

조류성감별을 위한 합리적인 프라이머설계와 확인

허은향, 박학성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시대는 과학과 기술의 시대이며 사회주의경제건설의 성과는 높은 과학기술에 의하여 담보됩니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 305페이지)

세계적으로 자연계에 존재하는 조류의 50%가 형태학적으로나 행위상으로 암수를 감별하기가 어렵고 따라서 인공적으로 번식시킬수 없는것으로 되어있다.

최근에 새에서 성염색체에 특이적인 유전자를 증폭하여 암수를 감별하기 위한 분자성감별방법들이 개발되고있다.[1, 2]

우리는 중앙동물원의 많은 조류에서 성감별을 위한 프라이머를 합성하기 위하여 생명정보자료기지 NCBI에서 13목 60종의 조류에서 성염색체에 특이적인 CHD유전자(Chromobox Helicase DNA)들의 염기배열을 검색하였다. 검색한 염기배열에 기초하여 합리적인 프라이머를 설계하고 합성하여 닭과 오리에서 확인하였다.

재료 및 방법

재료로는 닭(*Gallus gallus domesticus*)과 오리(*Anas platyrhynchos*)를 이용하였다.

생명정보자료기지 NCBI에서 CHD유전자염기배열의 검색과 프라이머설계 NCBI게놈자료기지(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 두루미목, 매목, 앵무새목, 황새-왜가리목, 부엉이목, 닭목, 오리-기러기목, 비둘기목, 청조목, 참새목, 알도요목을 비롯한 13목의 60종의 조류에서 CHD유전자염기배열을 검색하였다. CHD(Chromobox Helicase DNA)유전자의 염기배열을 가지고 상동성검색프로그램 MEGA5.05를 이용하여 핵산과 단백질상동성을 검색하였다. 단백질상동성검색결과에 의하여 합리적인 프라이머쌍을 설계하였다.

닭, 오리에서 CHD유전자의 증폭 닭, 오리에서 채혈과 총DNA는 선행방법[1]에 기초하여 분리하였다.

CHD유전자의 증폭 주형DNA 1 μ L, 프라이머쌍 각각 0.5 μ L, PCR Mix(MgCl₂ 2 μ L, dNTP 2 μ L, 0.1U/ μ L Taq DNA폴리메라제 0.125 μ L, 10 \times PCR완충액 2.5 μ L) 6.7 μ L, ddH₂O 16.4 μ L 총체적 25 μ L 되게 맞추었다.

PCR는 PCR장치(《Master Cycler》)에서 다음의 프로그램에 따라 진행하였다.

94 $^{\circ}$ C 예비변성 5min \rightarrow 35회전의 94 $^{\circ}$ C 변성 30s, 55 $^{\circ}$ C 아닐링 30s, 72 $^{\circ}$ C 사슬연장 60s, \rightarrow 최종사슬연장 72 $^{\circ}$ C 5min.

아가로즈겔전기영동 PCR반응후 반응액에 4 μ L의 브롬페놀청을 첨가하여 혼합한 후 아가로즈겔전기영동장치(《BIO-RAD Mini-Protein $^{\circ}$ Tetra System》)에서 영동을 진행하였다.

결과 및 논의

1) 생명정보자료기지 NCBI에서 *CHD*유전자염기배열의 검색과 프라이머설계

인터넷을 통하여 생명정보자료기지 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 두루미목, 매목, 앵무새목, 황새-왜가리목, 부엉이목, 닭목, 오리-기러기목, 비둘기목, 청조목, 참새목, 알도요목을 비롯한 13목의 60종의 조류에서 *CHD*유전자염기배열을 검색하였다. 13목 60종의 조류의 성염색체에 특이적인 *CHD*유전자들의 염기배열을 가지고 상동성검색프로그램 MEGA5.05를 리용하여 염기배열상동성검색을 진행하였다.

검색결과에 의하면 60종의 조류에서 *CHD-Z*, *CHD-W*유전자들의 염기배열상동성은 각각 96.2~99.2, 97.2~100%정도였다.

*CHD*유전자들의 상동성검색결과에 기초하여 프로그램 MEGA5.05를 리용하여 조류에서 *CHD*단백질배열상동성을 결정하고 상동성이 가장 높은 영역에서 상류프라이머와 하류프라이머를 설계하였다. 설계한 프라이머쌍은 다음과 같다.

상류프라이머 HUH1 5'-ACTGATTCGCTCTACGAGAACG-3' 프라이머길이 21bp

하류프라이머 HUH2 5'-TAACTTTACTGGTCACGAAC-3' 프라이머길이 20bp

2) 닭, 오리에서 *CHD*유전자의 증폭을 위한 프라이머설계의 확인

우리가 설계합성한 프라이머 HUH1/HUH2를 리용하여 조류의 암수감별이 가능한가를 검토하기 위하여 먼저 암수가 명백히 구별되는 닭과 오리에서 혈액을 채취하여 분리한 DNA에서 *CHD*유전자를 증폭하였는데 그 결과는 그림과 같다.

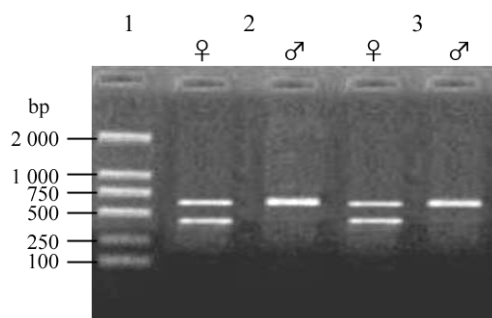


그림. *CHD*유전자의 증폭산물의
1% 아가로스겔전기영동상

1-분자량표식자(DL 2000), 2-닭, 3-오리;
예비변성 5min, 아닐링온도 55℃

그림에서 보는바와 같이 암수가 정확히 구별되는 닭과 오리에서 프라이머 HUH1/HUH2를 리용하여 *CHD*유전자를 증폭하였을 때 암컷인 경우에는 2개의 띠가, 수컷인 경우에는 1개의 띠가 나타났으며 증폭산물의 크기는 각각 600, 450bp정도였다. 이로부터 HUH1/HUH2를 조류의 암수감별을 위한 프라이머로 리용할수 있다고 볼수 있다.

맺는 말

13목 60종의 조류에서 *CHD*유전자의 염기배열 및 단백질상동성을 검색하여 *CHD*유전자의 특이프라이머 HUH1, HUH2를 설계합성하고 암수감별정확도를 닭과 오리에서 확인하였다.

참고 문헌

- [1] Lih Chiann Wang; Journal of Heredity, 99, 2, 187, 2008.
- [2] P. G. McDonald; J. Avian. Biol., 42, 197, 2011.

주체103(2014)년 10월 5일 원고접수

Design and Verification of Proper Primers for Avian Sexing

Ho Un Hyang, Pak Hak Song

In avian of 13 orders, 60 species we searched sequence homology of *CHD* genes and CHD protein, designed and synthesized HUH1/HUH2 primers to amplify *CHD* genes, in chicken and ducks investigated sexing reliability.

Key words: avian, *CHD* gene, PCR, sex determination