

## PCR 기법에 의한 소 Freemartin의 판정에 관한 연구

오성중 · 김태현 · 윤두학 · 전익수 · 양보석 · 임경순\* · 박용운  
축산기술연구소

### Detection of Bovine Freemartinism by the Polymerase Chain Reaction

S. J. Oh, T. H. Kim, D. H. Yoon, B. S. Yang, I. S. Jeon, K. S. Im\* and Y. Y. Park

National Livestock Research Institute

#### SUMMARY

This study was conducted to detect the Y-specific DNA in the blood of the female calf in bovine heterosexual production. Genomic DNAs of the freemartin were isolated from the blood and amplified with Y-chromosome specific DNA primer(141bp). In order to estimate the lower limit for the detection of XY cells, blood from a bull was diluted in cow blood to 0.01%. DNA sequencing on the PCR products was shown the same sequences as Y chromosome DNA of the normal cows. The Y specific DNA band by PCR was detected all blood of female calf suspected to have bovine freemartin syndrom and the karyotyping with freemartin blood was identified as XX / XY chimerism. Therefore, the PCR methods used in this study was very useful technique for the detection of freemartin in Hanwoo and Holstein.

(Key words : PCR, freemartin, Y-specific DNA)

#### 서 론

암소에 있어서 불임은 여러 가지 원인에 의해서 선천적 혹은 후천적으로 발생하지만 그중 암수 쌍자생산시 암송아지의 약 92%정도는 계속해서 번식이 불가능한 번식 불능을 나타내는 Freemartin이 된다(Marcum, 1974). 프리마틴은 이성 쌍자 임신시 수정 후 49~52일 사이에 수송아지의 울프관에 의해 생성되는 호르몬에 의해 암송아지의 번식기관이 발생 기원인 뿔기관이 정상 발달되지 못하고 퇴화되기 시작한다고 하였고 이는 암수 송아지의 양막의 융합과 vascular anastomosis가 되었기 때문으로 추측하였다(Jost 등, 1972).

소의 freemartin syndrome은 외음부의 모양, 질의 길이 등에 의해 검사법(Miyake 등, 1980)도 있으나 정확도가 떨어져 주로 염색체 검사에 의존하여 왔는데 소(Ohno 등, 1962, Fecheimer 등, 1963), 닭(Moore와 Owen, 1965), 말(Bouters와 Vandeplassche, 1970), 돼지(Mcfee 등, 1966) 그리고 드물게 사람에서도 보고된 바 있다(Uchida, 1990). 소의 프리마틴은 이성 쌍자가 공유하는 혈류 때문에 Choriovascular anastomoses로 발전되고 따라서 혈액 중의 성염색체 중 XX/XY염색체의 비율이 20~80%이고 드물게는 1% 미만인 경우도 있어 염색체 분석에 의한 freemartin의 판정에 어려움을 나타내고 있다. Eldridge 와 Blazak 등(1976)은 freemartin에서 XY cell이 1% 미만일 경우 50

\* 서울대학교 농업생명대학(College of Agriculture and Life Science, Seoul National University)

개의 혈액세포 중 40%만이 XY세포가 발견된다고 하여 소의 프리마틴 판정에는 성염색체 검사시 정확성이 떨어질 수 있다고 하였다. 三宅陽 등(1981)은 35쌍의 이성쌍자 중 염색체 검사로 28두는 XX/XY chimerism은 확인되었으나 7두에서는 검사되지 못하였다고 하였다. Miyake 등(1982)은 프리마틴 암소의 염색체 분석 결과 XY의 비율이 58%였고 그 중에서도 약 4%는 정상적으로 번식이 가능하였다고 하였다. 그러나 Fujishiro 등(1995)은 PCR기법에 의해 수소의 혈액 비율이 0.1%까지도 판정이 가능함을 보고하였고 지금까지 Marcum (1974)에 의해 프리마틴의 한 종류로 분류되었던 것들을 다시 5가지로 분류하였다.

최근에는 이성쌍자의 암소 혈액에서 핵을 분리하여 Y염색체 특이 primer로 쉽게 프리마틴을 진단하였고 특히 염색체 분석시 XY세포의 비율이 0.1%수준까지 판정하는 방법을 개발하였다(Olsaker 등, 1993).

이와 같이 소의 이성쌍자의 프리마틴 검정은 주로 임상학적인 진단과 염색체 분석에 의한 방법이 보편적으로 수행되어 오고 있으나 보다 정확하고 빠른 판정을 위해서 Y-염색체 특이적 DNA만을 증폭시켜 XY 세포의 농도가 낮아도 혈액중 Y특이적 DNA 증폭을 통한 PCR기법에 의한 소 프리마틴을 정확히 판정해 낼 수 있는 방법을 한우와 젓소를 이용 구명하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 동물

수정란이식 혹은 인공수정에 의해 생산된 한우 혹은 젓소의 이성쌍자 15쌍 중 프리마틴으로 추정되는 암송아지의 15두에서 혈액 20ml를 채혈하였다. 프리마틴으로 추정되는 암송아지는 직장 검사 혹은 유리봉을 이용하여 자궁의 길이가 작거나 발달이 안된 것을 확인하였고 일부는 자궁이나 질의 정상인 이성쌍자의 암송아지에서의 혈액을 채혈 이용하였다.

### 2. 암·수소 혈액의 회석 및 DNA 추출

한우 암소 혈액 대비 수소의 혈액의 50, 40, 30,

20, 10, 5, 1.0, 0.5, 0.1, 0.01%까지 혼합하였고 그 중 500 $\mu$ l를 취하여 Split Second™ DNA kit(BM, 독일)을 이용 DNA를 추출하여 PCR에 공시하였다.

### 3. Oligonucleotide Y-specific DNA primer 제조 및 PCR

소의 Y-specific DNA primer는 BOV97M인 5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT-3'과 5'-GGC TAT GCT AAC ACA AAT TCT-3' 그리고 Bovine specific DNA primer는 5'-TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT-3'과 5'-TCG TCA GAA ACC GCA CAC TG-3'을 제조 사용하였다.

혈액 중 Y-염색체 특이적 DNA를 증폭시키기 위하여 합성된 소 Y-specific DNA primer는 Thermocyclers(Single Block System, 미국)를 사용하여 증폭하였다. 0.5ml의 eppendorf tube(reaction tube)에 10 $\times$  buffer 5 $\mu$ l, 1.25mM dNTP 8 $\mu$ l, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ l, genomic DNA 100 ng 그리고 합성한 primer를 100 pmole 그리고 2.5 unit의 Taq DNA polymerase(Promega, 미국)을 넣고 멸균 증류수로 50 $\mu$ l가 되게 채운 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에 30초로 30 cycles 증폭시켰다. PCR로 증폭된 프리마틴의 DNA는 2%의 agarose gel에서 전기영동후 Y 특이 DNA 단편을 판정하였다.

### 4. Y chromosome specific DNA primer의 PCR 산물의 sequencing

PCR산물을 pCR™ vector(Invitrogene Co.)에 cloning한 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환시킨 후 positive colony를 선발하였다. 선발된 colony(recombinant plasmid)를 LB 액상배지에서 배양하여 Alkaline 방법으로 재조합 plasmid DNA를 분리하고 13% PEG로 정제하여 template DNA를 준비하였다. Sequencing은 dideoxy chain termination법(Sanger 등, 1977)으로 DNA를 합성한 후 8% polyacrylamide gel에서 전기영동을 하였고 X-ray film에 autoradiography하여 염기서열을 분석하였다.

## 5. 백혈구 배양에 의한 염색체 분석

PCR 기법에 의해 프리마틴으로 판정된 암송아지에서 XX/XY의 세포를 확인하기 위하여 10ml의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 1,550rpm으로 원심 분리하여 적혈구층위의 buffy coat만 분리하였다. 분리된 buffy coat는 20% FBS, 2% Pokeweed mitogen(Gibco Chemical Co., U.S.A.) 1% heparin(중외제약, 한국), 100IU penicillin/ml(Sigma Chemical Co., U.S.A.)이 첨가된 15ml의 RPMI-1640 배양액(Gibco Chemical Co., U.S.A.)에 넣고 38.5℃에서 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 0.1% colchicine 0.15ml을 첨가하여 증기상을 유도한 뒤 1,000rpm에서 10분간 원심분리 후 0.3% sodium citrate(Sigma Chemical Co., U.S.A.)와 FBS가 3:1이 되도록 혼합한 저장 용액으로 20분간 저장처리시켰다. 저장처리 후 methanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 고정 용액으로 5℃에서 최소 30분 이상 1차 고정시킨 다음 1,000rpm에서 10분간 원심 분리한 후 부유액을 버리고 동일한 고정 용액을 다시 투여하여 2차 고정시켰다. 2차 고정 후 동일한 과정을 2회 더 반복한 다음 5℃의 증류수에 보관된 slide glass(Corning, U.S.A.)에 준비된 용액 3~4방울을 떨어뜨려 도말시킨 다음 자연 건조시켰다. 완전히 건조된 slide를 4% Giemsa(Merk Chemical Co., German)용액으로 7~8분간 염색한 후 광학현미경(BX-50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

1. Y chromosome specific DNA primer의 PCR products에 대한 DNA sequencing

5'-GAT CAC TAT ACA TAC ACC ACT CTC ATC CTA CCT AAT AGA  
TTC CAG CTG ATA ATT TGC AAC TAT ACT CCA AAG TTT TGT  
GGA AAT GTG AAA GAA AAT CAT TCA GCT CAT CTG TTT CAG  
AGA CAG AAT TTG TGT TAG CAT AGC CAA GCC GAA-3'

Fig. 1. DNA sequences of Y chromosome specific DNA primer amplified by PCR. The single underlined sequences indicated the sequence of the primers used for PCR.

본 연구에서 제조한 소 Y 염색체 특이적 DNA primer가 소의 이성쌍자의 프리마틴인 암송아지에서도 정확히 Y 염색체상의 DNA를 증폭시키는지를 알기 위하여 PCR 산물을 가지고 sequencing한 결과는 Fig. 1과 같다.

본 연구에서 제조한 Y 염색체 특이적 primer는 프리마틴 암송아지의 혈액 DNA의 PCR 산물에서 똑같이 증폭되고 있으며 그 이후의 염기 배열까지도 확인할 수 있어 정상 수소의 Y 염색체 특이적 primer로서 정확히 Y-염색체 특이적 DNA에 반복적 non-functional repeated gene이 증폭되어 소의 freemartin 검정뿐만 아니라 수정란의 성판별에도 유용할 것으로 사료된다.

## 2. 수소의 혈액 희석 비율에 따른 Y-band 검출

소의 freemartin의 혈액내 XY의 비율은 개체에 따라 다르고 염색체 검사시 XY세포의 비율이 낮을 경우 freemartin의 판정이 쉽지 않을 뿐만 아니라 오판이 날 수 있으므로 freemartin의 혈액내 XY 세포 비율을 인위적으로 달리하여 PCR한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 암소의 혈액 대비 수소의 혈액을 Lane 0.01%, Lane 2는 0.05%, Lane 3은 0.1%, Lane 4는 1%, Lane 5는 5%로 희석하고 DNA를 분리 PCR한 결과이다. 암소 혈액 대비 수소의 혈액이 0.1%까지는 물론 0.01% 즉 X-chromosome cell 대비 1/10,000개의 Y-chromosome cell만 있어도 정확히 프리마틴 여부가 판정되었다. 따라서 염색체 검사에 의한 freemartin 암소에서 XY cell이 1% 미만일 경우 50개의 혈액세포중 40%만이 XY세포가 발견된다고 하여 소의 프리마틴 판정에는 성염색체 검사시 정확성이 떨어질 수 있다고 한 Eldridge와 Blazak 등(1976)이 보고의 문제점을

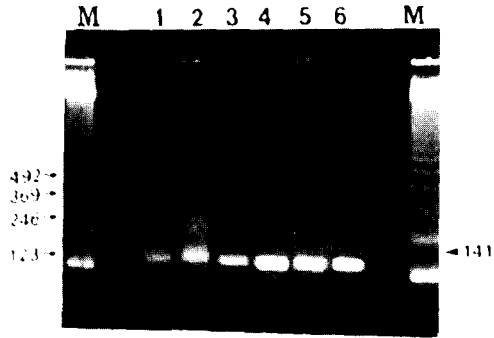


Fig. 2. Dilution of blood from Hanwoo bull in cow blood.

The percentage of bull blood in the samples of cow's blood was 0.01%(Lane 1), 0.05%(Lane 2), 0.1% (Lane 3), 0.5%(Lane 4), 1.0%(Lane 5) and 5.0%(Lane 6)

완전히 해결할 수 있으며, Schellander 등(1992)이 인위적 암수 chimera에서 0.1%까지 PCR기법으로 freemartin의 판정을 얻을 수 있다고 한 보고보다 본 연구에서는 그 10배 이상 Y 염색체 비율이 적은 경우도 Y 특이 DNA를 검출해 낼 수 있는 정확한 방법이었다. 따라서 본 연구의 방법을 활용한다면 모든 freemartin을 조기에 정확히 검진할 수 있다고

사료된다.

### 3. 이성쌍자의 암송아지에서의 Y-band검출

이성쌍자의 암송아지에서 추출한 DNA로부터 Y-specific DNA primer를 사용하여 PCR한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 이성쌍자의 모든 프리 마틴 암송아지(Lane 1, 3, 5, 7, 9)는 수소 특이적 (141bp) 그리고 암수 특이적 DNA band(216bp)를 나타내고 있어 XX/XY 세포를 갖고 있는 chim-

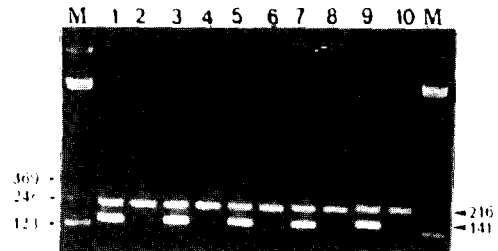


Fig. 3. Detection of the specific base pairs for the Bovine- and Y-chromosome specific DNA in Hanwoo freemartin DNA.

M : DNA size marker ( 123 Ladder)

Lane 1, 3, 5, 7, and 9 : Freemartin

Lane 2, 4, 6, 8, and 10 : Normal female

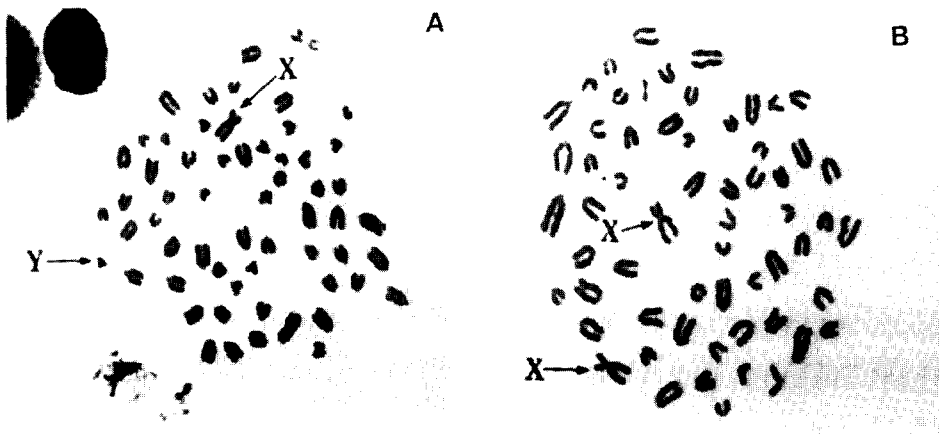


Fig. 4. Metaphase spreads of the male(A) and female(B).

erism을 보였으며 이러한 양상을 보인 프리마틴 암송아지의 백혈구 배양에 의해 얻어진 염색체 분석 결과 Fig. 4와 같이 숫컷과 암컷의 염색체 증기상을 나타내었다. 반면, 정상 암소에서는 소 특이적인 DNA products(216bp)만이 검출되어 쉽게 프리마틴 여부를 판정할 수 있었다. 이는 Olsaker 등(1993)이 보고한 소 프리마틴의 혈액 DNA를 증폭시켜 Y-chromosome DNA 단편을 검진하는 방법과 본 연구의 결과가 일치하였고 Plante 등(1991)의 결과와도 같은 결과로 경향이었다. Marcum(1974)은 소의 모든 프리마틴은 XX/XY의 chimerism 이라는 본 연구의 Y-염색체 DNA의 증폭 검출 결과와는 일치되는 연구 결과를 나타냈다.

## 적 요

이성쌍자 암소의 프리마틴 여부를 조기에 판정하기 위하여 한우 9두 및 젃소 6두의 혈액에서 DNA를 추출하였고 Y-specific DNA primer를 이용 PCR 기법에 의해 암소 혈액내 XX/XY chimerism을 여부를 판정하였으며 얻어진 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 프리마틴 혈액 DNA 중 Y-염색체 특이적 DNA를 증폭한 PCR products의 DNA를 sequencing결과 프리마틴 암소에서도 정확히 Y-specific DNA를 증폭한다는 것을 확인하였다.
2. 한우 암소 혈액 대비 수소의 혈액의 5.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.01%까지 혼합되었을 경우도 정확히 Y-specific DNA band가 검출됨을 확인하였다.
3. 한우 및 젃소의 이성쌍자의 암송아지의 혈액 DNA에서 모두 216bp와 141bp의 PCR 산물이 전기영동시 검출되었다.
4. 프리마틴의 혈액을 배양한 바 XX/XY 염색체가 검출되었다

## 참고문헌

Bouters R and Vandeplassche M. 1970. Equine heterosexual chomeric twins: anatomical and chromosomal findings.

Eldridge FE and Blazak WF. 1976. Chromosomal analysis of fertile female heterosexual twins in cattle. *J. Dairy Sci.* 60:458-463.

Fechheimer NS, Herschler MS and Gilmore LO. 1963. Sex chromosomes mosaicism in unlike sexed cattle twins. *Proceedings of the 11th Int'l Congress of Genetics.* 1:265.

Jost A, Vigier B and Prepin J. 1972. Freemartin in cattle. The first steps of sexual organogenesis. *J. Reprod. Fert.* 29:349.

Marcum JB. 1974. The freemartin syndrome. *Anim. Breed Abstr.* 42:227-242.

McFee AF, Knight M and Banner MW. 1966. An intersex pig with XX/XY leucocyte mosaicism. *Canadian J. Genetics and Cytology.* 8:502-503.

Miyake YI, Ishikawa T and Kawata K. 1980. The relationship between sex chromosomal chimerism and vaginal length in bovine heterosexual twin females. *Jpn J. Anim. Reprod.* 26:69-73.

Miyake YI, Ishikawa T, Yoshia M, Abe T and Komatsu M. 1982. An additional case of fertile bovine heterosexual twin femae with sex-chromosomal chimerism(XX/XY). *Jpn J. Anim. Reprod.* 28:105-108.

Moore MAS and Owen JJT. 1965. Bovine freemartins and true hemaphroditism. *Lancet.* 1:1163-1165.

Ohno S, Trujillo JM, Stenius C, Christian LC and Teplitz RL. 1962. Possible germ cell chimeras among newborn dizygotic twin calves(*Bos taurus*). *Cytogenetics* 1:258-265.

Olsaker I, Jorgensen CB, Hellemann AL, Thomsen PD and Lie O. 1993. A fast and highly sensitive method for detecting freemartinism in bovine twins using immunomagnetic beads and Y-specific PCR. *Anim. Genetics.* 24:311-313.

Plante Y, Schmutz SM, Lang KDM and Moker JS. 1991. Detection of leucochimaerism in

- bovine twins by DNA fingerprinting.23:295-302
- Schillander K, Peli J, Taha TA, Kopp E and Mayr B. 1992. Diagnosis of bovine freemartinism by polymerase chain reaction. 23:549-551
- Uchida IA. 1990. Twinning in spontaneouse abortions and developmental abnormalities. Issues and Reviews in Teratology. 5:155-180
- 三宅陽一, 井上忠如, 石川 恒, 河田啓一郎, 沼田芳明, 小谷忠生, 三宅 勝, 武石昌敬, 常包 正, 三好憲一-乳牛の異性3,4および5児の多胎10組よ性染色体キメラに関する研究. 日本の家畜繁殖誌. 27:80-85.