

종돈의 모근 Genomic DNA를 이용한 스트레스 증후군 검색

김계웅^{1†} · 김진우 · 유재영 · 박홍양

건국대학교 축산대학 축산학과

Detection of Porcine Stress Syndrome from Genomic DNA of Hair Follicle by PCR-RFLP in Breeding Pig

Kim, G. W.^{1†}, J. W. Kim, J. Y. Yoo and H. Y. Park

Dept. of Animal Husbandry, College of Animal Husbandry, Konkuk University.

ABSTRACT

This study was carried out to investigate PSS (Porcine Stress Syndrome) with the PSE (Pale, Soft, Exudative) in 319 different pigs (Yorkshire 150; Landrace 89 and Duroc 80). The PCR-RFLP method was adapted to detect the ryanodine receptor (RYR 1) gene mutation and to estimate the genotype frequency of the RYR1 gene in breeding pig population. The DNA samples were collected from hair follicles of pigs of Yorkshire, Landrace and Duroc. After DNA amplification by PCR, the PCR products were digested by restriction enzyme, *Cfo* I. Primary PCR products of ryanodine receptor gene were length of 659 bp in hair follicle and their second PCR products were length of 522 bp in hair follicle. The exon region (522 bp) including point mutation (C→T; Arg→Cys) in the porcine ryanodine receptor gene, which is a causal mutation for PSS, was 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 439 and 83 bp. The mutant homozygous (nn) individuals showed only one DNA fragment 522 bp. In addition, all three fragments (522, 439 and 83 bp) were showed in heterozygous (Nn) carrier animals. The normal homozygous (NN), heterozygous (Nn) and mutant homozygous (nn) were 98.00, 2.00 and 0.00% in Yorkshire pigs, 87.64, 11.24 and 1.12% in Landrace, 100.00, 0.00 and 0.00% in Duroc, respectively. The gene frequencies of N and n were 0.990 and 0.010 in Yorkshire pigs, 0.933 and 0.067 in Landrace, 1.000 and 0.000 in Duroc, respectively.

(Key words : Porcine stress syndrome, Genomic DNA, PSE, PCR-RFLP, Genotypes)

I. 서 론

돼지는 여러 스트레스 인자에 감수성이 대단히 높은 동물로서 스트레스에 대하여 특이적으로 민감하게 반응을 보이는 병적 현상을 나타내는데, 이러한 증상을 돼지 스트레스 증후군(Porcine Stress Syndrome; PSS)이라 한다. PSS 돼지는 스트레스 감수성 유전자가 homozygous한 돼지로 밀사, 온도, 외부적 자극, 취급상의 부주의, 수송 등에 의해 근육강직, 체온의 상승, hypermetabolism, 세포내 이온 불균형 등의 증상을 초래하여 폐사하거나, 도축시에는 육질이 저하되는 PSE

(Pale, soft, Exudative) 돈육이 생산된다고 하며, 이러한 PSE 돈육의 특징은 육색이 창백하고 조직이 힘이 없으며, 육즙이 스며 나오고 신선육으로서 맛이 없을 뿐만 아니라 소비자의 구매 의욕을 저하시키며, 가공시에는 결착력이 떨어지고, 유통 도중에 정상 돈육 보다 1~4% 육질 손실이 발생할 뿐만 아니라 경제적인 손실을 유발한다고 보고하고 있다 (MacLennan 등, 1992; 박 등, 1998; 윤, 2002; Simpson과 Webb, 1989; 황 등, 2002).

이러한 PSS돼지의 검색은 할로텐 가스(halothane gas)를 돼지에 흡입 마취시켜 후지의 강직 여부를 구분하는 실험방

[†] Corresponding author : Tel: 041-330-1245, E-mail: kimgoong@kongju.ac.kr

¹ 공주대학교 산업과학대학 동물자원학과(Dept. of Animal Resource Science, Kongju National University).

법(Webb과 Jordan, 1978 ; Simpson 과 Webb, 1989)을 사용하였는데, 이는 체중 15 kg 내외(7~8주령) 자김계웅 등:종돈의 모근 Genomic DNA를 이용한 스트레스 증후군 검색돈을 대상으로 할로텐 가스 농도 5%에서 1분간, 3%에서 2분간 마취시키는 방법으로 이때 후지가 강직되면 할로텐 양성(halothane positive, H⁺H⁺)이고, 이완상태이면 할로텐 음성(halothane negative, H⁻H⁻)로 판별하는 것으로 숙련된 조사자에 의해 95% 이상 식별 가능하지만 많은 연구결과 다른 요인에 의해 많은 영향을 받아 정확도가 낮은 단점이 있어 왔다.

1990년대 들어서 분자생물학의 발전에 의해 DNA 수준에서 여러 접근방법에 의해 실용화되고 있는데, 돼지 스트레스 증후군 유전자와 연관성이 높은 할로텐 유전자를 밝혔는데, 이는 염기서열 중 1843번째 단일염기 돌연변이에 의해 615번째 아미노산의 arginine이 cysteine으로 변화되어 과다하게 생성된 젖산에 의해 근육세포내의 pH는 떨어지게 되며, 이러한 결과는 다른 연구자들에 의하여 재확인되었으며(Fill 등, 1990; Fujii 등, 1991; Harbitz 등, 1992; Hughes 등, 1992; Vogeli 등, 1994), 이러한 단일 염기 돌연변이를 돼지에 전혀 해를 끼치지 않고 유전자를 검색할 수 있는 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism)라는 방법이 있는데, 이러한 스트레스 감수성 돼지를 구별하는 유전자의 표현양식은 정상인 돼지의 경우 정상(HH), 이형접합체(Hh), 그리고 열성동형접합체, 즉 스트레스 감수성 돼지(hh)로 나타내고 있다. 일반적으로 혈액이나 조직에서 DNA를 추출하던 것을 최근에는 모근을 통해 간편하게 DNA를 얻어 실험할 수 있게 되었다(Fujii 등, 1991, 윤, 2002). 돼지 스트레스 증후군 유전자에 대한 헤테로(Hh)의 발생비율은 15~20%, 열성 동형접합체는 1.5~2% 정도 발생되고 있다(윤, 2002). 최근의 PCR-RFLP 기법을 이용하여 유전자형에 따라서 암수별로 구분하여 발생률을 연구한 결과 돌연변이 돼지(hh)는 0.2%, 헤테로(Hh)는 12%, 정상(HH)돼지는 87.8%이었는데, 돼지 스트레스 증후군의 품종별 발생빈도는 국내의 경우 듀록 품종에서는 정상돈 95.7%, 이형접합체 돈은 4.3%를 나타냈으며, 요크셔 품종의 경우는 정상돈 80.4%, 이형접합체 돈은 18.0%, 열성 동형접합체 돈은 1.6%를 나타냈으며, 랜드레이스 품종의 경우 정상돈 53.2%, 이형접합체 돈은 38.7%, 열성 동형접합체 돈은 8.1%를 보여 랜드레이스종에서 가장 높게 나타났다고 보고하였다(박 등, 1997).

본 연구는 우리나라에서 사육되고 있는 순종종돈 Yorkshire 종 150두, Landrace 종 89두, Duroc 종 80두, 총 319두를

대상으로 모근에서 채취한 DNA를 이용하여 PCR-RFLP 방법으로 스트레스 증후군 유전자인 ryanodine receptor의 품종별 출현율을 검색하여 우량한 종돈을 선발하기 위한 기초적 자료를 얻기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 모발채취

본 연구에서 사용된 공시축은 충남 소재의 S 종돈장과 경기도 소재의 K 종돈장에서 사육되고 있는 순종 Yorkshire 종 150두, Landrace 종 89두, Duroc 종 80두의 총 319두를 공시축으로 선정하였다.

선정된 공시동물로부터 손상되지 않도록 주의하여 모발을 채취하였고 모근 부위의 genomic DNA의 손상을 방지하기 위하여 100% ethanol에 침지하여 운반한 후 4℃에서 보관하였다.

2. DNA extraction

채취 후 4℃에서 보관된 모발을 100% ethanol에 2회 세척한 후 증류수에 1회 세척을 실시하였으며 모근 부위를 절단하여 게놈 DNA 추출용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 39 mM DTT, 200μL/mL Proteinase K, 2.0% SDS)을(Uchihashi 등, 1992 ; Richards 등, 1993) 약 10개의 모근 당 게놈 DNA 추출용액 500 μL을 첨가한 후 56℃에서 18시간 동안 digestion 하였다. 이후 동량의 phenol/chloroform (1:1)을 첨가한 후 상등액을 회수하였으며, 회수된 상등액에 2.5배 부피의 100% ethanol과 1/10배 부피의 3M sodium acetate, pH 4.5와 혼합하였고, -70℃에서 2시간 이상 정지시킨 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리를 실시하여 pellet 상태의 침전물만을 남기고 다른 혼합액들을 제거 한 후 70% ethanol과 혼합한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 DNA를 회수하고, 20 μL의 3차 증류수와 혼합하여 용해시킨 후 PCR 증폭 시까지 -70℃에서 보관하였다.

3. Primer 제작

모근을 포함하는 모발에서 추출한 게놈 DNA를 사용하여 RYR 1 유전자의 절편을 증폭하기 위한 프라이머의 염기서열 설정은 RYR 1 유전자의 돌연변이가 위치한 cDNA의 1843번째 염기(Gene Bank accession number : 164647, 1769446, 164645)가 중합효소 연쇄반응 산물내에 포함될 수 있도록 설정하였다. 이러한 primer쌍은 제 1차 PCR인 primary PCR

Table 1. Primer pairs sequence of ryanodine receptor gene

Name of primer	Sequences	Size of products
Primary PCR		659bp
P-1	5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCA-3'	
P-3	5'-ATTCACCGGAGTGGAGTCTCTGAG-3'	
Nested PCR		522bp
P-4	5'-CATGTATGGACAACATCCACCT-3'	
P-5	5'-CTGGTGACATAGTTGATGAGGT-3'	

증폭과정에 사용된 프라이머는 Table 1에서 나타난 바와 같은 구조로 되어있는 Vogeli 등(1994)이 보고한 프라이머를 사용하였으며, nested PCR에서 사용된 프라이머는 우(2000)와 윤(2003)이 사용한바 있는 primer쌍으로 이는 품종간 또는 개체간에 알려진 돌연변이 염기가 존재하지 않는(Fujii 등, 1991) 염기서열을 갖는 부위를 선택하여 사용하였다.

4. RYR1 유전자 증폭을 위한 PCR 반응조건

RYR1 유전자의 PCR 증폭을 위한 반응조건은 다음과 같다. GeneAmp PCR System 9700 (Perkin-Elmer Cetus, Foster City, Clifornia, U.S.A.)을 이용하여 실시하였다. 즉 primary PCR의 경우 반응액은 0.5 ml tube에 template DNA, primer P-1과 P-3을 각각 2.0 μ l, dNTPs 2.0 μ l, MgCl₂ 최종농도를 1.5 mM로 조절하였고, 10 X buffer(Mg⁺⁺ free) 2.5 μ l 그리고 Taq DNA polymerase 1.25 units를 첨가하여 PCR 반응액을 총 25 μ l로 조정하였다. PCR cycle은 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing 59 $^{\circ}$ C에서 1분, extension에서 72 $^{\circ}$ C 1분간의 cycle을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 polymerization 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열하고 DNA 증폭과정을 종료하였다.

Nested PCR은 반응액을 0.5 ml tube에 template DNA를 primary PCR 산물 2.0 μ l로 사용하였고, primer P-4과 P-5를 사용하여 PCR 반응액을 총 25 μ l로 조정하고, PCR cycle은 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing 47 $^{\circ}$ C에서 30초, extension에서 72 $^{\circ}$ C 1분간의 cycle을 총 30회 반복한 다음 마지막으로 polymerization 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열하고 DNA 증폭과정을 종료하였다.

5. 제한효소 처리 및 전기영동

증폭된 RYR1 유전자의 돌연변이 검사를 위해 GCGC의 염기서열을 인지하는 제한효소 Cfo I(Promega, WI, USA)을 사용하였다. RYR 1 유전자에 있어 스트레스증후군 유전자

는 정상돈의 RYR1 유전자와 비교시 1843번째 염기가 정상돈에서는 시토신으로 존재(GCGC)하나 스트레스증후군의 경우는 돌연변이에 의해 티미딘으로 치환되어(GTGC) 제한효소 Cfo I 처리시 정상돈의 RYR 1 유전자 절편은 제한효소에 의하여 절단되나 스트레스증후군 유전자의 경우는 Cfo I 제한효소에 의해 인지되지 못해 절단되지 못한다.

Cfo I 제한효소 처리는 PCR 증폭산물 15 μ l, Cfo I 효소 5 units, BSA 5 mg을 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 실시하였으며, 제한효소 처리 후 PCR 증폭산물 4 μ l에 해당하는 양을 전기영동 하였다.

PCR 증폭산물을 확인하기 위하여 1.5% agarose gel을 이용하여 확인하였으며, 전기영동 버퍼는 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1.0 mM EDTA)를 사용하였으며, Cfo I 제한효소 처리 후 RFLP 검사를 위한 경우는 2.0% agarose gel에서 전기영동을 실시하였으며, 전기영동을 실시한 후 UV상에서 유전자형의 검사를 실시하였다. 한편 증폭산물과 제한효소 처리 후 절편들의 크기를 측정하기 위하여 size marker로서 1 kb DNA ladder와 100 bp ladder(MBI Fermentas Inc., NY, U.S.A)를 사용하였다.

6. 유전자형 분석

충남 소재의 S 종돈장과 경기도 소재의 K 종돈장에서 사육되고 있는 순종종돈 Yorkshire 종 150두, Landrace 종 89두, Duroc 종 80두, 총 319두의 종돈 모근을 공시재료로 RYR1 유전자형을 분류하여 분석하였다. 집단내의 Hardy-Weinberg equilibrium 통계분석은 Chi-square test를 이용하여 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. PCR 증폭산물

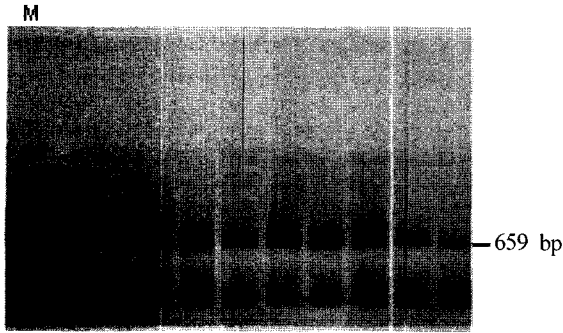


Fig. 1. Primary PCR products of RYR1 from hair follicles of breeding pigs with specific primer P-1, P-3 by 1.5% agarose gel electrophoresis in breeding pigs (M: 100 bp ladder).

PSS 돼지를 유발하는 RYR1 gene의 단일 염기돌연변이 부분을 포함하는 primer(P-1, P-3)를 이용하여 PCR 증폭을 실시한 primary PCR 증폭산물의 결과는 Fig. 1에서 제시한 바와 같다.

Fig. 1에서 보이는 것과 같이 primary PCR 증폭산물은 659 bp의 단일 밴드로 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Table 1에서 보여준 primer(P-1, P-3)를 통하여 예상된 RYR1 부분의 유전자가 증폭되었음을 확인하여 주고 있다. 그러나 primary PCR을 수행한 결과, primary PCR 증폭의 효율성이 낮아 증폭이 잘 이루어지지 않은 것으로 사료되었다.

Primary PCR 증폭의 문제점을 해결하기 위하여 primary PCR 증폭산물을 가지고 nested PCR을 수행한 결과 nested PCR 증폭산물의 결과는 Fig. 2와 같다. 즉 Fig. 2에서 보이는 것과 같이 nested PCR의 증폭산물은 약 522 bp의 단일 밴드로 증폭되었음을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 Table

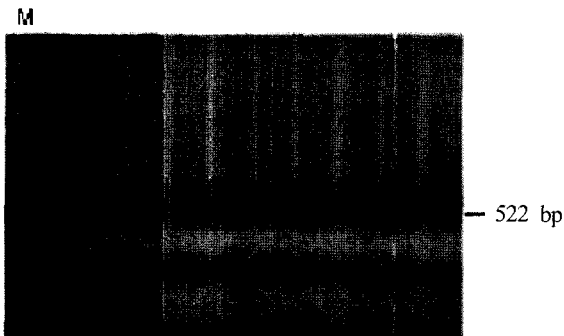


Fig. 2. Nested PCR products of RYR1 from hair follicles of breeding pigs with specific primer P-4, P-5 by 1.5% agarose gel electrophoresis in breeding pigs (M: 1kb ladder).

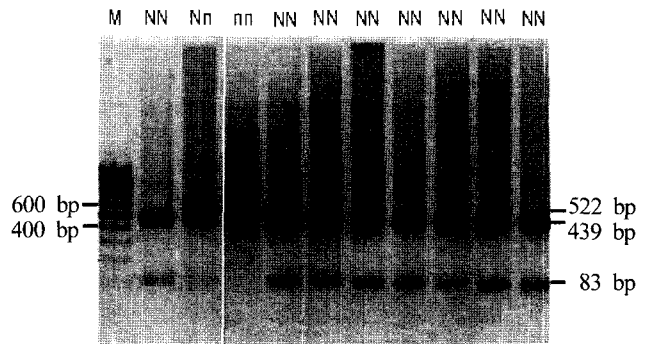


Fig. 3. Banding patterns of RYR1 DNA digested with Cfo I by 2.0% agarose gel electrophoresis in breeding pigs (M: 100bp ladder, NN: normal type, Nn: heterozygous type, nn: recessive homozygous type).

1에서 보여준 primer(P-4, P-5)를 통하여 예상된 RYR1 gene 부분의 유전자가 증폭되었음을 확인시켜 주고 있다. 또한 primary PCR 증폭산물과 비교하여 nested PCR의 증폭 산물은 PSS 검색을 위한 충분한 양의 산물이 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

2. 제한효소 처리에 의한 PSS 유전자 검색

제한효소 Cfo I은 정상인 개체의 RYR 1 유전자의 돌연부위를 인지하여 절단시키며 이때 Cfo I 제한효소가 인지하는 부위는 GCGC로써 모근에서 추출된 DNA의 PCR 증폭 단편을 가지고 Cfo I 제한효소로 digest 하여준 결과는 Fig. 3에서 제시한 바와 같다.

모근에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로 primer P-4과 P-5의 증폭산물을 제한효소 Cfo I으로 처리한 결과는 Fig. 3에서와 같이 정상돈의 경우는 제한효소에 의해 인지되어 RYR 1 유전자의 증폭산물이 절단되어 439 bp, 83 bp의 절편이 형성되며 PSS 잠재돈인 heterozygote의 경우는 522 bp, 439 bp, 83 bp의 세 종류의 절편이 형성되나, PSS 돈의 경우는 Cfo I에 의해 인지되지 않아 522 bp의 PCR 산물이 나타난다.

3. RYR1 유전자형과 유전자 분포

충남 소재의 S 종돈장과 경기도 소재의 K 종돈장에서 사육되고 있는 Yorkshire 종 150두, Landrace 종 89두, Duroc 종 80두의 총 319두의 종돈 모근에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로하여 본 연구에서 설정한 중합효소 연쇄반응 및 Cfo I 제한효소처리 후 전기영동상에서 RYR1 좌위의 유전자형 및 유전자 출현 빈도를 분석한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 품종 구분 없이 319두를 대상

Table 2. Distributions of RYR1 genotypes determined by PCR-RFLP technique in 319 breeding pigs (Yorkshire 150; Landrace 89 and Duroc 80)

Genotype*	Genotype frequency	Gene frequency	Predicted frequency of genotype
NN	95.61 (305)	N 0.9765	p^2 0.9536
Nn	4.08 (13)		$2pq$ 0.0459
nn	0.31 (1)	n 0.0235	q^2 0.0005
Total	100 (319)	- 1.0000	- 1.0000

* NN: normal, Nn: heterozygous, nn: mutant homozygous (PSS).
(): Number of pigs.

으로 분석한 결과는 정상 개체(NN), 헤테로 개체(Nn) 및 감수성 개체(nn) 3종류의 유전자형이 확인되었다. 정상 개체(NN)는 전체 319두 중에서 305두로 95.6%를 보여 매우 높게 출현 하였다. 헤테로 개체(Nn)는 13두로 4.1%를 보인 반면에, 감수성 개체(nn)는 1두 발현으로 0.3%의 매우 낮은 비율로 나타났다. 이러한 결과는 국내에서 박 등(1997)이 품종 구별 없이 정상돼지의 비율은 76.7%, 헤테로 돼지의 출현율은 20.4%, PSS 돼지의 출현 비율이 2.9%이라고 보고한 결과와 황 등(2002)이 정상 돼지 81%, 헤테로 돼지 출현 비율 15%, PSS 돼지 출현 비율 4%로 보고한 결과보다는 헤테로 돼지와 PSS 돼지가 매우 낮게 나타났다. 그리고 외국에서 O'Brien 등(1993)이 정상 돼지의 출현 비율이 80.97%라고 보고한 결과보다도 높게 나타났다.

대립유전자 중 정상유전자인 N 유전자는 0.9765의 높은 빈도로 나타난 반면, PSS 돼지의 발현 열성 유전자인 n 유전자는 0.0235로 매우 낮은 비율로 출현되었다. 이러한 결과는 박 등(1997)이 정상 유전자가 0.869의 빈도로 나타났고, PSS 유전자가 0.131의 빈도로 나타났다고 보고한 결과와 다소 차이를 보였으며, O'Brien 등(1993)이 모든 품종에서 0.101의 비율로 나타났다고 보고한 결과치와도 상이하였다. 이러한 차이는 유전적으로 우수한 정상돼지를 집중적으로 선발하여 열성인 PSS돼지를 지속적으로 도태시킨 결과에 기인하는 것으로 사료된다.

돼지의 품종별 PSS 출현율을 살펴보면 Table 3에서 보는 바와 같다. Yorkshire종 150두에서 정상 개체(NN)는 98.00%(147두), 헤테로 개체(Nn)는 2.00%(3두)였으나, PSS 감수

성 개체(nn)는 전혀 출현되지 않았다. Landrace종에서 정상 개체(NN)는 87.64%(78두), 헤테로 개체(Nn)는 11.24%(10두)가 출현하였으나, PSS 감수성 개체(nn)는 1.12%(1두)가 출현하였다. 그리고 Duroc종에서는 헤테로 개체(Nn)와 PSS 감수성 개체(nn) 모두 출현하지 않았다.

이러한 결과는 국내에서 박 등(1997)이 랜드레이스, 대요크셔 및 듀록에서 헤테로가 각각 38.7, 18.0 및 4.3%, PSS가 각각 8.1, 1.6 및 0.0%로 보고한 결과보다는 Yorkshire 및 Landrace종에서는 낮은 빈도를 보였으며, Duroc종의 PSS 출현빈도는 본 연구와 동일한 0.00%를 보였다. 외국에서 Houde 등(1993)이 랜드레이스, 듀록 및 대요크셔에 대한 유전자형 분석결과 헤테로가 각각 27.3, 3.2 및 17.9%이었고, 또한 PSS가 각각 1.4, 1.6 및 1.9%로 보고한 결과보다 낮게 나타났다. 일반적으로 PSS 유전자의 출현율은 품종에 따라 많은 차이를 보이는데, 그중 특히 Pietrain종에서 PSS 유전자의 출현빈도가 상당히 높게 나타나는 것으로 보고되었고, 이외의 품종에서는 Landrace종에서 타 품종에 비하여 상대적으로 높게 PSS 유전자가 높게 출현하는 것으로 보고되었는데(Houde 등, 1993; 박 등, 1997), 이는 본 연구결과에서 다른 품종에서 보다 Landrace종에서 헤테로 및 PSS 개체가 비교적 높게 나타나 유사한 결과를 보여주었다.

PCR-RFLP방법으로 분석한 결과를 토대로 유전자형 출현 빈도가 품종별 모집단에서 Hardy-Weinberg equilibrium상태에 도달했는가의 여부를 조사하였다. 자유도가 1인 상태에서 $P=5\%$ 값은 3.84이므로 현재의 χ^2 값에 기초한 P 값은 5% 이하가 된다. 따라서 현재의 유전자형 관측치는 유전자

Table 3. Distributions of genotype determined by PCR-RFLP within breeds and statistical test for goodness of fitness by Hardy-Weinberg equilibrium

Genotype	Yorkshire		Landrace		Duroc	
	Observed No.	Expected No.	Observed No.	Expected No.	Observed No.	Expected No.
NN	147 (98.00)	147.01	78 (87.64)	77.41	80 (100.00)	80.00
Nn	3 (2.00)	2.97	10 (11.24)	11.19	0 (0.00)	0.00
nn	0 (0.00)	0.02	1 (1.12)	0.40	0 (0.00)	0.00
Total	150 (100.00)	150.00	89 (100.00)	89.00	80 (100.00)	80.00
χ^2 -values	0.020 ^{NS} (df=1)		0.807 ^{NS} (df=1)		0.000 ^{NS} (df=1)	
Probabilities	0.75 < p < 0.90		0.25 < p < 0.50		p < 0.90	

^{NS} = Non-significant ($p > 0.05$).

() : Number of in parentheses are the percentage of pigs.

형 기대치와 유의성이 없는 것으로 나타나, Hardy-Weinberg 법칙과 일치하여 유전적 평형을 이루고 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 90년대 말 이후 PSS돼지의 우수한 검색방법이 개발되어진 이후 PSS돼지의 강력한 도태(선발)가 이루어져 PSS 유전자를 보유한 돼지가 점차 줄어들었기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여보면, 모근을 이용한 PSS 검색 방법으로 보다 간편히 종돈장에서 PSS 유전인자를 보유한 돼지를 쉽게 검색하여 조기에 종돈수준에서부터 강력한 선발을 하여 PSS 유전인자를 줄여 PSE 돈육의 생산을 효과적으로 예방함으로써 농가의 소득 향상 및 생산성 향상을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구는 319두의 서로 다른 품종에서 PSE육을 생산하는 PSS 돼지 출현빈도를 조사하였다(Yorkshire 150; Landrace 89 and Duroc 80). PCR-RFLP법을 이용하여 돼지의 모근을 DNA sample로 사용하여, PCR로 증폭된 유전자는 Cfo I 제한 효소로 절단하여 종돈에 존재하는 ryanodine receptor (RYR 1) 돌연변이 유전자의 출현빈도를 조사한 결과를 요약

하면 다음과 같다.

모근에서 추출한 DNA를 주형으로 한 Primary PCR을 수행한 결과 ryanodine receptor 유전자 중 659bp의 증폭산물을 얻었으며, second PCR을 수행한 결과에서는 522 bp의 증폭산물을 얻었다. 이 증폭산물은 porcine ryanodine receptor 유전자의 exon 영역 중 PSS를 유발하는 point mutation(C→T; Arg→Cys) 부분을 포함하고 있으므로 Cfo I 제한효소에 의해 분석될 수 있으며, agarose gel 전기영동에 의하여 세 가지의 유전자형으로 분류할 수 있다. 정상 homotype(NN)은 두 개의 DNA band(439, 83bp)로 나타나며, 열성 homotype(nn)은 522 bp의 단일 밴드로 출현한다. 그리고 세 개의 밴드(522, 439 그리고, 83 bp)는 heterotype(Nn)의 잠재성 돼지로 표현된다. Yorkshire종에서는 정상돼지가 98.00%로 나타났으며, hetero 돼지는 2.00% 그리고, PSS돼지는 출현하지 않았다. Landrace 돼지에서는 정상돼지가 87.64%로 나타났으며, hetero 돼지와 PSS돼지가 각각 11.24와 1.12%로 나타났으나, Duroc종에서는 정상돼지(NN)만이 출현하였다. 대립 유전자 빈도는 Yorkshire종은 정상 N유전자가 0.990의 비율로 나타났으며, 열성 n 유전자는 0.010의 비율로 출현하였으며, Landrace종에서는 N유전자와 n유전자가 각각 0.933과 0.067의 빈도로 출현하였으며, Duroc종에서는 N 유전자의 빈도가 1.000의 빈도로 나타났으나, n유전자의 빈도는 0.000의 빈도

로 나타났다. 3품종 집단 모두에서 Hardy-Weinberg 법칙과 일치하여 유전적 평형을 이루고 있었다.

V. 인용문헌

1. Fill, M., Coronado, R., Mickelson, J., Vilven, R. J., Ma, J., Jacobson, B. A. and Louis, C. F. 1990. Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophysical Journal*. 50:471-475.
2. Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., Leon, S. D., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J. and MacLennan, D. H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253: 448-451.
3. Harbitz, I., Kristensen, T., Bosnes, M., Kran, S. and Davies, W. 1992. DNA sequence of the skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg615→Cys615 mutation, association with porcine malignant hyperthermia, in Norwegian Landrace pigs. *Animal Genetics*. 23: 395-402.
4. Houde, A., Pommier, S. A. and Roy, R. 1993. Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine population. *Journal of Animal Science*. 71:1414-1418.
5. Hughes, I. P., Moran, C. and Nicholas, F. W. 1992. PCR genotyping of the ryanodine receptor gene for a putative causal mutation for malignant hyperthermia in Australian pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 109:465-476.
6. MacLennan, D. H. and Phillips, M. S. 1992. Malignant Hyperthermia. *Science*. 256:789-794.
7. O'Brien, P. J., Shen, H., Cory, C. R. and Zhng, X. 1993. 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.
8. Richards, B., Skoletsky, J., Shuber, A. P., Balfour, R., Stern, R. C., Dorkin, H. L., Parad, R. B., Witt, D. and Klinger, K. W. 1993. Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum. Mol. Genet.* 2:159-163.
9. Simpson, S. P. and Webb, A. J. 1989. Growth and carcass performance of British Landrace pigs heterozygous at the halothane locus. *Animal Production*. 49:503-509.
10. Uchihi, R., Tamaki, K., Kojima, T., Yamamoto, T. and Katsumata, Y. 1992. Deoxyribonucleic acid (DNA) typing of human leukocyte antigen (HLA)-DQ1 from single hairs in Japanese. *Journal of Forensic Sciences*. 37:853-859.
11. Vogeli, P., Bolt, R., Fries, R. and Stranzinger, G. 1994. Co-segregation of the malignant hyperthermia and the Arg615-Cys615 mutation in the skeletal muscle calcium release channel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds. *Animal Genetics*. 25:59-66.
12. Webb, A. J. and Jordan, C. H. C. 1978. Halothane sensitivity as a field test for stress susceptibility in the pig. *Animal Production*. 26:157-163.
13. 박영일, 박태섭, 신영수, 이학교, 김형균, 오하식, 손창준, 한재용. 1997. PCR-RFLP 기법을 이용한 PSS 돼지 검색에 관한 연구. *한국동물유전육종학회지*. 1:73-80.
14. 박영일, 한재용, 이수찬, 이일주, 박태섭, 이기영, 신영수, 이학교, 김형균, 오하식, 손창준. 1998. PSS 유전자형이 돼지의 경제형질에 미치는 효과. *한국동물유전육종학회지*. 2:21-26.
15. 우승철. 2000. 돼지 모근을 이용한 PSS 유전자형 결정에 관한 연구. *건국대학교 석사학위 논문*.
16. 윤덕영. 2002. 돼지 모근을 이용한 3단계 PCR-RFLP 방법으로 돼지 스트레스 유전자 검사. *건국대학교 박사학위 논문*.
17. 황의경, 김연수. 2002. PCR-RFLP 기법을 이용한 Porcine Stress Syndrome의 진단. *대한수의학회지*. 42:65-71.

(접수일자: 2004. 2. 4. / 채택일자: 2004. 2. 28.)