

Rat H-Y 抗體에 의한 생쥐 分割卵의 性 調節에 關한 研究

鄭場龍·朴喜成·朴忠生*

晋州農林專門大學 畜産科

Studies on Sexing of Bisected Mouse Embryos by Rat H-Y Antibody

Chung, J.Y., H.S. Park, C.S. Park*

Chinju National Agricultural & Forestry Technical College

SUMMARY

This experiment was carried out to develop a new technique of identifying XX of XY-bearing bisected embryos prior to implantation by immunological method. H-Y antiserum prepared in inbred Wistar female rats by repeated immunization with spleen cells from males of the same strain.

The reactivity of H-Y antibody was confirmed by culturing mouse embryos in the medium containing H-Y antiserum and complement obtained from the guinea pig. The optimal condition for the activity of H-Y antibody was also investigated by culturing embryos under the concentration or affected H-Y antibody and culture rate. However, production of live young or sex rate of male and female from embryos transferred with pseudopregnant.

The biological test with the morula stage embryos showed that H-Y antibody was formed in all female rats immunized with spleen cell, but it was formed only in 80% female rats immunized with the antigen.

When the bisected mouse embryos were cultured *in vitro* for 5~6 hours in morula stage, of 457 bisected embryos 81.4% of them were developed to the blastocyst stage.

When the concentration rate of complement to H-Y antiserum varied from 1.0~5.0 μ l, the lysis-rate of embryo was 19.5 to 67.3%. The concentration rate of complement did not influence the lysis-rate of embryos($P<0.05$). The morphology embryos of bisected, zona-free and intact embryos showed the embryos lysis rate of 58.6, 42.7 and 48.5% respectively($P<0.05$).

Pregnancy rate were 50.0, 45.5 and 57.1% in pseudopregnant recipient transferred with bisected, zona-free and intact blastocyst embryos. However, production of live youngs, sexual rate of male or female was 24(50.0 : 50.0), 22(45.5 : 55.5) and 36(58.3 : 41.7)mice, but affected and non affected half embryos with H-Y antiserum treatment was 23.1 and 26.7%. Also production of live youngs and sexual rate was 14(92.9 : 7.1) and 17(17.6 : 82.4)mice in affected and non affected half embryos in H-Y antiserum treatment($P<0.05$).

이 논문은 1990년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

* 慶尙大學校 農科大學(Coll. of Agri., Gyeongsang Natl. University)

I. 緒 論

태어나는 新生兒의 性을 인위적으로 調節하려는 연구는 사람 및 각종 동물을 이용하여 오랜전부터 계속되어 왔으나(Smith, 1919), Eichward와 Silmsler(1955)가 생쥐의 皮膚移植 실험에서 組織適合性-Y抗原(histocompatibility-antigen; H-Y antigen)을 발견한 이래 이 분야에 있어서 많은 연구가 수행되어 왔다(Adinolfi 등, 1982; Bradley와 Heslop, 1985; Nagamine 등, 1984; Ohno 등, 1978).

H-Y 抗體에 의한 性의 조절에 관한 연구에는 精子에 H-Y 抗體를 처리한 연구 보고도 있으나 유의적인 결과를 얻지 못했다(Bennett 등, 1975; Goldberg 등, 1971; Hirouyki 등, 1985; Nakamura 등, 1984; Ohno와 Wachtel, 1978; Wachtel 등, 1974; White 등, 1984). 그러나 초기 受精卵의 體外培養技術의 발전으로 Kroc와 Goldber(1976)는 8-내지 16-細胞期の 생쥐 受精卵을 補體의 존재하에서 H-Y 抗血清을 처리하여 XY 形의 수정란의 半數가 破壞되어 cytotoxic 效果가 확인되었으며, Epstein 등(1980)은 8-細胞期 수정란 92개를 H-Y 抗血清과 補體로 처리한 결과 41개가 破壞되거나 발달이 정지되었고, 51개의 受精卵은 胞胚期까지 정상적으로 발달하였다고 보고하였다. 1980년대에 들어서 H-Y 抗體에 영향을 받지 않은 受精卵을 移植하여 태어난 產子의 性比는 생쥐에서 81.1%(White 등, 1983), 흰쥐에서 80%(Utsumi, 1983), 대동물인 소에서는 90%(White 등, 1987)가 암컷이었다고 하였다.

지금까지의 연구는 C₅₇BL/6J 近郊系統의 생쥐를 중심으로 H-Y 抗體를 제조하여 이를 4-내지 16-細胞期 受精卵에 처리한 연구가 대부분이었으나, DA 系統의 흰쥐 脾臟細胞를 抗原으로 하여 제조된 H-Y 抗血清에 흰쥐의 桑實胚를 培養하여 57%(Utsumi 등, 1983)와 51%(Utsumi 등, 1984)가 破壞되었다고 보고하였으며, Satoh 등(1985)은 흰쥐의 抗血清에 산양과 소의 桑實胚와 胞胚期를 배양한 결과 형태학적으로 분류가 가능한 것은 桑實胚였으며, compacted morula stage의 경우가 H-Y 抗血清에 의한 形態學的 分類가 가장 잘 되었다고 보고하였다.

한편 受精卵分割에 관해서는 Nicholas와 Hall

(1942)이 4~8細胞期 수정란 分割을 시도한 이래 실험 동물을 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔으나 가축에 있어서는 1979년 Willadsen에 의하여 면양에서 최초로 일란성 쌍태생산에 성공하였다. 그 후 소(McEvoy와 Sreenan, 1987), 면양(Tsunoda 등, 1985), 생쥐(Nagashima 등, 1984)에서 각각 產子를 생산하였다고 보고하였다.

本 研究는 Wistar 흰쥐에서 제조된 H-Y 抗血清 처리에 의하여 着床前 受精卵의 性을 免疫學的으로 判別할 수 있는 방법을 개발코져 桑實胚 및 胞胚期에 있는 생쥐 受精卵을 微細操作기법으로 분할하여 한쪽은 H-Y 抗血清 처리에 사용하고 다른 한쪽은 受卵 생쥐에 移植함으로써 微細分割 技術의 開發, 適定 體外 培養條件 및 H-Y 抗體 反應 機轉을 규명하고, 나아가 경제적으로 유익한 가축에 應用함으로써 畜産業 발전에 이바지 하고자 생쥐 受精卵을 公試하여 微細分割 및 H-Y 抗體 反應에 의한 분할란의 암 수 생성절 技法을 개발코져 한다.

II. 材料 및 方法

1. 공시동물 및 사양관리

H-Y 抗血清의 제조는 8~10 주령의 근교계통 Wistar 흰쥐를 사용하였으며, 수정란 회수를 위해서는 ICR 계통으로써 供卵생쥐는 4~6주령이고 체중은 10~15g의 미성숙 암컷과 受卵생쥐는 10~12주령의 성숙한 암컷을 사용하였으며, 위임신 유기를 위하여 10~12주령의 정관경찰 시술을 받은 수컷을 시험에 사용하였다. 補體의 생산은 16~20주령, 체중 700~800g의 English 종 guinea pig에서 심장채혈을 하여 혈청을 제조하였다.

공시동물의 사육조건으로 실내온도는 21±2°C로 유지하며, 조명은 1일 14시간(18:00~22:00)으로 허용하고 물과 표준사료(실험동물 펠렛사료)는 자유로이 급식케 하였다.

2. 과배란의 유기 및 수정

과배란 유기는 PMSG(Sigma)를 5IU를 복강 주사하고 48시간 후 hCG(Sigma)5IU를 복강 주사하여 과배란을 유기시킨 다음, 수컷과 1:1의 비율로 개별상자에 합사시켜 자연교미를 유도하였다. 수란생쥐로 사

용될 암컷과 과배란유기 후 정관 결찰 기술을 받은 수컷과 합사시켜 위임신을 유도하였다. 합사 다음날 아침에 膣全 유무를 확인하여 질전이 형성되어 있는 것만을 실험에 사용하였으며, 질전을 확인한 날을 수정 제1일로 하였다.

3. 수정란의 회수

수정 후 상실배기는 3.0~3.5일에, 포배기는 3.5~4.0일에 생쥐를 경추탈구법으로 도살하여 자궁을 척출한 다음 자궁 관류를 실시하여 수정란을 회수하였으며, 관류액은 HEPES-BMOC-3 배양액에 0.5% BSA (Sigma, U.S.A)를 첨가하여 사용하였다. 회수한 수정란은 형태학적으로 정상적인 것만 골라 실험에 사용하였다.

4. 수정란의 分割

분할에 사용할 수정란은 형태학적으로 정상적인 수정란을 선별하여 유동 paraffin 이 덮혀진 소립 배양액내에 수정란을 옮긴 다음 inverted microscope (Olympus, Japan) 하에서 micromanipulator (Good fellow)를 장치하여 Park 등(1987)의 垂直分割 방법으로 보정용 피펫을 사용하지 않고 分割을 실시하였다.

5. 수정란의 체외배양

분할후 2~3시간 동안 體外培養을 실시하여 정상적으로 한쌍이 reformation 된 수정란만을 골라 한쪽을 H-Y 항체 처리에 사용하고 다른 한쪽은 수란 생쥐에 移植을 실시하였으며, 分割卵의 체외배양은 NaHCO_3 -BMOC-3 培養液으로 하여 CO_2 가 5% 함유된 37°C incubator 내에서 배양을 실시하였다. 배양액의 pH는 7.4로 조정하였으며, 사용 직전에 $0.2\mu\text{m}$ 의 millipore filter로 濾過시켜 사용하였다.

6. H-Y 抗血清의 제조 및 처리

H-Y 血清의 제조는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 近郊系統 Wistar 흰쥐의 수컷 脾臟細胞를 적출하여 D-PBS에 침적시켜 균질기로 균질화시켜 정(1987)의 방법으로 제조하였으며, 수정란의 처리는 0.3% BSA가 함유된 배양액에 H-Y 抗血清($3\mu\text{l}$)과 補體($7\mu\text{l}$)를 혼용한 배양액 $25\mu\text{l}$ 의 소적용 조직배양용 5% CO_2 95% air, 37°C incubator 내에서 3시간 이상 平衡시킨 후 사용하였다.

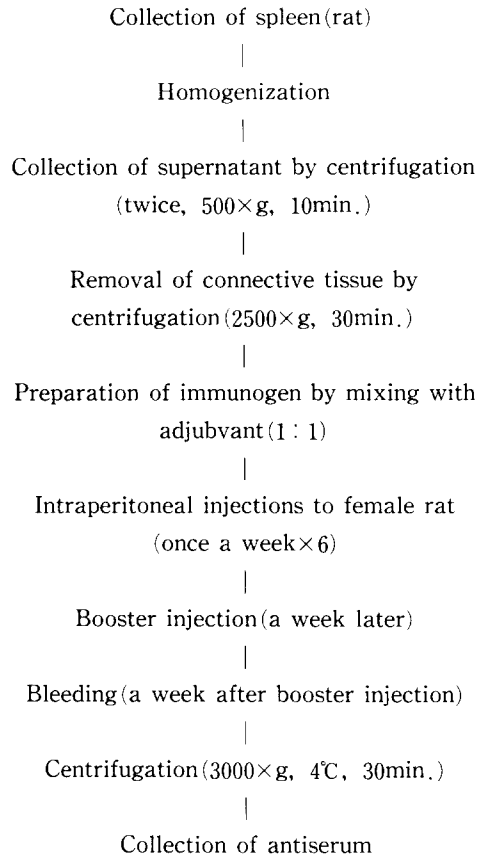


Fig. 1. Preparation of rat H-Y antiserum

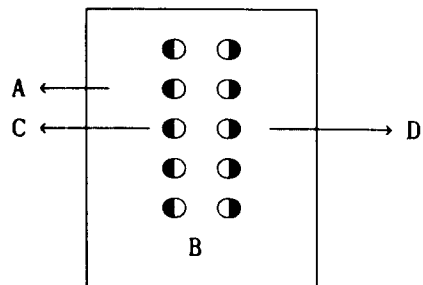


Fig. 2. Procedure of embryo culture with embryos bisection and bisected embryos.

- A : Dish
- B : Paraffin oil
- C : Bisected embryo culture in NaHCO_3 -BMOC-3 medium drops
- D : Bisected embryo culture in H-Y antiserum treated drops

7. H-Y 抗血清 처리후 수정란의 形態學的 分類

Fig. 2에서 보는 바와 같이 H-Y 항 혈청이 준비된 소직에 분할한 한쪽 수정란을 6~8시간 배양 후 형태학적 분류는 다음과 같이 하였다.

- 1) Grade A: 割球가 완전히 破壞된 것
- 2) Grade B: 發達이 중지된 것
- 3) Grade C: 割球가 부분적으로 破壞된 것
- 4) Grade D: 割球가 非正常的으로 발달된 것

8. 分割卵의 移植

온전한 한쪽 분할란의 수란생취에서의 移植은 Park 등(1988)의 방법에 준하여 수술적 방법으로 이식을 실시하였으며, 이때 受卵생취의 마취는 ketamine 과 xylazine 을 1:1로 희석하여 근육주사함으로써 마취를 유도한 후 배정중선을 절개하여 자궁각을 노출시키 이의 상부를 26 gauge 주사침으로 천자하여 이곳을 통하여 배양에 담긴 수정란을 이식용 피펫에 흡입한 다음 자궁각내로 피펫을 삽입하여 수정란을 주입하였다. 형태학적으로 분류한 수정란의 grade A 와 grade B 만을 골라 수정란 이식을 실시하였다.

9. 통계학적 분석

통계학적 분석은 Chisquare test 및 Student's T-test 를 실시하여 각 처리군간의 유의성 및 최소유의차

검정을 실시하였다.

III. 結果 및 考察

1. H-Y 抗體의 生成 確認

H-Y 抗血清 및 補體를 함유한 培養液에서 ICR 생취 8~16細胞期 受精卵을 24~30시간 培養한 후 그 形態學的 特性을 考察한 結果는 Table 1과 같다. 10마리의 個體중 H-Y 抗體의 生成이 확인된 것은 8마리로서 80%가 生成되었으며, 427개의 수정란중 182(43%)個가 破壞되었다.

이와 같은 결과는 鄭等(1987)이 報告한 Wistar 흰취에서 80%이상 H-Y 항체가 生成된 것과 비슷한 結果이며, Kroc 와 Goldberg(1976)의 8~16細胞期 수정란을 補體의 存在下에서 H-Y 抗體를 處理하여 44%(12/27) XY 형의 수정란이 파괴되었다고 보고하였으며, Epstein 등(1980)은 8~16세포기의 ICR 系統 생취 受精卵 515個중에서 245(47.6)個가 파괴되었다고 하였고 White 등(1983)은 8~16세포기 생취수정란 47.9%(479/1,000)가 破壞되었다고 보고하였다. 이러한 結果들은 本實驗의 結果와 대체적으로 일치하는 成績이다.

Table 1. Detection of H-Y antiserum in mouse embryos*

Samples	No. of embryos examined	No. of embryos developed (%)	No. of embryos affected (%)
1	63	33(55)	30(48)
2	47	23(49)	24(51)
3	44	21(48)	23(52)
4	38	20(53)	18(47)
5	46	22(48)	24(52)
6	24	22(92)	2(8)
7	39	21(54)	18(46)
8	48	29(60)	19(40)
9	34	32(94)	2(6)
10	44	22(50)	22(50)
Total	427	245(57)	182(43)

*8~16 cell stage embryos

2. 分割 受精卵의 體外培養

ICR 생쥐 桑實胚期和 胞胚期の 수정란을 分割하여 2~3시간동안 體外培養을 실시하여 얻은 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이 桑實胚期는 457개의 分割 受精卵의 81.4%(372)가 正常的인 twin 으로 胞胚期까지 發達하였으며, 胞胚期 分割卵의 84.7%(122/144)가 胞胚期까지 정상적으로 發達하였으나 이들간에 有意의 ($P < 0.05$)인 差異는 없었다.

이러한 結果는 Nagshima 등(1984)의 桑實胚期 分割卵에서 57.3%가 胞胚期로 發達하였다는 成績보다는 월등히 높은 결과이며, McEvoy와 Sreenan(1987)이 牛의 桑實胚期 수정란을 分割하여 PBS 를 培養液으로 사용하여 48시간 培養하였을 때 86%가 정상적으로 發達하였다는 成績과 李等(1989)의 89.6%, 姜等(1989)의 ICR 系統의 생쥐 桑實胚와 胞胚期の 分割受精卵 91.6%와 95.3%가 정상적으로 發達하였다는 결과와 대체적으로 一致하였다.

3. 補體의 濃度

補體의 濃度가 H-Y 抗體의 活性에 미치는 영향은

Table 3에서 보는 바와 같다. 補체와 항체 의 混合比를 10 μ l 範圍 내에서 1:9, 1:4, 1:2.3, 1:1.5 및 1:1의 比率로 했을 때 破壞된 分割卵의 비율은 各各 19.5%(54/277), 41.2%(131/318), 47.1%(239/507), 51.4%(188/366) 및 67.3%(138/205)로써 1:9를 除外하고 補體의 濃度間에 차이가 없었으며, Krco와 Goldberg(1976), White等(1982), Ko等(1986) 및 鄭(1987)의 報告와 대체로 一致하는 結果이다.

補체 的 濃度가 H-Y 抗體의 活性에 미치는 影響은 그다지 크지 않음을 確認할 수 있었다. 다만 補體의 存在는 H-Y 抗體의 作用을 위하여 必需의인 것이라고 생각된다.

4. 分割卵에 대한 H-Y 抗體의 效果

桑實胚期の 수정란을 分割하여 短時間에 걸쳐 體外培養한 後 정상적으로 胞胚期까지 發達한 分割卵을 H-Y 抗血清과 補體를 함유한 배양액에서 5~6시간 体外배양을 실시한 後 분할란의 形態學的 特性은 Table 4에서 보는 바와 같다.

分割卵의 302個중 177個(58.7%)가 破壞되었고

Table 2. *In vitro* development of bisected mouse embryos.

Stage of embryos	No. of embryos	Blastocysts to developed from bisected embryos(%)		
		Twin	Single	Degenerated
Morula	457	372(81.4)	72(15.7)	13(2.9)
Blastocyst	144	122(84.7)	15(10.4)	7(4.9)

There are no significant ($P < 0.05$) differences in blastocysts to development of bisected embryos between the cell stages.

Table 3. Optimal concentration of complement for the activity of H-Y antiserum.

H-Y antiserum/ Complement (v/v)	No. of embryos	No. of embryos affected (%)	No. of embryos developed (%)	No. of embryos degenerated (%)
1: 9(1 μ l: 9 μ l)	277	54(19.5) ^c	214(77.3) ^a	9(3.2) ^a
1: 4(2 μ l: 8 μ l)	318	131(41.2) ^b	173(54.4) ^b	14(4.4) ^a
1: 2.3(3 μ l: 7 μ l)	507	239(47.1) ^b	251(49.5) ^{bc}	17(3.4) ^a
1: 1.5(4 μ l: 6 μ l)	366	188(51.4) ^b	151(41.2) ^c	27(7.4) ^a
1: 1 (5 μ l: 5 μ l)	205	138(67.3) ^a	48(23.4) ^d	19(9.3) ^a

The percentages with different superscripts denote significant ($P < 0.05$) difference between H-Y antiserum or complement of concentration.

Table 4. Effect of bisected, zona-free or intact morula embryos from H-Y antibody treatment on lysis of mouse embryos

Morphology of embryos	No. of embryos	No. of embryos developed (%)	No. of embryos affected (%)
Bisected*	302	125 (41.4) ^b	177 (58.6) ^a
Zona-free	386	221 (57.3) ^a	165 (42.7) ^b
Intact	258	133 (51.5) ^{ab}	125 (48.5) ^b

*Bisected single embryos.

The percentages with the different superscripts significant ($P < 0.05$) difference between the morphology of embryos.

125(41.4)個는 胎胚期까지 정상적으로 발달하였으며 zona-free 한 수정란은 42.7% (165/386)가 파괴되었고 intact 한 수정란은 48.5% (125/258)가 파괴되어 이들간에 비슷한水準을 보였다. 이러한 결과는 鄭 (1987)의 intact 수정란의 47.5% (76/160)가, Utsumi 等(1983)의 흰쥐 상실배기 수정란 57%와 Utsumi 等(1984)의 51%가, Stremiński(1979)의 C₅₇BL/6J 계통의 zona-free 수정란에서 58%가, Krco와 Goldberg(1976)는 생쥐 8-16세포기 zona-free 수정란의 53%가 破壞되었다고 報告한 것들과 대체적으로 같은 成績이었다.

5. 受精卵 移植 및 産子의 性 判別

胎胚期까지 정상적으로 발달된 것 중 grade A와 grade B만을 選別하여 外科적으로 移植하여 얻은 결

과는 Table 5에서 보는 바와 같이 H-Y 抗血清과 補體의 存在下에서 培養한 후 影響을 받지 않은 다른 한쪽 수정란을 이식하여 태어난 17마리 중 14마리(82.4%)가 암컷이었는데 영향을 받은 다른 한쪽 수정란을 이식하였을 때 92.9% (13/14)가 수컷으로 태어나 이들간에 有意性($P < 0.05$)이 認定되었다. 한편 分割 受精卵, zona-free 受精卵 및 intact 受精卵를 移植하여 各各 50%, 55.5% 및 41.7%가 암컷으로 태어나 自然的인 性比 50:50과는 有意的($P < 0.05$)인 差異가 없었다.

이러한 결과는 White 等(1983)은 報告한 여러가지 系統의 생쥐에서 81.1% (43/53)가, White 等(1982)의 C₅₇BL/6J 계통 생쥐에서 86.2% (50/58)가, Shelton과 Goldberg(1984)의 F₁(C₅₇BL/6J A/J)의 생쥐에서 82% (14/17)가, Utsumi 等(1983)의 DA系

Table 5. Production of live youngs and sexual rate following transfer of blastocyst stage embryos by different morphology or H-Y antiserum treatment of embryos.

Morphology of embryos	No. of embryos transferred	No. of recipient mouse	No. of pregnant mouse (%)	No. of youngs (%)		
				Male	Female	Total
Bisected	112	16	8 (50.0) ^{ab}	12 (50.0) ^b	12 (50.0) ^{ab}	24
Zona-free	88	11	5 (45.5) ^b	10 (45.5) ^b	12 (55.5) ^a	22
Intact	126	14	8 (57.1) ^a	21 (58.3) ^a	15 (41.7) ^b	36
Affected						
half embryos	52	13	4 (23.1) ^A	13 (92.9) ^A	1 (7.1) ^A	14
Non affected						
half embryos	78	15	4 (26.7) ^A	3 (17.6) ^B	14 (82.4) ^B	17

The percentages with the different superscripts denote significant ($P < 0.05$) difference between the morphology or half embryos.

統의 흰쥐에서 79%가, Wachtel(1984)은 牛에서 태어난 72마리중 6마리가 암송아지였다고 보고한 結果와 같은 水準의 結果를 얻었다.

IV. 摘 要

本 研究는 免疫學的 方法에 의하여 性を 調節할 수 있는 方法을 개발하고자 近郊系統의 Wastar 흰쥐의 수컷 비장을 摘出하여 均質化시킨 다음 상층액을 취하여 同種의 암컷 腹腔內에 接種함으로써 H-Y 抗原에 대한 H-Y 抗 血清을 제조하였으며, 제조된 H-Y 抗 血清과 補體를 함유한 培養液에 ICR 系統의 생쥐로부터 採卵한 桑實胚 受精卵를 分割을 실시하여 分割된 受精卵를 5~6시간 體外培養을 실시하여 H-Y 抗 血清의 濃度, 反應效果, 분할수정란의 體外培養率 등을 調査하였으며, 이들 분할수정란을 受卵생쥐에 移植을 실시하여 受胎率 및 新生子の 性比를 調査한 結果는 다음과 같다.

H-Y 抗體의 形成은 rat 10마리중 8마리에서 抗體가 형성되어 80%의 形成率을 보였으며, 427개의 수정란을 H-Y 抗體를 處理하여 이중 182개(43%)가 파괴되었다. 分割 桑實胚期 및 胞胚期 수정란의 체외배양은 한 쌍이 모두 발달한 것은 각각 81.4 및 84.7%였으며, 한쪽만 발달한 것은 15.7 및 10.4%로서 發達段階間에 有意的($P < 0.05$)인 차이는 없었다.

分割 受精卵의 H-Y 抗體의 適定濃度는 H-Y 抗 血清과 補體의 比率를 1 : 2.3(3 μ l : 7 μ l)로 처리했을 때 47.1%가 影響을 받았으며, 49.5%는 정상적으로 발달함으로써 가장 適定 比率이었다($P < 0.05$). 수정란의 H-Y 抗體 效果는 分割 桑實胚期의 경우 58.6%가 影響을 받음으로써 zona-free(42.7%) 및 정상적인 桑實胚期 수정란(48.5%)보다 有意적($P < 0.05$)으로 높은 反應을 나타내었다.

受胎率은 正常的인 桑實胚期 수정란을 移植하였을 때 57.1%가 受胎되어 分割 受精卵(50.0%) 및 zona-free 수정란(54.5%)보다 有意的($P < 0.05$)으로 높은 受胎率을 얻었으며, 分割 受精卵에 있어서 한쪽만 H-Y 抗體를 處理하여 影響을 받은 수정란을 移植하였을 때 23.1%가 受胎하여 影響을 받지 않은 수정란의 26.7%간에 有意的($P < 0.05$)인 差異가 없었다. 또한 分婯한 생쥐의 수컷과 암컷의 性比는 分割 受精卵 (50 :

50), zona-free 수정란(45.5 : 55.5) 및 정상적(58.3 : 41.7)인 수정란을 移植하여 生産한 생쥐의 性比는 암수比率에 있어서 큰 차이가 없었으나 分割한 한쪽 수정란에만 H-Y 抗體를 處理하여 影響을 받은 수정란과 影響을 받지 않은 수정란을 移植하였을 때 수컷 및 암컷의 比率이 各各 92.9 : 7.1 및 17.6 : 82.4로써 이들 間に 有意的($P < 0.05$)인 差異가 있었다.

V. 參考文獻

1. Adinofi, M., P. Polani and J. Zenthon. 1982. Genetic control of H-Y synthesis. A hypothesis. Hum. Gent. 61 : 1-2.
2. Bennet, D., E.A. Boys, M.F. Lydn, B.J. Mathieson, M. Scheld and K. Yanagisawa. 1975. Expression of H-Y(male) antigen in phenotypically female Tfm/Y mice. Science 257 : 236-238.
3. Bradley, M.P. and B.F. Heslop. 1985. Elicitation of a rapid and transient antibody response to H-Y antigen by intraplenic immunization. Transplantation 39 : 634-638.
4. Chung, J.Y. 1987. Studies on the sexing of mouse embryos by Rat H-Y antibody. Ph. D. Thesis. Gyeongsang Nat. Univ., Chinju, Korea.
5. Eichward, E. J. and C.R. Silmsner. 1955. Communication. Transplant. Bull. 2 : 148-149.
6. Epstein, C.J., S. Smith and B. Travis. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. Tissue Antigens 15 : 63-67.
7. Goldberg E.H., E.A. Boyse, D. Bennet, M. Scheid and E.A. Carswell. 1971. Serological demonstration of H-Y(male) antigen on mouse sperm. Nature 232 : 478-480.
8. Kang, D.J., H.S. Park, H.J. Lee, and C. S. Park. 1989. Studies on culture and

- transfer of mouse embryos bisected at various cell stages. *Korean J. Emb. Trans.* 1: 28-34.
9. Hiroyuki, A., Y. Takahashi and H. Kanagawa. 1985. Sex determination of ddy mouse morulae by anti male spleen cell sperm. *Japan. J. Anim. Reprod.* 31: 74-76.
 10. Ko, J.J., H.S. Shim, J.B. Kim, H.Y. Park and K.S. Chung. 1986. Optimal condition and interspecific cross-reaction of H-Y antibody activity. *Korea J. Anim. Reprod.* 10: 168-174.
 11. Kroc, C.J. and E.H. Goldberg. 1976. H-Y (male) antigen detection on eight-cell mouse embryos. *Science* 193: 1134-1135.
 12. Lee, H.J., H.S. Park, T.S. Kim, S.Y. Choe and C.S. Park. 1989. Study on improvement of viability of mouse embryos after bisection. *Korean J. Vet. Res.* 29: 123-128.
 13. McEvoy, T.G. and Sreenan J.M. 1989. The survival of bisected cattle embryos without zonae pellucidae. *Theriogenol.* 22: 257.
 14. Nagamine, C., J. Reidy and G.C. Koo. 1984. A radiobinding assay for human H-Y antigen using monoclonal antibodies. *Transplantation.* 37: 13-17.
 15. Nakamura, D., S.S. Wachtel and K. Kallman. 1984. H-Y antigen and the evolution of Heterogamety. *J. Hered.* 75: 353-358.
 16. Nagashima, H. Matsui K., Sawasaki T. and Kano Y. 1984. Production of monozygotic mouse twins from microsurgically bisected morulae. *J. Reprod. Fert.* 70: 357-362.
 17. Nicholas, J.S. and Hall B.V. 1942. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. *J. Exp. Zool.* 90: 441-459.
 18. Ohno, S., Y. Nagi and S. Ciccarese. 1978. Testicular cells Iyostripped of H-Y antigen organize ovarion follicle-like aggregates. *Cytogenet. Cell. Genet.* 20: 351-364.
 19. Ohno, S. and S.S. Wachtel. 1978. On the selective elimination of Y-bearing sperm. *Immunogenetics* 7: 13-16.
 20. Park, C.S., S.Y. Choe, H.Y. Lee, J.S. Lee and H.S. Park. 1987. Studies on the technological development of embryos transfer an manipulation in goat. II. Production of monozygotic twins by bisection of embryos. *Proc. Mol. Biol. & Genet. Engineering.* Seoul, pp. 215-222.
 21. Park, C.S., S.Y. Choe, H.Y. Lee, J.S. Lee and H.S. Park. 1988. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goat. III. Improvement of viability and conception rate following bisection and transfer of embryos. *Proc. Mol. Biol. & Genet. Engineering,* Seoul, pp. 9-14.
 22. 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.
 23. Shelton, J.A. and E.H. Goldberg. 1984. Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantion mouse embryos. *Transplantation* 37: 7-8.
 24. Smith, F. 1919. The early history of verterinary literature and its british development. Vol. 1. Bailliere, Tindall and Cox, London.
 25. Strzemienski, P. 1979. Sex of C57BL/6J and CDI mouse embryos after treatment with H-Y antiserum and guinea pig complement. Ph. D. Thesis, University of Massachusetts.
 26. Tsunoda M. Tokunaga T., Sugie T. and Katsumata M. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of

- bisected embryos in the goats. *Theriogenol.* 24: 337-343.
27. Utsumi, K., E. Satoh and M. Yuhara. 1983. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. *J. Reprod. Immunol. Suppl.* 59.
28. Utsumi, K., E. Satoh and Yuhara. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. *10th Int Cong: on Anim. Reprod. and AI.* 234-235.
29. Wachtel, S.S., G.C. Koo, E.E. Zuckerman, U. Hammerling, M.P. Scheid and E. A. Boyse. 1974. Serological crossreactivity between H-Y(male) antigens of mouse and man. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71: 1215-1218.
30. Willadsen, S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature.* 227: 298-300.
31. 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.
32. 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.
33. White, K.L., G.B. Anderson, R.H. Bondurant, S. Donahue and R.L. Pashen. 1987. Viability of bisected bovine embryos after detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 27: 293.