

染色體 分析에 의한 생쥐初期胚의 性 判別에 관한 研究

申鉉東 · 金正翊

江原大學校 農科大學

Study on the Sexing of Mouse Embryos by Chromosomal Analysis

Shin. H. D. and C. I. Kim

College of Agriculture, Kangweon National University

Summary

As a preliminary experiment to establish the process on the sexing of mouse embryos by chromosomal analysis, present studies were carried out with inbred (ICR, C₅₇BL) and F₁ hybrid [(ICR x C₅₇BL) = F₁ x ICR] mice to investigate the blastomere numbers and mitotic indices (M.I.) to the developmental stage of embryos recovered, the optimum periods of anti-mitotic agent administration, the successful rates of sexing and sex-ratio.

The results obtained were summarized as follows:

1. The blastomere numbers (mean \pm S.E.) of the morula and blastocyst were 18 \pm 0.4 and 54 \pm 0.7, respectively.
2. Whereas the M.I. of F₁ hybrid (16 \pm 0.2%) was higher than that of inbred ICR (15 \pm 0.1%) and C₅₇BL (12 \pm 0.6%) in the different strains, the morula (7 \pm 0.6%) was higher than that of blastocyst (6 \pm 0.4%) in the case of embryo stages.
3. Following to anti-mitotic agents treated, the M.I. of embryos cultured with Colcemid (17 \pm 1.1%) was superior to that of embryos cultured with Velban (12 \pm 0.9%) and the Colcemid injection (7 \pm 0.4%).
4. The successful rate of sexing in the blastocyst (38.7%; 124/320) was superior to the morula (35.9%; 52/145), and the F₁ hybrid (48.1%) was higher than that of inbred ICR (42.4%) and C₅₇BL (28.2%).
5. In the successful rate of sexing to the methods of administration, the embryos cultured with Colcemid (46.0%) was superior to that of embryos cultured with Velban (39.0%) and the Colcemid injection (38.8%).
6. Of 98 embryos sexed after culture with Colcemid, 89(90.8%) were observed between 2 and 4 hrs. In the case of Velban treatment, 83.1% (74/89) was observed between 2½ and 4½ hrs.
7. Out of 761 prepared embryos it was possible to sex 311; 157 were male and 154 were female, i.e. a sex-ratio of 50% approximately.

I. 緒 論

哺乳動物의 遺傳的 性은 受精時에 決定되어 相異한 表現型의 性으로 발전되는 경우는 극히 적으므로 後代의 性을 人爲的으로 支配하는 方法에는 體內 또는 体外에서 X- 또는 Y-染色體를 지닌 半數體의 精子를 分離하여 卵子和 結合시키는 것이 理論上으로 합리적이라 하겠으나 實用可能性이 稀薄한 것으로 알려지고 있다(Betteridge et al, 1981; Wilmut, 1982).

後代의 性을 人爲적으로 조절하려는 노력으로 精子의 人工分離法(Leslie et al, 1982; Garner et al, 1983)을 비롯하여 初期胚의 兩性核中 한쪽의 前核을 除去하여 父 또는 母親의 遺傳子 構成(genome)만을 갖는 卵子를 個體發生시키는 片親性 卵子의 發生(Hoppe & Illmensee, 1977, 1982), 바아小體(Barr body)의 관찰(Vickers, 1976; Gardner & Edwards, 1968) 및 組織適合性 Y 抗原(Histocompatibility-Yantigen: White et al, 1982; Wachtel, 1984) 등을 이용한 연구 結果가 보고되어 있으나, 이상의 方法은 완전한 성을 조절하거나 出産前에 雌雄의 확인이 어렵고, 高度의 技術과 실험비를 요하는 등의 문제점이 있다.

수정란은 初期 卵割期에 有絲分裂의 異常이 일어나거나 細胞가 融合하는 경우를 除外하고는 核型이 變하는 일은 극히 적으며(King, 1984), 최근에는 受精卵 移植技術이 발달됨에 따라서 수정란의 分割球 中 一部分을 취하여 核型分析으로 性을 判別한 후에 選擇적으로 移植하여 後代의 性을 支配하려는 연구가 활발히 進行되고 있다(Vickers, 1967a; Singh & Hare, 1980; King, 1984).

染色體 分析法에 의한 수정란의 성지배가 가능해지면, 移植前 수정란의 성을 判別한 후에 冷凍保存하여 필요한 시기에 원하는 性의 수정란을 이식하게 되므로 수정란 이식술의 實用化에 進·步할 수 있으며, 특히 畜牛에서 수정란 이식에 의한 雙胎誘起時에 예견되는 異性雙胎 中 雌性의 Freemartin발 생을 예방하는 등 大家畜에서 産業的인 意義가 있다.

本 實驗은 染色體 分析에 의한 초기배의 性 判別

에 대한 기초자료를 얻기 위하여, 생쥐初期胚의 細胞數에 대한 有絲分裂指數(Mitotic index; M. I.), 有絲分裂 抑制劑의 處理方法과 時間別 性判別의 成功率 및 性比를 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

本 實驗에 사용된 公시동물은 18~23°C의 온도와 12시간 明, 12시간 暗의 光線 조절하의 Plastic cage에서 자유급식 상태로 사육된 生후 6~8주령의 體重이 25~30g인 近親系統(ICR, C₅₇BL)과 雜種系統(ICR×C₅₇BL)種의 生쥐로서 雌性 67두와 雄性 15두가 公시 되었다.

2. 試驗期間 및 場所

1984년 9월 1일부터 1985년 10월 10일 사이에 江原大學校 附屬動物 飼育場과 畜産學科 家畜繁殖學 實驗室에서 실시되었다.

3. 過排卵의 誘起 및 自然交尾

일령별로 사육된 雌性生쥐에 過排卵을 유기시키기 위하여 PMSG 5 IU를 1회 腹腔內 注射하였으며, 45~48시간 후에 hCG 5 IU를 같은 方法으로 注射하였다. hCG 注射과 동시에 자성생쥐와 음성生쥐를 1:1로 합사하여 자연교미를 유도하였다. 다음날 아침 陰栓(Coital plug)을 검사하여 임신 1일로 잡았으며, 질전이 확인되지 않은 개체는 실험에서 제외시켰다.

4. 受精卵의 採取

수정란의 채취는 자성생쥐를 頸部脫骨로 屠殺開腹하여 생식기관을 채외로 절취한 後에 여과지 위로 옮겨서 주위의 結체조직과 혈액을 제거한 다음 hCG注射후 66시간 이후의 桑實胚와 胚盤胞期胚의 수정란을 회수하기 위하여 子宮角을 分離切斷하여 자궁각의 한쪽끝을 forcep으로 잡고 注射침을 꽂아 1ml내외의 灌流液을 주입하여 유리접시내로 회수하였다. 회수된 수정란은 실체 顯미경하에서 발육상태를 검사하여 형태적으로 정상인 수정란만을 실험에 공용하였다.

5. 有絲分裂 抑制劑의 處理

수정란의 分割球는 細胞分裂 中期像을 유지하도

록 有絲分裂 抑制劑를 채란전 복강내에 직접 주사하거나, 채란후 培養液에 첨가하여 細胞分裂 中期로 유지시켰다.

5.1 Colcemid의 注射

9% NaCl 50ml에 50mg colcemid(N-desacetyl-N-methylcolchicine; Ciba)가 첨가된 용액을 채란 2시간전에 복강내에 주사(Colcemid 1 μ g/g體重)하였다(Vickers, 1967a).

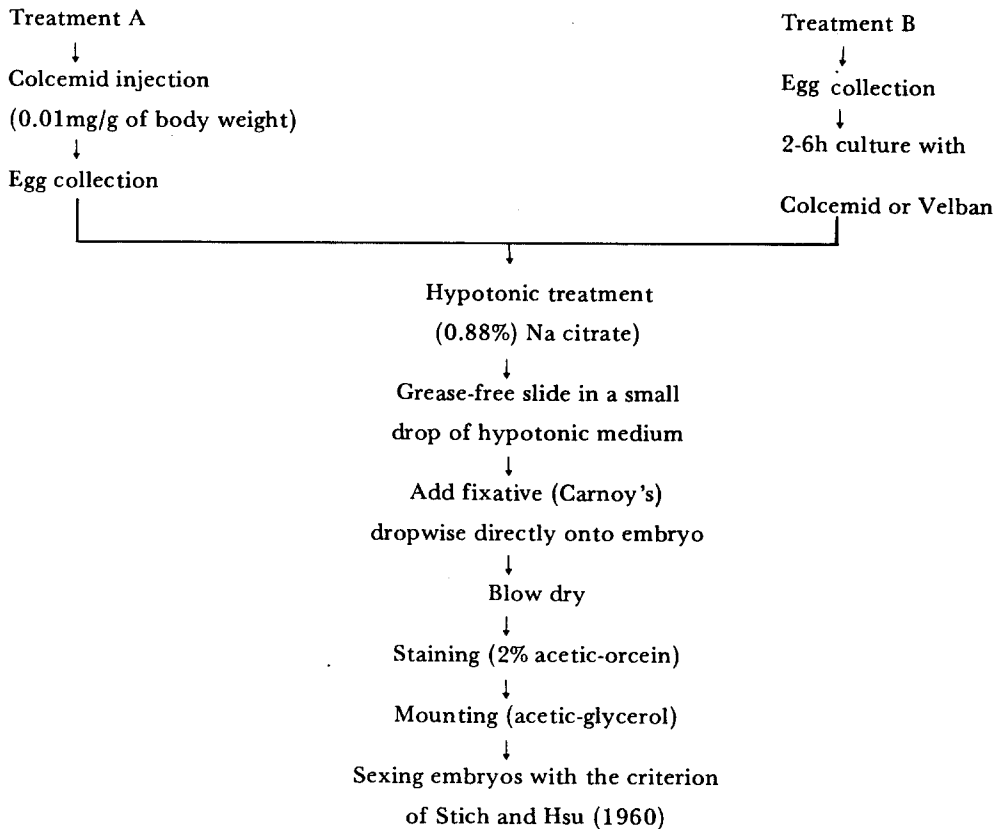
5.2 有絲分裂 抑制劑의 添加培養

Colcemid를 주사하지 않은 생쥐에서 회수된 수정란은 Velban(Vinblastine Sulfate; Libby, Aldrich chemical company, Inc)과 Colcemid가 첨가된 배양액내에서 일정기간 배양하였다. 즉 Velban 또는

colcemid를 Hanks' 溶液(Hanks & Wallace, 1949)에 첨가하여 Brinster 培養液에서 최종농도가 velban은 0.02 μ g/ml(Kinsey, 1971), colcemid는 0.05 μ g/ml(Singh & Hare, 1980)이 되도록 하여 사용직전에 membrane filter(pore size; 0.3 μ m)로 여과하여 小滴培養液을 만들어 CO₂ 배양기(5% CO₂ in air, 37°C)내에서 2시간 平衡시킨 후에 준비된 수정란을 소적배양액내로 옮겨 1~6시간 배양하면서 30분 간격으로 수정란의 염색체 표본을 제작하였다.

6. 染色體 標本製作

수정란의 染色體 觀察은 Tarkowski(1966)와 King 등(1979, 1984)의 실험방법을 수정보완하여 실시하였다(Fig. 1)



Total time: 4-8hrs. (including an approximation of time required for microscopic examination)

Figure 1. Method for sexing preimplantation whole mouse embryos by chromosomal analysis (Tarkowski, 1966; King et al., 1979).

유사분열 억제제에 처리된 수정란은 염색체의 관찰이 용이되도록 분산시키기 위하여 상실배기 이전의 것은 0.88% Sodium citrate 용액(低張液)에서 6~8분, 배반포 이후의 수정란은 동일 용액에서 8~12분간 실온에서 노출시킨 후에 固定液(methylalcohol:glacial acetic acid:3:1)으로 수정란을 피복하여 투명대의 분해와 염색체를 분산, 고정시켰다. 고정액의 양은 0.02 (morula 이전)~0.04ml (blastocyst 이후)가 되게 하였으며 고정직후에 風乾하여 염색체와 핵을 슬라이드 그라스에 부착시켰다. 계속하여 2% acetic-orcein으로 염색하였다.

7. 性的 判別

제작된 표본은 位相差顯微鏡(Phase-contrast microscope, BH₂ Olympus)하에서 鏡檢하여 가장 작은 염색체가 2개 있는 것(two small chromosomes of equal size)은 雌性(Fig. 2), 3개 있는 것(two small autosome plus Y chromosome)은 雄性(Fig.3)으로 판별하였다(Stich & Hsu, 1960). 한편 작은 염색체가 4개 이상으로 性的 구별이 어려운 경우에 짝수는 자성, 홀수일때는 응성으로 判別하였으며(Kaufman, 1973), 핵數와 염색체군의 수를 세어 有絲分裂數(Mitotic index; $\frac{\text{염색체군수}}{\text{핵수} + \text{염색체군수}} \times 100$)를 계산하였다.



Figure 2. The metaphase plate from a blastocyst incubated for 2½-4½ hrs in medium containing velban (0.02 ug/ml). Presence of two small chromosomes (arrows) is typical for female karyotype. Reproduced at 3,000X.

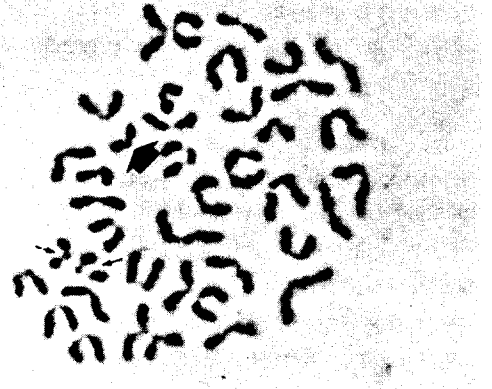


Figure 3. The metaphase plate from a blastocyst incubated for 2-4 hours in medium containing colcemid (0.05 ug/ml). Three small chromosomes are visible, Y (large arrow) being discernible from the two small arrows) Reproduced at 3,000X.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 有絲分裂 抑制劑의 處理方法에 따른 性判別

1.1 Colcemid의 주사

Inbred(ICR×ICR) 계통의 mouse에 colcemid (1 μg/g 体重)를 채란 2시간 전에 복강내에 주사하여 회수된 수정란의 염색체를 분석한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에 나타난 바와같이 mouse의 桑實胚와 胚盤胞期胚의 細胞數는 각각 평균 18±0.4, 54±0.7개였으며, 桑實胚期의 평균 Mitotic index(M.I.)는 7±0.6%로서 胚盤胞期 6±0.4%의 성적보다 다소 우수하였다.

性的 判別에 공용된 320개의 수정란중 124개가 性이 判別되어 38.8%의 性判別率의 성적을 얻었으며, 수정란의 발육단계별 성적에서는 胚盤胞가 41.1% (72/175)로서 桑實胚의 35.9% (52/145)보다 우수하였다. 한편 M.I.에 따른 성관별율의 성적은 性이 판별된 수정란중 53.2% (66/124)가 M.I. 값이 10% 이상의 군에 속하여 상실배와 배반포배에서 공히 M.I. 값이 증가됨에 따라 성관별율이 증가되는 경향을 나타냈다.

이상의 성적은 Singh과 Hare(1980)의 M.I. (7.5

Table 1. Results of chromosomal analysis and mitotic indices of mouse embryos after colcemid injection.

Embryo stages	No. of embryos (%)	Mean no. of cell per embryo	Mean mitotic index (%)	Percentages of embryos with a mitotic index and sexed of			
				between 0-5%	between 6-9%	between 10-15%	above 15%
Morula	145	18±0.4	7±0.6	52.4 (76)	19.3 (28)	15.2 (22)	13.1 (19)
Sexed	52 (35.9)			23.1 (12)	23.1 (12)	30.8 (16)	23.1 (12)
Blastocyst	175	54±0.7	6±0.4	52.6 (92)	13.7 (24)	26.9 (47)	6.9 (12)
Sexed	72 (41.1)			27.8 (20)	19.4 (14)	40.3 (29)	12.5 (9)
Total	320	36±0.6	7±0.4	52.5 (168)	16.3 (52)	21.6 (69)	9.7 (31)
Sexed	124 (38.8)			25.8 (32)	20.9 (26)	36.3 (45)	16.9 (21)

(); No. of embryos sexed.

%)와 세포수(39.7개)의 성적과 대체적으로 일치하고 있으나, 성관별율의 성적에서는 Vickers(1967a)가 本實驗과 동일한 방법으로 얻은 성적(43.9%)에는 미치지 못하였다. 본 실험에서 성관별율의 성적이 저조한 원인은 전체 세포수에 대한 有絲分裂 中期의 염색체의 발현율이 극히 저조하여 M.I.가 5% 미만에 속하는 것이 전체 수정란의 52.5% (168/320)을 차지한데 기인된 것으로 생각된다.

1.2 Anti-mitotic劑의 添加培養

1.2.1 Colcemid의 첨가

근친계통(ICR, C₅₇BL)과 잡종계통(ICR×C₅₇BL, (ICR×C₅₇BL)×ICR)의 생취수정란을 Brinster(1965) 배양액내에 colcemid(0.05μg/ml)를 첨가하여 1~6 시간 배양하면서 30분 간격으로 염색체를 분석하여 얻은 결과를 Table 2에 요약하였다.

Table 2. Results of chromosomal analysis and mitotic indices of mouse embryos in culture medium with colcemid.

Strain	Anti-mitotic agent	No. of embryos (%)	Mean mitotic index (%)	Percentage of embryos with a mitotic index and sexed of			
				between 0-5%	between 6-9%	between 10-15%	above 15%
ICR	Colcemid	99	16±1.4	29.3 (29)	6.1 (6)	10.1 (10)	54.5 (54)
	Sexed	44 (44.4)		18.2 (8)	6.8 (3)	13.6 (6)	61.4 (27)
C ₅₇ BL	Colcemid	62	15±2.1	29.0 (18)	17.7 (11)	14.5 (9)	38.9 (24)
	Sexed	28 (45.2)		10.7 (3)	17.9 (5)	14.3 (4)	57.1 (16)
F ₁ *	Colcemid	52	20±2.8	30.8 (16)	11.5 (6)	13.5 (7)	44.2 (23)
	Sexed	26 (50.0)		15.4 (4)	11.5 (5)	19.2 (5)	53.8 (14)

*F₁=ICR × C₅₇BL or F₁(ICR×C₅₇BL)×ICR. (); No. of embryos sexed.

Table 2에에서 보는 바와같이 ICR과 C₅₇BL 계통 및 F₁의 평균 M.I.는 각각 16±1.4, 15±2.1 및 20±2.8%로서 잡종계통(F₁)의 성적이 근친계통보다 우수하였다. 한편 성관별율은 ICR과 C₅₇BL 계통 및 잡종계통(F₁)에서 각각 44.4%, 45.2%와 50.0%로서 M.I.의 성적과 비슷한 경향이 나타났

다.

이와같은 성적은 Singh와 Hare(1980)가 mouse의 초기배를 colcemid(0.05μg/ml)가 첨가된 배양액에서 4~6 시간 동안 배양한 결과, M.I.의 값이 7.5%였다는 성적보다 우수하였다. 한편 성관별율의 성적에서 잡종계통의 근친계통보다 우수하였던 것은

잡종계통의 M.I. 값이 여타구의 성적보다 증가하였으며, M.I.가 15% 이상에서 성관별율이 가장 좋은 것으로 判明되었다.

2.2.1 Velban의 添加

근친계통(ICR, C₅₇,BL)과 잡종계통(F₁(ICR×C₅₇,BL)×ICR)의 생쥐에서 회수한 수정란을 velban (0.02μg/ml)이 첨가된 배양액내에서 일정시간동안 배양하여 얻은 성적은 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와같이 근친계통인 ICR과 C₅₇,BL 및 잡종계통의 평균 M.I.값은 각각 14±1.8, 10±1.1 및 12±1.3%로서 근친계통의 ICR종이 여타구보다 우수하였으나, 성관별율에서는 잡종계통(46.3%)

의 성적이 근친계통(32.9~40.2%)보다 우수한 상반된 결과를 나타냈다. 이와같은 結果는 供試된 雜種系統의 수정란수(54개)가 여타구(82~92개)에 비하여 적은데 반하여 M.I.의 값이 15% 이상에 속하는 수정란의 比率가 40%(22/54)로서 여타구의 성적(19.5~34.8%)보다 높은데에 기인한 것으로 생각된다.

(3) 處理時間別 性 判別率

受精卵의 세포가 細胞分裂 中期에 도달하도록 일정한 colcemid와 velban을 배양액내에 첨가하여 배양한 후 시간별로 染色體를 分析한 結果는 Fig.4와 같다.

Table 3. Results of chromosome analysis and mitotic indices of mouse embryos in culture medium with velban.

Strain	Anti-mitotic agent	No. of embryos (%)	Mean mitotic index (%)	Percentage of embryos with a mitotic index and of sexed of			
				between 0-5%	between 6-9%	between 10-15%	above 15%
ICR	Velban	92	14±1.8	45.7 (42)	8.7 (8)	10.9 (10)	34.8 (32)
	Sexed	37 (40.2)		13.5 (5)	13.5 (5)	16.2 (6)	56.8 (21)
C ₅₇ , BL	Velban	82	10±1.1	29.3 (24)	24.4 (20)	26.8 (22)	19.5 (16)
	Sexed	27 (32.9)		11.1 (3)	11.1 (3)	40.7 (11)	37.0 (10)
F ₁ *	Velban	54	12±1.3	37.0 (20)	11.1 (6)	11.1 (6)	40.7 (22)
	Sexed	25 (46.3)		28.0 (7)	16.0 (4)	16.0 (4)	40.0 (10)

*F₁=ICR×C₅₇,BL or F₁(ICR×C₅₇,BL)×ICR. () ; No. of embryos sexed.

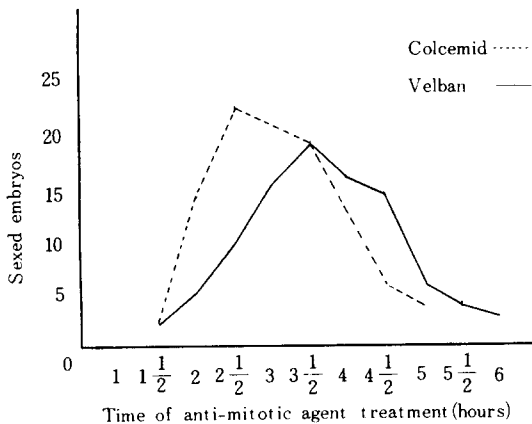


Figure 4. Effect of anti-mitotic agents treated on sexing mouse embryos.

colcemid의 처리구에서 性이 判別된 受精卵중 90.8% (89/98)가 2~4 시간 사이에 判別되었으며, velban 처리구에서는 83.1% (74/89)가 2.5~4.5 시간 사이에서 性이 判別되어 velban 처리구가 colcemid의 처리구보다 30분정도 늦게 細胞分裂 中期에 도달하는 것이 判別되었다.

이와같은 結果는 Singh와 Hare (1980)가 colcemid 첨가 배양액 (0.05μg/ml)내에서 4~6 시간, Kinsey (1971)는 velban 첨가액 (0.02μg/ml)에서 7~8 시간 배양하여 染色體의 표본을 제작한 보고에 비하여 2~4 시간이 단축되었다. 한편 牛 受精卵의 경우에 배양시간을 2~4 시간에서 6~10시간으로 늘림으로서 10%이상의 M.I.에 속하는 수정란의 비율이 44%에서 57%로 향상되었다는 King등 (1979)의 보고와 상이한 結果를 얻었다.

본 실험의 결과, 생쥐染色體 分析을 위한 표본제작의 최적시간은 colcemid와 velban을 添加하여 2~4 시간 동안 培養한 후에 실시하는 것이 바람직하며, 牛 수정란(King, 1979)에서와는 달리 생쥐수정란은 처리시간을 연장할수록 不完全하고 비정상적인 細胞分裂의 中期가 축적되어 性判別이 어려워지

는 것으로 생각된다.

3) 有絲分裂 抑制劑의 處理方法과 性比 有絲分裂 抑制劑를 採卵前에 주사하거나 採卵後에 添加 培養하여 先처리한 생쥐初期胚의 염색체를 분석하여 性を 判別한 결과를 Table 4 에 요약하였다.

Table 4. Results of sexing mouse embryos by chromosomal analysis.

Treatment	No. of embryos recovered	No. of embryos prepared	Mitotic index (%)	Sexed embryos (%)	Sex-ratio	
					Male	Female
Colcemid injection	426	320	7±0.4	124 (38.8)	49.1	50.8
Culture with Colcemid	268	213	17±1.1	98 (46.0)	51.0	48.9
Culture with Velban	290	228	12±0.9	89 (39.0)	51.6	48.3
Total	984	761	12±0.4	311 (40.9)	50.5	49.5

有絲分裂 抑制劑의 처리별 M.I.의 성적은 colcemid를 첨가한 배양액내에서 수정란을 培養한 區가 17±1.1%로서 velban을 첨가배양한 區의 12±0.9%와 colcemid주사구의 7±0.4%보다 우수하였다. 한편 性판별율은 colcemid첨가 배양구가 46.0%로서 velban첨가구(39.0%)와 colcemid주사구(38.8%)보다 우수하여 M.I. 성적과 대체적으로 동일한 경향을 보였으나, M.I.의 성적에서와 같이 큰 差異는 認定되지 않았다.

회수된 수정란의 984개중 761개가 染色體 分析에 供用되었으며, 그중 311개가 性判別되어 40.9% (311/761)의 性判別率의 성적을 얻었다. 한편 性판별된 수정란중 雌雄의 性比는 약 1 : 1 (157 : 154) 이었다.

이상의 결과는 Moustafa등(1978)의 76%, Kaufman(1973)의 67.3%의 성적과 Singh과 Hare(1980)의 54% 및 韓과 鄭(1985)의 52.8% 性판별율보다는 낮은 수준이었으나, Vickers(1967a)의 43.9%와 Long과 Williams(1980)의 42.6%의 성적과는 대체로 일치하였다.

IV. 摘 要

포유동물 初期胚의 性판별에 대한 基礎資料를 습득하기 위하여 6~8週齡의 생쥐(25~30g)에 5 IU의 PMSG와 hCG를 48시간 간격으로 腹腔內에 주사하여 回收한 初期胚의 細胞數, 有絲分裂 抑制劑의 처리에 따른 有絲分裂指數(M.I.)와 性判別成績을 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 상실배의 細胞數는 평균 18±0.4개였으며, 胚盤胞期胚는 54±0.7개였다.

2. 發育段階別 M.I.의 성적은 상실배(7±0.6%)가 배반포기배(6±0.4%)보다 높았으며, 品種間 M.I.에서는 잡종계통(16±0.2%)이 근친계통의 ICR(15±0.1%)과 C₅₇BL(12±0.6%)보다 우수하였다.

3. 有絲分裂抑制劑의 처리별 M.I. 성적은 colcemid첨가 배양구(17±1.1%)가 velban첨가배양구(12±0.9%)와 colcemid주사구(7±0.4)보다 우수하였다.

4. 性判別率의 성적은 胚盤胞가 38.7% (124/320)로서 상실기배의 35.9% (52/145)보다 우수하였으며,

잡종계통 (48.1%)이 근친계통의 ICR (42.4%)과 C₅₇BL (38.2%)보다 우수하였다.

5. 有絲分裂 抑制劑의 처리별 性判別率은 colcemid 침가 배양구 (46.0%)가 velban 침가 배양구 (39.0%)와 colcemid 주사구 (38.8%)보다 우수하였다.

6. 有絲分裂 抑制劑의 침가 배양후 性の 판별은 colcemid 침가구에서 2~4 시간, velban 침가구에서는 2.5~4.5 시간내에 각각 90.8% (89/98)와 83.1% (74/89)가 판별되어 colcemid 침가구가 30분간 단축되었다.

7. 처리된 수정란중 性が 判別된 수정란의 比率은 40.9% (311/761)였으며, 性が 判別된 수정란중 雌性和 雄性으로 判別된 수정란은 각각 157개와 154개로서 性比는 약 1:1이었다.

REFERENCES

1. Betteridge, K.J., W.C.D. Hare and E.L. Singh (1981) Approches to sex selection in farm animals. In; New Technologies in Animal Breeding, (Eds.) Brackett, B.G., G.E. Seidel, Academic Press. New York, London, pp. 109-125.
2. Brinster, R.L. (1956) Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. J. Exp. Zool. 158:59-68.
3. Gardner, R.L. and R.G. Edwards (1968) Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. Nature 218:346-348.
4. Garner, D.L., B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson, M.A. Van Dilla and L.A. Johnson (1983) Quantification of the X- and Y-Chromosome Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flow Cytometry. Biology of Reproduction. 28:312-321.
5. Hanks, J.H., Wallace, R.E. (1949) Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc. Exp. Biol. Med. 71:196.
6. Hoppe, P.C. and K. Illmensee (1977) Microsurgically produced homozygous diploid uniparental mice. Pro. natn. Acad. Sci. USA. 74: 5657-5661.
7. Hoppe, P.C. and K. Illmensee (1982) Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. Proc. natn. Acad. Sci. USA. 79: 1912-1916.
8. Kaufman, M.H. (1973) Analysis of the first cleavage division to determine the sex-ratio and incidence of chromosome anomalies at conception in the mouse. J. Reprod. Fert. 35:67-72.
9. King, W.A. (1984) Sexing embryos by cytological methods. Theriogenology 21:7-17.
10. King, W.A., T. Linares, I. Gustavaon and A. Brne (1979) A method for preparation of chromosomes from bovine zygotes and blastocyst. Vet. Sci. Commun. 3:51-56.
11. Kinsey, J.D. (1971) Preparation of chromosomes and interphase uncles of early embryos for autoradiography, In; Methods in mammalian embryology. (Ed.) Daniel, J.C., Jr. pp.260-267. W.H. freeman and Company.
12. Leslie, G.W., M. D. Quinlivan, M.D. Kathleen Preciado, B.A. Toni Lorraine Long and Herlinda Sullivan (1982) Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and sephadex chromatography. Fertility and Sterility. 37: 103-107.
13. Long, S.E. and C.V. Williams (1980) Frequency of chromosomal abnormalities in early embryos of the domestic sheep (*Ovis aries*). J. Reprod. Fert. 48: 197-201.
14. Moustafa, L.A., J. Hahn and R. Roselius (1978) Versuche zur Geschlechtsbestimmung an Tag 6 und 7 alten Rinderembryonen, Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 91:236-

238.

15. Singh, E.L. and W.C.D. Hare (1980) The feasibility of sexing bovine morule stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology* 14:421-427.
16. Stich, H.F. and T.C. Hsu (1960) Cytological identification of male and female somatic cells in the mouse. *Exp. Cell Res.* 20:248-249.
17. Tarkowski, A.K. (1966) An air-drying method for chromosome preparations from eggs. *Cytogenetics*. 5:395-400.
18. Vickers, A.D. (1967a) A direct measurement of the sex-ratio in mouse blastocyst. *J. Reprod. Fert.* 13:375-376.
19. Vickers, A.D. (1967b) Amniotic sex chromatin and foetal sexing in the mouse. *J. Reprod. Fert.* 14:503-505.
20. Wachtel, S.S. (1984) H-Y antigen in the study of sexdetermination and control of sex ratio. *Theriogenology* 21:18-28.
21. White, K.L., G.M. Lindner, G.B. Anderson and R.H. Bon Durant (1982) Survival after transfer of "Sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology* 18:655-662.
22. Wilmut, I. (1982) Applications of egg transfer to animal production, breeding and research, In: *Mammalian Egg Transfer*. (ed.) Adams, C.E., CRC Press, Inc. pp.211-230.
23. 鄭吉生, 朴世必, 崔炳相. 1985. HY抗體處理를 받은 생쥐 肝의 試驗管内 發達. 建大附設畜産經營研究所 論文集 10 : 37 - 46.