 등, 1999;

Bredbacka 등, 1995) 등이 있다. 특히 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 Y specific DNA의 검정은 적은 양의 수정란 세포를 이용하여 간편하면서도 보다 정확한 성감별을 실시할 수 있게 되었다.

소(유일정 등, 1999; Bredbacka 등, 1995)와 면양(Gutierrez-Adan 등, 1997) 등 가축에서의 수정란 성감별은 많은 연구가 진행되어 왔으나 돼지에서의 수정란 성감별은 아직 보고가 부족한 상태이다(Kawarasaki 등, 1994).

따라서 돼지의 체외수정 기술과 그 수정란을 이용한 성감별을 실시하여 가축의 생산성을 증대시키고자 본 연구에서는 배반포 단계의 체외수정란을 이용하여 성감별을 실시하고 이를 위해 돼지 난포액(porcine follicular fluid, pFF), BSA 등이 첨가된 배지 상태에서 체외수정을 위한 적절한 정자 농도를 알아봄으로써 배반포 발달률을 높일 수 있는 조건을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 돼지 난자의 체외수정

#### 1) 난포란의 준비

도축장에서 도살 직후 적출한 돼지 난소를 100 IU/ml의 penicillin G 와 100  $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 멸균 생리식염수로 2회 또는 3회 세척한 후 37C 수조에 넣어 2시간 이내 체외수정에 이용하였다. 난포란을 채취하기 위하여 18 gauge의 주사침이 장착된 10ml 주사기로 3-6 mm 직경의 난포란을 찢어 난포액과 난포란을 흡입하여 50ml cornical tube로 옮겨 10분간 정치시켜 난포란의 침전을 유도한 다음 침전물만을 취하여 87  $\times$  15mm petri dish에 옮겨 Tyrode Lactate(TL)-epes를 섞어 실체현미경하에서 난세포질이 균일한 난포란을 난구세포의 부착상태에 따라 선별하여 체외성숙에 이용하였다.

#### 2) 체외성숙배양

North Carolina State University (NCSU) 23 배양액을 기본으로 10% porcine follicular fluid

(pFF), 0.1mg/ml cysteine, 10 IU/ml hCG(human chorionic gonadotrophin), 10 IU/ml eCG(equine chorionic gonadotrophin), 10 ng/ml EGF (epidermal growth factor)를 첨가한 배양액을 4 well dish 에 500  $\mu$ l씩 분주하고 NCSU 23으로 세척한 난자를 50~60개씩 넣어 22시간은 호르몬(10 IU/ml eCG와 10 IU/ml hCG)이 첨가된 상태에서, 그리고 나서 그 후에 22시간은 호르몬이 첨가되지 않은 상태에서 성숙시켰다.

### 3) 정자수 조정

정액은 인공 수정소에서 가져온 인공수정용 액상정액으로 사용 전까지 17°C에서 보관한 후 사용할 때 6ml를 1,500 rpm에서 3분간 원심분리한 후 세척배지(sperm washing media; D-PBS)를 3ml 넣고 pipetting 한 후 다시 원심분리를 2회 실시하였다. 마지막 상층액을 제거한 후 정자 세척 배지를 2ml 흡려 넣어 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 10분간 swim-up을 실시하였다. 부유된 정자들을 회수하여 1,500 rpm에서 3분간 원심분리를 하여 상층액을 걷어내고 *in-vitro* fertilization media (IVF 배지)인 modified Tris-Buffered medium (mTBM)으로 희석하여 최종농도가  $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $5.0 \times 10^5$  및  $10 \times 10^5$ 가 되도록 조정하였다.

### 4) 체외수정

배양액은 mTBM을 기본 배양액으로 2.5 mM caffeine과 0.1% BSA를 첨가하여 사용하였다. 44시간 체외 성숙된 난자를 0.1% hyaluronidase로 난구세포를 제거한 후 IVF 배지 1 droplet(50  $\mu$ l)에 20~30개씩 넣었다. 난자가 들어있는 droplet에 상기 조정된 정자수 군별로 정액을 5  $\mu$ l 씩 주입한 후 5~6시간동안 체외수정을 실시하였다. 체외수정 후 난자를 회수하여 NCSU 23 배양액에 옮긴 후 배양 후 48시간과 144시간에 각각 분할율과 배반포 형성율을 확인하였다.

## 2. 돼지 체외수정란의 PCR 기법에 의한 성감별

### 1) 공시 수정란

체외수정란중 배양 후 6~7일에 생산된 배반포

(blastocyst) 단계의 신선 수정란을 이용하였다.

### 2) 수정란 성감별을 위한 primers

돼지 수정란 성감별을 위해 사용된 primer는 Kawarasaki 등 (2000)이 사용한 porcine male-specific primer(Y-associated)로서 그 염기배열은; forward primer는 5'-TCATGGACCAGGTAGGG AAT-3', reverse primer는 5'-GAAAGACACGTCC TTGGAGA-3'이었다.

증폭된 PCR 산물의 크기는 491 nucleotides이었다.

### 3) Genomic DNA의 준비

돼지 수정란 성감별시에 PCR 실험의 조건을 확립하기 위하여 이용된 genomic DNA는 혈액의 buffy coat로부터 추출하였다. 임상적으로 건강하다고 판단된 암, 수의 성돈의 혈액을 채취하였고, genomic DNA purification kit(Promega)를 이용하여 암컷과 수컷의 genomic DNA를 각각 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 사용전까지 4°C에서 보관하였다.

### 4) 수정란으로부터 DNA의 추출

성감별 공시 수정란 1개가 포함된 배지 1  $\mu$ l를 mineral oil로 도포된 4  $\mu$ l의 embryo lysis buffer (ELB: 20 mM Tris, 0.9% Tween 20, 0.9% Nonidet, 0.4mg/ml proteinase K)가 들어있는 PCR 튜브에 넣고 55°C에서 30분간 처리한 후 thermal cycler (Ericomp)를 이용하여 95°C에서 15분간 처리하여 수정란의 DNA를 추출하였다.

### 5) PCR 및 전기영동

수정란으로부터 추출된 DNA의 PCR을 위한 반응액 (10 $\times$ PCR buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM dNTPs, 20 pmol primers, 5 IU Taq polymerase)을 혼합한 후 증류수를 첨가하여 25  $\mu$ l가 되도록 하였다. PCR 증폭은 thermal cycler를 이용하여 94°C에서 3분간 primary denaturation을 실시하였고 denaturation, annealing, extension을 각각 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 35 cycles를 수행하였으며 마지막 extension은 72°C에서 10분간 정치하였다. PCR 증폭이 완료된 다음 PCR 산물 5

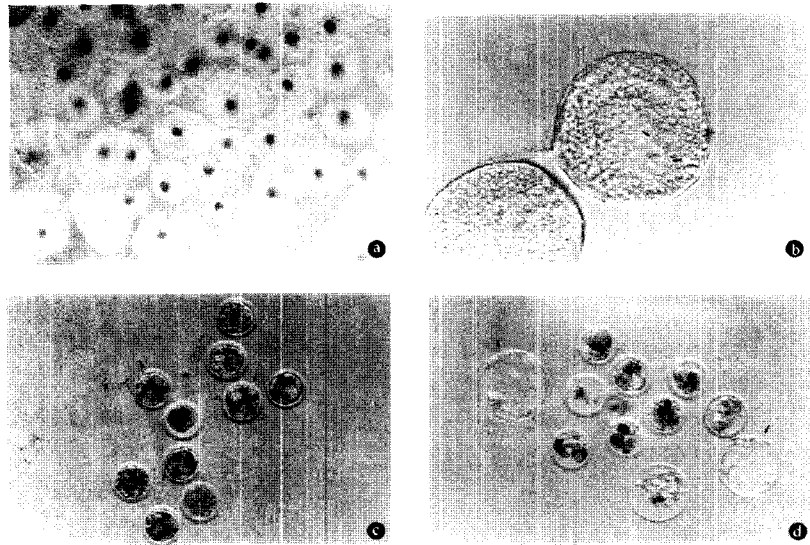


Fig. 1. Processing of production of porcine blastocysts derived by *in vitro* fertilization. a. porcine oocytes cultured for 22 hrs; cumulus cells are enlarged. b. porcine oocytes at 12 hrs after *in vitro* fertilization; male and female pronuclear formation(arrows) c. 4-cell stage porcine embryos (arrows) d. porcine blastocysts at 6 days after *in vitro* fertilization (arrows).

$\mu$ 에 loading dye 1  $\mu$ 를 혼합하여 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml)로 염색하고 UV transilluminator 상에서 관찰하였다. 대조군으로 사용된 수컷의 혈액에서 추출된 genomic DNA PCR 산물의 size인 491 bp에서 band가 존재시 수컷으로 판정하고, band가 없을 때 암컷으로 판정하였다.

### 3. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과를 ANOVA로 통계처리하였으며 DUNCAN 다중검정에 의해 실험군간의 유의 차를 구하였다.

## 결 과

### 1. 돼지 체외수정에서 정자 농도의 효과

체외수정에 의한 돼지 배반포 수정란 생산과정은 Fig. 1과 같다. Fig. 1의 a는 난소에서 채취한 난자를 22시간 배양한 후의 사진으로서 난구세포가 확장되어 있고, b는 체외수정 반응 후 12시간이 지난 난자로 응성. 자성 전핵이 형성되어 있다. c는 체외수정 후 48시간에 분할한 4세포들, d는 체외수정 후 144시간에 발달한 배반포를 나타내고 있다. 각각 다른 정자 농도에 따른 분할률과 배반포 형성율은 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of different sperm concentration on cleavage and development of porcine embryo

Sperm concentration	No. of oocytes examined	Cleavage rate (%, Mean $\pm$ SD)	Blastocyst rate (%, Mean $\pm$ SD)
$5.0 \times 10^4$	226	$55.95 \pm 5.82^b$	$16.03 \pm 3.58^b$
$2.5 \times 10^5$	232	$67.88 \pm 5.02^a$	$22.40 \pm 3.73^a$
$6.0 \times 10^5$	236	$60.18 \pm 5.01^a$	$21.41 \pm 3.30^a$
$10.0 \times 10^5$	220	$47.60 \pm 12.55^c$	$12.37 \pm 2.83^c$

<sup>a,b,c</sup> : Different superscripts denote significant differences within columns ( $P < 0.01$ ).

정자 농도  $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $6.0 \times 10^5$  및  $10.0 \times 10^5$ 의 분할률은 각각 55.95, 67.88, 60.18, 47.60%이었다. 수정 후 6일째 확인한 배반포 형성율은 각각 16.03, 22.40, 21.41, 12.37%이었다. 정자 수  $2.5 \times 10^5$ 과  $6.0 \times 10^5$ 의 경우  $5 \times 10^4$ ,  $10.0 \times 10^5$ 의 정자수의 경우보다 각각 높은 분할률과 배반포 형성율을 나타내었다( $P < 0.01$ ).  $10.0 \times 10^5$  정자수의 경우 가장 낮은 분할률과 배반포 형성율을 나타내었다.

## 2. 체외수정란의 성감별

체외수정란의 성을 판정하기 전에 돼지 Y- 특이 DNA primer로 성을 판별할 수 있는 지를 확인하기 위하여 암컷과 수컷의 혈액에서 추출한 genomic DNA와 수정하지 않은 미수정란을 증폭한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 M lane은 웅성 혈액 DNA, F lane은 자성 혈액 DNA, Lane 1,2는 미수정난자이며, 이들을 Y- 특이 DNA primer로 증폭한 결과 M Lane에서는 491 bp에서 증폭된 band를 확인할 수 있었고, F Lane에서는 증폭된 band가 나타나지 않았다. 미수정란을 증폭한 Lane 1, 2에서도 역시 증폭된 band가 나타나지 않았다.

Fig. 3에서와 같이 배반포 단계의 체외수정란을 이용하여 PCR 방법으로 성감별한 결과 수컷 genomic DNA와 동일하게 Lane 1에서는 491 bp에서 band를 확인함에 따라 수컷으로 판정하였다.

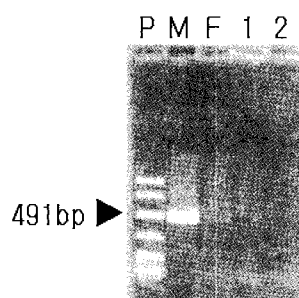


Fig. 2. PCR amplifications of porcine unfertilized oocytes. P : Molecular size marker(Promega<sup>®</sup>). M : genomic DNA from blood sample of male porcine, positive control. F : genomic DNA from blood sample of female porcine, negative control. Lane 1, 2 : porcine oocytes unfertilized.

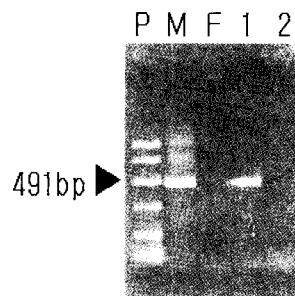


Fig. 3. PCR amplifications of porcine blastocysts. P, Molecular size marker(Promega<sup>®</sup>). M : genomic DNA from blood sample of male porcine, positive control. F : genomic DNA from blood sample of female porcine, negative control. Lane 1 : porcine blastocyst(male) Lane 2 : porcine blastocyst(female)

Table 2. Result of sex determination of porcine embryos by PCR

No. of embryos	Male	Female
31	18 (58.1%)	13 (41.9%)

배반포 단계의 돼지 체외수정란에 대해 상기 PCR 방법을 이용한 성감별 결과는 Table 2와 같다.

31개의 배반포에 대한 성감별의 결과 18개가 수컷, 13개가 암컷으로서 각각 58.1%, 41.9%를 나타내었다.

## 고 찰

배반포 단계의 돼지 체외수정란을 이용하여 성감별을 실시하기 위해서 먼저 돼지 체외수정에 의해 수정란을 얻기 위한 조건을 확립하였다.

돼지는 정자농도와 공배양 시간이 배발달과 배반포 형성에 영향을 줄 수 있다. 돼지는 체내에서도 다정자 침입률이 다른 동물에 비해 30~40% 정도로 극히 높다(Polge, 1978; Hanly, 1961). 체외수정에서도 다정자 침입률이 65%에 이른다는 보고가 있고(Wang 등, 1991), 이 때문에 수정 후 배가 정상적인 개체로 발생하는 데 어려움이 있다. 따라서 본 실험은 다정자 침입률이 적고 수정률을 높

일 수 있는 정자 농도를 찾을 목적으로 수행되었다.

Hunter와 Dziuk (1968)는 체내수정 시에 정자는 인공수정 후 2시간 이내 투명대에 도달하여 투명대를 통과하고 난자의 세포질내 들어가 3시간 내에 수정반응을 개시한다고 하였다. 신선정액을 이용하여 체외수정을 할 때는 수정 후 4시간 내에 정자 침입이 이루어진다고 보고되었다(Kikuchi 등, 1995).

또한 돼지 체외수정 시에 이용되는 배지로 조직 배양용 medium 199(Funahashi 등, 1994; Nagai와 Moor, 1990; Williams, 1986), Brackett and Oliphant (BO) medium(Kikuchi 등, 1993), modified Krebs-Ringer bicarbonate solution(Naito 등, 1988) 등이 있다. 이 세 가지 배지와 본 실험에서 사용한 mTBM 수정배지를 비교해 보면 mTBM 배지에서  $Ca^{2+}$  이 농도(7.5 mM)로 함유되어 있고 bicarbonate가 첨가되지 않았다. 체외수정 배지(mTBM)에서  $CaCl_2$  농도가 2.5 mM에서 10 mM로 증가할 때 정자의 난자내 침투율, 다정자침입을 그리고 난자에 침투하는 정자수가 정자 농도에 따라 각각 증가한다고 보고되었다<sup>1)</sup>.

따라서 본 실험에서는 Abeydeera와 Day (1997)의 방법을 기초로 하여 체외수정을 위해서 mTBM 배지를 사용하고 수정시간을 6시간으로 정하였고 신선정액을 이용하여 정자농도를 다르게 하는 방법을 실시했다. Abeydeera & Day (1997)는 동결정액을 사용하여 체외수정의 결과를 보고하였고 사용된 정자수는  $5 \times 10^5/ml$ 이었다.

이 실험에서 각각의 다른 정자농도( $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $6.0 \times 10^5$  그리고  $10.0 \times 10^5$ )에 따른 분할률과 배반포 형성율을 비교하면 67.88과 22.40%로  $2.5 \times 10^5$ 가 분할률, 배반포 형성율이 가장 높게 나타났고  $10 \times 10^5$ 가 47.60 과 12.37%로 가장 낮았다. 이 결과는 동결정액의 정자수는  $5.0 \times 10^5/ml$ 로 조정하여 이용한 Abeydeera와 Day (1997)의 결과와 비교했을 때 분할률과 배반포 형성률 모두 본 실험에서 높은 수치를 나타냈다.

수정란의 발달율은 다정자침입률이 증가함에 따라 감소한다. 다정자 침입의 수정란에서는 수정란의 성장지연이 보고되었다(Han 등, 1999). 특히

다정자 침입 수정란의 초기 발달은 전핵단계에서부터 지연된다. 이것은 세포주기의 지속시간이 다정자의 침입 수정란에서는 증가하기 때문으로 생각된다. 길어진 세포주기 시간에 의해 수정란의 발달이 감소하는 원인으로 여겨진다(Han 등, 1999).

본 실험결과  $2.5 \times 10^5$ 가 배지와 수정시간이 일정한 상태에서 수정란의 발달을 및 배반포 발달율에서 가장 적절한 농도로 나타났다.

본 실험에서 성감별을 위해 PCR 방법을 사용해 본 결과 성 조절 기술은 가축의 생산 효율 증진을 위한 매우 혁신적인 기술이며, 앞서 서론에서 살펴본 바와 같이 많은 연구가 오래 전부터 수행되어 왔다. 이들 방법들 중에서 Y 염색체의 DNA 검정을 이용한 성의 감별은 수정란 세포 표면의 특성이나 세포내의 효소의 활성, 염색체의 핵형 분석 등의 여러 방법들 보다 실용적인 방법으로 평가되고 있다(Thibier 와 Nibart, 1995).

체외수정으로 생산된 배반포를 성감별한 결과 수컷이 58.1%, 암컷이 41.9%로 자연적 성비와 비슷하나 수컷의 비율이 약간 높게 나타났다. 이것은 Kawarasaki 등 (2000)이 chromosome Y-, 1-specific DNA probe를 이용한 *in situ hybridization*에 의한 돼지 수정란의 성감별을 실시하여 32세포 이상의 수정란에서 수컷이 54%, 암컷이 46%로 나온 것과 근소한 차이를 보였다.

이상의 결과로 PCR 방법을 이용하여 돼지 체외수정란의 성감별을 할 수 있음을 확인하였다.

## 적 요

성감별에 이용할 돼지 수정란을 체외수정 방법으로 생산하기 위하여 돼지 난소에서 채취한 난자를 NCSU 23 배지에서 eCG, hCG를 첨가한 상태에서 22시간, 첨가하지 않은 상태에서 22시간 체외성숙을 시킨 후 mTBM을 이용하여 여러가지 정자농도( $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $6.0 \times 10^5$  그리고  $10.0 \times 10^5$ )에 따라 6시간 수정시켰고, NCSU 23 배지에서 배양시켰다. 배양 후 44시간에 수정란의 분할률을 관찰하였고, 144시간에 배반포 형성율을 확인하였다.

성감별 방법은 체외수정으로 생산된 배반포를

돼지 Y- specific DNA primer를 이용하여 PCR 처리를 한 후 전기영동으로 491 bp에서 증폭된 band의 유무에 따라 암컷과 수컷의 성을 판정하였다.

1. 돼지 체외수정에서 정자농도  $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $6.0 \times 10^5$  및  $10.0 \times 10^5$ 에 따른 수정란 분할률은 각각 55.95, 67.88, 60.18, 47.60% 이었다.
2. 정자농도  $5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $6.0 \times 10^5$  및  $10.0 \times 10^5$ 에 따른 배반포 형성율은 각각 16.03, 22.40, 21.41, 12.37%이었다.
3. 31개의 체외수정으로 생산된 배반포에 대한 PCR을 이용한 성감별 결과는 18개가 수컷, 13개가 암컷으로서 각각 58.1%과 41.9%를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 돼지의 체외수정으로 생산된 배반포에 대한 성감별시 PCR 기법이 신속하고 정확하게 성감별을 실시할 수 있는 방법으로 판단되었다.

#### 참고문헌

- Abeydeera LR, Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium : effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Abeydeera LR and Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development *in vitro* of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 57:729-734.
- Birkhead TR, Moller AP and Sutherland WJ. 1993. Why do females make it so difficult for males to fertilize their eggs? *J. Theor. Biol.*, 161: 51-60.
- Brandriff BF, Gordon LA, Haendel S, et al. 1986. Sex chromosome ratio determined by karyotypic analysis in albumin isolated human sperm. *Fertil. Steril.*, 46:678-685.
- Bredbacka P, Kankaanpaa A and Peippo J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology*, 44:167-176.
- Coy PE, Martinez S, Ruiz JM, et al. 1993. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation *in vitro* in pigs. *Theriogenology*, 40:539-546.
- Ding J and Foxcroft GR. 1994. Epidermal growth factor enhances oocytes maturation in pig. *Mol. Reprod. Dev.*, 39:30-40.
- Funahashi H and Day BN. 1993. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig. *J. Reprod. Fertil.*, 99:97-103.
- Funahashi H, Cantley TC and Day BN. 1994. Different hormonal requirement of porcine oocyte-complexes during maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 101:159-165.
- Gutierrez-Adan A, Cushwa WT, Anderson GB, et al. 1997. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. *Anim. Genet.*, 28:135-138.
- Hanly S. 1961. Prenatal mortality in farm animals. *J. Reprod. Fertil.*, 2:182-194.
- Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, et al. 1999. Growth retardation of inner cell mass in polyspermic porcine embryos produced *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 60:1110-1113.
- Hunter RHF and Dziuk PJ. 1968. Sperm penetration of pig eggs in relation to the timing of ovulation and insemination. *J. Reprod. Fertil.*, 15:199-208.
- Hunter RHF. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil.*, 72:203-211.
- Hunter RHF. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, 29: 385-391.
- Iritani A, Niwa K and Imai H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.*, 54:394-384.

- Itagaki Y, Kimura N, Yamanaka M, et al. 1995. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated *in vitro*. *J. Mamm. Ova. Res.*, 12:73-78.
- Iwaskai S and Nakahara T. 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.
- Kano K, Miyano T and Kato S. 1994. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42:1061-1068.
- Kawarasaki T, Matsumoto K, et al. 2000. Sexing of porcine embryo by *in situ* hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. *Theriogenology*, 53:1501-1509.
- Kawarasaki T, Kohsaka T, Chikyu M, et al. 1994. Detection of porcine male-specific DNA sequence using polymerase chain reaction: Effect of template cell number and amplification condition. *Jpn. J. Swine. Sci.*, 31:27-32.
- Kawarasaki T, Kohsaka T, Sone M, et al. 1995. Detection of Y-bearing porcine spermatozoa by *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled, porcine male-specific DNA probe produced by polymerase chain reaction. *Mol. Reprod. Dev.*, 40:455-459.
- Kikuchi K, Nagai T, Motlik J, et al. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Theriogenology*, 39:593-599.
- Kikuchi K, Naito K, Daen FP, et al. 1995. Histone H<sub>1</sub> kinase activity during *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 43:523-532.
- Kim NH, Funahashi H, et al. 1996. Effects of oviductal fluid on sperm penetration and cortical granule exocytosis during fertilization of pig oocytes *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 107:79-86.
- King WA. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21:7-17.
- Lu KH, Cran DG and Seidel GE Jr. 1999. *In vitro* fertilization with flow cytometrically sorted bovine sperm. *Theriogenology*, 52:1393-1405.
- Mattioli M, Galeati G and Seren E. 1988. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete. Res.*, 20:177- 183.
- Nagai T, Niwa K and Iritani A. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 70:271-275.
- Nagai T and Moor RM. 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:377- 382.
- Naito K, Fukuda Y and Yoyoda Y. 1988. Effect of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*. *Gamete. Res.*, 21:289-295.
- Polge C. 1978. Fertilization in the pig and the horse. *J. Reprod. Fertil.*, 54:461-470.
- Pomp D, Good BA, Geisert RD, et al. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J. Anim. Sci.*, 73:1408-15.
- Rath D, Niemann H and Tao T. 1995. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo field *in vitro*. *Theriogenology*, 44:529-538.
- Thibier M and Nibart M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology*, 43:71-80.
- Utsumi K, Hayashi M, Takakura R, et al. 1993. Embryo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:25-32.



- Wang WH, Okuda K and Niwa K. 1991. *In vitro* penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 93:491-499.
- Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, et al. 1998. Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after *in vitro* fertilization. Mol. Reprod. Dev., 49:308-316.
- Wang WH, Abeydeera LR, Okuda K, et al. 1994. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod., 50:510-515.
- Williams TJ. 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. Theriogenology, 25:733-736.
- Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 88:1-8.
- 유일정, 김용준, 이경광. 1999. 햄스터 H-Y항체와 중합효소연쇄반응을 이용한 소 수정란의 성감별. 대한수의학회지, 39:189-203.
- 
- (접수일: 2001. 9. 28/ 채택일: 2001. 11. 15)