

H-Y 抗體에 의한 생쥐初期胚의 性判別에 관한 研究

II. 間接免疫螢光測定法에 의한 性判別

梁富根 · 張正淳* · 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

II. Sexing of mouse embryos by immunofluorescence assay

Yang, B. K., C.S. Chang* and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

Summary

These studies were carried out to examine the sex of preimplantation mouse embryo.

For the investigation of sex-ratio of mouse embryos, morula and blastocyst stage embryos treated with H-Y antiserum (10%, v/v) and FITC anti-mouse-IgG were divided into the positive and negative embryos. Positive and negative identified embryos were observed the viability according to the in vitro culture and the sex ratio was also investigated by chromosomal analysis.

The results obtained in these studies were summarized as follows:

1. Two hundred sixty-seven recovered embryos of morula or blastocyst stage were incubated in medium containing H-Y antiserum and FITC anti-mouse-IgG. Positively or negatively identified embryos were 139 and 128. This trend indicated the approximal sex ratio was 1:1.
2. Sex ratio was measured using the embryos treated with indirect immunofluorescence assay to examine the relationship between embryo developmental stage and sex ratio. Sex ratio of morula stage embryos was 45.2% positive and 54.8% negative, on the other hand, the ratio switched to 56.4% positive and 43.6% negative embryo in blastocyst stage.
3. Forty-seven positive and 57 negative embryos were obtained out of 104 morula stage embryos treated with indirect immunofluorescence assay. Survived positive or negative embryos during in vitro culture were 42 and 49, respectively out of 47 and 57 embryos.
4. The numbers of negative and positive embryos were 171 and 92 out of 163 blastocyst embryos which were incubated in the medium containing H-Y antiserum and FITC anti-mouse-IgG. The result of karyotype test showed the successful rate of sexing embryo is positive and negative embryos was 63.0% (58/92) and 62.0% (44/71). The final female to male ratio within 58 positive embryos was 22.7:77.6, and the ratio of the 44 negative embryos was 77.3:22.7.

I. 緒 論

最近에 활발히 進行되고 있는 性判別중 免疫學的

方法인 組織適合性 Y 抗原(H-Y antigen)을 이용한 性比調節에는 細胞發育能檢査(Cytolytic assay of H-Y antigen)와 免疫螢光測定法(Immuno-fluorescent

*仁荷大學校 理科學(College of Science, Inha University)

of H-Y antigen)이 있으며 細胞發育能檢査에 의한 性判別은 H-Y 抗原을 갖는 雄性 受精卵(XY)의 正常發育을 억제시킴으로서 (Krcso & Goldberg, 1976; Epstein, et al., 1980; White, et al., 1983, 1984; Utsumi, 1984; Wachtel, 1984) XX-染色體의 구성을 갖는 雌性 受精卵만을 선별하여 受卵畜에 移植시키는 방법이므로 雄性産仔의 생산이 불가능하다. 그러나 免疫螢光測定法(White et al., 1984)은 移植前 受精卵의 雌性判別이 가능하게 되므로 원하는 性の 仔畜을 선택적으로 생산할 수 있다.

本研究는 Mouse 初期胚의 性判別을 위하여 受精卵를 間接免疫螢光法으로 처리한 후 螢光標識卵(雄性), 非螢光標識卵(雌性)으로 구분하여 體外培養에 따른 受精卵의 生存性과 染色分析法으로 性を 判別하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試受精卵

ICR系統의 생쥐에서 PMSG (5 IU)와 hCG(5IU)를 투여하여 과배란을 유기시킨후 雄性생쥐와 1:1로 교배시켰다. 桑實胚期와 胚盤胞期 受精卵의 회수를 위하여 자연교배후 76~84시간, 80~90시간에 각각 자궁을 관류하여 受精卵를 회수하였다.

2. 間接免疫螢光測定法

桑實胚와 胚盤胞期의 생쥐 受精卵의 性判別을 위하여 間接免疫螢光測定法을 실시하였다(Fig. 1).

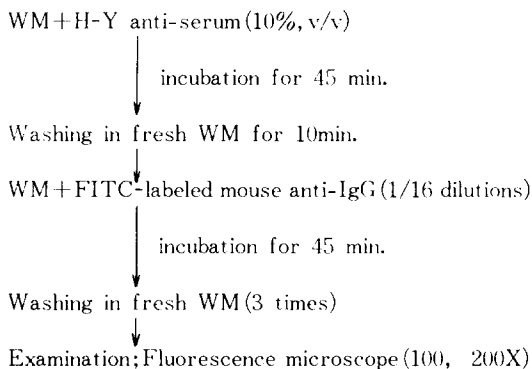


Fig. 1. Procedures of immunofluorescent detection of H-Y antigen in mouse embryo

BSA가 첨가되지 않은 修正 Whitten 배양액에 H-Y 抗血清(10%)을 혼합하여 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂ in air)내에서 2시간이상 평형을 실시한 후 준비된 受精卵를 45분간 배양시킨후 BSA가 첨가된 신선한 m-WM에 3회이상 세척하여 37°C에서 10분간 정치시킨다. m-WM(free BSA)에 FITC anti-mouse IgG(bio-yeda, Israel)를 1/16로 희석시켜 상기 방법과 같이 평형을 실시한 小滴培養液으로 옮겨 45분간 배양시킨후 BSA가 첨가된 신선한 배양액으로 3회 세척하였다. 그후 형광현미경(Vickers M₁₇, England)하에서 100-200X로 螢光의 유무를 檢査하여 雌雄을 判別하였다.

III. 結果 및 考察

1. 間接螢光抗體 처리후 受精卵의 培養

생쥐 桑實胚와 胚盤胞期 受精卵를 H-Y 抗血清과 FITC anti-mouse IgG에서 배양후 螢光標識의 有無에 따라 螢光標識卵과 非螢光標識卵으로 구분하여 性を 判別한 결과는 Table 1과 같다. (Fig. 2)

Table 1에서 나타난 바와 같이 회수된 267개의 수정란을 間接免疫螢光法으로 처리하여 螢光標識卵 139개, 非螢光標識卵 128개로 판명되어 雌雄의 比

Table 1. Fluorescent detection of rat H-Y antiserum and FITC anti-mouse IgG on mouse embryo

Stage of embryos	No. of embryos	No. of embryos	
		Fluorescenced	Non-fluorescenced
Morula	25	12	13
"	28	13	15
"	2	1	1
"	49	21	28
Sub-total	104	47 (45.2)	57 (54.8)
Blastocyst	23	11	12
"	31	11	20
"	14	14	0
"	15	7	8
"	26	21	5
"	54	28	26
Sub-total	163	92 (56.4)	71 (43.6)
Total	267	139 (52.1)	128 (47.9)

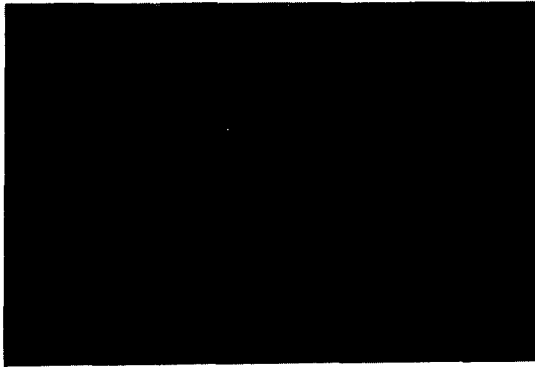


Fig. 2. Classification of fluorescing and non-fluorescing embryos by indirect immunofluorescence assay

는 47.9 : 52.9으로서 약 1 : 1의 결과를 얻었다.

한편 發育段階別 성적에서는 桑實胚期受精卵 104개 중 螢光標識卵 47개 (45.2%) 非螢光標識卵 57개 (54.8%)였으며 胚盤胞期受精卵 163個 중 螢光標識卵 92개 (56.4%), 非螢光標識卵 71개 (43.6%)로서 受精卵의 發育段階에 따른 性比에 대한 차이는 인정되지 않았다. 이와 같은 성적은 White 등 (1983)이 桑實胚와 胚盤胞期 생취受精卵 305개를 間接免疫螢光法으로 처리하여 螢光標識卵 169개 (55%)와 非螢光標識卵 136개 (45%)로 분리되어 약 1 : 1의 성적을 얻은 것과 대체로 일치하였다.

H-Y 抗血清과 FITC anti-mouse IgG에서 일정시간 생취受精卵을 培養하여 螢光標識卵과 非螢光標識卵으로 구분한 다음 體外배양에 따른 受精卵의 生存性을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

桑實胚期 受精卵 104개 중 螢光標識卵 47개 (45.2

Table 2. Viability of mouse embryos *in vitro* culture containing the rat H-Y anti-serum and FITC anti-mouse IgG

Classification	Embryo stage	No. of treated embryos (%)	No. of developed embryos (%)
No. of fluorescenced embryos	Morula	47 (45.2)	42 (89.4)
No. of non-fluorescenced embryos	Morula	57 (54.8)	49 (86.0)
Total		104	91 (87.5)

%), 非螢光標識卵 57개 (58.4%)가 性이 判別되어 性比는 約 1 : 1로 나타났다. 螢光標識受精卵 47개 중 42개가 일정기간동안 體外培養하여 初期胚盤胞期和 hatching 상태까지 발육되어 體外培養率 89.4%였고 非螢光標識受精卵 57개 중 49개가 胚盤胞期로 정상발육되어 86.0%의 성적을 얻었다.

2. 間接螢光抗體 처리후 受精卵의 染色體 分析

間接螢光抗體 처리후 螢光標識卵과 非螢光標識卵으로 구분, 染色體 分析하여 性을 判別한 결과를 Table 3, 4에 요약하였다.

胚盤胞期 受精卵 163개 중 92개가 螢光標識卵, 71개가 非螢光標識卵으로 구분되어 雄性 (56.4%) 과 雌性 (43.6%) 간의 性比에는 유의성이 인정되지 않았다.

螢光標識수정란 중 92개를 염색체 分析한 결과 58개가 性이 判別되어 63.0%의 性判別성적을 얻었으

Table 3. Sex ratio of fluorescing mouse embryo by chromosomal analysis

Exp. No.	No. of embryos treated			No. of sexed embryos	Positive	
	Total	Positive	Negative		Male (%)	Female (%)
1	23	11	12	4	4	0
2	31	11	20	6	5	1
3	14	14	0	12	9	3
4	15	7	8	5	4	1
5	26	21	5	16	11	5
6	54	28	26	15	12	3
Total (%)	163	92 (56.4)	71 (43.6)	58 (63.0)	45 (77.6)	13 (22.4)

Table 4. Sex ratio of non-fluorescing mouse embryo by chromosomal analysis

Exp. No.	No. of embryos treated			No. of sexed embryos	Negative	
	Total	Positive	Negative		Male (%)	Female (%)
1	23	11	12	3	0	3
2	31	11	20	11	3	8
3	14	11	0			
4	15	7	8	6	1	5
5	26	21	5	5	1	4
6	54	28	26	19	5	14
Total (%)	163	92 (56.4)	71 (43.6)	41 (62.0)	10 (22.7)	34 (77.3)

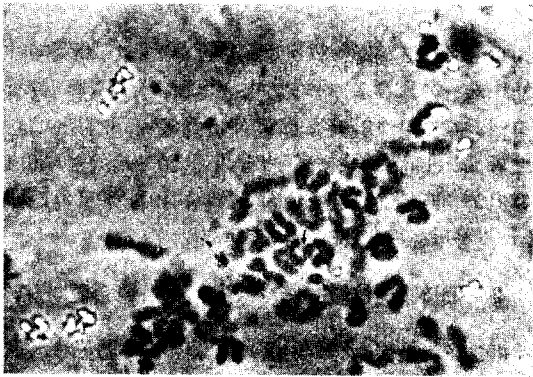


Fig. 3. The metaphase plate of mouse blastocyst classified as positive in the immunofluorescence assay. Presence of the small chromosomes (arrows) are male (XY)

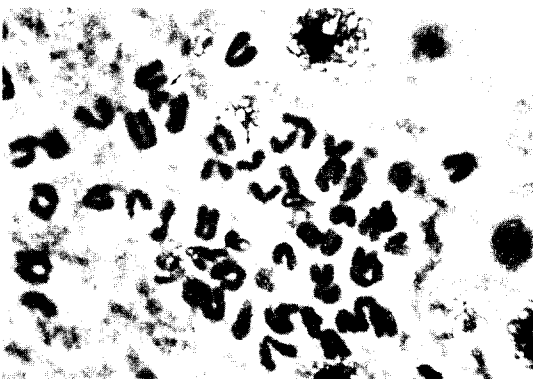


Fig. 4. The metaphase plate of mouse blastocyst classified as negative in the immunofluorescence assay. Presence of two small chromosomes (arrows) indicate female (XX)

며 이중 45개 (77.6%)가 雄性 (Fig. 3), 13개 (22.4%)가 雌性으로 判別되어 間接螢光抗體 처리후 螢光標識 수정란 중에는 雄性보다 유의하게 많았다.

非螢光標識 수정란 (71개) 중 44개 (62.0%)가 性이 判別되었으며 27개 (38.0%)는 性이 判別되지 않았다. 性判別된 44개의 수정란 중 10개 (22.7%)가 雌性, 34개 (77.3%)가 雌性 (Fig. 4)으로 判別되어 雌雄性比는 77.3 : 22.7로서 非螢光標識卵으로 判別된 受精卵에서는 雌性受精卵의 출현빈도가 유의하게 증가되었다. 이와 같은 성적은 White 등 (1983)이 螢光標識受精卵 156개를 위임신 생쥐에 移植하여 18마리 (78.0%)의 雄性和 5마리 (22%)의 雌性産仔를 얻었으며 非螢光標識 受精卵 98개를 移植하여 雄性 4마리 (17%), 雌性 19마리 (87%)의 출산성적을 얻어 螢光標識卵에서는 雄性, 非螢光標識卵에서는 雌性이 유의할 정도 ($P < 0.001$)로 많이 생산되었다는 보고와 일치하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 間接免疫螢光法은 哺乳動物에서 初期胚의 性判別에 이용 가능하고, 특히 상기 방법은 雌性受精卵 뿐만 아니라 雄性受精卵의 선별도 가능하며 受精卵의 보존성에도 유해한 영향을 미치지 않은 것으로 생각된다. 또한 H-Y 항혈청과 補體가 함유된 배양액에서 性의 判別이 어려운 胚盤胞期受精卵의 性判別이 용이하게 이루어질 수 있다고 생각된다.

IV. 摘要

Mouse 初期胚의 性比를 조사하기 위하여 桑實胚와 胚盤胞期受精卵을 間接免疫螢光法으로 처리한 후 螢光標識卵과 非螢光標識卵으로 구분하여 體外

培養에 따른 受精卵의 生存性과 染色體分析法으로 性을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 桑實胚와 胚盤胞期 수정란 276개를 H-Y抗血清과 FITC anti-mouse IgG로 標識시켜 배양한(間接免疫螢光測定) 결과 螢光標識卵(雄性)이 139개(52.1%), 非螢光標識卵(雌性)이 128개(47.9%)의 성적을 나타내 約 1:1의 性比를 보였다.

2. 間接免疫螢光測定法에 의한 수정란(267개)의 發育段階別 性比를 조사한 결과 桑實胚期에서 螢光標識卵 45.2%(47/104), 非螢光標識卵 54.8%(57/104)였으며 胚盤胞期에서는 螢光標識卵 56.4%(92/163), 非螢光標識卵 43.6%(71/163)로서 發育段階間에 차이가 인정되지 않았다.

3. 桑實胚期受精卵 104개를 間接免疫螢光測定法에 따라 처리한 결과 螢光標識卵 47개(45.2%)와 非螢光標識卵 57개(54.8%)의 성적을 얻었다. 한편 間接免疫螢光처리후 螢光標識卵(47개)과 非螢光標識卵(57개)으로 判別된 受精卵를 채워 배양하여 胚盤胞期까지의 정상 발육율은 螢光標識卵이 89.4%(42/47), 非螢光標識卵이 86.0%(49/57)로서 受精卵의 생존성에는 유해한 영향을 미치지 못하였다.

4. 胚盤胞期受精卵 163개중 92개(56.4%)가 螢光標識卵, 71개(43.6%)가 非螢光標識卵이었으며 性染色體의 核型을 分析한 결과 螢光標識 수정란 92개중 58개가 성이 판별되어 성판별율은 63.0%였으며 그중 45개(77.6%)가 雄性, 13개(22.4%)가 雌性으로 判別되었다. 한편 非螢光標識 수정란 71개중 44개(62.0%)가 性이 判別되었으며 性이 判別된 受精卵중 雄性 10개(22.7%), 雌性 34개(77.3%)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. Krco, C.J. and E.H. Goldberg. 1976. H-Y (male) antigen; Detection on eight-cell mouse embryos. *Science*. 193:1134-1135.
3. 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.* 234-235.
4. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*. 21:18-28.
5. 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.
6. White, K.L., G.M. Lindner, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1982. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology*. 18:655-662.
7. White, K.L., G.M. Lindner, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*. 19:701-705.