

염색체 미세절단과 형광 접합법을 이용한 소 성염색체 library의 개발

이 종 호

서울대학교 농업생명과학대학 가축번식실험실

이식 전 수정란의 성판정은 많은 축산인의 소망이었다. 많은 방법이 제기되었지만, 세포유전학적 분석방법은 ET의 상용화에 거의 무의미할 정도로 한계가 많았고, 이후 개발된 음성 특이적 항원이나 X-염색체에서 발현되는 효소의 활동을 통한 성판정 방법은 흥미롭기는 하나 산업적 적용에 제약이 많았다. 80년대 중반 Y-염색체 특이적인 DNA 탐침자의 개발과 PCR을 통한 DNA 증폭기술의 개발은 수정란 성판정을 획기적으로 개선시켰다. DNA기술을 통한 수정란의 성판정은 분자생물학을 현장으로 진출시킨 첫 경우이기도 했다. 90년대에 세포유전학적 분석에서 FISH가 소개되었으며, 염색체 특이적 library는 다른 기초적이고 응용세포유전학적 연구에 유용한 도구가 되었다.

최근에는 사람에서는 착상전 수정란의 성판별 및 유전진단을 위해 실시되고 있는 형광직접접합법(fluorescent in situ hybridization; FISH)은 효소적 유전자 증폭(polymerase chain reaction; PCR)에 비해 높은 민감도와 정확성을 보이고 있으나 hybridization 및 washing 과정에 매우 긴 시간이 소요되고, 절차도 까다로워 현장에서의 적용이 용이치 않았다. 그러나 direct labelled probe의 이용, heat programmable instrument의 개발, denaturing chemical의 사용배제 등을 통해 소요시간 및 절차의 대폭적인 간소화를 이루어 현장의 적용 가능성을 한층 높이고 있다.

현재 사람의 세포유전학 및 종양학에서는 FISH의 다양한 기술이 많이 이용하고 있으나 소에서는 탐침자(probe)가 개발되어 있지 않아 그 이용이 미미하다. 본 연구는 FISH를 이용하기 위한 탐침자의 개발을 궁극적인 목표로 삼았으며, 이를 위해 접근이 용이한 방식을 개발하여 기존의 방식과는 다른 소 배아세포의 성을 판별 할 수 있는 접근방법을 소개 하고자한다.

1. FISH를 이용한 소 Y-염색체상의 반복서열 검색

가축번식학 분야의 중심과제는 단연 수정란의 성판정인데, 염색체분석법(King, 1984), 음성 특이적 항원의 검출(Wachte, 1984), X-염색체 관련 효소의 활성 검사(Monk 와 Handyside, 1988), Y-염색체 특이적 탐침자의 접합(Bondioli 등, 1989)등을 이용한 방법 등이 시도되었다.

최근에 와서 사람과 소에 대한 직접 접합법을 이용하여 Y-염색체를 갖고 있는 정자를 검출하기 위해 Y-염색체 특이적 절편에 대한 DNA 탐침자를 사용하였다(Cartwright 등, 1993). 또한 Y-염색체 특이적 반복서열은 사람에 있어 PCR방법을 이용하여 수정란의 성판정에도 이용되었다(Handyside 등, 1990). 소는 Peura 등(1991)이 연구하였다. Y-염색체 상에는 많은 수의 clones이 있기에 Y-염색체 특이적 서열의 검출은 상당히 효과적이다(Kunuienda 등, 1992). 최근 보고에 따르면 PCR을 이용한 IVF 소 수정란의 성판정은 Y-염색체 특이적 반복서열의 증폭 때문에 상당히 중요하다고 한다(Bredbacka 등, 1996). 그러나 PCR을 이용한 성판정에 있어 중요한 문제점은 같은 기원의 할구간의 편차와 증폭 실패, 오염 등에 있다(Munne 등, 1994).

따라서, 본 연구의 목적은 PCR을 통해 제작한 소 음성 특이적 DNA 탐침자를 이용한 FISH를 통해 소 수정란의 성판정을 하는데 있다. 이를 통해 임파구와 할구의 Y-염색체를 동시에 검출하고 소 염색체, 정자와 수정란의 성판정에 대한 좀더 빠르고 민감한 FISH 방법을 개발하는 방법을 소개하고자한다.

2. 미세절단법과 형광직접접합법을 이용한 소 성 염색체의 물리적 지도작성

염색체의 구조와 기능을 이해하기 위한 "human genome project(인체게놈 연구사업)"가 한창 진행중이다. 그 일환으로 본 연구에서는 소 성염색체의 지도작성 및 탐침자의 개발을 연구하였다. 특히 성염색체는 X-염색체 불활성화, X-관련 유전자, 성 결정, 정자형성 및 관련된 수개의 유전자를 포함할 뿐 아니라 종의 유지 및 번성에 필수적이다. Quantitative trait loci(QTLs ;경제형질)를 구별하기 위한 전제조건은 게놈에 대한 포괄범위를 확장할 수 있는 충분한 informative marker로 구성된 유전지도이다. 이는 cloned DNA로부터 무작위

로 합성되었다. 최근 소 유전자의 물리적 지도는 1652개의 유전자위와 1138의 다형성 지시자, 142개의 탐침자, 1755개의 primers로 구성되었다 (Bovmap Db:INRA, 1997). 이 지도는 QTLs를 함유한 거대한 염색체 지역을 구별하기에 충분하나 QTL의 정교한 지도작성이나 소 품종간 marker- assisted selection에는 적합하지 않다. 최근 개발된 지시자들도 계놈의 특정 지역의 지시자 밀도를 높이기에는 역부족이다.

Meltzer 등(1992)은 DOP-PCR과 GTG-banded된 염색체의 물리적 절단 방법 및 탐침자로서 PCR의 산물을 이용하는 Micro-FISH방법 (미세-형광접합법)을 소개하고 있다. 비록 FISH가 사람의 세포유전학이나 암 생물학의 영역에서 매우 광범위하게 사용되고 있다고는 하나 소에 있어서는 그 사용이 매우 제한적이다. 따라서 소 성염색체 탐침자 제작 및 염색체 특이적 library를 연구에 효과적이고 빠른 개발은 매우 중요하다고 하겠다.

Micro-FISH 절차는 미세절단한 염색체 절편을 직접 효소적 증폭하여 형광 직접법으로 확인하는 일련의 과정을 포함한다. Ponce De Leon FA 등(1996)은 Xp 대한 소 염색체 탐침자를 연구하여 submetacentric bovine X chromosome 과 acrocentric sheep and goat X chromosomes간 단편의 동질성을 연구하였다. Goldammer 등(1997)은 Bos taurus (BTA Y)와 B.indicus(BIN Y)의 Y 염색체를 미세절단한 후 DOP- primer로 PCR증폭하고 cloning하였다.

우리는 Micro-FISH를 이용하여 소 성염색체 Xp와 Y(Couple) 특이적 DNA 탐침자를 미세절단과 DOP-PCR 증폭 및 그들간의 접합을 통해 제작하여 중기 염색체에서 Xp와 Y내의 미세절단 부위를 확인하였다. 이 과정에서 미세절단하고 증폭시킨 소 염색체 절편은 FISH후 염색체 상에서 정확히 그들의 대상 지역에 재 접합하였고, 이것은 고농도의 소 성염색체 절편 특이적 DNA sequence임이 입증되었다. 또한 Micro-FISH은 물리적 지도작성을 위한 band 특이적 libraries를 제작하는데 확실한 방법이었다. 따라서, 본 Micro-FISH를 이용한 연구는 이 염색체의 QTL분석을 확장할 수 있는 physical mapping의 기초자료를 얻고, 소 성염색체의 포괄적 지도를 제공할 것이다. 또한 성염색체 탐침자는 FISH를 이용한 IVF 소 수정란의 성 판별에 적용이 가능하리라 사료된다.