

Cloning을 이용한 PSS Hetero 돼지에서의 염기 서열 분석

유재영 · 김계웅[†] · 이종완¹ · 김영봉 · 이정은 · 이동희 · 이희정 · 윤종만² · 박홍양

건국대학교 축산대학 동물생명공학과

초 록

PSS hetero 돼지를 이용하여 PSS와 관련된 유전자를 cloning 하여 유전자 구조를 분석하고 세포내의 유전자의 존재를 확인하여 PSS 돼지의 유전양식을 밝히고자 실시되었고, 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 615번 amino acid 가 N과 n에서 각각 arginine과 cysteine으로 존재함을 확인할 수 있었다. 그리고 6번 염색체(PSS 관련유전자)로부터 우성유전자 N과 열성유전자 n이 각각 유전자 좌위(locus)에 대립 유전자(alleles)로 존재함을 확인할 수 있었으며, 이러한 alleles로 존재함으로써 각각의 유전자가 나뉘어져 유전됨을 알 수 있었다.

(주제어 : Porcine stress syndrome, Hetero, Ryanodine receptor, Cloning, DNA sequencing)

서 론

PSS 돼지(porcine stress syndrome)는 밀사, 온도, 외부적 자극, 취급상의 부주의, 수송 등에 의해 근육강직, 체온의 상승, hypermetabolism, 세포 내 이온 불균형 등의 증상을 초래하여 폐사하거나, 도축 시에는 육질이 저하되는 PSE(pale, soft, exudative) 돈육이 생산되어 농가의 경제적 손실을 유발되어 지는 돼지로 알려져 있다(윤, 2002; 김 등, 2003; 김 등, 2004). 이러한 PSS 돼지에서 연관성이 높은 6번 염색체의 ryanodine receptor gene(RYR1) 좌위의 1843번째 단일염기 돌연변이에 의해 615번째 아미노산의 arginine이 cysteine으로 변화되어 과다하게 생성된 젖산에 의해 근육세포내의 pH는 떨어지게 된다고 알려져 있다(Harbitz 등, 1990; Fujii 등, 1991; Harbitz 등, 1992; Hughes 등, 1992; Vögeli 등, 1994).

스트레스 감수성 돼지를 구별하는 유전자의 표현양식은 정상인 돼지의 경우 정상(HH), 이형접합체(Hh), 그리고 열성동형접합체, 즉 스트레스 감수성 돼지(hh)로 나타내고 있는데, 이형접합체의 경우 정상 유전자와 PSS 유전자가 동시에 존재하고 있다고 알려져 있으므로 이러한 PSS hetero 돼지도 검색을 통하여 제거하여 줄 필요성이 있다.

PSS 돼지의 검색은 Webb and Jordan(1978)에 의하여 휘발성 마취제인 halothane gas를 이용하여 8~10주령의 종돈을 3~5분간 마취시켜 근육의 경직성 정도를 조사하여 판독하는 방법을 이용하여 연구가 수행되어졌다. 그러나, 이와 같은 방법은 숙련자에 있어서 95% 이상 정확하게 판별할 수 있다고 보고되어지고 있으나, 정상적인(H⁺H⁻) 돼지에게도 해를 입힐 수 있다는 단점과 hetero 돼지(H⁺H⁻)

의 판별이 어려운 것이 단점이었다(김 등, 1998; 박 등, 1997). 최근 분자생물학의 발달로 인하여 PSS 돼지와 관련된 유전자에 대하여 분석하여 보고하였고, PCR 법이 수행된 이후 6번 상염색체 좌위에 위치한 RYR1 gene 부분을 증폭하고 제한효소를 이용하여 PSS 돼지를 감별하는 PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism)법을 이용하여 연구를 수행하게 되었다(Fujii 등, 1991; O'Brien 등, 1993; Prossor, 1993; 박 등, 1997).

1970년 초반에 restriction enzyme의 발견과 plasmid를 이용한 cloning 기술이 발달함에 따라 유전자 구조의 해석 수준이 발달하게 되었으며, 80년대 중반 이후 expression vector의 발견도 분자생물학의 발전에 큰 기여를 하여 주었다(Sambrook and Russell, 2001).

따라서, 본 연구는 분자 생물학적 기술 중 PCR-RFLP 법을 이용하여 RYR1 유전자를 증폭하여 PSS Hetero 돼지를 구분하였고, 증폭된 유전자를 Cloning하여 유전자 구조를 분석하고, 세포내의 유전자의 존재를 확인하여 PSS 돼지의 유전양식을 구명코자 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물

공시동물은 충남 K 농장에서 사육 중인 Landrace Yorkshire(LY)종으로서 PCR-RFLP 방법을 통하여 PSS hetero 돼지로 판명된 돼지를 공시 동물로 선정하였다.

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

² 군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과(Dept. of Marine Life Science, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University)

[†] Corresponding author : G. W. Kim, Dept. of Animal Resource Science, College of Industrial Science, Kongju National University. TEL : +82-41-330-1245, E-mail: kimgoong@kongju.ac.kr

Table 1. Primer sequence of ryanodine receptor gene

Primer name	Sequence	Product size
Forward primer	5'-GCCAACTGTGCCCTTTTCTCC-3'	1,881 bp
Reverse primer	5'-TACTGTGTGGTGCCCTCTGCT-3'	

PCR 및 cloning

선정된 공시동물의 혈액에서 추출한 genomic DNA를 가지고 Table 1의 프라이머를 사용하여 PCR한 후 T-vector (Promega, USA)에 ligation하고, Topo10F를 host cell로 cloning한 후, Ampicillin과 X-Gal, 그리고 IPTG가 첨가된 배지에 접종하여 유전자가 도입된 것으로 추정되는 blue colony를 선별하였다.

Sequence 분석

유전자가 도입된 것으로 추정되는 blue colony를 선택하여 plasmid purification mini kit (Qiagen)를 이용하여 Plasmid DNA를 추출한 후 EcoR I 제한효소로 처리하여 유전자 도입 여부를 확인하였으며, PCR에 사용된 primers를 이용하여 direct sequencing 방법으로 염기 서열을 확인하였다(ABI sequencer).

Sequencing을 실시하여 분석된 염기서열은 정상유전자(N)와 mutation 유전자(n)구조를 확인하였으며, Sequencing 결과를 토대로 BLAST (Basic Local Alignment Search Tools)를 통하여 RYR 1유전자와 일치 여부를 판독하였다.

결과 및 고찰

PSS 돼지와 관련된 유전자를 증폭하여 cloning하였으며,

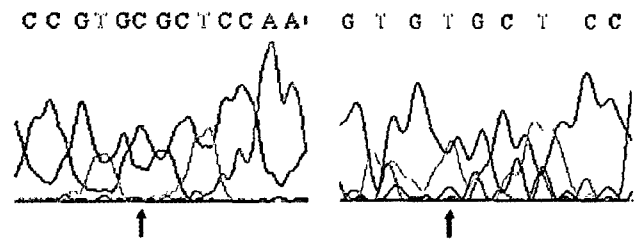


Fig. 2. Diagram is PSS normal sequence(left) and PSS mutation sequence(right).

전기영동을 통하여 분석한 결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 T-vector에 클로닝된 유전자를 EcoR I 제한효소로 처리한 결과는 Lane 1에서와 같이 3.0kb와 1.8kb의 밴드로 나타나 RYR 1 유전자가 도입되었음을 알 수 있었다.

Fig. 1의 Lane 2와 3은 유전자가 도입된 것으로 추정된 1.8kb의 밴드를 회수하여 Hha I(GCGC sequence 인식) 제한효소로 절단한 후 전기영동한 결과에서는 PSS Normal 유전자와 PSS mutation 유전자로 각각 분류되어 세포 내에 2가지 유전자가 모두 존재하는 것으로 시사하고 있음을 확인할 수 있었다.

각각 정상 유전자와 mutation 유전자가 도입된 것을 확인한 plasmid DNA를 이용하여 direct sequencing법을 이용하여 분석한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 정상유전자와 mutation 유전자가 도입된 것을 확인할 수 있었다.

염기서열을 분석한 결과를 가지고 BLAST를 통하여 이미 보고된 염기서열과 비교한 결과는 Fujii 등(1991)과 Harbitz 등(1992)이 보고한 유전자 구조와 동일한 것으로 나타나 PSS 돼지와 관련된 RYR 1유전자가 증폭되었으며, cloning 되었음을 확인할 수 있었고, 615th amino acid가 N과 n에서 각각 arginine와 cysteine으로 존재함을 확인할 수 있었다. 또한, 6th 염색체(PSS 관련유전자)로부터 N과 n

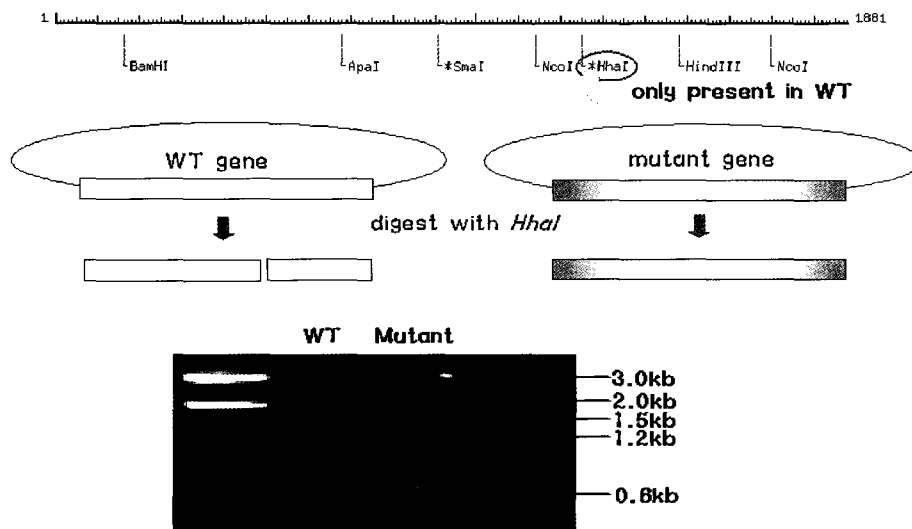


Fig. 1. Plasmid DNA for EcoR I enzyme digestive (Lane 1), PSS Normal gene(Lane 2) and PSS mutation gene(Lane 3) for Hha I enzyme and Lane 4 is 100bp ladder plus.

1 GCCAACTGTG CCCTTTTCTC CAACAACTTG GATTGGCTGG TCAGCAAGCT GGATCGACTG GAGGCCTCCT 70
 Sense primer

71 CAGGTAGGAG AACCCAGGGG GAGGGGACAG GGGACAGGGG CGGGGAGGGC AGGGCTTCAG CCATCTCACC 140
 141 TCTCACTCTG ATCCCTGGGC AGGGATCCTG GAGGTGCTGT ACTGTGCCTT GATTGAGAGT CCTGAGGTCC 210
 211 TGAACATCAT CCAGGAGAAC CACATCAAGT CCATCATCTC CCTTCTGGAC AAGCATGGGA GGAACCACAA 280
 281 GGTGGGCTC TCATCCCTC AATTCTGCAC TTGATCTTTC CCCACCCCTC CTCTCACTC TTACTTGGAC 350
 351 TCCTCTGCCA CATGCTTCTA GCTCAATACA AAGGTCTCAA ACTCCTTGTT TTTGTTTTTG TTTTATGAGC 420
 421 TGAACCTGTG GCAAATGGAA GTTCCAGGC AAGGGGGTGA ACCAGAGCTA TAGCTGCTGG CCTACACCAC 490
 491 AGCCTCATCA ACAACGCCAG ATCCGAGCCG TGTCTGCCAC CTACACCACA GCTCATGGCA ATACCAGATC 560
 561 CTTAACCAC TGAGCGAGGC CAGGGATCGA ACCTGCAACC TCACGAATAC TAGTGGGTT TGAACCCAC 630
 631 TGAAGCCACA ATGGGAACTC CTCAAAGTCA TTCTTAAATG GATTCTGGGC CCCCGATATG CTTCTTAGA 700
 701 TCTTTGAAGT GTTTCTAAA TGCTAATGT AAATGCAGGC GGCTGCATAT ACACGCTCCA GTTTGCCACA 770
 771 GGTCCATCCA GTCCCCACTG AATTAATTAT TTCTAACCAC CTCATGTATG GACAACATCC ACCTGGCCCC 840
 841 GAAGATGCAC GTTGGTGACC CCCGCCATC CAGAACCTCG TCTTGGTCTC CGTGTCTCG CACTGACCCG 910
 911 GGCTTTCCTT CTTGCCCTCG ACTTCTCACC CTTGCTCCC GTCTCTCCTT TCCTCCTCTG CTGATGCCCG 980
 981 ATCCCATCCC TCACAGCCCC CTGCGTCTCA CCAGACCTTT CTCTTTGACC TTGATCTCCC TGTGTCATCC 1050
 1051 CTGACCTTCC CGCTTTCACC ACCTCTTCTC AGTCACATCC CCACCTCCA CCCTGGGACA TCATCCTTCT 1120
 1121 GGCTTCCCAC CTTGGGTCTT CCATGGACCA CACCCTCCCC GCAAGTGCCC TCACACCTTG ACCTCTGACC 1190
 1191 TTGACCCCTA GGTGCTGGAT GTCCTGTGTT CCCTGTGTGT GTGCAATGGT GTGGCCGT[GY GC]TCCAACCA 1260
 1261 AGATCTCATT ACTGAGAACT TGCTCCCTGG CCGCGAGCTT CTGCTGCAGA CAAACCTCAT CAACTATGTC 1330
 1331 ACCAGGTCTG GCCCCCCAAC CTTTGACCCC AGAGCTTAGA ACCCTCCACC ACCCCGCCCC GACTCAGAGA 1400
 1401 CTCCACTCCG GTGAATGGCC CTTCTCCGT CCCCCACCCC CGGACTTAAT GCCAGTCCCC ACCCTGTCTG 1470
 1471 TGCTTGTCCT AAGCTTGTC CTGGCTTCTT ACTTCTCTTA CCCTTCTTCC CCAAACCTTT TCTCCCTCTG 1540
 1541 TCTCTTCTCT TTTCTCTCTT TCTGTGTTG CTCTCTTTGT CTGTCTATCT ATTCTCTCTC CATCTCTTTT 1610
 1611 TCCAGGTCTT TCTCTCATCT CTCTTCTCTG TCTTTGACG TCTCTCTGTC TGTCTCTGCC TCTGCTTCTT 1680
 1681 CTCTCTGTGT CTCTGTCTCC ATGGCTCTGC CTTCCGTTT TTCCTGCGTA TGTGTCTCTT TGTCTTTTTC 1750
 1751 CCTCTCCCCC CCAGCCTTCC CTCCAGCCTG GCTCTCTTCT CCAGCCCTCC TCATCCTCCT CTTCTGTCCC 1820
 1821 ATTTCTCTCT GAGCATCCGC CCAACATCT TTGTGGGCCG AGCAGAGGGC ACCACACAGT A 1881
 Antisense primer

Fig. 3. Sequence of ryanodine receptor(RYR1) gene. The site of sense primer and antisense primer sequence is underlined. Mutation region was written with IUB DNA code(Y: C or T).

이 각각 존재함을 통해 이들이 대립유전자 좌위(allelic loci)로 존재함을 확인할 수 있었으며, 이러한 allele로 존재함은 각각 유전자가 나뉘어져 유전형식에 따라 유전됨을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 연구결과를 종합하여 보면 PSS hetero 돼지는 정상 유전자와 mutation 유전자가 모두 세포 내에 각각 따로 존재하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 이는 PSS hetero 돼지라도 PSS mutation 유전자가 유전됨으로 인하여 PSS 돼지의 발생을 유발시킬 수 있음을 확인함으로써 PSS hetero 돼지도 유전자 분석을 통하여 제거하여 나아감으로서 정상돼지를 선발하는데 있어 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

Cloning and Sequencing of Heterozygous PSS Gene in Pigs

Yoo, J. Y. , G. W. Kim, J. W. Lee, Y. B. Kim, J. Y. Lee, D. H. Lee, H. J. Lee, J. M. Yoon and H. Y. Park

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

ABSTRACT

This study was carried out to analyze the structure of the gene related to porcine stress syndrome (PSS) through cloning from PSS heterozygous pigs and to examine hereditary type associated with PSS. The results obtained from the study were summarized as follows:

Amino acid arginine and cysteine exist in dominant gene, N and harmfully recessive gene, n, respectively. It was confirmed that such genes exists as alleles in the sixth chromosome related to PSS. These allelic genes might be inherited according to Mendelian law.

(Key words : Porcine stress syndrome, Hetero,

Ryanodine receptor, Cloning, DNA sequencing)

인용문헌

1. 김계웅, 김진우, 유재영, 박홍양 (2004): 종돈의 genomic DNA를 이용한 스트레스 증후군 검색. 한국동물번식학회지 28(1):37-43.
2. 김동훈, 김태현, 이영창, 이제룡, 최진성, 이무하 (2003): 품종이 Porcine stress syndrome 돼지 출현비율 및 육질에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 45(5):841-846.
3. 김철욱, 조광근, 최윤재, 박외선, 권윤정 (1998): Porcine Ryanodine Receptor 유전자의 Mutation을 확인하기 위한 Double Tube Allele Specific Primer PCR의 이용. 한국축산학회지 40(3):227-234.
4. 박영일, 박태섭, 신영수, 이학교, 김형균, 오하식, 손창준, 한재용 (1997): PCR-RFLP 기법을 이용한 PSS 돼지 검색에 관한 연구. 한국동물유전육종학회지 1(1):73-80.
5. 윤덕영 (2003): 돼지의 모근을 이용한 3단계 PCR-RFLP 방법으로 돼지 스트레스 유전자 검사. 건국대학교 대학원 박사학위 논문.
6. Fujii I, Otsu K, Zorzto F, De Leon S, Khanna V, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH (1991): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253:448-451.
7. Harbitz I, Chowdhary B, Thomsen PD, Davies W, Kaufmann U, Kran S, Gustavsson I, Christensen K, Hauge JG (1990): Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11-q21 segment of chromosome 6. Genomics 8(2):243-248.
8. Harbitz I, Kristensen T, Bosnes M, Kran S, Davies W (1992): DNA sequence of the skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg-615-Cys615 mutation associated with porcine malignant hyperthermia in Norwegian Landrace Pigs Animal Genetics 23 395-402.
9. Hughes IP, Moran C, Nicholas FW (1992): PCR genotyping of the ryanodine receptor gene for a putative causal mutation for malignant hyperthermia in Australian pigs. J Anim Breed Genet 109:465-476.
10. O'Brien PJ, Shen H, Cory CR, Zhzng X (1993): Use of a DNA-based test for the mutation associated with porcine stress syndrome(malignant hyperthermia) in 10,000 breeding swine. J Am Vet Med Assoc 203: 842-851.
11. Prosser J (1993). Detecting single-base mutation. TIB-TECH 11:238-246.
12. Sambrook J, Russell DW (2001): Molecularcloning: A Laboratory Manual (3rd. Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory.
13. Vögeli P, Bolt R, Fries R, Stanzinger 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.
14. Webb AJ, Jordan CHC (1978): Halothane sensitivity as a field test for stress susceptibility in the pig. Anim Prod 26:157-163.

(접수일자: 2005. 1. 19. / 채택일자: 2005. 2. 28.)