

LAMP 방법에 의한 소 수정란의 성 판별과 Biopsy에 따른 수정란의 체외발달

조상래 · 최선호 · 김현중 · 한만희 · 최창용 · 정연길¹ · 손동수[†]
농촌진흥청 축산연구소

Sex Detection and *In Vitro* Development of Biopsied Bovine Embryo for LAMP Based Embryo Sexing

S. R. Cho, S. H. Choi, H. J. Kim, M. H. Han,
C. Y. Choe, Y. G. Chung¹ and D. S. Son[†]

National Livestock Institute, RDA.

SUMMARY

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is novel DNA amplification methods that amplifies a target sequence specifically under isothermal condition.

The present study was to assess the *in vitro* viability after biopsy and sexing rate of different types of embryo biopsied. *In vivo* compact morulae and blastocyst embryos were obtained from Korean Native Cow (KNC) superovulated with FSH (Antorin, R-10) on 7 Day after artificial insemination. *In vitro* compact morulae and blastocyst embryos were obtained with KNC or Holsteins that were gained on 6, 7 or 8 day after *in vitro* fertilization (IVF) with frozen semen. Biopsy of bovine embryo was carried out in a 80 μ l drop with Ca²⁺-Mg²⁺ free D-PBS and the viability of biopsied embryos were evaluated in IVM (IFP, Japan) medium at 12 hrs culture time. The sex ratio of biopsied Hanwoo embryos were male vs. female of 43.5% vs. 56.5% *in vivo* and 33.9% vs. 49.2% *in vitro* respectively, and male rate of biopsied Holstein embryos were significantly higher than female (70.8 vs. 29.2%), and indefinite rate of *in vitro* embryos was 16.9% and *in vivo* was not.

The degeneration rate of biopsied embryo, *in vitro* embryos were significantly higher than *in vivo* (13.2% vs, 0.0%, $P<0.05$). The survivability of *in vivo* embryo were between biopsied following punching method was significantly ($P<0.05$) higher than bisection method produced embryos (100% vs. 83.3%) and *in vitro* had no difference. However, the degeneration rate of biopsied embryo by bisection method was significantly higher than punching methods between *in vivo* and *in vitro* (16.7 vs. 22.6%, respectively, $P<0.05$).

In conclusion, these results indicate that punching method was optimal and survivability after embryo biopsy was useful for reducing the damage caused by the embryo biopsy procedure for LAMP-based embryo sexing.

(Key words : bovine embryo, sexing, biopsy embryo, survivability)

* 본 연구는 2004~2005년도 농촌진흥청 축산연구소 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

¹이티 바이오텍(ET Bio-Tech)

[†] Correspondence : E-mail : sonds@rda.go.kr

서 론

정자와 수정란을 이용한 가축의 성 판별 기술은 축산업의 생산성을 높일 수 있는 중요한 수단으로 소에서는 능력 개량과 유전적으로 우수한 개체의 조기 증식 기술로 소개되어 왔다. 수정란의 성 판별에 대한 연구는 1976년 Harr 등이 소 수정란의 염색체 분석을 통해서 보고한 이후 1980년대 초기에는 mouse 수정란에서 H-Y antigen 방법을 시작하여 소 수정란에도 이를 적용하였으며(White 등, 1982; Epstein 등, 1980), 1990년대에는 electrophoresis를 포함한 소 수정란의 PCR 성판별을 대규모로 이용한 것이 처음으로 보고되었다(Herr 등, 1990). 그리고 최근에는 분자유전의 연구 분야에서 소의 Y-chromosome에 있어서 male 특이 DNA sequence를 이용함으로써 인공수정과 수정란 이식 연구 분야에서도 응용되고 있는 기술이다. 또한 이러한 방법은 주로 정자와 수정란을 이용한 PCR 연구방법이 주로 소개되어 왔으며(Thibier and Nibart, 1995), PCR 방법은 분석에 소요되는 시간이 길며, DNA를 증폭시키거나 조작하는 과정에서 오염에 노출될 수 있다는 단점을 가지고 있다(Chen 등, 1999; Appa와 Totey, 1999; Kobayashi 등, 1998; Zang 등, 1992).

수정란의 성 판별을 위해서는 적정 할구수와 biopsy 된 수정란의 생존성을 위해서 수정란의 biopsy 방법과 수정란의 배양조건 등이 고려되어야 한다.

최근에 수정란의 성 판별 방법으로 등온에서 빠르게 DNA를 증폭하고 높은 DNA 반응의 특이성을 가지고 있는 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 방법이 Mori 등(2001)에 의해서 보고되었다.

따라서, 본 연구에서는 LAMP 방법을 이용하여 한우 수정란의 성 판별에 활용 가능성을 조사하기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

1. 체외 수정란 생산

도축난소는 25°C 생리식염수에 침지하여 실험실로 운반하였으며, 난자 회수는 18Gauge 주사침

이 부착된 10ml 주사기로 직경 2~6mm의 가시난포에서 난자를 흡입하여 난자를 회수하였다. 회수된 난자를 0.1% polyvinylalcohol(PVA)가 첨가된 TCM199(Sigma) 배양액에서 3~4회 세척한 후 체외성숙 배양액 IVMD(IFP, Japan)에서 22시간 동안 체외 성숙을 유도하였다. 체외 수정은 체외 성숙된 난포란을 caffein과 heparin이 첨가된 BO 배양액에서 한우 동결정액을 이용하여 1×10^6 cells/ml의 정자로 6시간 동안 실시하였다. IVMD(IFP, Japan) 배양액에서 체외 발달을 실시하여 배양 후 6~8일째 생산된 수정란을 실험에 공시하였다.

2. 체내 수정란 생산

체내 수정란 생산을 위해서 사용된 공란우는 축산연구소 가축유전자원시험장에서 사육중인 한우를 공시하였다. 공란우의 처리는 발정 발현과 무관하게 Progesterone releasing device인 CIDR(InterAg, NZ)를 질내에 삽입하고 CIDR 삽입 7~8일째부터 FSH(Antorin R-10, Kawasaki, Japan) 28AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 분할 근육주사하였으며, FSH 투여 5회째에 $PGF_2\alpha$ 25mg, 6회째에 15mg을 투여하였고 7회째에 CIDR를 제거하였다. 발정 징후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였으며, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란하였다.

3. 수정란 Biopsy 및 체외배양

수정란의 biopsy는 micromanipulator가 장착된 inverted 현미경에 microblade를 부착하여 실시하였다. 배반포기 수정란을 petri dish(87mm×20mm, Corning)에 Ca^{2+} , Mg^{2+} free D-PBS(Gibco) 80 μ l의 미소적에서 Bio-cut blade(15°, Feather, Japan)를 이용하여 수정란의 영양막세포 일부분을 절단(biopsy) 후 성판별에 사용하고, 나머지 수정란은 배양하였거나 상실배기 수정란을 petri dish의 미소적 내에서 수정란의 투명대를 미세 유리 피펫으로 절개(punching)한 후 12시간 배양하고 절개된 투명대 부분으로 부화되어 나오는 일부분을 절단하여 성판별에 사용하였다. Biopsy가 완료된 수정란들은 0.1% PVA가 함유된 D-PBS 배양액에서 2~3회 washing 후 IVMD(FTP, Japan) 배양액에서 배양하

었다.

Biopsy한 수정란을 12시간 이상 배양하였을 때 확장배반포기 및 탈출배반포기 단계까지 발달하는 수정란은 생존성이 있는 것으로 판단하였다.

4. 수정란 성 판별

수정란의 성 판별은 Hiroki 등(2004b)의 방법에 의해서 실시하였다. Biopsy된 수정란 할구로부터 DNA 증폭을 위해서 소 수정란 성 판별 키트(Loop-amp, Eiken Chemical Co, Ltd)를 사용하였다. 6 μ l DNA 추출용액과 6 μ l biopsied 수정란의 할구를 혼합하여 DNA를 추출한 후 양성 특이적인 반응 튜브와 음성·자성의 동일한 반응을 일으키는 튜브에 각각 5 μ l 동일하게 DNA에 튜브에 분주하였다. 그리고, 각 튜브에 20 μ l 반응 mixture를 혼합한 후, DNA 증폭을 위해서 Turbidimeter LA-100 (Teramecs Co., Ltd., Kyoto, Japan)을 사용하여 63.5°C에서 40분, 그리고 80°C에서 2분간 실시하였다.

각 튜브에서 두 반응이 각각 Positive(+)일 때 수정란은 male로서 판정하였으며, 양성 특이 반응 튜브에서 negative(-) 그리고, 일반 반응 튜브에서 positive(+) 결과가 나오면 female로서 판정하였다. 일반 반응 튜브에서 positive(+)의 결과가 나오지 않으면 성 판별이 되지 않은 것으로 간주하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 도출된 결과는 4회 이상 반복하였으며, 통계학적 분석은 ANOVA Program을 이용하였으며, $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검증을 실시하였다.

결 과

1. 수정란의 성 판별을

LAMP 방법으로 한우 체내 수정란과 체외 수정란 및 젖소 체외 수정란에 대하여 성 판별을 실시한 결과는 Table 1과 같다.

한우 체내 수정란의 성비는 암컷이 56.5%, 수컷이 43.5%였고, 체외 수정란은 암컷이 49.2%, 수컷이 33.9%였으며, 판별이 불가능한 것이 16.9%였다. 한편, 젖소 체외 수정란의 성비는 암컷이 29.2%, 수컷이 70.8%를 나타내어 수컷의 비율이 한우 체내 및 체외수정란의 수컷보다 유의적으로 많았다 ($P < 0.05$). 그리고 성 판별이 불가능한 것이 한우 체내수정란 및 젖소 체외수정란에서는 없었으나 한우 체외수정란에서 16.9%로 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P < 0.05$).

2. 한우 수정란의 Biopsy후 체외 발달을

한우 체내 및 체외수정란을 punching 후 biopsy하여 체외에서 12시간 이상 배양하였을 때 확장배반포기 또는 탈출 배반포기까지 발달을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Biopsy한 체내 수정란의 체외 발달율은 100%였으나 체외 수정란에서는 체외 발달율이 86.8%를 나타내고, 정상적으로 발달하지 못하고 퇴화된 수정란이 13.2%로 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P < 0.05$).

3. 수정란의 Biopsy 방법에 따른 배발달을

Table 3은 Biopsy 방법에 따른 한우 체내·외 수정란과 젖소 체외 수정란의 배발달을 조사한 결과이다.

Table 1. Sexing rates according to *in vivo* and *in vitro* embryo production in Hanwoo and Holstein

Embryo	No. of embryos	No. of sexed embryo to (%)		Ambiguity
		Female	Male	
<i>In vivo</i> (Hanwoo)	23	13(56.5) ^a	10(43.5) ^a	0(0) ^a
<i>In vitro</i> (Hanwoo)	59	29(49.2) ^a	20(33.9) ^a	10(16.9) ^b
<i>In vitro</i> (Holstein)	24	7(29.2) ^a	17(70.8) ^b	0(0) ^a

^{ab} Percentages with different superscripts within columns indicate significant difference($P < 0.05$), Replicates 5.

Table 2. Developmental rates of biopsied embryos produced by different methods in Hanwoo

Embryo	No. of embryos	No. of embryos developed to (%)	
		exBL/hBL*	Degeneration
<i>In vivo</i>	25	25(100.0) ^a	0(0.0) ^a
<i>In vitro</i>	68	59(86.8) ^a	9(13.2) ^b

* exBL: expanded blastocyst, hBL: hatching blastocyst.
^{ab} Percentages with different superscripts within columns indicate significant difference($P<0.05$).
 Replicates 4.

체내 수정란에서 punching 방법과 biopsy 방법으로 biopsy 후 배발달율은 각각 100%와 83.3%로 biopsy 방법이 정상적으로 발달하지 못하고 퇴화된 수정란이 16.7%로 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P<0.05$).

체외수정란에서 punching 방법과 biopsy 방법으로 biopsy 후 배발달율은 각각 100%와 77.4%로 biopsy 방법이 정상적으로 발달하지 못하고 퇴화된 수정란이 22.6%로 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P<0.05$).

고 찰

수정란의 성 판별을 위해서 최소한의 활구를 필요로 한다. 그래서 수정란으로부터 영양막 세포를

한 개 또는 그 이상의 세포를 회수하여 DNA 증폭을 실시하게 되는데, Hiroki 등(2004a)은 성 판별을 위해서 필요한 수정란의 활구수를 3~5개가 적당하다고 보고하였는데, 이것은 수정란의 성 판별을 위해서는 적어도 5개 정도는 되어야 성의 분석이 가능하다는 것을 보여준다. 성 판별을 위한 활구 분리를 위해서 실시하는 수정란의 biopsy 방법은 보고자들마다 서로 다른 방법을 사용하게 된다(Lewis 등, 1994; Forell, 2001). 또한 이러한 방법들 차이에서 biopsy 후 수정란의 발달에 영향을 주어 성 판별된 수정란 이식에 영향을 미칠 수도 있을 것이다. 따라서 Table 2에서 실시한 성 판별된 한우 수정란의 체외 발달율을 살펴보면 biopsy 된 체내·외 수정란이 re-formation 되거나 hatching 단계까지 발달하는 비율이 100 vs. 87%로서 두 처리군간에는 유의적인 차이는 나타나지 않았지만 biopsy 후 degeneration의 비율에 있어서는 *in vitro* 수정란에서 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과에 대해서 Hasler 등(2002)은 수정란의 biopsy는 수정란의 생존성 저하를 가져올 수 있으며 그리고, 수정란을 이식한 후 임신율의 감소를 초래할 수 있으며, 또한, 체외수정란 역시 biopsy에 따른 체외 배양시에 발달율의 저하의 결과를 보였다고 보고하였다. 이러한 내용은 수정란의 biopsy로 인해서 수정란의 등급과 발달 단계에 중요한 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3의 결과를 살펴보면 LAMP 방법에 따른 수정란의 성 판별의 비율을 보여주고 있다. 한우

Table 3. The survivability and degeneration rates of embryos between two different biopsy methods for embryo sexing in cows

Embryo	Methods	No. embryos	No. (%) of	
			Survivability	Degeneration
<i>In vivo</i>	Punching	26	26(100) ^a	0(0) ^a
	Biopsy	12	10(83.3) ^a	2(16.7) ^b
<i>In vitro</i>	Punching	35	35(100) ^a	0(0) ^a
	Biopsy	31	24(77.4) ^b	7(22.6) ^b

* Punching : cutting after punching at morula, biopsy : cutting at expanded blastocyst stage.
^{ab} Percentages with different superscripts within columns indicate significant difference($P<0.05$).
 Replicates 6.

체내 수정란에 있어서는 female의 비율은 57%, male의 비율은 44%, 체외 수정란은 female 49%, male 34%로서 각 처리군에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Holstein 체외 수정란에서는 female 29%, male 70%로서 male의 비율이 유의적으로($P < 0.05$) 높은 결과를 나타내었다. 일반적으로 소 수정란의 male과 female의 비율은 거의 1:1의 비율로 나타나는데 female보다는 male의 비율이 약 2~3% 높은 비율의 결과를 보고하였으며(Jafar and Flint, 1996), 몇몇 연구자들은 일반적으로 7일째 생산된 소 체외 수정란의 정상적인 1:1의 비율을 넘어서 male과 female의 비율이 1.3:1~1.9:1로 female의 비율이 다소 높게 나타난다고 보고하였다(Carvalho 등, 1996). 이러한 보고는 본 연구에서도 비슷한 결과를 나타내었다. 그리고 Grisart 등(1995)은 소 체외 수정란의 비율을 1:1의 비율을 보고하였으며, Bredbacka & Bredbacka (1996)와 Yadav 등 (1993) 등은 male의 비율이 female의 비율보다 유의적으로($P < 0.05$) 높은 결과를 보고하기도 하였다. 이러한 결과는 oxidative stress로 유도된 gene expression의 결과로 인해 female 수정란보다 male의 수정란이 더 빠른 발달을 보이기 때문이라고 보고하였다(Sohal와 Allen. 1990). 본 연구에 사용된 수정란 수는 106개의 수정란 중 female의 비율은 45% 수준으로서 Shea (1999)가 보고한 46% 결과와 비슷한 경향을 보였으며, 이 같은 female의 수정란에 영향을 미치는 요인으로는 정확치 않지만 인공수정시 정액의 선택과 수정란의 등급에서도 성의 비율이 형성된다고 하였다.

그러나 본 연구의 결과 체외 수정란에 있어서 성의 판별이 확인되지 못한 비율이 한우 *in vitro*에서 17%의 결과를 나타내었다. 비슷한 연구 결과로서 1999년 Shea는 Holstein *in vivo* 수정란에서 성이 확인되지 않은 비율은 수컷의 개체에 따라서 8~12%, 그리고 모계의 영향 즉 공란우에 의해서 3~10%, 수정란의 발달 단계인 morula와 blastocysts간 9~11% 그리고 수정란의 질(quality)의 영향으로 9~10%의 비율로 나타난다고 보고하였다.

이와 같은 결과는 소 수정란 biopsy에 이용된 공란우 사이에서의 종간의 특이성이 원인이 될 수도 있으며, 그리고 가장 큰 이유로서는 biopsy 샘플의

오염이 원인이 될 수 있다(Herr와 Reed, 1991). 왜냐하면 PCR의 방법은 매우 민감하며 또한 적은 수의 할구를 이용하기 때문에 biopsy와 분석 과정 중에 오염된 결과라고 추측할 수 있기 때문이다. Hiroki 등(2004a)은 성 판별을 위해서 사용되는 최적의 할구수는 5~7개를 이용하는 것이 가장 정확한 판정을 할 수 있다고 보고하였다. 그리고, 성의 진단에 있어서 이러한 방법들 간의 차이는 수정란과 biopsy 샘플에 따른 세포수와, 샘플에 있어서 DNA의 부재와 불충분한 발현이 원인이 될 수도 있기 때문에 이러한 biopsy 방법은 수정란의 성 판별에 대단히 중요한 요인이 될 수도 있을 것이다.

Biopsy 방법에 따른 수정란의 생존율은 수정란 이식을 상업적으로 이용하는데 중요한 요인이기 때문에 수정란의 biopsy를 위한 micromanipulation의 조작 또한 중요한 기술이다(Herr와 Reed, 1991). 그리고 biopsy 방법에 의해서 소 수정란의 성을 직접 분석이 가능하다(Lopes 등, 2001). 수정란의 성 판별을 위해서 사용되는 biopsy는 가장 간단하고 효율적인 방법으로 적용을 하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 본 실험의 결과에서 biopsy 방법에 따른 수정란의 생존성 비율을 보면 *in vitro* 수정란에서 punching 방법이 수정란의 일부를 절개하는 biopsy보다 유의적으로($P < 0.05$) 높은 생존율을 보였다. 하지만 *in vivo* 수정란에서는 biopsy 방법에 따른 생존율은 유의적인 차이를 보이지 않았다. Biopsy 후의 수정란의 degeneration 되는 비율이 *in vivo*와 *in vitro* 모두 biopsy 방법에서 17~23% 수준으로 높은 결과를 보였다. Chrenek 등(2001) 등은 수정란을 biopsy 후 biopsied 된 수정란의 60%만이 배반포까지 발달하였다고 보고하였고, Machaty 등(1993)도 56% 수준으로 보고하여 Chrenk 등(2001)과 비슷한 결과를 보고하였으며, 또한 Forell (2001)은 수정란의 할구의 일부를 흡입하는 aspiration 방법으로 체외 수정란을 biopsy를 수행한 결과의 효율은 92%로 보고하였다. 하지만 본 연구의 결과를 비교하면 biopsy 후의 수정란 생존율이 이들 보고자의 결과보다 본 연구에서 사용된 punching 방법의 결과(100%)가 유의적으로($P < 0.05$) 높은 결과를 보였다.

이러한 연구 결과들을 본 실험 결과와 비교하면 수정란을 biopsy 또는 aspiration 방법으로 biopsy한 결과보다는 수정란에 손상을 적게 주는 투명대 절개 후 부화되어 나오는 영양막 세포 일부를 이용하는 방법이 효과적인 것으로 사료된다. 또한 이 방법은 성 판별을 위한 최소한의 할구를 취할 수 있으며, 수정란에 손상을 적게 주는 장점을 가지고 있기 때문에 biopsy 후 수정란의 생존율을 비롯하여 수정란 동결 보존에도 중요한 요인이 될 것으로 사료된다.

적 요

수정란의 성 판별은 유전적으로 우수한 유전형질을 보유하고 있는 소의 수정란을 성 판별하므로서 희망하는 성의 송아지를 생산할 수 있으며, 부가가치가 높은 수정란을 확보할 수 있는 기술이다.

수정란의 손상을 최소화하면서 할구를 biopsy하는 기술을 개발하고, 간단하고 빠른 시간에 성 판별이 가능한 Loop-mediated isothermal amplification 방법으로 수정란을 성 판별을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 한우 체내 수정란의 성비는 암컷이 56.5%, 수컷이 43.5%였고, 체외 수정란은 암컷이 49.2%, 수컷이 33.9%였다. 그리고, 젖소 체외 수정란의 성비는 암컷이 29.2%, 수컷이 70.8%를 나타내어 한우 체내 및 체외 수정란보다 젖소 체외수정란의 수컷비율이 유의적으로 높게 나타내었다($P<0.05$). 또한, 한우 체외 수정란에서 성 판별이 불가능한 것이 16.9%를 나타내어 한우 체내 수정란 및 젖소 체외 수정란과는 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.05$).
2. Biopsy한 체내 수정란의 체외 발달율은 100%였으나 체외 수정란에서는 정상적으로 발달하지 못하고 퇴화된 수정란이 13.2%로 체내 수정란보다 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P<0.05$).
3. Punching 방법으로 수정란의 biopsy 후 정상적으로 발달하지 못하고 퇴화된 수정란은 체내 및 체외 수정란에서는 없었으나 biopsy 방법으로 biopsy한 수정란은 체내 및 체외 수정

란에서 각각 16.7% 및 22.6%를 나타내어 Punching 방법보다 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P<0.05$).

이상의 결과로 보아 한우 체내 수정란은 LAMP 방법을 이용하여 간단하고 신속하게 성 판별이 가능하며, 수정란의 biopsy는 punching 방법이 수정란에 손상을 적게 주는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Appa Rao KB and Totey SM. 1999. Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of *in vitro* developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology*, 51:785-797.
- Bredbacka K and Brebacka P. 1996. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 106:169-172.
- Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y and Mapletoft RJ. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stage on day 7. *Theriogenology*, 45:489-498.
- Chen CM, Hu CL, Wang CH, Hung CM, Wu HK and Choon KB. 1999. Gender determination in single bovine blastomere by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mol. Reprod. Dev.*, 54:209-214.
- Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J and Bulla J. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology*, 55:1071-1081.
- Epstein CJ, Smith S and Travis B. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens*, 15:63-67.
- Forell F. 2001. Producao *in vitro*, biopsia e sexagem de embriões bovinos. [*In vitro* production, biopsy, and sexing of bovine embryos] M. Sc

- Dissertation in Cellular and Molecular Biology. Porto Alegre, RS, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 33-42.
- Grisart B, Massip A, Collette L and Dassy F. 1995. The sex ratio of bovine embryo produced *in vitro* in serum free oviduct cell-conditioned medium is not altered. *Theriogenology*, 43: 1097-1106.
- Harr WCD, Mitchell D, Betteridge KJ, Eaglesome MD and Randall GCB. 1976. Sexing 2-week old bovine embryos by chromosome analysis prior to surgical transfer: preliminary methods and results. *Theriogenology*, 5:243-53.
- Hasler JF, Cardey E, Stokes JE and Bredbacka P. 2002. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, 58:1457-1469.
- Herr CM, Matthaehi KL, Steel T and Reed KC. 1990. Rapid Y-chromosome assay sexing of peripheral blood lymphocytes from Bovidae of known phenotypic sex. *Theriogenology*, 33:246.
- Herr CM and Reed KC. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35:45-54.
- Hiroki H, Soichi K, Satoru M, Ken S, Sadao O, Yoshiyuki T, Seiji K, Keiko T, Keibo T, Keibo W, Tsugunori N, Hidenari Y, Sigenori M and Akira M. 2004a. Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 62:887-896.
- Hiroki H, Satoru M, Satoru M, Takahashi H, Yoshikazu S, Naohiko K, Mutsumi I, Ken S, Sadao O and Akira M. 2004b. Genetic Diagnosis of Claudin-16 Deficiency and Sex Determination in Bovine Preimplantation Embryos, 50(6): 613-618.
- Jafar SI and Flint APF. 1996. Sex selection in mammals: a review. *Theriogenology*, 46:191-200.
- Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, 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.
- Lewis IM. 1994. Splitting cattle embryos commercially: the effect of sucrose, embryo stage and the duration between embryo recovery and biopsy. *Theriogenology*, 41:237.
- Lopes RFF, Forell F, Oliveria ATD and Rodrigues JL. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field condition. *Theriogenology*, 56:1383-1392.
- Machaty Z, Pald A, Csaki T, Varga Z, Kiss I, Barandi Z and Vajta G. 1993. Biosy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 98:467-470.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N and Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289:150-4.
- Nagamine K, Hase T and Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes*, 16:223-229.
- Notomi Y, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K and Amino N. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28:63.
- Shea BF. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six-year retrospective study. *Theriogenology*, 51:841-854.
- Sohal RS and Allen RG. 1990. Oxidative stress as causal factors in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp. Gerontology*, 25:499-522.
- Thibier M and Nibart. 1995. The Sexing of the embryos in the field. *Theriogenology*, 43:71-80.
- Yadav BR, King WA and Betteridge KJ. 1993. Relationship between the completion of the

first cleavage and chromosomal complement, sex and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. Mol. Reprod. Dev., 36:434-439.

White KL, Linder GM, Aderson GB and Bon-Durant RH. 1982. Survival after transfer of sexed mouse embryos exposed to H-Y antisera. Theriogenology, 18:655-662.

Williams TJ. 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the

X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. Theriogenology, 25:733-739.

Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navid W and Arnheim N. 1992. Whole genome amplification from a single cell: Implication for genetic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5847-5851.

(접수일: 2005. 6. 17 / 채택일: 2005. 8. 3)