

SRY와 Amelogenin gene의 증폭에 의한 말의 성(sex) 결정 예

조길재* · 이선영 · 양영진

한국마사회 유전자검사실

(계재승인: 2004년 12월 22일)

A case of sex determination by amplification of SRY and Amelogenin gene in horse

Gil-jae Cho*, Sun-young Lee, Young-jin Yang

Laboratory of Equine Genetics, Korea Racing Association, Gwachon 427-711, Korea

(Accepted: December 22, 2004)

Abstract : The objective of present study was to ascertain sex determination for individual identification, parentage control, and sex chromosome anomalies in horse. PCR amplification products of the equine sex determining region of the Y chromosome gene (SRY) and amelogenin gene (AMEL) were detected by using agarose gel electrophoresis. A normal sire and foal II showed 1 SRY band (430 bp) and 3 AMEL (AMELX, AMELY, and AMELX/Y) band, 175 bp, 160 bp, 190 bp, respectively, and a normal dam and foal I showed a single AMELX band (175 bp). These results enables a quick diagnosis for sex determination prior to cytogenetic analysis.

Key words : Amelogenin, chromosome, equine sex determination, SRY

서 론

국내에서 태어난 더러브렛 망아지 혹은 번식을 목적으로 수입된 씨말을 경주용 내지 번식용으로 활용하기 위해서는 사람의 출생신고와 유사한 등록과정을 반드시 거쳐야 한다. 말의 등록, 즉 혈통서(Stud book)는 번식용으로 활용되는 더러브렛의 모든 번식·생산 기록을 국제적인 기준에 따라 정리 수록한 책으로 통상 4년마다 정기적으로 발행되며 더러브렛은 바로 이 혈통서를 통해 국제적으로 공인되고 있다.

말의 혈통등록은 등록기관에서 등록대상말로부터 시료를 채취하여 의뢰서와 함께 감정기관으로 송부하면 감정기관에서는 유전자형 감정 혹은 혈액형 감정을 통해 친자판정을 행한 후 그 결과를 등록기관에 통보하게 된다. 말을 포함한 동물의 친자감정은 부모로부터 반반씩 물려받는 대립유전자를 대상으로 멘델의 유전양식에 준하여 실시하고 있다 [11].

말의 혈통서에 등재되기 위해서는 한국의 축산법과

더러브렛 등록규정에 근거하여 유전자형 감정 혹은 혈액형 감정과 모색유전의 범칙에 의해서 친자관계가 확인되어야만 한다 [2,4]. 현재 이용되고 있는 대표적인 유전자형 감정은 short tandem repeats(STRs), short sequence repeats(SSR) 혹은 sequence tagged microsatellite sites (STMS)로 불리워지는 microsatellite markers를 이용한 분석기법이다 [10]. Microsatellite DNA typing은 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction) 기술을 이용하여 혈액을 포함, 구강상피세포나 모근으로부터 얻은 적은 양의 DNA로도 분석이 가능하게 되어 사람을 비롯하여 다양한 동물에서 분자 유전학적 특징 연구에 응용하고 있다 [5]. 말에서 주로 이용하고 있는 microsatellite DNA marker는 국제동물유전학회에서 지정한 9개의 국제최소 검사항목과 추가검사항목으로 구분하고 있다. 이들 추가항목중에서 LEX3은 성(sex)에 따라 멘델의 유전법칙과 다소 상이한 형태로 나타나는 경우가 있다. 그래서 먼저 감정 대상말의 성(sex)을 알고 있어야만 친자감정이 가능한 경우도 있다.

*Corresponding author: Gil-jae Cho

Laboratory of Equine Genetics, Korea Racing Association, Gwachon 427-711, Korea
[Tel: +82-2-509-1933, Fax: +82-2-509-2672, E-mail: chogj@kra.co.kr]

말을 포함한 포유동물의 성은 부모로부터 물려받는 유전인자에 의해 결정된다. 성의 확실한 구분은 성염색체(sex chromosomes)라고 불리워지는 핵형(karyotype)의 분석에 의해 가능하지만 최근에는 분자생물학적 기법으로 가능하게 되었다. 일차적인 수컷성결정암호(male sex determining signal)는 Y염색체의 유전자(gene)에 의해 코드되어 있는 DNA binding protein인 Y염색체 성결정영역유전자(sex determining region of Y chromosome: SRY)로 불리워지는 인자에 의해 결정되는 것으로 알려져 있다 [9]. Amelogenin은 치아 enamel의 형성에 관여하는 ameloblasts에 의해 분비되는 extracellular matrix protein으로서 이것의 유전자는 X와 Y의 성염색체에 위치하고 있다 [8]. 말에서는 Y염색체상(AMELY)의 Amelogenin 유전자의 amino acid coding region은 X염색체(AMELX)보다 짧은 24염기로서 PCR에 의한 증폭 및 agarose gel 전기영동으로 분석할 수 있는 것으로 알려져 있다 [8].

국내산 말의 혈통등록을 위한 친자감정의 효율을 높임과 동시에 친자감정시 문제시 되는 marker의 분석에 유용한 기초자료를 확보하고자 더러브렛 말을 대상으로 microsatellite marker LEX3의 분석 및 Y염색체 성결정영역유전자와 Amelogenin 유전자를 이용하여 말의 성결정에 관한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

국내에서 사육중인 더러브렛 말 6두의 갈기나 꼬리로 부터 채취한 모근을 이용하여 DNA를 추출 정제하여 공시재료로 이용하였다. Genomic DNA의 추출은 Tozaki 등의 방법 [12]을 응용하였다. 5개의 hair roots와 lysis buffer 200 ul, proteinase K (20 mg/ml) 1.25 u/을 혼합한 후 60°C에서 45분 동안 incubation시킨 후 97°C에서 20분동안 heating 한 다음 template DNA로서 이용하였다.

Primer 선정 및 PCR

실험에 이용한 primer의 염기서열은 Table 1에 나타내었다. PCR은 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 행하였다. 먼저 microsatellite marker LEX3은 12.5 u/의 premix PCR buffer (ABgene, USA)와 50 ng의 template DNA를 혼합하여 total volume을 25 u/로 조정 한 후 95°C에서 10분간 가열하여 변성을 유도하고 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 1분간의 annealing 그리고 72°C에서 1분간의 extension의 3단계로 30회 반복하였고 72°C에서 60분간 extension을 실시하였다. 증폭된 DNA는 유전자형

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Primers	Nucleotide sequence
LEX3 F	5'-ACATCTAACCAGTGCTGAGACT-3'
LEX3 R	5'-GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC-3'
SRY F	5'-CTTAAGCTTCTGCTATGTCCAGAGTATCC-3'
SRY R	5'-GCGGTTTGTCACTTTTCTGTGGCACTT-3'
AMEL F	5'- CCAACCCAACACCACCAGCCCAACCTCCCT-3'
AMEL R	5'- AGCATAGGGGGCAAGGGCTGCAAGGGGAAT-3'

자동분석기(Perkin-Elmer ABI Prism 310 Genetic Analyzer, USA)에 의해 전기영동하고 검출된 각 유전자좌의 대립 유전자는 GeneScan Ver.2.1(Perkin-Elmer)과 Genotyper Ver.2.5(Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 대립유전자를 분석한 후 친자감정을 실시하였다 [1]. SRY와 Amelogenin 유전자의 분석을 위한 PCR은 30 ng의 template DNA와 각각의 primer 30 pmol을 12.5 u/의 premix PCR buffer (ABgene, USA)에 혼합하여 total volume을 50 u/로 조정 한 후 먼저 94°C에서 5분간 가열하여 변성을 유도하고 94°C에서 60초간 denaturation, 68°C에서 30초간의 annealing 과 extension의 2단계로 35회 반복하였으며 PCR 후 DNA products는 4% agarose gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다 [8].

결 과

LEX3 marker를 이용한 말의 microsatellite DNA형

더러브렛 6두를 대상으로 LEX3 microsatellite marker에 대한 유전자형을 분석한 결과는 Fig. 1과 Table 2에서 보는 바와 같이 관찰된 대립유전자는 망아지 I의 경우는 씨수말(160 bp/160 bp, P/P), 씨암말(144 bp/144 bp, H/H), 망아지(144 bp/160 bp, H/P)로서 멘델의 유전법칙에 부합되어 친자관계가 가능하였으나 망아지 II의 경우는 씨수말(144 bp/144 bp, H/H), 씨암말(144 bp/156 bp, H/N), 망아지(156 bp/156 bp, N/N)로서 멘델의 유전법칙에 어긋나 친자관계가 성립되지 않아 추가마커에 대한 검사 및 null 혹은 mutation 여부를 확인한 후 최종적인 친자관계를 확인하여야 한다.

SRY와 Amelogenin gene에 의한 말의 성결정

SRY와 Amelogenin gene의 증폭 후 agarose gel 전기영동의 결과는 Fig. 2와 3에서 보는 바와 같다. SRY gene은 씨암말과 망아지 I에서는 아무것도 관찰되지 않았으나 씨수말과 망아지 II에서 430 bp(Y염색체) band 1개가

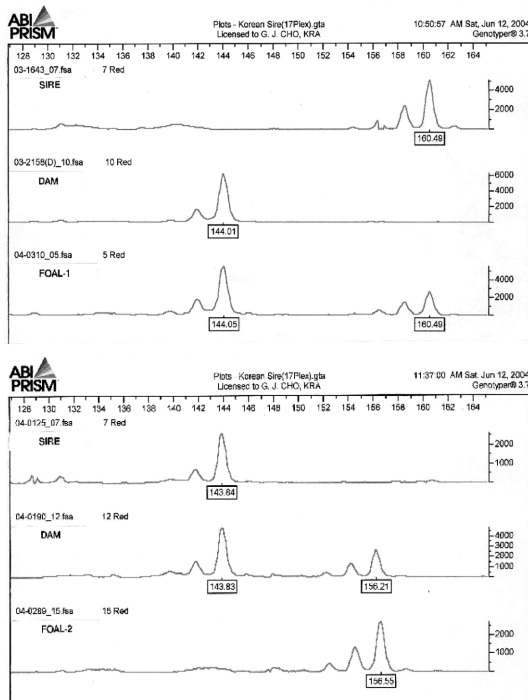


Fig. 1. Electropherogram of microsatellite LEX3 marker in Thoroughbred horse using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

Table 2. A case of parentage testing by LEX3 microsatellite marker in Thoroughbred horse

Samples	Allele size(bp)	Samples	Allele size(bp)
Sire	160/160(P/P*)	Sire	144/144(H/H)
Dam	144/144(H/H)	Dam	144/156(H/N)
Foal I	144/160(H/P)	Foal II	156/156(N/N)

* Alphabetical allele code for marker is identical to the assignment on ISAG.

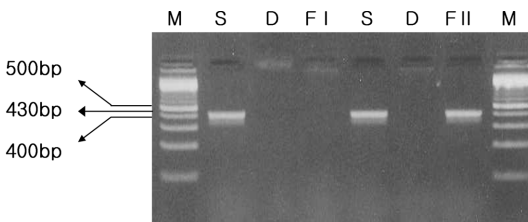


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of SRY gene fragments. Lane M: 100-bp DNA ladder, Lane S: sire, Lane D: dam, Lane F: foal. SRY band (430 bp) was only detected in sire and foal II.

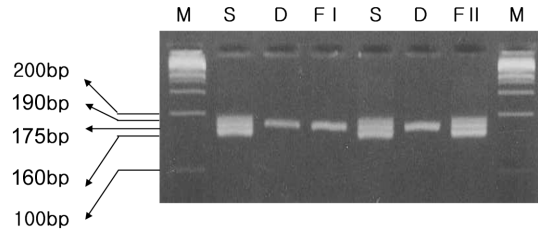


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amelogenin gene fragments. Lane M: 100-bp DNA ladder, Lane S: sire, Lane D: dam, Lane F: foal. AMEL XY band (190 bp), AMELX band (175 bp) and Y band (160 bp) were detected in sire and foal II. Dam and foal I show only a single AMELX band (175 bp).

관찰되었다.

Amelogenin gene은 씨암말과 망아지 I은 175 bp(X염색체)의 band 1개만 관찰되었고 씨수말과 망아지 II에서 190 bp(X, Y 염색체), 175 bp(X 염색체), 160 bp(Y 염색체)의 3개의 band가 관찰되었다.

SRY gene과 Amelogenin gene을 증폭하여 분석한 결과 망아지 I의 성(sex)은 암(female)말, 망아지 II는 숫(male)말로 확인되었다.

고 찰

동물의 혈통보존을 위한 정확한 친자감정은 말을 포함하여 모든 동물에서 효율적인 육종 프로그램에 필수불가결한 것으로 알려져 있다 [10]. 최근에는 국내에서도 말을 위시하여 소나 개 등에서 정확한 개체식별이나 친자감정이 요구되고 있는 실정이다. 더러브렛 말은 2000년 국제동물유전학회 말 분과위원회에서 9개의 microsatellite DNA marker를 국제최소검사항목으로 지정한 이래 현재는 각국의 친자감정 기관에서 국제최소검사항목외에 추가항목에 대해서도 더러브렛 말의 개체식별이나 친자감정에 이용하고 있다 [1]. Microsatellite LEX3 marker는 추가항목에 포함되어 있으며 2004년 국내산 망아지의 친자감정에 처음으로 채택하여 현재 검사에 활용중에 있다 [6, 7].

말의 개체식별이나 친자감정시 문제될 수 있는 LEX3 marker는 멘델의 유전법칙에 어긋날 경우 실제로 생산자나 등록기관에 문의하여 성(sex)을 알고 있어야만 친자감정시 오류를 최소화 할 수 있을 것이다. 국내산 망아지의 친자감정에서 나타난 LEX3 marker의 문제점을 해결하고자 그 말을 대상으로 SRY gene과 Amelogenin gene의 증폭에 의한 성(sex)을 분석한 결과 SRY gene은 씨암말과 망아지 I에서는 아무것도 관찰되지 않았으나 씨수말과 망아지 II에서 430 bp(Y 염색체) band 1개가 관찰

되었다.

Amelogenin gene은 씨암말과 망아지 I은 175 bp(X염색체)의 band 1개만 관찰되었고 씨수말과 망아지 II에서 190 bp(X,Y 염색체), 175 bp(X 염색체), 160 bp(Y 염색체)의 3개의 band가 관찰되었다.

Hasegawa 등 [8]은 정상적인 씨수말, 씨암말, 망아지 그리고 염색체 이상이 있는 XY 씨암말을 대상으로 SRY gene과 Amelogenin gene을 증폭하여 분석한 결과 SRY gene은 씨수말에서 band(429 bp) 1개를 검출하였고 Amelogenin gene은 씨암말에서 AMELX band(184 bp), 씨수말과 XY 씨암말에서 AMELY band(160 bp), AMELH (XY) band(200 bp)를 검출하여 보고한 바 있다. 또, Abe 등[3]이 씨수말에서 band(214 bp) 1개를 검출하였으나 씨암말과 XY 씨암말에서는 SRY gene의 band가 검출되지 않았다고 보고한 성적과 본 연구의 결과는 유사함이 확인되었다. SRY gene과 Amelogenin gene을 증폭하여 분석한 본 연구의 결과 망아지 I의 성(sex)은 암(female) 말, 망아지 II는 숫(male)말로 확인되어 LEX3 marker는 X염색체와 link된 것으로 추정되며 추가마커에 대한 검사 결과 멘델의 유전법칙에 부합되어 친자감정에도 아무런 문제가 없는 것으로 사료된다.

말에서 염색체의 이상과 관련이 있는 것은 성염색체를 포함하여 사람의 Down syndrome과 같은 autosomal trisomy가 대표적인 것이며 암말에서는 63,X gonadal dysgenesis (X monosomy), 63,X/64,XX gonadal dysgenesis, 64,XY sex reversal, 65,XXX 등이 있고 숫말에서는 65,XXY, XX male syndrome, XX/XY chimerism 등이 알려져 있다 [4].

국내에서 번식말로 활용되고 있는 더러브렛에서 염색체의 이상에 관한 보고는 아직 없으나 앞으로 염색체와 관련된 연구와 더러브렛을 포함한 제주말의 개체식별이나 친자감정시에 본 연구결과를 활용하면 좋을 것으로 사료된다.

결 론

Microsatellite LEX3 marker를 이용한 국내산 더러브렛의 친자감정에서 문제시 된 6두의 말을 대상으로 성(sex)을 결정하고자 SRY와 Amelogenin gene을 증폭하여 얻은 결론은 다음과 같다.

SRY gene은 씨암말과 망아지 I에서는 아무것도 관찰되지 않았으나 씨수말과 망아지 II에서 430 bp(Y 염색체) band 1개가 관찰되었다.

Amelogenin gene은 씨암말과 망아지 I은 175 bp(X염색체)의 band 1개만 관찰되었고 씨수말과 망아지 II에서 190 bp(X,Y 염색체), 175 bp(X 염색체), 160 bp(Y 염색체)의 3개의 band가 관찰되었다.

SRY gene과 Amelogenin gene을 증폭하여 분석한 결과 망아지 I의 성(sex)은 암(female)말, 망아지 II는 숫(male)말로 확인되었다.

참고문헌

1. **조길재**. Microsatellite DNA형 분석을 이용한 더러브렛 말의 친자감정. 한국동물자원과학회지 2004, **46**, 129-136.
2. **조길재, 김봉환**. 더러브렛 말의 혈액형에 관한 연구. 대한수의학회지 2000, **40**, 683-689.
3. **Abe S, Miyake YI, Kageyama SI, Watanabe G, Taya K, Kawakura K**. Deletion of the Sry region on the Y chromosome detected in a case of equine gonadal hypoplasia (XY female) with abnormal hormonal profiles. Equine Vet J 1999, **31**, 336-338.
4. **Bowling AT**. Horse genetics. pp. 115-122. CAB International, New York, 1996.
5. **Bowling AT, Eggleston-Scott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E**. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. Anim Genet 1997, **28**, 247-252.
6. **Coogle L, Bailey E, Reid R, Russ M**. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, -007, -008, -009, -010, -011, -013 and -014. Anim Genet 1996, **27**, 126-127.
7. **Dimoski P**. Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. Croat Med J 2003, **44**, 332-335.
8. **Hasegawa T, Sato F, Ishida N, Fukushima Y, Mukoyama H**. Sex determination by amplification of equine SRY and Amelogenin genes. J Vet Med Sci 2000, **62**, 1109-1110.
9. **Makinen A, Hasegawa T, Makila M, Katila T**. Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes. Equine Vet J 1999, **31**, 346-349.
10. **Putnova L, Knoll A, Dvorak V, Dvorak J**. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. Czech J Anim Sci 2003, **48**, 307-314.
11. **Tozaki T**. Characterization of equine microsatellites and repetitive elements, and validation of paternity testing for Thoroughbreds. A. Ph. D. Dissertation. Showa University, Japan, 2001.
12. **Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota KI, Hasegawa T, Ishida N, Miura N, Choi-Miura NH, Tomita M**. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. J Vet Med Sci 2001, **63**, 1191-1197.