붉은사슴과 엘크에서 *SRY* 와 *ZFX-ZFY* 유전자의 Duplex PCR 기법을 이용한 성 판별

한상현 · 이성수 · 고문석 · 조인철

농촌진흥청 난지농업연구소

A Molecular Sex Identification Using Duplex PCR Method for *SRY* and *ZFX-ZFY* Genes in Red Deer and Elk

S. H. Han, S. S. Lee, M. S. Ko and I. C. Cho

National Institute of Subtropical Agriculture, Rural Development Administration

ABSTRACT

This study was focused on discriminating the molecular sexes of red deer and elk by duplex polymerase chain reaction(PCR) using two primer sets. Sex differentiation of mammals is primarily dependent on the presence or absence of sex *determining region Y*(*SRY*) gene encoded on Y chromosome which plays a key role for male development. *Zinc finger X-Y*(*ZFX-ZFY*) gene, one of X-Y homology gene group was found on X- and Y- chromosomes, respectively. At first, the nucleotide sequences were characterized for the intron 9 flanking region of *ZFX-ZFY* genes. The intron 9 of *ZFX* and *ZFY* is 529-bp and 665-bp in length, respectively. A transposable element sequence similar to bovine SINE element Bov-tA was detected only in *ZFY* gene of Cervidae. Sexing analysis was conducted by duplex PCR assay for amplification of *SRY* and *ZFX-ZFY* genes. Two differentially amplified patterns were found: one for females has a common band amplified only from *ZFX* as a template, and another for males had three bands(a common *ZFX* and two male-specific *ZFY* and *SRY*). On the separate tests using each gene, the results was identical to those from duplex PCR assay. Moreover, the results from PCR assays provide also identical information to phenotypic investigation of individuals of red deer, elk as well as their hybridized progenies collected from two isolated farms. These results suggest that it may be a rapid and precise method for determining the sexes by duplex PCR amplification using Y-chromosome specific *SRY* and X- and Y- homologous *ZFX-ZFY* genes showing sexual dimorphism in red deer and elk without any other controls.
(**Key words** : Elk, Molecular sexing, Red deer, *SRY*, *ZFX-ZFY*)

Ⅰ. 서 론

세계최대의 녹용 소비국인 우리나라에는 2000년 말 기준으로 12만 5천 여 두의 사슴이 사육되고 있으며(농림부, 2005), 녹용 채취를 위해 꽃사슴(sika deer), 붉은사슴(red deer), 엘크(elk)의 3 종류가 사육되고 있다(김 등, 2006). 우리나라에서의 사슴산업은 주로 육용이 아닌, 녹용과 녹각 생산에 초점이 맞추어져 있어 수컷의 경제적 가치가 암컷보다 훨씬 높아 번식과 관련한 조기 성판별 기법 확립의 필요성이 대두되고 있다. 축종에 따른 차이가 있기는 하지

Corresponding author : In-Cheol Cho, National Institute of Subtropical Agriculture, R.D.A. Jeju, Jeju 690-150, Korea
Tel : 064-754-5731 E-mail : choic4753@rda.go.kr

만, 축산업에서 가축의 암수 성비는 향후 축군의 규모를 결정할 뿐만 아니라 여러 가지 측면에서 농가의 경제성을 결정하는 가장 중요한 지표 중 하나이다. 생물공학 기법의 발달과 더불어 인공수정과 자연교배에 의한 가축생산에서 출생축에 대한 조기 성 판별은 계획적이고 체계적인 양축에 많은 도움을 줄 수 있는 요소이다.

포유류에서 성염색체의 진화는 매우 흥미로운 관심의 대상 중 하나이다. 원래 한 쌍의 상동염색에서 진화한 것으로, Y 염색체는 점진적으로 붕괴되었다. Y 염색체 상에만 존재하는 *SRY* 유전자는 배아의 웅성발생을 유도하는 지배적인 역할을 수행한다(Sinclair 등, 1990; Koopman 등, 1991; Nagai, 2001). 대부분의 포유류 세포에서 발현되는 가장 보편적인 DNA-결합 단백질 중 하나인 ZF는 인간에게서 800 여종 이상의 단백질들이 예상되고 있다(McCarty 등, 2003). 이들 중 X-, Y- 염색체 상에 암호화된 *ZFX* 와 *ZFY* 유전자 서열의 이형성(dimorphism)이 보고되면서 전사발현에 관련된 연구뿐만 아니라, 다양한 동물에서 성판별 표지인자로서 사용을 위한 연구들이 진행되어 왔다. 최근, 인간과 소, 말, 돼지 등에서 이들 상동유전자의 인트론 서열에서 발견되는 염기치환에 대한 분석이나 전위인자(transposable element)의 유무에 따라 X-, Y-염색체를 구분가능하다는 연구결과들이 보고되고 있다(Pomp 등, 1995; Poloumienko, 2004; 조 등, 2005).

분자생물학적 성판별 기법은 핵형분석(Gardner와 Edwards, 1968; King 등, 1979), Barr body의 확인(Barr, 1960)과 성－특이 항체검사(Anderson, 1987), Y 염색체 특이 probe를 이용한 fluorescent *in situ* hybridization(FISH) 기법을 통해 직접 또는 간접적으로 Y 염색체 또는 Y-연관 유전자에서 발현되는 단백질의 존재 여부를 확인하는 방법들이 시행되어왔으나(Thomsen 등, 1992; Staessen 등, 1999; Rens 등, 2001; Quilter 등, 2002), 이보다 간단하고 효율적인 방법으로는 *in vitro*에서 PCR 기법을 이용한 Y 염색체 특이적 유전자 또는 X, Y 염색체 모두에 암호화된 유전자를 증폭하여 비교하는 분석법들이 개발되고 있다. 현재 포유류에서 PCR 성판별을 위해서 *SRY*, *amelogenin* X-Y, *ZFX-ZFY* 등이 이용되고 있으며, 이외에도 X, Y 염색체 상의 공통된 반복서열의 길이 차이를 random amplified polymorphic DNA(RAPD)나 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 등의 방법으로 검출하여 분자표지로 활용하려는 시도들이 계속되고 있다(Bello와 Sanchez, 1999; Horng과 Huang, 2003; 조 등, 2005). 사슴류에 대한 분자 성판별 기법의 도입은 주로 야생에서 멸종 위기에 처한 사슴류 집단의 개체군의 변화추이에 대한 분석이나 밀렵을 단속하는 과정에서 종의 판별과 더불어 번식기 중 보호대상인 암컷 사냥 여부를 판정하기 위한 자료의 필요에 의해 진행되고 있으며, 현재 도체, 부산물, 모근, 분변 등을 대상으로 한 성판별까지 다양하게 시도되고 있는 실정이다(Takahashi 등, 1998; Yamauchi 등, 2000; Pfeiffer와 Brenig, 2005).

본 연구는 우리나라에서 사육 중인 사슴류 중에서 경제성이 높은 축종인 붉은사슴과 엘크에 대해 수컷 특이 유전자인 *SRY*와 X-, Y-염색체 상동인 *ZFX-ZFY* 유전자들을 동시에 분석할 수 있는 duplex PCR 기법을 이용하여 신속하면서도 정확한 분자 성판별 기법으로써의 이용을 검토해보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

경상남도와 제주도의 농장에서 붉은사슴과 엘크, 이들 간의 교잡 F_1을 각각 암컷 22 두, 수컷 30 두, 교잡 F_1 12 두를 제공받아 시험하였다(Table 2). 교잡 F_1의 경우 암수에 대한 기록 없이 제공받았으며, PCR 시험 후 표현형 자료와 차후 대조하였다. 총 64 두를 대상으로 전혈 또는 근육, 피부에서 DNA를 추출하여 유전자 성판별에 이용하였다. 전혈과 근육, 피부에서 DNA 추출은 sucrose-proteinase K lysis buffer(Birren 등, 1997)를 이용하였으며, 추출 과정은 일부 변형하여 수행하였다. 모근 DNA 추출은 Chelex 100 resin(Bio-Rad, USA)을 이용하여 100℃에서 10분간 가열한 후 DNA 현탁액을

회수하였다. DNA 용출용액은 phenol 추출법과 ethanol 침전으로 다시 회수하고 TE buffer에 용해하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

2. 중합효소연쇄반응(PCR)

조직으로부터 분리한 DNA를 주형으로, 10 × PCR 반응 완충액, 20 mM dNTP, 각각 200 mM primer, 1.5 units *Taq* DNA polymerase(TaKaRa, Japan)에 멸균한 탈이온수를 첨가하여 25 μl 용량으로 PCR 반응을 수행하였다. 성 판별을 위한 PCR 증폭용 primer들은 기존에 보고된 서열 정보들을 이용하여 직접 고안하였다(Table 1). Duplex PCR에서는 상기된 PCR 반응액 조성 중에서 길이가 짧은 *SRY* primer는 각각 100 mM, *ZFX-ZFY* primer는 각각 200 mM, *Taq* DNA polymerase는 2 units로 변경하여 반응에 이용하였다. 각각의 PCR 반응을 위한 annealing 온도는 gradient PCR 분석을 통해 최적 온도를 결정하였고, PTC-200(MJ Research, USA)을 이용하여 증폭하였다. 유전자 증폭은 94℃ 2분 열변성 후, 94℃−45초, annealing 온도−1분, 72℃−1분으로 이어지는 증폭반응을 30회 반복한 후 72℃−10분간 최종 신장하고, 이후 4℃에서 보관하였다. 증폭 산물은 ethidium bromide가 함유된 2.0% agarose 겔 상에서 전기영동한 후, UV 하에서 확인하고 사진촬영 하였다.

3. 유전자 클로닝과 염기서열 분석

유전자 증폭산물에 대한 염기서열 결정을 위하여 DNA sequencing을 수행하였다. 정제된 *SRY*와 *ZFX, ZFY*에 대한 PCR 산물들은 TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, USA)의 pCR2.0 vector에 연결한 후 대장균 OneShot Top10F' competent 세포에 형질 전환하였고, 재조합 plasmid는 Wizard Plus SV Minipreps(Promega, USA)로 회수하였다. 추출한 plasmid DNA를 주형으로 dye-termination 반응을 수행하였고 MegaBase 500 (Amersham Pamacia, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 기존에 보고된 서열들을 기준으로 액손−인트론 경계를 확인하였고, 염기서열간 비교를 위한 다중정렬은 CLUSTAL W program(Thompson 등, 1994)으로 확인하였다. 본 연구에서 새롭게 결정된 붉은사슴과 엘크의 *ZFX-ZFY* 서열들은 GenBank database에 등록하였다(GenBank accession no. DQ415948, DQ415950, EF104262-63). 또한 *ZFX-ZFY* 인트론 9 서열상에서 repetitive DNA의 존재 여부는 CENSOR web program(http://www.girinst.org/censor/)을 이용하여 확인하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

사슴을 포함한 포유류에서 성의 분화는 Y 염색체의 존재에 의해 웅성발생이 유도되고, Y 염색체가 없는 경우 자성으로 발생하게 된다. 특히, Y 염색체 내에서도 *SRY* 유전자는 웅성발생에 중추적인 역할을 수행한다. 유전자 전사에서 중요한 조절 단백질 중 하나인 ZF 유전자들 중 X, Y 염색체에 상동으로 알려진 *ZFX-ZFY*는 전사조절의 분자생물학적 기능뿐만 아니라,

Table 1. PCR Primers used for the amplification of *SRY* and *ZFX-ZFY* genes

Gene	Primer name	Nucleotide sequences[1)]	Acc. No.[2)]
SRY	dSRY1f	GCTGGGGTATGAGTGGAAAA	AB046700(sika deer) and AF148462(cattle)
	dSRY1R	GTTTTCCGACGAGGTCGATA	
ZFX-ZFY intron 9	dZF9iF	GCTGACCCTGGAGAAGATGA	AF454949(human) and NM_177491(cattle)
	dZF9iR	CTTCTTGTTGAGAGTCATTGACAG	

[1)] nucleotide sequences are displayed from 5' to 3'.
[2)] used as standard sequences for the designation of each primer.

인트론의 염기서열 상에서 비대칭적 전위인자의 진화에 따른 길이의 차이를 나타내는 것으로도 알려져 있다. 본 연구에서는 이들 *SRY*와 *ZFX-ZFY* 유전자에 대한 duplex PCR 방법을 통해 붉은사슴과 엘크, 두 종간 교잡 F_1에 대한 유전자 성판별에 대한 이용가능성을 확인하고자 하였다.

1. *SRY* 유전자의 증폭 양상과 유전자 성 판별

수컷 특이적인 *SRY* 유전자 서열을 결정하기 위하여 PCR 증폭산물에 대한 cloning과 DNA sequencing을 수행하였다. 염기서열의 길이는 primer 제작에 이용한 소와 꽃사슴의 *SRY* 유전자 서열(GenBank accession no. AB046700, AF148462)들과 같은 길이를 나타내었다(126-bp). 사슴 *SRY* 유전자의 증폭 결과는 수컷에서만 특이적인 단일밴드가 관찰되었고, 암컷에서는 PCR 산물이 출현하지 않았다(Fig. 1a). 암수에 대한 정보가 기록되지 않은 시료에서도 PCR 밴드가 관찰된 경우 수컷으로 판정하였다.

2. *ZFX-ZFY* 증폭 양상과 유전자 서열의 특성

사슴과 엘크, 교잡 F_1의 DNA 시료를 대상으로 *ZFX-ZFY* 유전자의 인트론 9를 포함한 영역을 PCR로 증폭하여 성 판별을 수행하였다. 전기영동 겔 상에서 암컷의 경우 단일밴드로 관찰되었고, 수컷에서는 *ZFX*와 *ZFY*에서 유래된 두 개의 PCR 산물이 heteroduplex 형태로 관찰되었다(Fig. 1b). DNA 염기서열을 분석한 결과 증폭한 PCR 산물의 길이는 사슴에서 *ZFX* 606-bp, *ZFY* 742-bp, 엘크에서 *ZFX* 607-bp, *ZFY* 742-bp로 확인되었다. Poloumienko(2004)는 *ZFX-ZFY* 유전자 인트론 7, 8, 9 상에서 전위인자의 유무에 따른 성별 이형성을 인간, 소, 말, 돼지에서 보고하였고, 조 등(2005)은 *ZFX-ZFY*의 인트론 7의 전위인자 삽입양상에 따라 돼지의 유전자 성판별이 가능함을 보고하였다. 본 연구 결정한 붉은사슴과 엘크의 *ZFX*, *ZFY*의 인트론 9

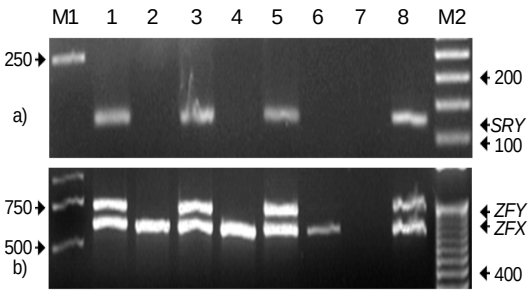

Fig. 1. Analyses for molecular sexing in red deer, elk and their hybrids between both using *SRY*(a) and intron 9 flanking region of *ZFX-ZFY*(b). The numbers above lanes are followed: 1-2, red deer; 3-4, elk; 5-8, F_1 progenies. PCR products from male animals are 1, 3, 5, and 8, and those from female animals are 2, 4, and 6, respectively. The lane 7 is failed to amplify. M1 and M2 are DNA size markers, 1-kb DNA Ladder Plus and 50-bp DNA Ladder, respectively.

서열상에서 반복서열의 존재를 확인하기 위해 CENSOR program으로 탐색하였다. 그 결과 소(cattle) 유전체에서 많은 사본이 존재하는 것으로 보고된 RNA 매개성 역전위인자(retroelement)의 일종인 short interspersed nuclear element (SINE) Bov-tA와 매우 유사한 서열이 붉은사슴과 엘크의 *ZFY* 인트론에서 관찰되었고, *ZFX*에서는 발견되지 않았다. Fig. 2는 붉은사슴과 엘크의 *ZFX-ZFY* 인트론 9를 포함한 PCR 산물의 서열을 비교한 것이다. 분석결과 엑손 9와 10에서는 염기치환은 관찰되나 삽입/결실 돌연변이는 관찰되지 않았다. 반면, 인트론 9 서열에서는 여러 지점에서 삽입/결실 돌연변이들이 관찰되었으며, *ZFY*의 인트론에서는 Bov-tA와 유사한 반복서열의 삽입이 붉은사슴과 엘크에서 공히 관찰되었다(Fig. 2).

3. Duplex PCR을 이용한 성 판별

붉은사슴과 엘크의 분자 성 판별을 위하여 본 연구에서는 *SRY*와 *ZFX-ZFY* 인트론 9에 대

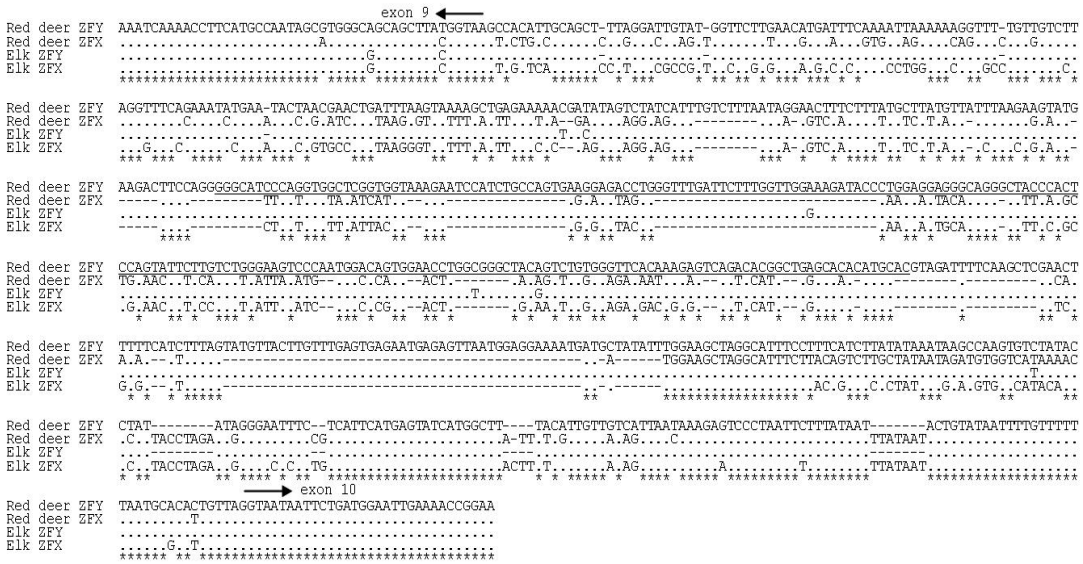

Fig. 2. Comparison between the sequences of intron 9 flanking region of *ZFX* and *ZFY* from red deer and elk. Underlined sequences indicate the short interspersed nuclear element(SINE)-like sequence similar to Bov-tA reported in bovine genome. Arrows above sequences indicate the exon 9 and exon 10, respectively. Censor web program was used for scanning repetitive DNA sequence.

Table 2. Comparison of sexing results from PCR tests and phenotype investigation

		red deer (n = 22)		elk (n = 30)		F_1* (n = 12)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
Phenotype sex		8	14	21	9	7	5
PCR amplification		8	14	21	9	6	5
PCR sexing	*SRY*	8	14	21	9	6	6
	ZFX-ZFY	8	14	21	9	6	5
	Duplex PCR	8	14	21	9	6	5
Accuracy** of Duplex PCR		100	100	100	100	85.7	100

* produced between red deer and elk, and the samples were provided without information of sexes, and data of their gender phenotype were obtained after PCR tests.

** is percentage calculated by comparing the sexing results from duplex PCR versus those from phenotype genders of animals described by specimen providers.

한 duplex PCR 분석법을 고안하였다. Fig. 3은 duplex PCR에서 얻은 PCR 산물에 대한 전기영동 겔을 나타낸 것이다. 겔 상에서 암컷의 경우 *ZFX*에서 유래된 단일 밴드가 나타냈으며, 수컷의 경우는 *ZFX, ZFY, SRY*를 주형으로 증폭된 3 개의 밴드가 출현하였다. 암수 기록이 없는 미지시료들에서도 암수에 해당하는 단일밴드 또는 3 개의 밴드를 갖는 개체들로 구분되었다. Table 2는 제주도와 경상남도의 사슴농장에서 수집한 붉은사슴과 엘크, 종간 교잡 F_1의 암수에 대한 표현형의 정보와 S*RY, ZFX-ZFY*, duplex PCR 등을 이용한 분자 성감별의 결과를

요약한 것이다. 분석에 이용한 붉은사슴과 엘크는 생식기에 대한 표현형 성 판별 결과와 PCR을 이용한 암수 성 판별 결과가 서로 정확히 일치하였다.

반면, 전기영동 결과에서 lane 7의 경우 *SRY*, *ZFX-ZFY*, duplex PCR에서 모두 PCR 산물이 관찰되지 않았다(Fig. 1, Fig. 3). *SRY* 증폭 결과만으로는 lane 7 시료가 암컷으로 판정되나, *ZFX-ZFY*와 duplex PCR의 결과를 종합하면, PCR 반응에 이용한 주형 DNA에 문제가 있어 해당 시료에 대한 성 판별이 불가능한 것으로 판단된다. 이상의 결과는 *SRY* 유전자에 대한 PCR 성 판별에서 나타날 수 있는 오류이며, 주형 DNA의 PCR 증폭 활성을 증명하기 위한 별도의 positive control test가 요구되는 이유가 된다.

가축을 비롯한 다양한 포유동물에서 유전자 성 판별은 Y 염색체 특이 유전자 확인하는 방법이 가장 간단하나, 일반적으로 PCR 증폭의 신빙성을 제공하기 위해 상동염색체나 X, Y 염색체 공통의 유전자 하나를 positive control로 증폭하여 제시하고 있다. Takahashi 등(1998)은 *SRY* 유전자 증폭으로 일본 꽃사슴의 유전자 성 판별을 수행하였고, microsatellite인 *BOVIRBP*를 positive control로 이용하였으며, Cao 등(2005)은

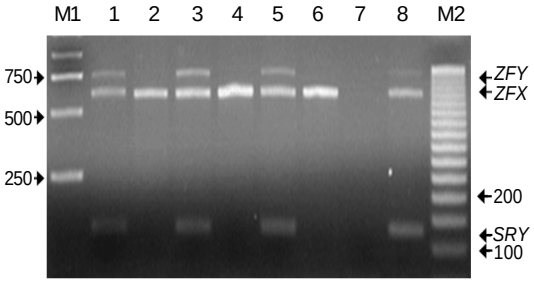

Fig. 3. Duplex PCR assay for molecular sexing in red deer, elk, and their hybrids using the both primer sets for *SRY* and intron 9 flanking region of *ZFX-ZFY*. Information of animals tested for each lane is identical to those described in Fig. 1. M1 and M2 are DNA size markers, 1-kb DNA Ladder Plus and 50-bp DNA Ladder, respectively.

중국에서 멸종위기종 중 하나인 tufted deer의 성 판별을 위해 핵형분석과 함께 성염색체 연관유전자인 *SRY*와 *ZFX-ZFY*를 각각 증폭하였다. Wilson과 White(1998)은 positive control로 *fragile X mental retardation*(*FMR*) 유전자를 이용하였다. Cao 등의 보고에서는 *ZFX*와 *ZFY*의 이형성은 기재되어 있지 않고, 단지 *SRY* 증폭에 대한 positive control로 *ZFX-ZFY* 유전자의 증폭을 이용하였다. 이외에도 X-, Y-염색체에 공통으로 존재하면서 이형성을 나타내는 것으로 잘 알려진 유전자인 *amelogenin*(*AMEL*) 유전자의 증폭 양상을 이용하여 성 판별을 수행한 보고들이 있으나, 면양, 일본 꽃사슴, 유럽 붉은사슴에 대한 증폭에서 *AMELX*는 공통으로 출현하며 수컷에서 *AMELY*가 특이적으로 출현하지만 수컷에서 얻어진 *AMELX-AMELY* 증폭산물의 전기영동 겔 상에서 비특이적인 증폭산물이 함께 증폭됨을 보고하고 있다(Yamauchi 등, 2000; Pfeiffer와 Brenig, 2005).

결론적으로, 본 연구에서 고안한 수컷–특이(male-specific) 유전자와 성별–이형 유전자를 동시에 증폭하는 duplex PCR 분석기법은 암컷과 수컷에서 서로 명확한 차이를 나타내는 밴드 양상을 얻을 수 있고, *ZFX* 유전자 자체가 positive control이 되기 때문에 DNA 분리과정에서 발생할 수 있는 주형 DNA의 부재와 같은 오류를 제외하면 DNA 분자에 대한 성 판별에 있어 매우 신속하고 정확한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 비록 본 연구에서 이용한 시료들이 혈액이나 모근만을 대상으로 하였으나, 발생 중인 배아의 양수를 천자하거나, 기내 발생 중인 할구 등을 대상으로 분석이 수행된다면 붉은사슴이나 엘크의 번식에서 암수를 조기 판명할 수 있는 유용한 분석 기법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Ⅳ. 요 약

두 가지 primer 쌍을 동시에 이용한 duplex PCR 기법으로 붉은사슴과 엘크의 유전자 성 판별에 대한 이용가능성을 확인하기 위해 본 연구를 수행하였다. 근본적으로 포유동물의 성

분화는 Y-염색체 상에 암호화되어 있으며 웅성 발생에 지배적인 역할을 수행하는 *SRY* 유전자의 존재 여부에 따라 결정되게 된다. X-, Y- 염색체에 상동인 유전자들 중 하나인 *ZFX-ZFY* 유전자는 X-, Y- 염색체 상에서 각각 발견된다. 유전자 성 판별에 앞서 붉은사슴의 *ZFX-ZFY* 유전자의 인트론 9를 포함하는 절편에 대한 염기서열의 특성을 확인하였다. 인트론 9의 길이는 *ZFX*와 *ZFY*에서 각각 529, 665-bp로 확인되었다. *ZFY* 인트론 9에서 전위인자의 일종인 bovine SINE element와 유사한 서열이 관찰되었다. *SRY*와 *ZFX-ZFY* 유전자들을 동시에 증폭하는 duplex PCR을 통해 유전자 성 판별을 수행하였고, 암수가 서로 구분되는 증폭 양상을 나타내었다: 암컷에서는 *ZFX*에서 증폭된 공통의 증폭 산물 하나만이 관찰되었고 수컷은 세 개의 밴드가 관찰되었다(*ZFX*에 해당하는 공통의 밴드와 *ZFY*와 *SRY*에서 증폭된 두 개의 수컷 특이 밴드). 두 가지 유전자에 대한 독립적인 PCR 시험에서 얻은 결과는 duplex PCR에 의해 얻은 결과와 동일한 양상을 나타내었다. 또한 유전자 성 판별의 결과들은 각각의 개체에 대한 표현형적 성판별 자료와 정확히 일치하였다. Y 염색체 특이적인 *SRY*와 X-, Y- 상동이면서 성적 이형성을 나타내는 *ZFX-ZFY* 유전자들에 대한 duplex PCR 방법은 붉은사슴과 엘크의 성 판별에 있어 여타 다른 대조시험을 요구하지 않으면서 없이 신속하고 정확한 정보를 제공하는 분석법이 될 것으로 기대된다.

Ⅴ. 인 용 문 헌

1. Anderson, 1G. B. 1987. Identification of embryonic sex detection of H-Y antigen. Theriogenology 27: 81-97.
2. Barr, M. L. 1960. Sexual dimorphism interphase nuclei. Am. J. Hum. Genet. 12:118-127.
3. Bello, N. and Sanchez, A. 1999. The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Mol. Ecol. 8:667-669.
4. Birren, B., Green, E. D., Klapholz, S., Myers, R. M. and Roskams, J. 1997. *Genome analysis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
5. Cao, X., Jiang, H. and Zhang, X. 2005. Polymorphic karyotypes and sex chromosomes in the tufted deer(*Elaphodus cephalophus*): cytogenetic studies and analyses of sex chromosome-linked genes. Cytogenet. Genome Res. 109:512-518.
6. Gardner, R. L. and Edwards, R. G. 1968. Control of the sex ratio at full term in rabbit by transferring sexed blastocysts. Nature 218:346-349.
7. Horng, Y. M. and Huang, M. C. 2003. Male-specific DNA sequences in pigs. Theriogenology 59:841-848.
8. King, W. A., Linares, T., Gustavesson, I. and Bane, A. A. 1979. A method for preparation of chromosome from bovine zygotes and blastocyts. Vet. Sci. Commun. 3:51-56.
9. Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351:117-121.
10. McCarty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D. and Smale, S. T. 2003. Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. Mol. Cell 11:459-470.
11. Nagai, K. 2001. Molecular evolution of *Sry* and *Sox* gene. Gene 270:161-169.
12. Pfeiffer, I. and Brenig, B. 2005. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep(*Ovis aries*) and European red deer(*Cervus elaphus*). BMC Genetics 6:16.
13. Poloumienko, A. 2004. Cloning and comparative analysis of the bovine, porcine, and equine sex chromosome genes *ZFX* and *ZFY*. Genome 47:74-83.
14. Pomp, D., Good, B. A., Geisert, R. D., Corbin, C. J. and Conley, A. J. 1995. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. J. Anim. Sci. 73:1408-1415.
15. Quilter, C. R., Blott, S. C., Mileham, A. J., Affara, N. A., Sargent, C. A. and Griffin, D. K. 2002. A

mapping and evolutionary study of porcine sex chromosome genes. Mamm. Genome 13:588-594.

16. Rens, W., Yang, F., Welch, G., Revell, S., O'Brien, P. C., Solanky, N., Johnson, L. A. and Ferguson Smith, M. A. 2001. An X-Y paint set and sperm FISH protocol that can be used for validation of cattle sperm separation procedures. Reproduction 121:541-546.
17. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. -M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. 1990. A gene from the human sex-determining region Y encodes a protein with a homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346:240-244.
18. Staessen, C., Van Assche, E., Joris, H., Bonduelle, M., Vandervorst, M., Liebaers, I. and Van Steirteghem, A. 1999. Clinical experience of sex determination by fluorescent *in-situ* hybridization for preimplantation genetic diagnosis. Mol. Hum. Reprod. 5:382-389.
19. Takahashi, M., Masuda, R., Uno, H., Yokoyama, M., Suzuki, M., Yoshida, M. C. and Ohtaishi, N. 1998. Sexing of carcass remains of the sika deer (*Cervus nippon*) using PCR amplification of the Sry gene. J. Vet. Med. Sci. 60:713-716.
20. Thomsen, P. D., Hindkjaer, J. and Christensen, K. 1992. Assignment of a porcine male-specific DNA repeat to Y-chromosomal heterochromatin. Cytogenet. Cell Genet. 61:152-154.
21. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.
22. Wilson, P. J. and White, B. N. 1998. Sex identification of elk(*Cervus elaphus canadensis*), moose(*Alces alces*), and white-tailed deer(*Odocoileus virginianus*) using the polymerase chain reaction. J. Forensic. Sci. 43:477-482.
23. Yamauchi, K., Hamasaki, S., Miyazaki, K., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y. 2000. Sex determination based on fecal DNA analysis of the *Amelogenin* gene in sika deer(*Cervus nippon*). J. Vet. Med. Sci. 62:669-671.
24. 김일석, 전상근, 하경희, 박석태, 곽경락, 박정권, 강양수. 2006. 엘크 사슴육의 물리화학적, 지방산 조성 및 관능적 특성. 한국축산식품학회지 26: 70-77.
25. 농림부. 2005. 기타가축통계.
26. 조인철, 강승률, 이성수, 최유림, 고문석, 오문유, 한상현. 2005. 돼지 SRY와 ZF 유전자를 이용한 성판별 기법. 한국동물자원과학회지 47:317-324.

(접수일자 : 2006. 11. 13. / 채택일자 : 2007. 1. 23.)