

H-Y항체에 의한 토끼배의 성 감별과 이등분 절단 토끼배의 융합에 관한 연구

최화식 · 임경순* · 진동일**

김천전문대학 임상병리과

Studies on the Aggregation of H-Y Antibody-Sexed and Bisected Rabbit Embryo

Choi, H. S., K. S. Im* and D. I. Jin**

Department of Clinical Pathology, KimChun College

SUMMARY

These experiments were carried out to examine the development capacity of sexed and then bisected embryo from 8-cell to morula stage. Antisera to histocompatibility-Y(H-Y) antigen were prepared in inbred SD female rat by repeated immunization of spleen cell or testis supernatant from males of same strain. Male and female embryos were separated by delaying development of embryos against H-Y antibody. After sexing, rabbit embryos were bisected and aggregated.

The results obtained from these experiments were summarized as follows:

1. When mouse and rabbit 8-, 16-cell and morular embryos were cultured in H-Y antiserum, the ratio of embryo which has developed to hatching blastocyst was 53.4, 46.3 and 57.4% in mouse embryos, and 49.0, 52.0 and 61.0% in rabbit embryo, respectively. The ratio of mouse and rabbit embryos developed to hatching blastocyst showed nearly natural sex rate(50%), except rabbit morula showed a little higher ratio(61.0%) as compared to natural sex ratio.
2. When rabbit demi-embryos from 8-, 16-cell embryo and morula were cultured, the percentage of demi-embryos developed to eu-blastocysts was 75, 117 and 123% in 8-, 16-cell and morula, respectively. Morula was the most suitable for bisecting and culture.
3. When rabbit demi-embryo was individually aggregated and cultured, the aggregation rate of 8-, 16-cell and morula demi-embryo was 70, 68 and 58% without zona pellucida removed, and 62, 69 and 51% with zona pellucida. The rate of aggregation was higher in 8- and 16-cell demi-embryos than in morula demi-embryo.
4. When sexed-demi-embryo was aggregated with another demi-embryo with demi-embryo with same sex, the rate of embryo developed to blastocyst was 60, 50 and 25%, respectively. Eight-cell demi-embryo showed highest rate.

In conclusion, it showed that H-Y antiserum which was made by rat spleen cell enabled sexing rabbit embryos. And when rabbit sexed 8-, 16-cell and morula demi-embryo were aggregated,

* 서울대학교 동물자원과학과(Department of Animal Science and Technology, Seoul National University)

** 선문대학교 식량자원학부(Department of Food Resources, Sun Moon University)

they were developed to eu-blastocyst which suggested the potential of sexed embryo manipulation.

(Key words : Rabbit embryo, Demi-embryo, H-Y antiserum, Sexing, Aggregation, Chimera)

I. 서 론

보다 나은 축산업의 발전을 위해 유전적으로 양호한 동물의 생산에 많은 노력을 기울이고 있는 것이 현실이다. 이러한 노력 중의 하나가 초기 발달 단계에서 성을 인위적으로 조절하고 성을 조절한 개체와 다른 종의 초기수정란을 서로 융합시켜 지금까지 존재한 종류보다 경제적, 유전적인 모든 면에서 우수한 새로운 종을 창출하려는 연구가 최근 큰 관심을 끌고 있다. 포유동물 초기배의 각 분할구는 미분화상태이기 때문에 각각의 분할구는 하나의 완전한 태아로 발육할 수 있는全能性을 가지고 있다는 사실은 생쥐(Tarkowski, 1959), 토끼(Moore, 1968), 면양(Willadsen, 1980), 돼지(Nagashima 등, 1988) 및 소(Willadsen, 1981) 등의 초기배의 할구를 인위적으로 분리 배양하였을 때 이식 가능한 상실배 혹은 배반포로 발달을 보으로써 입증되었다. 또한 Willadsen(1979, 1980)은 면양의 상실배와 배반포를 양분 후 이식하여 이란성 쌍태를 얻었다고 보고하였다.

포유동물의 성은 염색체에 따라 옹성과 자성이 결정되므로, H-Y항체를 이용한 초기배의 성 판별에 대한 연구가 진행 중이다(Nakamura 등, 1984; Wachtel, 1984; White 등, 1987a). 이러한 연구는 100%의 정확도를 가지는 것은 아니지만 어떤 성 판별방법보다 쉽게 수행할 수 있어 실제 이용이 가능하다(임 등, 1989; 정 등, 1991). 세대를 거치는 재래식 품종개량법을 개선하기 위하여, 유전적 조성이 다른 두 품종 간의 초기배반포를 성 감별 절단 이등분한 후 융합하여 새로운 개체를 작출할 가능성이 있어 가속개량 효과에 큰 기대가 모아진다. 본 연구는 H-Y항체로 성 판별한 토끼의 수정란을 간단한 수작업 방법으로 이등분 절단하고, 유전적으로 상이한 2종류의 개체에서 유래한 할구를 융합하여 유전자 조성이 상이한 초기배를 생산하고 배양함으로써 초기배 발달에 대한 기초 지식을 확립할 목적으로 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

H-Y항혈청을 생산하기 위하여 7~8주령의 근교계 SD흰쥐를 사용하였다. 수정란 채란을 위하여 6~12개월령의 New Zealand White종 자성을 공란토로, 8~12개월령 자성을 수란토로, 12~24개월령 옹토를 공시하였다.

2. 다배란 처리 및 수정란 회수

수정란 회수를 위해 공란토에 12시간 간격으로 0.3, 0.4, 0.5, 0.5, 0.5 및 0.5mg, 총 2.7mg FSH(Sigma, 미국)를 6회에 걸쳐 피하주사하고 마지막 FSH주사 12시간 후 hCG 200IU를 근육주사 함과 동시에 동일 품종의 옹성토끼와 2회 자연교미를 시켰다. 수정란의 회수 시기는 8~16세포기는 교미 후 1.5~2.0일, 상실배는 2.5일에 m-PBS(Sigma, 미국)+0.3% BSA(Sigma, 미국)로 난관을 관류하여 수정란을 회수하였다. 회수한 수정란 중 형태적으로 정상인 수정란만 실험에 사용하였다. 수정란 회수를 위한 관류액으로는 pH 7.2~7.4, 삼투압 270~285mOsm/kg으로 조정된 m-PBS(modified Dulbecco's phosphate buffered saline; Gibco, 미국)에 0.3% BSA (bovine serum albumin; Sigma, 미국)을 첨가하여 사용하였다. 수정란의 배양을 위해서는 Ham's F10(Sigma, 미국)에 10% FBS(Fetal Bovine Serum; Gibco, 미국)를 첨가하여 사용하였다. 관류액과 배양액은 사용전에 0.22 μ m membrane filter(Gelman, 미국)로 여과, 제균하였다.

3. H-Y항혈청 제조 및 수정란에 대한 H-Y항체의 처리

H-Y항혈청 제조 과정은 이(1991)의 방법에 따라 준비하여, Ham's F10에 10%(v/v)를 첨가하여 사용하였다. 각 처리에서 H-Y항체의 생성이 확인된 흰쥐항혈청 10%(v/v)를 Ham's F10에 첨가하여 25 μ l

의 소적을 배양용 incubator내에서 3시간 이상 평형시킨 후 각 소적당 8, 16-세포기 및 상실배를 각각 8~10개의 수정란을 넣고 24~72시간 배양한 후, 실체현미경(Olympus, 일본) 하에서 형태학적 특성을 관찰하였다. 수정란 중 발달 상태가 경과 시간에 따라 발달이 중지되거나 세포용해현상을 보인 수정란은 H-Y항체에 의해 영향을 받은 것은 음성으로, 배반포까지 정상적으로 발달한 것은 영향을 받지 않은 것은 자성으로 구분하였으며, 이때 판정은 이(1991) 및 Kroc와 Goldberg(1976)의 결과를 기준으로 구분하였다. 배양의 조건은 99% humidified, 5% CO₂+95% air, 37℃인 CO₂ 배양기(Leec, 영국)에서 실시하였다.

4. 수정란의 투명대 제거, 절단 이등분 및 융합

형태적으로 정상인 수정란을 골라 PBS로 1회 세척한 후에 0.5% pronase를 함유한 배양액에서 20~30분간 배양하여 mucin coat를 먼저 제거하고, 다시 2~3분간 배양하여 투명대 연화를 유도하였다. 이어 CMF(Ca²⁺, Mg²⁺-free; Sigma, 미국)배양액에서 약 20분간 배양하므로써 decompaction시켰다. 0.2ml의 Ham's F10배양액에 들어 있는 5~10개의 mucin coat 혹은 투명대가 제거된 수정란을 slide glass 위에 정치시킨 후 실체현미경하에서 미세한 유리바늘(8~10μm)을 수정란의 정중앙 바로 위에 놓고 직선 아래 방향으로 가만히 내려 수정란을 압질하였다. 절단한 할구를 Ham's F10+10% FBS 소적에 1쌍씩 넣어 습도 99%, 5% CO₂+95% Air, 37℃배양기에서 24~72시간을 배양하였다. 배양 후 절단분리배의 발달 상태를 다음과 같이 분류하였다. Eu-blastocyst : 비록 대조구보다 작지만 뚜렷한 내부세포괴와 양호한 영양배가 있는 것, Pseudo-blastocyst : 내부세포괴가 없거나 할구세포의 일부가 탈락되어 있는 것, Degenerate : 퇴화되고 있는 것으로 분류하였다.

투명대가 있는 절단분리배를 CMF배양액에 5분 정도 두었다가 개체가 서로 다른 할구를 조심스레 pipetting하여 반으로 쪼개진 투명대내에 잔존하는 다른 할구세포에 약한 힘으로 압박하여 넣어 주어 융합을 유도하였다. 투명대가 완전히 제거된 절단분리배의 융합은 CMF배양액에 5분 정도 두었다가 round형의 micro well modul(Nuck, Denmark)에 담겨 있는 Ham's F10+20% FCS(Sigma, 미국) 소적에 옮겨

24시간 이상 배양하여 발달 여부를 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 수정란의 발달단계가 H-Y항체반응에 미치는 영향

토끼의 8세포기배부터 상실배까지의 수정란을 흰쥐 H-Y항체가 포함된 배양액에서 배양했을 때 부화배반포기까지 발달한 결과는 Table 1과 같다. 토끼의 8-, 16-세포기 및 상실배를 H-Y항혈청과 보체가 포함된 배양액에서 각각 49, 52 및 41개를 배양하였을 때 배반포까지 발달한 수정란은 각각 24(49.0%), 27(52.0%) 및 25(61.0%)로 8- 및 16-세포기는 자연성비인 50%에 가까운 비율을 보였으나 상실배는 61%로 50:50의 자연성비에서 약간 더 벗어났다(Table 1).

토끼의 상실배가 자연성비에서 약간 벗어난 것은 8-과 16-세포기배에서는 부친에서 유래한 H-Y항원의 유전자가 발현되나, 상실배에서는 H-Y항원의 발현이 서서히 잠복하기 시작한다는 것을 시사한다(White 등, 1987b; Anderson, 1987).

이(1991)는 토끼와 생쥐의 수정란을 H-Y항혈청이 포함된 배양액에서 배양한 결과 2~4-세포기배에서는 H-Y항혈청의 영향을 받지 않고, 음성의 수정란인 경우 8-세포기배부터 초기상실배까지 H-Y항혈청의 영향을 받다가 그 후의 발달단계부터는 다시 H-Y항혈청의 영향을 받지 않는다고 주장하였다(Warner와 Spanus, 1984). 이러한 현상은 수정란이 모체의 자궁에 착상할 때 4-세포기에서 상실배 단계 사이의 초기 수정란에 발현되는 H-Y항원이 착상시기에 모체의 면역적 기작에 의해 모체가 착상 거부반응을 일으킬 수 있으므로 이러한 거부현상을 방지하기 위해 배반포기

Table 1. Development of 8- to morula rabbit embryos cultured in the rat H-Y anti-serum

Stage of cell	No. of embryo examined		
	Total	Developed	Undeveloped
8-cell	49	24(49.0)	25(51.0)
16-cell	52	27(52.0)	25(48.0)
Morula	41	25(61.0)	16(39.0)

Developed: developed from 16-cell to blastocyst.

이후에는 수정란의 H-Y항원이 자체의 mechanism에 의해 잠복되거나 다른 물질로 피복되기 때문인 것으로 추정된다(Beer와 Sio, 1982). 그러므로 토끼수정란에 있어서 H-Y항원을 검출할 수 있는 가장 효과적인 시기는 8-세포기와 16-세포기임을 시사한다.

2. 절단이등분배의 체외 배양

토끼 수정란을 절단이등분하여 체외 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 8-세포기배 8개, 16-세포기배 52개 및 상실배 66개를 절단분리하여 각각 72, 48 및 24~33시간을 배양하였을 때 eu-blastocyst로 발달한 것은 각각 6/8(75%), 61/52(117%) 및 81/66(123%)였고, pseudo-blastocyst로 발달한 것은 6/8(75%), 39/52(75%) 및 43/66(65%)였고, 퇴화된 것은 4/8(50%), 4/52(8%) 및 8/66(12%)였다. 즉 이들 이등분배는 절단 직후 24~72시간 배양에서 정상배보다 소형이나마 내부세포기가 존재하는 전형적인 배반포로 발달하였다.

이것은 Tarkowski(1959)가 생쥐상실배를 이용한 실험에서 절단이등분배를 배반포까지 배양후 크기를 측정하고 그 크기가 정상배의 약 절반 가량이었다고 보고한 내용과 일치한다. 본 시험에서 절단이등분배가 정상적인 배반포로 발달한 비율은 8-세포기 이등분배에서 낮은 비율을 보였으나, 16-세포기 및 상실배에서는 높은 비율을 나타내어 16-세포기배 이상에서 절단이등분배는 117~123% 전후가 배반포로 발달될 수 있음을 시사한다. 8-세포기 이등분배가 배반포 발생율이 낮은 원인은 할구의 숫자가 적어 그 중 한개만 손상을 입어도 배반포 발달에 큰 영향을 미치기 때문으로 보고되고 있다(Tarkowski 등, 1967; Willadsen, 1979; 1980).

Ozil(1983)은 8일된 소 수정란 11개를 micromanipulator로 이등분하여 배양했을 때 16개의 half-ex-

panded blastocysts를 생산하였다고 보고하였다. Seike 등(1989)은 인위적으로 소 수정란을 절단이등분할 때 수정 7~8일 사이의 배를 주로 사용하였으며, 많은 연구자들이 인위적으로 수정란을 절단이등분할 때 수정 후 7~8일 사이의 배를 사용하였다(Warfield 등, 1987; McEvoy와 Sreenan, 1990; Kippax 등, 1991). 이러한 보고들을 비교해 볼 때, 인위적으로 절단한 배는 자연적으로 절단되는 배보다 절단되는 시기가 빠르지만 절단후 배발생에는 큰 문제가 없는 것으로 사료된다.

3. 분리할구 융합배의 발생능력

투명대의 유무가 이등분절단배의 융합에 미치는 영향을 조사하기 위하여 토끼 수정란의 투명대와 mucin coat를 모두 제거하거나 mucin coat만을 제거한 후 응집시켰을 때 응집율은 Table 3에서 보는 바와 같다. 투명대를 제거한 실험구의 경우 76쌍의 절단이등분배 중 49개가 응집되었는데, 그 중 8-, 16-세포기 및 상실배의 이등분배가 응집된 비율은 각각 70, 68 및 58%로 8-세포기가 가장 높았고 상실배가 가장 낮았지만 배의 발육단계간에는 큰 차이가 없었다.

마찬가지로 mucin coat만 제거한 실험구의 경우 모두 161쌍의 이등분배 중 104개가 응집되었는데, 그 중 8-, 16-세포기 및 상실배의 이등분배의 응집율은 각각 62.2, 69.4 및 51.1%로 역시 투명대 제거구와 거의 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 보아 투명대의 유무는 이등분절단배의 융합율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 이와 정(1984)은 생쥐 2-, 4- 및 8-세포기배의 투명대를 완전히 제거시킨 후 융합시켰을 때 융합율은 각각 61/85(75%), 68/77(88.3%) 및 98/101(97%)로 본 실험보다 높은 융합율을 보고하였는데 그 원인은 투명대만을 제거한 whole embryo를 사용했기 때문으로 생각된다.

Table 2. *In vitro* development of rabbit demi-embryos

Stage of embryo	Culture time (hr)	No. of whole embryo	No. of demi-embryo	Developmental status of demi-embryo		
				Eu-(%)	Pseudo-(%)	Deg(%)
8-cell	72	8	16	6(75)	6(75)	4(50)
16-cell	48	52	104	61(117)	39(75)	4(8)
Morula	24~33	66	132	81(123)	43(65)	8(12)

Eu- : eu-blastocyst, Pseudo- : pseudo-blastocyst, Deg : Degenerated

Table 3. Aggregation rate of demi-embryos from 8-, 16-cell and morula in rabbit

Zona pellucida	Stage of demi-embryo	No. (%) of demi-embryo examined		
		Total	Aggregation	Unaggregation
Free	8- to 8-cell	20	14(70.0)	6(30.0)
	16- to 16-cell	25	17(68.0)	8(15.0)
	Morula to morula	31	18(58.0)	13(42.0)
Contained	8- to 8-cell	45	28(62.2)	17(37.8)
	16- to 16-cell	62	43(69.4)	19(30.6)
	Morula to morula	54	33(51.1)	21(48.9)

Embryos were confirmed by aggregation and developed to blastocyst.

Tarkowski(1959)는 생쥐의 4-세포기배를 microneedle로 투명대를 관통하여 할구 1~3개를 파괴 후 남은 할구를 배양하였을 때 약 100%가 배반포까지 발달하였다고 보고하였다. Moore 등(1968)은 토끼의 2- 및 4-세포기배에서 분리된 각각의 할구를 난관에 이식하여 투명대가 유무가 발달에 미치는 실험에서 투명대가 있는 경우 5와 25%, 투명대가 없는 경우 0 및 0%로 초기수정란에 있어서는 투명대가 수정란의 발달에 중요한 영향을 미친다고 하였다. 투명대가 있는 경우에도 발달율이 낮은 이유는 식세포가 투명대의 구멍을 통해 투명대 내부에 할구와 같이 존재하여 식세포가 할구의 발달에 나쁜 영향을 미친다고 주장하였다. Rossant(1976)는 생쥐의 4- 및 8-세포기배의 분리된 할구를 투명대에 재주입하여 난관 이식 5일 후 재채란하여 확인한 결과 배반포까지 발달한 비율은 52와 35%였다고 보고하였다. 그러나 Nagashima 등(1984)은 16-세포기 생쥐배를 절단이등분하여 이식하였을 때 태아의 비율이 54%로 투명대가 없는 경우에도 이등분배의 발달에 큰 양향을 미치지 않는다고 주장하였다. Tarkowski(1967)는 생쥐 8-세포기배를 투명대 제거 후 153개를 응집하여 이식하였을 때 36마리(21%)가 분만하였다고 보고하였다. 또한 Zeilmarker(1973)는 흰쥐와 생쥐의 8~16-세포기배를 이용하여 이종간에 응집을 실시하여 배반포까지 발달한 비율은 75%였다고 보고하였고, Polzin 등(1987)은 산양의 내부세포괴(inner cell mass) 세포 1개를 면양의 투명대가 제거된 배반포에 주입하여 59%의 chimera 배를 생산하였다고 보고하였다. Takowski(1961)는 수정란의 응집능력은 8~16-세포기배에서 가장 뛰어나서 이 단계에서 응집을 유도하면 배반포까지 발달

할 확률이 가장 높았다고 주장하였다. 뿐만 아니라 whole embryo를 융합하면 융합배가 발달하는 동안 배반포배의 크기가 정상배의 2배 정도로 커진다고 하였으며, 이 크기가 생존에 미치는 영향은 알 수 없다고 보고하였다(Zeilmark, 1973). 손상을 받지 않은 2~8-세포기배의 할구세포 각각은 배반포 및 개체로 발달할 능력을 가지고 있어서 융합시 1개의 생존세포로서 작용하기 때문에(Polzine 등, 1987; Schmidt 등, 1984), 이등분배는 절단시 할구세포의 손상이 없을 경우에는 이등분배의 융합은 정상할구의 융합과 큰 차이가 없을 것으로 사료된다. 본 실험에서는 전체적 응집율에 있어서 투명대 미제거구와 제거구는 각각 64.5와 64.6%로 큰 차이가 없었다. 그러므로 수정란의 절단배를 응집할 때 절단시기는 8-세포기배 혹은 16-세포기배가 가장 적합한 것으로 사료된다.

4. 성판별후 절단이등분한 배의 융합율

흰쥐 H-Y항체에 의해 성 판별한 토끼 수정란을 수작업으로 이등분 절단한 후 같은 성의 절단배끼리 융합시켰을 때 융합율은 Table 4와 같다(Fig. 1). 성 판별된 토끼의 절단이등분배가 융합·배양 후 정상적으로 융합이 이루어진 비율은 8-, 16-세포기 및 상실배가 각각 55.6(10/18), 58.8(10/17) 및 40.0%(8/20)로 16-세포기배가 가장 높았으나 각 발육단계별 간에는 큰 차이가 없었다. 그러나 융합이 이루어진 후 상실배로 발달한 비율은 이등분-8세포기배, 16-세포기배 및 상실배가 각각 40, 50 및 75%로 이등분 상실배가 가장 높았으나, 배반포로 발달한 비율은 60, 50 및 25%로 이등분 8-세포기배가 가장 높았다. 따라서 성 감별부터 융합 후 배반포까지 발달하는데는 8-세포기

Table 4. Aggregation rate of sexed demi-embryo in rabbit

Stage of demi-embryo	Culture ^T time (hr)	No. of embryo examined			Development of aggregated embryos	
		Total	Agre	A/T(%)	Morula(%)/Agre(%)	Blastocyst/Agre(%)
8- to 8-cell ^{***}	72	18	10	55.6	4/10(40)	6/10(60)
16- to 16-cell ^{**}	48	17	10	58.8	5/10(50)	5/10(50)
Morula to morula [*]	24	20	8	40.0	6/8(75)	2/8(25)

^{***} : developed to 16-cell, ^{**} : developed to 32-cell, ^{*} : developed to blastocyst, T : time cultured from recovery to development to morula and blastocyst, Agre : aggregated.

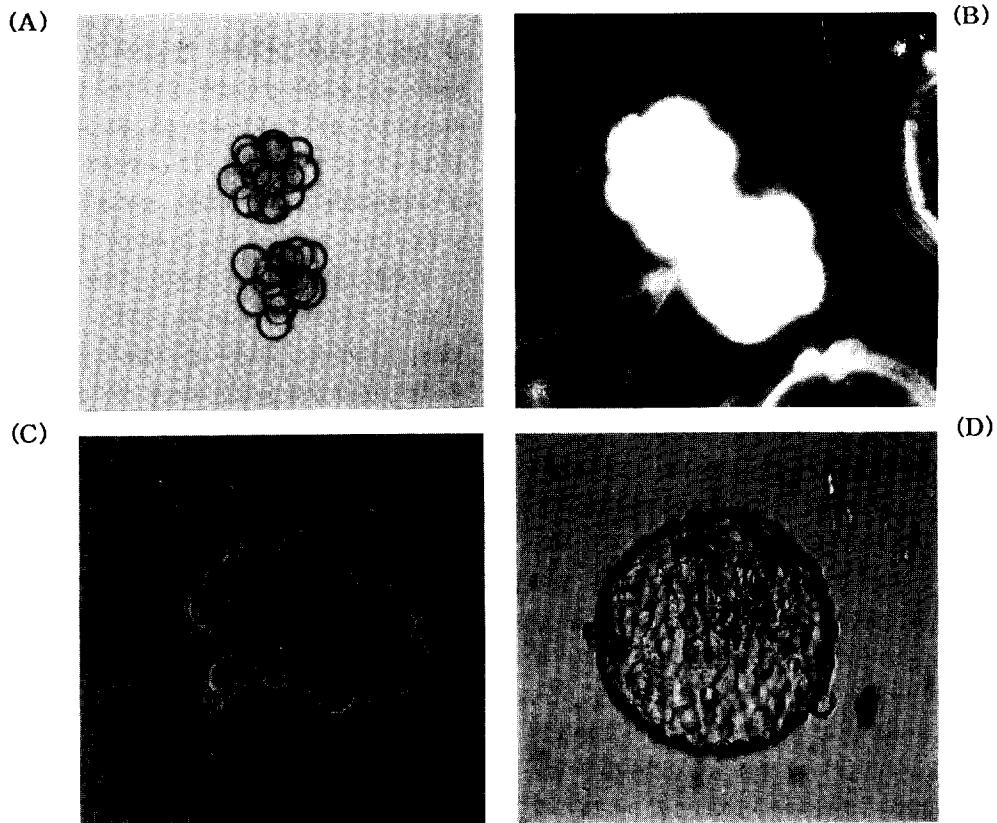


Fig. 1. Aggregation of sexed demi-embryos.

Bisected demi-embryos(A), early aggregation of demi-embryos(B), 12-hours cultured embryo(C) and 60-hours cultured embryos(D)

배를 H-Y 항혈청에서 16-세포기배, 32-세포기배 및 상실배까지 배양하여 절단 이등분한 후, 이등분-8세포기배를 융합·배양하는 것이 이등분-16세포기배 및 이등분-상실배를 융합·배양하는 것보다 유리한 것으로

시사된다.

Williams 등(1990)은 소의 상실배를 절단·융합한 실험에서 상실배에서도 발달단계가 같지 않으면 융합율이 떨어진다고 하였다. 즉, 16-세포기와 상실배, 상

실배와 상실배 및 상실배와 tight-상실배를 각각 융합하였을 때 chimera 생산비율은 100, 36 및 20%였다고 보고하여, 상실배를 중심으로 발달단계가 큰 수정란은 chimera가 생산되지 않는다고 보고하였다. 이러한 결과로 보아 성 판별된 demi-embryo의 융합은 상실배보다 8- 혹은 16-세포기가 적당한 것으로 사료된다. Tarkowski(1961)는 성 판별전 융합에 의해 생산되는 chimeric 배는 자성, 음성 및 간성이 발생할 확률은 각각 25, 25 및 50%라고 주장하였다. 그리고 8-세포기 생취배를 융합하여 58개의 융합배를 이식하였을 때 자성 2마리, 음성 2마리 및 간성 3마리가 분만되었다고 보고하여, 성 판별없이 융합하였을 때는 간성의 발생 가능성이 높다고 보고하였다. 따라서, 성적으로 정상인 chimera를 생산하기 위해서는 융합을 하기에 앞서 H-Y항체나 PCR 등을 이용하여 성 판별하는 것이 바람직하다고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 토끼의 수정란을 면역학적 방법에 의하여 성을 판별하고, 성 판별된 토끼 수정란을 절단하였다. 성 판별을 위하여 근교계 SD회주의 융성비장세포를 H-Y항원으로 사용하여 동종의 자성에 면역시켜 H-Y항혈청을 제조하였으며, 제조된 H-Y항혈청이 포함된 Ham's F10 배양액에서 토끼 수정란의 배양을 하여 세포용해현상 및 발생지연현상을 나타내는 배를 음성으로 발생배를 자성으로 분리하였다. 또한 성 판별된 토끼 수정란을 절단 이등분하여 융합하였다. 이 실험에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 토끼의 8-, 16-세포기 및 상실배를 H-Y항혈청으로 배양하였을 때 부화배반포까지 발달한 수정란의 비율은 각각 49.0, 52.0 및 61.0%로 8-과 16-세포기배는 자연성비에 가까웠으나 상실배는 자연성비 50%에서 약간 벗어났다.
2. 토끼의 8-, 16-세포기배 및 상실배의 절단이등분 배를 각각 72, 48 및 24~33시간 배양하였을 때, eu-blastocyst로 발달한 비율은 각각 38, 59 및 61%로 상실배가 8-과 16-세포기배보다 높았다. 이것은 토끼수정란을 절단 후 배양할 때 상실배가 가장 적합한 것으로 시사된다.
3. 절단 이등분 토끼배를 다른 개체의 것과 융합하

여 배양하였을 때 융합율은 8-, 16-세포기 및 상실배 할구가 투명 대체거에서 각각 70, 68 및 58%, 투명대 미세거에서 각각 62, 69 및 51%로 융합율은 상실배 할구보다 8- 과 16-세포기 할구에서 높았다.

4. 성 판별 절단 이등분 배를 같은 성의 다른 개체의 것과 융합하여 배양하였을 때 상실배로 발달한 비율은 이등분 8-, 16-세포기 및 상실배가 각각 40, 50 및 75%로 이등분 상실배가 가장 높았으나, 배반포로 발달한 비율은 각각 60, 50 및 25%로 이등분 8-세포기배가 가장 높았다.

결론적으로 흰쥐 수컷 비장세포를 항원으로 생산한 H-Y항혈청은 토끼의 8-세포기배부터 상실배까지 성 판별에 활용할 수 있을 것으로 시사된다. 또한 성 판별된 토끼의 8-, 16-세포기배 및 상실배를 절단 이등분후 융합하였을 때 eu-blastocyst로 발달하여 성 감별 후 수정란 조작의 가능성을 시사한다.

V. 인용문헌

1. Anderson, G. B. 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27:81-97.
2. Beer, A. E. and J. O. Sio. 1982. Placenta as an immunological barrier. *Biol. Reprod.*, 26:15-27.
3. Kippax, L. S., W. B. Christie and T. G. Rowan. 1991. Effects of method of splitting stage of development and presence or absence of zona pellucida on foetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos. *Therio.*, 35(1):25-35.
4. Kroc, C. J. and E. H. Goldberg. 1976. H-Y (male)antigen detection on eight-cell embryos. *Science*, 193:1134-1135.
5. McEvoy, T. G. and J. M. Sreenan. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. *Therio.*, 33(6):1245-1253.
6. Moore, N. W., C. E. Adams and L. E. A.

- Rowson. 1968. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J. Reprod. Fert.*, 17:527-531.
7. Nagashima, H., Y. Katoh, K. Shibata and S. Ogawa. 1988. Production of normal piglets from microsurgically split morulae and blastocysts. *Therio.*, 29(2):485.
 8. Nagashima, H., K. Matsui, T. Sawasaki and Y. Kano. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.*, 70:357.
 9. Ozil, J. P. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 69:463.
 10. Polzin, V. J., D. L. Anderson, G. B. Anderson, R. H. BonDurant, J. E. Butler, R. L. Pashen, M. C. T. Penedo and J. D. Rowe. 1987. Production of sheep-goat chimeras by inner cell mass transplantation. *J. Anim. Sci.*, 65: 325-330.
 11. Rossant, J. 1976. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, Vol. 36(2):283-290.
 12. Schmidt, G. H., M. M. Wilkinson and B. A. J. Ponder. 1984. A method for the preparation of large intact sheets of intestinal mucosa: Application to the study of mouse aggregation chimeras. *The Anatomical Record*, 210:407-411.
 13. Seike, N., K. Saeki, K. Utaka, M. Sakai, R. Takakura, Y. Nagao and H. Kanagawa. 1989. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. *Therio.*, 32(2):211-220.
 14. Tarkowski, A. K. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature Lond.*, 184:1286-1287.
 15. Tarkowski, A. K. and J. Wroblewska. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 18:155.
 16. Wachtel, S. S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21(1):18-28.
 17. Warfield, S. J., G. E. Seidel, Jr. and R. P. Elsdon. 1987. Transfer of bovine demi-embryo with and without the zona pellucida. *J. Anim. Sci.*, 65:756-761.
 18. Warner, C. M. and D. J. Spannaus. 1984. Determination of H-2 antigens on preimplantation mouse embryos using conventional antisera and monoclonal antibody. *J. Exp. Zool.*, 230:37-52.
 19. White, K. L., G. B. Anderson, P. J. Berger, R. H. BonDurant and R. L. Pashen. 1987a. Identification of a male-specific histocompatibility protein on preimplantation porcine embryos. *Gamete Res.*, 17:107-113.
 20. White, K. L., G. B. Anderson, R. H. BonDurant, S. Donahue and R. L. Pashen. 1987b. Viability of bisected bovine embryos after detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27:293(abstr.).
 21. Willadsen, S. M. 1979. A method of culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298.
 22. Willadsen, S. M. 1980. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. *J. Reprod. Fert.*, 59:357.
 23. Willadsen, S. M. and C. Polge. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *The Veterinary Record*, 211-213.
 24. Williams, T. J., R. K. Munro and J. N. Shelton. 1990. Production of interspecies chimeric calves by aggregation of *Bos indicus* and *Bos taurus* demi-embryos. *Reprod. Fertil.*, 2:285-394.
 25. Zeilmarker, G. H. 1973. Fusion of rat and

- mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts. *Nature*, 242:115-116.
26. 이창규. 1991. H-Y항체에 의한 생쥐 및 토끼 수정란의 성조절에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문.
27. 임경순, 이창규, 양보석, 정구민, 박영식. 1989. H-Y항체를 이용한 소 수정란의 성감별에 관한 연구. 농시논문집, 32:35-41.
28. 정장용, 박희성, 박충생. 1991. Rat H-Y항체에 의한 생쥐 분할란의 성 조절에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 15(3):179-187.
- (접수일자 : 1997. 3. 15. / 채택일자 : 1997. 4. 28.)