

## H-Y抗體의 處理가 생쥐受精卵의 發達에 미치는 影響

高正在 · 沈昊燮 · 金鍾培 · 朴弘陽 · 鄭吉生 · 李景廣\*

建國大學校 畜産大學

### Effect of H-Y Antibody on in vitro Development of Mouse Embryos

Ko, J. J., H. S. Shim, J. B. Kim, H. Y. Park,  
K. S. Chung, and K. K. Lee\*  
College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

#### Summary

These experiments were carried out to develop new techniques identifying XX-bearing embryos prior to implantation by immunological method. Antiserum to histocompatibility-Y(H-Y) antigen was prepared in adult SD(sprague-dawley) female rat by repeated immunization of new-bone testis supernatant from males of the same strain.

ELISA test was used to identify the H-Y antibody of antiserum. Total 124 mouse embryos (8-cell stage) were treated with H-Y antiserum and complement in BSA free Hoppe and Pitt's medium and cultured under the gas phase of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C for 24 to 48 hrs. The morphological characteristics of embryos treated were observed under the phase-contrast microscope.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. Optimal Density of H-Y antibody were appeared to be 0.27-0.47 by ELISA test.
2. Of total 124 embryos treated with H-Y antiserum and complement 69(55.6%) embryos developed to blastocyst and 55(44.4%) destroyed or arrested.

#### I. 緒 論

哺乳動物의 性을 人爲的으로 支配하려는 研究는 오래전부터 試圖되어 왔다. 그중에서도 최근에 와서는 免疫學的 方法에 의하여 受精卵의 性을 鑑別한 다음 選擇의으로 移植함으로써 後代의 性을 調節하려는 研究가 특히 活發하게 進行되고 있다. (Boyse & Bennett, 1971; Sacco & Shivers, 1973; Oikawa & Yanagimachi, 1975; Wachtel, 1975; Ohno,

1976; Krco & Goldberg, 1976; Tsunoda & Chang, 1978; Epstein, Smith & Travis, 1980; White, 1983; Utsmi, 1983; Shelton, 1984)

이러한 研究들은 어느것이나 Eichwald와 Silmsler (1955)가 近親繁殖을 實施한 雄性생쥐의 組織에서 組織適合性抗原 (Histocompatibility-Y antigen)을 發見하고, 이 H-Y antigen에 대한 遺傳學的 및 免疫學的 特性을 究명한 많은 研究結果 (Welshons & Russel, 1959; Price, 1970; Rary, et al., 1979; Billingham, 1981; Koo, 1981; Goodfellow, 1982;

Tartakovsky, 1983; Wachtel, 1984; Steinmuller, 1984)에 근거를 두고 진행되어 왔다. Wachtel(1974)은 Y-Chromosome과 관련된 세포 표면의 항원들은 rat, rabbit, guinea pig와 human을 포함한 몇몇哺乳動物의種에 있어서 서로交叉反應이 있다는 것을立證하였고, 異型配偶자의鳥類나兩棲類의雌性에서도 H-Y抗原이存在하며 8細胞期雄性胚의細胞膜에도 H-Y抗原이存在한다고 보고하였다. 이어 Krco와 Goldberg(1976)는 8細胞期の생쥐受精卵을 Complement存在하에서 H-Y抗體로處理했을 경우 XY型的受精卵에 대해서는 Cytotoxic效果가 있다는 것을確認하였다. 또한, Epstein等(1980)은 8細胞期 생쥐受精卵 92個를 H-Y抗體와 Complement로處理한結果, 41個의受精卵이破壞되거나發達이停止되었고, 나머지 51個의受精卵은胚盤胞期까지發達하였다고報告하였다. 이들중染色體分析이可能했던 34個는 모두 XX型染色體를 가지고 있었다고報告하였다. White等(1983)은 8-16細胞期の生쥐受精卵 550個를 monoclonal H-Y抗體와 complement로處理한 후正常的으로發達한 294個의胚盤胞를 foster mother에게移植하여 얻은 53마리의새끼중 43마리(81.13%)가 암컷이었다고報告하였으며, Wachtel等(1984)은大家畜인 소에 있어서도受精卵에 monoclonal H-Y抗體를 처리함으로써 원하는性을 가진個體生産에成功했다고報告하였다.

한편, 國內의境遇, 이러한免疫學的方法에 의하여性調節을試圖하는研究는 아직初期段階에 머무르고 있는實情이다. 이에本研究에서는 Rat에서生産된 H-Y抗體로 생쥐受精卵에處理하여受精卵의 in vitro發達狀態를 관찰하고, 동시에性染色體를分析하여選擇的인移植의可能性如何를 규명하려고試圖하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 試驗材料

#### 1) 供試動物

H-Y抗血清과 Normol Rat Serum을調製하기 위하여 Inbred SD(Sprague-dawley)種 Rat를供試하였다. 이들의年齡은 8~10주령, 體重은 150~200g이었다. 分娩後 3時間以內에 같은系統의 Rat로부터摘出된 new-bone testis를 H-Y抗原으로

使用하였다. 採卵을 위해서는 Inbred ICR系統의 생쥐를供試하였는데 이들의年齡은 4~6주령, 體重은 20~30g이었다. 한편 16~20주령, 體重 700~800g의 English種 guinea pig를屠殺하여 serum을採取, complement로使用하였다.

#### 2) 受精卵

##### (1) 多排卵誘起

午後 4時에 首當 5 I·U·의 PMSG(Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Follicon, Invert, Holland)를 1回 腹腔에注射하였으며 45~48時間後에 5 I·U·의 HCG(Human Chorionic Gonadotropin; Choculan, Invert, Holland)를 同一한方法으로注射하였다. 授精을 위하여 HCG注射後 12~15時間째에 1對1의比率로雄性生쥐를合송시켰다. 이어翌日 아침에 陰栓의有無를確認하여 陰栓이 없는個體는採卵對象에서除外시켰다.

##### (2) 受精卵回收

陰栓發見當日을第1日로 하여 2 $\frac{1}{2}$ 日째 되는날에外科的方法에 의하여卵管과子宮을摘出한 후, 實體顯微鏡(Kyowa Optal Co., Japan)下에서灌流함으로써受精卵을回收하였다.

#### 3) 培養液

採卵과回收된受精卵의培養에는 Hoppe & Pitts(1973)의培養液을使用하였는데 이培養液의 pH는 7.3, 滲透壓은 300mosm였으며使用直前に 0.2 $\mu$ m의 Millipore Filter(German Science Inc., U. S. A)를使用하여濾過시킴으로서細菌을除去하였다.

## 2. 試驗方法

### 1) H-Y抗血清의調製

Inbred SD種의雌性흰쥐와 같은系統의雄性흰쥐를交配시켜 태어난새끼로부터生후 3시간이내에摘出해낸精巢를 PBS에沈漬시켜均質器(Nihon Seiki Kaisha Ltd., Japan)로均質化시켰다. 이어 원심분리에 의하여脂肪 및結合組織을除去하고上層液을取하여 H-Y抗原으로使用하였다. 이抗原과 adjuvant(Gibco)를 1:1로混合, 1주일에 1回씩, 매회 2ml씩 6주동안 같은系統의雌性흰쥐 腹腔內에注射하였으며, 마지막 1주일의 booster注射 후 7일째 되는날에採血, 遠心分離(3000Xg, 30min, 4 $^{\circ}$ C)함으로써 H-Y抗血清을調製하였다(Fig. 1).

Rat newborn-testis  
 ↓  
 Homogenization  
 ↓  
 Collecting supernatant by centrifugation  
 (twice, 1000Xg, 10min.)  
 ↓  
 Removal of connective tissue by centrifugation  
 (2500Xg, 30min.)  
 ↓  
 Making the immunogen by mixing with adjuvant  
 (1 : 1)  
 ↓  
 Treatment on female rat by intraperitoneal  
 injection(once a week x 6)  
 ↓  
 Booster injection  
 ↓  
 Bleeding a week after booster injection  
 ↓  
 Centrifugation(3000Xg, 4 °C, 30min.)  
 ↓  
 Collecting antiserum

Fig. 1. Preparation of Rat H-Y antiserum

2) H-Y 抗體의 確認

抗原에 對한 抗體生成의 有無를 確認하기 위하여 ELISA TEST를 實施하였다. H-Y抗原을 coating buffer(barbiturate buffer, pH 9.6)로 1:10의 比率로 稀釋, EIA用 plate에서 3시간 coating한 후, 0.5%의 BSA용액으로 2회 洗滌하였다. 이어 1% BSA용액으로 2시간 blocking시킨 후 0.5%의 BSA용액으로 재차 3~4회 洗滌하였다. 10배로 稀釋된 抗血清을 각 Well에 150μl씩 分注하여 2시간 培養, 0.5% BSA용액으로 3~4회 세척하였다. 이어 conjugate rabbit (anti-rat Ig G-A.P)를 1:500으로 稀釋하여 150μl씩 각Well에 分注하여 2시간 反應시켰다. 다시 0.5% BSA용액으로 3~4회 세척한 후 diethanol amine buffer (pH,7.8)에 A.P-su- bstvate를 溶解하여 (1mg/ 1ml) 150μl씩 각 Well에 분주하여 30분간 反應시켰다. 이어 5N의 NaOH 용액으로 반응을 중단시킨 후, ELISA

reader(Dy- natech)로 410nm에서 O·D (Optimal D ensity) 價를 測定하였다(Fig. 2).  
 Coating antigen on then on the plate wells for EIA with barbiturate buffer(PH 9· 2) for 3 hrs.  
 ↓ Washing with 0.5%BSA solution  
 Blocking with 1 % BSA solution for 3 hrs.  
 ↓ Washing with 0.5% BSA solution  
 Incubation for 2 hrs after distribution on each Well by 150 l of antiserum.  
 ↓ Washing with 0.5% BSA solution  
 Conjugate reaction for 2 hrs(Rabbit anti-rat IgG- AP; 1:500 dilution).  
 ↓ Washing with 0.5% BSA solution  
 Substrate reaction for 30 min.  
 ↓  
 Suspending the reaction of conjugate-substrate with 5 N NaOH.  
 ↓  
 Estimating O.D value at 410 nm by ELISA reader.

Fig. 2. Detection of H-Y antibody by ELISA test.

3) 受精卵의 培養

BSA가 함유되어 있지않은 Hoppe & Pitts 培養液에 H-Y抗血清(10%, V/V)과 complement(20%, V/V)를 混合한 培養液 50μl의 小滴을 조직 배양용 petri-dish에 적하시킨 후, paraffin oil로 덮은 다음, 5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C의 배양조건하에서 4시간 이상 平衡을 實施하였다. 이어 8細胞期の 생쥐 受精卵을 培養液에 넣어 24~48시간 동안 배양하면서 受精卵의 發達狀態를 位相差顯微鏡(Ernst Leitz Co., W-Germany)下에서 形態學的 特性을 中心으로 觀察하였다. 이때 對照區로 사용된 培養液으로는 BSA함유 Hoppe & Pitts 배양액, Hoppe & Pitts배양액에 H- Y抗血清을 添加한 배양액, Hoppe & Pitts 배양액에 Normal Rat Serum을 添加한 배양액, Hoppe & Pitts 배양액에 Normal Rat Serum과 Normal Guinea Pig Serum을 첨가한 배양액 등을 사용하였으며 배양조건은 試驗區와 同一하였다.

### III. 結果 및 考察

本 試驗에 의하여 얻어진 結果를 要約하여 考察하면 다음과 같다.

ELISA TEST에 의하여 H-Y抗原과 抗血清을 反應시킨 후, ELISA reader로 410nm에서 H-Y抗體를 測定한 結果, O.D價는 0.27~0.47로서 H-Y抗體가 形成되었음을 確認할 수 있었다(Table 1.).

Table 1. Detection of H-Y antibody by ELISA test

Sample	O. D. value
A *	0.00
B	0.33
C	0.44
D	0.47
E	0.39
F	0.29
G	0.27
H	0.00

A\*, H\*: control, B-G: immunized rat serum

즉, 대조구인 A 구와 H 구의 O·D價는 다같이 0였으나 시험구인 B, C, D, E, F 및 G 구의 그것은 각각 0.33, 0.44, 0.47, 0.39, 0.29 및 0.27 로서 다같이 H-Y抗體가 形成되어 있음을 보여준다. 그리고 H-Y抗體處理 受精卵의 形態學의 特性을 살펴 보면 H-Y抗體와 complement를 含有한 배양액으로 8細胞期의 생쥐 受精卵을 24~48시간 배양하면서 배양시간의 經過에 隨伴되는 受精卵의 發達狀態를 觀察한 結果는 Fig. 3., 4 및 Table 2에서 보는 바와 같았다.

그림 3은 배양개시 후 2시간째의 受精卵으로서 어느것이나 形態學적으로 이상이 없는 桑實胚들이었다.

한편 Fig 4는 Fig 3에 제시된 受精卵을 24시간 배양하였을때의 상태로서 上段 2個와 下段 1개는 H-Y抗體와 complement의 處理에 依하여 細胞가 破壞되었으며, 나머지 6個의 受精卵은 모두 정상적인 발달을 보여주고 있다. H-Y抗體와 complement에 의하여 發達이 중단된 受精卵은 그 細胞膜에 H-Y抗原을 가진 XY型 受精卵이고 발달이 정상적으로 진행된 것은 H-Y抗原이 없는 XX型 性

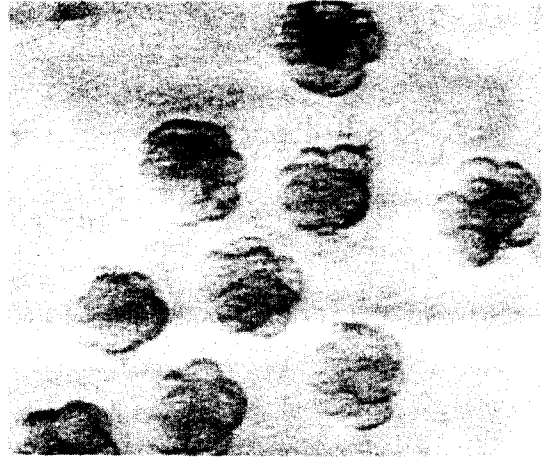


Fig. 3. Embryos stage after incubation for 2 hrs.

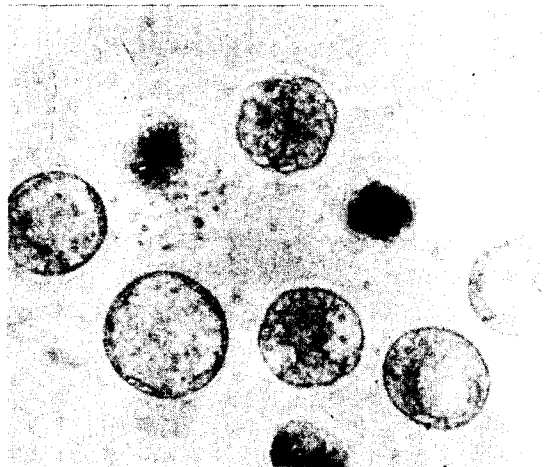


Fig. 4. Embryos stage incubation for 24 hrs.

染色體를 가진 受精卵이라고 推定된다(Epstein, 1980; Joyce, et al., 1984).

H-Y抗體와 complement處理를 받은 受精卵과 對照區의 培養液에서 培養된 受精卵의 形態學의 特性은 Table 2에서 보는 바와 같았다.

이 Table 2에 의하여 알 수 있는 바와 같이 H-Y抗體와 complement를 처리받은 124개의 8細胞期 受精卵 중에서 69(55.6%)개는 胚盤胞期까지 發達하였고, 나머지 55(44.4%)개는 發達이 停止되거나 細胞가 破壞되었다. 그러나, 대조구에서 배양된 受精卵은 대체적으로 별다른 영향을 받지 않는 것으로 판단 되었다. 이러한 결과는 H-Y抗體나

Table 2. In vitro development of embryos in various media

Culture medium	No. of embryos	No. of embryos developed (%)	No. of embryos arrested or destroyed (%)
H & P+NGPS+H-Y antiserum	124	69(55.6)	55(44.4)
H & P+BSA	170	160(94)	10(6)
H & P+H-Y antiserum	52	49(94.2)	3(5.6)
H & P+NRS	54	46(85)	8(15)
H & P+NRS+NGPS	50	45(90)	5(10)

NGPS; Normal guinea pig serum, H & P; Hoppe & Pitts, NRS; Normal rat serum

complement 단독으로는 受精卵에 대하여 어떠한 결정적인 효과를 미치지 못했다고 報告한 Krco와 Goldberg(1976), 및 White 等(1983)의 研究結果가 대체로 일치하는 것이었다.

그리고 本 研究에 이어 수행된 다른 研究에 의하여 H-Y 抗體와 complement의 處理를 받은 다음에도 정상적으로 발달한 受精卵중 染色體 分析이 可能했던 受精卵은 모두 XX型 性染色體를 갖는 受精卵인 것으로 判明되었다(韓, 等, 1985).

이상의 결과를 종합하여 考察할때 H-Y 抗體處理에 의하여, 적어도 생쥐의 受精卵은, 그것을 移植하기전에 XX型 性染色體를 갖는 것과 XY型 性染色體를 갖는 것을 識別하여 分離할 수 있는 것으로 판단된다.

#### IV. 摘 要

本 試驗은 免疫學의 方法에 의하여 착상전 생쥐 受精卵의 性을 識別할 수 있는 方法을 개발하기 위하여 實施하였다.

SD Rat의 new-bone testis를 摘出하여 均質화시킨 다음 上層液을 取하여 同種의 암컷 腹腔內에 注射함으로써 H-Y 抗原에 대한 抗血清을 調製하였다. 抗血清中の H-Y 抗體는 ELISA TEST에 의하여 確認하였다.

H-Y 抗血清과 complement를 含有한 Hoppe & Pitts 배양액에 ICR 系統의 생쥐에서 얻은 8細胞期 受精卵을 일정시간 培養하였다. 이때의 배양 조건은 5%CO<sub>2</sub>, 95%air, 37°C에 습도는 飽和狀態였다. 배양이 끝난 受精卵은 位相差顯微鏡下에서 形態學의 特性을 觀察하였다. 本 研究에 의하여 얻어진 結果는 다음과 같았다.

1. ELISA TEST에 의해 抗血清中の H-Y 抗體를 測定한 결과 O·D價는 0.27~0.47로서 H-Y 抗體의 存在가 確認되었다.
2. H-Y 抗體와 complement로 處理된 124 個의 受精卵중 69(55.6%)個는 胚盤期까지 정상적인 發達을 보였고 55(44.4%)個는 發達이 停止되거나 破壞되었다.

#### REFERENCES

1. Adinolfi, M., P. Polani and J. Zenthon. 1982. Genetic control of H-Y synthesis. A hypothesis. Hum, Genet., 61:1-2.
2. Bennet, D. and E.A. Boyse. 1973. Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y anti-serum. Nature, 246: 308-309.
3. Bennett, D., E.A. Boyse, M.F. Lyon, B.J. Mathieson, M. Scheid, K. Yanagisawa. 1975. Expression of H-Y(male) antigen in phenotypically female Tfm/Y mice. Nature, 257:236-238.
4. Billingham, R.E. and I.M. Hings. 1981. The H-Y antigen and its role in natural transplantation. Hum. Genet., 58:9-17.
5. Eichwald, E.J. and Silmsker. 1955. Communication. Transplant. Bul., 2:148-149.
6. Epstein, C.J., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Tissue Antigen, 15:63-67.
7. Farber, C.M., D. Liebenthal, S.S. Wachtel,

- C.C. Rundles. 1984. Detection of H-Y in the enzyme-linked immunosorbent assay. *Hum. Genet.*, 65:278-279.
8. Goldberg, E.H., E.A. Boyse, D. Bennett, M. Scheid and E.A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y(male) antigen on mouse sperm. *Nature*, 232:378-380.
  9. King, W.A. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21:7-17.
  10. Koo, G.C. 1981. Serology of H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 58:18-20.
  11. Kourounakis, L.H. and E. Moller. 1984. Adjuvants influence the immunoglobulin subclass distribution of immune responses in vivo. *Scand. J. Immunol.*, 19:219-225.
  12. Krco, C.J. and E.H. Goldberg. 1976. H-Y (male) antigen: Detection on eight-cell mouse embryos. *Science*, 193:1134-1135.
  13. Mittwoch, U. 1977. H-Y antigen and the growth of the dominant gonad. *J. Medical Genetics*, 14:334-338.
  14. Müller, U. 1982. Identification and function of serologically detectable H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 61:91-94.
  15. Ohno, S., L.C. Christian, S.S. Wachtel and G.C. Koo, 1976. Hormone-like role of H-Y antigen in bovine freematin gonad. *Nature*, 261:597-598.
  16. Ohno, S. 1983. Sex control in mammals. *Proceedings of the International Symposium on Beef production*. pp.263-273.
  17. Rary, J.M., D.K. Cummings, H.W. Jones, and J. A. Rock. 1979. Assignment of the H-Y antigen gene to the short arm of chromosome Y. *J. Hered.*, 70:78-80.
  18. Snell, G.D. 1981. Studies in histocompatibility. *Science*, 213:172.
  19. Shapiro, M. and R.P. Erickson. 1981. Evidence that the serological determinant of H-Y antigen is carbohydrate. *Nature*, 290:503-505.
  20. Shelton, J.A. and E.H. Goldberg. 1984. Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Transplantation*, 37:7-8.
  21. Tsunoda, Y. and M.C. Chang, 1976. Reproduction in rats and mice isoimmunized with homogenates of ovary testis with epididymis or sperm suspensions. *J. Reprod. Fert.* 46:379-382.
  22. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1983. Sxing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. *J. Reprod. Immunol., Supplement*. p.59.
  23. Wachtel, S.S. 1979. Primary sex determination: H-Y antigen and the development of the mammalian testis. *Arthritis and Rheumatism*, 22:1200-1210.
  24. Wachtel, S.S., G.C. Koo and E.A. Boyse. 1975. Evolutionary conservation of H-Y (male) antigen. *Nature*, 254:270-272.
  25. Wachtel, S.S., S. Ohno, G.C. Koo and E.A. Boyse, 1975. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257:235-236.
  26. Wachtel, S.S., G.C. Koo, E.E. Zuckerman, U. Hammerling, M.P. Scheid and E.A. Boyse. 1974. Serological crossreactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71:1215-1218.
  27. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21:18-28.
  28. Wachtel, G.M., S.S. Wachtel, D. Nakamura, C.A. Moreirafilho, M. Brunner and G.C. Koo. 1984. H-Y antibodies recognize the H-Y transplantation antigen. *Transplantation*, 37:8-13.
  29. White, K.L., G.W. Linder, G.B. Anderson and R.H. Bondurant. 1982. Survival after

- transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology*, 18:655-662.
30. White, K.L., G.W. Linder, G.B. Anderson and R.H. Bondurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*, 19:701-705.
31. Whittingham, D.C. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.*, 14:7-21.
32. Zavos, P.M. 1983. Preconception sex determination via intravaginal administration of H-Y antisera in rabbits. *Theriogenology*, 20:235-240.
33. 韓龍萬·金鍾培·朴弘陽·鄭吉生·李景廣, 1986. 染色體分析에 의한 생쥐 受精卵의 性鑑別. 韓國家畜繁殖學會誌