

한국멧토끼 ZFX와 ZFY 유전자의 성별 이형성과 분자 성판별

한상현 · 조인철 · 이성수 · 오문유¹ · 오홍식^{2*}

농촌진흥청 난지농업연구소, ¹제주대학교 자연과학대학 생명과학과, ²제주대학교 사범대학 과학교육과

Received December 28, 2006 / Accepted March 2, 2007

Molecular Sex Determination Using Sexual Dimorphisms between ZFX and ZFY Genes in Korean Hares (*Lepus coreanus* Thomas). Sang-Hyun Han, In-Cheol Cho, Sung-Soo Lee, Moon-You Oh¹ and Hong-Shik Oh^{2*}. National Institute of Subtropical Agriculture, R.D.A., ¹Department of Life Science, College of Natural Sciences, Cheju National University, ²Department of Science Education, College of Education, Cheju National University – This study was performed to develop the molecular marker for sex determination of hare (*Lepus coreanus*) distributed in Korea which focused on sexual dimorphism between X and Y chromosomal homologous genes, zinc finger-X (ZFX) and -Y (ZFY). The intron 7 regions of ZFX and ZFY genes exhibited differential amplification patterns between male and female hares. The lengths of intron 7 region of ZFX and ZFY genes were 538 and 233-bp, respectively. Especially, the ZFX intron 7 contained a repetitive sequence identified as member of RNA-mediated transposable elements which was similar to CSINE2 commonly found in the rabbit genome. However, it was not present in intron 7 of ZFY gene. The molecular sex typing by polymerase chain reaction (PCR) was also carried out to determine the sex of hare based on difference in lengths between the intron 7 regions of ZFX and ZFY genes. All DNA samples tested had common band amplified from ZFX. However, the male hare DNAs had two distinct bands which amplified from ZFX and ZFY genes, respectively. The results from ZFX-ZFY PCR sex typing were identical to those from phenotypic investigation and from amplification patterns using male-specific sex determining region Y (SRY) gene as well. Finally, this study suggested that the sexual dimorphism between intron 7 regions of ZFX and ZFY could be useful genetic marker to determine sex of hare.

Key words – sexual dimorphism, ZFX, ZFY, hare, SINE

서 론

멧토끼 (*Lepus coreanus*)는 토끼과 (Leporidae)에 속하며 제주도를 제외한 우리나라 전역에 널리 분포하는 종이다. 가축으로 이용되는 집토끼 (rabbit, *Oryctolagus cuniculus*)와 겉모습은 비슷하나, 번식방법 등 생리적 특성과 굴을 만들지 않는 등 생태적인 특성이 확연히 달라 서로 다른 속으로 구분되고 있다. 현재까지 우리나라 멧토끼의 분류학적 위치에 대한 논란이 계속되고 있는 가운데, mtDNA CTYB 유전자 서열의 계통유전학적 분석을 통해 *L. mandshuricus*와 근연임을 제시하고 있다[12,14]. 국내에 몇 종 안 되는 야생 포유류 중 하나인 멧토끼는 산림 남벌과 개발로 인한 서식지의 감소 뿐만 아니라, 남획의 결과 그 수가 점차 감소되고 있는 실정이다.

포유류의 진화에 대한 연구에서 성염색체의 진화 양상은 매우 흥미로운 관심의 대상 중 하나이다. 원래 한 쌍의 상동염색에서 진화한 것으로 알려진 성염색체 중 Y 염색체는 점진적으로 붕괴되어 그 길이가 X 염색체에 비해 매우 짧아졌으

나, Y 염색체 상에만 존재하는 SRY 유전자는 배발생과정에서 응성발생을 유도하는 중추적인 역할을 수행한다[19,23]. 대부분의 포유류 세포에서 발현되는 가장 보존적인 DNA-결합 단백질 중 하나인 zinc finger (ZF)는 인간에게서 800 여종 이상의 단백질들이 예상되고 있다[16]. 이 중 성염색체 상에 암호화되어있는 ZFX와 ZFY의 인트론 상에서 염기치환 및 짧은 단편의 삽입/결실에 의한 다형성뿐만 아니라 전위인자의 삽입/결실에 의한 비교적 규모가 큰 성별 이형성 (dimorphism)이 확인되면서, 인간을 비롯한 소, 말, 돼지 등에서 이들 유전자들의 이형성을 근거로 X, Y 염색체를 구분하여 성판별에 이용하려는 연구들이 보고되고 있다[5,20,21].

생식기관에 대한 직접적인 관찰이 성판별에 가장 정확한 결과를 제시할 수 있으나, 생식기가 제거된 상태의 사체나 도체에 대한 성판별을 위해 분자생물학적 표지인자를 이용한 시도가 수행되고 있다. 핵형분석[6,13], Barr body의 확인 [2] 등은 Y 염색체를 직접 확인하거나 불활성 X 염색체의 존재를 통해 암수에 대한 정보를 제공하며, 성-특이 항체검사 [1]를 통해 수컷을 선별해 내기도 한다. 최근 Y 염색체 특이 probe를 이용한 *in situ* hybridization 기법은 Y 염색체의 존재를 직접 또는 간접적으로 확인할 수 있으며, Y-연관 유전자의 발현산물인 단백질의 존재 여부를 확인하는 방법들이 시행되어왔다[22,25]. 하지만 *in vitro*에서 PCR기법을 이용한

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3283, Fax : +82-64-725-4902

E-mail : sciedu@cheju.ac.kr

Y 염색체 특이적 유전자 또는 X, Y 염색체 모두에 암호화된 유전자를 증폭하여 비교하는 분석법은 경제적이면서 정확한 결과를 얻어낼 수 있어 다양한 동물을 대상으로 적용가능한 유전자 표지인자의 개발이 진행 중이다. 현재 포유류에서 PCR 성판별을 위해서 *SRY*, *amelogenin X-Y*, *ZFX-ZFY* 등이 이용되고 있으며, 이외에도 X, Y 염색체 상의 공통된 반복서열의 길이 차이를 random amplified polymorphic DNA나 restriction fragment length polymorphism 등의 방법으로 검출하여 분자표지자로 활용하려는 시도들이 계속되고 있다 [3,10].

현재 산림 남벌, 남획 등의 결과로 야생동물의 수가 급격히 감소하고 있어 종의 보존과 보호를 위한 노력은 요구되고 있다. 하지만, 세계적으로도 밀렵 등으로 번식기인 암컷을 포획하는 것마저도 개체의 외부나 생식기관을 제거한 이후에는 암-수를 신속, 정확하게 구분할 수 있는 분석법마저도 마련돼 있지 않아 불법 포획에 대한 정확한 증거를 제시하지 못하는 실정이다. 뿐만 아니라, 야생에서의 자연사나 사고에 의해 죽은 개체 역시 포식동물이나 세균에 의한 생식기관이 손상될 가능성은 다분하다. 본 연구는 야생상태의 어떤 원인에 의해 죽었거나, 인위적으로 포획된 멧토끼의 사체에 대한 유전자 성판별 기법을 확립하는 데 그 목적이 있다. 이를 위해 멧토끼의 X, Y 염색체에 상동으로 존재하는 *ZFX*, *ZFY* 유전자 절편에 대한 염기서열을 결정하고, 상호간의 염기서열의 특성을 비교하여 두 유전자간 성별 이형성을 탐색하고, 발견된 성별 이형성에 근거한 유전자 성판별 기법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

연구에 이용한 야생 멧토끼 시료는 한국유전자원은행에서 암수 판별기록이 있는 시료 중 암수 각각 2 개체씩을 분양받아 사용하였으며, 경상남도에서 암수 표현형 자료가 없는 멧토끼 사체 16 개체를 수집하여 이용하였다. 시료는 근육 또는 피부에서 DNA를 추출하였다. 근육과 피부에서의 DNA

추출은 sucrose-proteinase K lysis buffer[4]를 이용하였으며, 추출 과정은 일부 변형하여 수행하였다. DNA 추출 후 RNase를 처리하였고, 이후 phenol 추출법과 ethanol 침전으로 다시 회수하여 TE buffer에 용해하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

중합효소연쇄반응(PCR)

멧토끼에서 분리한 DNA를 주형으로, 10×PCR 반응 완충액, 20 mM dNTP, 각각 10 pmol primer, 2.0 units *Taq* DNA polymerase (TaKaRa, Japan)에 멸균한 탈이온수를 첨가하여 25 μ l 용량으로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 증폭용 primer들은 기존에 보고된 서열정보들을 토대로 직접 고안하였고, 서열의 정보는 Table 1에 제시하였다. *ZFX-ZFY* 유전자의 엑손 7과 10에서 고안한 hZFe7F와 hZFe10R을 멧토끼 인트론 7, 8, 9, 엑손 8과 9 전체, 엑손 7과 10의 일부가 포함된 서열의 결정을 위한 PCR 증폭에 이용하였다. 유전자 성판별을 위해, 성별 이형성을 보이는 인트론 7을 포함한 절편의 증폭은 hZFe7F와 hZFe8R을 이용하였고, 음성 특이적 *SRY* 유전자의 증폭을 위한 haSRYF와 haSRYR 프라이머를 이용하였다. PCR 증폭은 상기된 반응액 조성에 따랐으며 각각의 프라이머 세트의 annealing 온도는 gradient PCR 분석을 통해 최적 온도를 결정하였고, PTC-200 (MJ Research, USA)을 이용하였다. 유전자 증폭은 94°C 2분 열변성 후, 94°C-45 초, annealing 온도-1 분, 72°C-1 분 (*ZFX-ZFY* 인트론 7, *SRY*) 또는 2분 (*ZFX-ZFY* 엑손 7-10)으로 이어지는 증폭반응을 30회 반복한 후 72°C-10 분 최종신장하고, 이후 4°C에서 보관하였다. 증폭 산물은 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose 겔 상에서 전기영동한 후, UV 하에서 확인하고 사진촬영 하였다.

유전자 클로닝과 염기서열 분석

유전자 증폭산물에 대한 염기서열 결정을 위하여 DNA sequencing을 수행하였다. 정제된 *SRY*와 *ZFX*, *ZFY*에 대한 PCR 산물들은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)의 pCR2.0 vector에 연결한 후 대장균 OneShot Top10F' com-

Table 1. PCR Primers used for the amplification of *SRY* and *ZFX-ZFY* genes

Gene	Name	Nucleotide sequences ¹	Acc. No. ²
<i>ZFX-ZFY</i>	hZFe7F ^{3,4}	GCTGACCTTGGAGAAGATGAC	AF032867 and AF032365[20]
	hZFe8R ³	TGGCATGTGACCCACCATAAGC	
	hZFe10R ⁴	CGGTTTCAATTCCATCAGAAT	
<i>SRY</i>	haSRYF ³	TTGGTTAGCACAAACCACCA	AY785433[8]
	haSRYR ³	AGCATTTCCTACTGGTGTCC	

¹,nucleotide sequences are displayed from 5' to 3'.

²,used as the standard sequences for the designation of each primer.

³,used for molecular sex determination.

⁴,used for sequence determination of *ZFX* and *ZFY* genes.

petent 세포에 형질전환하였고, 재조합 plasmid는 Wizard Plus SV Minipreps (Promega, USA)로 회수하였다. 추출한 plasmid DNA를 주형으로 dye-termination 반응을 수행하였고 MegaBase 500 (Amersham Pharmacia, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 기존에 보고된 서열들 (Table 1)을 기준으로 엑손-인트론 경계를 확인하였고, 염기서열간 비교를 위한 다중정렬은 CLUSTAL W program[27]을 이용하였다. 본 연구에서 새롭게 결정한 멧토끼 ZFX-ZFY 서열들은 database에 등록하였다 (GenBank Accession EF110883-EF110886). 또한 인트론 7 상에서 반복서열의 존재는 CENSOR web program (<http://www.girinst.org/censor/>)으로 확인하였다.

결과 및 고찰

포유류의 성 분화 (sex differentiation)는 Y 염색체 특히, SRY 유전자에 의해 배아발생 중에 자성발생을 억제하면서 동시에 응성발생을 유도하는 일련의 과정이다. 유전자 전사를 조절하는 조절 단백질 중 하나인 ZF 유전자 중 X, Y 염색체에 상동인 ZFX-ZFY의 인트론 염기서열 상에서 전위인자 서열의 비대칭적 분포에 따른 길이의 차이를 나타내는 것으로도 알려져 있다.

ZFX-ZFY 염기서열에서 성별 이형성

멧토끼의 생식기에 대한 표현형 조사를 통해 암수가 결정된 시료 중 수컷 2 개체에서 ZFX와 ZFY 유전자 엑손 7의 3'

말단부에서 10의 5' 개시부에 이르는 영역에 대한 DNA 염기서열 분석을 수행하였다. 서열의 길이는 ZFX가 1,778-bp, ZFY는 1,613-bp이고, 이 중 인트론 7의 길이는 ZFX-ZFY에서 각각 538-bp, 233-bp로 확인되었다. 분석된 염기서열들 중에서 반복서열의 유무를 CENSOR 프로그램으로 확인한 결과 ZFX의 인트론 7에서 321-bp의 절편이 집토끼 (*O. cuniculus*)에서 보고된 CSINE2와 유사한 반복서열로 확인되었다[11]. Figure 1은 멧토끼 암·수 2개체에서 결정한 ZFX와 ZFY 유전자서열들을 다중 정렬하여 나타낸 것이다. 발견된 SINE-like 반복서열은 LcSINE으로 명명하였으며, BLAST 검색을 GenBank database 내의 서열과의 유사성을 검색한 결과 집토끼에서 보고된 유전체 서열상에서 방대하게 분포하고 있는 것으로 확인되었다 (data not shown).

기존의 보고에 따르면, 인간 유전체의 약 20% 이상이 근본적으로 전위인자 서열에서 파생하여 유래한 것으로 알려져 있다[24,17]. 이중 절반 정도는 long terminal repeat (LTR)이 없는 SINE 전위인자로 LTR를 갖는 LINE 전위인자의 활성화에 의해 전위활성을 나타낼 수 있는 것으로 보고되고 있다 [7,15]. 특히, X, Y 성염색체에 발견되는 전위인자의 경우, 성염색체의 비상동적인 진화과정에서 X, Y 염색체 사이에서 비대칭적으로 보존되어 특정 염색체에서는 삽입/결실되어 성염색체간 이형성을 증가시키는 요인이 되기도 한다. 최근 성연관 ZF 유전자 서열 내에서 비대칭적으로 존재하는 전위인자의 발견은 유전자 이형성을 이용한 성판별 표지인자로서 사람뿐만 아니라 소, 돼지, 말 등의 가축에서도 매우 유용하게 이용되고 있다[5,20,21].

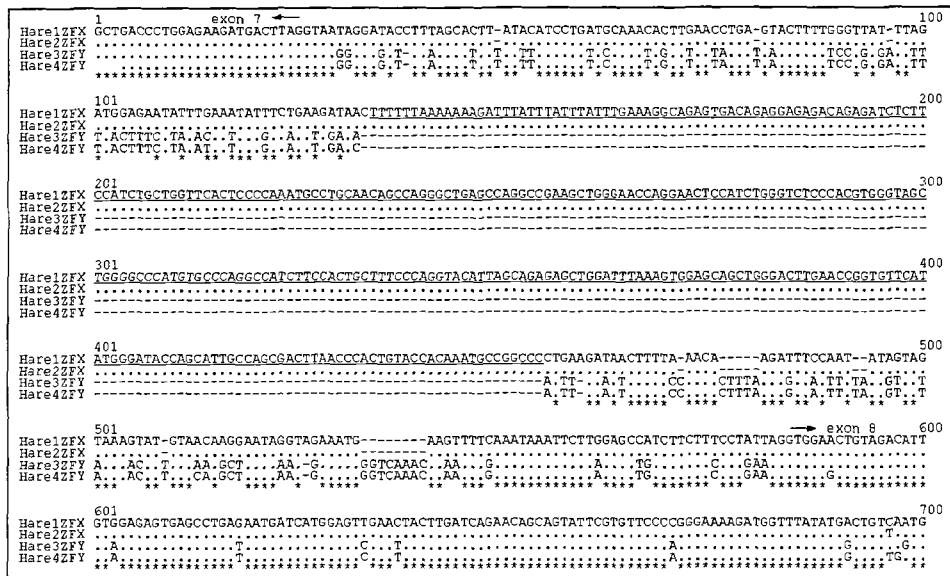


Fig. 1. Comparison between the sequences of intron 7 flanking region of ZFX and ZFY from hares. Arrows above sequences indicate the exon 7 and exon 8, respectively. Dashes and dots indicate the identical sequences and gaps, respectively. Underlined sequences indicate the LcSINE of short interspersed nuclear element (SINE)-like sequence similar to CSINE2 reported in the rabbit genome.

ZFX-ZFY 증폭 양상과 유전자 성판별

염기서열 결정에서 확인된 ZFX 인트론 7에서 LsSINE의 삽입/결실 형태를 이용하여, 수집된 전 개체에 대한 유전자 성판별을 시도하였다. 먼저 암수에 대한 표현형 정보를 알고 있는 시료에 대한 성판별 시험결과, 암수에서 ZFX와 ZFY 인트론 7을 포함한 절편에 대한 증폭양상이 서로 상이하게 관찰되었다 (Fig. 2a). 전기영동 겔 상에서 암컷은 단일 PCR 밴드 (695-bp)를, 수컷에서는 두 개의 PCR 밴드 (390-bp, 695-bp)를 보였다. 수컷에서 관찰되는 695-bp 밴드는 암컷의 것과 동일한 위치에서 확인되어, 결과적으로 이 밴드는 암수 공통인 X 염색체 ZF 유전자 즉, ZFX를 주형으로 증폭된 산물이며, 그에 반해 수컷에서만 특이적으로 발견되는 또 하나의 밴드는 Y 염색체의 ZFY 유전자를 주형으로 증폭된 것임을 알 수 있었다. 또한 수컷-특이적인 ZFY 밴드는 암수 공통인 ZFX 밴드에 비해 앞에서 언급한 LcSINE의 결실에 따라 더 작은 크기를 갖는 것으로 관찰되었다. 유전자 성판별에 대한 결과의 재확인과 궁극적으로 음성발생을 유도하는 핵심 유전자인 SRY의 존재를 확인하기 위해 PCR 증폭을 수행하였다. 그 결과 전기영동 겔 상에서 수컷에서는 PCR 산물이 관찰되나, 암컷은 PCR 산물이 관찰되지 않았다 (Fig. 2b). 또한 SRY와 ZFX-ZFY 증폭양상은 서로 일치하였고, 생식기관 관찰에 의한 표현형 자료들과도 정확히 일치하였다. 이상의 결과는 본 연구에서 이용한 시료들은 SRY와 ZFY 유전자가 Y 염색체 위에 완전히 연관되어 있어, SRY 유전자 전위에 의한 XX (+SRY) 음성 또는 XY (-SRY) 자성은 없는 것으로 판단된다[18,27,28].

최근 집토끼 SRY 유전자의 단백질 암호화 영역과 5', 3'-비해독부위의 서열의 변이가 품종 간 특이성이 없다는 것으로 보고되었고[8], 이후 SRY의 3' 비해독부위 상의 7-bp 삽입이 *O. algirus* 종에서만 빈번하고 집토끼에서는 관찰되지 않는다고 보고되었으나[9], 현재까지 유전자 성판별 기법은 멧토끼뿐만 아니라 집토끼에 대한 보고마저도 없다. 본 연구에서는 X, Y 성염색체 상동인 ZFX-ZFY 유전자 서열 사이에서

성별 이형성을 발견하였고, 이를 이용하여 멧토끼 사체에 대한 유전자 성판별을 수행하여 멧토끼의 사체에 대한 유전자 성판별에 따른 성별 자료를 얻어낼 수 있었다. PCR에 의한 유전자 성판별은 미량의 DNA라도 확보 가능하다면, PCR 증폭과 전기영동으로 이어지는 간단한 분석을 통해 거의 정확한 성판별 자료를 얻어낼 수 있어 밀렵이나 불법 포획된 멧토끼의 암수 판별에 활용할 수 있을 것이다. 야생동물 사체에 대한 성비조사는 야생집단의 변화추이를 확인할 수 있어 야생동물의 보존과 체계적인 관리를 위해 좋은 자료가 될 수 있다. 향후, 집토끼를 대상으로 암수 성판별 가능성의 확인, 포획이나 사고, 자연사에 의해 죽은 멧토끼를 다른 포유류와 구분할 수 있는 유전자 식별 기법 등을 보완한다면, 사체에 대한 정확한 종 동정과 더불어 암수 판별을 가능하게 할 수 있는 분석 체계가 구축될 수 있을 것으로 사료되며, 구축된 집토끼의 산업적 이용에서도 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

우리나라에 분포하는 멧토끼 (*Lepus coreanus*)의 성판별을 위한 분자 표지자를 개발하기 위하여, X, Y 염색체간 상동인 ZFX와 ZFY 유전자들의 성별 이형성에 초점을 맞추어 본 연구를 수행하였다. ZFX와 ZFY 유전자의 인트론 7 영역은 멧토끼의 암수가 구분되는 증폭 양상을 나타내었다. 인트론 7의 길이는 각각 ZFX에서 538, ZFY에서 233-bp로 확인되었다. 특히, ZFX의 인트론 7에서는 RNA-매개성 전위인자 중 한 종이며 토끼의 유전체에서 빈번하게 관찰되는 CSINE2와 유사한 반복서열이 발견되었다. 반면, 반복서열은 ZFY의 인트론 7에서는 관찰되지 않았다. ZFX와 ZFY 유전자의 인트론 7에서 확인된 길이의 차이에 근거하여 중합효소연쇄반응 기법을 이용한 유전자 성판별을 수행하였다. 시험에 이용된 모든 DNA 시료들은 ZFX에서 증폭된 공통의 밴드를 가지고 있었다. 이에 반해, 멧토끼 수컷 DNA들은 각각 ZFX와 ZFY에서 증폭된 두 개의 구분되는 밴드들을 나타내었다. ZFX-ZFY 유전자 성판별 결과는 표현형 성별 정보뿐만 아니라 수컷-특이적인 SRY 유전자의 증폭양상과도 일치한 결과와도 정확히 일치하였다. 이상의 결과들은 멧토끼에서 ZFX와 ZFY의 인트론 7 영역간의 성별 이형성은 유전자 성판별을 위한 유용한 유전자 표지자가 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Anderson, G. B. 1987. Identification of embryonic sex detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 27, 81-97.
2. Barr, M. L. 1960. Sexual dimorphism interphase nuclei. *Am. J. Hum. Genet.* 12, 118-127.
3. Bello, N. and A. Sanchez. 1999. The identification of a

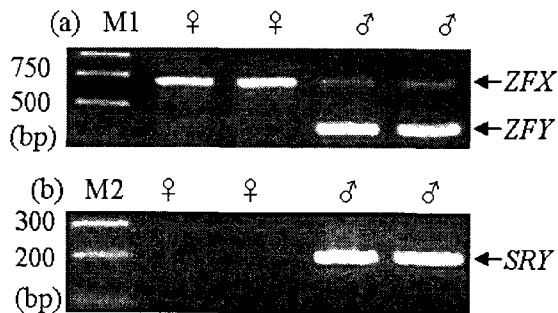


Fig. 2. PCR amplification patterns of the intron 7 flanking region of ZFX-ZFY genes (a) and SRY (b) in Korean hares. M1 and M2 are DNA size markers, 1-kb DNA Ladder and 100-bp DNA Ladder, respectively.

- sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Mol. Ecol.* **8**, 667-669.
4. Birren, B., E. D. Green, S. Klapholz, R. M. Myers and J. Roskams. 1997. *Genome analysis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
 5. Cho, I. C., S. Y. Kang, S. S. Lee, Y. L. Choi, M. S. Ko, M. Y. Oh and S. H. Han. 2005. Molecular sexing using SRY and ZF genes in pigs. *Korean J. Anim. Sci. Technol.* **47**, 317-324.
 6. Gardner, R. L. and R. G. Edwards. 1968. Control of the sex ratio at full term in rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature* **218**, 346-349.
 7. Gentles, A. J., O. Kohany and J. Jurka. 2005. Evolutionary diversity and potential recombinogenic role of integration targets of Non-LTR retrotransposons. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 1983-1991.
 8. Geraldes, A., C. Rogel-Gaillard and N. Ferrand. 2005. High levels of nucleotide diversity in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) SRY gene. *Anim. Genet.* **36**, 349-351.
 9. Geraldes, A. and N. Ferrand. 2006. A 7-bp insertion in the 3' untranslated region suggests the duplication and concerted evolution of the rabbit SRY gene. *Genet. Sel. Evol.* **38**, 313-320.
 10. Horng, Y. M. and M. C. Huang. 2003. Male-specific DNA sequences in pigs. *Theriogenology* **59**, 841-848.
 11. Jurka, J. 2006. CSINE2: A large family of SINE elements from rabbit. *Rebase Reports* **6**, 208.
 12. Kim Y. K. 1994. A comparison of nutrient digestibility by wild Korean mountain hares (*Lepus sinensis coreanus*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Korean J. Anim. Sci. Technol.* **36**, 397-402.
 13. King, W. A., T. Linares, I. Gustavesson and A. A. Bane. 1979. A method for preparation of chromosome from bovine zygotes and blastocytes. *Vet. Sci. Commun.* **3**, 51-56.
 14. Koh, H. S., T. Y. Chun, H. S. Yoo, Y. Zhang, J. Wang, M. Zhang and C. Wu. 2001. Mitochondrial cytochrome b gene sequence diversity in the Korean hare, *Lepus coreanus* Thomas (Mammalia, Lagomorpha). *Biochem. Genet.* **39**, 417-429.
 15. Lander, E. S., L. M. Linton and B. Birren. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
 16. McCarty, A. S., G. Kleiger, D. Eisenberg and S. T. Smale. 2003. Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol. Cell* **11**, 459-470.
 17. Medstrand, P., L. N. van de Lagemaat and D. L. Mager. 2002. Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genome Res.* **12**, 1483-1495.
 18. Melniczek, J. R., D. Dambach, U. Prociuk, P. F. Jezyk, P. S. Henthorn, D. F. Patterson and U. Giger. 1999. Sry-negative XX sex reversal in a family of Norwegian Elkhounds. *J. Vet. Intern. Med.* **13**, 564-569.
 19. Nagai, K. 2001. Molecular evolution of Sry and Sox gene. *Gene* **270**, 161-169.
 20. Poloumienko, A. 2004. Cloning and comparative analysis of the bovine, porcine, and equine sex chromosome genes ZFX and ZFY. *Genome* **47**, 74-83.
 21. Pomp, D., B. A. Good, R. D. Geisert, C. J. Corbin and A. J. Conley. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J. Anim. Sci.* **73**, 1408-1415.
 22. Quilter, C. R., S. C. Blott, A. J. Mileham, N. A. Affara, C. A. Sargent and D. K. Griffin. 2002. A mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome genes. *Mamm. Genome* **13**, 588-594.
 23. Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. -M. Frischauf, R. Lovell-Badge and P. N. Goodfellow. 1990. A gene from the human sex-determining region Y encodes a protein with a homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244.
 24. Smit, A. F. 1996. The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 657-663.
 25. Staessen, C., E. van Assche, H. Joris, M. Bonduelle, M. Vandervorst, I. Liebaers and A. van Steirteghem. 1999. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 382-389.
 26. Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
 27. Tomomasa, H., Y. Adachi, M. Iwabuchi, Y. Tohyama, M. Yotsukura, S. Oshio, T. Yazaki, T. Umeda, T. Takano, Y. Yamanouchi and Y. Nakahori. 1999. XX-male syndrome bearing the sex-determining region Y. *Arch. Androl.* **42**, 89-96.
 28. Zenteno, J. C., S. Carranza-Lira, A. L. Jimenez and S. Kofman, 2003. A de novo phe67leu mutation in the SRY gene in a patient with complete 46,XY gonadal dysgenesis. *J. Endocrinol. Invest.* **26**, 1117-1119.