

## Quantitative Oligonucleotide Ligation Assay (qOLA)를 이용한 Landrace 품종의 *KIT* 유전자 반복수 변이 탐지

서보영\* · 김재환\* · 남덕우\* · 유채경\*\* · 이상호\*\*\* · 이재봉\* · 임현태\* · 정은지\*\* · 조인철\*\*\*\* · 허강녕\*\*\*\*\* · 전진태\*

경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21)\*, 경상대학교 농생명학부\*\*, 경남동물과학기술\*\*\*, 농촌진흥청 난지농업연구소\*\*\*\*, 축산과학원 동물유전체과\*\*\*\*\*

## Detection of Copy Number Variation of the *KIT* Gene in the Landrace Breed using an Quantitative Oligonucleotide Ligation Assay (qOLA)

B. Y. Seo\*, J. H. Kim\*, D. W. Nahm\*, C. K. Yoo\*\*, S. H. Lee\*\*\*, J. B. Lee\*, H. T. Lim\*, E. J. Jung\*\*, I. C. Cho\*\*\*\*, K. N. Heo\*\*\*\*\* and J. T. Jeon\*

Division of Applied Life Science(BK21), Graduate School of Gyeongsang National University\*,

Division of Agriculture and Life, Gyeongsang National University\*\*,

Gyeongnam Animal Science Technology\*\*\*, National Institute of Subtropical Agriculture, R. D. A.\*\*\*\*,

National Institute of Animal Science, R. D. A.\*\*\*\*\*

### ABSTRACT

Recently, copy number variations (CNV) of genes or genomic segments have been intensively studied and various analysis methods have been developed. In this study, quantitative oligonucleotide ligation assay (qOLA) was applied to investigate CNV of *KIT* gene in the Landrace breed. A combined assay using qOLA and pyrosequencing, 6 genotype classes,  $I^1/I^1$  or  $I^3/i$  ( $I^{Be}$ ),  $I^1/I^2$  or  $I^3/I^P$ ,  $I^1/I^3$ ,  $I^1/I^P$  or  $I^2/i$  ( $I^{Be}$ ),  $I^2/I^2$  and  $I^2/I^P$ , were identified from 44 Landrace pigs. Genotype assignment using grouping features of measurements on a scatter plot showed 100% agreement with those using a statistical assignment by PROC FASTCLUS procedure implemented in the SAS package. Two versions (3100 and 3130) of ABI sequencers gave the same genotyping results, indicating there was no influence on qOLA by different versions of instrument, however, the means of standard deviation and coefficient of variation from the qOLA on a ABI 3130 (2.33 and 4.10) was lower than those from the qOLA on a ABI 3100 (2.67 and 4.81). Effect of proteinase K treatment on the PCR product followed by qOLA was very clear because noise peaks were disappeared and the observed ration fit better to the reference ratio corresponding to each genotype.

(Key words : Copy number variation, *KIT*, Landrace, OLA)

Corresponding author : J. T. Jeon, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Gyeongnam, Korea.

Tel: 055-751-5516, Fax: 055-756-7171, E-mail: jtjeon@nongae.gnu.ac.kr.

## I. 서 론

유전자의 반복수 변이 (CNV)는 진화 과정에서 중요한 기능으로써, 계놈 내의 구조적 차이를 발생시키는 진화론적 기작들 중 하나로 알려져 있다 (Richard and David, 1998; Daniel 등, 1999). 특정한 유전자, 단편 그리고 계놈 전체의 CNV는 종 내와 종 간의 분화에 관여하는 새로운 유전자를 형성한다 (James 등, 2003). 유전자의 CNV는 실제로 계놈 상에서 빈번히 발생하고 있으며 (Lynch and Conery, 2000), 인간의 경우 산재된 CNV가 계놈의 약 5% 정도를 이루고 있는 것으로 보고되어 있다 (Eichler, 2001; Bailey 등, 2002).

BAC cloning과 fiber-FISH 실험을 통해 돼지 *KIT* 유전자가 완벽히 전사가 가능한 염기서열을 포함하고 있음을 밝혀냈으며 (Marklund 등, 1998), duplication 상에 존재하는 *KIT* 유전자는 exon과 intron 염기배열을 포함하며, *KIT* duplication의 크기는 약 450 kb이고, *KIT* 영역에 접하는 *LINE* 사이의 동형 재조합이 아닌 것에 의해 나타난다고 보고하였다 (Giuffra 등, 2002). 돼지의 *Dominant white* 표현형은 melanocyte 이동과 생존에 중요한 역할을 하는 *mast/stem cell growth factor receptor*로 암호화 된 (Bernstein 등, 1990; Jackson, 1994) *KIT* 유전자에서 발생하는 두 개의 돌연변이에 의해서 나타난다. 돼지 *KIT* 유전자의 CNV는 duplication breakpoint에서 일어나는 치환 (C→G)과 splice donor site의 점 돌연변이 (G→A)와 밀접한 연관이 있다 (Johansson 등, 1996; Marklund 등, 1998).

돼지 *KIT* 유전자의 Splice 돌연변이는 exon 17 다음에 연결되는 intron 17의 첫 nucleotide가 G에서 A로 치환되어 발생하며, 6개의 *Dominant white/KIT* allele는 다음과 같이 동정되어졌다 (Johansson 등, 1996; Giuffra 등, 1999; Pielberg 등, 2002).; 일반적 색의 열성 *i* allele, *Patch* phenotype의 불완전우성 *I<sup>p</sup>* allele, *Dominant white* phenotype의 완전 우성 *I<sup>l</sup>*, *I<sup>2</sup>*와 *I<sup>3</sup>* allele 그리고 우성 *Belt*

phenotype의 *I<sup>Be</sup>*. Allele *i*와 *I<sup>Be</sup>*는 단일 *KIT* CNV를, *I<sup>l</sup>*과 *I<sup>p</sup>*는 2반복의 *KIT* CNV를 가지고, *I<sup>2</sup>*와 *I<sup>3</sup>*는 3반복의 *KIT* CNV와 연관이 있다. 하나의 CNV가 발생하는 *Dominant white*와 *Patch* allele는 *I*와 *I<sup>p</sup>* allele를 가지고 있는 교잡종 동물에서 같은 하나의 duplication breakpoint를 갖고 있음이 동정되어졌다 (Giuffra 등, 2002).

현재까지 CNV에 대한 많은 연구가 수행되었으며, 그 분석 방법 및 기기 또한 다양하게 발달되었다. CNV를 조사하기 위해서 고안한 여러 분석 방법들 중 최근 Landrace와 제주 재래돼지를 상호교배해서 생산한 F<sub>1</sub> 계열의 자돈과 순종 Large White가 보유하고 있는 *KIT* 유전자의 CNV를 측정하기 위하여 이용한 quantitative oligonucleotide ligation assay (qOLA)가 다른 분석 방법들에 비하여 더 정확함을 보고하고 있다 (Seo 등, unpublished data).

본 연구에서는 4반복 이상의 CNV를 보유하고 있는 Landrace 품종에서도 qOLA의 정확한 탐지가 가능한지를 조사하였다. 이를 바탕으로 백색 품종인 Landrace의 genotype을 정확하게 판정하고 백색의 표현형 개체가 유색 대립유전자를 갖는지를 조사하여, Duroc 옹돈 × F<sub>1</sub> 모돈 (Landrace × Large White) 교배체계에서 생산되는 비육돈에서 유색돈 출현을 제어할 대응 방안을 마련하고자 본 연구를 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 DNA 추출

경남 K GGP로부터 제공받은 순종 Landrace 44두의 모근을 이용하여 *KIT* CNV를 조사하였으며, PCR 증폭을 위한 주형으로 이용된 모근의 genomic DNA는 5% Chelex (Walsh 등, 1991)를 이용하여 추출하였다.

### 2. Duplication breakpoint 지역의 CNV (CNV\_Dup) 탐지

PCR 증폭을 위해 Pielberg 등 (2003)이 보고한 primer 서열을 이용하였으며, Seo 등 (unpublished data)이 보고한 qOLA를 이용하여 *KIT*의 CNV를 탐지하였다. 기기간의 차이점을 조사하기 위해 동일 sample을 ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)와 ABI Prism<sup>®</sup> 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 전기영동을 실시하였다. 그리고 GeneScan software version 2.1 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 결과값들을 상호 비교분석하였다.

### 3. Alternative spliced *KIT*의 CNV (CNV\_Spl) 탐지

*KIT*의 intron 17의 첫 nucleotide에서 발생하는 CNV\_Spl을 탐지하기 위한 PCR 반응 및 Pyrosequencing은 PyroMark MD (Biotage, Sweden)를 이용하여 Marklund 등 (1998)이 보고한 방법대로 수행하였다.

### 4. 통계 분석

Microsoft Excel program (Microsoft, USA)을 이용하여 자료 수집과 기초적인 통계 분석을 실시하였다. Landrace 44두의 genotyping한 결과들은 SAS package의 PROC FASTCLUS (SAS Institute Inc., 2004) procedure를 수행하여 분류하였다.

## III. 결 과

### 1. 표준 *KIT* 유전자형의 설정

2배체의 염색체상에 4반복 이상의 *KIT* 유전자를 보유하고 있는 돼지 품종에서 qOLA 방법을 이용하여 정확한 CNV 탐지가 가능한지를 알아보기 위하여 *Dominant White*로 알려져 있는 순종 Landrace를 이용하여 *KIT* CNV를 탐

지하였다. Duplication상에 존재하는 *KIT* 유전자는 모든 exon과 intron 염기배열을 포함하며, duplication의 크기는 약 450 kb일 것이라고 Pielberg 등 (2003)이 보고하였다. Splice donor site에서 발생하는 splice 돌연변이는 exon 17이 끝나고 intron 17이 시작되는 첫 염기에서 발생하고, normal의 경우 G, splice의 경우 A로 나타난다고 알려져 있으며, *LIMCI*과 *LIMEI* 사이에 존재하는 duplication breakpoint에서 발생하는 염기 치환은 normal의 경우 C, duplication의 경우 G로 나타난다 (Fig. 1).

Table 1은 duplication breakpoint 지역의 CNV (CNV\_Dup)와 선택적 Splicing 형태인 *KIT* CNV (CNV\_Spl)의 조합에 의한 *KIT* 좌위의 이론적인 genotype을 나타낸 것이다.  $i$ 와  $I^{be}$ 의 경우 intron 17이 시작되는 첫 염기가 G이고 duplication breakpoint가 C로 splice 돌연변이가 일어나지 않으며, duplication 또한 발생하지 않는다.  $I^p$ 와 *Dominant White*인  $I^l$ 의 경우 duplication이 1번씩 일어나지만  $I^p$ 의 경우 splice 돌연변이가 발생하지 않으나,  $I^l$ 의 경우 splice 돌연변이가 발생한다. *Dominant White*인  $I^2$ 와  $I^3$ 는 2번의 duplication이 일어나지만  $I^2$ 의 경우 1번의 splice 돌연변이가 발생하며,  $I^3$ 의 경우 2번의 splice 돌연변이가 발생한다.  $i$ ,  $I^{be}$  그리고  $I^p$ 의 경우는 G를 가지므로 모색의 phenotype이 유색으로 나타나며  $I^l$ ,  $I^2$  그리고  $I^3$  경우 유색종이 갖는 G를 가지고 있으나, White 모색을 나타내는 A가 우성이므로 모색의 phenotype은 White로 나타난다. Table 1에서 제외 한  $I^l$ 의 경우 duplication이 일어나지 않는 단일 splice 돌연변이 (A)가 발생하며 모색의 phenotype은 White를 나타낸다.

### 2. qOLA와 pyrosequencing assay를 이용한 Landrace 종의 좌표 분석

qOLA (Seo 등, unpublished data)를 이용하여 Landrace 종이 보유하고 있는 CNV\_Dup를 탐지하고, CNV\_Spl을 탐지하는 pyrosequencing

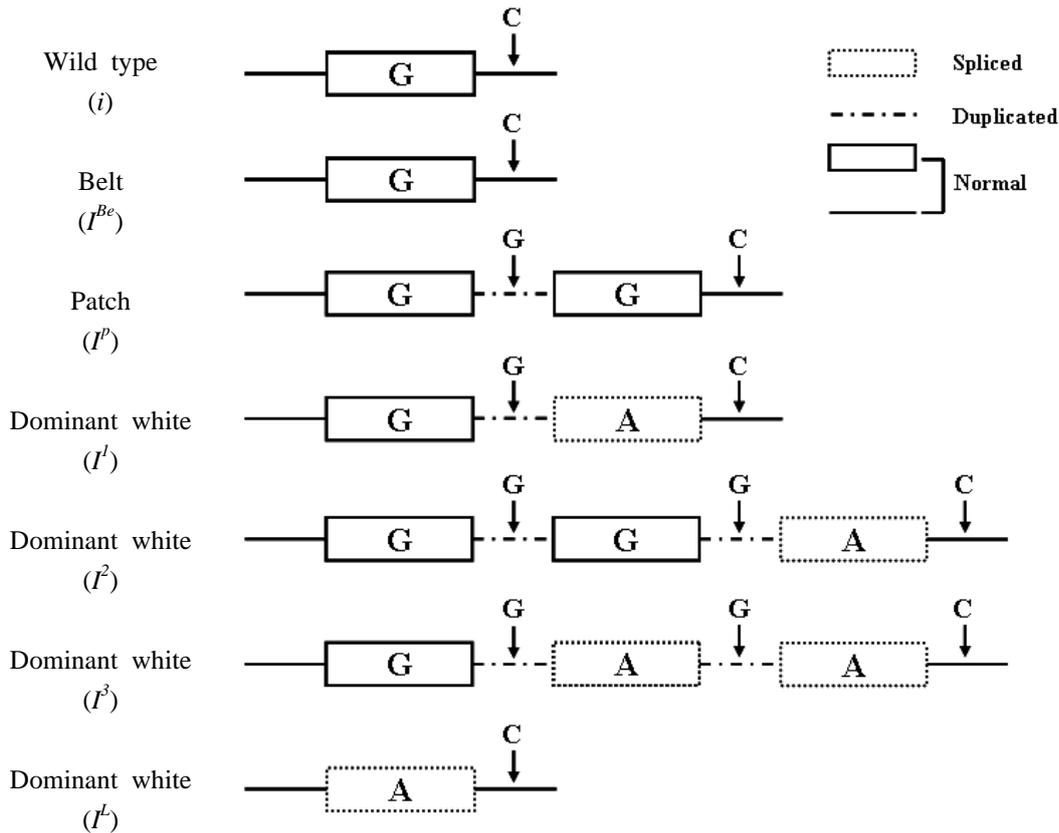


Fig. 1. Schematic description of *Dominant white/KIT* allele in pigs. A box indicates a *KIT* gene and a line indicates an intergenic region. G and A in the box reflect the normal and splice mutations, respectively, at the first nucleotide in intron17. G and C on the line are base substitutions at the 3'-end of the duplicate and normal copies, respectively.

assay (Pielberg 등, 2002)를 병행하여 genotyping 을 실시하였다 (Fig. 2). qOLA와 pyrosequencing assay의 조합된 관측치를 이론적인 genotype과 비교하여  $I^1/I^1$  또는  $I^3/i(I^{Be})$ ,  $I^1/I^2$  또는  $I^3/I^p$ ,  $I^1/I^3$ ,  $I^1/I^p$  또는  $I^2/i(I^{Be})$ ,  $I^2/I^2$ ,  $I^2/I^p$ 의 6 group으로 분류 하였다. 기기간의 차이점을 조사하기 위해 ABI Prism<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 전기영동 한 결과의 관측치 (qOLA\_3100)와 ABI Prism<sup>®</sup> 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 전기영동 한 결과의 관측치 (qOLA\_3130)를 동일 pyrosequencing assay의 관측치 (Pyro\_Splice)와 조합하였다. qOLA\_3100 (Fig. 2a)과 qOLA\_3130

(Fig. 2b)의 관측치를 비교한 결과 좌표 분석에 의한 큰 차이는 없었으나, qOLA\_3100이 qOLA\_3130 보다 밀집도가 더 높아 보였다.

### 3. 좌표 분석과 통계적인 분석의 상호 비교와 genotype의 분류

좌표 분석에 의한 genotype의 분류가 정확한 지를 검증하기 위하여 PROC FASTCLUS procedure를 이용하여 이론적인 genotype을 12개의 seed point로 좌표 상에 나타내고, 각 seed point의 중심에 가까이 있는 개체끼리 clustering하는 통계적 분류와 반복적인 경험을 바탕으로 한 좌표 분

Table 1. Theoretical genotype description of the *KIT* locus by the combination of splice mutation and duplication

Genotypes <sup>a</sup>	The first nucleotide in intron 17 (G/A) <sup>b</sup>	Splice ratios (%)	Duplication breakpoint (C/G) <sup>c</sup>	Duplication ratios (%)	Seed No. <sup>d</sup>
<i>i/i(I<sup>Be</sup>)</i>	-G/-G	0	-C/-C	0	1
<i>I<sup>p</sup>/i(I<sup>Be</sup>)</i>	-G-G/-G	0	-G-C/-C	33.3	2
<i>I<sup>p</sup>/I<sup>p</sup></i>	-G-G/-G-G	0	-G-C/-G-C	50	3
<i>I<sup>2</sup>/I<sup>p</sup></i>	-G-G-A/-G-G	20	-G-G-C/-G-C	60	4
<i>I<sup>1</sup>/I<sup>p</sup></i>	-G-A/-G-G	25	-G-C/-G-C	50	5
<i>I<sup>2</sup>/i(I<sup>Be</sup>)</i>	-G-G-A/-G	25	-G-G-C/-C	50	5
<i>I<sup>1</sup>/i(I<sup>Be</sup>)</i>	-G-A/-G	33.3	-G-C/-C	33.3	6
<i>I<sup>2</sup>/I<sup>2</sup></i>	-G-G-A/-G-G-A	33.3	-G-G-C/-G-G-C	66.7	7
<i>I<sup>1</sup>/I<sup>2</sup></i>	-G-A/-G-G-A	40	-G-C/-G-G-C	60	8
<i>I<sup>3</sup>/I<sup>p</sup></i>	-G-A-A/-G-G	40	-G-G-C/-G-C	60	8
<i>I<sup>1</sup>/I<sup>1</sup></i>	-G-A/-G-A	50	-G-C/-G-C	50	9
<i>I<sup>3</sup>/i(I<sup>Be</sup>)</i>	-G-A-A/-G	50	-G-G-C/-C	50	9
<i>I<sup>2</sup>/I<sup>3</sup></i>	-G-G-A/-G-A-A	50	-G-G-C/-G-G-C	66.7	10
<i>I<sup>1</sup>/I<sup>3</sup></i>	-G-A/-G-A-A	60	-G-C/-G-G-C	60	11
<i>I<sup>3</sup>/I<sup>3</sup></i>	-G-A-A/-G-A-A	66.7	-G-G-C/-G-G-C	66.7	12

<sup>a</sup> *I<sup>1</sup>* allele is not included and genotypes are ordered by the ratio of splice mutation

<sup>b</sup> G is normal copy and A is splice copy

<sup>c</sup> C is normal copy and G is duplicate copy

<sup>d</sup> Statistical classification by clustering at 12 seed points using the FASTCLUS procedure

석을 상호 비교하여 genotyping을 실시하였다 (Table 2). 그 결과 qOLA\_3100과 qOLA\_3130이 동일하게 분류되었으며, 좌표 분석에 의한 분류와 통계적 분류의 genotype이 100% 일치하였다. 이는 qOLA가 Seo 등 (unpublished data)이 보고한 4반복 이상의 CNV를 보유하고 있는 Large White (LW)와 유사한 Landrace에서도 정확한 분류가 가능하다는 것을 의미한다. 또한 qOLA\_3100과 qOLA\_3130이 동일하게 분류되므로 분석 기기 차이에 의한 분류의 오류는 없을 것이라고 사료된다. Landrace 44두에 대한 grouping 결과 *I<sup>1</sup>/I<sup>1</sup>* 또는 *I<sup>3</sup>/i(I<sup>Be</sup>)* group이 21 두 (47.73%)로 분

포도가 가장 높은 cluster를 이루고 있었다. 이는 Seo 등 (unpublished data)이 보고한 LW의 genotype이 대부분 *I<sup>1</sup>/I<sup>1</sup>* 또는 *I<sup>3</sup>/i(I<sup>Be</sup>)*와 *I<sup>1</sup>/I<sup>2</sup>* 또는 *I<sup>3</sup>/I<sup>p</sup>*의 두 group으로 분포되어 있는 것에 비하여 Landrace의 genotype은 하나의 group이 주를 이루고 있음을 의미한다.

#### 4. qOLA\_3100, qOLA\_3130 그리고 Pyro\_Splice의 정밀성 및 정확도 비교

Table 3은 qOLA\_3100, qOLA\_3130 그리고 Pyro\_Splice의 정밀성 및 정확도를 비교한 것

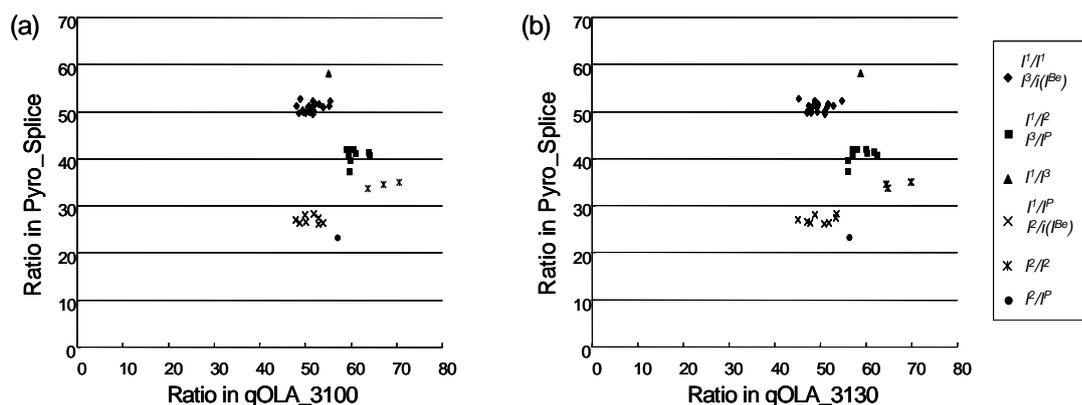


Fig. 2. Diagnostic tests for 44 Landrace pigs using a combination assay of qOLA and pyrosequencing (Pyro\_Splice). The x-axis of abscissas is the ratio of [duplicated copy/(duplicated copy + normal copy)] measured by qOLA. The y-axis is the ratio of [splice/(splice + normal)] measured by Pyro\_Splice.  
 (a) The result from ABI 3100 (b) The result from ABI 3130.

Table 2. Comparison between subjective judgment and statistical genotype assignments for 44 Landrace pigs. The genotype allocate by the grouping Landrace of observations and the number in the first row is class centroids for the statistical analysis

No. of Pigs (%)	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
$I^2/I^P$	1 (2.27)	—	—	—	—	—
$I^1/I^P$ or $I^2/i(I^{Be})$	—	8 (18.18)	—	—	—	—
$I^2/I^2$	—	—	3 (6.82)	—	—	—
$I^1/I^2$ or $I^3/I^P$	—	—	—	10 (22.73)	—	—
$I^1/I^1$ or $I^3/i(I^{Be})$	—	—	—	—	21 (47.73)	—
$I^1/I^3$	—	—	—	—	—	1 (2.27)

<sup>a</sup> Number of class centroid: 1 (0% and 0% of duplication ratio and splice ratio respectively), 2 (33.3% and 0%), 3 (50% and 0%), 4(60% and 20%), 5 (50% and 25%), 6 (33.3% and 33.3%), 7 (66.7% and 33.3%), 8 (60% and 40%), 9 (50% and 50%), 10 (66.7% and 50%), 11 (60% and 60%) and 12 (66.7% and 66.7)

Table 3. Comparison of accuracy and precision among qOLA\_3100, qOLA\_3130 and Pyro\_Splice in the genotyping of 44 Landrace pigs

Estimated genotype by qOLA	Pigs No.	qOLA_3100 (%)				qOLA_3130 (%)	
		Expected <sup>a</sup>	Means of observed	SD <sup>b</sup>	CV <sup>c</sup>	Expected	Means of observed
$I^1/I^1$ or $I^3/i(I^{Be})$	21	50	51.5	2.05	3.98	50	49.3
$I^1/I^2$ or $I^3/I^P$	10	60	60.8	1.86	3.05	60	59.0
$I^1/I^3$	1	60	55.2	. <sup>d</sup>	.	60	58.8
$I^1/I^P$ or $I^2/i(I^{Be})$	8	50	51.0	2.17	4.25	50	49.8
$I^2/I^2$	3	66.7	67.1	3.42	5.10	66.7	66.3
$I^2/I^P$	1	60	57.2	.	.	60	56.4

Estimated genotype by qOLA	qOLA_3130 (%)		Pyro_splice (%)			
	SD	CV	Expected	Means of observed	SD	CV
$I^1/I^1$ or $I^3/i(I^{Be})$	2.23	4.53	50	50.9	0.94	1.84
$I^1/I^2$ or $I^3/I^P$	2.34	3.97	40	40.8	1.51	3.70
$I^1/I^3$	.	.	60	58.1	.	.
$I^1/I^P$ or $I^2/i(I^{Be})$	3.07	6.17	25	27.0	0.86	3.20
$I^2/I^2$	3.04	4.58	33.3	34.4	0.67	1.93
$I^2/I^P$	.	.	20	23.1	.	.

<sup>a</sup>. Theoretical ratio corresponding to each genotype  
<sup>b</sup>. Standard deviation of each observation  
<sup>c</sup>. Coefficient of variation  
<sup>d</sup>. not analysis

이다.  $I^1/I^3$ 와  $I^2/I^P$ 를 제외한 표준편차 (SD)와 변이계수 (CV)는 Pyro\_splice가 qOLA 보다 낮게 나타났는데, 이는 qOLA가 PCR 반응 시 서로 다른 sequence의 경쟁적 증폭을 하는 반면에 Pyro\_splice의 경우 *KIT*의 sequence 배열 상에서 단일 염기 치환이 발생하므로 비교적 안정적인 증폭을 하기 때문인 것으로 사료된다 (Seo 등, unpublished data). 기기적인 차이점 비교에서 이론적인 genotype의 기대치에 대한 관측치의 평균 오차 범위는 qOLA\_3100이 0.4~2.8%로 qOLA\_3130 (0.2~1%)에 비하여 높았으나, SD와 CV의 평균은 2.33과 4.10으로 qOLA

\_3130 (2.67과 4.81)에 비하여 낮았다.

### 5. Proteinase K 처리의 효과

PCR 반응 후 proteinase K가 CNV\_Dup 분석에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 proteinase K를 처리한 것과 그렇지 않은 것을 비교해 보았다 (Fig. 3). 그 결과 proteinase K를 처리하지 않고 qOLA를 수행하였을 경우 원인이 무엇인지는 모르나 noise peak가 나타났으며 두 main peak (G/C)의 비율이 이론적인 genotype의 비율과 잘 맞지가 않았다 (Fig. 3a).

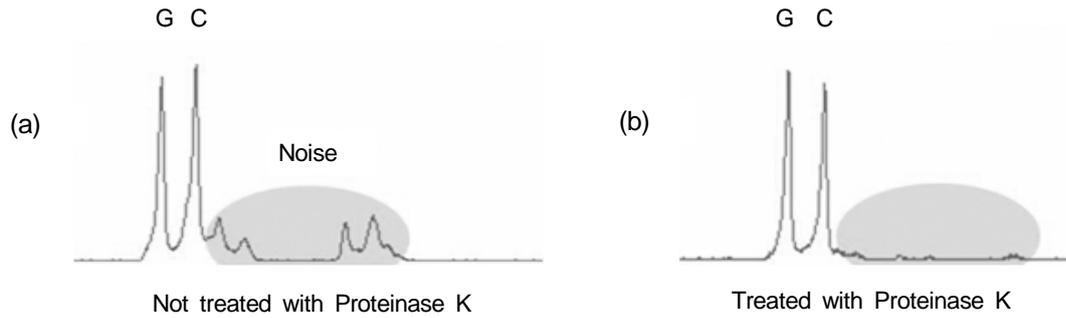


Fig. 3. Effect of proteinase K treatment on PCR followed by qOLA. Noise peaks were markedly decreased.

(a) Not treated with proteinase K (b) Treated with proteinase K

하지만 proteinase K를 처리하였을 경우 noise peak들이 사라졌으며 이론적인 genotype의 비율과 잘 맞게 되었다 (Fig. 3b).

## VI. 고 찰

qOLA와 pyrosequencing assay의 조합된 관측치를 이론적인 genotype과 비교하여 Landrace 44두를 좌표 분석 한 결과  $I^1/I^1$  또는  $I^3/i(I^{Be})$ ,  $I^1/I^2$  또는  $I^1/I^3$ ,  $I^1/I^3$  또는  $I^2/i(I^{Be})$ ,  $I^2/I^2$ ,  $I^2/I^3$ 의 6 group으로 분류되었다. 좌표 분석에 의한 genotype의 분류가 정확한지를 검증하기 위한 통계 분석과 좌표 분석의 상호 비교에서 genotype이 100% 일치율을 보였다. 이와 같이 qOLA가 Large White (LW) 종과 유사한 4반복 이상의 *KIT* 유전자를 보유하고 있는 Landrace에서도 정확한 분류가 가능한 것으로 보아 다른 종에서도 qOLA의 정확한 *KIT* 반복수 변이 (CNV) 탐지가 가능할 것으로 생각되어지며, genome에서 발생하는 CNV 탐지에 활용될 수 있을 것으로 사료되어진다. 또한 qOLA를 pyrosequencing법과 병행하여 *Dominant White*와 유색 allele를 정확하게 판별함으로써, 유색 allele를 보유하고 있는 백색종의 조기 선별이 가능할 것으로 미루어 양돈농가에서 필요로 하는 백색 종돈의 백모색 고정화를 위한 하나의 방편으로 활용할 수 있을 것이라 생각된다.

기기적인 차이점을 조사하기 위해 qOLA\_3100과 qOLA\_3130의 관측치를 비교한 결과 좌표 분석에 의한 큰 차이가 없었으며, 통계적 분류와 좌표 분석의 비교에서도 qOLA\_3100과 qOLA\_3130이 동일하게 분류되었다. 하지만 좌표 분석에서 qOLA\_3100이 qOLA\_3130보다 밀집도가 더 높아 보였으며, 정밀성 및 정확도 비교에서 qOLA\_3100의 표준편차와 변이계수의 평균이 2.33과 4.10으로 qOLA\_3130 (2.67과 4.81)에 비하여 낮게 나타나므로, 정밀성 및 정확도가 더 높을 것으로 생각된다.

qOLA 반응전 PCR 산물에 대하여 proteinase K 처리효과를 분석한 결과 proteinase K를 처리한 경우 전기영동 분석시 noise peak들이 제거되었으며 각 genotype의 이론적 비율에 보다 정확히 일치하였다. 이러한 이유는 qOLA를 하기 전 처리인 PCR 증폭단계에서 사용된 Taq DNA polymerase의 활성이 qOLA 반응에서도 유지되어 ligation 과정에 짧은 PCR 반응이 일어나기 때문인 것으로 사료되어지며, Proteinase K를 처리하게 되면 Taq DNA polymerase의 활성이 제거되어 PCR 반응이 일어나지 않아 noise peak들이 생성되지 않는 것으로 생각된다.

마지막으로 Landrace 44두에 대한 grouping 결과  $I^1/I^1$  또는  $I^3/i(I^{Be})$  group이 21두 (47.73%)로 분포도가 가장 높은 cluster를 이루고 있었다.

하지만  $I^1/I^P$  또는  $I^2/i(I^{Be})$ 와  $I^2/I^P$  genotype이 전체의 약 20.45%로 나타나는 것으로 보아 순종 Landrace가 *Dominant White* allele로 고정되어 있지 않은 상태이므로 *Dominant White* 고정화에 대한 육종 및 개량에 있어 보완이 필요할 것으로 사료된다.

## V. 요약

최근 들어 유전자 또는 DNA 분절의 반복수 변이 (CNV)에 관한 연구가 다수 수행되었으며, 그 분석 방법 및 기기 또한 다양하게 발달되었다. 본 연구는 Landrace 품종의 *KIT* 유전자 CNV 탐지를 위하여 다른 분석 방법들에 비하여 정확도가 높은 정량적 OLA 기법 (qOLA)을 이용하였다. qOLA와 pyrosequencing assay의 조합하여 분석한 결과를 Landrace 44두에 대한 좌표 분석을 한 결과  $I^1/I^1$  또는  $I^3/i(I^{Be})$ ,  $I^1/I^2$  또는  $I^3/I^P$ ,  $I^1/I^3$ ,  $I^1/I^P$  또는  $I^2/i(I^{Be})$ ,  $I^2/I^2$ ,  $I^2/I^P$ 의 6 genotype으로 분류되었으며, PROC FASTCLUS procedure를 이용한 통계 분석과 좌표 분석을 상호 비교한 결과 genotype의 분류가 100% 일치하였다. 기기간의 차이점을 조사하기 위해 qOLA\_3100과 qOLA\_3130의 관측치 비교를 실시한 결과 동일한 genotype 분류결과를 얻었다. 또한 정밀성 및 정확도 비교에서 qOLA\_3100의 경우 표준편차와 변이계수의 평균이 2.33과 4.10로 qOLA\_3130 (2.67과 4.81)에 비하여 낮게 나타났다. qOLA 반응전 PCR 산물에 대하여 proteinase K 처리 효과를 분석한 결과 pro- teinase K를 처리한 경우 전기영동 분석시 noise peak들이 제거되었으며 각 genotype의 이론적 비율에 보다 정확히 일치하였다.

## VI. 사 사

본 연구는 교육인적자원부 제2단계 BK21 사업의 장학금을 수혜 받았으며, 농촌진흥청 ‘바이오그린21사업’의 지원(과제번호: 20050301034467)에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비

지원에 감사드립니다.

## VII. 인용 문헌

1. Bailey, J. A., Gu, Z., Clark, R. A., Reinert, K., Samonte, R. V., Schwartz, S., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W. and Eichler, E. E. 2002. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297:1003-1007.
2. Bernstein, A., Chabot, B., Dubreuil, P., Reith, A., Nocka, K., Majumder, S., Ray, P. and Besmer, P. 1990. The mouse W/c-KIT locus. *Ciba Found. Symp.* 148:158-172.
3. Daniel L. B., Caleb F. D., Lisa A. G. and Jeffrey, L. N. 1999. Identification of Three Novel  $Ca^{2+}$  Channel  $\gamma$  Subunit Genes Reveals Molecular Diversification by Tandem and Chromosome Duplication. *Genome Res.* 9:1204-1213.
4. Eichler, E. E. 2001. Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet.* 17:661-669.
5. Giuffra, E., Evans, G., Törnsten, A., Wales, R., Day, A., Looft, H., Plastow, G. and Andersson, L. 1999. The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant white(I/KIT) locus. *Mamm. Genome* 10(12):1132-1136.
6. Giuffra, E., Törnsten, A., Marklund, S., ongcam-Rudloff, E., Chardon, P., Kijas, J. M. H., Anderson, S. I., Archibald, A. L. and Andersson, L. 2002. A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking KIT. *Mamm. Genome* 13:569-577.
7. Jackson, I. J. 1994. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu. Rev. Genet.* 28:189-217.
8. James, W. T., Mary, G. S., Tyrone, J. S., Robert, W. B., Jennifer, C. M., Pamela, J. T., Jacquelyn, R. I., Valerie, V. B. M., Shih, Q. L. L., Jeffrey W. T., Gerard, G. B., Stephen, M. B. S. and Eric

- D. G. 2003. Pericentromeric Duplications in the Laboratory Mouse. *Genome Res.* 13:55-63.
9. Johansson, M. M., Chaudhary, R., Hellmen, E., Hoyheim, B., Chowdhary, B. and Andersson, L. 1996. Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the *KIT* gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm. Genome* 7:822-830.
10. Lynch, M. and Conery, J. S. 2000. The evolutionary fate and consequence of duplicate genes. *Science* 10:1151-1155.
11. Marklund, S., Kijas, J., Martinez, H. R., Rönnstrand, L., Funa, K., Moller, M., Lange, D., Lilja, I. E. and Andersson, L. 1998. Molecular Basis for the Dominant White Phenotype in the Domestic Pig. *Genome Res.* 8:826-833.
12. Pielberg, G., Olsson, C., Syvänen, A. C. and Andersson, L. 2002. Unexpectedly High Allelic Diversity at the *KIT* Locus Causing Dominant White Color in the Domestic Pig. *Genetics* 160:305-311.
13. Pielberg G., Day A. E., Plastow G. S. and Andersson L. 2003. A sensitive method for detecting variation in copy numbers of duplicated genes. *Genome Res.* 13:2171-217.
14. Richard M. and David S., 1998. Pathological consequences of sequence duplications in the human genome. *Genome Res.* 8:1007-1021.
15. Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513.

(접수일자 : 2007. 8. 13. / 채택일자 : 2007. 10. 9.)