大韓獸醫學會誌(2002) 第42卷 第1號
Korean J Vet Res(2002) 42(1) : 65~71

PCR-RFLP 기법을 이용한 Porcine Stress Syndrome의 진단

황의경*, 김연수
상지대학교 생명자원과학대학 응용동물과학부
(게재승인 : 2002년 2월 14일)

Detection of the Ryanodine Receptor Gene Mutation Associated with Porcine Stress Syndrome from Pig Hair Roots by PCR-RFLP

Eui-Kyung Hwang*, Yeon-Soo Kim
Division of Applied Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University
(Accepted : February 14, 2002)

Abstract : We have utilized the PCR-RFLP method to detect the ryanodine receptor(RYR1) gene mutation and to estimate the genotype frequencies of the RYR1 gene in commercial crossbred pig population.

The exon region(659bp) including point mutation(C →T; Arg →Cys) in the porcine ryanodine receptor gene, which is a causal mutation for PSS, was amplified by PCR and digested with *Cfo I* restriction enzyme. The RYR1 gene was classified into three genotypes by agarose gel electrophoresis. The normal homozygous(NN) individuals showed two DNA fragments consisted of 493 and 166bp. The mutant homozygous(nn) individuals showed only one DNA fragment of 659bp. Also, all three fragments(659, 493 and 166bp) were showed in heterozygous(Nn) carrier animals. The proportions of normal, carrier and PSS pigs within crossbred population of pigs were 81%, 15% and 4%, respectively.

According to the results of analysis of variance for the association of genotypes of RYR1 of pigs at 30kg, day age at 90kg and average daily gains, the RYR1 nn genotype was very higher than RYR1 NN genotype for day age at 30kg with 5% level of significant difference, but no significant difference for association of any other genotypes with day age at 90kg and average daily gain in crossbred pigs.

Therefore, DNA diagnosis by using PCR-RFLP analysis for the PSS gene was useful for large-scale screening of commercial pigs in the swine industry.

Key words : PSS, PSE, RYR1, PCR-RFLP, Pigs

서 론

돼지는 각종 스트레스 인자에 감수성이 대단히 높은 동물로서 스트레스에 대해 특이적으로 민감하게 반응을 보이는 병적 현상을 나타내는데 이러한 증상을 돼지 스트레스 증후군(PSS; porcine stress syndrome)이라 하며, 이러한 돼지에서는 도축시 육질이 저하되는 PSE(pale, soft, exudative) 돈육을 생산한다[1]. 스트레스 감수성 돼지에서는 번식능력 퇴화현상이 나타나므로 모돈의 경우 복당 산자수 및 이유두수가 정상 개체보다 적고 자돈의 경우 폐사율이 높으며 육성 비육돈은 성장율이 낮을 뿐만 아니라 폐사율도 높은 편이며 생존한 돼지에서도 스트레스에 대한 민감성 때문에 60~70% 이상이 PSE 돈육을 생산하는 등 이로 인한 경제적 손실이 매우 크다[2,3].

* Corresponding author : Eui Kyung Hwang, Division of Applied Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea.
전화 : 033-730-0531(phone), ekhwang@mail.sangji.ac.kr(e-mail)

돼지 스트레스 증후군은 유전적 요인에 의해 지배되며 상염색체상의 단일 유전자 좌위에 존재하는 열성 유전자에 의해 발현된다[4]. PSS 유전인자를 보유하고 있는 스트레스 감수성 돼지는 호기적 또는 혐기적 대사과정를 일으키게 되는데, 열, 이산화탄소(CO_2), 젖산의 생성량이 많아져 근육의 수축 및 이완에 영향을 끼칠 뿐만 아니라 할로테인과 같은 휘발성 마취제를 주입시켰을 때도 이상현상을 초래하며, 소음, 진동, 이동, 수송, 투쟁, 고온 등 다양한 형태의 환경 스트레스 인자에 노출되었을 때 흥분, 불안 및 긴장이 고조된 상태에서 일련의 거부반응 증상을 표출한다. 이처럼 PSS 유전인자를 보유하고 있는 개체에서 생산된 PSE 돈육은 주유전자인 할로테인 유전자의 유무에 의하여 결정되므로 그 존재여부는 할로테인 가스 측정기나 최근에 개발된 DNA 검사방법으로 간단하게 검출하여 제거할 수 있게 되었다[3]. 그러나 할로테인 검사방법은 열성의 동형접합체 개체를 확인하는데는 효과적이지만 이형접합체와 정상의 동형접합체 개체간의 구별은 불가능하다[5].

한편, 근육의 수축과 대사작용에 중요한 역할을 하는 Ca^{2+}은 skeletal muscle ryanodine receptor인 RYR1 유전자에 의해서 분비가 조절되지만 이 유전자가 비정상적일 경우 세포간의 Ca^{2+} 분비가 제대로 안되어 신체운동이 원만하지 못하게 되기 때문에 악성고열증(malignant hyperthemia) 증상을 나타낸다[1]. 따라서 이 유전형질을 제거하려는 노력이 많이 시도되었으며, 다른 한편으로 PSS 유전자를 가진 개체가 정상인 개체보다 육량 증진 효과를 보이기 때문에 이를 이용하려는 연구도 또한 많이 시도되어 왔다[6, 7]. RYR1 유전자와 HAL(할로테인)유전자는 제6번 상염색체상에 있는 열성 유전자로서 스트레스 유전자(stress gene), 할로텐 유전자(halothane gene), 할 유전자(hal gene) 또는 돼지 스트레스 증후군 유전자(PSS gene)로 부르는데, 근육형이면서 스트레스 증후를 나타내는 돼지의 경우 소위 RYR1 이라고 부르는 근소포체의 calcium release channel(CRC) 결함과 밀접하게 관련되어 있다는 사실이 확인되었다[6]. 따라서 돼지 골격근에 있어 Ca^{2+} 방출통로(CRC)로서 기능을 담당하고 있는 RYR1 유전자는 악성고열증과 관련되어 있을 뿐만 아니라 PSS 인자와도 밀접한 관계를 맺고 있어 스트레스 감수성 유전인자의 검색을 위해서는 RYR1 유전자의 점돌연변이를 검출할 필요가 있다. PSS의 유전적 결함은 RYR1의 cDNA상의 1,843번째에 cytosine 염기가 thymine 염기로 치환(C →T)되므로써 615번째 아미노산의 arginine이 cystein으로 변화되어 발생한다[7, 8].

최근에 PSS의 세포유전학적 요인에 의한 RYR1 유전자의 단일 염기 돌연변이가 밝혀지면서 Fujii *et al*[5]이 PCR-RFLP 기법을 이용하여 PSS와 직접적으로 관련되어 있는 RYR1 유전자의 1843번째 염기서열 치환에 따른 유전자 돌연변이를 검출한 이후 DNA의 분자수준에서 PCR-RFLP 기술을 이용하여 스트레스 감수성 돼지의 조기 진단이 가능해졌다.

우리나라는 PSS가 양돈산업에 미치는 영향이 심각함에도 불구하고 이들 열성 불량유전형질의 색출을 위한 검사기술 개발, 스트레스 감수성 유전인자 보유실태 및 산업적 실용화를 위한 연구가 미흡한 실정이다. 따라서 스트레스에 의한 돼지 폐사율을 크게 줄이고 고품질 돈육생산을 통한 양돈농가의 경쟁력 제고를 위하여 스트레스 감수성 돼지에 대한 검색기술 개발과 함께 각종 스트레스 인자가 스트레스 감수성 돼지에 미치는 영향에 관한 연구는 중요한 과제라고 할 수 있다. 지금까지 국내에서는 주로 혈액을 이용하여 RYR1 유전자 돌연변이를 검출하였으나 혈액보다 채취하기가 훨씬 용이하고 돼지에게 가해지는 스트레스로 줄일 수 있도록 모근을 이용하여 이를 검출할 수 있는 방법을 국내에서는 처음으로 적용하였기에 이를 보고하고자 한다[12,13].

재료 및 방법

공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 종돈장으로부터 종돈능력 검정을 위해 출품된 종돈 총 100두(대요크셔 45두, 랜드레이스 38두, 듀록 17두)와 강원도와 경기도 일대의 양돈장에서 사육관리되고 있는 교잡종 돼지 총 100두로부터 채취한 모근(각 두당 3~5개)을 공시재료로 이용하였다.

Genomic DNA의 분리 및 정제

각 검정대상 공시돈으로부터 채취한 모근의 genomic DNA의 추출은 Trommelen *et al*[9]의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉 두당 3~5개의 모근을 100% 에탄올에 10초간 담근 후 3차 증류수를 이용하여 수세하고 1.5㎖ effendorf tube에 옮겼다. 여기에 150㎕의 extraction buffer(Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5% SDS)와 proteinase K(500㎍/ml)를 첨가하고 65℃에서 10시간정도 배양한 후 4℃에서 원심분리기를 이용하여 12,000rpm 속도로 10분간 원심분리하였다. 상청액에 phenol:chloroform:isoamylalchol(25:24:1)을 동량 섞어 4℃에서 14,000rpm 속도로 원심분리한 다음 상청액에 다시 chloroform : isoamylalchol(24:1)을 동량 첨가한 후 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 DNA

481 gg ctg cat ata cac gtc cag ttt gcc aca ggt cct acc agt ccc cac tga aat taa tta t

↑**RYR1-F primer**

541 tt cta acc acc tca tgt atg gac aac atc cac ctg gcc ccg aag atg cac gtt ggt gac c

601 cc cgc cca tcc aga acc tcg tct tgg tct ccg tgc tct cgc act gac ccg gcc ttt cac t

661 ct tgc ctc cga ctt ctc acc cct tgc tcc cgt ctc tcc ttt cct cct ctg ctg atg ccc g

721 at ccc atc cct cac agc ccc ctg cgt ctc acc aga cct ttc tct ttg acc ttg atc tcc c

781 tg tgt cat ccc tga cct tcc cgc ttt cac cac ctc ttc tca gtc aca tcc cca cct ccc a

841 cc ctg gga cat cat cct tct ggc ttc cca ccc tgg gtc ttc cat gga cca cac cct ccc c

901 gc aag tgc cct cac acc ttg acc tct gac ctt gac ccc tag gtg ctg gat gtc ctg tgt t

990 ↓***Cfo I***

961 cc ctg tgt gtg tgc aat ggt gtg gcc gtg cgc tcc aac caa gat ctc att act gag aac t

Val Ala Val Arg Ser Asn Gln

1021 tg ctc cct ggc cgc gag ctt ctg ctg cag aca aac ctc atc aac tat gtc acc agg tct g

1081 gc ccc cca acc ttt gac ccc aga gct tag aac cct cca cca ccc cgc ccc gac tca gag a

↑**RYR1-R primer**

1141 ct cca ctc cgg tga atg gcc ctt cct ccg tcc ccc acc ccc gga ctt aat gcc agt ccc c

Fig 1. Partial sequence of ryanodine receptor gene. The site of RYR1 primer sequence is underined, and the point mutation site is shown by an vertical arrow.

농도를 정량한 후 PCR에 이용하였다.

RYR1 primer의 설계 및 합성

PCR primer의 설계는 Fig 1에서 보는 바와 같다. Fig 1은 돼지의 calcium release channel인 RYR 1 gene으로 exon과 intron을 포함한 총 1,568bp 중에서 primer 제작에 필요한 481bp에서 1,170bp 부위를 나타내고 있다. 화살표가 가리키는 990bp 부분의 C가 T로 치환됨으로써 PSS 돈이 발생하게 된다. 따라서, 990bp 부분이 C가 T로 치환된 것을 확인하기 위하여 다음과 같은 RYR1-F와 RYR1-R 두 개의 primer 조합을 설계하고 합성하였다.

PCR 기법에 의한 RYR1 유전자의 증폭

RYR1 유전자의 PCR 증폭을 위한 반응조건은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer Cetus, Foster City, California, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5㎖ tube에 template DNA 50~80ng, primer 각 0.5 ㎛M, dNTP 각 200 ㎛M, 10× PCR buffer 그리고 *Taq* DNA polymerase 1 unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20㎕로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94℃에서 5분간 예비가열 후 94℃에서 1분, 67℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간의 cycle을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72℃에서 5분간 가열하고 DNA 증폭과정을 종료하였다.

제한효소 처리에 의한 DNA 절단 및 전기영동

PCR 종료 후 RYR1 유전자(659bp)의 제한효소 처리는 5㎕의 증폭산물에 5 unit의 *Cfo I* (Boehringer Mannheim) 제한효소를 이용하여 37℃에서 3시간 이상 반응시켜 절단했다. 제한효소로 절단하여 얻어진 DNA 단편을 TBE buffer(90mM tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0)를 이용한 2% agarose gel로 전기영동하여 분리한 후 ethidium

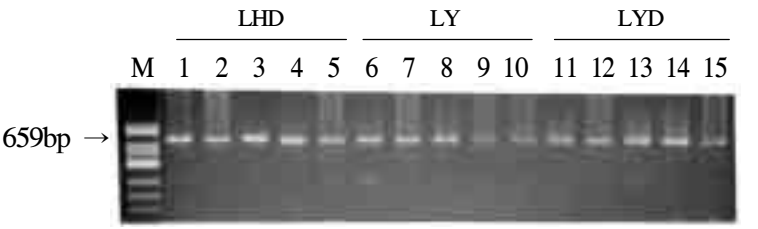

Fig 2. Banding patterns of PCR products with RYR1 specific primer by 2% agarose gel electrophoresis in crossbred pigs. Lane 1~15 ; 659bp PCR products with RYR1 gene.
M : molecular size marker(φX-174/Hae III marker). LHD : Landrace × Hampshire × Duroc, LY : Landrace × Yorkshire, LYD : Landrace × Yorkshire × Duroc.

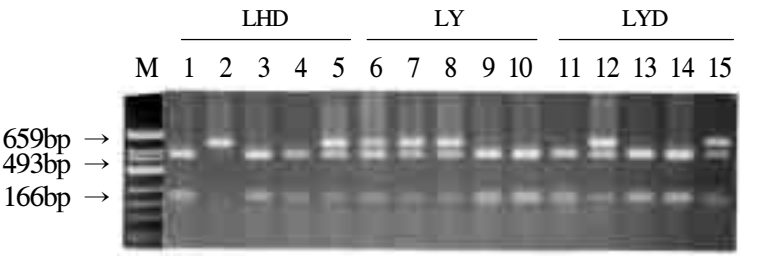

Fig 3. Banding patterns of RYR1 DNA digested with *Cfo I* by 2% agarose gel electrophoresis in crossbred pigs. Lane 1, 3, 4, 9, 10, 11, 13 and 14 ; RYR1 N/N genotypes, Lane 2 ; RYR1 n/n genotypes, Lane 5, 6, 7, 8, 12 and 15 ; RYR1 N/n heterozygote genotypes. M : molecular size marker(φX-174/Hae III marker). LHD : Landrace × Hampshire × Duroc, LY : Landrace × Yorkshire, LYD : Landrace × Yorkshire × Duroc.

bromide 용액으로 염색하여 UV 상에 발현된 DNA band 양상을 관찰하고 각 개체별 PSS 유전자형을 판정하였다.

결 과

PCR-RFLP 방법으로 PSS를 유발하는 ryanodine receptor 유전자의 단일 염기돌연변이(C →T)인 990번째를 포함하는 염기배열을 갖는 primer를 이용하여 RYR1 유전자 좌위를 증폭한 PCR 결과는 Fig 2와 같다. 또한, PCR 반응에 의해 증폭된 659bp의 RYR1 유전자 좌위의 PCR 증폭산물을 *Cfo I* 제한효소를 이용하여 절단한 다음 그 다형성을 확인하기 위하여 agarose gel 전기영동법으로 검출한 RFLP 양상은 Fig 3과 같다. Fig 3에서 보는 바와 같이 제한효소 *Cfo I*(G/CGC)으로 절단하였을 때 돌연변이 유전자가 존재하지 않는 정상의 개체(NN)에서는 493bp와 166bp 2개의 band가 검출되었다. 그러나 돌연변이 유전자를 동형접합체 상태로 보유하고 있는 PSS 감수성 개체(nn)는 C → T의 염기치환으로 *Cfo I* 제한효소의 인자부위가 존재하지 않아 659bp의 단일 band만이 검출되었고 한편, 돌연변이 유전자를 이형접합체 상태로 보유하고 있는 헤테로(잠재성) 개체(Nn)는 정상 유전자와 PSS 유전자를 절반씩 가지므로 493bp와 166bp 2개의 band 이외에 *Cfo I* 제한효소에 의해 인식되지 않는 659bp band까지 3개의 band가 모두 검출되었다.

이상과 같이 비육용 교잡돈을 대상으로 *Cfo I* 제한효소를 이용하여 RYR1 좌위의 PCR-RFLP 유전자형 및 유전자 출현빈도를 분석한 결과는 Table 1과 같다. 즉, 국내 비육용 교잡돈 100두에서 NN, Nn 및 nn 3종류의 유전자형이 확인되었으며, 이 가운데 정상 즉, PSS 저항성 개체가 전체의 81두(81.0%)로 매우 높은 출현율을 보인 반면 이형접합체의 잠재성 개체가 15두(15.0%)였고, PSS 감수성 개체의 출현 비율은 4두(4.0%)로 출현빈도가 매우 낮았다.

또한, 돼지 품종별 PSS 유전자형 출현빈도는 Table 2와 같다. 대요크셔는 헤테로가 18.0%, PSS인 개체는 4.0%를 나타내었으며, 듀록은 헤테로가 11.8%로 나타났지만 PSS인 개체는 검색되지 않아 매우 낮은 PSS 유전자의 비율을 나타냈다. 그러나, 랜드레이스는 헤테로 31.6%, PSS 13.2%로 매우 높은 비율의 PSS 유전자를 보유하고 있음을 알 수 있었다.

한편, PSS를 유발하는 RYR1 유전자의 유전자형과 30㎏ 도달일령, 90㎏ 도달일령 및 일당증체량간의 연관성

Table 1. Distribution of RYR1 genotype determined by PCR-RFLP technique in commercial crossbred population

Breed	No. of pigs	Genotype*			Gene frequency**		Predicted frequency of genoype		
		NN	Nn	nn	p	q	p^2	2pq	q^2
Crossbred	100	81(81.0)***	15(15.0)	4(4.0)	0.900	0.100	81.0	18.0	1.0

*Genotype determined by PCR-RFLP for the RYR1 locus. NN : normal, Nn : heterozygous, nn : mutant homozygous(PSS)
**p = N frequency and q = n frequency
***Numbers in parentheses are the percentage of pigs.
χ^2-test showed the evidence that the population was in Hardy-Weinberg equilibrium with respect to predicted frequency($P < 0.05$).

Table 2. Distribution of genotype determined by PCR-RFLP within breeds

Breed	No. of Pigs	Genotype*			Gene frequency**		Predicted frequency of genoype		
		NN	Nn	nn	p	q	p^2	2pq	q^2
L Yorkshire	45	35 (78.0)[3]	8 (18.0)	2 (4.0)	0.87	0.13	76.0	23.0	1.0
Landrace	38	21 (55.3)	12 (31.6)	5 (13.2)	0.71	0.29	50.4	41.2	8.4
Duroc	17	15 (88.2)	2 (11.8)	0 (0.0)	0.94	0.06	88.4	11.2	0.4

*Genotype determined by PCR-RFLP for the RYR1 locus. NN : normal, Nn : heterozygous, nn : mutant homozygous(PSS)
**p = N frequency and q = n frequency
***Numbers in parentheses are the percentage of pigs.
χ^2-test showed the evidence that the population was in Hardy-Weinberg equilibrium with respect to predicted frequency($P < 0.05$).

Table 3. Least squares means of Ages and average daily gain for RYR1 genotypes in commercial crossbred pigs

Genotypes	Age at 30㎏(day)	Age at 90㎏(day)	Average daily gain(g)
Normal(NN)	$73.9^{a} \pm 1.08$	$141.7^{a} \pm 1.75$	$875.3^{a} \pm 15.00$
Heterozygote(Nn)	$75.3^{ab} \pm 1.21$	$143.8^{a} \pm 1.87$	$871.2^{a} \pm 16.27$
PSS(nn)	$78.0^{b} \pm 1.97$	$152.7^{b} \pm 3.21$	$796.7^{b} \pm 26.26$

a, b : Means in the same row with different superscripts are significantly different($P < 0.05$).

을 분석한 결과는 Table 3과 같다.

RYR1 유전자형과 30kg 도달일령, 90kg 도달일령 및 일당증체량과의 연관성 분석에서 30kg 도달일령과 90kg 도달일령은 RYR1 유전자 좌위의 정상개체(NN), 헤테로(잠재성) 개체(Nn) 및 PSS 감수성 개체(nn) 유전자형이 각각 73.9, 75.3 및 78.0과 141.7, 143.8 및 152.7로 나타났으며, 30㎏ 도달일령과 90㎏ 도달일령은 PSS 개체(nn)가 정상개체(NN)에 비하여 현저하게 늦은 경향을 보였다. PSS 개체와 정상개체간 차이는 30㎏ 도달일령, 90kg 도달일령과 일당증체량에서 통계적 유의성이 있었으며 PSS 개체와 잠재성 개체간의 차이는 일당증체량과 90㎏ 도달일령에서 통계적 유의성이 있었다($P < 0.05$). 이상의 결과를 종합해 볼 때 돼지의 30kg 도달일령과 90kg 도달일령은 PSS 개체(nn)가 정상개체(NN)에 비하여 유의적으로 늦었고, 일당증체량에서는 정상개체(NN)가 PSS 개체(nn)에 비하여 유의적으로 높았다.

고 찰

스트레스 감수성 돼지가 스트레스 인자에 노출되면 호흡 곤란증, 창백한 피부와 붉은 반점의 충혈 및 체온의 급상승 등 대표적인 증상이 인정되며 특히, 일반적인 질환에 감염되지 않았어도 돌연 폐사를 일으키는 주요 원인으로 지적되고 있다[10]. 스트레스에 의한 폐사는 도축전 어느 시기에도 발생이 가능하며 폐사하지 않을 경우라도 스트레스에 의한 근육조직내 젖산의 과잉축적으로 인한 산중독현상을 초래하며 이로 인해 도축 후 육질이 현저히 저하되는 PSE돈육을 생산하게 된다[4]. 미국의 경우에도 유통 판매되고 있는 돈육의 약 8~10% 가 PSE육으로 추정되고 있다[10].

PSS 돼지의 발생율은 부분 또는 완전 무창돈사 형태의 수용시설을 이용하여 사육하거나 사료 효율 개선과 과도한 돈육축적을 도모하기 위하여 강력한 유전 선발을 실시하는 경우에 보다 높은 경향을 나타내고 있으며 또한 돼지 집단내 스트레스 감수성 유전인자의 잠복비율이 높을수록 스트레스에 의한 피해가 비례적으로 급증 확산되고 있다[7,8,10,16].

PCR-RFLP 기법을 이용하여 RYR1 유전자 돌연변이를 진단한 결과 정상개체가 전체의 81두(81.0%)로 매우 높은 출현율을 보인 반면 헤테로(잠재성) 개체가 15두(15.0%)였고, PSS 감수성 개체의 출현 비율은 4두(4.0%)로 출현빈도가 매우 낮았다. 이러한 연구 결과를 국내외 연구자들의 PSS에 관한 연구결과와 비교하여 보면 약간 높은 수치였다[7,8,11,12,13].

최근까지 국내외 연구자들의 PSS에 관한 연구결과를 살펴보면 Houde *et al*[7,8]은 랜드레이스, 듀록 및 대요크셔에 대한 유전자형 분석결과 헤테로가 각각 27.3%, 3.2% 및 17.9%, PSS가 각각 1.4%, 1.6% 및 1.9%로 나타났음을 보고하였고, Knorr *et al*[11]은 German landrace, Pietrain 및 Large white에서 헤테로가 각각 53.1%, 1.5% 및 1.8% 였고, PSS가 각각 19.6%, 98.5% 및 0.0%로 보고하였다. 한편, 국내에서는 박 등[12]이 랜드레이스, 대요크셔 및 듀록에서 헤테로 및 PSS가 각각 38.7%, 18.0% 및 4.3%와 8.1%, 1.6% 및 0.0%로 나타났음을 보고하였고, 정 등[13]은 비육용 교잡종 돼지에서 헤테로가 21.6%, PSS가 4.8%로 나타났음을 보고하였다.

한편, RYR1 유전자와 증체량과의 연관성 분석에서 Christian[4]은 RYR1 유전자의 PSS 개체(nn)가 정상개체(NN)보다 일당 증체량이 떨어진다고 하였으며, Berger *et al*[14]은 RYR1 유전자 좌위의 헤테로 개체(Nn)의 유전자형이 정상개체(NN)의 유전자형보다 평균 일당증체량이 낮아 통계적 유의성이 인정된다고 보고하였다. O'Brien *et al*[15]과 Leach *et al*[16]은 헤테로 개체(N/n)의 유전자형이 정상개체(NN)의 유전자형보다 사료효율이 높아 유의수준 0.05%에서 통계적 유의차가 인정된다고 하였으며, Wittmann *et al*[17]과 Hanset *et al*[18]은 헤테로 개체가 정상개체나 PSS 감수성 개체보다 평균 일당증체량이 높을 뿐만 아니라 육질에 영향을 미친다고 보고하였다. 본 연구의 결과를 외국의 경우와 비교하여 보면 PSS 유전자형 발생 비율이 다소 높은 것을 알 수 있었는데, 이러한 결과는 우리나라 비육돈의 생산방식이 대부분 대요크셔, 랜드레이스 및 듀록의 3개 품종을 이용한 3원 교잡종 돼지를 생산하고 있기 때문에 이들 3품종의 평균 PSS 유전자 출현빈도와 큰 차이가 나지 않는 것으로 판단된다.

일반적으로 PSS 유전자의 출현율은 품종에 따라 많은 차이를 보이는데 특히, Pietrain 종에서 PSS 유전자의 출현 빈도가 상당히 높은 것으로 알려져 있으며 이외에 랜드레이스종이 타 품종에 비해 상대적으로 높은 것으로 보고되어져 있다[7,8,11,12].

앞으로 이 기술을 이용하여 국내 종돈장 및 일반 양돈장에서 보다 쉽게 PSS 유전인자 보유 돼지를 검출함으로써 생산성 향상 및 PSE 돈육의 발생을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 PCR-RFLP 기법을 이용하여 국내 일반 양돈장에서 사육 관리되고 있는 비육용 교잡돈 집단의 PSS 유전자 출현빈도를 파악하여 PSE 돈육 발생을 억제하므로써 육질 개량 및 고품질 돼지고기 생산을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

PSS의 원인이 되는 ryanodine receptor 유전자의 단일염기 돌연변이(C →T; Arg →Cys)를 포함하는 659bp 영역을 PCR로 증폭한 후 *Cfo I* 제한효소로 처리하므로써 검정 개체의 DNA 유전자형을 판정하였다. 정상개체(NN)는 493bp와 166bp 2개의 DNA 단편이 검출되었으나 돌연변이 유전자를 동형접합체로 가지고 있는 PSS 감수성 개체(nn)는 659bp의 단일 밴드만이 검출되었다. 그리고 이형접합체의 잠재성 개체(Nn)는 659, 493 및 166bp 3개의 밴드가 모두 관찰되었다. 이 실험에 이용된 비육용 교잡종 100두에서 정상 개체가 73.6%였고 이형접합체의 잠재성 개체가 21.6% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 4.8%로 조사되었다.

비육용 교잡종 돼지의 RYR1 유전자형과 30kg 도달일령, 90kg 도달일령 및 일당증체량간의 연관성을 규명하기 위한 분산분석에서 RYR1 nn 유전자형이 NN 유전자

형보다 30kg 도달일령에서 5% 수준에서 유의적으로 높았으나 그외 다른 유전자형은 90kg 도달일령 및 일당증체량에 유의적인 영향을 미치지 않았다.

따라서, 이 연구의 PCR-RFLP 기법을 이용한 DNA 검사 방법은 양돈 산업에서 대단위 집단의 돼지 PSS 유전자 진단에 신속 정확하게 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. MacLennan DH and Phillips MS. Malignant hyperthermia. Science 256:789~794, 1992.
2. Sather AP, Jones SDM, Tong AKW, et al. Halothane genotype by weight interactions on pig meat quality. Can J Anim Sci 71:645~651, 1991.
3. Simpson SP, Webb AJ. Growth and carcass performance of British landrace pigs heterozygous at the halothane locus. Anim Prod, 49:503~509.
4. Christian LL. Inheritance of the porcine stress syndrome. Proc Anim Ind Week, Iowa State Univ. AS~447D, 1977.
5. Fujii J, Otsu K, Zorzaton F *et al.* Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253:448~451, 1991.
6. Rempel WE, Lu MY, Mickelson JR *et al.* The effect of skeletal muscle ryanodine receptor genotype on pig performance and carcass quality traits. Anim Sci 60:249~257, 1995.
7. Houde A, Pommier SA, Roy R. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine populations. J Anim Sci 71:1414~1418, 1993[a].
8. Houde A, Pommier SA. Use of PCR technology to detect a mutation associated with malignant hyperthermia in different pig tissues. Meat Sci 33:349, 1993[b].
9. Trommelen GJM, Den Dass NHG, Vijg J *et al.* Identify and paternity testing of cattle: Application of a deoxyribonucleic acid profiling protocol. J Dairy Sci 76: 1403~1411, 1993.
10. Topel DG, Bicknell EJ, Preston KS *et al.* Porcine stress syndrome. Mod Vet Pract 49:40, 1968.
11. Knorr C, Schwille M, Moser G *et al.* Calcium-release-channel genotypes in several pig populations associations with halothane and CK reactions. J Anim Breed Genet 111:243, 1994.
12. 박영일, 박태섭, 신영수 등. PCR-RFLP 기법을 이용한 PSS 돼지 검색에 관한 연구. 한국동물유전육종학회지 1:73~80, 1997.
13. 정의룡, 김우태, 김동균. DNA 분석기법을 이용한 PSS 돼지 진단. 생명자연과학논총 4:53~62, 1998.
14. Berger PJ, Christian LL, Louis CF *et al.* Estimation of genetic parameters for growth, muscle quality and nutritional content of meat products for centrally tested purebred market pigs. Research Investment Report, National Pork Producers Council, Des Moines, Iowa. 51~63. 1994.
15. O'Brien PJ, Shen H, Cory CR *et al.* Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome(malignant hyperthemia) in 10,000 breeding swine. J Am Vet Med Assoc 203:842~851, 1993.
16. Leach LM, Ellis M, Sutton DS *et al.* The growth performance, carcass characteristics and meat quality of halothane carrier and negative pigs. J Anim Sci 74:934~943, 1996.
17. Wittmann W, Peschke W, Littmann E *et al.* Mast-und schlachtleistungen von DL-Kastraten in Abhangigkeit von MHS-Genotyp. Zuchtungskunde 65:197~205, 1993.
18. Hanset R, Dasnois C, Scalais S *et al.* Genotypes au locus de sensibilite a halothane et caracteres de croissance et de carcass dans une population F2 pietrain × Large White. Genet Sel Evol 27:63~76, 1995.