

## 돼지 *SRY*와 *ZF* 유전자를 이용한 성판별 기법

조인철\* · 강승률\* · 이성수\* · 최유림\* · 고문석\* · 오문유\*\* · 한상현\*  
 농촌진흥청 난지농업연구소\*, 제주대학교 생명과학과\*\*

## Molecular Sexing Using *SRY* and *ZF* Genes in Pigs

I. C. Cho\*, S. Y. Kang\*, S. S. Lee\*, Y. L. Choi\*, M. S. Ko\*, M. Y. Oh\*\* and S. H. Han\*  
 National Institute of Subtropical Agriculture, R.D.A.\*,  
 Department of Life Science, College of Natural Sciences, Cheju National University\*\*

### ABSTRACT

A method for sex determination of pigs was examined using polymerase chain reaction(PCR). *Sex determining region Y(SRY)* gene encoded on Y chromosome plays a key role for primary male development. *Zinc finger X-Y(ZFX-ZFY)* gene, one of the X-Y homology gene group was found on the X and Y chromosomes, respectively. We tested for molecular sexing by amplification patterns of *SRY* and *ZF* genes. Genomic DNAs from various resources including porcine hairs and semen collected from domestic pig breeds and native pigs was used for PCR assay of each gene. The amplified products for porcine *SRY* gene were yielded only in males but not in females. On the other hand, two differential patterns were observed in amplification of *ZF* gene reflecting the chromosomal dimorphism by a length polymorphism between X and Y chromosomes. Of both, a common band was detected in all individuals tested so that this band might be amplified from *ZFX* gene as a PCR template, but another is specific for males indicated that from *ZFY*. The result of PCR assay provides identical information to that from investigation of phenotypic genders of the pigs tested. We suggest that this PCR strategy to determine porcine sexes using comparison of the amplification patterns of the *SRY* gene specific for Y chromosome and the dimorphic *ZF* gene between X and Y chromosomes may be a rapid and precise method for discrimination of two sexes and applied to DNA analysis of small samples such as embryonic blastomere, semen, and hairs.

(Key words : Chromosome, Pig, Polymerase chain reaction, Sex determination, *SRY*, *ZF*)

### I. 서 론

포유류에서 X, Y 성염색체의 진화는 가장 흥미로운 생물학적 관심의 대상 중 하나이다. 원래 한 쌍의 상동염색체에서 진화한 것으로 Y 염색체의 일부는 점진적으로 붕괴되어 현재는 웅성발생을 위한 필수적인 부분들만 남겨졌다고 추정하고 있다. Y 염색체 상의 유전자들은 크게 두 종류로 구분된다. 한 종류는 testis 발생에 특이적인 기능을 담당하면서 Y 염색체 상에만

존재하는 유전자들이며, 다른 한 가지는 X 염색체 유전자들과 상동인 유전자들이다. 포유류의 Y 염색체 상에서 발견되는 *sex determining region Y(SRY)* 유전자는 웅성발생에서 지배적인 역할을 수행한다(Sinclair 등, 1990; Koopman 등, 1991; Goodfellow와 Lovell-Badge, 1993; Nagai, 2001; Angelo와 Moreira, 2002). 돼지에서 *SRY*는 Yp1.2-1.3 상에 위치하며(Yang 등, 1993; Quilter 등, 2002), 하나의 암호화 영역으로 이루어져 있다. *SRY*의 전사체는 testis

Corresponding author : Sang-Hyun Han, National Institute of Subtropical Agriculture, R.D.A. Cheju 690-150, Korea.  
 Tel : 064-741-2559, E-mail : hansh04@rda.go.kr

형성 전 생식융기(genital ridge)와 성체의 다양한 조직에서 발견되며, 전사 산물은 생식기관의 발생과 더불어 출생 후 성숙에서도 자성발생을 억제하면서 음성 특이적 표현형 발현에 핵심적인 역할을 담당한다(Clepet 등, 1993; Hacker 등, 1995; Lahr 등, 1995; Margarit 등, 1998). 유전자의 돌연변이나 감수분열 중 염색체 전좌를 통한 재조합 등은 XX-XY핵형과 상반된 성의 출현이나 생식기관 기형 및 음성불임 등 다양한 표현형 이상을 초래할 수 있는 것으로 보고되었다(Fuse 등, 1991; Melniczek 등, 1999; Tomosama 등, 1999; Zenteno 등, 2003; Valetto 등, 2005). 포유류 세포에서 가장 보편적인 DNA-결합 단백질 motif의 하나인 zinc finger(ZF)는 인간에게서 800 여 종 이상의 단백질들이 예상되고 있다(McCarty 등, 2003). 포유류에서 X-연관인 ZFX와 Y-연관인 ZFY 유전자들은 비재조합 영역(non-recombining region)인 말단부에 위치하고 있으며, 두 유전자들은 모든 발생단계에 걸쳐 모든 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있다(Palmer 등, 1990; Iwase 등, 2003). 최근의 연구에서는 인간과 소, 돼지, 말의 ZFX, ZFY 유전자의 유사성을 비교한 결과 대부분의 intron 서열에서 80% 이상 상동이나, 몇몇 intron의 경우 SINE-like element의 출현으로 ZFX와 ZFY간 유전자의 길이가 상이하다고 보고되었다(Poloumienko, 2004).

축종에 따라 차이를 나타내기는 하지만, 인공수정에 의한 인위적인 번식이전 임의교배에 의한 번식이전 출생축의 성비(sex ratio)는 경제성을 좌우하는 중요한 기준이 되고 있다. 이에 따라 도체를 포함한 성체뿐만 아니라, 출생전 태아 또는 배아에 대한 성판별이 다양한 방법으로 시도되고 있다(오 등, 1996; 김 등, 2000; Rens 등, 2001; Hirayama 등, 2004; Lee 등, 2004). 핵형분석(Gardner와 Edwards, 1968; King 등, 1979)과 Barr body의 확인(Barr, 1960) 등 세포유전학적 분석과 성-특이적 항체검사(Anderson, 1987; White 등, 1987) 등 여러 가지 실험기법들이 성판별에 유용하게 이용되어 왔으며, 최근 분자유전학의 발달에 힘입어 Y 염색체 특이적 probe를 이용한 fluorescent *in situ* hybridization

(FISH) 기법을 통해 염색체 상에서 확인하거나, 보다 간단하고 효율적인 방법으로는 *in vitro*에서 polymerase chain reaction(PCR) 기법을 이용하여 Y 염색체 특이적 유전자 또는 X, Y 염색체 상동유전자를 증폭하여 비교하는 분석 기법들이 개발되고 있다(Thomsen 등, 1992; Chung 등, 1996; Staessen 등, 1999; Rens 등, 2001; Lee 등, 2004). 특히 음성발생에 핵심 유전자이면서 Y 염색체 특이적인 SRY 유전자의 증폭 여부는 수컷 판별의 기준이 되고 있으며, 상동유전자 중에는 AMELX-AMELY, ZFX-ZFY 유전자의 서열 다형성에 근거한 표지자들을 활용하고 있다(Sathasivam 등, 1995; Chung 등, 1996; Phua 등, 2003; Hirayama 등, 2004). 이외에도 X, Y 염색체 상의 공통된 반복서열 길이의 다형성을 random amplified polymorphic DNA(RAPD), microsatellite, restriction fragment length polymorphism 등의 방법으로 검출하여 분자표지자로 활용하려는 시도들이 계속되고 있다(Bello와 Sanchez, 1999; Shiue 등, 2000; Alves 등, 2003; Horng와 Huang, 2003).

현재까지 돼지의 X, Y 염색체에 대한 연구들이 다수 보고되어 있으나 간편하면서도 효율적인 유전자 성 판별을 수행할 수 있는 실험기법들은 구체적으로 마련되어 있지 않다. 본 연구에서는 여러 품종의 돼지의 다양한 조직에서부터 Y 염색체 특이적인 유전자인 SRY 유전자와 X, Y 염색체에서 공통으로 암호화되어 있으면서 유전자 길이의 이형성(dimorphism)이 보고된 ZFX-ZFY 유전자에 대한 PCR 분석을 통해 정확하면서도 신속한 분자적 성 판별 기법을 개발하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

현재 우리나라에서 사육되고 있는 돼지 5 품종(Berkshire, Duroc, Hampshire, Landrace, Large White) 각 30 두와 제주재래돼지 20 두, 한반도 재래돼지 20 두를 대상으로 전혈, 근육, 피부, 모근 등에서 추출한 DNA를 대상으로 유전자

성 판별을 위한 PCR 증폭 실험을 수행하였다. 또한 Duroc, Landrace, Large White 품종 각 10 두의 수컷에서 채취한 정액에서도 DNA를 추출하여 분석에 이용하였다. 조직에서 DNA 추출은 sucrose-proteinase K 방법(Birren 등, 1997)을 일부 변형하여 수행하였으며, 1 개의 모근과 소량의 정액에서 DNA 추출은 Chelex 100 resin(Bio-Rad, USA)을 이용하였다. 각각의 정액 시료와 모근 1 개를 DNA 추출완충액(5% Chelex / 1% SDS / 10 mM Tris / 1 mM EDTA)이 들어있는 tube에 넣고 10 분간 끓인 후 용액부분에 isopropanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 추출한 모든 DNA는 RNase(Sigma, USA) 처리 후 phenol 추출법과 ethanol 침전으로 다시 회수하고 TE buffer에 용해하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

2. Primer 제작

유전자 성 판별을 위해 PCR 증폭용 primer는 연구진이 직접 고안하였다. Y 염색체 상에 특이적으로 암호화된 SRY 유전자의 경우 기존에 보고된 돼지 SRY 유전자 서열(U49860)로부터 primer를 제작하였다. 또한, ZF 유전자에 대한 분석을 위해서 X, Y 염색체간 길이 차이를 나타내는 intron 7을 포함한 단편을 얻기 위해 기존에 보고된 인간, 소의 서열 중 exon 7과 exon 8의 서열을 비교하여 상동성이 높은 부분에서 primer를 제작하였다. Primer 제작은 Primer 3 web program을 이용하였으며, 증폭과정에서 mis-priming을 최소화하기 위해 Rodent\_and\_Simple

library option을 이용하였다. 본 연구에서 이용한 primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다.

3. 종합효소연쇄반응(PCR)

조직으로부터 분리한 DNA를 주형으로 한 PCR 반응은 10×반응 완충액, 20 mM dNTP, 각각 200 mM primer, 1.5 units Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan)에 멸균한 탈 이온수를 첨가하여 25 µl 용량으로 반응하였다. 혈액, 피부, 근육에서 추출한 10~100 ng, 정자시료에서는 1~2 ng, 1 개의 모근으로부터 추출한 DNA 전체를 PCR 주형으로 이용하였다. PCR 증폭은 PTC-200(MJ Research, USA)을 이용하여 Han 등(2004)의 방법을 변형하여 수행하였다. 반응 시 primer의 annealing 온도는 각각의 primer의 Tm에 근거하여 설정하였다. 증폭 산물은 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose 겔 상에서 전기영동한 후, UV 하에서 확인하고 사진촬영 하였다.

4. 유전자 Cloning과 염기서열 분석

유전자 증폭산물에 대한 염기서열 결정을 위하여 DNA sequencing을 수행하였다. 정제된 PCR 산물은 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)으로 재조합한 후, Wizard Plus SV MiniPreps (Promega, USA)으로 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid DNA를 주형으로 dye-termination 반응을 수행하였고 Megabase 500(Amersham Pharmacia, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 기존에 보고된 서

Table 1. Primers used for the amplification of porcine SRY and ZFX-ZFY genes

Gene	Name of primer	Nucleotide sequences <sup>1)</sup>	Acc. No. <sup>2)</sup>
SRY	pSRYF	5'-CCCTTTTCAAATGGTGCAGT-3'	U49860
	pSRYR	5'-TGTGAGAAAGTCCCGGCTGT-3'	U49860
ZF	ZFXyf	5'-GCTGACCCTGGAGAAGATGA-3'	AF454949 and
	ZFXyF	5'-CTTCTTGTGAGAGTCATTGACAG-3'	NM_177491

<sup>1)</sup> nucleotide sequences are displayed from 5' to 3'.

<sup>2)</sup> used as the standard sequences for primer designation in this study.

열들을 근거로 exon-intron 경계를 확인하였고, CLUSTAL W(Thompson 등, 1994) program으로 다중염기정렬을 수행하여 염기변이를 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 돼지 SRY 유전자 증폭실험에 따른 성판별

웅성발현에 핵심적인 SRY 유전자의 증폭에서 암수에 대한 정보를 알고 있는 개체들과 함께 암수를 모르는 시료들에 대한 시험을 수행하였다. Fig. 1은 SRY에 대한 PCR 증폭 결과이다. 전기영동 겔 상에서 암컷에서는 band가 나타나지 않았으나 수컷에서는 PCR 산물이 단일 밴드로 증폭되었다. 혈액이나 근육, 피부에서 추출한 DNA 외에도 모근 각 1개와 소량의 정자에서 추출한 DNA에 대한 분석 역시 정확한 결과를 나타내었다. 혈액과 근육, 모근에 대한 SRY 분석결과는 수집한 개체의 성에 따라 수컷에서만 PCR 산물이 특이적으로 관찰되었고, 정액에서 추출한 DNA에서도 PCR 산물이 관찰되었다. 돼지 품종 간 특이적 염기서열의 유무를 확인하기 위해 DNA sequencing을 수행하였고, GenBank database에 등록하였다(Acc. No. AJ842527 - AJ842531, AJ842536 - AJ842540, AJ842547 - AJ842550). 다중염기 정렬을 수행한 결과 전체 5 지점에서 단일염기변이(SNP)가 확인되었으며, SNP는 품종 특이적인 양상을 보였다(data not shown). Berkshire, Duroc, Hampshire, Landrace 품종에서는 품종별로 SRY 서열이 모두 동일하였으나, 제주도과 한반도 재래돼지와 Large White의 경우는 두 가지 이상의 서열을 나타내었다. 또한 Berkshire, Hampshire, Landrace에서 조사된 서열들과 Large White, 제주 재래돼지, 한반도 재래돼지의 일부는 전체 염기서열이 동일하게 나타났다. 유전자 서열의 유사도가 대단히 높아(99.64 ~ 100%) 계통 유연관계를 확인하기에는 어려움이 있었으나, 이들 중 SNP를 보이는 품종들은 SNP 부분만을 확인할 수 있는 정밀한 실험방법이 개발된다면 부계 기원을 확인하는 표지자로도 유용할 것으로 사료된다.

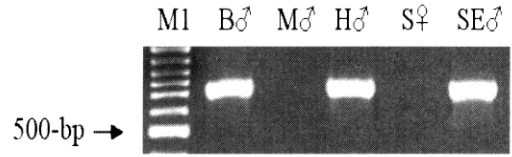


Fig. 1. PCR amplification patterns of porcine SRY gene specific for Y chromosome. B, blood; M, muscle; S, skin; H, Hair; SE, semen. M1 is the 100-bp DNA Ladder.

#### 2. 돼지 ZF 유전자 증폭실험에 따른 성 판별

돼지에서 ZF 유전자에 대한 분석에서는 조사된 모든 개체에서 암수에 따라 서로 다른 증폭 양상을 나타내었다. 조직이 유래된 개체의 표현형에 따라 혈액, 근육, 피부, 모근에서는 단일밴드인 ZFX만을 나타내는 암컷과 ZFX와 ZFY 유래의 두 밴드들을 모두 갖는 수컷으로 구분되었고, 정액 유래의 DNA에서는 ZFX와 ZFY 증폭산물이 모두 관찰되었다(Fig. 2). 염기서열에 대한 분석 결과 X 염색체 유래인 ZFX의 intron 7은 221-bp, Y 염색체 유래인 ZFY에서는 318-bp로 기존의 보고와 동일한 길이를 나타내었다. 본 연구에서 고안한 exon 7과 exon 8의 일부가 포함된 전체 PCR 산물의 길이는 각각 ZFX 379-bp, ZFY 476-bp로 확인되었다. 돼지 ZFX와 ZFY intron 7 서열간 유사도는 약 50%로 매우 낮은 수치를 보였고, 이는 ZFY intron 7의 전반부에서 95-bp SINE-like element의 출현에 따른 결과이다(Erlandsson 등, 2000; Poloumienko, 2004). X, Y 염색체에서 증폭된 ZFX, ZFY intron 7에서 PCR 산물의 길이 차이가 97-bp인 것은

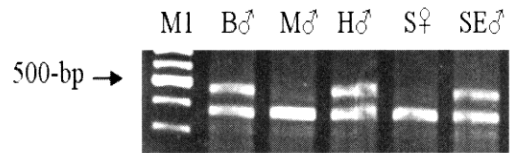


Fig. 2. PCR amplification patterns of porcine ZF gene. B, blood; M, muscle; S, skin; H, Hair; SE, semen. M1 is the 100-bp DNA Ladder.

SINE-like element의 삽입 이외에도 *ZFX*에서 2-bp, 4-bp 결실돌연변이가 각각 하나씩, *ZFY* 상에서도 하나의 4-bp 결실돌연변이가 추가로 출현하기 때문이다(data not shown). 본 연구에서 *ZFX-ZFY* 유전자 증폭에 이용한 primer는 Poloumienko(2004)에 의해 *ZFX-ZFY* 유전자상에서 이형성을 나타내는 intron 7의 양쪽에 위치한 exon 7과 exon 8에서 고안함으로써 intron 부위의 증폭과정에서 주형 DNA-primer annealing 과정에 높은 상보성을 부여할 수 있었기 때문에 반복수행에 결과 재현성을 높게 나타냈고, 표현형에 따른 성 판별 결과 및 *SRY* 분석 결과와 정확히 일치하였다.

### 3. 분자 표지자를 이용한 성 판별과 가축 육종

가축을 비롯한 다양한 포유동물에 대한 유전자 성 판별을 위하여 Y 염색체 특이적 유전자에 대하여 DNA 분석이나 염색체 분석이 주로 이용되고 있다(Thomsen 등, 1992; Staessen 등, 1999; Horng과 Huang, 2003; Valetto 등, 2005). Y 염색체 특이적인 유전자 증폭은 수컷의 선별에는 매우 유용하지만, PCR 증폭만이 아니라 세포유전학적 성 판별에 있어 실험결과에 대한 신빙성을 높이기 위해 상동염색체나 X, Y 염색체 공통의 유전자 하나에 대한 분석을 positive control로 제시해야만 한다. 반면, X, Y 염색체에 상동인 유전자의 다형성에 근거하여 RFLP 등의 방법으로 인간을 비롯한 소, 말, 염소, 양에 대한 분자유전학적 성판별을 수행하여 왔다(Aasen과 Medrano, 1990; Pollevick 등, 1992; Horvat 등 1993, Lawson과 Hewitt, 2003). 이 경우는 증폭된 PCR 산물을 차후 분석해야 하므로 신속성이 떨어진다고 하겠다. 하지만 단일 산물에 대한 분석만으로도 암수를 동시에 구별할 수 있다는 측면에서 *AMELX-AMELY*, *ZFX-ZFY* 등 X, Y 상동 유전자의 서열이나 길이의 다형성을 이용한 연구들이 진행되고 있다(Sathasivam 등, 1995; Chung 등, 1996; 오 등, 1996; 김 등, 2000; Hasegawa 등, 2000; Phua 등, 2003).

최근 소를 대상으로 체외수정에 의해 형성된 수정란 이식 이전단계에서 유전자 성 판별 기

법을 이용하고자 하는 노력들이 다각적으로 수행되고 있으며, 심지어 발생중인 배의 단일 할구와 정자에 대한 성 판별을 위한 연구까지 진행되고 있는 실정이다(오 등, 1996; 유 등, 1999; 김 등, 2000; Rens 등, 2001; Hirayama 등, 2004; Lee 등, 2004). 하지만, 현재까지 돼지에서 단일유전자에 대한 PCR 증폭만으로 암수를 동시에 판별할 수 있는 실험기법은 확립되어 있지 못한 실정이다. 또한, *SRY* 유전자가 옹성 발생에서 가장 핵심적인 역할을 담당하기 때문에 성 판별에 있어 필수적으로 확인되어야 한다. 이 경우 수컷 여부만 확인 가능하기 때문에 암컷에 대한 자료제시가 수반되어야 한다. Pomp 등(1995)은 *SRY* 유전자의 증폭으로 수컷을 탐색하고 *ZFX-ZFY* 유전자의 증폭 결과를 대조하는 duplex 증폭기법으로 어린 시기의 돼지에 대한 성 판별을 시행하였으나, *ZFX-ZFY* 유전자의 증폭 산물이 서로 동일한 길이를 나타내기 때문에 *SRY* 증폭에 대한 결과를 지지하거나 성 판별에 이용하였기 보다는 단지 PCR 증폭의 신빙성을 제시하는 결과라 할 수 있다. 돼지의 사육에서 자연교배를 이용하거나 인위적으로 정액을 채취한 후 주입하기 때문에 유전자 성 판별의 실효성 자체가 간과될 수 있으나, 유전적으로 능력이 향상된 종돈의 대량 확보를 위해서 인공수정이 필수적인 사안임을 고려해 볼 때 embryo에 대한 성 판별 기법의 확립은 시급히 마련되어야 할 것이다.

본 연구에서는 Y 염색체 특이적인 *SRY* 유전자와 X, Y 염색체 상동유전자인 *ZF* 유전자의 이형성을 바탕으로 돼지의 성 판별을 시도하였다. *SRY*의 경우 수컷에서만 PCR 산물이 출현하고 *ZF*는 암수에 따라 서로 다른 증폭 양상을 나타내게 된다. PCR 증폭 후 전기영동만으로 신속하고 경제적으로 암수판별이 가능하며, *ZFX-ZFY*와 *SRY* 두 유전자에 대한 분석을 동시에 수행함으로써 고도의 정확성을 마련하고 개개의 유전자에 대한 단일 분석결과의 오류를 보완할 수 있는 실험체계라 하겠다. 아울러 현재 DNA 추출 후 시험에 적용하고 있는 실험기법의 민감도를 높여 단일세포 수준에서 판별할 수 있는 범위로 확대해 간다면 돼지뿐만 아니

라 소, 말 등 모든 가축에 대하여 적용범위를 확대할 수 있을 것이고, 특히 집단 내에서 암컷의 비율이 돼지를 비롯한 대부분의 축종에서 농가의 수입과 직결된다는 면에서 본 연구 결과는 지대한 파급효과를 나타낼 것으로 사료된다.

#### IV. 요약

돼지의 성 판별을 위해서 중합효소연쇄반응(PCR) 기법을 시험하였다. *SRY*는 Y 염색체 상에 암호화되어 있으며 일차적인 웅성 발생에 대한 핵심적인 역할을 수행한다. *Zinc finger X-Y(ZFX-ZFY)* 유전자는 X-Y 염색체에 상등으로 존재하는 유전자들 중 하나이다. 본 연구진은 *SRY* 유전자와 *ZFX-ZFY* 유전자들의 증폭 양상을 이용하여 분자적 성 판별을 수행하였다. 가축돼지 품종들과 재래돼지의 정액과 모근을 포함한 여러 조직으로부터 추출한 genomic DNA들을 PCR assay에 이용하였다. *SRY*에 대한 증폭산물은 수컷에서만 특이적으로 관찰되었고, 암컷에서는 전혀 관찰되지 않았다. 반면, *ZF* 유전자에 대한 PCR 증폭 결과는 X, Y 염색체 간 유전자 길이의 다형성에 의한 이형성을 반영하는 두 가지 다른 양상의 밴드들로 관찰되었다. 이 둘 중 모든 개체에서 공통으로 발견되는 밴드는 X 염색체상의 *ZFX*를 주형으로 증폭된 것이며, 다른 하나는 수컷 특이적이며 *ZFY* 유전자를 주형으로 하는 것이다. PCR assay의 결과는 표현형에서 나타내는 성 판별 결과와 동일한 결과를 나타내었다. 본 연구결과는 Y 염색체 특이적인 *SRY*와 X, Y 염색체의 이형성을 나타내는 *ZFX-ZFY*에 대한 PCR 전략은 성을 판별하는 신속하면서도 정확한 실험기법으로 암수를 식별하는데 효율적으로 이용될 뿐만 아니라, 발생 중인 배의 할구나 정액, 모근같이 적은 양의 시료에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

#### V. 인용 문헌

1. Aasen, E. and Medrano, J. F. 1990. Amplification

of the *ZFY* and *ZFX* genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8:1279-1281.

2. Alves, B. C., Hossepian de Lima, V. F., Teixeira, C. M. and Moreira-Filho, C. A. 2003. Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. *Theriogenology* 59:1415-1419.

3. Anderson, G. B. 1987. Identification of embryonic sex detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 27: 81-97.

4. Angelo, M. and Moreira, M. 2002. *SRY* evolution in Cebidae(Platyrrhini: Primates). *J. Mol. Evol.* 55: 92-103.

5. Barr, M. L. 1960. Sexual dimorphism in interphase nuclei. *Am. J. Hum. Genet.* 12:118-127.

6. Bello, N. and Sanchez, A. 1999. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA(RAPD) assay. *Mol. Ecol.* 8:667-669.

7. Birren, B., Green, E. D., Klapholz, S., Myers, R. M. and Roskams, J. 1997. *Genome analysis: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

8. Chung, Y., Jeon, J. T., Kim, K. D., Lee, S. H. and Hong, K. C. 1996. Sex determination in somatic and embryonic cells of the pig by FISH and PCR. *Korean J. Anim. Reprod.* 20:323-331.

9. Clepet, C., Schafer, A. J., Sinclair, A. H., Palmer, M. S., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. 1993. The human *SRY* transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2:2007-2012.

10. Erlandsson, R., Wilson, J. F. and Paabo, S. 2000. Sex chromosomal transposable element accumulation and male-driven substitutional evolution in humans. *Mol. Biol. Evol.* 17:804-812.

11. Fuse, H., Satomi, S., Kazama, T., Katayama, T., Nagabuchi, S., Tamura, T., Nakahori, Y. and Nakagome, Y. 1991. DNA hybridization study using Y-specific probes in an XX-male. *Andrologia* 23: 237-239.

12. Gardner, R. L. and Edwards, R. G. 1968. Control of the sex ratio at full term in rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature* 218:346-349.

13. Goodfellow, P. N. and Lovell-Badge, R. 1993. *SRY* and sex determination in mammals. *Ann. Rev. Genet.* 27:71-92.

14. Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. and Lovell-

- Badge, R. 1995. Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603-1614.
15. Han, S. H., Kim, J. H., Song, J. H., Oh, J. H., Oh, Y. S., Jung, Y. H., Kayano, H. and Oh, M. Y. 2004. Polymorphism of the mtDNA cytochrome B and NADH dehydrogenase 6 genes in Tsushima and Jeju native horses. *Korean J. Genetics* 26:1-7.
  16. Hasegawa, T., Sato, F., Ishida, N., Fukushima, Y. and Mukoyama, H. 2000. Sex determination by simultaneous amplification of equine *SRY* and *amelogenin* genes. *J. Vet. Med. Sci.* 62:1109-1110.
  17. Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Hirano, T., Sugimoto, Y., Kobayashi, N., Inaba, M., Sawai, K., Onoe, S. and Minamihashi, A. 2004. Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos. *J. Reprod. Dev.* 50:613-618.
  18. Hong, Y. M. and Huang, M. C. 2003. Male-specific DNA sequences in pigs. *Theriogenology* 59:841-848.
  19. Horvat, S., Medrano, J. F., Behboodi, E., Anderson, G. B. and Murray, J. D. 1993. Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Res.* 2:134-140.
  20. Iwase, M., Satta, Y., Hirai, Y., Hirai, H., Imai, H. and Takahata, N. 2003. The amelogenin loci span ancient pseudoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:5258-5263.
  21. King, W. A., Linares, T., Gustavsson, I. and Bane, A. A. 1979. A method for preparation of chromosome from bovine zygotes and blastocysts. *Vet. Sci. Commun.* 3:51-56.
  22. Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121.
  23. Lahr, G., Maxson, S. C., Mayer, A., Just, W., Pilgrim, C. and Reisert, I. 1995. Transcription of the Y chromosomal gene, *Sry*, in adult mouse brain. *Mol. Brain Res.* 33:179-182.
  24. Lawson, L. J. and Hewitt, G. M. 2002. Comparison of substitution rates in *ZFX* and *ZFY* introns of sheep and goat related species supports the hypothesis of male-biased mutation rates. *J. Mol. Evol.* 54:54-61.
  25. Lee, J. H., Park, J. H., Lee, S. H., Park, C. S. and Jin, D. I. 2004. Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence *in situ* hybridization(FISH). *Theriogenology* 62: 1452-1458.
  26. Margarit, E., Guillen, A., Rebordosa, C., Vidal-Taboada, J., Sanchez, M., Ballesta, F. and Oliva, R. 1998. Identification of conserved potentially regulatory sequences of the *SRY* gene from 10 different species of mammals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:370-377.
  27. McCarty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D. and Smale, S. T. 2003. Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol. Cell* 11:459-470.
  28. Melniczek, J. R., Dambach, D., Prociuk, U., Jezyk, P. F., Henthorn, P. S., Patterson, D. F. and Giger, U. 1999. *Sry*-negative XX sex reversal in a family of Norwegian Elkhounds. *J. Vet. Intern. Med.* 13:564-569.
  29. Nagai, K. 2001. Molecular evolution of *Sry* and *Sox* gene. *Gene* 270:161-169.
  30. Palmer, M. S., Berta, P., Sinclair, A. H., Pym, B. and Goodfellow, P. N. 1990. Comparison of human *ZFY* and *ZFX* transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:1681-1685.
  31. Phua, A. C., Abdullah, R. B. and Mohamed, Z. 2003. A PCR-based sex determination method for possible application in caprine gender selection by simultaneous amplification of the *Sry* and *Aml-X* genes. *J. Reprod. Dev.* 49:307-311.
  32. Pollevick, G. D., Giambiagi, S., Mancardi, S., de Luca, L., Burrone, O., Frasc, A. C. and Ugalde, R. A. 1992. Sex determination of bovine embryos by restriction fragment polymorphisms of PCR amplified *ZFX/ZFY* loci. *Biotechnology* 10:805-807.
  33. Poloumienko, A. 2004. Cloning and comparative analysis of the bovine, porcine, and equine sex chromosome genes *ZFX* and *ZFY*. *Genome* 47: 74-83.
  34. Pomp, D., Good, B. A., Geisert, R. D., Corbin, C. J. and Conley, A. J. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J. Anim. Sci.* 73:1408-1415.
  35. Quilter, C. R., Blott, S. C., Mileham, A. J., Affara, N. A., Sargent, C. A. and Griffin, D. K. 2002. A mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome genes. *Mamm. Genome* 13:588-594.
  36. Rens, W., Yang, F., Welch, G., Revell, S., O'Brien, P. C., Solanky, N., Johnson, L. A. and Ferguson Smith, M. A. 2001. An X-Y paint set

- and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. *Reproduction* 121:541-546.
37. Sathasivam, K., Kageyama, S., Chikuni, K. and Notarianni, E. 1995. Sex determination in the domestic pig by DNA amplification using the HMG-box sequence. *Anim. Reprod.* 38:321-326.
  38. Shiue, Y. -L., Millon, L. V., Skow, L. C., Honeycutt, D., Murray, J. D. and Bowling, A. T. 2000. Synteny and regional marker order assignment of 26 type I and microsatellite markers to the horse X- and Y-chromosomes. *Chromosome Res.* 8:45-55.
  39. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. -M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human *sex-determining region Y* encodes a protein with a homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
  40. Staessen, C., van Assche, E., Joris, H., Bonduelle, M., Vandervorst, M., Liebaers, I. and Van Steirteghem, A. 1999. Clinical experience of sex determination by fluorescent *in-situ* hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* 5:382-389.
  41. Thomsen, P. D., Hindkjaer, J. and Christensen, K. 1992. Assignment of a porcine male-specific DNA repeat to Y-chromosomal heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet.* 61:152-154.
  42. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
  43. Tomomasa, H., Adachi, Y., Iwabuchi, M., Tohyama, Y., Yotsukura, M., Oshio, S., Yazaki, T., Umeda, T., Takano, T., Yamanouchi, Y. and Nakahori, Y. 1999. XX-male syndrome bearing the sex-determining region Y. *Arch. Androl.* 42:89-96.
  44. Valetto A, Bertini V, Rapalini E, Simi P. 2005. A 46, XX *SRY*-negative man with complete virilization and infertility as the main anomaly. *Fertil. Steril.* 83:216-219.
  45. White, K. L., Anderson, G. B., Berger, T. J., BonDurant, R. H. and Pashen, R. L. 1987. Identification of a male-specific histocompatibility protein on preimplantation porcine embryos. *Gamete Res.* 17:107-113.
  46. Yang, H., Fries, R. and Stranzinger, G. 1993. The sex-determining region Y(*SRY*) gene is mapped to p12-p13 of the Y chromosome in pig(*Sus scrofa domestica*) by *in situ* hybridization. *Anim. Genet.* 24:297-300.
  47. Zenteno, J. C., Carranza-Lira, S., Jimenez, A. L. and Kofman, S. 2003. A de novo phe67leu mutation in the *SRY* gene in a patient with complete 46, XY gonadal dysgenesis. *J. Endocrinol. Invest.* 26:1117-1119.
  48. 김용준, 정구남, 이해이, 조성우, 김용수, 유일정. 2000. 한우 체외수정란 biopsy 후 PCR 기법을 이용한 성 판정과 성감별 수정란의 이식. *한국수정란이식학회지* 15:219-230.
  49. 오성종, 양보석, 임경순. 1996. PCR 기법에 의한 수정란의 성 판별과 체외수정란의 발생속도가 성비에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 2:443-451.
  50. 유일정, 김용준, 이경광. 1999. 햄스터 H-Y 항체와 중합효소연쇄반응을 이용한 소 수정란의 성 감별. *대한수의학회지* 39:189-203.
- (접수일자 : 2005. 2. 21. / 채택일자 : 2005. 5. 31.)