

DNA 검사기법을 이용한 PSE육 생산 돼지 진단

김혜정*, 신성철, 채지선, 최은주, 김희선, 김현석, 정구용¹, 정의룡
 상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과
¹상지대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

서 론

돼지는 각종 스트레스 인자에 감수성이 높은 동물로서 스트레스에 대해 특이적으로 민감한 반응을 보이는 병적증상을 돼지 스트레스 증후군(porcine stress syndrome;PSS)이라고 부르며, 이 같은 돼지는 도축시 육질이 저하되는 PSE(pale, soft, exudative) 돈육을 생산하는 것으로 잘 알려져 있다⁽¹⁾.

스트레스 감수성 돼지는 번식능력 퇴화현상을 초래하며 모돈의 경우 복당 산자수 및 이유투두가 정상개체보다 적다. 또한, 자돈의 폐사율이 급증하며 육성 비육돈에 있어서는 성장률이 낮을 뿐만 아니라 폐사율이 높고 생존한 돼지는 스트레스에 대한 민감성 때문에 90% 이상의 높은 비율로 PSE 돈육의 육질이 크게 저하된 불량 저급육을 생산하게 된다^(2~4). 일명 물돼지라고 부르는 PSE의 이상 돈육은 육색이 창백하고 육조직은 연약하며 다량의 육즙이 삼출되어 보수성, 결합력 및 유회력이 매우 열악한 돈육의 상태를 의미하는데 PSE 돈육은 외관상 불량하여 신선육으로서의 가치가 매우 떨어질 뿐만 아니라 가공 특성도 낮아 양돈 생산농가 및 돈육 가공업체에 막대한 경제적 손실을 초래한다⁽⁵⁾.

특히, 국내에서 생산되는 수출용 돼지에서 PSE 돈육 발생율이 40%나 되어 미국 10%, 덴마크 3%, 영국 12% 및 일본 12%에 비해 상대적으로 높아 돈육 수출에 커다란 장애요인으로 지적되고 있다. 따라서 스트레스에 의한 돼지 폐사율을 크게 줄이고 고품질 돈육 생산을 통한 양돈 산업의 경쟁력을 제고하기 위해서는 물돼지 생산과 밀접한 관련이 있는 PSS 불량 유전자 색출을 위한 신속 간편하고 정확성이 높은 진단 기술 개발과 이를 이용한 PSE 돈육 발생을 감소 방안이 확립되어야 한다.

본 연구는 기존의 halothane 검정법을 대체할 수 있는 새로운 돼지 PSS 유전자 진단기술로서 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) 및 PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism) 기법을 개발하고 종돈 및 대규모 집단 검색을 통한 PSS 및 PSE육 생산 돼지의 조기 진단 및 검출에 활용하고자 한다.

재료 및 방법

강원도 및 경기도 일대의 종돈 총 120두(대요크셔 57두, 랜드레이스 42, 듀록 21)와 일반 양돈장에서 사육 관리되고 있는 식육용 교잡종 돼지 150두로 부터 채취한 모근(각 두당 3~5개)을 공시재료

로 이용하였다. 각 검정대상 공시돈으로부터 채취한 모근의 Genomic DNA 추출은 Trommelen 등⁽⁸⁾의 방법을 일부 변경하여 수행하였다. 돼지의 RYR1 유전자 돌연변이를 검출하기 위하여 ryanodine receptor cDNA의 염기서열상에서 염기치환 부분인 1843번째를 포함하는 1795번째부터 1928번째까지의 134bp 단편을 증폭하기 위한 Primer로서 forward primer : 5'-GTGCTGGATGTCTGTGTTCCCT-3' 및 reverse primer : 5'-CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG-3'을 설계 합성하였다(Fig. 1)

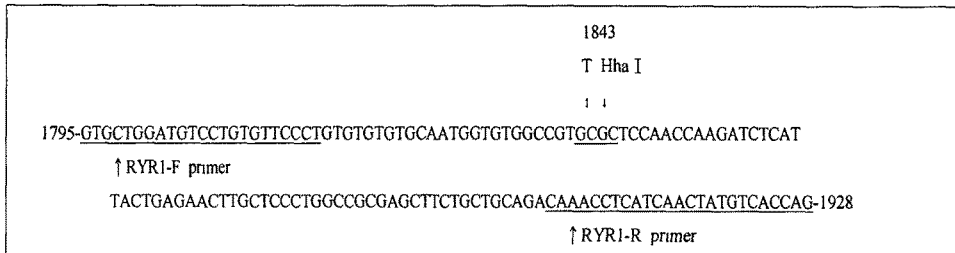


Fig. 1. Partial sequence of ryanodine receptor gene(cDNA 1795-1928) contained the missense mutation (1843 C→T). The sites of RYR1 primer sequence are underlined.

RYR1 유전자의 PCR 증폭을 위한 반응 조건을 GeneAmp PCR System 9600(Perkin - Elmer Cetus, USA)을 이용하였고 PCR 반응액은 Template DNA 50 μ g, primer 각 0.5 μ M, dNTP 각 200 μ M, 10 X PCR buffer 5 μ l 그리고 Taq polymerase 1unit를 첨가하여 총 20 μ l로 조정하였다.

PCR cycle은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열 한 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 67 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 PCR반응을 종료하였다.

SSCP 분석은 PCR 증폭 산물 3 μ l에 5~6배의 formamide dye (98% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylen cyanol)를 첨가하고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 즉시 ice에 5분간 보관하여 reannealing을 방지한 다음 10~12% 비변성 polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 후 silver staining으로 SSCP의 DNA band를 검출하고 각 banding pattern에 따른 유전자형을 판정하였다.

결과 및 고찰

돼지에서 스트레스 감수성 유전인자는 PSE 이상육의 주된 원인이 되고 동시에 스트레스와 관련하여 갑작스런 폐사의 주요 원인으로 작용할 뿐만 아니라 돼지의 생존능력, 환경적응 능력 및 번식능력의 감소 현상을 통하여 양돈생산 능가에 커다란 경제적 손실을 일으키는 열성의 불량유전형질로 잘 알려져 있다. 각종 스트레스에 의한 갑작스런 폐사, PSE 돈육 발생 및 halothane 감수성에 의한 malignant hyperthermia(MH)는 모두 PSS와 밀접한 관련이 있다^(1,4). 돼지 PSS는 Ca²⁺ 이온 channel을 합성하는 ryanodine receptor 유전자의 특정 부위에 점 돌연변이가 일어나 발생하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 돼지 골격근에 있어 Ca²⁺ 방출통로(CRC)로 기능을 담당하고 있는 RYR-1 유전자는 악성고열증(MH)과 관련되어져 있을 뿐만 아니라 PSS 인자와도 밀접한 관계를 맺고 있어 스트레스

감수성 유전인자의 검색을 위해서는 RYR1 유전자의 점 돌연변이를 검출할 필요가 있다. PSS의 유전적 결함은 RYR1의 cDNA상의 1843번째에 cytosine 염기(CGC)가 thymine 염기(TCC)로 치환(C→T)됨으로써 615번째 아미노산의 arginine이 cytosine으로 변화되어 발생한다⁶⁾. 즉, RYR1 유전자의 cDNA의 염기배열은 614번째 아미노산인 val의 codon으로서 GTG가 해당되고 615번째 아미노산으로 Arg는 CGC의 배열로서 이들 2개의 아미노산을 code하고 있는 부위(GRGCGC)에 GCG▼C의 Hha I 제한효소의 인지부위가 존재하고 있으며 한편, 615번 아미노산에서 Arg→Cys의 치환이 발생될 경우 이 부위의 염기서열은 TGC로 전환된다. 그 결과 615번과 161번 아미노산 부위는 TGC→TCC로 변화되어 Hha I 제한효소의 인지부위(GCT▼C)가 새롭게 형성된다.

본 실험에서 PSS를 유발하는 ryanodine receptor의 단일 염기돌연변이(C→T;Arg¹⁶⁵→Cys)를 포함하는 134 bp의 exon부위를 PCR로 증폭한 다음 PCR 증폭산물을 SSCP 분석하였다(Fig. 1). Table 1에서 보는 바와 같이 Landrace 42종 가운데 정상 즉, PSS 저항성 개체가 57.1%, 이형접합체의 잠재성 개체가 35.7% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 7.1%로 각각 나타났다. L. Yorkshire는 57두 가운데 PSS 저항성 개체가 82.5%, 이형접합체의 잠재성 개체가 15.8% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 1.7%로 나타났으며, Duroc은 21두 가운데 PSS 저항성 개체가 95.2%, 이형접합체의 잠재성 개체가 4.8% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 0%로 나타났다. 국내 비육용 교잡돈(Crossbred)의 경우엔 150두 가운데 정상 개체가 72.0%, 이형접합체의 잠재성 개체가 22.7% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 5.3%로 나타났다.

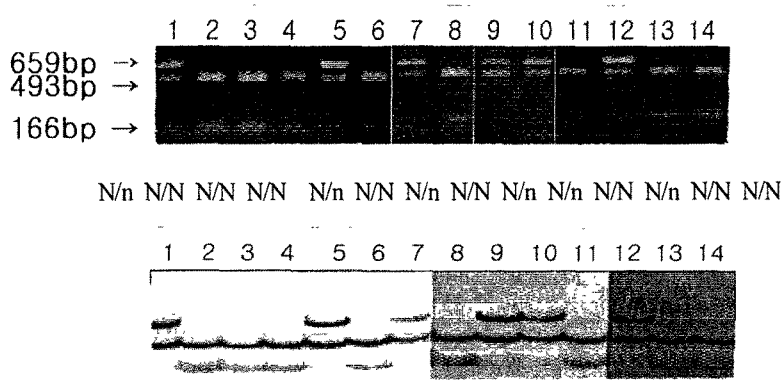


Fig. 1. DNA test for PSS and PSE meat using PCR-RFLP and PCR-SSCP techniques in pigs.

일반적으로 PSS 유전자의 출현율은 품종에 따라 많은 차이를 보이고 있으며 특히, Pietrain 종에서 PSS 유전자의 출현빈도가 가장 높은 것으로 알려져 있고 다음으로 랜드레이스종이 타 품종에 비해 상대적으로 높은 것으로 보고되어져 있다. 앞으로 비육돈 집단에 있어 PSS 발생율을 줄이기 위해서는 특히, 종돈에 대한 PSS 유전자 검색을 실시하여 PSS 유전자의 확산을 방지하고 품종집단으로부터 이 열성의 불량 유전인자를 제거하기 위한 진단 프로그램의 개발과 도입이 이루어져야 한다. 또한 외국으로부터 도입되는 수입종돈에 대해서도 PSS 유전자 진단을 실시하여 불량형질의 국내 확산을 사전에 예방할 필요가 있다.

Table 1. Distribution of RYR1 genotype by DNA diagnostic test in pig breeds

| Breed | No. of pigs | DNA type ^a | | | Gene frequencies | |
|--------------|-------------|-----------------------|----------|--------|------------------|-------|
| | | N/N | N/n | n/n | C1843 | T1843 |
| Landrace | 42 | 24(57.1) ^b | 15(35.7) | 3(7.1) | 0.75 | 0.25 |
| L. Yorkshire | 57 | 47(82.5) | 9(15.8) | 1(1.7) | 0.90 | 0.10 |
| Duroc | 21 | 20(95.2) | 1(4.8) | 0(0.0) | 0.97 | 0.03 |
| Crossbred | 150 | 108(72.0) | 34(22.7) | 8(5.3) | 0.83 | 0.17 |

^a DNA type determined by PCR- RFLP and SSCP for the porcine RYR1 gene. N/N : homozygous normal pig, N/n : heterozygous pig, n/n : homozygous recessive pig(PSS).

^b values in parentheses show the percentage of each genotype.

본 연구에서 PCR- RFLP 및 SSCP기법을 이용한 DNA 진단 기술은 돼지의 PSS 유전자를 연령이나 성별에 관계없이 조기에 신속 정확하게 색출하고 제거할 수 있어 PSE의 불량 이상 돈육의 발생을 근본적으로 감소시킴으로써 고품질 돈육생산에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 PCR-RFLP 및 PCR-SSCP 기법을 이용하여 PSE 돈육을 생산하는 PSS 돼지 유전자 진단 기술을 개발하고 이를 이용한 국내 종돈 및 교잡 비육돈의 PSS 유전자 출현 빈도를 파악하고자 수행하였다. 돼지 PSS의 원인이 되는 ryanodine receptor 유전자의 단일염기 돌연변이 (C→T ; Arg → Cys)를 포함하는 134 bp 영역을 PCR로 증폭한 후 RFLP 및 SSCP 기법으로 분석한 결과 동형접합체의 정상(N/N), 이형접합체의 잠재성 개체 (N/n) 그리고 돌연변이 유전자를 동형접합체 상태로 갖는 PSS 감수성 개체(n/n)에 각각 특이적인 유전자형이 검출되었다. 특히, PCR-SSCP기법을 이용한 RYR1 유전자 돌연변이 검출 방법은 보다 신속 간편하면서도 상대적으로 분석비용이 저렴한 정확성이 높은 PSS 돼지 진단기술로서 대규모 돼지집단검색이나 RFLP 방법으로 판정이 불확실한 시료의 재검에 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. MacLennan, et al.(1999) *Science*, 77, 408-415.
2. Simpson, et al.(1989) *Animal Prod.*, 49, 503.
3. Sather, et al.(1991) *Science*, 71, 645.
4. Jones, et al. (1994) *Pig News Information*, 15, 15N.
5. 정의룡 등 (1998) *생명자원과학논총, 상지대학교* 4, 53-62.
6. Fujii, et al. (1991) *Science*, 253, 448.
7. Otsu, et al. (1992) *Genomics*, 13, 835.
8. Trommelen et al. (1993) *J. Dairy Sci.*, 76, 1403-1411.