

免疫螢光測定法에 의한 牛受精卵의 性 判別

高光斗 · 梁富根 · 朴蓮洙 · 金正翊

江原大學校 畜産大學

Immunofluorescent Detection of H-Y Antigen on Preimplantation Bovine Embryos

Goh, G.D., B.K. Yang, Y.S. Park, C.I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangweon National University

SUMMARY

In order to determine the sex of preimplantation embryos prior to transfer in cattle, a series of experiments were carried out using 45 Holstein donor cows to examine the ovarian response on the gonadotropin and PGF₂ α , and the morphology of fresh embryos or frozen/thawed embryos after deep freezing at -196°C .

The sexing of embryos treated with the medium containing H-Y antiserum (10%, v/v) and FITC anti-mouse IgG (10%, v/v) were analysed by chromosomal analysis, and the sex of the embryos which survived were ascertain after delivering the pups.

The results obtained were summarized as follows :

1. The average number of developed follicle and corpus luteum per cow were 13.5 and 8.1, and the ovulation rate was 60.1%.
2. Of 220 ova recovered, 75 (34.1%) were morula and 91 (41.4%) were blastocyst, and the morphological normal and abnormal rate of ova recovered were 75.5% and 24.5%, respectively.
3. Of 39 frozen/thawed embryos, the scores of normal morula and blastocyst, after thawing were 79.2% (19/24) and 73.3% (11/15). The average rate of frozen/thawed embryo which appeared morphologically normal post thawing was 76.9% (30/39).
4. The sex ratio was measured using the embryos treated with immunofluorescence assay to examine the relationship between embryo developmental stage, sex ratio of morula stage embryo was 42.2% (19/45) fluorescing and 57.8% (26/45) non-fluorescing, on the other hand, the ratio switched to 46.8% (29/62) fluorescing and 53.2% (33/62) non-fluorescing embryo in blastocyst stage. The sex ratio was also measured between fresh and frozen/thawed embryos, fresh and frozen/thawed treated embryos were indicated 45.8% (38/83) fluorescing, 54.2% (45/83) non-fluorescing and 41.7% (10/24) fluorescing, 58.3% (14/24) non-fluorescing. This trend indicated the approximal sex ratio was 1 : 1.
5. The result of karyotype test showed the successful rate of sexing embryo is fluorescing and non-fluorescing was 21.2% (7/33) and 29.6% (8/27). The female to male ratio within 33 fluorescing was 28.6 : 71.4, and the ratio of 27 non-fluorescing embryos was 87.7 : 12.5.

6. Of the embryo transferred after assignment of H-Y phenotype, five of the fluorescing embryos survived to term, all was males. Whereas six non-fluorescing embryos also survived to term and the sexes of the calves were 1 male and 5 female.

I. 緒 論

家畜의 性を 조절하여 원하는 성의 仔畜을 생산할 수 있는 受精卵의 性判別이 가능해지면 畜牛에서 受精卵移植에 의한 雙胎誘起時에 豫見되는 異性雙胎 중 雌性的 freemartin을 예방할 수 있다.

최근에 組織適合性 Y 抗原(Histocompatibility-Y antigen)을 이용하여 수정란의 성을 판별하는 방법에 대한 연구가 실험동물을 중심으로 보고(Epstein et al., 1980; Utsumi et al., 1984; White et al., 1982, 1983; Wachtel, 1984)되어 있으며, 대가축에서의 보고예(White et al., 1984, 1987)는 많지 않다. 조직적합성 Y 항원을 이용한 성 판별법에는 細胞發育能檢査(Cytolytic detection of H-Y antigen)와 免疫螢光測定法(Immunofluorescent detection of H-Y antigen)이 있으며(White et al., 1983, 1984), 세포발육능검사법은 H-Y 抗原을 갖는 雄性 受精卵의 정상발육을 억제시키므로(Krco and Goldberg, 1976, Epstein et al., 1980) 雌性 受精卵만을 선별하여 受卵畜에 移植시키므로서 雄性 仔畜의 생산이 불가능하다. 그러나 면역형광측정법은 이식된 雌雄 受精卵의 생존에 有害한 영향을 주지 않고 성의 판별이 가능하게 되므로 원하는 性の 仔畜을 선택적으로 생산할 수 있다.

본 연구는 牛 受精卵 移植의 實用化 方案을 검토하는 연구의 일환으로서 이식된 수정란의 성 판별을 수행하기 위하여 性腺刺戟호르몬(GTH)과 $PGF_2\alpha$ 투여에 따른 卵巢反應을 조사하고 非外科的으로 회수된 新鮮 受精卵과 凍結融解卵의 性を 免疫螢光測定法으로 判別한 뒤, 性染色體의 核型分析과 移植後 産仔의 性比를 조사하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試動物

본 실험에 사용된 供試動物로서는 1~5 産의 Holstein 種 經産牛와 생후 7~8 주령(體重 200~250 g)의 Donryu 系統의 犏犏가 사용되었다.

2. H-Y 抗血清의 生産

犏犏(Donryu strain)의 H-Y 抗血清을 生産하기 위하여 雄性脾臟細胞(2×10^7 /ml)를 항원으로 하여 4~6 주령인 同種의 雌性犏犏에 투여하여 면역를 실시하였다. 마지막 booster 주사후 7~10 일후에 採血, 抗血清을 分離(2500 rpm, 20 分)하여 -70°C 의 초저온 냉동고(Revco, 1710, U.S.A)에 보관하였다.(양승, 1988)

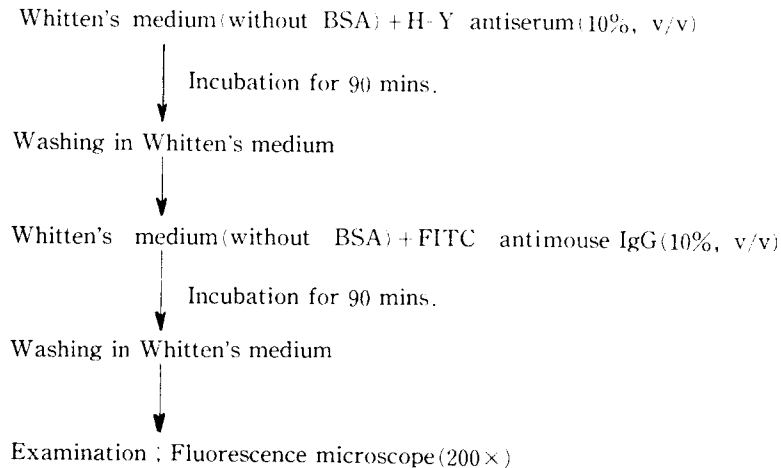


Fig. 1. Experimental procedure for the immunofluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation bovine embryos

3. 牛 受精卵의 回收 및 凍結保存

發情週期 9~13 일의 供卵牛에 PMSG 2500~3000 IU 을 1 회 皮下注射後, 48 시간 에 PGF_{2α} 25 mg 을 투여하여 過排卵을 誘起하였으며 발정이 발현하는 시기로부터 12 시간 간격으로 3 회 人工授精을 실시하였다. 첫 人工수정後 6~7 일째에 非外科的 方法으로 수정란을 회수하였다. 受精卵의 凍結 및 融解方法은 Elsdén 과 Seidel(1982)의 方法을 수정보완하여 실시하였다.

4. 免疫螢光測定法에 의한 受精卵의 性別別

1) 受精卵의 培養

수정란(桑實胚-初期胚盤期)의 性別을 위하여 免疫螢光測定法을 실시하였다.(Fig. 1)

BSA 가 첨가되지 않은 修正 Whitten's medium(m-WM)에 H-Y 抗血清(10% v/v)을 혼합한 배양액에서 수정란을 90 분간 배양(37°C, 5%CO₂, in air)한 후 신선한 m-WM 으로 3 회 세척, FITC anti-mouse IgG(10%, v/v)가 첨가된 m-WM 으로 옮겨 90 분간 배양하여 형광현미경(Viker's, M₁₇, England)하에서 螢光의 有無를 관찰하여 性別을 判別하였다. 즉 受精卵이 螢光을 나타내고 있는 것(positive : fluorescing)을 雄性, 螢光物質이 분산되었거나, 발현되지 않은 것(negative : non-fluorescing)은 雌性으로 判別하였다.(Fig. 2)

2) 受精卵의 染色體 分析

免疫螢光 처리後 螢光標識卵과 非螢光標識卵의 染色體의 核型을 分析하여 雌雄의 性別을 確立하였다.(Fig. 3)

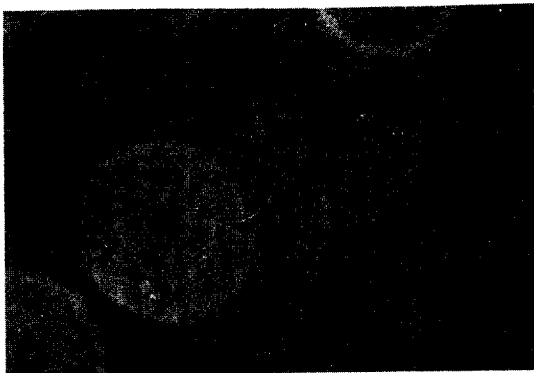


Fig. 2. Classification of fluorescing and non-fluorescing embryos by immunofluorescence assay

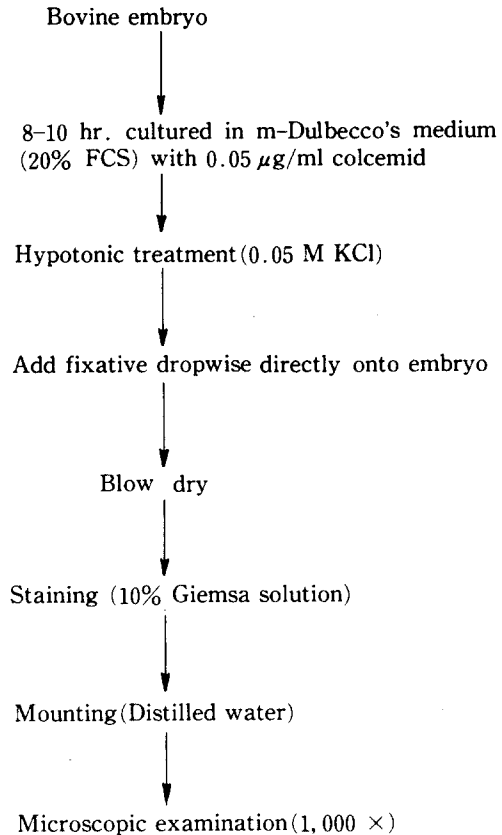


Fig. 3. Method for sexing preimplantation of embryos by chromosomal analysis

免疫螢光측정後 螢光標識卵과 非螢光標識卵으로 判別된 수정란의 核型을 檢査하기 위하여 배양액(m-Dulbecco's PBS+20% FCS)에 colcemid(N-desacetyl-N-methyl colchi-chinei, Ciba)의 最終濃도가 0.05 μg/ml(Singh & Hare, 1980)가 되도록 하여 만든 小適培養液내에서 8~10 시간 배양하여 細胞分裂中期狀(metaphase)을 유지토록 하였다. 有絲分裂抑制劑에서 배양한 수정란을 0.05 M KCl 용액에서 15~20 분간 실온에 靜置시킨 다음 고정액(ethyl alcohol : glacial acetic acid ; 3 : 1)으로 被覆하여 固定하였다. 고정後 10% Giemsa(pH 6.8) 용액으로 染色하여 加壓한 後에 cover glass 주위를 메니큐어로 封印하였다. 제작된 標本은 위상차현미경(100~1000×)하에서 染色體의 核型을 鏡檢하여 large submetacentric 형을 X 染色體(Fig. 3), Small submetacentric 형은 Y 染色體(Fig. 4)로 判別하였다.(Ford et al., 1980)

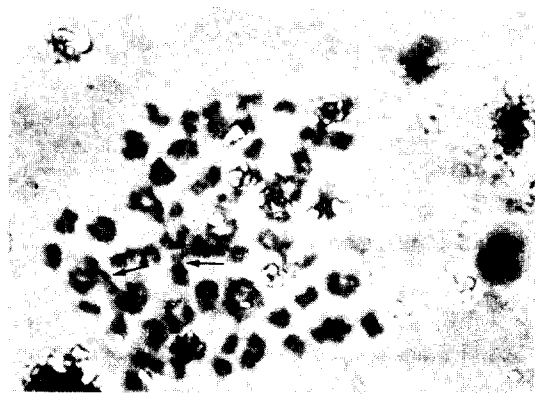


Fig. 4. Female bovine metaphase showing the XX chromosome(arrows) after culture in H-Y antiserum and FITC anti-mouse IgG

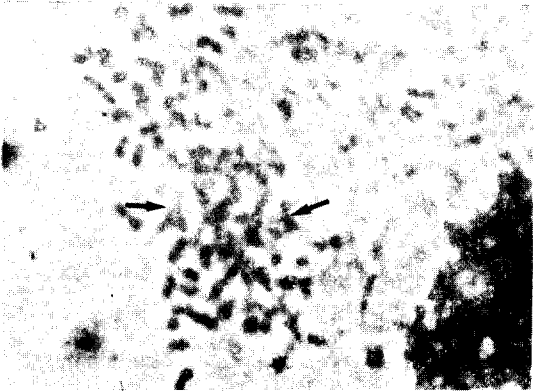


Fig. 5. Male bovine metaphase showing the XY chromosomes (arrows) in the immunofluorescence assay

3) 수정란의 이식 및 임신감정

免疫螢光測定法으로 螢光標識卵(雄性)과 非螢光標識卵(雌性)으로 判別된 수정란은 非外科的으로 受卵牛에 이식하였다. 移植후 45~60 일에 직장촉진법으로 이식란의 受胎成績을 조사하고, 分娩后 産仔의 性比를 확인하였다.

III. 結果 및 考察

1. 호르몬 처리에 대한 卵巢反應

PMSG 와 $PGF_2\alpha$ 를 투여한 공란우에서 卵胞의 發育과 排卵成績을 조사하여 표 1 과 같은 성적을 얻었다.

전체 供卵牛의 頭當平均 發育卵胞數는 13.5, 排卵后 형성된 黃體數는 8.1 개였으며, 發育卵胞數에 대한 排卵率은 60.1%였다. 이상의 성적은 平均黃體數가 5.2~6.0 개였다는 具와 鄭(1982), 任 등(1983), Almedia (1987) 등의 성적(4.2~7.0 개)보다는 우수하였으나, Sreenan(1983)과 Alcivar 등(1984) 및 南 등(1985)의 성적(12~17 개)에는 미치지 못하였다.

2. 受精卵의 發育段階

過排卵 처리후 회수된 수정란의 形態的 正常性과 발육단계를 조사한 성적을 표 2 에 요약하였다.

인공수정후 6~7 일째에 회수된 220 개의 受精卵中, 形態的으로 正常卵은 166 개 (75.5%), 異常卵은 54(24.5%)개 었다. 이와 같은 성적은 Newcomb

Table 1. Ovarian response to the hormone treatment

No. of animals	No. of developed follicles		No. of matured C.L.		Ovulation rates(%)
	Total	No./cow	Total	No./cow	
45	606	13.5	364	8.09	60.1

Table 2. Developmental stage of ova recovered 6-7 day after estrus

No. of animals	No. of ova recovered (No.cow)	Stage of embryos			
		Normal		Abnormal	
		Morula(%)	Blastocyst(%)	1-8 cell(%)	Degenerated(%)
45	220(4.9)	75(34.1)	91(41.4)	35(15.9)	19(8.6)

등(1976)의 異常卵子率이 23.5~27.3%의 성적과 南 등(1985)의 28.4%의 성적과 대체로 일치하였으나 Boland 등(1978)의 37.4% 보다는 낮은 경향을 보였다.

한편 발육단계별 성적에서는 桑實胚가 75 개 (34.1%), 胚盤胞가 91 개 (41.4%)로서 胚盤胞가 桑實胚期の 受精卵보다 다소 많은 출현율을 보였다. 이와 같은 발육단계의 출현율은 Betteridge(1977)와 南 등(1985)이 제시한 牛受精卵의 發育分布와 비슷한 성적을 나타내고 있다.

3. 受精卵의 凍結融解後 形態의 正常性

회수된 수정란중 형태적으로 정상인 桑實胚와 胚盤胞期の 수정란을 凍結保存한 후에 融解하여 형태적 정상성을 검사한 결과는 표 3 과 같다.

동결에 供用된 45 개의 수정란 중 융해후 회수된 卵子數는 39 개였으며, 그중 형태적으로 정상인 受精卵는 30 개로서 正常卵子率은 76.9%(30/39), 융해후 투명대가 손상을 입거나 分割球가 파괴된 異常卵은 23.1%(9/39)였다. 이와 같은 성적은 52~60%와 41.6%의 정상난자율을 얻은 Kennedy 등(1983)

과 Bilton 과 Moore(1979)의 성적보다는 우수하였으나, Tervit 와 Elsdén(1981)의 83.0%의 성적에는 미치지 못하였다. 發育段階別 正常卵의 성적에서는 桑實胚期和 胚盤胞에서 각각 79.2%(19/24)와 73.3%(11/15)로서 발육단계에 따른 차이는 인정되지 않았다.

4. 免疫螢光測定法에 의한 性別

1) 면역형광 처리후 수정란의 배양

이식전 牛 受精卵의 性別을 조사하기 위하여 인공 수정후 6~7 일째에 非外科的으로 회수한 桑實胚와 胚盤胞期 受精卵를 H-Y 抗血清과 FITC anti-mouse IgG 가 함유된 배양액내에서 일정시간 배양하여 螢光標識의 有無에 따라 雄(雄性)과 雌(雌性)으로 구분하여 性別을 判別한 결과를 표 4 에 요약하였다.

표 4 에 나타난 바와 같이 83 개의 新鮮卵을 면역형광으로 처리하여 螢光標識卵(38 개)과 非螢光標識卵(45 개)으로 判別된 雌雄의 性別은 54.2% : 45.8%로 약 1 : 1 의 결과를 얻었으며, 凍結融解卵은 24 개 중 螢光標識卵이 10 개, 非螢光標識卵은 14 개로 雌

Table 3. Morphology of frozen and thawed bovine embryo

Stage of embryo	No. of eggs frozen	No. of eggs recovered after thawing	Morphology of embryos thawed	
			Intact (%)	Damaged (%)
Morula	28	24	19(79.2)	5(20.8)
Blastocyst	17	15	11(73.3)	4(26.7)
Total	45	39(86.7)	30(76.9)	9(23.1)

Table 4. Fluorescent detection of rat H-Y antiserum and FITC-anti mouse IgG on bovine embryo

Stage of embryo	No. of embryo	No. of embryo	
		Fluorescenced (%)	Non-fluorescenced (%)
Fresh			
Morula	30	13(43.3)	17(56.7)
Blastocyst	53	25(47.2)	28(52.8)
Sub-total	83	38(45.8)	45(54.2)
Frozen/thawed			
Morula	15	6(40.0)	9(60.0)
Blastocyst	9	4(44.4)	5(55.6)
Sub-total	24	10(41.7)	14(58.3)
Total	107	48(44.9)	59(55.1)

雄의 性比는 58.3% : 41.7% 로서 新鮮卵과 비슷한 경향을 나타내어 신선란과 동결융해란간에 차이는 인정되지 않았다.

이상의 성적은 White(1984)가 155 개의 16 세포기-배반포기의 牛受精卵을 免疫螢光 처리하여 雌雄의 성비가 52.0% : 48.0% 로서 거의 1 : 1의 성적을 얻은 결과와 일치하는 경향을 보였다.

發育段階別의 성적에서는 桑實胚의 경우 螢光표식란과 비螢光표식란의 비율이 42.2% (19/45)와 57.8% (26/45)였으며 胚盤胞에서는 46.8% (29/62)와 53.2% (33/62)로서 발육단계별 성적에서도 암수의 성비는 약 1 : 1의 결과를 나타내었다.

2) 免疫螢光 처리후 受精卵의 染色體 分析

免疫螢光 처리후 螢光標識卵과 非螢光標識卵을 染色體分析하여 性을 判別한 결과를 표 5 와 6 에 요약하였다.

螢光標識卵 33 개를 染色體 分析한 결과 7 개가 성이 판별되어 21.2%의 性判別率을 얻었으며, 이중 5 개(71.4%)가 雄性; 2 개(28.6%)가 雌性으로 判別되어 免疫螢光 처리후 螢光표식수정란 중에는 雄性의 출현빈도가 雌性보다 높았다.

한편 非螢光標識卵 27 개중 8 개(29.6%)가 성이 판별되었으며 그중 1 개(12.5%)가 雄性, 7 개(87.5%)가 雌性으로 판별되어 免疫螢光처리후 非螢光標識卵으로 판별된 수정란에서는 雌性의 출현빈도가 현저히 증가되었다. 상기의 성적은 移植前 牛受精卵을 免疫螢光처리후 螢光標識卵(fluorescing)과 非螢光標識卵(non-fluorescing)으로 分離하여 염색체를 분석한 결과 螢光標識卵에서는 雄性(85%)이, 非螢光標識卵에서는 雌性(97%)의 비율이 현저하게 높았다고 보고한 White 등(1984)의 결과와 일치하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 實驗小動物의 H-Y 抗血清을 이용한 免疫螢光測定法은 이식전 牛受精卵의 성판별에 이용이 가능하다고 생각된다.

2. 免疫螢光처리후 牛受精卵의 이식과 分娩成積

免疫螢光 처리후 螢光標識卵과 非螢光標識卵으로 구분, 受卵牛의 子宮角에 移植하여 얻은 임신과 분만성적을 표 7, 8에 제시하였다.

42 개의 수정란을 H-Y 抗血清과 FITC anti-mouse IgG 가 함유된 배양액에서 일정시간 배양하

Table 5. Sex ratio fluorescing bovine embryo by chromosomal analysis

Total	No. of embryos treated		No. of sexed embryos(%)	Fluorescenced	
	Fluorescenced (%)	Non-fluorescenced (%)		M(%)	F(%)
60	33(55.0)	27(45.0)	7(21.2)	5(71.4)	2(28.6)

M : Male ; F : Female

Table 6. Sex ratio non-fluorescing bovine embryo by chromosomal analysis

Total	No. of embryos treated		No. of sexed embryos(%)	Non-fluorescenced	
	Fluorescenced (%)	Non-fluorescenced (%)		M(%)	F(%)
60	33(55.0)	27(45.0)	8(29.6)	1(12.5)	7(87.5)

Table 7. Survival after transfer of fluorescing embryos by immunofluorescence assay

Stage of embryo	No. of embryo fluorescenced	No. of recipient	No. of pregnant (%)	No. of pups born(%)	
				M	F
Morula	7	7	2	2	
Blastocyst	8	8	4	3	
Total	15	15	6(40.0)	5	

Table 8. Survival after transfer of non-fluorescing embryos by immunofluorescence assay

Stage of embryo	No. of embryo non-fluoresced	No. of recipient	No. of pregnant (%)	No. of pups born	
				M	F
Morula	7	7	3	1	1
Blastocyst	20	20	7		4
Total	27	27	10 (37.0)	1	5

여 螢光標識卵이 15 개 (35.7%), 非螢光標識卵이 27 개 (64.3%)로 구분되었다. 螢光標識卵을 發情同期化시킨 15 마리의 受卵牛에 移植한 후 45~60 일에 직장촉진법으로 임신을 확인한 결과 6頭가 임신되어 40.0%의 妊娠率을 나타냈으며 分娩된 5頭仔牛의 성은 모두 雄性으로 확인되었다. 한편 非螢光標識卵을 27 마리의 受卵牛에 이식하여 10 마리가 임신 (37.0%)되었으며, 이 중 6頭가 분만되어 5頭는 雌性, 1頭는 雄性으로 확인되었다.

이상의 성적은 Wachtel(1984)이 牛受精卵을 免疫螢光抗體처리후 형광표식란과 비형광표식란으로 판별된 8개의 수정란을 受卵牛에 이식하여 分娩된 6頭중 螢光標識卵 3개는 雄性, 非螢光標識卵 3개는 雌性으로 性이 판별된 성적과 대체로 일치하였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 免疫螢光抗體法은 哺乳動物에서 初期胚의 性判別에 이용이 가능하고 특히 상기법은 雌性受精卵뿐만 아니라 雄性受精卵의 生存性에도 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

IV. 摘要

牛受精卵의 移植前 性判別에 관한 연구를 수행하기 위하여 45頭의 供卵牛를 사용하여 性腺刺戟호르몬(GTH)과 PGF₂α투여에 따른 卵巢反應과 非外科的으로 회수한 受精卵의 發育段階 및 凍結融解후 生存性을 조사하였으며, 이식된 수정란의 性을 免疫螢光測定法으로 判別한 후 性染色體의 核型分析과 移植후 産仔의 性을 확인하였다.

본 실험에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 두당 平均發育卵胞數와 黃體數는 13.5개와 8.1개로서 發育卵胞數에 대한 排卵率은 60.1%였다.

2. 回收卵子 220개중 桑實胚와 胚盤胞로 정상발육한 난자수는 각각 75개 (34.1%)와 91개 (44.4%)였으며, 形態의 異常卵은 54개 (24.5%)였다.

3. 凍結融解후 회수된 난자중 형태적으로 정상인 난자의 비율은 桑實胚와 胚盤胞期에서 각각 79.2% (19/24)와 73.3% (11/15)로서 평균성적은 76.9% (30/39)였다.

4. 免疫螢光測定法에 따른 雌雄의 性比는 新鮮卵에서 54.2% : 45.8%, 凍結融解卵에서는 58.3% : 41.7%였으며, 발육단계별 성적에서는 桑實胚期 57.8% : 42.2%, 胚盤胞期 53.2% : 46.8%로서 모두 약 1 : 1의 결과를 나타냈다.

5. 면역형광처리후 염색체를 분석한 결과 螢光標識卵은 33개중 7개 (21.2%), 非螢光標識卵에서는 27개중 8개 (29.6%)가 성이 판별되었다. 성이 판별된 난자의 성비는 형광표식란에서 雌性이 28.6% (2/7), 雄性이 71.4% (5/7)였으며, 비형광표식란에서는 자성이 87.5% (7/8), 융성이 12.5% (1/8)였다.

6. 면역형광항체 처리후 螢光標識卵 (15개)을 受卵牛에 이식하여 5頭가 분만되었으며, 産仔의 性은 모두 雌性이었다. 非螢光標識卵 (27개)을 이식한 성적에서는 6頭가 분만되었으며 그중 1頭는 雄性, 5頭는 雌性으로 확인되었다.

V. 引用文獻

1. Alcivar, A.A., R.R. Maurer and L.L. Anderson. 1984. Superovulation response in FSH- or Dergonal treated heifers. *Theriogenology*, 22(6) : 635-642.
2. Almedia, A.P. 1987. Superovulatory responses in dairy cows treated repeatedly with PMSG. *Theriogenology*, 27(1) : 205.
3. Betteridge, K.J. 1977. Techniques and results

- in cattle, Superovulation, In ; Embryo transfer in farm animals(ed. K.J. Betteridge) . Canada Department of Agriculture Monograph, 16, pp 1-9.
4. Bilton, R.T. and N.W. Moore, 1979. Storage of cattle embryos. Proc. Aus. Soc. Reprod. Bio. 537-538.
 5. Boland, M.P., T.F. Crosby and I. Gordon. 1978. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. Theriogenology, 10 : 175-180.
 6. Elsdén, R.P., L.D. Nelson and G.E. Seidel. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. Theriogenology, 9 : 17-26.
 7. Epstein, C.T., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Tissue Antigens, 15 : 63-68.
 8. Ford, C.E., D.L. Pollock and I. Gustawmsson. 1980. Proceedings of the first international conference for the stardization of handed karyotypes of domestic Animal. Hereditas, 95 : 145-162.
 9. Kenndy, L.G., M.P. Boland and I. Gordon. 1983. Effect of bovine embryo quality on survival after rapid freezing and thawing. Theriogenology, 19(1) : 135.
 10. Krco, C.J. and E.H. Gordberg, 1976. H-Y (male) antigen : Detection eight-cell mouse embryos. Science, 193 : 1134-1235.
 11. Newcombs, R., L.E.A. Rowson and A.O. Trouson. 1976. The entry of superovulated eggs into the uterus, In ; Egg transfer in cattle(eds. L.E.A. Rowson) . pp. 1-15.
 12. Singh, E.L. and W.C.D. Hare. 1980. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo tranfer. Theriogenology, 14 : 421-427.
 13. Sreenan, J.M. 1983. Methods of consistent supply recovered and transfer of embryo in the cattle. In ; Strategics for the most efficient beef production. Proc. Intern. Sym. Beef Prod. Kyoto, Japan pp. 197-212.
 14. Tervit, H.R. and R.P. Elsdén. 1981. Development and viability of frozen/thawed cattle embryos. Theriogenology, 15(4) : 395-403.
 15. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. Proc. 10 th. Int. Cong. Anim. Reprod. and A.I. pp. 234-235.
 16. Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. Theriogenology, 21 : 18-28.
 17. White, K.L., G.B. Anderson, R.H. BonDurant and S. Donahue. 1987. Viability of bisected bovine embryos after detection of H-Y antigen. Theriogenology. 27 : 293.
 18. White, K.L., M.W. Bradbuny, G.B. Anderson and R.H. BonDurant. 1984. Immunofluorescent detection of male-specific factor on preimplantation bovine embryos. Theriogenology, 21 : 275.
 19. 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, 19 : 655-662.
 20. 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.
 21. 구자홍, 정창국. 1982. 젖소의 비수술적 수정란 회수 및 이식시험. 대한수의사회지, 18 : 45-82.
 22. 남상현, 양부근, 성홍룡, 고광두, 김정익. 1985. 우의 동결보존에 관한 연구. 1. 성선자극 호르몬과 PGF₂α의 투여에 따른 난소반응. 한국가축번식연구회보, 9(1) : 31-35.
 23. 임경순, 이용빈, 정구민. 1983. 소에 있어서 비외과적 방법에 의한 수정란의 채란기술에 관한 연구. 한국축산학회지, 25 : 244-254.
 24. 양부근, 장정순, 김정익. 1988. H-Y 항체에 의한 생쥐 초기배의 성관별에 관한 연구. II. 간접면역형광측정법에 의한 성관별. 한국가축번식학회지, 12(1) : 37-41.