

PCR 기법에 의한 소 수정란의 음성 특이적 DNA Band 출현과 성 판별에 관한 연구

김현중 · 오성중* · 김성우 · 최화식** · 윤종택*** · 정구민**** · 임경순
서울대학교 농업생명과학대학

Study on Sex Determination and Detection of Male Specific DNA Band in Bovine IVF Embryos Using Polymerase Chain Reaction

H. J. Kim, S. J. Oh*, S. W. Kim, H. S. Choi**, J. T. Yoon***, K. M. Chung**** and K. S. Im

College of Agriculture and Life Science, Seoul National University

SUMMARY

This study was carried out to determine the sex of genomic and embryonic DNA using polymerase chain reaction(PCR). Bovine specific(216bp) and Y chromosome specific DNA primers(141bp) were synthesized and tested for sexing. Bovine embryos used in this study were produced by *in vitro* fertilization. Few blastomeres for PCR were bisected by micromanipulator and demi-embryos were cultured in TCM 199 medium containing 0.1% of solcoseryl.

The results obtained were as follows;

1. Average optical density of genomic DNA extracted from blood of Hanwoo was 1.79 ± 0.14 .
2. The ratio of the demi-embryos developed to blastocyst was 62.1 and 81.9% in morula and blastocyst, respectively.
3. When DNA of 2~4, 5~10 and more than 11 blastomeres was amplified with Y chromosome specific DNA primer by PCR, appearance rate of Y specific DNA band was 16.7, 46.2 and 40.0%, respectively. At least 5 to 10 blastomeres were required to determine the sex of embryos.
4. The rate of demi-embryos developed to blastocyst was 73.3% in TCM 199 medium supplemented with 0.1% solcoseryl, but 55.6% in control.

(Key words : PCR, embryos sexing, splitting, Y chromosome specific DNA primer)

서 론

소 수정란 이식기술이 산업적으로 이용되면서 가축 능력개량의 촉진에 괄목할 만한 기여를 하고 있

으나 수정란의 생산 및 이식에 비용이 많이 들고 원하는 성을 생산하는데는 한계가 있다. 그러므로 원하는 성의 수정란을 사전에 확인하고 이식하여 산자를 생산할 수 있다면 수정란 이식 산업의 활성화에 획기적인 기여를 하게 될 것이다.

* 축산기술연구소 ** 김천전문대학 *** 국립안성산업대학교 **** 한국생명과학연구소
본 연구는 1993~1994 건국대학교 동물자원연구센터 연구비에 의해 수행되었음.

이식하기전의 수정란을 이용한 성관별에 관한 연구는 1968년 Gardner와 Edwards가 sex chromatin을 이용하여 토끼 수정란의 성관별에 성공한 이래 많은 연구들이 수행되어져왔다. 수정란의 성관별 방법은 성 염색체(德丸 등, 1991)와 H-Y항체(White 등, 1983; Wachtel, 1984)를 이용한 연구가 많이 이루어졌으나 아직까지도 정확성과 효율에 문제가 있어 실용화에 이르지 못하고 있는 실정이다. 그러나 수정란의 일부 할구를 분리하여 할구의 Y 염색체 DNA를 증폭하여 짧은 시간내에 수정란의 성을 판별하는 기술이 보고되고 있다(돼지; McGlaw 등, 1988와 사람; Nakahori, 1986). 소에 있어서는 Herr와 Reed(1991) 및 Bondioli 등(1989)은 Y chromosome specific polynucleotides를 이용하여 수정란의 성을 판별하는 연구를 수행하였으며 Herr(1990) 등은 혈액세포 및 수정란을 간편하게 성관별하는 방법을 개발하였고 유럽이나 일본 등에서는 PCR기법을 이용 수정란의 성을 판별하여 이식하는 것이 산업화 되고 있다.

PCR기법에 의한 수정란의 성관별을 위하여 적정 할구수, 분리할구의 배양 및 PCR조건 등에 대한 연구가 많이 수행되었다(Agrawala 등, 1992). 소의 상실배 및 배반포 수정란에서 5~6개의 할구를 분리하여 PCR로 증폭하였던 바 92개의 수정란중 90개에서 정확히 성관별이 되었다고 보고하였다. 그러나 아직도 정확한 primer의 개발과 이를 효율적으로 증폭시키는 방법에 대하여는 연구자에 따라 다르고 특히 수정란 할구의 성을 판별하는데는 primer의 양은 물론 적정 할구의 수 및 PCR를 위한 전처리 조건 등이 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 소의 Y염색체 특이적 DNA primer를 제조하여 혈액 및 수정란에서 정확한 성관별을 위한 여러 조건을 구명하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 체외수정란 생산

1) 난포란의 회수 및 체외성숙

도축장에서 도축되는 한우의 난소를 항생제가 첨가된 25°C의 멸균 식염수에 침적하여 2시간 이내로

실험실로 옮겨 37°C의 멸균된 생리 식염수로 2~3회 세척한 다음 직경이 2~7mm의 난포로부터 난자를 흡인 채란하였다. 채란된 난포란은 실체현미경하에서 난구세포가 충실히 있는 것만을 선별하여 공시하였다.

난포란의 체외 성숙은 TCM-199(Gibco, 미국)에 5%의 fetal calf serum(Gibco, 미국)과 antibiotic-antimycotic(Gibco, 미국)을 첨가하여 0.2 μ m의 filter로 여과하였다. 여과된 체외성숙 배양액을 500 μ l drop을 만들어 mineral oil(Squibb, 미국)로 덮은 다음 CO₂ incubator에서 20시간 체외 성숙을 시켰다.

2) 체외수정 및 수정란 배양

한우 동결정액을 38°C에 30초간 용해한 후 5mM의 caffein-sodium benzonate(Sigma, 미국)와 10 μ g/ μ l의 Heparin(Sigma, 미국)이 첨가된 B.O.액(Brackett와 Oliphant, 1975)을 이용하여 500g에서 5분간 2회 원심분리하고 소 혈청 알부민(Sigma, 미국)이 첨가된 체외수정용 B.O.액으로 최종 정자농도가 5 \times 10⁶/ml 되게 조정하였다. 정자농도가 조정되고 수정능력이 획득된 정자를 100 μ l의 small drop에서 15~20개의 체외성숙된 난자와 6~12시간 체외수정시켰다. 수정후 난자는 TCM-199으로 5회 이상 세척하여 난자 주위의 정자를 깨끗이 씻어준 후 난구세포위에 공배양하였다. 수정용 배양액에서 발생배지로 옮긴 수정란은 5%의 FCS를 첨가한 TCM-199 배양액을 이용 5%의 CO₂ incubator에서 9일간 배양하였으며 매 48시간마다 배양액의 1/2을 신선한 것으로 교환하여 주었고 매 24시간마다 난구세포와 수정란을 분리시켜 주었다.

2. 수정란 미세분리 및 PCR 성관별

1) 수정란의 미세분리 및 배양

체외수정으로 생산된 배반포이상의 수정란을 신선한 PBS로 2~3회 세척한 후 0.1%의 solcoceryl이 첨가된 100 μ l의 small drop에 넣어 micromanipulator에 bio-cut blade(Feather, 일본)를 이용하여 배반포 수정란의 내세포피(inner cell mass)와 영양아 세포가 반분되게 절단하거나 trophectoderm

의 5~10개의 할구를 분리하여 수정란의 성판별에 공시하였다.

수정란의 분리후 demi-embryo는 곧바로 20% FCS가 함유된 TCM-199배양액으로 3~4회 씻어 주었으며 난구세포의 monolayer가 형성된 500 μ l drop에 옮겨 24~48시간 동안 공배양하였다. 공배양액은 0.1%의 solcoceryl(영진약품, 한국)과 20%의 FCS가 들어 있는 TCM-199 배양액을 사용하였다.

3. 수정란의 성판별을 위한 oligonucleotide primer의 제조

소 특이적 그리고 Y염색체 특이적 DNA primer는 Table 1과 같고 primer의 배열과 크기는 각각 216bp와 141bp이다. 합성된 primer는 genomic DNA와 소 수정란 할구의 DNA 증폭을 위하여 사용하였다.

1) PCR 및 전기영동

혈액세포 DNA를 증폭시키기 위하여 합성된 소 Y염색체 특이적 primer와 소 특이적 primer를 thermocyclers(Single Block System, 미국)를 사용하여 증폭하였다. 0.5ml의 eppendorf tube(reaction tube)에 5 μ l의 10 \times buffer, 2.5unit의 Taq DNA polymerase(BM, 독일), 4 deoxynucleotide triphosphates(각 1 μ l), genomic DNA 0.2~1 μ g 그리고 합성한 primer 각 200ng을 넣고 평균중류수로 최종량이 50 μ l 되게 한 후 vortex로 완전히 혼합하고 그 위에 PCR 증폭시 수분증발을 방지하기 위하여 mineral oil(light, Sigma) 30 μ l를 넣어 기질의 DNA를 증폭시켰다.

PCR증폭은 첫번째 cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation을 실시하였고 두번째 cycle 부터는 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 an-

nealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 30초간 extension을 30~40 cycles 실시하였고 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 하였다. PCR반응이 끝난 후 2%의 agarose gel로 전기영동하여 PCR 산물(products)을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 소의 genomic DNA의 추출 및 primer의 검정

한우 암수 각 5두의 경정맥에서 채혈한 혈액 16.5ml를 ACD(acid citrate dextrose solution)용액 3.5ml와 혼합하여 -70 $^{\circ}$ C의 deep freezer에 보존 후 Sambrook 등(1991)의 방법으로 phenol을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. DNA의 순수도를 원자분광 흡광도로 측정한 O.D. 값은 1.79이상으로 비교적 순수한 genomic DNA가 소의 혈액으로부터 추출되었다.

합성 제조한 primer를 이용하여 혈액세포의 DNA를 PCR로 증폭시킨 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. Lane 1과 2, Lane 5와 6은 양성 genomic DNA, 그리고 Lane 3와 4는 자성 genomic DNA를 각각 Y염색체 특이적 혹은 소 특이적 DNA primer로 PCR 한 결과이다. 양성 특이적 DNA band는 정확히 Y염색체가 존재시에만 검출되었고 Lane 3과 4와 같이 자성의 DNA에서는 증폭하지 못하고 있다. 그러나 소 특이적 DNA band는 양성 혹은 자성 모두에서 검출되고 있어 본 연구에서 제조한 Y염색체 특이적 및 소 특이적 DNA primer들은 genomic DNA에서 정확히 성을 판별할 수 있음을 나타냈다.

Utsumi 등(1992) 및 Agrawala 등(1992)은 141bp의 Y 염색체 특이적 DNA primer를 이용하여 혈액 DNA에서 정확한 성을 판별할 수 있었다는 보고와 본 연구 결과와는 일치되고 있다. 그리고 Appa Rao 등(1993)도 Y 특이적 DNA primer로 genomic

Table 1. Oligonucleotide primer sequences for embryo sexing by PCR

Primer	Sequences	Fregment size
Bovine specific	5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3'	216bp
	5'-TCG TCA GAA ACC GCA CAC TG-3'	
Bovine Y chromosome specific	5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3'	141bp
	5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3'	

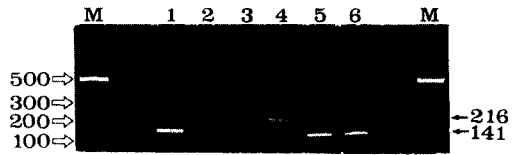


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified with Y-chromosome specific(141 bp) and bovine specific DNA primer(216bp). M : DNA size marker(100bp ladder)
 Lane 1 : male genomic DNA amplified with Y-chromosome specific DNA primer
 Lane 2 : male genomic DNA amplified with bovine specific DNA primer
 lane 3 : female genomic DNA amplified with Y-chromosome specific DNA primer
 Lane 4 : female genomic DNA amplified with bovine specific DNA primer
 Lane 5 and 6 : male genomic DNA amplified Y-chromosome specific and bovine specific DNA primer

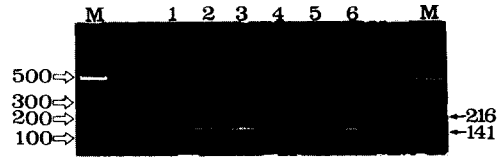


Fig. 2. Sex determination in bovine blastocysts by PCR.

M : DNA size marker(100bp ladder)
 Lane 1, 4 and 5 : female embryos
 Lane 2, 3 and 6 : male embryos

2. 수정란의 성판별을 위한 적정 할구 분리 및 배양

수정란의 성을 판별하기 위하여 체외수정에 의하여 생산된 좋은 질의 상실배 및 배반포 수정란을 micromanipulator로 미세분리하여 일부는 PCR 기법에 의한 수정란의 sexing에 사용하고 나머지는 이식 혹은 동결에 사용하기 위하여 수행한 결과는 Table 3에 나타냈다.

체외수정후 배양 6~8일에 생산된 좋은 질의 상실배와 배반포배의 미세분리시 각각 82.6% 그리고 80.5%의 미세분리 성공률을 얻었으나 유의성이 인정되지 않았으며 평균 미세분리 성공율은 81.6%였다.

Lucas-Hahn과 Niemann(1991) 등은 bisect한 demi-embryo를 24시간 배양시 92.3%의 높은 배양 성공율을 보고하였고 Itagaki 등(1993)은 biopsy와 bisect한 수정란을 24시간 배양한 결과 각각 86.3과 77.5%의 생존율을 보고하고 있다. 그러나 미세분리 수정란의 질, 분리방법 및 체외 배양조건 등에 따라서 분리 수정란의 생존성은 달라질 수 있으며 특히 분리기술의 숙련도에 따라서도 다소 다른 결과를 얻을 수 있다고 사료된다.

DNA를 증폭하여 141bp 크기에서 양성임을 확인한 결과와도 같았다. 특히 Kunieda 등(1992)은 소 상실배 혹은 배반포배에서도 Y 염색체 특이적 DNA primer인 BOV97M (141bp)가 성판별에 적합한 것으로 보고하였다(오 등, 1993). 따라서 BOV97M은 소의 혈액 및 수정란의 성판별을 위해 적합한 primer라고 사료된다.

Fig. 2는 Y 염색체 특이적 및 소 특이적 DNA primer를 이용하여 소 배반포 체외 수정란의 성을 판별한 것으로 Lane 1, 4 그리고 5에서는 216bp 크기에서만 DNA band가 검출되어 자성의 수정란으로 판정되었으나 Lane 2, 3 및 6에서는 141bp와 216bp 모두에서 DNA band가 확인되어 옹성의 수정란으로 판정되었다.

Table 2. Optical density of bovine genomic DNA

Breed	No. of heads	Optical density(O.D.)		
		$\lambda 260(A)$	$\lambda 280(B)$	$\lambda A / \lambda B$
Hanwoo	10	0.039±0.02	0.019±0.01	1.79±0.14

Table 3. Viability of bovine IVF embryos cultured in TCM 199 medium for 24 hours after splitting

Cell stage	No. of embryos	No. of embryos splitted
Morula	35	29(82.6)
Blastocyst	41	33(80.5)
Total	76	62(81.6)

Table 4. Effect of sorcoceryl supplementation on the development to the blastocyst after splitting

Embryo	Sorcoceryl supplement	No. of embryos cultured	No. of embryos to develop to blastocyst
Blastocyst	-	18	10(55.6) ^a
	+	60	44(73.3) ^b

(P<0.05)

Table 4는 미세분리란의 체외 배양시 TCM 199에 0.1%의 sorcoceryl 첨가시 생존율을 검토한 결과이다. Table 4에서 보는 바와 같이 solcoceryl를 첨가하여 배양시는 73.3%가 배반포강 재형성을 보였으나 무첨가구에서는 55.6%의 배반포 재형성을 보여 유의적으로 낮은 결과를 얻었다. 따라서 미세분리란의 배양에는 조직 혹은 세포의 활성을 촉진하는 것으로 알려진 sorcoceryl을 0.1% 첨가하여 배양하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

Tominaga 등(1996)은 solcoceryl 0.1과 1.0% 첨가하여 소 체외 수정란의 미세분리와 체외배양을 하였을 때 생존율은 61.1%로 대조구의 26.8%보다 유의적으로 높았으며 Takakura 등(1992)은 미세분리시 0.1%의 solcoceryl첨가로 임신율을 높일 수 있었으며 특히 쌍자 임신율도 높았다고 하였다. 따라서 수정란의 미세분리 및 체외 배양시 0.1%의 solcoceryl를 첨가하는 것이 수정란의 생존 및 수태율에 도움이 될 것으로 사료된다.

3. PCR 기법에 의한 성 판별용 적정 수정란의 적정 할구수

소 수정란의 성판별을 위하여 미세분리한 할구수에 따라 Y특이적 primer로 PCR하여 Y특이적

Table 5. Effects of number of blastomeres from bovine IVF embryos on appearance of Y specific band

No. of blastomeres	No. of embryos splitted	Appearance of Y specific band
2~4	18	3(16.7) ^a
5~10	26	12(46.2) ^b
Half	25	10(40.0) ^b

(P<0.05)

DNA band의 검출율을 조사한 결과는 Table 5와 같다. PCR에 공시한 할구수가 2~4개일 경우, Y특이적 band 검출율은 16.7%로 5~10개 이상에서 46.2%보다 유의적으로 낮았으나 분리 할구수가 5~10개와 그 이상과는 큰 차이가 없어 수정란의 성판별을 위해서는 최소 5개 이상의 할구가 있어야 소 수정란의 성판별이 가능할 것으로 사료된다.

渡邊 등(1992)은 소의 상실배 이상의 수정란 중 1~5개 이상의 할구를 분리하여 PCR기법으로 Y-DNA를 증폭하여 100%에 가까운 성판별 성적을 얻었고 Herr 등(1990)도 비슷한 방법으로 성조절된 송아지를 생산했으나 Keefer 등(1994)은 약 14% 정도는 성판별이 불확실하였다고 보고하였다. 그러나 Machaty 등(1993)은 소 체외수정란의 5일째 16~32세포기의 할구를 분리하여 소 특이적 그리고 Y-염색체 특이적 primer로 증폭하여 성판별한 결과 95.4%가 성 판별되었고, 이를 이식하였을 때 52.6%가 정상 임신되었다고 하였으며, Kirkpatrick과 Monson(1993)은 2~8세포기 수정란에서 95%의 성판별 정확도를 보고하였다. 또한 Appa Rao (1993)은 1~10개의 수정란의 할구 DNA로 충분히 성판별이 가능하고 4~16세포기보다는 상실배와 배반포배에서 성판별의 정확도가 높았다고 하였다. 따라서 소 수정란의 성판별을 위한 최소 적정 할구수는 최소 5~10개 이상 이라고 사료된다.

적 요

본 연구는 소 특이적 및 Y-염색체 특이적 DNA primer를 제조하여 한우 암수 각각 5두의 혈액에서 추출한 genomic DNA를 PCR기법에 의해 자용의 성 판별 가능성을 검토하였다. 수정란의 성을 판별

하기 위하여 배반포 체외 수정란의 할구를 미세분리 배양하였고 PCR기법에 의한 분리 할구수에 따른 수정란의 성관별 정확도를 검토하기 위하여 수행하였으며 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 혈액의 genomic DNA의 O.D. 값은 1.79 ± 0.14 로 순도가 높았다.
2. 수정란 미세분리후 배반포까지의 발달율은 상실배와 배반포배가 각각 62.1%와 81.9%로 배반포배가 높았다.
3. 소 수정란의 할구의 Y 특이적 DNA band 출현율은 할구 2~4개, 5~10개 그리고 11개 이상 분리시 각각 16.7%, 46.2% 그리고 40.0%로 5개 이상에서 수정란의 성을 판별할 수 있었다.
4. 분리 수정란의 체외배양시 배반포 발생율은 sorcoceryl 첨가가 73.3%로 무첨가 55.6%보다 유의하게 높았다.

참고문헌

- Agrawala PL, Wagner VA and Geldermann H. 1992. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology*. 38:969-978.
- Appa Rao KBC, Totey SM, Pawshe CH and Singh GP. 1993. Sex determination by DNA amplification of buffalo embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*. 39:179.
- Bondioli KM, Ellis SB, Pryor JH, Williams MV and Harpold MM. 1989. The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*. 31:91-104.
- Gardner RL and Edwards RG. 1968. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature*. 218:346-348.
- Herr CM, Holt NA, Matthaec KI and Reed KC. 1990. Sex of progeny from bovine embryos sexed with an rapid Y-chromosomal-detection assay. *Theriogenology*. 33:247.
- Herr CM and Reed KC. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*. 35:45-54.
- Keefer CL, Scott B, Koppang R, Paprocki AM, Bettauser J, Golueke P, Jurgella G, Matthews L, Stice S and Van Beek K. 1994. Male/female sex ratio and survival following embryo biopsy of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*. 41:225.
- Kirkpatrick BW and Monson RL 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J. Reprod. Fert.* 98:335-340.
- Kunieda T, Xian M, Kobayashi E, Imamichi Y, Moriwaki K and Toyoda Y. 1992. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.* 46:692-697.
- Machaty Z, Paldi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z and Vajta G. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* 98:469-670.
- McGlaw RA, Jacobson RJ and Akamatsu M. 1988. A male-specific repeated DNA sequence in domestic pig. *Nucleic Acids Res.* 16:10389.
- Nakahori Y, Mitami K, Yamada M and Nakagome Y. 1986. A human Y-chromosome specific repeated DNA family(DZY1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* 14:7569-7580.
- Sambrook JE, Fritsch F and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning*. Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd Ed. N. Y.
- Tominaga K, Yoneda and Utsumi K. 1996. Influence of "Solcoceryl" during culture on the sex-dependent repair of bovine demi-embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 43:331-335
- Takakura H, King WA, Betteridge KJ. 1985. Production of sexed calves from frozen-th-

- awed embryos, *Vet. Rec.* 117:603-608
- Utsumi K, Kawamoto T, Kim JI, Iritani A, Sakai A and Komano T. 1992. Sex determination of bovine embryos by the polymerase chain reaction using Y-specific primers. *J. Reprod. Dev.* 38(1):35-43.
- Wachtel SS. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and sex ratio. *Theriogenology.* 21:18-28.
- White KL, Linder GM, Anderson GTB and BonDurant RH. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology.* 19:01-705.
- 渡邊伸也, 高橋清也, 小西秀彦, 今井裕, 栗田崇, 高橋秀彰, 榊田博司, 安江博. 1992. PCR法によるウシ胚の性判定 技術の検討. *日畜會報.* 63(7):715-720
- 徳丸元幸, 後藤和文, 宅萬義博, 木庭正光, 大江伸幸, 中西喜彦, 小川清彦. 1991. 体外受精由来牛胚盤胞期胚の染色體検査における培地へのヘパリン添加の影響. *日畜會報.* 62:667-673.