

H-Y 항원의 Boosting 방법이 H-Y 항혈청 생산율과 역가에 미치는 효과와 H-Y 항혈청에 의한 토끼 수정란의 성판별에 관한 연구

임경순 · 이명섭 · 김성우 · 정구민*

서울대학교 농업생명과학대학 축산과학기술연구소

Effects of Boosting Methods of H-Y Antigen on Production Rate and Titer of H-Y Antiserum and Studies on Sexing of Rabbit Embryos by H-Y Antiserum

Im, K. S., M. S. Lee, S. W. Kim and K. M. Chung*

Institute of Animal Science and Technology, College of Agriculture and
Life Science, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

SUMMARY

The present study was carried out to sex effectively mouse and rabbit embryos using rat H-Y antiserum and to improve the rate of rat producing H-Y antiserum with H-Y antibody. The H-Y antiserum was prepared from inbred SD strain female rat immunized by intrasplenic injection and subsequent intraperitoneal booster of testis cell of syngenic male newborn rat. The titer of antiserum was identified by *in vitro* cytotoxicity test of mouse embryos. The rabbit embryos exposed to the H-Y antiserum was classified to the developed (H-Y negative) or delayed (H-Y positive) group. The H-Y negative rabbit embryos were transferred to recipients and sex of offspring was examined.

1. When mouse embryos were exposed to the rat H-Y antisera, the ratio of embryos developed vs delayed was various. The H-Y antisera where the ratio of embryos developed vs delayed showed the range of 40~60% were recognized as having titer of H-Y antibody.
2. When the subsequent intraperitoneal boosters were followed after priming of intrasplenic injection of H-Y antigen, the rate of rat producing the H-Y antiserum with H-Y antibody was 13, 27, 70 and 73% in control, 1st B, 2nd B and 3rd B, respectively. The rate in 2nd B and 3rd B was significantly($P < 0.05$) higher than that in control and 1st B.
3. When the rabbit morulae were exposed to the rat H-Y antiserum with H-Y antibody, the ratio of morulae developed versus delayed was 42:58% and it was close to the natural sex ratio 50:50%. It was confirmed that the rat H-Y antiserum was cross reactive to the rabbit morulae.

* 한국생명과학연구소(Hankook Institute of Life Science)

** 이 논문은 1993, 1994년 축산과학기술연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

*** 이 논문은 건국대학교 동물자원연구센터의 석사학위 논문 연구비에 의하여 연구되었음.

4. When the H-Y negative rabbit embryos were transferred to the recipients, the pregnancy rate was 50% and 83% of the newborns were females.

In conclusion, the rat H-Y antiserum with high titer of H-Y antibody was able to be obtained from the female rat immunized by the intrasplenic injection followed by the second intraperitoneal booster of testis cells at a week interval. When the rabbit embryos negative to the rat H-Y antiserum were transferred, 83% of the newborns were females.

I. 서론

원하는 성의 가축을 생산하고자 오래전부터 생식세포에 대한 성판별 연구가 있었다. 수정란의 성은 배란된 난자와 수정된 정자의 성염색체가 X 또는 Y 염색체 중 어떤 것이냐에 따라 결정이 된다. 수정전에 X 또는 Y 염색체 조성에 따라 체외에서 정자를 물리적으로 분리하려는 노력이 계속되어 X 또는 Y 정자를 분리하는데 어느 정도 성공을 거두었으나, 분리에 시간이 많이 들고 분리된 정자의 활력이 저하되어 분리된 정자가 산업적으로 이용되지 못하고 있다(Gledhill, 1988; Amann, 1989; Johnson 등, 1989; Johnson, 1990).

한편 수정란을 체외에서 다루는 기술이 발전함에 따라 수정란의 성을 체외에서 판별하려는 연구가 다양한 방법으로 수행되고 있다. 이러한 방법들은 수정란에 상해를 주는 방법(invasive)과 상해를 주지 않는 방법(noninvasive)으로 구분되는데(Betteridge, 1990), 전자로는 PCR을 이용한 성 판별법(van Vliet 등, 1989; Yano, 1993)이 있고 후자로는 H-Y 항체를 이용한 면역학적 성판별법이 있다.

Eichwald와 Silmsler(1955)는 근교계 생쥐의 피부 이식실험에서 응성에만 존재하는 조직적합성-Y 항원(Histocompatibility-Y antigen, H-Y antigen)을 발견하였는데, Wachtel 등(1975)은 포유동물의 응성 수정란 세포막에는 H-Y 항체에 특이적으로 반응하는 H-Y 항원이 존재한다고 보고하였다. Kroc과 Goldberg(1976)은 8~16 세포기 생쥐 수정란을 H-Y 항체와 보체로 처리하였을 때 약 50%의 수정란은 발달을 중지하거나 파괴되고 나머지 50%는 발달을 계속한다는 사실을 확인하였다. Epstein 등(1980), White 등(1982)과 Hiroyuki 등(1985)은 생쥐의 수정란에 H-Y 항혈청을 처리후 형태학적 특징을 관찰하여 수정

란의 성을 판별하였다. H-Y 항혈청은 중간 교차반응성이 있어 실험동물에서 생산된 H-Y 항혈청으로 경제동물의 수정란을 성판별하는 연구가 수행되었다(Wachtel, 1984; Utsumi 등, 1984). 지금까지 제조된 H-Y 항혈청은 역가가 낮을 뿐만 아니라 역가가 있는 혈청의 생산율이 낮았다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐 신생아의 정소세포를 항원으로 이 항원을 자성 흰쥐의 비장내에 주입한 후 다시 복강내에 주사하여, H-Y 항혈청의 생산율과 역가를 증가시키는 한편 흰쥐에서 얻은 H-Y 항혈청으로 토끼 수정란의 성을 판별하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 동물

H-Y 항혈청을 생산하기 위하여 4~5주령의 SD 근교계 흰쥐를 공시하였고, 항원을 추출하기 위하여 동계 신생자를 공시하였다. 수정란은 4~5주령의 ICR계 생쥐와 6~7개월령의 뉴질랜드 화이트종, 캘리포니아 종 토끼에서 회수하였고 수란토는 동종의 7~8개월령 토끼를 공시하였다.

2. 배양액

수정란 세척에는 0.4%(W/V) BSA(bovine serum albumin)를 첨가한 DPBS(Dulbeccos' Phosphate Buffered Saline, Gibco, 미국; pH 7.2~7.4, 삼투압 275~285 mOsm/kg)를 사용하였다. Ham's F10(pH 7.4~7.8, 삼투압 275~285 mOsm/kg)으로 생쥐 수정란을 배양하여 90% 이상이 배반포로 발달하는 배양액만을 수정란 배양에 사용하였다. 모든 배양액은 0.2 μ m 필터(MFS, 미국)로 사용전에 여과하여 멸균하였다.

3. H-Y 항혈청의 제조

H-Y 항혈청 제조의 개요는 Fig. 1과 같다.

출생후 48시간 이내의 흰쥐 신생자에서 분리한 정소를 DPBS로 3회 세척후 1.5ml 균질기(Wheaton, 미국)로 균질화하였다. 균질화된 정소조직을 500g에 5분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 세포수를 5×10^8 cells/ml로 조정 한 다음, FCA(Freud's Complete Adjuvant, Gibco, 미국)와 동량 혼합하여 3-way stopcock(B. Braun, 벨기에)으로 균질화하였다. 이 균질액을 항원으로 자성 흰쥐의 비장내에 개체당 0.2ml씩 주입하여 면역화 하였다. 정소세포와 FIA(Freud's Incomplete Adjuvant, Gibco, 미국)를 동량 혼합한 항원을 1주 간격으로 복강내에 주입하여 boosting을 실시하였다. 최종주사후 7일에 심장채혈하고 37℃에서 1시간 응고시킨 후 혈병을 제거하였다. 4℃에서 24시간 정치시킨 후 1,800g에 30분간 원심분리하였다. 상층 혈청을 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 -20℃ 이하에서 냉동보관하였다.

4. 다배란 처리 및 수정란 회수

생쥐는 7.5 IU PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotrophin, Sankyo, 일본)와 5 IU HCG(Human Chorionic Gonadotrophin, Sankyo, 일본)를 48시간 간격으로 복강주사하여 다배란을 유도하였다. 토끼는 FSH(Follicle Stimulating Hormone, Sig-

ma, 미국)를 12시간 간격으로 3일간 총 2.7mg을 피하주사하고 최종 FSH 주사후 12시간에 HCG를 200 IU 근육주사하여 다배란을 유도하였다. HCG 주사직 후 2회 자연교미시키고 난관을 42~45시간, 62~65시간에 관류하여 8~16세포기배와 상실배를 각각 회수하였고 형태적으로 정상인 수정란만을 사용하였다.

5. H-Y 항혈청의 처리

수정란은 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 수정란을 10%(V/V) H-Y 항혈청과 10%(V/V) GPC(Guinea Pig Complement, Gibco, 미국)를 함유한 50 μ l 소적에서 배양하였고 실험현미경하에서 형태학적으로 관찰하여 정상발달한 수정란과 발달이 지연된 수정란의 비율을 조사하였다.

6. 수정란 이식

수란토는 PMSG 100 IU와 HCG 200 IU를 48시간 간격으로 근육주사하고 유리봉으로 질을 자극하여 공란토와 발정주기를 동기화하였다. 질자극후 48~60시간에 수정란을 이식하고 태어난 산자의 성을 조사하였다.

7. 통계처리

Booster에 의한 H-Y 항체 생산율을 Turkey's HSD test로 유의성 검정하였다.

III. 결 과

흰쥐 H-Y 항혈청내의 H-Y 항체의 존재를 생쥐 수정란을 이용한 세포독성시험으로 평가한 결과는 Table 1과 같다. 대조구인 정상 자성 흰쥐 혈청(NFRS)의 경우 수정란의 92%가 정상적으로 발달한 반면 AS1, AS2, AS3에서는 수정란의 40~60%가 H-Y 항체에 반응하여 H-Y 항체의 존재를 확인할 수 있었다.

정소세포 항원을 비장내 주입하고 1주 간격으로 복강내에 booster를 실시고 항혈청 중 H-Y 항체의 역가를 갖는 흰쥐의 비율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 대조구는 항원을 비장내에만 주입한 것으로 H-Y 항체의 역가가 확인된 항혈청을 생산한 흰쥐의 비율은 13%였으며, 1st, 2nd 및 3rd B에서는 27, 70 및 73%

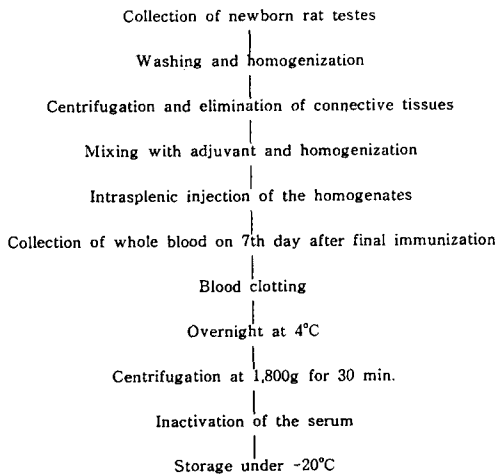


Fig. 1. The procedure of H-Y antiserum preparation.

Table 1. Response of mouse embryos to H-Y antibody *in vitro* culture

Serum	No. of embryos	Developed(%)	Affected(%)	H-Y antibody
NFRS ¹⁾	60	55(92)	5(8)	-
AS1 ²⁾	20	12(60)	8(40)	+ ³⁾
AS2	20	9(45)	11(55)	+
AS3	20	8(40)	12(60)	+
AS4	20	14(70)	6(30)	-
AS5	20	14(70)	6(30)	-
AS6	20	2(10)	18(90)	-
AS7	20	5(25)	15(75)	-
AS8	20	14(70)	6(30)	-
AS9	20	15(75)	5(25)	-
AS10	20	13(65)	7(35)	-

¹⁾ NFRS: Normal female rat serum

²⁾ AS: Rat H-Y Antiserum

³⁾ +: 40~60% of embryos was responded by H-Y antiserum

Table 2. Effect of subsequent booster on the rate of rat with H-Y antibody in case of intrasplenic injection of testis cell of newborn rat as antigen

Method of immunization	No. of rat immunized	No. of rat with H-Y antibody(%)
Control ¹⁾	30	4(13) ^a
1st B ²⁾	30	8(27) ^a
2nd B	30	21(70) ^b
3rd B	30	22(73) ^b

¹⁾ Control: no booster.

²⁾ B: Booster

^{a,b} values with different superscripts in the column differ significantly ($p < 0.05$).

였다. 항혈청을 생산한 흰쥐의 비율은 2nd와 3rd B에서 1st B에서보다 유의적으로 ($p < 0.05$) 높았다. 즉 2차 및 3차 booster에 의해 역가 있는 H-Y 항혈청의 생산율이 전반적으로 증가하였다.

역가가 확인된 흰쥐 H-Y 항혈청을 토끼 상실배에 처리하여 H-Y 항혈청에 의한 중간 교차반응을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 대조구(NFRS)에서는 배반포까지 정상적으로 발달한 비율이 92%인 반면 항혈청

처리구(AS)에서는 42%였다. 즉, 항혈청 처리구에서는 발달한 상실배와 발달중지된 상실배의 비율이 자연성비인 50:50%에 근접하였다.

H-Y 항혈청에 영향을 받지 않고 정상적으로 발달한(H-Y negative) 수정란을 수란토에 이식하여 산자의 성을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 실험구 각각의 수란토 4마리에 총 80개의 수정란을 이식하여 대조구에서는 3마리(75%)가, 처리구에서는 2마리(50%)가

Table 3. Development of rabbit morulae cultured in the medium containing rat H-Y antiserum

Serum	No. of morulae cultured	Developed(%)	Affected(%)
NFRS	100	92(92)	8(8)
AS	100	42(42)	58(58)

Table 4. Transfer of rabbit embryos sexed by rat H-Y antiserum

Treatment	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients(%)	Sex of pups	
				Male(%)	Female(%)
Control ¹⁾	80	4	3(75)	10(45)	12(55)
H-Y negative	80	4	2(50)	2(17)	10(83)

¹⁾ Control: culture of rabbit embryos in Ham's F10 + FBS(10%, V/V)

임신하였다. 태어난 산자의 성을 조사한 결과 자·웅 성비가 대조구에서는 12(55%):10(45%)로 자연 성비 50:50%에 근접한 반면 항혈청 처리구에서는 10(83%):2(17%)로 암컷의 비율이 월등히 높았다.

IV. 고 찰

H-Y 항혈청을 이용하여 착상전 수정란을 성판별하는 방법은 수정란을 성판별하는 다른 여러 방법에 비해 상대적으로 수정란에 상해를 적게 주어 원하는 성의 산자를 실용성 있게 생산할 수 있다. 본 연구에서는 H-Y 항혈청의 역가 및 생산율을 높이고 보다 효율적인 수정란 성판별 체계를 확립하기 위해 실시하였다.

정소세포를 항원으로 면역시킨 근교 SD계 자성 흰쥐에서 얻은 혈청 중에서 H-Y 항체의 존재 여부를 생쥐 수정란을 이용한 세포독성시험으로 확인하였다. H-Y 항혈청 처리구 중 발달한 수정란의 비율이 40~60% 범위에 있는 혈청만을 H-Y 항체역가가 있는 것으로 인정하였다(Table 1). White 등(1982)은 1,000개의 수정란을 H-Y 항혈청으로 처리하였을 때 479개(47.9%)의 수정란에서 세포용해 현상을 관찰하였다. 이는 수정란의 세포막에 존재하는 H-Y 항원이 H-Y 항체 및 보체와 결합하여 세포막에 구멍이 생김에 따라 세포 밖과 안의 삼투압 차이로 할구가 파괴된 것으로 시사된다(Mayer, 1973). H-Y 항체와 보체에 의해 영향을 받아 세포용해 현상을 보인 수정란(H-Y positive)은 음성 수정란으로, 영향을 받지 않고 정상적으로 발달한 수정란(H-Y negative)은 자성 수정란으로 추정된다(Epstein 등, 1980; White 등, 1982; 심 등, 1986; 양과 김, 1988; 정 등, 1989).

항원 주입후 연이은 booster의 효과를 알아보기 위한 실험에서는 Table 2에서 보는 바와 같이 비장내 주입만 한 경우에는 H-Y 항체 역가가 인정되는 항혈청을 생산한 흰쥐의 비율은 13%로 낮은 반면 booster

횟수가 1, 2 및 3회로 늘어날수록 27, 70 및 73%로 증가하였다. 특히 2차 이후의 booster에서는 역가가 인정된 항혈청을 생산한 흰쥐의 비율이 유의적으로($p < 0.05$) 증가하였다. 항원의 booster는 비장의 미세구조와 비장에서 memory B-cell 경로를 거치는 B-cell의 수, 항원특이적 B-cell 형성을 변화시킨다(Shilizzi, 1995). 또한 booster 횟수가 priming과 booster간 간격보다 면역반응에 더 큰 영향을 미친다(Hu 등, 1990). 따라서 본 결과는 일반적인 면역 반응과 일치하며 기존의 방법보다 효율적인 것으로 사료된다.

Table 3은 토끼의 상실배를 역가가 확인된 흰쥐 H-Y 항혈청과 보체를 첨가한 배양액에서 배양하여 상실배의 발달상을 관찰한 결과이다. 대조구에서는 정상적으로 발달한 상실배의 비율이 92%인 반면 항혈청 처리구에서는 정상적으로 발달한 상실배와 발달이 저해된 상실배의 비율이 42:58%로 자연성비인 50:50%에 근접하였다. 이상의 결과로 흰쥐 H-Y 항혈청이 토끼 상실배에 교차반응함을 확인할 수 있었다. Utsumi 등(1984)은 흰쥐의 상실배를 흰쥐 H-Y 항혈청만을 포함한 배양액에서 일정시간 배양하였을 때 배반포로 발달한 수정란과 발달이 지연된 수정란의 비율이 각각 49.0과 51.0%로 자연성비 50:50%에 근접한 비율이었고, 산양과 소의 상실배를 동일한 방법으로 처리하였을 때 산양에서 각각 44.0과 56.0%로, 소에서 50.0과 50.0%로 분리되었다고 보고하여 본 연구의 결과와 일치하였다. 여기서 배반포로 발달한 수정란(H-Y negative)은 자성 수정란으로, 발달이 지연된 수정란(H-Y positive)은 음성 수정란으로 추정된다(Utsumi 등, 1983, 1984; Satoh 등, 1985).

Table 4는 역가가 인정된 흰쥐 H-Y 항혈청으로 토끼 상실배를 처리하여 배반포로 발달한 수정란을 수란 토에 이식하여 태어난 산자의 성을 조사한 결과이다. 항혈청으로 처리하여 정상적으로 발달한(H-Y negative) 토끼 수정란을 이식한 결과 임신율은 50%로 대

조구의 75%에 비해 낮았으며 태어난 산자의 수도 대조구에서는 평균 7.3마리인 반면 항혈청 처리구에서는 평균 6.0마리로 약간 적었다. 항혈청 처리구에서 산자의 83%가 암컷이었는데 대조구에서는 수컷과 암컷의 비율이 45:55%로 자연성비를 보였다. 이상의 결과는 생쥐 수정란으로 역가를 검증한 흰쥐 H-Y 항혈청으로 토끼의 착상전 수정란을 성관별하여 산자의 성을 조절할 수 있음을 보여 주었다. 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 암컷이었다고 발표하였고, 박 등(1996)은 정소세포를 항원으로 제조한 H-Y 항혈청을 토끼 상실배에 처리하여 이식 후 산자의 성을 조사한 결과 산자의 86%가 암컷이었다고 보고하였다. 본 시험의 결과는 H-Y 항체를 이용하여 포유 동물 수정란의 성을 관별할 수 있었다는 White 등(1983, 1987), 고 등(1989) 및 정 등(1989)의 보고와 일치하였다.

본 연구 결과 흰쥐 신생자 정소세포를 항원으로 제조한 흰쥐 H-Y 항혈청으로 토끼 상실배를 처리하였을 때 배반포로 발달한 수정란은 83%가 자성임이 확인되었다. 또한 항원을 비장내 주입하고 1주 간격으로 복강내에 2회 이상의 booster를 실시할 경우 역가가 인정된 항혈청을 생산하는 흰쥐의 비율이 유의적($p < 0.05$)으로 증가한다는 것이 확인되었다.

V. 적 요

본 연구는 생쥐 및 토끼의 수정란을 흰쥐 H-Y 항혈청으로 성관별하는 방법을 확립하고 H-Y 항혈청 생산에 있어서 H-Y 항혈청의 역가와 생산율을 증진하고자 실시하였다. 근교계 SD 흰쥐의 신생자 정소세포를 H-Y 항원으로 사용하여 H-Y 항혈청을 제조하였으며, 고역가의 항혈청을 제조하기 위하여 항원을 비장내 주입 후 1주 간격으로 복강내에 booster를 실시하였다. H-Y 항체의 생성 유무는 생쥐 수정란을 이용한 세포 독성시험으로 검증하였으며 역가가 인정된 H-Y 항혈청으로 토끼의 수정란을 성관별한 후 이식하여 산자의 성을 조사하였다. 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 면역화하여 얻은 H-Y 항혈청에 생쥐 수정란을 노출시켰을 때 발달한 수정란과 발달이 지연 또

는 중지된 수정란의 비율은 다양하게 나타났다. 이중 발달한 수정란의 비율이 40~60%의 범위에서 항혈청만을 H-Y 항체의 역가가 있는 것으로 인정하였다.

2. 항원을 비장내 주입하거나 비장내 주입 후 1주 간격으로 복강내에 booster하여 얻어진 항혈청 중 H-Y 항체를 갖는 흰쥐의 비율은 booster 차수에 따라 각각 13, 27, 70, 73%로, 2차와 3차 booster에서 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였다.
3. 토끼 상실배를 흰쥐 H-Y 항혈청과 보체로 배양했을 때 정상적인 배반포로 발달한 수정란과 발달이 지연된 수정란의 비율은 42:58%로 자연성비 50:50%에 근접하였으며 흰쥐 H-Y 항혈청은 토끼 수정란에 중간 교차반응하는 것이 확인되었다.
4. H-Y 항혈청으로 상실배를 처리하여 정상적인 배반포로 발달한 토끼 수정란을 수란토에 이식하였을 때 임신율은 50%였으며 태어난 산자의 83%가 자성이었다. 즉 토끼의 상실배를 흰쥐 H-Y 항혈청에 노출하였을 때 정상적인 배반포로 발달한 수정란 중 83%는 실제 자성임이 확인되었다.

결론적으로 흰쥐 신생자 정소세포를 항원으로 H-Y 항혈청을 얻으려 할 때는 항원을 비장내에 주입하고 복강내에 1주 간격으로 2회 이상의 booster를 실시할 때 고역가의 항혈청을 다량으로 얻을 수 있었으며, 이 항혈청에 음성인 토끼 수정란을 이식하여 얻은 산자는 83%가 자성이었다.

VI. 인용문헌

1. Amann, R. P. 1989. Treatment of sperm to predetermine sex, *Theriogenology*, 31:49-60.
2. Betteridge, K. J. 1989. Livestock embryo sexing: past, present, and future. In: Wachtel, S. S(ed.) *Evolutionary Mechanism in Sex Determination*, CRC press, Boca raton, pp. 279-289.
3. Eichwald, E. J. and C. R. Silmsler. 1955. Un-titled publication. *Transplant. Bull.* 2:148-149.
4. Epstein, C. J., S. Smith and B. Travis. 1980.

- Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens*. 15: 63-68.
5. Gledhill, B. L. 1988. Selection and separation of X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Gamete Res.* 20:377-395.
 6. Goldberg, E. H., T. Arrington and S. Tokuda. 1973. Detection of H-Y(male) antigen on mouse lymph node cell to cell cytotoxicity test. *Transplantation*. 15:334-336.
 7. Hiroyuki, A., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1985. Sex determination of ddy mouse morula by anti-male spleen cell serum. *Japan. J. Anim. Reprod.* 31:74-76.
 8. Hu, J. G., T. Yokoyama and T. Kitagawa. 1990. Studies on the optimal immunization schedule of experimental animals. IV. The optimal age and sex of mice, and the influence of booster injections. *Chem. Pharm. Bull.* 38(2):448-451.
 9. Im, K. S., C. K. Lee, B. S. Yang, K. M. Chung and S. H. Kim. 1991. Studies on sexing of rabbit embryos by H-Y antibody. *Ani. Biotech. Bull.* 1(4):34-40.
 10. Johnson, L. A. 1990. Sex selection in swine: Altered sex ratio in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. *Proc. Amer. Soc. Cell Biol.* (abstr)
 11. Johnson, L. A., J. P. Flook and H. W. Hauwk. 1989. Sex preselection in rabbits: Live birth from X- and Y-sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41:199-203.
 12. Kroc, C. J. and E. H. Goldberg. 1976. Detection of H-Y(male) antigen on 8-cell mouse embryos. *Science*. 193:1134-1135.
 13. Mayer, M. 1973. The complement system. *Sci. Amer.* 229:54-66.
 14. Satoh, E., M. Den, K. Utsumi, M. Yuhara and M. Yamada. 1985. Development of sexed goat and cow embryo by H-Y antibody. *J. Mamm. Ova. Res.* 2:86-89.
 15. Shilizzi, B. M., H. F. J. Savelkoul, M. W. A. De Jonge, T. H. The and L. De Leij. 1995. Impaired antigen-specific B-cell response and altered splenic microstructure in mice following continuous administration of IL-4 *in vivo*. *Scan. J. Immunol.* 41(5):467-474.
 16. 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.*, p. 59(abstr.).
 17. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. *Proc. 10th Inter. Congr. Anim. Reprod. and AI.* University of Illinois, Urbana, IL, 234.
 18. van Vleit, R. A., A. M. Verrinder-Gibbins and J. S. Walton. 1989. Livestock embryo sexing: A review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology*. 32:421-438.
 19. Wachtel, S. S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology*. 21:18-28.
 20. Wachtel, S. S., G. C. Koo and E. A. Boyse. 1975. Evolutionary conservation of H-Y antigen. *Nature*. 254:270-272.
 21. 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.
 22. White, K. L., G. M. Lindner, G. B. Anderson and R. H. BonDurant. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Theriogenology*. 19:701-705.
 23. White, K. L., G. B. Anderson, R. L. Pashen and R. H. BonDurant. 1987. Detection of his-

- to compatibility (H-Y) antigen: Identification of sex of preimplantation ovine embryo. J. Reprod. Immunol., 10:27-32.
24. Yano, T. Sexing of *in vitro*-fertilized preimplantation mouse embryos by the PCR method. Jap. J. Hum. Genet. 38(3):277-288.
 25. 고팡두, 심호섭, 김종배, 박홍양, 정길생. 1986. H-Y 항체 활성의 최적 조건과 종간 교차반응. 한국가축번식학회지. 10:168-174.
 26. 남경우. 1995. 정소를 항원으로 한 H-Y 항혈청에 의한 생쥐, 토끼 수정란의 성판별에 관한 연구. 서울대학교 석사학위 논문.
 27. 박영일, 임경순, 한재용, 남경우, 황규춘, 박화춘. 1996. 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 성판별. 한국가축번식학회지. 20(1):53-61.
 28. 심호섭, 고정재, 김종배, 박홍양, 정길생. 1986. 생쥐 수정란에 대한 H-Y 항체의 처리가 산자의 성비에 미치는 영향. 한국축산학회지. 28:759-764.
 29. 양부근, 김정익. 1988. H-Y 항체에 의한 생쥐 초기배의 성판별에 관한 연구. I. 세포 발육능 검사에 의한 성판별. 한국가축번식학회지. 12:31-36.
 30. 이창규. 1991. H-Y 항체에 의한 생쥐 및 토끼 수정란의 성조절에 관한 연구. 서울대학교 석사학위 논문.
 31. 정장용, 박충생, 박희성. 1989. Rat H-Y 항체에 의한 생쥐 Embryo의 성조절에 관한 연구. I. H-Y 항체의 처리가 생쥐 상실배의 발달에 미치는 영향 및 세포독성시험. 한국축산학회지 31:491-496.
 32. 정장용, 박충생, 박희성. 1989. Rat H-Y 항체에 의한 생쥐 Embryo의 성조절에 관한 연구. II. H-Y 항체의 처리가 생쥐 Embryo의 발달에 미치는 영향. 한국축산학회지. 31:497-503.
 33. 정장용, 박충생, 박희성. 1989. Rat H-Y 항체에 의한 생쥐 Embryo의 성조절에 관한 연구. III. H-Y 항혈청에 의한 Balb/c 생쥐 상실배의 성판별. 한국축산학회지. 31:491-496.
 34. 최화식. 1996. H-Y 항체에 의한 생쥐 및 토끼 수정란의 성판별과 판별된 토끼 수정란 할구의 융합, 발생 및 수태에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.