

CHD유전자를 리용한 번대수리 (*Aegypius monachus*)의 성감별

허은향, 박학성

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《지하자원과 산림자원, 해양자원을 비롯한 나라의 귀중한 자원을 보호하고 적극 늘여 나가며 나무심기를 전군중적운동으로 힘있게 벌려 모든 산들에 푸른 숲이 우거지게 하여야 합니다.》

최근에 새의 혈액으로부터 DNA를 분리하여 성염색체에 특이적인 성결정유전자를 증폭하여 암수를 감별하기 위한 여러가지 방법들이 개발되고있다.[1, 2]

일반적으로 새류의 암컷에는 CHD-Z, CHD-W유전자가, 수컷에는 CHD-Z유전자가 있으므로 CHD유전자를 증폭하면 암컷은 2개의 띠로, 수컷은 1개의 띠로 나타난다.

우리는 번대수리의 혈액으로부터 DNA를 분리하여 Z 및 W염색체에 존재하는 CHD(Chromobox Helicase DNA)유전자를 리용하여 성감별을 진행하였다.

재료 및 방법

연구재료로는 중앙동물원에 있는 번대수리(*Aegypius monachus*)를 리용하였다.

채혈 새의 익하정맥에서 뽑은 피를 항응고제(0.5mL의 1% EDTA)가 들어있는 원심분리관에 넣고 응고되지 않도록 잘 흔들어준다.

총DNA분리 및 분석 총DNA분리는 페놀-클로로포름법으로 하였다.

분리한 총DNA의 농도와 순도는 자외선분광광도계(《Nanodrop 2000》)를 리용하여 결정하였다.

분리한 총DNA의 유무를 아가로즈겔전기영동하여 겔도크장치(《Geldoc-It™》)에서 확인하였다.

성감별프라이머를 리용한 CHD유전자의 증폭 분석을 위한 프라이머배열은 다음과 같다.

HUH 1 5'-ACTGATTCGTCTACGAGAACG-3'

HUH 2 5'-TAACTTTACTGGTCACGAAC-3'

PCR반응액조성은 다음과 같다.

주형DNA 1μL, 프라이머쌍 각각 0.5μL, PCR반응액(MgCl₂ 2μL, dNTP 2μL, 0.1U/μL Taq DNA 폴리메라제 0.125μL, 10×PCR완충액포함 2.5μL) 6.6μL, 재증류수(ddH₂O) 16.4μL, 총체적 25μL 되게 맞추었다.

PCR반응은 《Master Cycler》에서 다음의 프로그램에 따라 진행하였다.

94℃ 예비변성 5min→35회전의 94℃ 변성 30s, 50℃ 아닐링 30s, 72℃ 사슬연장 60s→최종사슬연장 72℃ 5min.

아가로즈겔전기영동 PCR반응후 반응액에 4μL의 브롬페놀청을 첨가하여 혼합한 다음 아가로즈겔전기영동장치(《BIO-RAD Mini-Protein® Tetra System》)에서 전기영동하였다.

연구 결과

1) 혈액으로부터 총DNA분리

번대수리 6개체의 익하정맥으로부터 혈액을 뽑고 그로부터 페놀-클로르포름법으로 DNA를 분리하였다.

분리한 총DNA의 순도는 표, 총DNA를 아가로스겔전기영동한 결과는 그림 1과 같다.

표. 번대수리의 혈액DNA의 순도

개체번호	DNA농도 $/(ng \cdot \mu L^{-1})$	A_{260}/A_{280}
1	111.3	1.89
2	106.4	1.86
3	123.8	1.80
4	93.6	1.81
5	103.3	1.83
6	98.2	1.80

20mg/mL 프로테이나제 K 10 μ L, 56°C 8h 처리

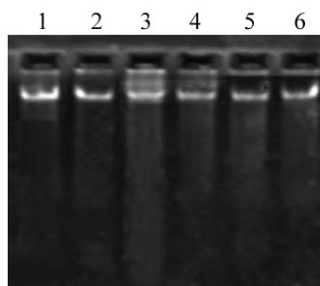


그림 1. 총DNA의 1% 아가로스겔전기영동상

표에서 보는바와 같이 6마리의 번대수리로부터 분리한 DNA농도는 93~112ng/ μ L이고 A_{260}/A_{280} 값이 1.8이상이다.

그림 1에서 보는바와 같이 분리한 DNA가 1% 아가로스겔전기영동상에서 단일띠로 나타나므로 앞으로의 분자표식자실험에 리용할수 있다.

2) CHD유전자를 리용한 성감별

CHD유전자를 증폭하기 위한 특이프라이머 HUH 1, HUH 2를 리용하여 번대수리에서 각 이한 PCR조건에 따르는 유전자의 증폭산물을 1% 아가로스겔전기영동으로 확인하였다.

PCR증폭에 미치는 예비변성시간의 영향 94°C에서 5, 10min간 예비변성하였을 때 CHD유전자증폭산물의 1% 아가로스겔전기영동상은 그림 2와 같다.

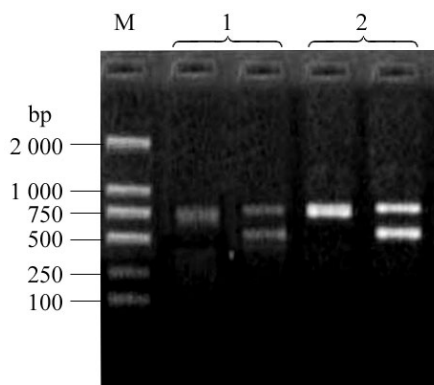


그림 2. 예비변성시간에 따르는 1% 아가로스겔전기영동상 50°C에서 아닐링, M-분자량표식자 (DL 2000), 1, 2는 예비변성시간이 각각 5, 10min일 때

그림 2에서 보는바와 같이 예비변성을 10min간 진행할 때 목적유전자의 증폭산물이 더 명백히 나타났다.

PCR증폭에 미치는 아닐링온도의 영향 50°C와 55°C에서 아닐링을 진행하였을 때 CHD유전자증폭산물의 1% 아가로스겔전기영동상은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 아닐링온도가 50°C일 때 55°C일 때보다 목적유전자의 증폭산물이 더 명백히 나타났다.

CHD유전자의 증폭에 의한 번대수리의 성감별 위해서 결정 한 예비변성시간(94°C에서 10min)과 아닐링온도(50°C)로 CHD유전자를 증폭하여 번대수리 6마리의 성감별을 진행하였다.(그림 4)

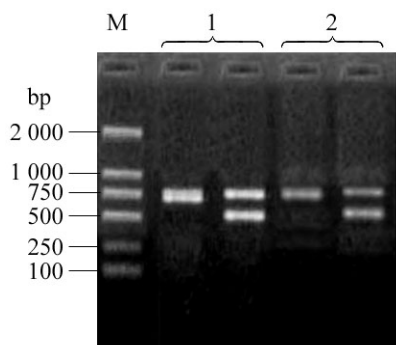


그림 3. 아닐링온도에 따르는
1% 아가로스겔전기영동상
예비변성 94℃에서 10min,
M—분자량표식자
(DL 2000), 1, 2는 아닐링
온도가 각각 50, 55℃일 때

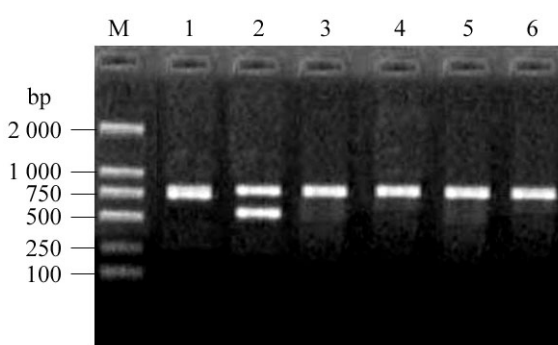


그림 4. CHD유전자증폭산물의
1% 아가로스겔전기영동상
예비변성 94℃에서 10min, 아닐링온도 50℃,
M—분자량표식자(DL 2000), 1—6은
개체번호임

그림 4에서 보는바와 같이 증폭산물의 크기는 각각 750, 500bp정도로서 NCBI자료기지에서 염기배열을 검색하여 설계한 성감별프라이머쌍 HUH 1과 HUH 2에 의한 증폭산물의 크기와 일치한다고 볼수 있다. 따라서 1, 3—6번 개체들은 CHD유전자의 증폭산물이 1개의 띠로 나타나므로 수컷, 2번 개체는 2개의 띠로 나타나므로 암컷이다.

맺 는 말

1) 번대수리에서 CHD유전자의 증폭산물은 암컷(2번 개체)에서는 2개의 띠로, 수컷(1, 3—6번 개체)에서는 1개의 띠로 나타난다.

2) CHD유전자의 성감별프라이머 HUH 1, HUH 2를 리용한 증폭산물의 크기는 번대수리에서 각각 750, 500bp정도이다.

참 고 문 헌

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

주체103(2014)년 7월 5일 원고접수

Sex Determination using CHD Genes in Black Vulture(*Aegypius monachus*)

Ho Un Hyang, Pak Hak Song

Firstly amplification product of CHD gene are two bands in female(individual number 2) and one bands in males(individual number 1, from 3 to 6) in black vulture.

Secondly fragment length of CHD genes amplified by HUH 1 and HUH 2 primers was approximately 750bp and 500bp in black vulture.

Key words: CHD gene, sex determination, black vulture