

소 수정란의 할구 분리방법에 따른 생존율 및 성판별 PCR의 개선

김상환¹, 김정래¹, 이호준¹, 정덕원², 김대은³, 이득환⁴, 윤종택^{1,4,*}

¹한경대학교 유전공학연구소, ²충청북도 축산위생연구소, ³한경대학교 대학원 동물생명환경학과, ⁴한경대학교 미래융합기술대학원 동물바이오융합전공, ⁵경북대학교 임상병리학과, ⁶한경대학교 동물생명환경과학부 동물생명공학전공

The Improvement of Sexing PCR Conditions and Survival Rate of Blastomere Separation Method in the Bovine Embryo

Sang-Hwan Kim¹, Kyong-Lae Kim⁴, Ho-Jun Lee¹, Kyoung-Sub Jung², Jun-Seok Baek³, Duk-Won Jung⁴, Dae-Eun Kim⁵, Deuk-Hwan Lee⁶ and Jong-Taek Yoon^{1,6,*}

¹Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea.

²Major in Animal Fusion Biotechnology, Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea.

³Department of Bio-Medical Science Laboratory, Kyungbok University, Suncheon 540-742, Korea.

⁴Department of Animal Life Science, Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea.

ABSTRACT

The present study was conducted to compare on embryo survival rates by blastomere isolation methods, and establish the optimal PCR procedure for perform the sexing of bovine blastocysts produced by IVF. IVF embryos used in the study was used the Bisected or Sliced methods for blastomere isolation, and the survival rates of blastocyst with rapid way of sexing PCR was assessed. In the present study for survival rates in blastocyst was the total cleavage rate was 75% and a blastocyst development among cleaved embryos was 40%. Survival rate of embryos treated with intact, bisected or sliced method was 100, 63.3 or 81.3%, respectively. Therefore, survival rate of embryos treated with sliced method was higher compared to that of embryos treated with bisected method. The sexing rate of female or male was not significantly different between S4BFBR primer and BSY + BSP primer (1.75 : 1 vs. 1.43 : 1), respectively. Because of the PCR amplification using the S4BFBR primer was simpler method than multiplex PCR amplification method. Furthermore, the accuracy of sexing rate and reduction of PCR work time between 2-step and 3-step of PCR methods was 98.0% / 1.5 hr and 97.0% / 3.5 hr, respectively. Based on these results, it can be suggested that the sliced and PCR methods we developed was very effective method to reduce time consuming and procedure of PCR amplification for sexing with the increase of survival rate on the blastocyst.

(Key words : bisection, blastocyst, bovine, S4BFBR primer, sexing)

서 론

수정란의 성판별의 방법에 있어 유전자의 발현 양상 분석 이후 수정란의 생존율에 관한 연구는 매우 중요하다. 수정란의 할구 분리방법으로 micromanipulation, micropipette 그리고 biopsy를 이용한 할구 분리방법이 대표적으로 사용되고 있고, 수정란의 초기배에서 할구 분리방법과 배양방법에 따라 생존율에 영향을 미친다는 보고가 있으며(Nagashima 등 1981; Willaden 등, 1981; Lehn-Jensen과 Willadsen, 1983; Hasler 등,

2002), micropipette에 의한 할구 분리 방법보다 micromanipulation과 biopsy를 이용한 할구 분리 방법이 높은 생존율을 나타낸다는 보고가 있다(Kim 등, 1995; Son 등, 2005). 특히 성판별을 위한 할구 분리 기술은 수정란 생존율에 영향을 미치는 기술로 현재 biopsy를 이용한 방법을 선호하고 있으나, biopsy 방법에 따라 성판별 수정란의 생존율 및 수태율에 영향을 준다는 보고가 있다(Shea, 1999). 성판별 수정란의 이용 가치가 증가됨에 따라 수정란의 할구를 분리하여 PCR을 이용한 성판별 방법 이외 H-Y antigen에 반응하는 H-Y antibody

* 본 논문은 농촌진흥청 아젠다사업(과제번호:PJ907087)의 지원에 의해 이루어짐.

* Correspondence : E-mail : jtyoon@hknu.ac.kr

의 이용환(Utsumi 등, 1992) fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 방법을 통한 분광도 측정 방법(Kobayashi 등, 1998) 그리고 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 방법(Hirayama 등, 2004)이 널리 이용되고 있으나, PCR을 이용한 성관별은 약 91% 이상의 정확도를 보이고 있으며(Roschlau 등, 1997; Shea, 1999), 실험실에서 일반적으로 사용할 수 있는 방법으로 선호되고 있다. 1990년대 초기에 개발된 PCR 방법은 수정란 성관별에 새로운 가능성을 제시하였으며, 사람(Handyside 등, 1989), 소(Herr 등, 1990; Peura 등, 1991; Kirkpatrick and Monson, 1993; Machaty 등, 1993; Collins 등, 1995; Thibier와 Nibart, 1995), 말(Peippo 등, 1995), 양(Herr 등, 1990; Bredbacka와 Peippo, 1992), 돼지(Fajfar-Whetstone 등, 1993; Ford와 Conley, 1994) 그리고 쥐(Kunieda 등, 1992)에서 효율성이 증명되었다. PCR은 Y염색체의 특이적 염기서열을 증폭하여 수정란의 성관별을 비교적 짧은 시간에 판정할 수 있는 장점이 있으나, 자성에서는 특이적 밴드를 증폭을 볼 수 없는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 음성 특이적 sequence와 두 성에 같이 존재하는 종 특이적 염기서열로 구성된 PCR primer sets를 수정란 성관별에 이용하고 있다(Herr 등, 1990; Peura 등, 1991; Kudo 등, 1993; Machaty 등, 1993; Roschlau 등, 1997; Taneja 등, 1998; Shea 등, 1999; Park 등, 2001; Alevs 등, 2003). 또한 Kageyama 등(2004)와 Diez 등(2009)은 S4BFBR(specific 4 bovine foreword bovine revers) primer를 합성하여 하나의 primer로 음성 특이적인 band와 소 특이적인 band 모두를 확인하였으나, 결과 판독까지 3~4시간 요구된다.

따라서 본 연구는 할구 분리방법의 개선과 PCR 방법의 개선을 통하여 소 수정란 성관별이 산업현장에 보다 잘 적용할 수 있는 방법 모색을 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채란 및 체외 성숙

도축장에서 도축된 한우의 난소를 35°C의 생리식염수(0.85%)에 넣어 2시간 이내에 실험실로 운반하여 생리식염수로 3~4회 세정하고 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 2~6 mm의 난포에서 난포액과 난자를 흡입, 채취하였다. 난자는 난구세포가 치밀하며 3층 이상 난구세포가 부착되어 있으면서 세포질이 균일한 난자만을 선별하였다. 선별된 난자는 HEPES-buffered tissue culture medium-199(TCM-199; Gibco, MD, USA)에 50 µg/ml의 gentamycin(SK chemical, Geyonggi, Korea), 0.3%(w:v) fatty acid free bovine serum albumin(BSA : Sigma, MO, USA)이 첨가된 기본 배양액으로 3~4회 세정한 후, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, MD, USA), 2.5 µg/ml FSH(Sigma, MO, USA), 1 µg/ml estradiol-17β(Sigma, MO, USA), 20 µg/ml epidermal growth factor(Sigma, MO,

USA) 및 50 µg/ml gentamycin(SK chemical, Geyonggi, Korea)을 첨가한 TCM-199 성숙 배양액에 1~2회 세정 후 같은 배양액이 well당 500 µl 담겨있는 4-well dish(Nunc, Roskilde, Denmark)에 각 well당 20~25개의 난포란을 넣고, 39°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 18~20시간 동안 체외 성숙을 유도하였다.

2. 정자 처리 및 체외 수정

젖소 동결 정액을 37°C의 온수에서 15~20초간 용해한 후, 90% 및 45% percoll gradient(Sigma, MO, USA)법을 이용하여 600 RCF로 25분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, sperm pellet 부분만을 3 ml의 SBO(sperm bracket-oliphant)로 희석하여 600 RCF로 5분간 다시 원심 분리하여 정자를 세정하였다. 정자 처리하는 동안 성숙된 난자는 60 mm 배양접시에 25 µl의 IVF-BO 미소적에 13~15개의 난자가 함유되도록 하여 체외수정을 준비하였다. 세정이 끝난 정자 pellet에 IVF-BO를 첨가하여 정자 농도를 2 × 10⁶/ml 하여 IVF-BO 미소적에 25 µl씩 첨가하여 18시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 체외 수정을 유도하였다.

3. 체외 배양

체외 수정된 난자는 TCM-washing 배지로 옮겨 pipetting하여 난구세포 및 방사관 세포를 제거하였다. 난구세포와 방사관세포가 제거된 수정란은 30 µl의 CR1aa 배지에 소적 당 5~7개의 난자를 넣고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양 후 CR2aa 배지로 옮겨 다시 4일간 배양하여 배발달을 유도하였다.

4. 수정란의 성관별을 위한 할구 분리

성관별을 위한 할구 분리방법은 Fig. 1과 같이 sliced와 biopsy 방법의 2가지 방법을 사용하였다. 할구 분리를 위하여 수정란은 체외수정 후 5일째에 petri dish(87 mm × 20 mm)에 멸균 mineral oil 아래 50 µl의 Ca⁺와 Mg²⁺가 제거된 (-)D-PBS(Gibco, Seoul, Kor)에 옮긴 후 micromanipulation(Olympus, Tokyo, JAP)에서 실시하였다. 먼저 sliced 방법은 상실배 수정란의 투명대에 구멍을 낸 후, CR2aa 체외배양 배지에 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 배반포 단계로 진행하면서 투명대 밖으로 돌출되어 나오는 할구를 흡입용 micropipett으로 분리하였다. Bisection 방법은 초기 배반포 이상의 수정란 중에서 형태적으로 정상인 수정란을 bio-cut blade(Feather, Osaka, JAP)로 수정란의 ICM은 피하고, TE의 일부 할구를 절단하여 분리하였다.

5. 전혈 및 할구에서 DNA 분리

소 DNA는 암소와 수소의 혈액을 채취한 후 임파구를 분리하여 준비하였으며, 분리된 임파구는 10분 동안 SDS에서 처리하여 임파구에서 나온 추출물을 원심 분리하여 모았다. 추

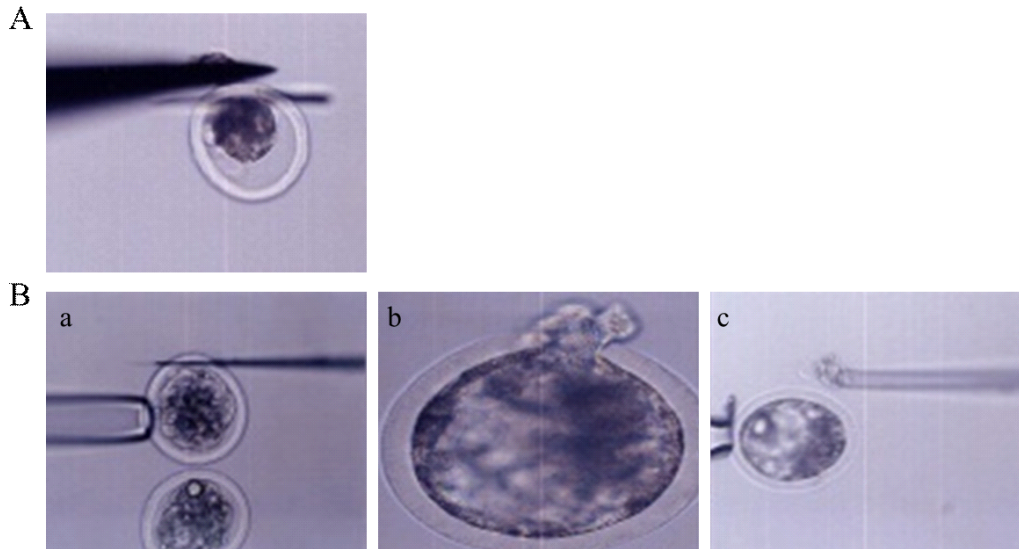


Fig. 1. The procedure of blastomere isolation for embryo sexing. A : Bisected method, B : Sliced method. a) sliced of morula stage, b) blastocyst development after sliced, c) blastomere isolation.

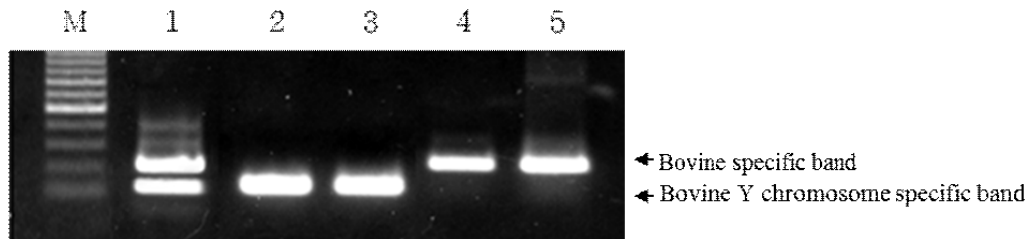


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified in male bovine blood DNA. And used the two kinds of bovine Y-chromosome specific primer(SB4 and bSY), and one bovine specific primer(bSP). Lane 1 : SB4(178 bp, 145), Lane 2, 3 : bSY(141 bp), Lane 4, 5 : bSP(216 bp)

출물을 phenol-chloroform 용액과 배양하여 DNA를 정제하였으며, DNA 농도는 260 nm에서, 기관 및 단백질 오염의 평가는 280 nm에서 spectrophotometer로 측정하여 판단하였다. 분리된 자웅성 DNA는 5 ng 농도의 시료에 증류수를 희석하여 준비하였다. Sliced나 bisected 방법에 의해 분리된 할구는 PCR tube로 옮겨 보관 후 개선된 PCR 방법에 의하여 바로 추출할 수 있도록 하였다. 할구에서 DNA의 분리는 PCR 과정 중에서 95℃에서 5분간 열처리한 후, 4℃에서 2분간 냉각하여 DNA

를 추출하는 과정(이하 분리 과정)과 DNA를 추출하는 과정을 PCR 증폭 과정과 통합(이하 통합 과정)하여 실시하였다.

6. Sexing을 위한 PCR 방법

자성과 음성 소의 전혈에서 추출한 DNA와 sliced 및 bisected된 할구의 DNA를 최종 50 µl로 제작된 Master Mix tube에 첨가하였으며, PCR에 이용된 특이 primer는 Table 1과 같다. 반응 mixture는 10 × PCR buffer(100 mM, pH 8.3 Tris-HCl,

Table 1. Oligonucleotide primers and fragment size

| Primer | Sequence | Fragment size(bp) | Gene No. |
|--------------|---|--------------------|----------------|
| S4BF S4BR | Fw 5'-CAAGTGCTGCAGAGGATGTGGGAG-3' Rv 5'-GAGTGAGATTTCTGGATCATATGGCTACT-3' | 178(♂+♀) 145(♂) | AC_000180.1 |
| BSY | Fw 5'-TCCAAGCAAAGAACCCCGCT-3' Rv 5'-TCGTCAGAAACCGCACACTG-3' | 141(♂) | NM_174240.2 |
| BSP | Fw 5'-GATCACTATACATACACCACT-3' Rv 5'-GCTATGCTAACACAAATTCTG-3' | 216(♂+♀) | NM_001014984.1 |

Table 2. Thermal conditions for PCR amplification

| Step | PCR condition | | | |
|----------------|---------------|-------|------------|--------|
| | 2-step PCR | | 3-step PCR | |
| DNA extraction | 95°C | 5 min | 95°C | 10 min |
| Cooling | 4°C | 2 min | | |
| Denaturation | 95°C | 5 min | 95°C | 5 min |
| Denaturation | 95°C | 30 s | 95°C | 30 s |
| Annealing | 55°C | 35 s | 55°C | 30 s |
| Extension | | | 72°C | 30 s |
| Cycle | 28 | | 30 | |
| Extension | 72°C | 8 min | 72°C | 8 min |
| Total time | 1.5 h | | 3.5 h | |

500 mM KCl 및 15 mM MgCl₂, 0.25 mM dNTP, 1 U Taq polymerase(Toyobo, Osaka, Japan) 및 1 mM S4BFBR primer를 첨가하였고, 이 mixture에 6 × loading buffer 2 μl를 첨가하여 PCR를 하였다. 양성 특이 증폭물의 크기는 178 base pair(bp)이고, 소 특이 증폭물의 길이는 145 bp이다. PCR은 Table 2와 같은 방법으로 실시하였다. PCR 후 산물은 2% agarose gel(Gibco, MD, USA)에서 전기영동한 후, UV 광선을 이용하여 Fig. 2와 같이 한 band만 gel 상에 보일 경우 그 샘플은 자성 수정란으로 판정하고, 두 개의 band가 확인되면 양성 수정란으로 판정하였다.

7. 신속한 성판별을 위한 PCR 방법 개선

신속하게 수정란의 성판별을 실시하기 위하여 기존의 DNA를 추출하고, extension 과정을 넣은 3-step PCR법에서 DNA 추출과정을 PCR 과정에 통합시키고, extension 과정을 생략한 2-step PCR(denaturation + annealing) 법을 통하여 성판별에 소요되는 시간을 단축하고자 실시하였다.

8. 통계적 처리

Chi-square test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Demi-embryo 생존율

성판별을 위한 소 수정란의 할구 분리 방법에 따른 수정란의 생존율은 Table 3과 같다. 온전한 수정란의 생존율은 100%였고, bisected와 sliced embryo의 생존율은 각각 63.8%와 81.3%로 sliced embryo의 생존율이 높았다. 이러한 bisected 법 결과는 Lopes 등(2001)이 배반포 단계에서 일부분을 칼로 자른 후에 58%의 부화율을 보인 것과 비슷하였고, sliced 법의 결과는 Kim 등(2000)이 보고한 투명대에 slit을 주고, 그 부분으로 할구를 밀어내는 방법의 press-out 법으로 91.9~94.1%의 높은 생존율을 보인 결과와 비슷하였다. 또한 분리 방법에 따른 세포 수는 sliced법이 120 ± 40.3개로 Bisected 법의 107.4 ± 8.1개보다 다소 높게 나타났다.

할구 분리 후 생존율과 세포 수의 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 시도한 sliced 법이 성판별을 위한 유용한 할구 분리 방법으로 판단된다.

2. DNA 추출 과정에 따른 PCR Sexing

DNA를 추출하는 과정에 따른 primer의 평가와 PCR sexing 결과는 Fig. 3과 Table 4와 같다. Primer의 평가와 PCR 방법의 정확도를 평가하기 위하여 DNA 추출 과정을 추가하여 2-step 그리고 3-step PCR을 실시한 결과, SB4 primer를 사용한 PCR 방법에서 DNA의 추출 유무를 확인할 수 있는 소의

Table 3. Viability of the embryos after *in vitro* cultured for 24h according to blastomere isolation methods

| Methods | No.(%) of blastocysts | | No. of cells |
|----------|-----------------------|----------|--------------|
| | Examined | Survived | |
| Intact | 20 | 20(100) | 142 ± 30.8 |
| Bisected | 36 | 23(63.8) | 107.4 ± 8.1 |
| Sliced | 32 | 26(81.3) | 120 ± 40.3 |

Table 5. Embryo sexing by PCR amplification on different PCR procedures

| PCR method | No. of embryos | No. of(%) | | | Correction(%) |
|------------|----------------|-----------|----------|----|---------------|
| | | M | F | Un | |
| 3-step* | 33 | 13(39.4) | 20(60.6) | 1 | 97.0 |
| 2-step* | 42 | 15(35.7) | 27(64.3) | 1 | 98.0 |

* 2-step : denaturation-annealing, * 3-step : denaturation-annealing-extension.

M : male, F : female, Un : unidentified.

특이적 band가 보여 bSY만을 사용한 방법보다 정밀한 결과를 보였으며(Fig. 3A), 9개의 수정란 할구를 이용하여 2-step과 3-step PCR 방법의 정확도를 분석한 결과에서는 2-step의 경우 정확한 성판별을 확인할 수 있었으나, 3-step의 경우 한 개의 수정란의 판별이 2-step과 다르게 확인되었다(Fig. 3B). 수

정란을 개선된 sliced 방법을 이용하여 할구를 분리한 후 2-step 그리고 3-step PCR을 실시하여 성판별율을 분석한 결과, 2-step PCR 방법이 97.2%로 기존의 분리방법인 3-step PCR 방법의 96.3%와는 큰 차이가 나타나지 않았다(Table 4).

일반적으로 성판별을 위한 DNA 추출 과정은 96°C에서 10

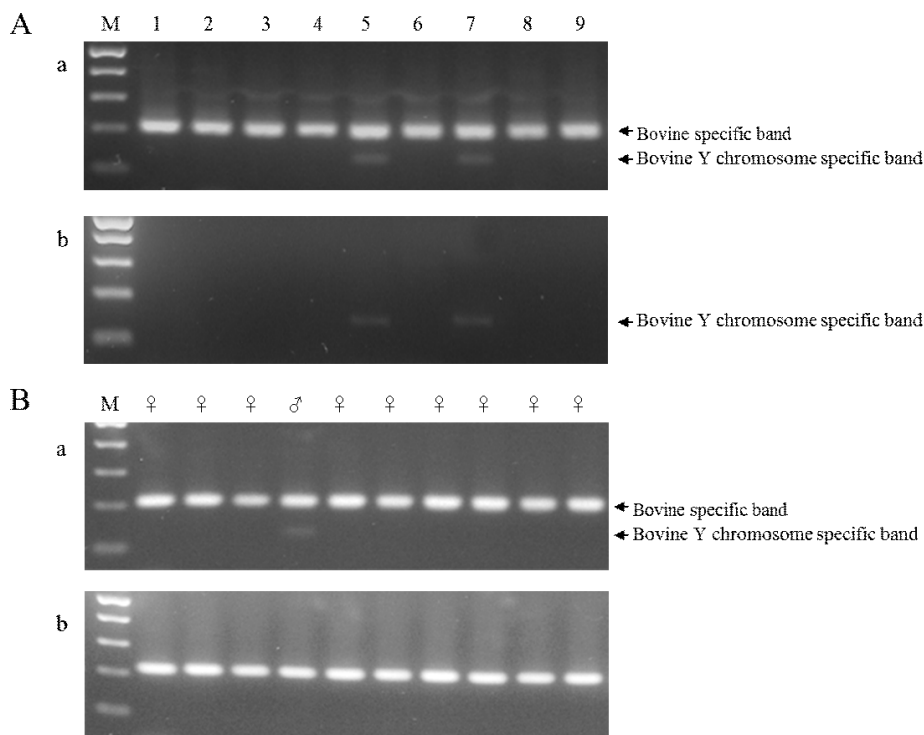


Fig. 3. Evaluation of PCR method and primer accuracy. A : evaluation of primer accuracy. a) SB4 primer, b)BSY primer, Lane 1-4, 6 and 8-9 : female blastocyst, Lane 5 and 7 : male blastocyst. B : evaluation of PCR method. a)2-step PCR method, b)3-step PCR method.

Table 4. Effect of DNA extraction method on PCR-based embryo sexing

| Extraction method | No. of oocytes examined | No. of | | | Correction(%) |
|-------------------|-------------------------|--------|----|----|---------------|
| | | M | F | Un | |
| Apart | 27 | 10 | 16 | 1 | 96.3 |
| Combined | 36 | 13 | 22 | 1 | 97.2 |

M : male, F : female, Un : unidentified.

분간 열처리하는 PCR 증폭 과정과 분리하여 처리한 후 냉동 보관하거나 PCR 증폭에 이용되어 왔으나, Hirayama 등(2004)은 loop-mediated isothermal amplification 법을 사용 시 NaOH와 Proteinase K 및 열처리 방법을 이용하여 DNA 추출 후 성관별을 한 결과 유의적 차이는 없었지만, 열처리 방법이 간단하고 빠르다고 보고한 바 있다.

따라서 수정란 성관별 시 본 실험에서 개발된 DNA 추출과정을 PCR 증폭과정과 분리함이 없이 하나의 과정으로 통합하는 방법은 번거로움과 관별에 소요되는 시간을 단축할 수 있는 유용한 방법으로 판단된다.

3. 체외수정란 신속한 성관별을 위한 PCR 조건 확립

2-step PCR 법과 3-step PCR에 의한 성관별율은 Table 5와 같다. 3-step PCR 법의 경우 전기영동을 위한 loading 시간을 포함하여 4시간여의 시간이 소요되었으나, 2-step PCR 법은 2시간 정도로 단축되었으며, 성관별 결과도 98%의 정확도를 나타내어 3-step의 97%와 차이가 없음을 확인할 수 있다.

Hirayama 등(2004)은 LAMP 법으로 성관별에서 multiplex PCR 법을 사용하였는데, 처음엔 3-step법으로 97°C/8s, 50°C/20s, 72°C/15s로 15 cycles를 실시하고, 이어서 2-step으로 30 cycles을 98°C/8s, 66°C/20s로 PCR을 실시한 바 있다.

따라서 본 실험에서 개발된 2-step PCR 법은 신속하고 정확한 PCR 조건이 필요한 수정란의 성관별을 위해 적절한 방법으로 사료된다.

결 론

본 연구는 성관별 PCR 과정에서 할구 분리방법과 PCR 방법의 개선을 통하여 소 수정란 성관별을 산업 현장에 보다 잘 적용할 수 있는 방안 모색을 위해 실시하였다.

성관별을 위한 소 수정란의 할구 분리 방법에서 bisected와 sliced embryo의 생존율은 각각 63.8%와 81.3%로 sliced embryo의 생존율이 높았으며, 세포 수는 sliced 법이 120 ± 40.3개로 bisected 법의 107.4 ± 8.1개보다 다소 높게 나타났다.

DNA를 추출하는 과정에 따른 PCR sexing 결과는 DNA를 추출하는 과정을 PCR 증폭 과정과 통합(이하 통합 과정)하여 실시 통합 과정에서 PCR을 한 후 성관별율이 97.2%로 기존의 분리 방법의 성관별율 96.3%와 차이가 나타나지 않았다.

2-step PCR 법과 3-step PCR에 의한 성관별에 소요되는 시간은 3-step PCR 법의 경우 전기영동을 위한 loading 시간을 포함하여 4시간여의 시간이 소요되었으나, 2-step PCR 법은 2시간 정도로 단축되었으며, 성관별 결과도 98%의 정확도를 나타내어 3-step의 97%와 차이가 없음을 확인할 수 있다.

따라서 본 연구에서 수행된 Sliced 법에 의한 할구분리방법은 생존율과 적정 세포 수 유지를 위한 매우 유용한 할구 분

리 방법이라 사료되며, 수정란 성관별 시 DNA 추출 과정을 PCR 증폭 과정과 분리함이 없이 하나의 과정으로 통합하는 방법과 2-step PCR 법은 신속하고 정확한 PCR 조건이 필요한 수정란의 성관별을 위해 적절한 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Aleves BC, Illossepan de Lima VF, Teixeira CM and Moreira Filho CA. 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.
- Bredbacka P and Peippo J. 1992. Sex diagnosis of ovine and bovine embryos by enzymatic amplification and digestion of the DNA from the ZFY/ZFX locus. *Agric. Science Finl.* 2: 233-238.
- Collins ME, Stevens DA, Jenner LJ and Brownlie J. 1995. A rapid method for rRNA detection in single cell biopsies from preimplantation-stage bovine embryos. *Theriogenology* 43: 1227-1238.
- Diez C, Bermejo-Alvarez P, Trigo B, Caamano JN, Munoz M, Molina I, Gutierrez-Adan A, Carrocera S, Martin D, Gomez E 2009. Changes in testosterone or temperature during the in vitro oocyte culture do not alter the sex ratio of bovine embryos. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 311A: 448-452.
- Fajfar-Whestone CJ, Lane Rayburn A III, Schook LB and Wheeler MB. 1993. Sex determination of porcine preimplantation embryos via Y-chromosome specific DNA sequences. *Anim. Biotechnol.* 4: 183-193.
- Ford SP and Conley AJ. 1994. Effect of sex and recipient breed of porcine embryonic development. *Biol. Reprod. Abst.* 50: 88.
- Handyside AH, Pattinson JK, Penketh R JA, Delhanty JDA, Winston RML and Tuddenham EGD. 1989. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet.* 1: 347-349.
- Hasler JF, Cardey E, Stokes JE and Bredbacka P. 2002. Non-electrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* 58: 1457-1469.
- Herr CM, Holt NA, Matthaie KI and Reed KC. 1990. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology* 33: 247.
- Herr CM, Matthaie KI, Bradley MP and Reed KC. 1990. Rapid accurate sexing of livestock embryos *Proceedings of 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Pro-*

- duction XVI: 343.
- Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S and Minamihashi A. 2004. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loopmediated isothermal amplification. *Theriogenology* 62: 887-896.
- Kageyama S, Yoshida I, Kawakura K and Chikuni K. 2004. A novel repeated sequence located on the bovine Y chromosome ; Its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 509-514.
- Kim SK, Lee MH and Suh KW. 1995. Studies on the survival rate of bisected porcine embryos and immature oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 19: 129-134.
- Kim YJ, Chung GN, Lee HL, Cho SW, Kim YS and Yu IJ. 2000. Sex determination of biopsied Hanwoo embryos by polymerase chain reaction and embryo transfer with sexed blastocysts. *J. Emb. Trans.* 15: 219-230.
- Kirkpatrick BW, Monson RL. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVF and IVF. *J. Reprod. Fertil.* 98: 335-340.
- Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasada H, Umezumi M and Sato E. 1998. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 390-394.
- Kudo T, Sato S and Sutou S. 1993. Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction : Cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *J. Reprod. Dev.* 39: 55-63.
- Kunieda T, Xian M, Kobayashi E, Imamichi T, 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.
- Lehn-Jenson H and Willadsen SM. 1983. Deep-freezing of cow "half and quarter" embryos. *Theriogenology* 19: 49-54.
- Lopes RFF, Forell F, Oliverira ATD and Rodrigues JL. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.
- Macháty Z, Páldi A, Csáki T, Varga Z, Kiss I, Bárándi Z and Vajta G. 1993. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.* 98: 467-470.
- Nagashima H and Ogawa S. 1981. Studies on the developmental potential and survival after the deep freezing of micro-surgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. *J. Anim. Reprod. Jap.* 27: 12-19.
- Son DS, Cho SR, Choe CY, Choi SH, Han MH, Kim HJ, Cho CY, Jean HJ, Kim YK, Jeoung YG, Saito N, Kageyama S and Choe SY. 2005. Production of superior cows by sexed embryo transfer using *in vivo* embryos in Hanwoo. *J. Emb. Trans.* 20: 163-168
- Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI and Im KS. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction(PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 55: 1843-1853.
- Peippo J, Huhtinen M and Kotilainen T. 1995. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 44: 619-627.
- Peura T, Hyttinen JM, Turunen J and Jänne J. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35: 547-555.
- Roschlau K, Roschlau D, Roselius R, Dexne U, Michaelis U, Strehl R, Unicki P and Rink N. 1997. Over 5years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. *Theriogenology* 47: 273.
- Shea BF. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results; a six-year retrospective study. *Theriogenology* 51: 841-854.
- Taneja M, Rao KB, Gangawane S, Zawar SG and Totey SM. 1998. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using polymerase chain reaction; production of calves with predetermined sex under field conditions. *Indian J. Exp. Biol.* 36: 1201-1208.
- Thibier M and Nibart M. 1995. The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.
- Utsumi K, Kawamoto T, Kim JH, 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: 35-43.
- Willadsen SM and Polge C. 1981. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet. Rec.* 108: 211-213.