

**Y 염색체 특이성 DNA 분리와 단일 H-Y 항체 개발에
의한 토끼의 수정란 성 감별에 관한 연구**
I. 정소를 항원으로 한 H-Y 항혈청에 의한 토끼 수정란의 성 판별

박영일 · 임경순 · 한재용 · 남경우 · 황규춘 · 박화춘
서울대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

**Studies on Isolation of Y-specific DNA Marker and Development of
Monoclonal H-Y Antibody for Embryo Sexing in Rabbit**
**I. Sexing of Rabbit Morula by H-Y Antiserum from Female Rat
Immunized by Rat Newborn Testis Cell as An Antigen**

Park, Y. I., K. S. Im, J. Y. Han, K. W. Nam, K. C. Hwang and H. C. Park

Department of Animal Science and Technology,
College of Agriculture and Life Science,
Seoul National University, Suweon, 441-744, Korea.

SUMMARY

This study was carried out to determine effectively the sex of rabbit embryos using H-Y antiserum. H-Y antiserum was obtained from inbred SD strain female rat which was immunized by injection of testis cell of inbred SD strain male rat into its spleen. The titer of antiserum was identified by sperm cytotoxicity test and culture of rabbit embryos with antiserum. The developed or undeveloped embryos were separated by exposure the embryos to the antiserum with H-Y antibody. Developed embryo were transferred to the recipients and sex of offsprings were examined.

1. In the sperm cytotoxicity test, the rate of dead sperm showed no difference between two antisera from spleen and testis cell as antigens. It is confirmed that H-Y antibody in antiserum was absorbed by H-Y antigen in male rat spleen cells.
2. When rabbit morulae were exposed to antiserum and complement, the rate of embryos developed or arrested was 51 and 49% respectively and the rate was closely same as natural sex ratio of 50:50%.
3. When rabbit morulae were cultured for 12h in the medium containing antiserum produced by antigen of testis cell, the rate of embryos developed or arrested was 48 and 52% respectively and the rate was closely same as natural sex ratio of 50:50%.
4. Eighty rabbit embryos which were not affected by H-Y antiserum were transferred to four recipients. Two recipients were pregnant and born 13 pups among which 2 (14%) were male and 11 (86%) were female.

이 논문은 1993년 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

In conclusion, existence of H-Y antibody in the serum from female rat immunized by injecting testis cell from newborn male rat to the spleen of the female rat was confirmed. When rabbit morulae were exposed to H-Y antiserum and complement, about a half of embryos were developed to blastocysts. When the rabbit embryos not affected by H-Y antiserum were transferred, the rate of female offsprings was 86%. Therefore, it was identified that most of embryos which were not affected by H-Y antiserum were female.

I. 서론

가족에서 원하는 성의 신생자를 생산하고자 하는 인간의 염원은 오래 전부터 큰 관심사였다. 성숙의 표현형성은 태아의 성선이 정소 또는 난소로 분화하느냐에 따라 결정된다. XY 또는 XX 성염색체를 가지는 개체는 수컷으로, XX 또는 XO 성염색체를 가지는 개체는 암컷으로 발달하기 때문에 정소로 분화하기 위하여는 Y 염색체의 존재가 필요하다. 오래 전부터 정자의 물리적 특성의 차이를 이용하여 X-정자와 Y-정자의 분리를 시도하였으나 (Gledhill, 1988; Amann, 1989) 뚜렷한 성과를 거두지 못하였다.

체외에서 수정란을 성공적으로 다룰 수 있게 됨에 따라 착상전 수정란의 성을 판별하여 이식하는 연구가 활발히 수행되었다. Eichwald 등 (1958)은 근교계통 생쥐의 피부이식 실험에서 음성에만 존재하는 조직적합성-Y 항원 (Histocompatibility-Y antigen; H-Y antigen)을 발견하였고 그 후 Wachtel 등 (1975)은 포유동물의 음성 수정란의 세포막에는 H-Y 항체에 대한 특이적으로 반응하는 항원이 존재한다고 보고하였다.

Kroc와 Goldberg (1976)는 8-16 세포기 생쥐 수정란을 H-Y 항체와 보체로 처리하였을 때 약 반수의 수정란이 발달을 중지하거나 파괴된다는 사실을 확인하였다. Epstein 등 (1980)은 동일한 방법으로 처리한 후 세포 용해현상을 보이지 않은 생쥐 수정란을 염색체 분석한 결과 92%가 XX형이었다고 보고하였다. White 등 (1982), White 등 (1983) 및 Utsumi 등 (1983)은 생쥐 수정란을 H-Y항혈청으로 처리하였을 때 영향을 받지 않은 수정란은 자성이었다고 보고하였다.

H-Y 항원으로 White 등 (1987a)은 생쥐의 음성 비장세포를 Wachtel 등 (1980)은 정소조직을 사용하

였다. 본 연구에서는 흰쥐의 음성 비장세포와 정소조직을 항원으로 제조한 H-Y항혈청이 토끼 상실배의 성 판별에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

7~8주령 근교 SD계 흰쥐가 H-Y 항혈청 생산을 위하여 사용되었다. 5~6개월령 뉴질랜드 화이트종과 칼리포니아종 토끼가 수정란의 생산을 위하여 사용되었다.

2. 배양액

0.2% (v/v) BSA (bovine serum albumin)을 첨가한 PBS (phosphate buffered saline; pH 7.2~7.4, 삼투압 270~285 mOsm/kg)가 난자 세척에 사용되었고 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum)을 첨가한 Ham's F10 (pH 7.5, 삼투압 280~285 mOsm/kg)이 난자의 배양에 사용되었다. 배양액은 사용하기전 0.22 μ m 여과기로 여과하였다.

3. 다배란 처리 및 수정란의 회수

다배란 처리를 위해 FSH (follicle stimulating hormone, Sigma, 미국)을 12시간 간격으로 3일간 총 3.7 mg을 토끼에 피하주사하고 마지막 FSH 주사 후 12시간에 HCG 200IU를 근육주사하였다. HCG 주사후 동일 품종의 음성토끼와 2회 자연교미를 실시하였다. HCG 주사후 62~65 시간에 난관을 관류하여 상실배를 회수하였다. 형태적으로 정상인 난자만을 사용하였다.

4. H-Y 항혈청의 제조

비장과 정소를 항원으로 한 H-Y 항혈청 제조의 개요는 Fig. 1과 같다.

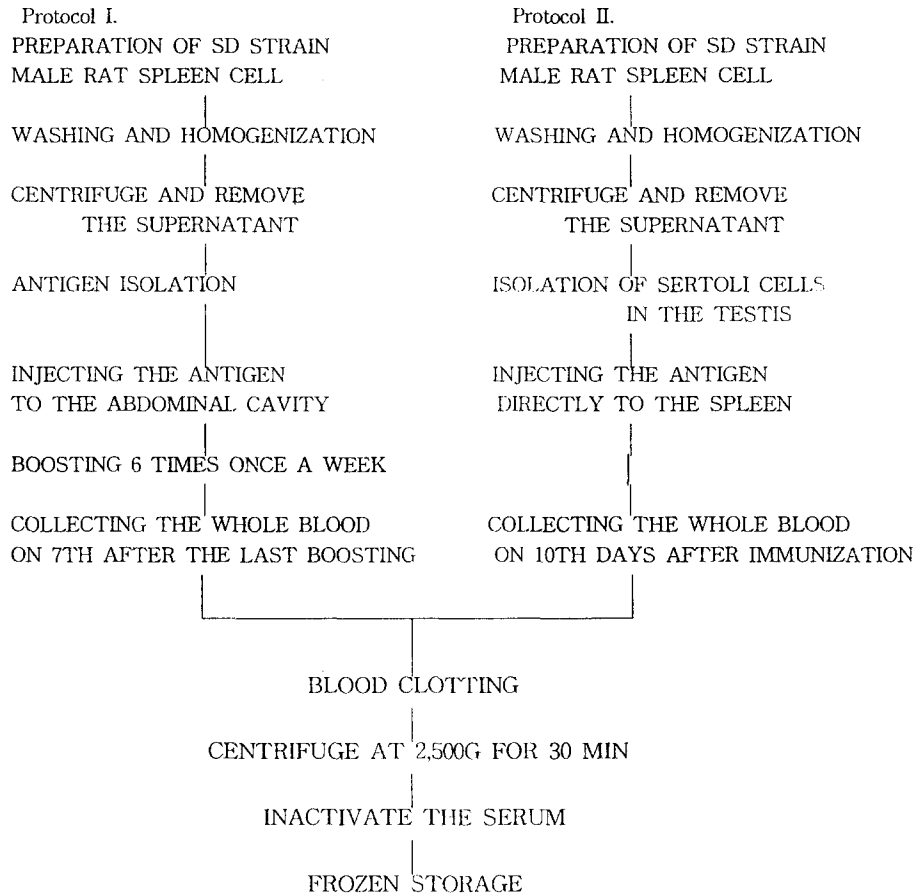


Fig. 1. H-Y antiserum preparation.

1) 비장을 항원으로 한 H-Y 항혈청 제조 (Protocol I)

웅성흰쥐의 비장을 적출하여 PBS로 3회 세척한 후 균질기로 균질화 하였다.

결체조직을 제거하기 위하여 균질화한 비장을 500 g에 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고 이를 2,500 g에 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 침전물을 PBS로 부유시킨 후 혈구계산기로 세포수를 세어 세포수가 ml당 10^8 개가 되도록 조정하였다. 조정된 항원과 동량의 FIA(Freund's incomplete adjuvant, Gibco, 미국) 혼합물을 동종 자성 흰쥐의 복강내 주사하여 priming한 후 1주 간격으로 5주간 항원만을

복강내 주사하여 boosting을 실시하였다. 마지막 boosting 주사 후 7일째, 심장에서 채혈하고 응고를 기다려 4℃에서 2,500g, 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 이 혈청을 56℃에 30분 가열하여 비활성화시킨 후 사용할 때까지 냉동고(-20℃)에 보관하였다.

2) 정소를 항원으로 한 H-Y 항혈청 제조 (Protocol II)

출생후 72시간 이내의 SD계 흰쥐 신생자에서 분리한 정소를 PBS로 3회 세척후 1 ml 용량의 균질기로 균질화하였다. 균질화된 정소조직을 500 g에 5분간 원심분리하여 상층액을 취하여 항원으로 하였다. 이 항원을 자성 흰쥐의 비장에 직접 주입하여 면역화 시켰

다. 면역후 10일에 채혈하고 이 혈액을 37°C에서 1시간 응고시킨 후 혈병을 제거하고 4°C에서 24시간 정지시킨 후 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 이 혈청을 56°C에서 30분간 가열하여 비활성화 시킨 후 사용할 때까지 냉동고(-20°C)에서 보관하였다.

5. H-Y 항체생성의 확인

1) 정자 세포독성 시험

ICR계 웅성생쥐의 정소상체를 적출하여 배양액내에서 가위로 여러번 자른 다음 5분 후 상층액을 취하여 ml당 정자수가 5×10^6 되도록 조정하였다. 이어 H-Y 항혈청 (50 μ l), 정자부유액 (50 μ l) 및 보체 (Guinea Pig Serum, 50 μ l)를 혼합하여 37°C에서 45분 배양하였다. 이어 0.4% trypan blue 용액 (Sigma, 미국) 100 μ l 첨가한 후 혈구계산기로 정자 사멸율을 측정하였다.

2) 흡수시험

H-Y 항혈청을 자성 또는 웅성 비장세포 (1×10^8 /ml)와 4:1로 희석하여 4°C에서 30분간 흡수시킨 후 원심분리하여 비장세포를 제거하고 상층액에 대하여 위와 동일한 방법으로 정자 세포독성 시험을 실시하였다.

6. 수정란에 대한 H-Y 항체의 처리

항혈청 10% (v/v)를 포함한 Ham's F10 배양액에서 토끼의 상실배를 12시간 배양후 실체현미경하에서 난자의 형태학적 특성을 관찰하여 포배강의 형성 유무에 따라 발생이 진행된 것 (H-Y negative)과 발생이 지연된 것 (H-Y positive)으로 구분하였다. 배양은 99% 습도, 5% CO₂, 95% 공기, 37°C 조건의 CO₂ 배양기 (Ibec, 영국)에서 실시하였다.

7. 수정란의 이식

건강 상태가 양호한 수란토를 선발하여 PMSG 200 IU를 근육주사하고 3일 후에 HCG 75 IU를 귀정맥에 주사하고 유리봉으로 질을 자극하여 배란을 유도하였다. 질 자극후 48시간에 수란토를 개복 절개하여 난관을 노출하고 수정란을 이식하였다. 태어난 산자의 성

을 조사하였다.

III. 결 과

근교 SD계 웅성 흰쥐의 비장세포와 신생자 정자세포를 항원으로 면역한 동계 자성 흰쥐에서 얻은 항혈청내 H-Y 항체의 존재를 정자세포 독성시험으로 검사한 결과는 Table 1과 같다. 항원이 비장세포인 경우 정자의 사멸율은 대조구 5%, NRS 20%로 매우 낮았으나 AS는 68~93%로 현저하게 높았다. 항원이 정자세포인 경우도 정자의 사멸율은 대조구 5%, NRS 22%로 매우 낮았으나 AS는 66~92%로 현저하게 높았다. 정자의 사멸율은 대조구, NRS 및 AS 모두 두 항원 비장세포와 정자세포간에 현저한 차이가 없었다.

비장세포와 정자세포를 항원으로 하여 얻은 H-Y 항혈청을 웅성과 자성의 비장세포로 흡수시킨 후 이들 항혈청을 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 및 1/64로 희석하여 정자세포 독성검사를 실시한 결과는 Table 2와 같다. 비장세포를 항원으로 얻은 항혈청의 경우 1/2 희석에서 정자의 사멸율은 비흡수 (unabsorption)와 F-spleen 흡수가 각각 83과 78%로 현저히 높았으나 M-spleen 흡수와 NRS는 25와 20%로 현저히 낮았다. 정자세포를 항원으로 얻은 항혈청의 경우도 마찬가지로 1/2 희석에서 정자의 사멸율은 비흡수 (unabsorption)와 F-spleen 흡수가 각각 88과 82%로 현저히 높았으나 M-spleen 흡수와 NRS는 각각 24와 25%로 현저히 낮았다. 즉 비장세포와 정자세포를 항원으로 얻은 혈청 모두 M-spleen으로 흡수시킨 경우 정자의 사멸율이 현저히 낮았다. 희석에 따른 H-Y 항혈청의 정자의 사멸율은 비장세포를 항원으로 얻은 H-Y 항혈청의 경우 1/8 희석까지는 비흡수 (unabsorption)에서 83~70%, F-spleen 흡수에서

Table 1. Percentage of dead sperm by cytotoxicity test

Antigen	Control	NRS	AS				
			1	2	3	4	5
Spleen	5	20	89	68	72	91	93
Testis	5	20	74	68	88	66	92

AS : antiserum

NRS : normal rat serum

Table 2. Percentage of dead sperm by absorption test

Antigen	Treatment	Dilution rate of H-Y antiserum					
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Spleen	Unabsorption	83	77	70	52	44	25
	F-Spleen	78	76	68	50	38	22
	M-Spleen	25	24	24	18	16	16
	NRS	20	23	18	18	13	12
Testis	Unabsorption	88	78	70	65	40	25
	F-Spleen	82	80	72	60	38	22
	M-Spleen	24	24	20	22	16	15
	NRS	25	22	22	20	17	13

F-Spleen : absorption to female spleen cell

M-Spleen : absorption to male spleen cell

78~68%로 서서히 떨어졌으나 1/16~1/64 희석에서는 비흡수 (unabsorption)에서 52~25%, F-spleen 흡수에서 50~22%로 급격히 감소하였다. 또한 희석에 따른 H-Y 항혈청의 정자의 사멸율은 정자세포를 항원으로 얻은 H-Y 항혈청의 경우에도 1/8 희석까지는 비흡수 (unabsorption)에서 88~70%, F-spleen 흡수에서 82~72%로 서서히 떨어졌으나, 1/16~1/64 희석에서는 비흡수 (unabsorption)에서 65~25%, F-spleen 흡수에서 60~22%로 급격히

감소하였다.

비장세포와 신생자 정자세포를 항원으로 SD계 자성 흰쥐를 면역시켰을 때 H-Y 항체를 갖는 혈청을 생산하는 자성 흰쥐의 비율은 Table 3과 같다. H-Y 항체를 갖는 혈청을 생산하는 자성 흰쥐의 비율은 비장세포를 항원으로 한 경우가 53%, 신생자 정자세포를 항원으로 한 경우가 65%로 신생자 정자세포를 항원으로 한 경우가 비장세포를 항원으로 한 경우보다 약간 높았다.

Table 3. Effect of antigens on rate of female rat with H-Y antibody in the sera

Source of antigen	No. of immunized rat	No. of rat with H-Y antibody
Spleen cell	15	8 (53)
Newborn testis	17	11 (65)

() : percentage

토끼의 상실배를 H-Y 항혈청 (AS)과 보체 10% (v/v)를 첨가한 Ham's F10 배양액에 부유하여 24~48시간 배양했을 때 발달이 지연된 난자의 비율과 발달이 지연된 난자의 비율은 Table 4와 같다. Ham's F10만으로 토끼의 상실배를 배양했을 때 발달된 난자와 지연된 난자의 비율은 각각 93과 7%로 발달된 난자의 비율이 현저히 높았다. 한편 NRS, GPC 또는 NRS와 GPC를 각각 첨가한 Ham's F10으로 토끼 상

Table 4. Effects of H-Y antiserum(AS) on development of rabbit morula

Treatment	No. of embryo		
	Cultured	Developed	Delayed
Ham's F10	30	28 (93)	2 (7)
Ham's F10+NRS	30	27 (90)	3 (10)
Ham's F10+GPC	30	27 (90)	3 (10)
Ham's F10+NRS+GPC	30	22 (73)	8 (27)
Ham's F10+AS+GPC	157	80 (51)	77 (49)

() : percentage

실배를 배양했을 때 발달된 난자와 지연된 난자의 비율은 각각 90과 10%, 90과 10% 또는 73과 27%로 발달된 난자의 비율이 지연된 난자의 비율보다 현저히 높았다. 그러나 AS와 GPC를 첨가한 Ham's F10으로 토끼 난자를 배양했을 때 발달된 난자와 지연된 난자의 비율은 51과 49%로 양자간에 차이가 없었다.

비장세포와 신생자 정자세포를 항원으로 얻은 항혈청만을 첨가한 Ham's F10으로 토끼 상실배를 부유하여 12시간 배양했을 때 발달된 난자와 지연된 난자의 비율은 Table 5와 같다. 비장세포를 항원으로 얻은 혈청의 경우 혈청 무첨가 (-)에서는 발달된 난자와 지연된 난자의 비율이 92와 8%로 발달된 난자의 비율이 지연된 난자의 비율보다 현저하게 높았으나 혈청 첨가 (+)에서는 발달된 난자와 지연된 난자의 비율이 47과 53%로 양자간에 차이가 없었다. 마찬가지로 신생자 정자세포를 항원으로 얻은 혈청의 경우도 혈청 무첨가 (-)에서는 발달된 난자와 지연된 난자의 비율이 95와 5%로 발달된 난자의 비율이 지연된 난자의 비율보다 현저히 높았으나 혈청 첨가 (+)에서는 발달된 난자와 지연된 난자의 비율이 48과 52%로 양자간에 차이가 없었다.

H-Y 항혈청을 첨가한 Ham's F10에서 토끼의 상실배를 배양하여 H-Y 항체에 반응하지 않은 (H-Y negative) 즉 발달할 수정란을 수란토에 이식하여 산자의 성을 판별한 결과는 Table 6과 같다. 대조구의 경우

수란토 2두에 39개의 난자를 이식하였는데 1두가 임신하여 7두의 산자가 태어났으며 암수의 비율은 43과 57%로 자연성비에 가까웠으나 H-Y 항체에 반응하지 않은 난자의 경우는 수란토 4두에 80개의 난자를 이식하였는데 2두가 임신하여 13두의 산자가 태어났으며 암수의 비율은 86과 14%로 암산자의 비율이 훨씬 높았다.

IV. 고 찰

여러 종의 웅성의 착상전 수정란에서 H-Y 항원의 존재가 시사되었으며 이는 수정란을 H-Y 항체반응으로 성 판별하는 기초가 되고 있다. 본 연구는 H-Y 항혈청을 생산하는 효율적 방법을 개발하고 H-Y 항혈청 중에 H-Y 항체의 존재를 정확하게 확인하며 이 H-Y 항혈청으로 토끼 수정란의 성을 판별하기 위하여 실시하였다. 비장세포 또는 신생자의 정자세포를 항원으로 면역시킨 근교 SD계 자성 흰쥐에서 얻은 혈청 중의 H-Y 항체의 존재를 정자세포 독성시험과 난자의 배양 시험으로 확인하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 비장세포와 정자세포를 항원으로 얻은 두 혈청 모두 68~93%와 66~92%의 높은 정자의 사멸율을 보여주어 혈청 중에 H-Y 항체가 존재함을 확인할 수 있었다.

Dooher와 Bennett (1971), White 등 (1982, 1987a), Iyer 등 (1989) 및 정 등 (1989a)도 정자세포

Table 5. Effects of H-Y antisera by spleen or newborn testis on development of rabbit morula

Source of antigen	AS	Cultured	No. of embryo	
			Developed	Delayed
Spleen cell	-	60	55 (92)	5 (8)
	+	60	28 (47)	22 (53)
Newborn testis	-	60	57 (95)	3 (5)
	+	60	29 (48)	31 (52)

() : percentage

Table 6. Embryo transfer and sex of the offsprings

Embryo	No. of embryo transferred	No. of recipient	No. of pregnant recipient	Sex of pups	
				Male	Female
Control	39	2	1 (50)	4 (57)	3 (43)
H-Y negative	80	4	2 (50)	2 (14)	11 (86)

() : percentage

포 독성시험에 의하여 항혈청 중의 H-Y 항체의 존재를 확인하였다. Table 2는 항혈청 중에 존재하는 H-Y 항체가 음성 비장세포 중에 존재하는 H-Y 항원과 결합하여 소실되는지를 확인한 실험이다. 비장세포나 정자세포를 항원으로 얻은 두 혈청 모두 정자의 사멸율은 비흡수와 F.spleen 흡수에서는 높았으나 M.spleen 흡수에서는 낮았다. 이는 두 혈청 중에 존재하는 H-Y 항체가 음성 비장세포 표면에 존재하는 H-Y 항원과 결합하여 소실되었으며 비흡수 또는 자성 비장세포흡수의 혈청에는 H-Y 항체가 그대로 존재한다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 Goldberg 등 (1971)이 근교계 C57BL/6 생쥐에서 제조된 H-Y 항혈청을 음성 비장세포로 흡수시켰을 때 정자의 사멸율이 20% 이하로 매우 낮았다는 보고와 일치한다.

Table 3에서 H-Y 항체를 갖는 혈청을 생산하는 근교 SD계 자성 흰쥐의 비율은 신생자와 정자세포를 항원으로 한 경우가 65%로 비장세포를 항원으로 한 경우의 53%보다 약간 높았다. Koo (1981)는 생쥐를 H-Y 항원으로 면역시켰을 때 30%의 개체에서 H-Y 항체를 갖는 혈청을 생산하였다고 보고하였고, Bradley와 Heslop (1984)는 Balb/c 계통의 생쥐를 사용하였을 때 27%의 개체에서 H-Y 항체를 갖는 혈청을 얻었다고 보고하였다. 이 (1991)는 흰쥐의 비장세포를 항원으로 얻은 혈청중 H-Y 항체를 갖는 개체의 비율이 21.4%였다고 보고하였다. 이상의 보고에서 H-Y 항체를 갖는 혈청을 생산하는 개체의 비율은 본 연구의 53%와 65%보다 약간 낮다. 그러나 정 등 (1991)은 Winster 흰쥐를 사용하여 얻은 혈청 중 H-Y 항체를 갖는 개체의 비율이 80% 였다고 보고하여 연구자간에 상당한 변이를 보이고 있다.

Table 4는 토끼의 상실배를 H-Y 항혈청과 보체를 첨가한 Ham's F10에서 배양했을 때 난자의 발달을 관찰한 실험이다. NRS, GPC 또는 NRS와 GPC를 첨가한 Ham's F10에서 토끼의 상실배를 배양했을 때는 발달된 난자의 비율이 73~93%로 높았으나 AS와 GPC를 첨가한 Ham's F10에서 토끼의 상실배를 배양했을 때는 발달된 난자와 지연된 난자의 비율이 51과 49%로 자연성비 50 : 50을 보여주었다. 정 등 (1989b)은 H-Y 항혈청과 보체의 존재하에서 생쥐 수정란을 배양하였을 때 47~57%의 수정란이 파괴되었다고 보고하였다. Ladd 등 (1983)도 H-Y 항혈청의

존재에서 ICR계 16-세포기 생쥐 수정란을 배양하였을 때 자성과 음성의 수정란이 47과 53%였다고 보고하였다. Utsumi 등 (1991)은 DA계통의 흰쥐 비장세포를 항원으로 하여 제조된 H-Y 항혈청을 포함한 배양액에서 흰쥐의 상실배를 배양하였을 때 상실배중 57%가 파괴되었다고 보고하였다. 본 연구에서 H-Y 항혈청과 보체의 존재 하에서 발달한 수정란은 H-Y 항체에 영향을 받지 않은 자성수정란으로, 발달이 지연된 수정란은 H-Y 항체에 영향을 받은 음성 수정란으로 시사된다.

Table 5에서 보여주는 바와 같이 비장세포나 신생자 정자세포를 항원으로 얻은 항혈청의 존재 하에서 토끼 상실배를 배양했을 때 발달된 난자와 지연된 난자의 비율은 비장세포 항원에서 47과 53%, 신생자 정자세포 항원에서 48과 52%로 모두 자연성비 50:50에 근접하였다. 따라서 토끼의 상실배를 성관별하는데는 비장세포와 신생자 정자세포를 항원으로 한 어느 항혈청도 유용하게 사용할 수 있음이 확인되었다.

정자세포를 항원으로 사용하면 흰쥐의 신생자중 번식에 사용하지 않는 음성 신생자를 사용할 수 있으며 따라서 비장을 얻기 위하여 성숙한 음성 흰쥐를 확보하는 노력을 줄일 수 있으며 항원을 자성 비장에 1회 주입하여 면역이 가능하므로 면역방법이 간편하다. Table 6에서 보여주는 바와 같이 신생자의 정자세포를 항원으로 얻은 H-Y 항혈청을 첨가한 Ham's F10에 토끼 상실배를 배양하여 H-Y 항체에 반응하지 않는 (H-Y negative) 즉 발달한 수정란을 수란토에 이식하였을 때 암수의 성비는 86:14%로 암자토의 비율이 훨씬 높아 H-Y 항체에 반응하지 않은 수정란은 대부분이 암수정란임이 판명되었다. 이 (1991)는 토끼 상실배를 H-Y 항혈청으로 처리하고 간접면역형광법으로 관찰하여 H-Y 항체에 반응하지 않는 즉 형광을 발하지 않는 수정란을 수란토에 이식하였을 때 산자의 85.7%가 암자토였다고 발표하였다. 본 시험의 결과는 H-Y 항체를 이용하여 포유동물 수정란의 성을 판별할 수 있었다는 White 등 (1983, 1987b), 고 등 (1989) 및 정 등 (1989b)의 보고와 일치한다.

본 연구 결과 신생자의 정자세포를 항원으로 얻은 혈청중 65%는 H-Y 항체를 소유하며 이 H-Y 항혈청을 첨가한 배양액으로 토끼의 상실배를 배양하였을 때 발생이 진행되는 수정란은 자성이고 발생이 지연되는

수정란은 음성임이 확인되었다.

V. 적 요

본 연구는 신생자 정소세포를 항원으로 한 H-Y 항혈청을 사용하여 토끼의 수정란을 효과적으로 성 판별하기 위하여 실시하였다. 근교 SD계의 음성신생자의 정소세포를 H-Y 항원을 동종의 자성의 비장에 주입하여 H-Y 항혈청을 제조하였다. 역가는 정자 독성시험과 토끼 수정란의 배양을 통하여 확인하였다. 항체의 형성이 확인된 항혈청을 사용하여 토끼 수정란의 자·웅을 분리하였으며 성 판별한 수정란을 이식하여 태어난 산자의 성을 조사하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 정자세포 독성시험에서 비장세포와 정자세포를 항원으로 제조한 두 항혈청의 정자사멸율 간에는 차이가 없었으며 혈청중 H-Y 항체는 음성 비장세포의 H-Y 항원과 결합하여 소실되는 것을 확인하였다.
2. 토끼의 상실배를 H-Y 항혈청과 보체에 노출하였을 때 발달한 수정란과 발달이 지연된 수정란의 비율은 51:49%로 약 50:50의 비율을 보였다.
3. 토끼의 상실배를 정소세포를 항원으로 제조한 H-Y 항혈청에서 12시간 배양하였을 때 배반포로 발달한 수정란과 상실배에서 발생이 지연된 수정란의 비율은 48:52%로 약 50:50의 비율을 보였다.
4. 정소세포를 항원으로 제조한 H-Y 항혈청으로 처리한 상실배에서 배반포로 발달한 수정란 80개를 4마리의 수란토에 이식하여 2마리가 임신되어 13마리의 자태가 태어났는데 이중 11마리 (86%)가 자성자태였다.

결론적으로 음성 흰쥐의 정소세포를 항원으로 암흰쥐의 비장에 주입하여 면역시켜 얻은 혈청 중에는 H-Y 항체가 존재하며 이 H-Y 항혈청에 토끼의 상실배를 노출시키면 약 50%가 배반포로 발달하며, 배반포로 발달한 수정란을 이식하면 86%가 암자태로 태어났다. 따라서 H-Y 항체에 노출하여 발달하는 수정란은 대부분이 자성임이 확인되었다.

VI. 인용문헌

1. Amann, R. P. 1989. Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology*, 31:49-60.
2. Bradely, M. P. and S. F. Heslop. 1984. An improved urease-ELISA protocol for the screening of monoclonal H-Y antibodies. *Proc. Univ. Otago. Med. Sch.*, 62:14-16.
3. Dooher, G. B. and D. Bennett. 1977. A simple technique for preparing easy to read, permanent cytotoxicity tests on mouse spermatozoon. *Transplantation*, 23:381-383.
4. Eichwald, E. J., C. R. Silmsler and I. Weissmann. 1958. Sex-linked rejection of normal and neoplastic tissue. I. Distribution and specificity. *J. Nat. Cancer Inst.*, 20:563-575.
5. Epstein, C. J., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens*, 15:63-68.
6. Gledhill, B. L. 1988. Selection and separation of X- and Y- chromosome bearing mammalian sperm. *Gamete Res.*, 20:377-395.
7. Goldberg, E. H., E. A. Boyse, D. Bennett, M. Scheid and E. A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y antigen on mouse sperm. *Nature*, 228:570-572.
8. Iyer, S. V., T. P. Nandedkar and U. C. Hedge. 1989. Production of H-Y antibody in the ascites fluid of mouse and localization of the antigen on cells and tissue. *Gamete Res.*, 22:37-49.
9. Koo, G. C. 1981. Serology of H-Y antigen. *Hum. Genet.*, 58:18-20.
10. Kroc, C. J. and E. H. Goldberg. 1976. Detection of H-Y (male) antigen on 8-cell mouse embryos. *Science*, 193:1134-1135.
11. Ladd, P. C., J. A. Hancock, B. K. Jones and D. A. Synder. 1983. Development of early mouse embryos in Ham's F10, BOMC-3 and

- PBS media. *Theriogenology*, 19:136.
12. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1983. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. Proc. 2nd Int. Cong. Reprod. Immun. Kyoto, Japan. J. Reprod. Immunol. Suppl., :59 (Abst.)
 13. Utsumi, K., E. Satoh and A. Iritani. 1991. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *J. Exp. Zoo.* 260:99-105.
 14. Wachtel, S. S., S. Ohno, G. C. Koo and E. A. Boyse. 1975. Possible role of H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257:235-236.
 15. Wachtel, S. S., J. L. Hall, U. M ller and R. S. K. Chagnati. 1980. Serum-born H Y antigen in the fetal bovine freematin. *Cell*, 21: 917-926.
 16. 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.
 17. White, K. L., G. M. 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.
 18. White, K. L., G. B. Anderson, P. J. Berger, R. H. BonDurant and R. L. Pashen. 1987a. Identificaiton of a male-specific histocompatibility protein on preimplantation porcine embryos. *Gamete Res.*, 17:107-113.
 19. White, K. L., G. B. Anderson, R. L. Pashen and R. H. BonDurant. 1987b. Detection of histocompatibility (H-Y) antigen: Identification of sex of preimplantation ovine embryo. *J. Reprod. Immunol.*, 10:27-32.
 20. 고광두, 양부근, 박연수, 김정익. 1989. 면역형광 측정법에 의한 우수수정란의 성판별. *한국가축번식학회지*, 13:113-120.
 21. 이창규. 1991. H-Y 항체에 의한 생쥐 및 토끼 수정란의 성조절에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문.
 22. 정장용, 박충생, 박희성. 1989a. Rat H-Y 항체에 의한 생쥐 수정란의 성조절에 관한 연구. I. H-Y 항체의 처리가 생쥐 수정란의 발달에 미치는 영향 및 세포독성시험. *한국축산학회지*, 31:491-496.
 23. 정장용, 박충생, 박희성. 1989b. 흰쥐 H-Y 항체에 의한 생쥐수정란의 성조절에 관한 연구. II. H-Y 항체의 처리가 생쥐수정란의 발달에 미치는 영향. *한국축산학회지*, 31(8):497-503.
 24. 정장용, 박희성, 박충생. 1991. 흰쥐 H-Y 항체에 의한 생쥐 분할란의 성조절에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 15(3):179-187.