

## H-Y抗體에 의한 생쥐初期胚의 性判別에 關한 研究

### I. 細胞發育能檢査에 의한 性判別

梁富根·金正翊

江原大學校 畜産大學

## Study on the sexing of preimplantation mouse embryo exposed to H-Y antisera

### I. Sexing of mouse embryos by cytolytic assay

Yang, B.K. and C.I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

### Summary

These studies were conducted using inbred ICR mice to examine the sex of preimplantation mouse embryo.

The morphological normality of mice embryos treated with the culture medium containing rat H-Y antiserum (10%, v/v) plus complement (20%, v/v) was observed and also the sexing of embryos was investigated by chromosomal analysis.

The results obtained were summarized as follows:

1. The viability of preimplantation mouse embryos, which were incubated in vitro with different media condition, was scored 68.9-85.5% in control group. However, 151 embryos normally developed up to blastocyst and 160 embryos were retarded growth or destroyed out of total 311 embryos treated in the medium containing H-Y antiserum (10%, v/v) plus complement (20%, v/v).
2. H-Y antiserum was prepared from inbred rats (Wistar and Donryu strain) with different immunization times (4, 5 and 6th) to examine the specific titer of embryos by the number of immunization. Percentage of normally developed embryos incubated either in the medium containing the antiserum of Wistar plus complement or Donryu plus complement was revealed 50.9, 47.4 and 50.0% (4, 5 and 6th immunization and 47.8, 41.2 and 48.7%, respectively).
3. Twenty two females and five males were identified out of forty-eight normally developed embryos incubated in the medium containing H-Y antiserum plus complement by chromosomal analysis.

### I. 緒 論

家畜의 性을 인위적으로 조절하려는 노력은 오래 전부터 많은 연구자들에 의하여 시도되어 왔다. 最近에 受精卵移植術이 개발 보급됨에 따라 受精卵의 상업화가 도래되면서 移植前 受精卵의 性判別 문제가 관심의 초점이 되어 왔다. 後代의 性을 조절하

려는 노력에는 精子의 人工分離 (Leslie, et al., 1982; Garner, et al., 1983; Kaneko, et al., 1983) 片親性卵의 發生 (Hoppe & Illmen see, 1977, 1982) Barr body의 관찰 (Vickers, 1967; Gardner & Edward, 1968) 性染色體의 分析 (Singh & Hare, 1980; Rottman, 1981; King, 1984) 受精卵의 發育速度 (Tsunoda, et al., 1985) 및 酵素染色法에 의한 性鑑別 (Williams, 1986)

등 연구가 진행되고 있다. 이상의 방법은 家畜의 性을 완전히 支配하거나 出生前 性의 判別이 어려울 뿐만 아니라 고도의 기술과 막대한 연구비가 소요되는 등의 문제점이 있다. 이와 같은 문제점을 극소화시키고 연구결과의 활용을 제고시키기 위하여 免疫學的 方法인 組織適合性 Y 抗原(Histocompatibility-Y antigen)을 이용하여 受精卵의 性을 判別하는 방법에 대한 연구가 國內外에서 보고되고 있다(Krco & Goldberg, 1976; Epstein, et al., 1980; White et al., 1982, 1983, 1984; Utsumi, et al., 1984, Wachtel, 1984; 高等, 1986).

本 研究는 移植前受精卵의 性鑑別을 위하여 rat에서 생성된 H-Y 抗血清을 사용하여 생쥐受精卵의 細胞發育能檢査와 染色體分析法로 性을 判別하여 性比를 조사하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 供試動物

본 실험에서 使用된 供試動物은 受精卵의 採卵을 위하여 생후 7~9주령의 體重이 25~30g인 ICR 系統의 생쥐와 H-Y 抗血清을 생산하기 위하여 8~10주령의 近交系 Wistar와 Donryu 系統 흰쥐가 사용되었다. 또한 補體(Complement)를 만들기 위하여 生後 4個月령의 體重이 700~900g인 English種 기니픽이 供試되었다.

### 2. 供試受精卵

過排卵誘起를 위하여 雌性 생쥐에 PMSG 5단위(IU)를 1회 腹腔내 주사하였으며, 48시간 후에 hCG 5IU를 腹腔內 주사하였다. hCG 주사와 동시에 雄性 생쥐와 1:1로 合券하여 交尾시킨후 68~72시간에 卵管을 분리절단하거나, 子宮을 관류하여 8細胞期의 受精卵을 회수, 실제현미경으로 發育狀態를 檢査한뒤 형태적으로 정상인 受精卵을 실험에 供試하였다.

### 3. H-Y 抗血清의 生産

H-Y 抗血清을 제조하기 위하여 Wistar와 Donryu 系統의 흰쥐 雄性脾臟細胞를 H-Y 抗原으로 사용하였다. 즉 雄性 rat를 도살 개복하여 체외로 절취한 후, 주위의 結체조직 및 혈액을 제거한 다음 PBS 용액이 충전된 주사기를 이용한 압축법으로 2회 관

류시켜 細胞를 분리, 실험관내로 회수하였고 회수된 細胞浮遊液을 500rpm으로 1분간 원심분리기에 서 원심분리하여 혈액을 제거한 후 2000rpm(15분)으로 3회 원심분리시켜 비장세포의 미물질을 제거하고, 회수된 세포부유액을 세포수가  $1 \times 10^6$  /ml가 되도록 조정하여 4~6주동안 同種의 雌性흰쥐에 투여하여 면역를 실시하였다. 마지막 booster 주사후 7~10일 후에 採血, 원심분리(2500rpm, 20분)하여 항원정을 제조하였다.

### 4. H-Y 抗體에 의한 細胞發育能檢査

BSA가 첨가되지 않은 修正 Whitten배양액에 H-Y 抗血清(10%, v/v)과 補體(NGPS; 20%, v/v)를 혼합한 배양액을 조직배양용 petri-dish의 저면에 부착, 멸균된 paraffin oil로 피복하여 小滴培養液을 만들고, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air 및 37°C의 배양조건으로 2시간이상 평형시킨 후에 8細胞期 수정란을 소적배양액내로 옮겨 18~48시간동안 배양하면서 실제현미경으로 受精卵의 發育狀態를 檢査하였다.

### 5. 染色體分析

유사분열 억제제인 colcemid를 수정 Whitten배양액에 최종농도가 0.05μg/ml가 되도록 하여 受精卵의 배양방법과 동일한 방법으로 2시간동안 배양후 Tarkowski(1966)와 King 등(1979)의 실험방법을 修正하여 受精卵의 染色體를 분석하였다(申과 金, 1986).

## III. 結果 및 考察

### 1. 受精卵의 培養에 의한 細胞發育能檢査

8細胞期 생쥐受精卵을 H-Y 抗血清과 補體가 혼합된 배양액에서 배양시킨 시험군과 대조군으로 배양액에서 일정시간 배양한 후 受精卵의 形態學的 特性을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

대조군중 BSA(WM+BSA)와 정상 생쥐血清(WM+NMS)이 첨가된 배양액에서 배양한 受精卵의 體外發育率은 85.8%(169/197)와 72.2%(26/36)였으며 抗血清과 補體의 단독처리군인 WM+H-Y와 WM+NGPS의 처리군에서는 體外發育率이 71.6%(58/81)와 68.9%(51/74)로서 WM+BSA와 WM

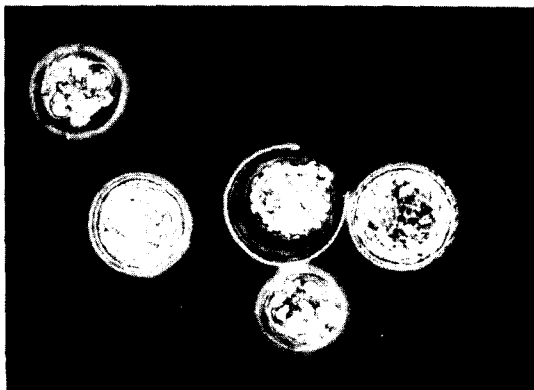
**Table 1. *In vitro* development of embryo in various media**

Culture media	Total	Number of embryos	
		Classification	
		Unaffected(%)	Affected(%)
WM <sup>1</sup> +BSA <sup>2</sup>	197	169(85.8)	28(14.2)
WM+NMS <sup>3</sup>	36	26(72.2)	10(27.8)
WM+H-Y <sup>4</sup>	81	58(71.6)	23(28.4)
WM+NGPS <sup>5</sup>	74	51(68.9)	23(31.1)
WM+NGPS+H-Y	311	151(48.6)	160(51.4)

1. WM:Whitten's medium 2. BSA:Bovine serum albumin  
3. NMS:Normal mouse serum 4. H-Y:H-Y antiserum  
5. NGPS:Normal guinea pig serum

+NMS의 성적보다 H-Y抗體나 補體가 단독으로 첨가된 배양조건이 다소 떨어지는 경향이 있었으나 受精卵에 대하여 결정적인 영향을 미치지 못하였다. 이와 같은 성적은 H-Y抗血清과 補體의 단독첨가에서 受精卵의 生存性에 나쁜 영향을 미치지 않는다고 보고한 Kreo와 Goldberg(1976) 및 高等(1986)의 결과와 일치한다. 한편, 시험구인 흰쥐의 H-Y抗血清과 補體가 함유된 배양액내에서 8細胞期受精卵 311개를 배양하여 發育이 정지하거나 分割球가 파괴된 受精卵은 160개였으며(51.4%), 正常發育된 受精卵은 151개(48.6%)로서 受精卵의 體外發育에 현저한 영향을 미쳤다(Fig. 1).

White 등(1982)은 대조군인 Brinster 배양액(BMOC-3)과 BMOC-3+NGPS, BMOC-3+NMS, B



**Fig. 1. Affected(arrows) and unaffected embryos after 24h in the medium containing H-Y antiserum plus complement. Reproduced at 340X**

MOC+NGPS+NMS을 혼합한 배양액내에서 92.8, 88.0, 95.6 및 88.8%의 정상발육 성적을 얻었으며, 실험군으로 BMOC-3+NGPS+H-Y抗血清이 함유된 배양액에서 생쥐수정란을 배양하여 52.1%의 정상발육을 보고하였다. 이상에서 대조군(88.0~95.6%)의 정상발육성적은 본 실험결과(68.9%~85.8%)보다 우수하였으나 실험군의 경우 52.1% 정상발육성적으로 본 실험결과와 비슷한 경향을 나타냈다. 이상의 결과에서 볼때 배양액에 정상생쥐혈청, 정상가니릭血清 및 H-Y抗血清만을 단독 첨가할 경우 受精卵의 體外發育에는 영향을 미치지 않았으며 H-Y抗血清과 補體가 첨가된 배양액에서는 受精卵에 나쁜 영향을 미친다고 생각된다.

흰쥐에서 생산된 H-Y抗血清이 系統間 및 免疫回數에 따라 생쥐受精卵의 發育에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Wistar와 Donryu 계통의 흰쥐에서 4회, 5회, 6회 번역을 실시하여 생산된 抗血清과 補體가 혼합된 배양액에 수정란의 形態의 正常性을 조사한 결과를 Table 2 및 3에 요약하였다.

**Table 2. Effects of *in vitro* development of mouse embryo in the medium containing Wistar rat antiserum plus complement**

Donor strain	Antiserum	No. of embryos treated	No. of embryos	
	No. of immunized		Developed(%)	Arrested(%)
ICR	4th	112	57(50.9)	55(49.1)
	5th	38	18(47.4)	20(52.6)
	6th	42	21(50.0)	21(50.0)
Total		192	96(50.0)	96(50.0)

**Table 3. Effects of *in vitro* development of mouse embryo in the medium containing Donryu rat antiserum plus complement**

Donor strain	Antiserum	No. of embryos treated	No. of embryos	
	No. of immunized		Developed(%)	Arrested(%)
ICR	4th	46	22(47.8)	24(52.2)
	5th	34	14(41.2)	20(58.8)
	6th	39	19(48.7)	20(51.3)
Total		119	55(46.2)	64(53.8)

Table 2, 3에서 보는 바와 같이 Wistar 系統과 Donryu 系統의 暉쥐에 4 회, 5 회 및 6 회 면역하여 생산된 抗血清과 補體가 혼합된 배양액에서 8細胞期受精卵을 배양시킨 결과 Wistar 抗血清인 경우 발육이 지연되거나 分割球가 파괴된 것과 정상적으로 胚盤胞期까지 發育된 것의 비율은 4 회, 5 회, 6 회에서 각각 49.1 : 50.9, 52.6 : 47.4 및 50 : 50으로 약 1 : 1의 성적을 얻었다. 또한 Donryu 系統의 暉쥐에서 4 회, 5 회 및 6 회 면역을 실시하여 생산된 H-Y 抗血清과 補體가 혼합한 배양액에서 배양시킨 결과 영향을 받은 것과 영향을 받지 않고 정상 발육된 受精卵의 비율은 각각 52.2 : 47.8, 58.8 : 41.2 및 51.3 : 48.7의 성적을 나타내 Wistar 系統과 비슷한 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 暉쥐의 系統間에 H-Y 抗體의 생산능력에는 차이가 없었으며 면역횟수(4 ~ 6 회) 간에도 차이가 없으므로 暉쥐의 H-Y 抗血清의 生産을 위한 면역횟수는 4 회로 충분하다고 생각된다.

## 2. 細胞發育能檢査후 受精卵의 染色體 分析

H-Y 抗血清과 補體가 함유된 배양액에서 8細胞期 생취 受精卵을 일정시간 배양후 染色體의 核型을 分析(Fig. 2)하여 性を 判別한 결과는 Table 4와 같다.

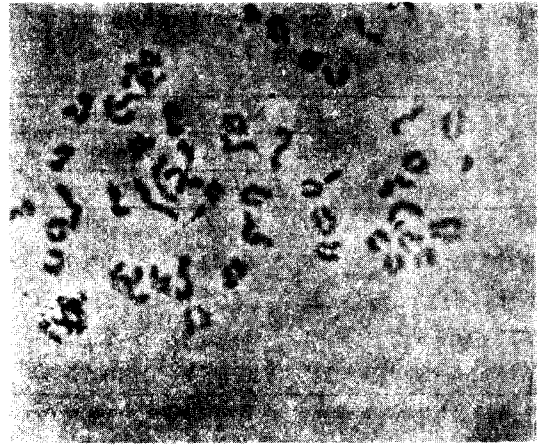


Fig. 2. The metaphase plate of normal mouse blastocyst developed after culture in H-Y antiserum and complement. Presence of two small chromosomes (arrows: XX) is typical for female.

H-Y 抗血清과 補體에 의하여 정상적으로 胚盤胞期까지 發育한 受精卵 48개중 27개가 性이 判別되어 56.3%의 性判別率을 얻었으며 21개(43.7%)는 性이 判別되지 않았다. 性이 判別된 受精卵중 22개(81.5%)는 雌性, 5개(18.5%)가 雄性으로 나타나 H-Y 抗體와 補體가 함유된 배양액에서 정상적으로

Table 4. Sexed embryos of mouse blastocyst shown development after culture in H-Y antiserum and complement

Experiment number	No. of embryos unaffected in culture	No. of embryos sexed	Sex ratio		
			Female	Male	Unidentified
1	5	2	1	1	3
2	3	2	2		1
3	4	3	3		1
4	4	3	3		1
5	5	3	1	2	2
6	4	3	2	1	1
7	4	2	2		2
8	5	3	3		2
9	3	1	1		2
10	4	2	1	1	2
11	2	1	1		1
12	5	2	2		3
Total (%)	48	27 (56.3)	22 (81.5)	5 (18.5)	21 (43.7)

발육된 受精卵 중에서 雌性이 유의( $P < 0.001$ ) 하게 많았다. 이와같은 성적은 White 등(1983)의 81%, Stzemienski(1981)의 82% 및 Utsumi 등(1984)의 77-79%와 대체로 일치하는 경향을 보였으나 White 등(1982)의 86.2% 및 Epstein 등(1980)의 92%보다는 다소 낮은 성적을 나타냈다. 이상의 결과로 볼 때 補體의 존재하에서 H-Y 抗血清에 의해 정상발육된 受精卵은 암컷, 발육이 지연되거나 파괴된 受精卵을 수컷이라고 보고한 Krco와 Goldberg(1976)의 보고와 일치하였다. 본 실험에서 생쥐 受精卵(311개)을 H-Y 抗血清과 補體가 첨가된 배양액내에서 體外培養하여 151개(48.6%)가 正常發育하였으며, 그중 일부(48개)에 대하여 染色體分析을 실시한 결과 27개(56.3%)의 性이 判別되었으며 性이 判別된 受精卵중 대부분(81.5%)이 XX 染色體를 갖는 雌性 受精卵으로 확인되어 생쥐 初期胚의 性判別에 H-Y 抗體의 이용이 가능하다고 생각된다.

#### IV. 摘要

哺乳動物 初期胚의 性判別에 관한 연구를 수행하기 위하여 생쥐 受精卵을 흰쥐 H-Y 抗血清과 補體가 혼합된 배양액 내에서 일정기간 배양시킨 후 수정란의 형태적 정상성을 조사하고, 染色體分析法으로 性을 判別한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 생쥐 受精卵을 여러가지 배양조건에서 體外培養시킨 결과 대조군에서는 수정란이 正常發育(68.9~85.8%)하였으나, H-Y 抗體와 補體가 함유한 배양액 내에서 처리된 311개의 受精卵중 151개(48.6%)가 胚盤胞期까지 정상발육되었고 160개(51.4%)는 발육이 정지되거나 分割球가 파괴되었다.

2. 免疫回數에 따라 생산된 抗血清의 抗體價를 측정하기 위하여 Wistar 系統과 Danryu 系統의 흰쥐에서 4 회, 5 회 및 6 회 면역후 생산된 H-Y 抗血清이 첨가된 배양액 내에서 수정란을 배양시킨 결과, 正常發育率이 Wistar 系統에서 각각 50.9, 47.4, 50.0%였으며, Donryu 系統에서 생산된 抗血清에서는 47.8, 41.2, 48.7%로서 차이가 인정되지 않았다.

3. 8細胞期 생쥐 受精卵을 H-Y 抗血清과 補體가 첨가된 배양액내에서 일정기간 배양시킨 뒤 정상적으로 發育된 受精卵(48개)을 染色體分析을 실시한 결과, 雌性 22개(81.5%), 雄性 5개(18.5%)로

判別되었다.

#### V. 引用文獻

1. Epstein, C.J., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens* 15:63-68.
2. Gardner, R.L. and R.G. Edwards. 1968. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*. 218:346-348.
3. Garner, D.L., B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson, M.A. Van Dilla and L.A. Johnson. 1983. Quantification of the X-and Y-chromosome bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 28:312-321.
4. Hoppe, P.C. and K. Illmensee. 1977. Microsurgically produced homozygous diploid uniparental mice. *Prod. Nat. Acad. Sci. USA* 74:5657-5661.
5. Hoppe, P.C. and K. Illmensee. 1982. Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into genetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79:1912-1916.
6. Kaneko, S., J. Yanaguchi, T. Kohayashi and R. Lizuka. 1983. Separation of human X-and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Fertil. Steril.*, 40: 661-665.
7. King, W.A. 1984. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 21:7-17.
8. King, W.A., T. Lineares, I Gustavaaon and A Bane. 1979. A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Common.* 3:51-56.
9. Krco, C.J. and E.H. Goldberg. 1976. H-Y

- (male) antigen; Detection on eight-cell mouse embryos. *Science*. 193:1134-1135.
10. Quinlivan, W.L.G., K. Preciado, T.L. Long and H. Sullivan. 1982. separation of human X and Y spermatozoa by albumin, gradients and sephadex chromatography. *Fertility and sterility* 37:103-107.
  11. Rottman, O.J. and W.W. Lampeter. 1981. Development of early mouse and rabbit embryos without zona pellucida. *J. Reprod. Fert.* 61:303-306.
  12. Singh, E.L. and W.C.D. Hare. 1980. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology*. 14:423-427.
  13. Tarkowski, A.K. 1966. An airing method for chromosome preparations from eggs. *Cytogenetic*. 5:394-400.
  14. Tsunoda, Y., T. Tokunage and T. Sugie. 1985. Altered sex ratio of live young after transfer of fast-and slow-developing mouse embryos. *Gamete Research* 12:301-304.
  15. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. *Proc. 10th. Int. Congr. Anim. Reprod. And A.I.* pp.234-235.
  16. Vickers, A.D. 1967. Amniotic sex chromatin and fetal sexing in the mouse. *J. Reprod. Fert.* 14:503-505.
  17. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology* 21:18-28.
  18. White, K.L., M.W. Bradbury, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1984. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos. *Theriogenology* 21:275.
  19. White, K.L., G.M. 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.
  20. White, K.L., G.M. Linder, G.B. Anderson and BonDurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology* 19:701-705.
  21. Willams, 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.
  22. 高正在, 沈昊燮, 金鍾培, 朴弘陽, 鄭吉生, 李景廣. 1986. H-Y抗體의 處理가 생쥐 受精卵의 發達에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌 10(1): 42-48.
  23. 申鉉東, 金正翊. 1986. 染色體 分析에 의한 생쥐 初期胚의 性判別에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌 10(1): 27-35.