

체내 및 체외 수정란의 할구를 이용한 성 판별

한영훈¹ · 김홍래¹ · 조운비¹ · 진동일^{1*}

¹충남대학교 동물자원생명과학과

Sex determination of in vivo- and in vitro-derived bovine embryos

Rong-Xun Han¹, Hong-Rye Kim¹, Yun-Fei Diao¹, Dong-Il Jin^{1*}

¹Dept. of Animal Science & Biotechnology

Received on 20 April 2011, revised on 13 May 2011, accepted on 20 June 2011

Abstract : The objective of this study was to develop a rapid and reliable PCR method for sexing of morula or blastocyst stage bovine embryo. BOV97M and bovine 1.715 satellite DNA sequences were selected for amplification of male and bovine specific DNA, respectively. But the unbalanced number of copies of these two repetitive sequences required some modification of PCR method. Karyotyping of blastomeres were carried for the confirmation of sex determination in bovine embryos. The coincidence rate of sex between biopsied-single blastomere and matched blastocyst was 80.0%. When in vivo- and in vitro- derived embryos were compared, 61.8% and 56.7% were male in in vitro- and in vivo-derived embryos, respectively. In vivo-derived embryos showed better hatching rate than in vitro-derived embryos following biopsy of blastomeres. In conclusion, rapid and effective PCR could be applied to sexing of bovine preimplantation embryos using single blastomere. The sensitivity of this assay may eliminate the need for biopsy of more than one nucleated blastomere and reduce trauma to the embryos derived from biopsy procedure.

Key words : Sexing, In vitro embryos, In vivo embryos, PCR

I. 서론

축산에서 암수 구별의 이용성은 매우 중요한 의미를 가지고 있다. 특히 소에서 성판별은 농가소득과 직접적으로 연결되어 있을 뿐만 아니라 가축의 검정사업에도 효과적으로 이용될 수 있다. 정자를 이용한 성판별은 농가에서의 실용성이 떨어지고 성판별 비율도 변이가 심한 반면, 수정란의 성판별 방법은 분자생물학의 발전과 함께 크게 개선되고 있다. 대리모로 이식하기 전에 수정란의 성을 판별하여 원하는 성의 수정란만을 이식하여 산자를 생산하고자 하는 것으로 분할 중에 있는 수정란의 할구를 대상으로 실시되는 분자생물학적 성판별 방법은 체외수정기술(in vitro fertilization)과 미세조작기술(micromanipulation)의 발달은 수정란의 성판별을 통한 후대의 성의 인위적 조절을 앞당기는데 기여하고 있다(Bruce et al., 1994; Chen

et al., 1999; Greenlee et al., 1998; Hwang et al., 1995; Ian 1994; Machaty et al., 1993).

수정란을 성판정하는 방법은 H-Y 항원과 같이 음성 특이적 항원을 이용한 면역학적 방법, X-염색체 특이적 효소량의 측정, 염색체 분석을 이용한 세포생물학적 방법, PCR을 이용하여 Y-염색체 특이적 염기서열을 증폭하는 방법과 및 X-/Y-염색체 특이적인 탐침자를 이용한 형광직접접합법 등이 있다(Bruce et al., 1994; Hare et al., 1980; Miller and Therman 2001; Munne et al., 1994; Murray et al., 1985 Viuff et al., 1999, Viuff et al., 2000). 면역학적 방법과 효소적 방법은 태반선 동물비침투적 성판정 방법으로 수정란에 가해지는 물리적 손상이 적은 반면, 정확도에 있어서는 크게 떨어지는 것으로 평가되고 있으며, 세포생물학적 방법과 분자생물학적 방법은 침투적 성판정 방법으로 높은 정확도에 비해 수정란에 가해지는 손상이 크고 성염색체 특이적 염기서열을 찾는 방법이 까다로워 성판정의 결과가 잘못될 소지가 큰 것으로 보고되고 있다

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5876

E-mail address: dijin@cnu.ac.kr

(Iwasaki and Nakahara, 1990; Long and William 1980; Munne et al., 1994, Munne et al., 1995; Murray et al., 1985).

포유동물의 성은 heterogametic(XY)와 homogametic(XX)으로 되어있고 옹성의 표현형은 Y 염색체의 존재와 관련이 있으며 성결정은 이 Y염색체상의 특이적 유전자에 의한다고 밝혀졌다. 이는 Test-determining factor(TDF)라는 조절유전자가 Y 염색체상에 존재하여 표현형의 성을 결정하는 작용을 한다(Daneau et al., 1995). 즉 TDF가 있으면 수컷, 없으면 암컷으로 되는데 성 염색체와 표현형상의 성과는 일치하고 있다. 이 TDF라고 추정되는 유전자를 cloning하여 SRY(Sex-determining region Y gene, 사람에서는 SRY, 쥐에서는 Sry)라고 명명하였다(Sinclair et al., 1990). 주요 축종인 소, 양, buffalo 등은 물론 태반성 동물들의 TDF는 최근 ZFY로 명명되었고(Page et al., 1987) 성판별에 주요한 Y chromosome-specific DNA primer로 사용되고 있다. Y염색체상에 있는 500~8,000 copies이상의 비기능적이고 반복적인 염기서열이 존재하는데 이런 반복적인 염기서열이 성 결정지역(sex-determining region)에 존재하므로 이들 DNA를 cloning하여 Y 염색체에 특이적 DNA primer를 만들어 소 수정란의 성판별에 사용하고 있다. Matthews와 Reed(1992)는 소 Y염색체의 약 40%는 repeated sequence이고 이를 sub-clone하여 male-enriched 즉, male-specific DNA primer를 만들었으며 이는 소는 물론 면양, 산양 그리고 사슴의 성판별에도 이용이 가능하다고 하였다.

PCR(Polymerase Chain Reaction)은 수정란을 성판별을 하고자하는 연구자들에게 매우 유용한 수단이 되고 있는데 특히 종-특이적, 성-특이적 염색체 염기서열이 밝혀지면서 PCR에 의한 수정란의 성판정은 매우 효율적이며 정확한 성판별 방법으로 평가되고 있다(Chen et al., 1999; Cui, et al., 1994; Machaty et al., 1993; Miller and Koopman, 1990; Navidi and Arnheim, 1991; Plucieniczak et al., 1982). 그러나 PCR에 의한 성판별은 여러 가지 조건 즉 수정란의 할구채취, PCR 조건, Y-염색체 및 소의 특이적 primer의 선택, primer의 농도 등에 의해 상이한 결과가 얻어질 수 있고 PCR 자체가 예민한 DNA 증폭방법이기 때문에 성판별 분석시 상당한 오류를 나타낼 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 실용적으로 활용될 수 있는 소

의 성판별 기법을 확립하기 위해 상실배나 초기 배반포 상태의 수정란을 이용하여 실험을 수행하였다. 한우의 체외 및 체내 수정란에서 할구분할(blastomere biopsy)을 실시하여, 할구 DNA를 PCR에 의해 성판별을 실시한 다음 핵형 분석에 의해 성판별과 성판별율을 확인하였으며 체내수정란과 체외수정란의 성비를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 체외수정란의 준비

가. 남자의 체외성숙

37°C의 생리식염수가 들어있는 보온병을 이용하여 도축장에서 난소를 채취한 후 보온병에 넣어 실험실로 운반하였다. 난소를 생리식염수로 2-3회 세정한 후 멸균여과지로 수분을 흡수시키고 18 gauge needle이 연결된 10 ml 주사기로 5% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 첨가된 TCM199을 소량 흡인한 후 난포에서 난자를 흡인하였다. 흡인된 난자를 포함한 난포액을 100 mm dish에 놓고 실험현미경하에서 난구세포에 둘러싸인 직경 2-8 mm의 미성숙난포를 선별하였다. 10%의 FBS가 첨가된 TCM199을 성숙배양액으로 준비하고 4-well dish에 5 µg/ml의 FSH 및 1 µg/ml의 estradiol-17β를 첨가하고 각 well 당 0.45 ml의 성숙배양용 TCM199을 분주하였다. 각 well 당 20-30개의 난자를 넣어 18-20시간 배양한 후 실험에 사용하였다.

나. 체외배양

(1) 공배양

체외수정된 난자를 TCM199 기본배양액으로 2-3회 세척한 후 2 ml의 배양배지를 10 ml의 tube에 넣고 voltex mixer를 이용하여 voltexing을 실시하여 난구세포 및 방사관 세포를 제거하였다. 난구세포와 방사관세포가 제거된 난자를 과립막세포 또는 난관상피세포가 1×10^6 cell/ml의 농도로 조정되어 4-well dish에 배양된 각 홀에 신선배양액 0.5 ml을 첨가한 후 15-20개의 난자를 넣어 공배양을 실시하며, 매 48시간마다 0.5 ml의 배지를 제거하고 신선배양액 0.5 ml을 첨가하여 교환하면서 수정 후 7-10일까지 incubator에서(39°C, 5% CO₂) 배양을 실시하여 배발달을 유도하였다.

(2) 단순배양

단순배지에서 배양한 체외 수정된 난자는 세정용 TALP 배양액으로 2-3회 세척한 후 2 ml의 mTALP 배양배지를 10 ml의 tube에 넣고 voltex mix를 이용하여 voltexing을 실시하여 난구세포 및 방사관 세포를 제거하였다. 난구세포와 방사관세포가 제거된 난자를 CR1aa, CR2, mTALP 배지로 25~30 μ l의 미소적을 만든 후 미네랄 오일로 피복하여 실험 2시간 전에 전배양하였으며, 소적당 5-10개의 난자를 넣고 incubator에서 (39°C, 5% CO₂) 7-10일 동안 배지 교환없이 배양을 실시하여 배발달을 유도하였다.

다. 수정란의 할구분리

상실배나 초기 배반포 상태의 형태적으로 정상적인 수정란에서 micromanipulator를 사용하여 할구를 분리하였다. 20 mM sucrose와 1mg/ml BSA가 첨가된 PBS용액에서 수정란을 고정하고 biopsy pipette을 투명대에 삽입하여 1-2개의 할구를 천천히 분리회수하였다. demi-embryo는 다른 tube에 넣어 성판별에 이용하였고 또한 세척 후 계속 배양하여 배발달을 측정하거나 동결보존 하였다. 할구는 microtube에 회수하여 PCR반응을 위해 DNA 추출을 실시하였다.

2. PCR을 이용한 성판별

가. DNA 추출

할구세포의 genomic DNA의 추출은 Schmoll과 Schell-ander(1996)의 boiling 방법을 이용하였다. 할구세포를 0.2 ml PCR tube에 약 10 μ l H₂O와 함께 98°C에서 약 10분간 끓인 후 20 μ l의 PCR reaction으로 반응시켰다.

나. PCR

성판별을 위한 primer로는 BOV97M(Miller와 Koopman, 1990)과 BRY4a(Reed et al., 1989)를 이용하였다. PCR후 2% agarose gel을 이용하여 전기영동을 실시하여 암수 성을 확인하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. 먼저 할구세포를 PBS로 2번 씻어주고 2 ml trypsin 용액을 첨가하여 배양하였다. DMEM 8 ml을 넣어 세포를 회수하고 원심분리한 후 500 μ l의 lysis buffer(50 mM Tris, 0.5% SDS, 100 mM EDTA)로 섞고 30 μ l proteinase K(10mg/ml)을 넣고 55°C에 5시간정도 배양하였다. 500 μ l PCI(phenol: chloro-

form: isoamylalcohol=25:24:1)을 넣어 잘 섞을 다음 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 50 ml sodium acetate 용액(3 M, Ph 6.0)과 1 ml의 100% ethanol을 넣어 DNA를 침전시켰다. 원심분리 후 DNA를 100 μ l TE buffer에 녹여 준비하였다. PCR을 위한 primers는 다음과 같다.

(BOV97M) 5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3',
5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3'
(BRY4a) 5'-CAA GAC CAT ACA TAT GTC ATT ATA
GAC AG-3'
5'-CAC AAA AAC AAA ATT TAT GTA CTT
CAT GT-3'

PCR mixture는 10x buffer 2 μ l, 1.25 mM dNTP, 100 pM primer와 1 unit Taq polymerase를 20 μ l가 되게 멸균 증류수로 섞어주고 mineral oil로 덮고 PCR 반응을 실시하였다. denaturation은 94°C 1분간, annealing은 55°C 30초간, extension은 72°C 1분간을 35 cycle을 실시하여 완료하였고 PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동으로 확인하였다.

3. 핵형분석

분리된 할구세포는 핵형분석(karyotyping)을 실시하여 염색체의 수와 성, 이상 등을 검사하였다. 방법으로는 할구세포를 vinblastin으로 처리하여 metaphase에 정지시킨 다음 hypotonic 용액으로 팽창시킨 후 고정액을 첨가하여 slide위에 떨어뜨려 cell을부수고 염색체가 퍼져 나오도록 하는 방법을 이용하였다. 필요한 용액은 다음과 같이 준비하였다. vinblastin sulfate: 증류수로 2 mg/ml로 희석하여 stock solution으로 사용하였다. hypotonic solution: 3 g sodium citrate, 2.24 g potassium chloride에 증류수로 1 liter까지 넣어 잘 섞고 filtration을 하여 준비하였다. Carnoy's fixative: 100 ml glacial acetic acid와 200 ml methanol을 잘 섞어 준비하였다. Giemsa/Wright staining solution: 0.1 g Giemsa crystal과 0.8 g Wright crystal을 400 ml methanol로 녹여 Whatman filter paper로 걸러내었다. 10 ml 배양액 중에 자라는 수정란에 50 μ l의 vinblastin sulfate(2 μ g/ml)용액을 첨가하고 37°C에서 2시간정도 배양하였다. 그동안 무균상태의 증류수와 70%

ethanol은 냉장시키고 trypsin, hypotonic solution, DMEM은 37°C로 보온시켰다. 배양액을 따라내고 PBS로 2번 씻어내고 2 ml trypsin 용액을 넣고 2-3분 37°C에 배양하였다. 8 ml 배양액을 첨가하여 세포를 회수하고 원심분리 하였다. 상층액을 따라내고 나머지 용액으로 세포를 섞어주고 15 ml의 hypotonic solution을 넣고 37°C water bath에 약 20분간 배양하였다. 약 5분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 나머지 용액으로 세포를 섞어주고 약 10 방울 정도의 Carnoy's fixative를 떨어뜨리면서 세포에 섞어주었다. fixative를 4.5 ml까지 첨가한 후 흰침전물을 가능한 제거하고 천천히 섞은 후원심분리 하였다. 상층액을 버리고 4 ml fixative를 첨가하여 원심분리 시키는 작업을 2번 반복 실시하였다. 마지막 상층액을 버리고 알맞은 농도의 세포가 되게 fixative를 넣어(약 3-5 ml) 섞어주었다. slides는 70% ethanol과 증류수에 잘씻어 준비하고 세포를 slides 위에서 약 50 cm 높이에서 떨어뜨렸다. slide를 저온의 hot plate에서 약 30분 건조시키고 Giemsa/Wright staining solution에 약 3분간 염색하고 PBS에 담가 slides를 씻어 주었다.

4. 통계분석

실험의 모든 data는 Chi-square test 또는 Student

t-test에 의해 분석되었고 p값이 0.05이하 일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

IV. 결과 및 고찰

1. PCR과 karyotyping에 의한 성판별 비교 실험

소 수정란의 할구 일부를 분리한 후 수소와 암소의 DNA를 control로 bovine specific primer와 Y-specific primer를 이용하여 PCR을 실시하여 소 수정란의 성판별을 실시하였다. Fig. 1에서와 같이 bovine-specific primers에 의해서는 모든 소의 sample에서 216 bp의 밴드가 나타났고, Y-specific primers에 의해서는 141 bp의 밴드가 수소 DNA에서만 나타나 이 Y-specific band가 나타난 할구의 수정란은 수컷 수정란인 것으로 판단된다. 또한 소의 수정란을 이용하여 염색체 분석을 실시하였다. 할구를 vinblastin sulfate를 이용하여 세포분열 중기 II기로 유도한 후 hypotonic 용액으로 염색체를 준비하여 관찰하였다(Fig. 2). 소의 sex chromosome은 metacentric형으로 상염색체의 telocentric과는 쉽게 구분되는데 Y-chromosome은 X-chromosome에 비해 크기 때문에 쉽게 X- 및 Y chromosome을 현미경하에서 구분할 수 있다. 정상 수정란의 할구는 대부분 X- 및 Y-chromosome을 가진 수컷(Fig. 2A)과

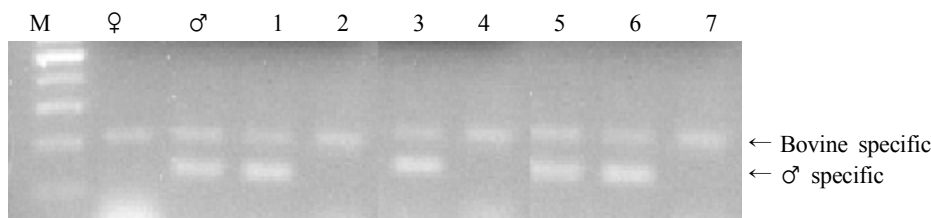


Fig. 1. Bovine embryo blastomere sex determination by PCR analysis (Male: line 1, 3, 5, 6 female: line 2, 4, 7).

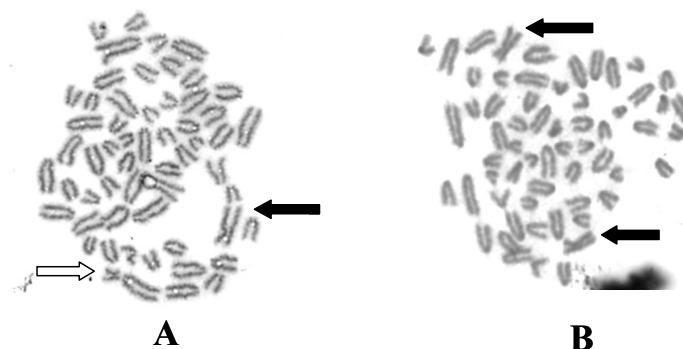


Fig. 2. Bovine embryo chromosome analysis (X800).(A)male chromosome, (B)Female chromosome. \blackleftarrow : X-chromosome, \blacktriangleright : Y-chromosome.

Table 1. Comparison of sex determination rate of blastomeres between PCR and karyotype analysis.

No embryos analyzed	Consistent sex determined	Inconsistent sex determined	Coincident rate (%)
30	24	3	80.0

Table 2. Blastomere separated in vitro fertilization and in vivo fertilization embryo development rate.

Embryos	No. embryos	No. expanded blastocysts (%)	No. hatched blastocysts (%)
In vitro	55	28 (50.9)	13 (23.6) ^a
In vivo	25	13 (52.0)	8 (32.0) ^b

^{a,b}Within a column, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 3. In vitro fertilization and in vivo fertilization embryo sex determination by PCR analysis.

Embryos	No. blastocysts	Male (%)	Female (%)	M/F ratio
In vitro	55	34 (61.8)	21 (38.2)	1.62 ^a
In vivo	30	17 (56.7)	13 (43.3)	1.31 ^b

^{a,b}Within a column, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2개의 X-chromosome을 지닌 암컷(Fig. 2B)으로 관찰되었다. PCR을 이용한 성판별과 소 수정란에서 할구를 분리하는 기술을 이용하여 in vitro에서 상실배까지 배양된 수정란에서 한쪽 demi-embryo는 PCR을 다른 한쪽 demi-embryo는 karyotyping을 실시하여 수정란의 성을 비교하여 보았다(Table 1). 총 30개의 수정란을 사용하여 할구를 분할 한 후 PCR 성판별과 karyotype에서 X-chromosome과 Y-chromosome을 관찰하여 sex를 비교하였을 때, 일치하는 비율을 조사하였을 때 약 24마리가 일치하는 것으로 확인되었고 5마리정도는 전혀 반대의 성으로 판명되었다. 그리고 1마리 정도는 판명불가로 나타나 약 80%의 PCR과 karyotyping과 일치하는 것으로 나타났다.

2. 체외수정란 및 체내수정란의 성 판별 비교 실험

체내에서 회수된 수정란의 성과 체외에서 수정된 수정란의 성을 비교분석하기 위해 소의 자궁에 채취한 배반포기 수정란(체내수정란)을 이용하여 미세주입기하에서 할구를 분리하였고 분리한 수정란은 다시 배양하여 확장배반포나 부화배반포기까지 발육하는 것을 관찰하여 보았다. 체내수정란의 할구분리 후 곧바로 배양한 다음 발육율을 Table 2에 체외수정란과 비교하여 정리하였다. 확장배반포나 부화배반포기까지의 배발달율은 체내수정란이 체외수정란보다 높은 것으로 나타났다. 특히 부화배반포까지의 발육율은 체내수정란이 32.0%, 체외수정란이 23.6%로 체내수

정란이 훨씬 높게 나타나 체내수정란이 물리적인 손상에 강한 것으로 판단되었다. 또한 체내수정란과 체외수정란의 할구를 이용하여 PCR로 성을 판별하였을 때 수컷 수정란의 비율은 체외수정란에서 61.8%, 체내수정란에서는 56.7%로 나타났다(Table 3). 수컷과 암컷의 비율(M/F ratio)은 체외수정란에서는 1.62, 체내수정란에서는 1.31로 체외수정란에서 수컷의 비율이 높은 것으로 나타났다. 그러나 배반포기의 체내수정란과 체외수정란에서 공히 수컷의 비율이 높은 것으로 판명되었다. IVF 체외수정란에서 수컷의 비율이 높다는 보고(Avery et al., 1992; Cavalho et al., 1995, 1996)가 있으나 체외수정란의 경우 수정시기, 초기 배발달율, 체외 배양조건 등의 여러 요인들이 영향을 미친다. 특히 체외수정란의 경우 발육속도가 빠른 수정란에서 수컷의 비율이 높은 것으로 보고되고 있다(Cavalho et al., 1996; Marquant-Le Guienne et al., 1992). 특히 체외배양액과 조건 등이 향상되면서 배발달 속도가 증가되고 있는데 이러한 체외배양조건 등이 성비에 영향을 미치는 것으로 사료되나, 정확하게 성비에 영향을 미치는 요인들에 대한 연구가 필요하다.

IV. 결론

본 연구에서는 소에서 PCR을 이용한 성 판별을 위해 소의 Y염색체 특이적 성 판별용 primer를 제작하였고, 소 satellite DNA 특이적 primer와 함께 소 정자와 난자의

DNA를 이용하여 PCR 조건을 확립하였다. 또한 할구 분리 후 배발달율에서는 대조구 수정란의 배발달율과 유의적인 차이가 없어 할구 분리가 배발달율에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 소 수정란에서 할구를 분리하고 다시 배양하여 배반포까지 발육하는 조건도 개발하였다. 이상에서와 같이 PCR 및 karyotyping에 의한 성판별법을 확립하였고, 체외수정란과 체내수정란의 성판별율을 조사하여 성판별된 수정란의 생산에 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단(No. 2010-0001356)과 농업진흥청 바이오그린21(No. 20070401034031) 및 공동연구사업(No. PJ007793) 지원으로 연구되었음.

참고 문헌

- Avery B, Jorgensen CB, Madision V, Greve T. 1992. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 265-270.
- Bruce A, Dennis B, Julian LR, Martin R, James DW. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. Garland Publishing, Inc., pp 863-910.
- Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y, Mapletoft RJ. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on Day 7. *Theriogenology* 45: 489-498.
- Carvalho RV, Del campo MR, Plante Y, Mapletoft RJ. 1995. Effect of stage of development on sex ratio and survival after freezing of Day 7 bovine IVF embryos. *Theriogenology* 43: 183(Abstr.).
- Chen CM, Hu CL, Wang CH, Hung CM, Wu HK, Choo KB, Cheng WT. 1999. Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mol. Reprod. Dev.* 54: 209-14.
- Cui KH, Warnes GM, Jeffrey R, Matthews CD. 1994. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet* 343: 79-82.
- Daneau I, Houde A, Ethier JF, Lussier JG, Silversides DW. 1995. Bovine SRY gene locus: Cloning and testicular expression. *Biol. Reprod.* 52: 591-599.
- Greenlee AR, Krisher RL, Plotka ED. 1998. Rapid sexing of murine preimplantation embryos using a nested, multiplex polymerase chain reaction(PCR). *Mol. Reprod. Dev.* 49: 261-67.
- Hare WCD, Singh EL, Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB, Mitchell D, Bilton RJ, Trouson AO. 1980. Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. *Can.J. Genet. Cytol.* 22: 615-26.
- Hwang YS, Han YM, Lee CS, Kim S, Lee KG. 1995. Sex determination of bovine embryos by polymerase chain reaction. *Korean J. Anim. Reprod.* 18: 275-84.
- Ian G. 1994. *Laboratory production of cattle embryos*. CAB international, pp 227-292.
- Iwasaki S, Nakahara T. 1990. 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: 669-75.
- Long SE, William CV. 1980. Frequency of chromosome abnormalities in early embryos of the domestic sheep. *J. Reprod. Fertil.* 58: 197-201.
- Machaty Z, Paldi A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z, Vajta G. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98: 467-70.
- Marquant-Le Guienne B, Nibart M, Bruyader C, Kohan G, Esposito L, Thuard JM, Thibier M. 1992. DNA probe sexing of young in vitro fertilized bovine embryos. *Theriogenology* 37: 253(Abstr.).
- Matthews ME, Reed KC. 1992. Sequences from a family of bovine Y-chromosomal repeats. *Genomics.* 13: 1267-1273.
- Miller JR, Koopman M. 1990. Isolation and characterization of two-male specific DNA fragment from the bovine gene. *Anim. Genet.* 21: 77-87.
- Miller OJ, Therman E. 2001. *Human chromosome (4th edition)*, Springer, pp 315-317.
- Munne S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. 1994. Chromosome mosaicism in human embryos *Biol. Reprod.* 51: 373-79.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. 1995. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 64: 382-91.
- Murray J, Boland MP, Moran C, Sutton R, Nancarrow CD, Scaramuzzi RJ, Hoskinson RM. 1985. Occurrence of haploid and haploid/diploid mosaic embryos in untreated and androstenedion-immune Australian Merino sheep. *J. Reprod. Fert.* 74, 551-55.
- Navidi W, Arnheim N. 1991. Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis. *Human Reprod.* 6: 836-49.
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, Dela Chapelle A, Brown LG. 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell.* 51:1091-1104.
- Plucienniczak A, Skowronski J, Jawodski J. 1982. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. *J. Mol. Biol.* 158: 293-304.
- Sinclair AH, Berta Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goddell PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346: 240-244.

Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, William JL, Callesen H, Thomsen PD. 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.* 60: 1273-78.

Viuff D, Greve T, Avery B, Hyttel P, Brockhoff PB, Thomsen PD. 2000. Chromosome aberrations in vitro- produced bovine embryos at days 2 – 5 post insemination. *Biol. Reprod.* 63: 1143-48.