大韓獸醫學會誌(1999) 第39卷 第1號
Korean J Vet Res(1999) 39(1) : 189~203

햄스터 H-Y항체와 중합효소연쇄반응을 이용한 소 수정란의 성감별

유일정 · 김용준 · 이경광*

전북대학교 수의과대학 산과학교실
한국과학기술원 생명공학연구소*
(1998년 10월 7일 접수)

Sex determination of bovine embryos with hamster H-Y antibody and by polymerase chain reaction

Il-jeoung Yu, Yong-jun Kim, Kyung-kwang Lee*

Department of Obstetrics, College of Veterinary Medicine,
Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
*KIST, Taejon, 305-600, Korea**
(Received Oct 7, 1998)

Abstract : To determine sex of bovine embryos using hamster histocompatibility Y(H-Y) antibodies, bovine compact morulae were incubated for 6 hours in TCM199 supplemented with 10% hamster H-Y antiserum and the embryos with developmental arrest were diagnosed as male embryos, while the embryos showing development during the incubation as female embryos.

This presumptive embryo sexing was confirmed by polymerase chain reaction(PCR)method.

1. In the result of hamster sperm cytotoxicity test to measure H-Y antibody titer, the rate of dead sperm was considerably lower in H-Y antiserum absorbed with hamster male splenocytes than in H-Y antiserum absorbed with hamster female splenocytes or H-Y antiserum unabsorbed with splenocytes($p < 0.01$).

2. The rate of oocytes fertilized *in vitro* and the rate of blastocysts of the fertilized oocytes were 58.5% and 32.4%, respectively.

The rate of blastocysts on day 8 was 15.9%, denoting the highest rate during whole culture period posterior to *in vitro fertilization* (IVF).

3. The bovine 16 cell and compact morulae embryos incubated in the medium supplemented with hamster H-Y antibodies showed 37.1% and 48.9% of developmental arrest which were diagnosed as male, respectively, and rates of redeveloped embryos from the arrested were 24.1% in 16 cell and 44.3% in compact morulae embryos, respectively, denoting higher rate of sex

본 연구는 96년도 한국과학재단의 목적기초과제(KOSEF 961-0606-051-2)에 의하여 이루어졌음.
Address reprint requests to Dr. Yong-jun Kim, Department of Obstetris, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Republic of Korea.

determination and rate of redevelopment in compact morulae than 16 cell embryos.

4. Bovine compact morulae of Korean cattle and Holstein were treated with hamster H-Y antibodies for sex determination and the rates of developmental arrest(diagnosed as male) were 48.4% for Korean cattle and 47.9% for Holstein, respectively. The rates of redeveloped embryos to blastocyst after treatment were 42.6% for Korean cattle and 41.8% for Holstein, respectively, showing no significant differences of sex determination and redevelopment between both breed.

5. The sex determination of bovine embryos(Korean cattle and Holstein) using hamster H-Y antibodies was diagnosed by PCR for confirmation, denoting the rates of 86.1% for Korean cattle and 85.9% for Holstein male embryos, respectively, and the rates of 91.9% for Korean cattle and 90.1% for Holstein female embryos, respectively, with no significant differences of sex determination between both breed.

These results indicated that hamster H-Y antibodies can be usable for sex determination of bovine embryos of Korean cattle and Holstein, the viability of bovine embryos was sustained while being cultured in the medium supplemented with hamster H-Y antibodies of appropriate titer and sex determination of bovine embryos by PCR can be feasible for confirmation.

Key words : sex determination of bovine embryo, hamster H-Y antibodies, PCR, *In vitro fertilization*.

서 론

가축에서 농가가 원하는 성의 산자를 원활하게 생산할 수 있다면 가축의 생산성 및 축산경영의 효율성을 크게 높일 수 있으며 가축산업이 크게 향상될 것으로 기대된다. 따라서 정자 또는 수정란의 성감별 및 성조절은 많은 학자들의 집중적인 연구대상의 하나이다.

정자에 대한 성조절은 X정자와 Y정자를 분리하기 위한 여러가지 방법들이 모색되었다. 즉, albumin density gradient를 이용한 원심분리법[1,2] 기타 물질의 density gradient 를 이용한 방법[3-5], sephadex를 이용한 크로마토그래피법[6], 전기영동법[7,8], 점액통과 활력에 따른 분리[9,10], 형광염색법[11,12], deoxyribonucleic acid(DNA) 양에 따른 cell sorting 법[13], 면역학적 법[14,15] 등 많은 방법들이 인체 및 동물들을 대상으로 수행되었다. 그러나 정자의 성 분리는 한쪽 성으로 치우치도록 분리는 가능하나 아직까지 완벽한 분리가 어려울 뿐만 아니라 더욱이 성 분리처리된 정자를 이용하여 정상적인 수태율을 얻기도 매우 어렵다.

수정란의 성감별 방법은 과거 성염색체 분석방법[16-19]이 주를 이루어 왔으나 이 방법은 정확성은 높으나 embryo로 부터 metaphase 상태를 얻기가 힘들어 성확인율이 다소 떨어지며 장시간을 요하는 단점을 지니고 있다. 최근에는 histocompatibility Y(H-Y) 항체 이용진단법[20-24], X-linked enzymes 이용법[25], 수정란의 발달속도에 의한 구분방법[26-28], Y-specific DNA를 검정하는 polymerase chain reaction(PCR) 방법[29-32]이 있다. 이와같은 방법중 X-linked enzymes 이용법은 염색과정이 수정란에 유해한 영향을 주며 수정란 발달속도에 의한 암 · 수 구분방법은 수정란의 발달단계에 따라 판정해야 하므로 정확한 진단이 어렵다. 또한 Y-specific DNA를 검정하는 PCR 방법은 정확성은 매우 높으나 수정란을 생검하여 일부 세포를 추출해야 하므로 수정란의 생존성에 영향을 주게 되는 점, 고도의 기술이 필요한 점 등의 단점이 있다.

H-Y 항체를 이용한 성감별에 대한 많은 연구에서 단점으로 지적된 가장 중요한 점은 H-Y 항체로 처리한 결과 male 수정란을 사멸시킨다는 점[20,33,34]이었다.

그러나 Utsumi *et al*[22]은 랫트의 H-Y 항체를 이용하여 랫트의 *in vivo* 수정란을 성감별한 후 수정란 이식에 의해 성을 확인한 결과 일시적인 발달정지를 보인 수정란

중 91%가 male 수정란임을 발표함으로써 male 수정란을 H-Y 항체에 의해 사멸시키지 않고 성감별 할 수 있음을 보고하였다.

이와같이 H-Y 항체를 이용한 수정란의 성감별 방법이 male 수정란에 대한 일시적인 발달억제만을 나타낼 뿐 수정란에 손상을 주지 않고 정확성도 높은 방법이 될 수 있기 때문에 수정란 세포에 손상을 주는 다른 방법에 비해 효과적일 수 있다. 그러나 지금까지 수정란의 성감별을 위한 H-Y 항체생산에 사용된 실험동물은 주로 랫트와 마우스이었다. 따라서 본 실험에서는 아직까지 H-Y 항체를 이용한 수정란의 성감별에 한 번도 공여된 적이 없는 햄스터의 H-Y 항체를 이용하여 한우와 유우 수정란에 대한 성감별 가능성 여부를 알아보았다. 아울러 Utsumi *et al*[22]과 같이 male 수정란의 생존성에 장애를 주지 않는 적정 항체역가를 알아보고자 하였으며 이에 대한 성감별의 정확도를 PCR 방법을 통해 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

햄스터 H-Y 항체에 의한 소 수정란의 성감별 :

1. 햄스터 H-Y 항체의 생산 :

1) 실험동물 : Histocompatibility Y(H-Y) 항체생산을 위한 햄스터는 golden hamsters이었으며 5년 이상 inbred 된 8주령에서 9주령의 female hamster 30수와 male hamster 90수를 사용하였다.

2) 햄스터 H-Y 항원의 제조 : Male hamster의 비장을 외과적으로 절제하여 phosphate buffered saline(PBS)로 3~4회 세척한 후 glass slides를 이용하여 PBS가 담긴 60×15mm의 petri dish 내에서 splenocytes를 완만히 분리하였다. Pasteur pipette을 이용하여 균질화된 splenocytes의 부유액을 15ml 원심분리관내로 옮겨 3분동안 침전시킨 후 상층액을 얻었다. 그다음 union 32R을 이용하여 1,000 rpm(union 32R, 한일)에서 10분동안 원심분리하여 splenocytes 침전을 얻고 PBS를 5ml 까지 채워서 pasteur pipette으로 잘 혼합하여 다시 1,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 세척하였다. 다시 상층액을 제거한 침전물에 PBS를 2ml까지 채워서 splenocytes와 PBS를 pasteur pipette으로 잘 혼합하여 HISTOPAQUE®-1077(Sigma) 4ml가 담긴 원심분리관내로 천천히 옮긴 후 2,932rpm에서 20분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 buffy-coat 층을 pasteur pipette을 이용하여 다른 원심분리관에 옮긴 후 PBS를 11ml 까지 채워 PBS와 buffy-coat 층을 혼합한 다음 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. HISTOPAQUE®-1077로 density gradient 원심분리후에도 buffy-coat 층내 적혈구가 존재할 경우는 Gey's soln 5ml와 fetal calf serum(FCS) 1ml를 첨가하여 1,135rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 buffy-coat 층에 PBS를 첨가하여 1,000rpm에서 10분동안 원심분리한 후 혈구계산판에 splenocytes 부유액을 옮긴 후 광학현미경을 이용하여 400배 시야에서 splenocytes의 수를 계산하였다. 그후 PBS를 첨가하여 1×10^7 splenocytes(0.5ml)으로 희석하여 H-Y 항원으로 사용하였다.

3) 햄스터 H-Y 항혈청의 제조 : 1×10^7 splenocytes(0.5 ml)를 female hamsters에 1주 1회씩 6주동안 복강내 주사한 다음 2주후 보강주사를 하였다.

최종 보강주사 1주일후 female hamsters를 경추탈구법으로 희생시켜 복대정맥에서 혈액을 채취하였다. 채혈후 혈액을 응고시켜 4℃에서 하루밤동안 보관한 후 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 H-Y 항혈청을 분리하고 56℃에서 30분동안 비동화시킨 후 사용전까지 -70℃에 보관하였다.

2. 햄스터 H-Y 항체의 역가측정을 위한 세포독성 검사 :

1) 햄스터 정자부유액 준비 : Male hamster로 부터 정소상체를 절제하여 PBS로 여러번 세척하여 fructose와 FCS가 각각 0.5%와 5%로 첨가된 PBS가 담긴 petri dish 내에서 여러조각으로 자른 후 정자부유액을 회수하여 15ml 시험관에 옮겨 사용전까지 37℃의 water bath내에 보관하였다. Hamster의 정자수를 측정한 후 PBS 첨가 정자수를 2×10^6/ml로 조절하여 본 실험에 사용하였다.

2) 햄스터 H-Y 항혈청의 사용기준 : 여러 개체로 부터 얻은 항혈청중에서 일차적으로 H-Y 항체가 존재하는 H-Y 항혈청을 선택하기 위하여 well(cell culture cluster, costar)내 혈청 50μl, guinea pig complement(Gibco) 50μl와 정자수가 조정된 정자배지 50μl를 각각 첨가한 후 37℃에서 30분간 배양하였다. Bennett와 Boyse[14]의 기준에 의해 정자 사멸률이 70% 이상을 나타낸 햄스터 항혈청만을 선택하여 흡수실험에 공여하였다.

3) H-Y 항체역가 산정 : 70%의 정자 사멸률을 보인 H-Y 항혈청을 Goldberg[35]의 방법에 준하여 male splenocytes 또는 female splenocytes와 4 : 1의 비율이 되도록 각각 혼합하여 4℃에서 30분간 반응시켰다. 그후 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 Wachtel *et al*[36]

의 방법에 준하여 흡수실험을 실시하여 H-Y 항체역가를 산정하였다. 요약하면 splenocytes가 흡수되지 않은 H-Y 항혈청 50μl, male hamster의 splenocytes와 흡수과정을 거친 H-Y 항혈청 50μl 그리고 female hamster의 splenocytes와 흡수과정을 거친 H-Y 항혈청 50μl를 각각 연속적으로 희석한 후 각 well에 complement와 sperm을 동량씩 첨가하여 37℃에서 30분간 배양시켰다. 각 well에 0.16% trypan blue를 100μl씩 첨가한 후 5분후 혈구계산판을 이용하여 죽은 정자수를 광학현미경하에서 400배로 측정하였다.

Wachtel *et al*[36]의 방법에 준하여 female hamster의 splenocytes와 흡수한 H-Y 항혈청을 2배 희석시 사멸정자수가 70% 이상의 수준을 나타내고 male hamster의 splenocytes와 흡수한 H-Y 항혈청을 2배 희석시 사멸정자수가 50% 이하 수준을 나타낸 H-Y 항혈청을 선택하여 H-Y 항체를 이용한 소수정란 성감별에 사용하였다.

소 수정란 성감별을 위한 H-Y 항혈청의 희석배율은 Utsumi *et al*[22]의 방법을 참고하여 splenocytes 비흡수 H-Y 항혈청의 독성검사에서 58~60% 정자사멸률이 나타난 10배의 희석비율을 사용하였다.

3. 소 난자의 체외수정 :

1) 소 난소의 채취와 난자의 회수 및 배양 : 전주축협 도축장과 대전직할시 도축장에서 도축된 한우와 유우 난소를 채취하여 25~30℃의 멸균 생리식염수가 들어있는 보온병에 담아 도축후 3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 멸균 생리식염수내에는 1 *l* 당 penicillin 10^5IU와 streptomycin 100mg를 첨가하였다. 실험실로 운반후 멸균된 37℃의 생리식염수로 난소를 세척하여 사용전까지 37℃ water bath에 보관하였다.

난자의 회수를 위하여 멸균 종이타올로 난소의 물기를 닦은 후 5ml 주사기를 이용하여 3% FCS가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(Gibco BRL)를 1ml 흡입한 후 7mm 이하의 난포로 부터 난포액을 흡입하였다. 5ml 정도까지 흡입된 난포액은 90×15mm의 petri dish 내에 천천히 분주하였다.

일정량의 난포액이 담긴 90×15mm의 petri dish를 경사지게 기울여 상층액을 제거한 후 실체현미경하에서 10배로 난자를 관찰하면서 pasteur pipette을 이용하여 3% FCS 첨가 D-PBS가 담긴 35×10mm의 petri dish 내에 난자를 옮겼다. 그후 pasteur pipette을 이용하여 10% FCS 첨가 TCM199내로 난자를 옮겨 2~3회 세척하였다. 35×10mm의 petri dish내 10% FCS 첨가 TCM199의 100μl droplet을 만들어 paraffin oil로 덮었고 소 난자 20개씩 droplet내 넣은 후 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 22~24 시간동안 배양시켰다.

2) 소정자 준비 : 소 동결정액 스트로를 37℃의 water bath 내에서 30초간 융해시킨 후 15ml 시험관에 넣어 washing용 Brackett Oliphant(B.O., 1975) 배지를 7ml 까지 첨가하여 혼합한 후 1,650rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리한 액의 상층액을 제거한 후 washing용 B.O. 배지를 다시 7ml 까지 첨가하여 혈구계산판을 이용하여 살아있는 정자수를 측정하였다. 그후 원심분리하여 상층액을 제거한 후 ml당 1×10^7의 정자수가 되도록 B.O. 희석액을 혼합하였다

3) 체외수정 반응 및 배양 : 정자수를 조정한 후 100μl를 취하여 35×10mm의 petri dish내 droplet을 만들고 paraffin oil로 덮어 30분 내지 1시간동안 전배양시켰다. 그리고나서 pasteur pipette을 이용하여 droplet 내에 난자 20개씩을 넣어 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 5시간 반응시켰다.

체외수정 반응후 10% FCS 첨가 TCM199로 난자를 세척하였고 난자성숙시 사용된 TCM199내로 다시 옮겨 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 배양시켰다. 배양 48시간후 petri dish를 가볍게 치거나 pasteur pipette을 이용하여 난구세포로부터 난자를 분리시켰다.

1일 1회 실체현미경하에서 40배로 수정란의 발달상태를 관찰하였고 배양배지의 ½을 상기와 동일하게 조성된 새로운 TCM199로 매일 교환하였다. 또한 체외수정 후 48시간에 난자의 수정율을 조사하였으며 수정후 7일~11일 사이에 수정된 전체 난자로 부터 각각의 배반포율을 조사하였다. 아울러 수정된 전체 난자로부터 전체 배반포율을 조사하였다.

4. 햄스터 H-Y 항체를 이용한 소 수정란의 성감별 :

1) 한우 16세포기배 및 compact 상실배의 성감별 : 햄스터 H-Y 항체를 이용한 성감별에 있어서 수정란의 발달단계에 따른 차이를 알아보고자 16세포기배 및 compact 상실배 단계의 한우 수정란을 10% FCS 첨가 TCM199에 햄스터 H-Y 항혈청이 10%가 되도록 첨가한 후 수정란 20개씩을 넣어 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 6시간동안 배양하였다.

배양후 실체현미경하에서 63배로 관찰하여 발달정지된 수정란과 발달이 진행된 수정란을 구분하였으며 발달이 정지된 수정란은 male 수정란으로 진단하였다. 6시

간의 배양후 TCM199로 3회 이상 세척하였고 각 그룹별로 H-Y 항혈청이 없는 기존의 TCM199 내로 옮겨 38.5℃, 5% CO_2 조건하에서 재배양하였다. 그후 16세포기 수정란은 배양 24시간, 48시간 및 72시간에, compact 상실배 단계의 수정란은 배양 24시간 및 48시간에 발달 정지된 수정란의 배반포로의 재발달률을 조사하였다.

2) 한우 및 유우 Compact 상실배의 성감별 : Compact 상실배의 성감별에서 한우와 유우간의 품종간 차이를 알아보기 위하여 한우 및 유우의 compact 상실배에 대한 성감별을 하였고 그 진단방법은 전항과 동일한 방법으로 실시하였다. 또한 같은 방법으로 발달정지된 수정란율과 발달정지된 수정란의 배반포로 재발달된 율을 조사하였다.

5. 햄스터 H-Y 항체 이용 성감별된 소 수정란의 PCR 방법에 의한 확인 :

1) 수정란 성감별을 위한 primers : 소 수정란 성감별 실험에 사용된 primers는 bovine male-specific primers, BRY.1(Bovine repeat, Y-associated)[37,38]으로서 그 염기배열은 ;

forward primer는 5'-GGATCCGAGACACAGAACAG-3', reverse primer는 5'-CAAGCTAATCCATGCATCCT-3' 이었다.

증폭된 PCR product의 크기는 304 nucleotides이었다.

2) Genomic DNA의 준비 : 소 수정란 성감별에 대조군으로 이용된 genomic DNA는 혈액의 buffy coat로 부터 추출하였다. 임상적으로 건강하다고 판단된 암 · 수의 한우 및 유우의 혈액을 채취하였고 Genomic DNA Purification Kit(Promega)를 이용하여 male과 female genomic DNA를 각각 추출하였다.

또한 UV/spectrophotometer를 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 control로 사용할 DNA 농도를 10ng/μl이 되도록 희석하였다. 추출한 genomic DNA는 사용전까지 4℃에서 보관하였다.

3) 수정란으로 부터 DNA의 추출 : 햄스터 H-Y 항체를 처리하여 성감별된 한우 또는 유우 수정란 각각 1개가 포함된 배지 1μl를 pasteur pipette을 이용하여 embryo lysis buffer 4μl(20mM Tris, 0.9% Tween 20, 0.9% Nonidet, 0.4mg/ml proteinase K)가 들어있는 PCR tube에 옮겨 mineral oil 25μl로 덮은 후 55℃에서 30분간 처리하고 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmer Co, USA)를 이용하여 95℃에서 15분간 처리하여 수정란의 DNA를 추출하였다.

4) 수정란 DNA의 PCR : 수정란으로 부터 추출된 DNA의 PCR을 위한 혼합액은 10×Reaction Buffer, 25mM $MgCl_2$, 25mM dNTPS, 각각의 10pmol primer, 5IU Taq DNA Polymerase(Promega)를 혼합한 후 증류수를 첨가하여 45μl가 되도록 하였다. 수정란의 DNA가 추출된 각각의 tube에 혼합액 45μl를 첨가하였다.

반응조건으로는 94℃에서 3분간 primary denaturation을 실시하였고 denaturation, annealing, extension을 각각 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 35 cycles을 수행하였다. 상기 PCR 처리를 위하여 Gene Amp PCR System 2400(Perkin Elmer Co, USA)을 사용하였다.

5) 증폭 DNA의 분석 : 증폭된 PCR product의 크기를 확인하기 위하여 PCR product 10μl에 loading dye 2μl를 pipette으로 혼합하고 나서 혼합액 12μl씩 1.5% agarose gel의 slot에 넣었고 120V에서 40분간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide(0.5g/ml)로 염색하여 UV transilluminator (Bio Rad)로 관찰하였다. Molecular size marker로서 PCR marker(Promega)를 사용하고 male 수정란의 경우 control로서 male blood에서 추출된 genomic DNA의 PCR product의 size인 304bp와 비교 확인하였다.

결과분석 : 본 실험에서 얻어진 결과를 실험에 따라 *t*-검정 또는 anova로 통계처리하였으며 anova로 통계처리시 duncan 다중검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

햄스터 H-Y 항체의 햄스터 정자에 대한 세포독성 : Female 또는 male hamster의 splenocytes와 흡수시키지 않은 세포 비흡수 H-Y 항혈청을 보체 및 햄스터 정자와 반응시킨 결과 H-Y 항혈청의 희석배율이 증가할수록 햄스터의 정자 사멸률이 점차 감소하는 경향을 보였다($p < 0.01$).

한편 Female hamster의 splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청의 독성 검사결과 H-Y 항혈청의 희석배율이 증가할수록 정자 사멸률은 점차 감소하였으나($p < 0.01$), 8배 희석배율과 16배 희석배율에서 상호간에 유의적인 차이없이 50.3~52.5%의 정자 사멸률을 나타냈다.

Male hamster의 splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청의 독성 검사결과 H-Y 항혈청의 희석배율이 증가할수록 정자 사멸률은 점차 감소하였으나($p < 0.01$) 8배 희석배율 이후 희석배율이 증가하여도 상호간에 유의차 없이 10.2~12.9%의 정자 사멸률을 나타냈다.

햄스터 H-Y 항혈청 희석시 2배에서 32배 까지의 전체 희석배율에서 세포 비흡수 H-Y 항혈청, female splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청 그리고 male splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청의 독성 검사결과 세포 비흡수 H-Y 항혈청의 경우 가장 높은 정자 사멸률을 보였고($p < 0.01$), male splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청에서 가장 낮은 정자 사멸률을 보였으며($p < 0.01$) female splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청에서의 정자는 male splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청의 정자보다 더 높은 정자 사멸률을 보였다 ($p < 0.01$)(Table 1).

한우난자의 체외수정율과 배반포율 : 한우 난소의 난포로부터 난자를 흡입하여 10% FCS 첨가 TCM199 내에서 22시간 배양시킨 후 체외수정 및 배양하여 48시간후 난자의 수정율을 조사한 결과, 전체 총 644개의 난자중 분할된 난자는 377개로 58.5%의 수정율을 나타냈다 (Table 2).

수정된 난자중 체외수정후 7일, 8일, 9일, 10일, 11일 사이의 배반포기배로의 발달율은 각각 5.6%, 15.9%, 7.9%, 2.7%, 0.3%로서 배양 8일의 배반포기배로의 발달율이 15.9%로서 가장 높은 수치를 나타냈으며 배양 11일의 배반포기배로의 발달율이 0.3%로서 가장 낮은 수치를 보였다.

총 배반포기배로의 발달율은 32.4% 였다. 배반포의 발달상태는 Fig 1과 같다.

한우 체외수정란의 햄스터 H-Y 항체를 이용한 성감별 : 한우 16세포기배 및 compact 상실배를 각각 햄스터 H-Y 항체로 성감별한 결과 male 수정란으로 판단된, 발달정지된 수정란율은 16세포기배는 37.1%, compact 상실배는 48.9%로서 compact 상실배의 발달정지율이 더 높게 나타났다($p < 0.01$).

햄스터 H-Y 항체에 의해 발달정지된 수정란을 다시 H-Y 항혈청이 첨가되지 않은 TCM199 내에 배양하여 배반포기배로 재발달된 수정란율을 조사한 결과 16세포기배는 24.1%, compact 상실배는 44.3%로서 compact 상실배는 16세포기배에 비해 더 높은 재발달률을 나타냈다 ($p < 0.01$)(Table 3).

한우 및 유우 체외수정란의 햄스터 H-Y 항체를 이용한 성감별 비교 : 한우 및 유우의 compact 상실배를 각각

Table 1. Result of cytotoxicity test on hamster sperm with hamster H-Y antiserum after absorption with female or male hamster splenocytes(Mean±SD)

Dilution rate of H-Y antiserum	Percentage of dead sperm treated with H-Y antiserum and complement*		
	H-Y antiserum unabsorbed with splenocytes	H-Y antiserum absorbed with female splenocytes	H-Y antiserum absorbed with male splenocytes
1/2	$77.4\pm1.3^{A,a}$	$67.2\pm1.7^{B,a}$	$50.3\pm0.9^{C,a}$
1/4	$71.5\pm1.5^{A,b}$	$56.1\pm0.9^{B,b}$	$40.4\pm0.5^{C,b}$
1/8	$61.6\pm0.5^{A,c}$	$52.5\pm1.1^{B,c}$	$12.9\pm0.3^{C,c}$
1/16	$58.0\pm1.2^{A,d}$	$50.3\pm1.0^{B,c}$	$11.6\pm0.3^{C,c}$
1/32	$49.0\pm1.4^{A,e}$	$37.8\pm1.6^{B,d}$	$10.2\pm0.4^{C,c}$

* : Guinea pig serum was used as complement at dilution of 1 : 32.
A, B, C : Different superscripts denote significant differences within rows($p < 0.01$).
a, b, c, d, e : Different superscripts denote significant differences within columns($p < 0.01$).

Table 2. Result of *in vitro* fertilization of bovine oocytes and the rate of blastocysts in Korean cattle

No. of oocytes	No. of cleaved oocytes / Total no. of oocytes (%)	No. of blastocysts/No. of cleaved oocytes(%)					Total no. of blastocysts / Total no. of cleaved oocytes (%)
		Day posterior to IVF					
		7th	8th	9th	10th	11th	
644	377/644(58.5)	21/377(5.6)	60/377(15.9)	30/377(7.9)	10/377(2.7)	1/377(0.3)	122/377(32.4)

Table 3. Rate of developmental arrest of Korean cattle embryos incubated with hamster H-Y antibody for 6 hours and rate of re-development of arrested embryos incubated in cultrue medium without H-Y antibody(Mean±SD, n = 8)

Stage of embryos	No. of embryos	Rate of developmental arrest*	Rate of re-development**
16 cell	180	37.1 ± 2.3^{b}	24.1 ± 6.0^{b}
Compact morula	198	48.9 ± 2.2^{a}	44.3 ± 1.2^{a}

a, b : Different superscriptes denote significant differences within colums($p < 0.01$).
* : Number of arrested embryos / Total number of embryos(%).
** : Number of re-developmental embryos / Number of arrested embryos(%).

햄스터 H-Y 항체로 처리하여 male 수정란으로 성감별된, 발달정지된 수정란율은 한우 및 유우 각각 48.4%, 47.9%를 나타내었다. 또한 햄스터 H-Y 항체와 반응후 발달정지된 수정란을 H-Y 항혈청이 첨가되지 않은 TCM 199 내에 배양한 결과 배반포기배로 재발달된 한우 및 유우의 수정란율은 각각 42.6%, 41.8%를 나타내었다. 소 compact 상실배가 햄스터 H-Y 항체에 반응되기 전의 상태와 햄스터 H-Y 항체와 반응시 발달정지를 보이거나 배반포기배로 발달중인 상태는 각각 Fig 2, 3와 같고 햄스터 H-Y 항체와 반응시 발달정지된 수정란이 반응후 재발달을 보인 변화는 Fig 4와 같다. 햄스터 H-Y 항체와 반응된 한우 수정란의 발달정지율과 배반포로의 재발달률이 유우 수정란의 발달정지율과 배반포로의 재발달률보다 약간 높은 수치를 나타내었으나 유의차는 인정되지 않았다(Table 4).

성감별 수정란의 PCR방법에 의한 확인 : 한우 및 유우 compact 상실배에 대해 햄스터 H-Y 항체를 이용하여 성감별한 결과 10% H-Y 항혈청이 첨가된 TCM199 내에서 6시간동안 배양후 발달정지된 수정란 즉, male로 판단된 수정란율은 한우 수정란이 48.4%이고, 유우 수정란이 47.6%로서 한우 수정란의 발달 정지율이 유우 수정란의 발달정지율에 비해 약간 높은 수치를 나타내었으나 유의차는 인정되지 않았다. 또한 female 수정란 즉, H-Y 항체에 영향없이 발달이 진행된 수정란율은 한우에서 51.6%, 유우에서는 52.4%를 나타내어 유우 수정란에서 한우 수정란 보다 약간 높은 수치가 나타났으나 유의차는 인정되지 않았다.

H-Y 항체에 의해 성감별된 female과 male의 성비는 한우 수정란은 51.6% : 48.4%, 유우 수정란은 52.4% : 47.6%를 각각 나타냈다.

햄스터 H-Y 항체에 의한 성감별후 PCR 방법에 의한 성 판단결과 한우의 경우는 male과 female로 판별된 율은 각각 86.1%와 91.9%를 나타내었다. 유우의 경우는 male과 female이 각각 85.9%와 90.1%를 나타냈다. 한우와 유우 수정란 모두에서 H-Y 항체로 성감별후 PCR 방법으로 판별시 female 수정란에 대한 판별률이 male 수정란보다 더 높은 수치를 나타내었으나 유의차는 인정되지 않았다(Table 5).

햄스터 H-Y 항체를 이용하여 성감별한 소 수정란에 대해 PCR에 의해 성을 판정한 결과는 Fig 5와 같다. Fig에서 1, 5, 6, 7, 10번 수정란은 male로 2, 3, 4, 8, 9번 수정란은 female로 판정되었다.

Table 4. Rate of developmental arrest of bovine compact morulae incubated with hamster H-Y antiserum and rate of re-development of arrested embryos incubated in culture medium without H-Y antiserum between Korean cattle and Holstein(Mean±SD, n = 6)

Breeds	No. of embryos	Rate of developmental arrest*	Rate of re-development**
Korean cattle	126	48.4±3.0	42.6±2.8
Holstein	114	47.9±2.3	41.8±3.0

* : Number of arrested embryos / Total number of embryos(%).
** : Number or re-developmental embryos / Number of arrested embryos(%).

Table 5. Result of PCR method to determine sex of bovine compact morulae embryos sexed with hamster H-Y antibody according to different cattle breed(Mean±SD, n = 6)

Breed	No. of embryos	Presumptive sexing with H-Y antibody		Sexing by PCR	
		Male	Female	Male	Female
		Rate of embryos arrested*	Rate of embryos developed**	Rate of male embryos***	Rate of female embryos****
Korean cattle	192	48.4±1.4	51.6±1.5	86.1±1.9	91.9±2.9
Holstein	193	47.6±1.3	52.4±1.3	85.9±1.8	90.1±2.9

* : No. of embryos arrested / Total no. of embryos(%).
** : No. of embryos developed / Total no. of embryos(%).
*** : No. of male embryos / No. of presumptive male embryos(%).
**** : No. of female embryos / No. of presumptive female embryos(%).

고 찰

햄스터 H-Y 항체의 역가측정을 위한 세포독성 실험결과 햄스터 H-Y 항혈청의 2배부터 32배까지 전체 희석배율에서 hamster splenocytes와 흡수시키지 않은 H-Y 항혈청, female hamster splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청, male hamster splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청순으로 햄스터 정자의 사멸률이 낮아지는 결과가 나타났다. 이 결과는 Wachtel *et al*[36]이 C57BL/6 마우스를 이용하여 H-Y 항체를 생산하여 정자세포 독성검사를 한 결과와 그외 여러 연구자들[35,39,40]이 마우스를 이용한 H-Y 항체를 세포독성검사하여 발표한 결과와 유사하다고 생각된다. 이러한 결과가 나타난 이유는 항원 · 항체 · 보체반응에 의해 햄스터 H-Y 항원인 정자가 보체 및 H-Y 항체와 반응하여 세포독성으로 인해 정자가 죽게 된다. 또한 male hamster splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청과 반응된 정자에서 정자 사멸률이 낮게 나타난 것은 male hamster splenocytes와의 흡수과정을 통해 H-Y 항체의 독성이 감소되기 때문인 것으로 생각된다. Splenocytes 비흡수 H-Y 항혈청 및 female hamster splenocytes와 흡수시킨 H-Y 항혈청과 반응된 정자에서 정자 사멸률이 높게 나타나는 것은 이 혈청들중에는 흡수과정시 male cell의 H-Y 항원이 존재하지 않아 항원 · 항체가 결합된 상태가 아니므로 햄스터 항혈청내 H-Y 항체와 햄스터 정자의 H-Y 항원이 반응하여 정자의 사멸이 높게 일어난 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서 제조한 햄스터 혈청중에는 햄스터 H-Y 항체가 존재하고 있음을 증명하는 것으로 보여진다.

또한 H-Y 항혈청의 희석배율에 따라 정자 사멸률을 조사한 결과에서 splenocytes 비흡수 H-Y 항혈청이 정자 및 보체와 반응한 결과 2배 희석시의 정자 사멸률 77%에서 32배 희석시 49%까지 점차 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 Goldberg *et al*[35] 다른 연구자들[14,33]이 보고한 마우스 H-Y 항체의 정자세포 독성검사에서의 정자 사멸률과 유사한 수치는 아니나 H-Y 항혈청의 희석배율이 높을수록 정자 사멸률이 감소되는 경향은 유사하였다.

Female splenocytes 및 male splenocytes와 각각 흡수된 H-Y 항혈청의 희석배율에 따른 세포독성 실험결과도 희석배율이 높을수록 정자 사멸률이 낮게 나타나는 경향을 보였다. 이러한 결과를 종합하면 본 실험에서 H-Y 항체역가는 충분했던 것으로 보여진다.

본 실험에서 수정란 성감별을 위한 햄스터 H-Y 항체로는 10배로 희석한 항혈청을 사용하였는데 이것은 여러 연구자들[29~31]의 보고에서 수정란 성감별시 H-Y 항체 독성에 의해 수정란이 사멸되었다고 하였다. 그러나 Utsumi[21,22]는 수정란을 H-Y 항체와 배양중 male 수정란은 발육정지를 일으키나 항체제거시 다시 재발달되었다는 결과를 보고함으로써 male 수정란의 생존성을 유지할 수 있는 H-Y 항체의 적정 역가조정에 대한 필요성을 보고한 바 본 실험에서도 같은 목적으로 이용하고자 하였다.

본 실험중 소 체외수정 실험결과에서 한우 난자를 10% FCS가 첨가된 TCM199에서 22시간동안 배양한 후 한우 정자와 체외수정하여 48시간후 조사한 난자의 수정율은 58.5%를 나타내었다. 이 결과는 오 등[41]이 10% FCS가 첨가된 TCM199 내에서 배양하여 수정된 한우 난

자의 수정율이 54.6% 였다고 발표한 결과보다 약간 높은 성적이었으나 Itagaki[42]가 동일한 배지 및 유우 난자를 사용하여 보고한 68.1%의 수정율에 비해 약간 낮은 성적이었다. 본 실험의 결과가 Itagaki[42] 보다 낮은 성적을 보인 것을 Itagaki[42]가 보고한 수정율은 체외수정후 72시간을 기준하여 관찰한 결과이므로 48시간 이후 분할된 난자수가 포함되어 수정율이 더 높게 나타난 것으로 생각된다.

체외수정후 배양일에 따른 배반포기배의 발달율은 체외수정후 7일, 8일, 9일, 10일, 11일에 각각 5.6%, 15.9%, 7.9%, 2.7%, 0.3%를 나타내어 체외수정후 8일에 가장 높은 배반포기배로의 발달을 보였다. Rehman *et al*[43]이 Buffalo Rat Liver Cells(BRLC)가 첨가된 TCM199와 Bovine Oviduct Epithelial Cells(BOEC)가 첨가된 TCM199 내에서 체외수정후 7일부터 9일까지 배양일에 따른 각각의 배반포기배로의 발달율 비교에서도 배양 8일에 BRLC가 첨가된 배지는 46.5%의 배반포기배로의 발달율을, BOEC가 첨가된 배지는 45.3%의 배반포기배로의 발달율을 나타내어 본 실험의 성적과는 다소 차이는 있으나 배반포기배로의 발달율이 체외수정후 8일에 가장 높은 성적을 나타냈다고한 결과와는 일치한다. 이 밖에도 Aoyagi *et al*[44]이 체외수정시 배반포기배로의 발달율이 8일에 가장 많이 나타난다고 보고하고 있어 본 실험의 결과와 일치하는 것으로 보인다.

본 실험에서 전체 총 수정된 난자중 배반포기배로의 발달율은 32.7%로 Bevers *et al*[45]이 보고한 30.1%와 약간의 차이는 있으나 거의 유사한 성적을 보였으며 Furnus *et al*[46]도 이와 유사한 배반포기배로의 발달율을 보고하였다. 이 실험에서 한우 난자를 이용하였으므로 상기 연구자들이 사용한 유우 난자에서의 결과와 비교할 때 품종간에 큰 차이는 인정되지 않는 것으로 보인다. 이 실험에서 별도의 실험계획을 세우지는 않았으나 반복된 체외수정 실험에서 볼 때 체외수정의 성공을 결정지을 수 있는 인자로서는 난자를 둘러싸는 난구세포의 상태, 체외수정에 사용되는 정자의 수정능력 및 정자수, 수정후 난자의 오염성 여부 등이 중요한 인자라고 생각된다.

본 실험에서 한우 16세포기배와 compact 상실배를 햄스터 H-Y 항체에 의해 성감별한 결과 male 수정란으로 판단되는 발육정지된 수정란율은 compact 상실배에서 16세포기배에 비해 더 높게 나타났다. 16세포기배와 compact 상실배를 H-Y 항체에 의해 성감별한 비교 자료는 접하기 어려우나 Krco *et al*[33]및 다른 연구자들[34,47]은 포유동물의 수정란내 H-Y 항원의 발현은 8세포기 이후에서만 인정되고 있다고 보고하고 있다. 이 점을 감안할 때 16세포기배 단계의 수정란은 com-pact 상실배 단계의 수정란 보다 H-Y 항원의 면역원이 약하여 햄스터 H-Y 항체에 대한 반응이 적게 나타난 것으로 생각된다.

상기의 결과에서와 같이 발육정지된 수정란을 male 수정란으로 발육이 진행중인 수정란을 female 수정란으로 성감별할 수 있었는데 이 결과는 마우스 H-Y 항체로 성감별을 한 Avery와 Schimidt[20], 양 등[48] 그리고 랫트 H-Y 항체를 이용한 Utsumi *et al*[21], 박 등[23], 고 등[49]의 결과와 비교해볼 때 햄스터에서도 H-Y 항체를 제작할 수 있다는 사실과 햄스터 H-Y 항체를 이용해서도 소 수정란 성감별에 이용할 수 있음을 인정할 수 있는 결과로 판단된다.

또한 본 실험에서 H-Y 항체에 의해 발달정지된 수정란을 TCM199로 washing 한 후 H-Y 항체가 없는 TCM 199내 재배양하여 배반포기배로 재발달된 수정란율을 조사한 결과 16세포기배에서 compact 상실배 보다 더 낮은 배반포기배로의 발달율을 나타냈는데 이 결과는 H-Y 항체가 compact 상실배 보다 16세포기배 단계의 수정란에 더 유해한 영향을 미쳤거나 16세포기배의 재발달 능력이 더 약했던 것으로 생각된다.

본 실험에서 한우 및 유우의 compact 상실배 단계의 수정란을 햄스터 H-Y 항체에 의해 성감별하여 male 수정란으로 판단되는 발달정지된 수정란율은 각각 48.4%, 47.9%로 나타났다. Utsumi *et al*[21]은 랫트 H-Y 항체를 이용하여 compact 상실배 단계의 소 수정란을 성감별한 결과 51%의 수정란이 발달정지되었다고 하였고 이를 잠정적인 male 수정란으로 판단하였다. 본 실험의 결과는 이보다 약간 낮은 수치이기는 하나 King *et al*[50] 및 다른 연구자들[41,51]이 보고한 바와 같이 *in vivo* 및 *in vitro* 소수정란에서 male 수정란과 female 수정란의 성비가 50 : 50이라고 한 것과 크게 벗어나지 않은 범위로 생각된다.

햄스터 H-Y 항체에 의해서 성감별한 후 H-Y 항체가 없는 TCM199에서 재배양하였을 때 발육정지 되었던 compact 상실배가 배반포기배로 재발달된 수정란율은 한우 및 유우 수정란에서 각각 42.6%, 41.8%를 나타내었다. 이 실험의 결과는 Utsumi *et al*[21]이 랫트 H-Y 항체로 성감별한 후 발육정지되었던 소 수정란의 재발달률이 40%라고 한 것과 유사한 결과이다.

이 결과를 볼 때 Utsumi *et al*[21]이 랫트 H-Y 항체를 이

용한 경우에서와 같이 햄스터 H-Y 항체를 이용해서도 소 수정란에서 male 수정란에 대한 사멸을 일으키지 않고 성감별할 수 있음을 확인할 수 있는 것으로 판단된다.

이 실험에서 햄스터 H-Y 항체에 의해서 잠정적으로 성감별된 한우 및 유우 수정란을 PCR 방법에 의하여 성을 확인한 결과 male 수정란의 확인율은 한우와 유우 각각 86.1%와 85.9%를 나타내었다. Utsumi *et al*[21]은 성 염색체 검사를 이용하여 랫트 H-Y 항혈청에 의해 male로 간주된 수정란의 성을 확인한 결과 78%가 male 수정란임을 확인하였고 수정란 이식후 태어난 산자의 성을 확인한 결과는 94%가 male 수정란임을 확인하였다.

이와같이 H-Y 항체를 이용하여 수정란의 성을 감별하는 방법은 연구자에 따라 확인하는 방법에 약간의 차이는 있으나 대체적으로 80% 이상의 정확성을 나타내고 있다.

한편 이 실험에서 햄스터 H-Y 항체에 의해 female로 성감별된 한우 및 유우의 수정란을 PCR 방법에 의해 성을 확인한 결과는 각각 91.9%, 90.1%로 나타나 male 수정란에 대한 확인율에 비해 다소 높은 성적을 나타냈다. 이 결과는 박 등[23]이 토끼에서 H-Y 항체에 대해 반응을 보이지 않은 수정란을 수정란 이식후 생산된 산자에서 female로 확인하여 86%의 정확율을 보고한 것과 Utsumi *et al*[21]이 H-Y 항체에 반응을 보이지 않은 수정란을 성염색체 분석에 의해서 female로 확인한 90%의 정확율과 거의 같았다. 이 실험에서 male 수정란에서 PCR 방법에 의한 성 확인율이 female 수정란의 확인율 보다 약간 낮게 나타난 것은 H-Y 항체에 의해서 발육정지된 수정란을 TCM199 내에서 재배양하여 48시간까지 배반포기배로의 발달율을 확인한 후 PCR 방법에 공여하였으므로 수정란의 약간의 변성으로 인해 male 수정란으로부터 DNA가 추출되는데 문제점이 있어 중합효소 연쇄반응이 정상적으로 일어나지 않았을 가능성도 배제할 수 없다고 생각된다.

PCR 방법에 의한 성감별 방법은 male gene을 확인함[31,32,42,52,53]으로써 이루어지기 때문에 이론적으로 그 성공률은 100%에 해당된다고 본다. 그러나 gene이 표현될 수 있는 세포량의 절대 부족 또는 PCR 처리과정중 gene의 오염 등에 의해 PCR 반응이 표현되지 않을 수 있는 점[54]이 존재하므로 완벽한 실험기술이 요구되며 이 실험에서 H-Y 항체로 성감별된 수정란에 대하여 PCR 방법은 상기 결과로 볼 때 확진의 진단방법으로서 매우 적당하다고 생각된다.

상기의 결과에서 소수정란의 성감별시 햄스터 H-Y 항체를 이용한 성감별은 수정란에 대한 손상없이 생존성에 지장을 주지 않고 성감별하고자 할 때 그리고 PCR 방법은 수정란 성감별의 정확성을 높이고자 할 때 각각 이용될 수 있는 방법으로 판단된다.

결 론

한우 및 유우 수정란의 성감별을 위하여 햄스터 H-Y 항체 이용방법 및 PCR 방법을 사용하였다. 한우 및 유우 수정란은 *in vitro* 수정란을 이용하였으며 햄스터 H-Y 항체는 5년 이상 inbred 된 8~9주령의 golden hamster로부터 얻었고 PCR 방법은 BRY.1 Primers(Forward primer: 5'-GGATCCGAGACACAGAACAG-3', Reverse primer: 5'-CAAGCTAATCCATGCATCCT-3')를 이용하였다.

햄스터 H-Y 항체를 이용한 성감별은 compact 상실배의 소수정란을 10% 햄스터 H-Y 항혈청 첨가 TCM199내 6시간 배양하여 발육이 정지된 수정란을 male 수정란으로, 발육이 진행중인 수정란을 female 수정란으로 판단하였고 이것을 PCR 방법으로 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. H-Y 항체의 역가를 측정하기 위해 햄스터 H-Y 항체의 정자에 대한 독성검사결과 male hamster의 splenocytes와 흡수된 H-Y 항혈청과 반응된 정자는 female hamster의 splenocytes와 흡수한 H-Y 항혈청 및 splenocytes 비흡수 H-Y 항혈청과 반응된 정자보다 정자 사멸수가 현저히 낮게 나타났다($p < 0.01$).

2. 한우 체외수정시 수정율은 58.5%의 성적을 보였고 수정된 난자중 배반포기배로의 발달률은 32.4%를 나타내었다. 체외수정후 발달일에 따른 배반포기배로의 발달률은 체외수정후 8일에서 15.9%로 가장 높게 나타났다.

3. 햄스터 H-Y 항체를 이용하여 한우의 16세포기배 및 compact 상실배를 성감별한 결과 male 수정란으로 진단된 발육정지된 수정란은 각각 37.1%와 48.9%였으며 발육정지된 수정란을 성감별후 재배양한 결과 배반포기배로 발달된 수정란율은 각각 24.1%와 44.3%로서 compact 상실배가 더 높은 성감별률과 성감별후 재발달률을 보였다($p < 0.01$).

4. 한우 및 유우의 compact 상실배를 H-Y 항체로 성감별한 결과 발달정지된 수정란(male)은 각각 48.4%와 47.9%였으며 성감별후 재배양한 결과 배반포기배로 발달된

수정란율은 각각 42.6%와 41.8%로서 상호간에 유의차가 인정되지 않았다.

5. H-Y 항체를 이용하여 성감별된 한우및 유우 수정란에 대해 PCR 방법에 의해 성을 확인한 결과 male 수정란 확인율은 한우 및 유우 수정란 각각 86.1%와 85.9%였으며 female 수정란 확인율은 한우및 유우 수정란 각각 91.9%와 90.1%로서 한우 및 유우 수정란 상호간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

이상의 결과에서 한우 및 유우 수정란 성감별에 햄스터 H-Y 항체를 이용할 수 있다는 점, 햄스터 H-Y 항체를 적정한 역가로 사용시 수정란의 생존성을 유지할 수 있다는 점, 햄스터 H-Y 항체 이용시 PCR 방법을 이용하여 확인이 가능하다는 점을 알게 되었다.

Legends for figures

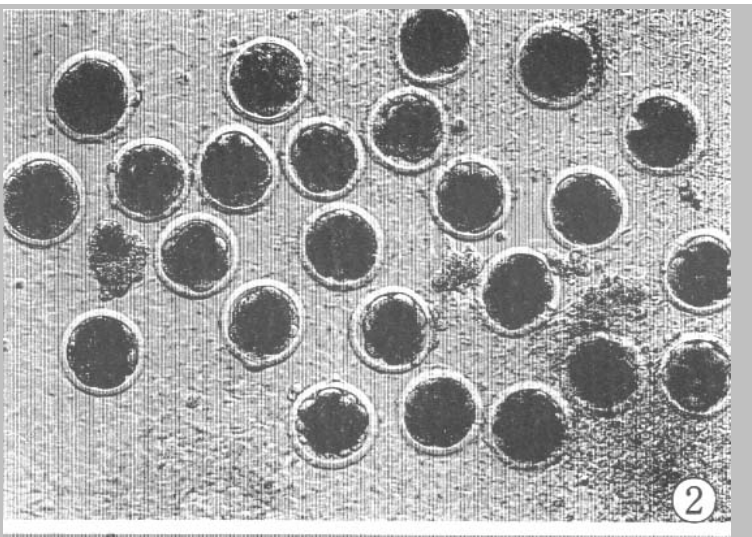
Fig 1. A bovine expanded blastocyst Inverted Microscope. × 200.

Fig 2. Bovine compact morulae before incubation with H-Y antiserum for sex determination. Inverted Microscope. × 100.

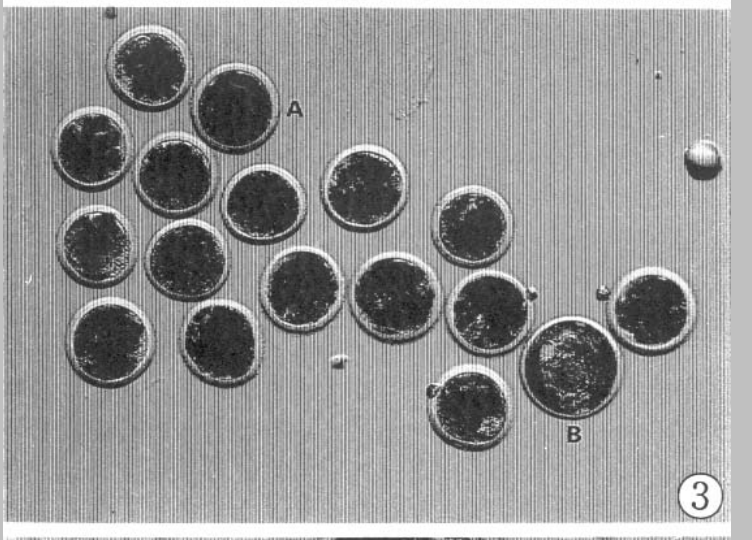
Fig 3. A bovine compact morula with developmental arrest(A) and an embryo developed to early blastocyst(B) after incubation with hamster H-Y antiserum for 6 hours. Inverted Microscope. × 100.

Fig 4. Bovine embryos redeveloped to early blastocysts(arrow) in TCM199 without H-Y antiserum after developmental arrest by hamster H-Y antibodies. Inverted Microscope. × 200.

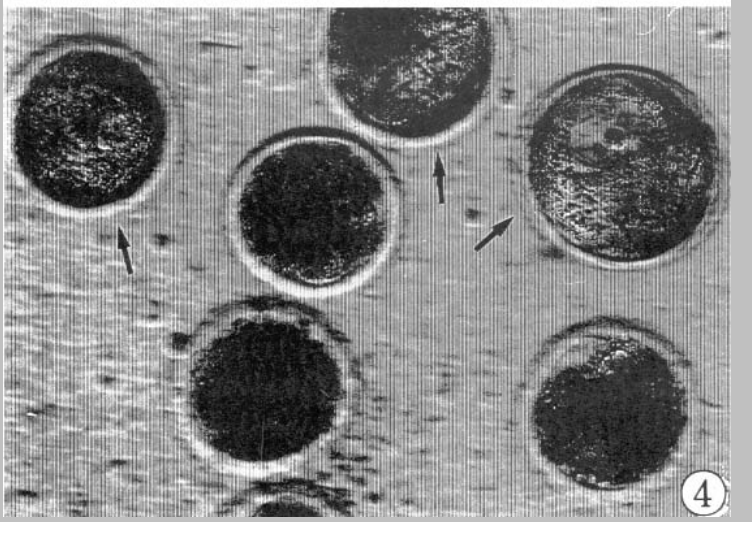
Fig 5. Agarose gel electrophoresis of PCR products from bovine embryos after presumptive sexing with hamster H-Y antibody.
P : PCR marker(Promega); M : genomic DNA from blood sample of male cattle, positive control.
F : genomic DNA from blood sample of female cattle, negative control.
Lanes 1, 5, 6, 7, 10 : males; Lanes 2, 3, 4, 8, 9 : females.



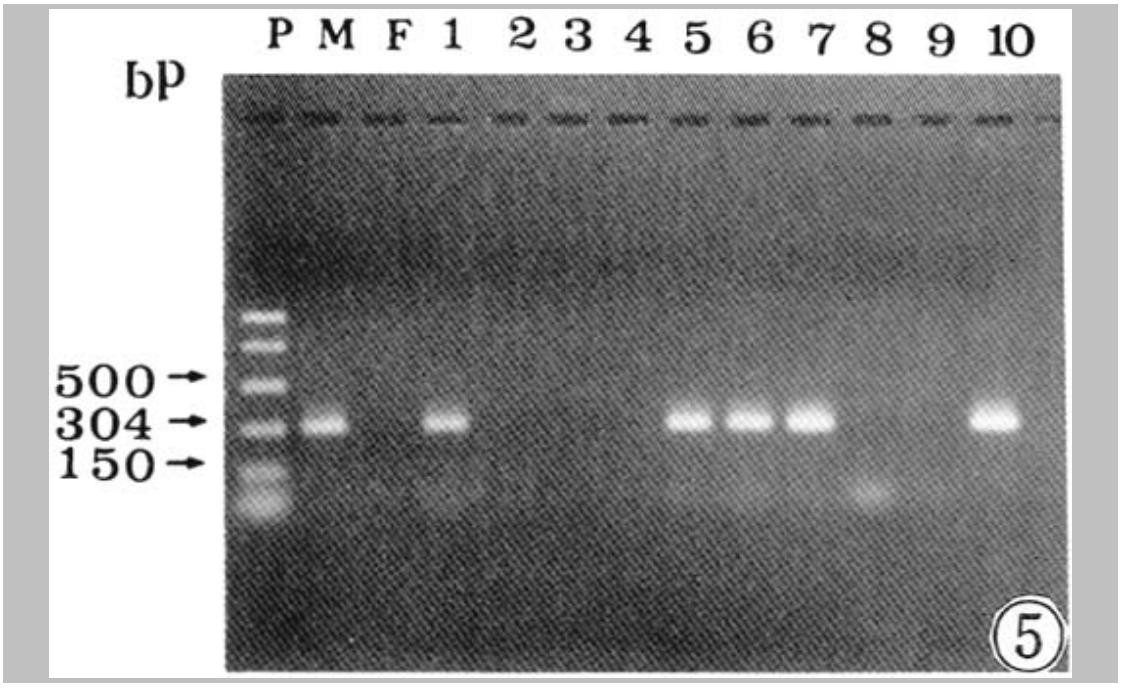
2



3



4



참 고 문 헌

1. Binor Z, Rao R, Hans van der Ven, *et al*. The effect of albumin gradients and human serum on the longevity and fertilizing capacity of human spermatozoa in the hamster ova penetration assay. *Fertil Steril*, 38: 222-226, 1982.
2. Lindahl PE. Centrifugation as a means of separation X- and Y-chromosomes bearing sperm. *A Symp Anim Sci*, 69:1971.
3. Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, *et al*. Separation of human X-and Y-bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. *Feril Steril*, 40:661-665, 1983.
4. Rhode W, Porstmann T, Prehn S, *et al*. Gravitational pattern of Y-bearing human sperm in density gradient centrifugation. *J Reprod Fertil*, 42:587-591, 1975.
5. Shastry PR, Hedge UC, Rao SS. Use of ficoll sodium metrizoate density gradient to separate human X- and Y-bearing spermatozoa. *Nature*, 269:58-60, 1977.
6. Landa CA, Almouist JI, Amann RP. Factors influencing Sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa. *J Dairy Sci*, 63:277-282, 1980.
7. Nevo AC, Michaeli I, Schindler H. Electrophoretic Properties of bull and of rabbit spermatozoa. *Exp Cell Res*, 23:69-83, 1961.
8. Sevinc A. Experiments on sex control by electrophoretic separation of spermatozoa in the rabbit. *J Reprod Fertil*, 16:7-12, 1968.
9. Kaiser R, Broer KH, Citoler P, *et al*. Penetration of spermatozoa with Y chromosomes in cervical mucus by an *in vitro* test. *Geburtshilfe Frauenheikd*, 34:426-430, 1974.
10. Rhode W, Porstmann T, Dorner G. Migration of Y-bearing spermatozoa in cervical mucus. *J Reprod Fertile*, 33:157-160, 1973.
11. Brandriff BF, Gordon LA, Haendel S, *et al*. Sex chromosome ratio determined by karyotypic analysis in albumin isolated human sperm. *Fertil Steril*, 46:678-685, 1986.
12. Sumner AT, Robinson JA, Evans HJ. Distinguishing between XY and YY bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content, *Nature*, 229:231-235, 1971.
13. Otto FJ, Hacker U, Zante J, *et al*. Flow cytometry of human spermatozoa. *Hist Chem*, 61:249-254, 1979.
14. Bennett D, Boyse EA. Sex ratio in progency of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature*, 246:308-309, 1973.

15. McLaren A. Immunological control of fertility in female mice. *Nature*, 201:582-585, 1964.
16. Esptein CJ, Smith S, Travis B, *et al*. Both X-chromosomes function before visible X-chromosome Inactivation in female mouse embryos. *Nature*, 274:500-503, 1978.
17. Iwaskai S, Nakahara T. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33:669-675, 1990.
18. King WA. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology*, 21:7-17, 1984.
19. 송시한, 박충생, 송상현. 염색체분석기법에 의한 소 체외수정란의 성조절. 한국가축번식학회지, 20:179-190, 1996.
20. Avery B, Schmidt M. Sex determination of bovine embryos using H-Y antibodies. *Acta Vet Scand*, 30:155-164, 1989.
21. Utsumi K, Hayashi M, Takakura R, *et al*. Embyo sex selection by a rat male-specific antibody and the cytogenetic and developmental confirmation in cattle embryos. *Mol Reprod Develop*, 34:25-32, 1993.
22. Utsumi K, Satoh E, Iritani A. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *Exp Zool*, 260:99-105, 1991.
23. 박영일, 임경순, 한재용 등. Y 염색체 특이성 DNA 분리와 단일 H-Y 항체 개발에 의한 토끼의 수정란 성감별에 관한 연구 I. 정소를 항원으로한 H-Y 항혈청에 의한 토끼 수정란의 성판별. 한국가축번식학회지, 20:53-63, 1996.
24. 최화식, 임경순, 진동일. H-Y 항체에 의한 토끼배의 성감별과 이등분 절단 토끼배의 융배에 관한 연구. 한국가축번식학회, 21:85-93, 1997.
25. Williams TJ. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, 25:733-739, 1986.
26. Avery B, Bak A., Schmidt M. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology*, 32:139-147, 1989.
27. Itagaki Y, Kimura N, Yamanaka M, *et al*. Developmental rate differences and sex of bovine preimplantation embryos generated *in vitro*. *J Mamm Ova Res*, 12:73-78, 1995.
28. 이상영, 양부근, 김정익. Mouse 초기배의 발육속도에 따른 성비에 관한 연구. 한국가축번식학회지, 11:218-222. 1987.
29. Agrawala PL, Wagner VA, Geldermann H. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology*, 38:969-978, 1992.
30. Bredbacka P, Kankaanpää A, Peippo J. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology*, 44:167-176, 1995.
31. Itagaki Y, Kimura N, Yamanaka, *et al*. PCR sexing and survival following embryo biopsy-bisection of *in vitro* produced bovine embryos. *J Mamm Ova Res*, 13:48-51, 1996.
32. Kudo T, Sato S, Sutou S. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *Reprod Develop*, 39:55-63, 1993.
33. Krco CJ, Goldberg EH. H-Y(Male) antigen: Detection on eight-cell mouse embryos. *Science*, 193:1134-1135, 1976.
34. Wachtel SS. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*, 21:19-28, 1984.
35. Goldberg EH, Boyse EA, Bennett D, *et al*. Serological demonstration of H-Y (Male) Antigen on mouse sperm. *Nature*, 232:478-480, 1971.
36. Wachtel SS, Koo GC, Bennet D, *et al*. Serological crossreactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc Nat Acad Sci*, 71:1215-1218, 1974.
37. Peippo J, Bredbacka P. Fast sample preparation with dithiothreitol for bovine embryo sex determination by the polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 47: 272, 1997.
38. 황윤식, 한용만, 이철상 등. PCR 방법을 이용한 소 수정란의 성판별. 한국가축번식학회지, 18:275-284, 1995.

39. Piedrahita JA, Anderson GB. Investigation of sperm cytotoxicity as an indicator of ability of antisera to detect male-specific antigen on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil*, 74:637-644, 1985.
40. Wachtel SS, Koo GC, Boyse EA. Evolutionary conservation of H-Y('male') antigen. *Nature*, 254:270-272, 1975.
41. 오성종, 양보석, 임경순. PCR 기법에 의한 수정란의 성판별과 체외수정란의 발생속도가 성비에 미치는 영향. 한국가축번식학회지, 2:443-451, 1996.
42. Itagaki Y, Sato S, Shitanaka Y, *et al*. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction : Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. *Reprod Develop*, 39:65-71, 1993.
43. Rehman N, Collins AR, Suh TK, *et al*. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cocultured with buffalo rat liver cells. *Theriogenology*, 41:1453-1462, 1994.
44. Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, *et al*. Effects of culture systems on development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34:749-759, 1990.
45. Bevers MM, Dieleman SJ, Van den Hurk R, *et al*. Regulation and moleculation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47:13-21, 1997.
46 Furnus CC, Matos DG, Martinez AG, *et al.* Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viabilityof in-vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 47:481-490, 1997.
47. Anderson GB. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27:81-97, 1987.
48. 앙부근, 김정익. H-Y 항체에 의한 생쥐초기배의 성판별에 관한 연구 I. 세포발육능 검사에 의한 성판별. 한국가축번식학회지, 12:31-36, 1998.
49. 고광두, 양부근, 정회태. 염색체 분석 및 H-Y 항체처리에 의한 우수정란의 성판별에 관한 연구. 한국 수정란 이식연구회지, 3:48-52, 1998.
50. King WA, Yadav BR, Xu KP, *et al*. The sex ratios of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, 36:779-788, 1991.
51. Yadav BR, King WA, Xu KP, *et al*. Sex ratio of bovine embryos produced in fertilization *in vivo* and *vitro*. *Theriogenology*, 33:356, 1990.
52. Herr CM, Matthaei KI, Steel T, *et al.* Rapid Y-chromosome-assay sexing of peripheral blood lymphocytes from bovine of known phenotypic sex. *Theriogenology*, 33:246, 1990.
53. Peura T, Hyttinen JM, Turunen M, *et al*. Preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 35:547-555, 1984.
54. Hilgers LJ, Herr C. DNA contamination of reagents used in embryo transfer and culture. *Theriogenology*, 40:923-932, 1993.