

최 중
연구보고서

돼지의 경제형질 특이 마커를 이용한
유전자 기능분석에 관한 연구

Functional analysis of Genes by
specific marker for Economic traits in Swine

진 주 산 업 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지의 경제형질 특이 마커를 이용한 유전자 기능분석에 관한 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 24 일

주관연구기관명 : 진주산업대학교

총괄연구책임자 : 김 철 욱

세부연구책임자 : 김 철 욱

연 구 원 : 조 광 근

연 구 원 : 서 상 식

연 구 원 : 정 원 용

연 구 원 : 박 다 혜

연 구 원 : 조 은 석

연 구 원 : 조 환 래

요 약 문

I. 제 목

돼지의 경제형질 특이 마커를 이용한 유전자 기능분석에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라의 돼지 경제형질 연관 특이 유전자를 찾는 방법으로 Tail-PCR 분석을 이용한 연구는 거의 전무한 실정이다. 대부분이 기존의 특이 marker를 사용하거나 새로운 marker 개발에 대한 연구를 수행 중이다. Microsatellite marker는 짧은 서열의 반복을 나타내는 형질 특이적인 유전자 서열이다. 이 유전자 서열은 기능을 나타내는 것이 아니므로 경제형질과 관련된 marker 주위의 기능을 나타내는 유전자를 찾기 위해 TAIL-PCR 분석을 시도했다.

특이 유전자 발견을 위해 genome scanning, positional cloning, DNA microarray, radiation hybrid mapping 등이 현재 이용되고 있다. 단일 돌연변이가 대부분인 질적형질의 경우 DNA marker의 이용이 현재로도 용이한 상태에 왔다. 그러나 증체율, 육질, 번식성적, 산유량 등의 대부분의 성장, 등지방두께, 육질의 경우 많은 연구 결과가 발표되고 있음에도 불구하고 그 내용면에서는 아쉽게도 DNA Marker를 성장, 등지방두께, 육질 선발에 이용 할 수 있는 실제적인 단계가 아닌 유전자의 위치와 특정 양적형질의 연관을 특정의 실험 집단에서 발견했다고 보고에 그치고 있다.

위와 같은 점을 감안 하여 본 연구에서는 선발해 둔 경제형질 연관 specific marker 실험을 통하여 경제형질 연관 유전자들의 기능을 밝힘으로써 DNA Marker로 임의적인 위치나 양적형질만을 파악하는 것이 아니라 정확한 유전자를 알아내고자 한다.

따라서 본 연구에서는 경제형질 연관 marker 주변의 유전자를 탐색하여 경제형질과의 연관성을 규명하고 유전자 특성을 분석하여 선발된 유전자의 기능을 추론한다. 기존 marker 정보와 실험을 수행하고 이를 토대로 돼지의 경제형질 유전자 발굴 및 특성 분석하여 돼지의 경제형질 특이 유전자를 이용한 조기 진단 기술을 개

발 하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 도체 형질, 품질 특성, 육색 및 지방색, 지방산 조성과 연관된 MS marker를 이용하여 재현성 검증을 수행하므로서 돼지의 경제형질 연관 marker를 선발한다. 선발된 경제 형질 연관 marker의 염기서열로서 Thermal asymmetric interlaced (TAIL) - PCR 기법을 실시하여 주변 유전자를 cloning 한다. 또한 돼지 fat library를 제작하고 이로부터 유전자를 cloning하여 확보한다. TAIL-PCR과 fat library로부터 얻어진 유전자의 염기서열을 확인하고 NCBI GenBank search를 통해 homology와 기능을 확인한다. 이중 경제형질 연관 유용 유전자들을 선발하여 Southern blot, Northern blot, Reverse transcript (RT) - PCR, Real-time PCR, western blot 방법을 수행한다. Southern blot 분석에서는 돼지의 genomic DNA 상의 존재 유무와 유전자의 copy수, isoform 등을 확인한다. Northern, RT-PCR, real-time PCR 에서는 RNA가 언제 어디서 어떻게 발현되는지 확인한다. 또한 western blotting 에서는 protein의 발현양상에 대해서 확인한다. 마지막으로 돼지의 알려진 경제형질 연관 candidate gene을 선발하여 경제형질과의 연관성을 확인한다. 이와 같은 분석을 통해 선발된 유전자들에 대한 정보를 선점하고, 경제형질 연관 유전자들을 이용한 경제 형질이 우수한 돼지의 조기 진단 방법을 개발한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

돼지 경제형질 연관 MS marker의 재현성 검증을 통해서 좀 더 경제형질과 연관성이 높은 23개의 maker를 선발하였다. 선발된 MS marker를 토대로 TAIL-PCR 실험 기법을 이용하여 23개의 기능성 유전자들을 찾아내었다. 23개 유전자의 염기서열 분석과 NCBI GenBank search를 수행하여 특징적인 7개 유전자를 확보하였다. 또한 Fat library로부터 95개의 유전자를 cloning하여 GenBank search를 통해 중복되어지는 유전자를 제외하고 35개 유전자를 확보하였다.

TAIL-PCR 분석으로 선발된 7개와 Fat library로부터 얻어진 2개의 유전자 각각에 대해서 Southern blot, Northern blot, RT-PCR, real-time PCR, Western blot 분석을 통하여 지방 대사과정에 관련이 있는 Adiponectin 유전자와 일당증체량, 사료효율, 등지방 두께와 연관성이 있는 것으로 확인된 Galectin-1, Urate oxidase의

유전자를 확보하였다. 또한 새롭게 발견된 돼지의 no match 유전자 6개를 확보함으로써 이 유전자들을 GenBank에 등록하여 지적소유권을 선점하였다.

또한 경제형질과 관련성이 있는 것으로 이미 알려져 있는 후보유전자 GHRH, H-FABP, MYOG 3개의 유전자의 유전자형을 분석함으로써 돼지의 일당증체량, 등지방두께, 정육율, 사료요구율과 관련성을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 얻어진 유전자 정보와 경제형질과 관련된 특이 유전자는 새로운 조기 진단법을 개발함으로써 우수한 종돈을 선발하여 양돈 농가의 소득 증대에 기여하는데 활용할 수 있을 것이다. 본 연구를 통해 얻어진 주요 연구결과와 이를 이용한 양돈 산업에 활용방안을 요약하면 다음과 같다.

- ◎ 돼지의 육질 검사용 프라이머 및 이를 이용한 육질 진단 방법 (특허 출원: 10-2007-0050352)
- ◎ RFLP를 이용한 돼지의 경제형질 진단 방법 (특허 출원: 10-2007-0050318)
- ◎ 새로운 6개의 유용 유전자 정보 선점 : NM001 ~ NM005, Galectin-1.
- ◎ 축산연구소, 종돈 능력 검정소, 종돈장, 각 시·군 농업기술센터를 통해 우수한 종돈 선발 기술 보급 계획임.
- ◎ 진주산업대학교 양돈 과학기술 센터에서 직접 진단 기술을 보급할 계획임.
- ◎ 양돈인들에게 개발된 기술에 대한 사업설명회, 영농기술 등 농업인 교육을 개최하여 지속적으로 홍보.

SUMMARY

I. Title

Functional analysis of Genes by specific marker for Economic traits in Swine

II. Aims and Necessities of this study

At present there was no research used Tail-PCR analysis method to find specific gene associated with economic traits of swine in Korea. Most researches used either existent specific marker or doing study for new marker development. Microsatellite marker is specific gene sequence associated with traits that show repeat of short sequence. Because this gene sequence of marker did not express function, we did try Tail-PCR analysis to find functional genes from marker associated with economic traits of the surroundings. In order to discovery of specific gene, we used genome scanning, positional cloning, DNA microarray, and radiation hybrid mapping etc. In the case of most qualitative traits, composed of a mutation DNA marker is going to utilize at present. However, those are announced results of research that most growth, Backfat thickness, meat quality are related to average daily gain, meat quality, breeding results, milk producing amount etc. Nevertheless, DNA Marker could not use to select the growth, Backfat thickness, meat quality. DNA marker was reported that found position of gene and specification quantitative traits relate to specification experiment group. Like those, this research analyzed function of genes related to economic traits using selected specific markers associated with economic traits. Then we confirm the correct gene in this research because our purpose do not identify arbitrary position and quantitative traits by DNA Marker.

Therefore we searched functional genes around marker associated with economic traits in this research, and confirmed the relation between newly found genes and marker with economic traits, and identified the functions of selected gene through character analysis of the gene.

III. Content and scope of the research

This research carried out reproducibility verification used Ms-marker associated with carcass traits and meat quality traits, lean and fat color, and fat composition and selected superior marker associated with economic traits of pig. TAIL-PCR techniques is fulfilled by selected sequence of marker associated with economic traits and surrounding specific genes were obtained by cloning. Also, fat library of pig was constructed and ensure through cloning of genes from it. Cloned genes were confirmed sequence of the gene obtained from Tail-PCR and fat library and NCBI GenBank to confirm homology and function of gene. Selected useful genes associated with economic traits is performed Southern Blot, Northern Blot, Reverse transcript (RT)-PCR, Real time-PCR and Western Blot experiment. By Southern blotting technique was

confirmed existence of genomic DNA in pig, copies number of gene, and isoforms. By Northern blotting, RT-PCR, real-time PCR of technique were confirmed expression levels of RNA, and western blotting technique was confirmed the relationship with expression levels of protein. Finally, we selected well-known candidate gene associated with economic traits of pig and identified the relationship between candidate gene and economic traits.

Also, We are going to develop early diagnosis technique of superior pig by specific gene associated with economic traits on the basis of those analyses.

IV. Results and suggestions on application of the study

We selected 23 markers that were identified excellent marker through reproducibility verification of Ms-marker associated with economic traits of pig and found 23 gene clones TAIL-PCR technique on the basis of selected marker. 7 Specific functional genes were obtained that were analyzed by sequencing and were searched using NCBI GenBank of 23 genes. Also, we did clone 95 genes from Fat library, and obtained 35 genes except duplicated genes through GenBank search. Each gene that 7 genes were selected by TAIL-PCR analysis and 2 genes were obtained from fat library had analyzed by Southern blotting, Northern blotting, RT-PCR, real-time PCR, and Western blotting. Moreover we obtained Galectin-1 and Urate oxidase gene that related to average daily gain, feed conversion and backfat thickness and obtained Adiponectin gene that related to fat metabolism. Also, 6 no match genes defined being found newly in pig, and we preoccupied intellectual property right as we registered these results to Genbank.

In addition, by analysis on GHRH, H-FABP and MYOG gene that are a candidate gene to known as related to economic traits analyze genotype, we investigated the relation between genotype and traits of average daily gain, feed conversion, backfat thickness. In this research, as we developed the early diagnosis technique for superior pig of genes associated with economic traits and the information of gene. These developments of diagnosis technique may act doing to increase income of pig breeding farmhouse. The results and suggestions on utilization of results through this study is as follows.

- ◎ Primers for testing meat quality of pig and a diagnosis technique of pig asid priemrs (apply for a patent :10-2007-0050318).
- ◎ A diagnosis technique for economic traits of pig using RFLP (apply for a patent: 10-2007-0050352).
- ◎ Identified the information new 6 genes : NM001 ~ NM005, Galectin-1.
- ◎ Distribute the early technique for superior pig via rural development administration and each county-city agriculture development, Korea swine

testing association and technology center.

- ◎ Distribute the early diagnosis technique for superior pig via swine scientific technique center of JINJU National University.
- ◎ Publicize about the early diagnosis technique for superior pig via continuously Business briefing session and engaging in agriculture technology.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of project	1
Section 1. Aims and Necessity of the research and development	1
1. Technical aspect	2
2. Economic and industrial aspect	2
3. Social and cultural aspect	3
Section 2. Contents and scope of the project	3
Chapter 2. Status of the technology development	6
Section 1. Status of development in domestic	6
Section 2. Status of development in abroad	7
Chapter 3. Research contents and results	10
Section 1. Introduction of the research	10
Section 2. Flanking DNA cloning by marker of economic traits	12
1. Experimental animal and sample preparation	12
2. Selection of DNA marker associated with economic traits	20
3. Verification of reproducibility of DNA marker	23
4. TAIL-PCR analysis by DNA marker associated with economic traits	30
5. Gene cloning of TAIL-PCR products	40
Section 3. Construction of Fat library and clones of obtain	56
1. Total RNA preparation of fat tissues	56
2. Construction of fat cDNA library	57
3. Cloning & Sequencing	57
4. Obtained clones from fat cDNA library	58
Section 4. Analysis of expression pattern of genes	67
1. Tissue of collection	67
2. Southern blot analysis	67

3. Northern blot analysis	70
4. Quantitative RT-PCR analysis	74
5. Western blot analysis	85
6. Real-time PCR analysis	89
Section 5. Selection of candidate gene and RFLP analysis	96
1. Selection of candidate gene	96
2. Selection of experiment animals	96
3. PCR-RFLP analysis of 3 gene	96
4. Statistics analysis	97
5. Results of study	97
Section 6. Development of early diagnosis technology with selected gene and patent	106
1. Development of early diagnosis technique in pig by gene associated with economic traits	106
2. Development of early diagnosis technique in superior pig by candidate genes of polymorphism	108
3. Development of economic traits diagnosis technique with obtained clones	111
Chapter 4. Achievement and contribution to related fields	112
Section 1. Achievement	112
Section 2. Contribution to related research fields	114
Chapter 5. Application of the results	119
Chapter 6. Overseas technology information collected during the research	122
Chapter 7. Reference	124

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	1
제 1 절	연구개발의 목적 및 필요성	1
1.	기술적 측면	2
2.	경제·산업적 측면	2
3.	사회·문화적 측면	3
제 2 절	연구개발의 내용 및 범위	3
제 2 장	국내·외 기술개발 현황	6
제 1 절	국내 기술개발 현황	6
제 2 절	국의 기술개발 현황	7
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	10
제 1 절	서 설	10
제 2 절	경제형질 연관 marker를 이용한 flanking DNA cloning	12
1.	실험동물 및 샘플 준비	12
2.	경제형질 연관 우수 marker 선발	20
3.	선발된 경제형질 연관 Marker의 재현성 검증	23
4.	경제형질 연관 marker를 이용한 TAIL-PCR 분석	30
5.	TAIL-PCR 결과물의 Gene cloning	40
제 3 절	Fat Library 제작 및 clone 확보	56
1.	Fat tissue로부터 total RNA 분리	56
2.	cDNA library 제작	57
3.	Cloning & Sequencing	57
4.	Fat library로부터 확보된 clone	58
제 4 절	유전자 발현양상 분석	67
1.	조직채취	67
2.	Southern blot analysis	67

3. Northern blot analysis	70
4. Quantitative RT-PCR analysis	85
5. Western blot analysis	74
6. Real-time PCR analysis	89
제 5 절 Candidate gene의 선발 및 RFLP 분석	96
1. Candidate gene 선발	96
2. 실험동물 선발	96
3. 3개 유전자에 대한 PCR-RFLP 분석	96
4. 통계분석	97
5. 연구 결과	97
제 6 절 선발 유전자를 이용한 종돈의 조기진단기법 개발 및 특허화	106
1. 경제형질 연관 유전자를 이용한 돼지 조기 진단 기법 개발	106
2. Candidate gene의 유전자 다형성을 이용한 종돈의 조기 진단 기법 개발 ...	108
3. 확보된 Clone을 이용한 경제형질 진단 방법 개발	111
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	112
제 1 절 연구개발 목표달성도	112
제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도	114
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	119
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	122
제 7 장. 참고문헌	124

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

생명과학 산업은 유전체학 시대 (genomic era)를 지나 기능 유전체학 (functional genomics) 시대로 접어들면서 생명체를 구성하고 있는 수많은 유전자들의 기능이해를 통한 유전체내에 잠재되어 있는 유전정보의 능동적 활용이라는 측면에서 현대유전학은 과거의 수동적인 유전정보이용에 대립되는 적극적인 과학이라고 할 수 있겠다.

특히 의학이나 동식물 생명산업 분야에 있어서는 유전정보의 효과적 이용이 가져올 수 있는 성과들은 매우 클 것으로 생각된다. 사양기술과 사육환경이 전반적으로 개선된 현재의 동물사육 여건에서는 동물의 유전능력 향상에 의한 생산성향상이 더욱더 강조되어야 할 부분이다.

2005년까지의 결과에 의하면 소에서는 약 1,700개의 DNA Marker가 유전자지도 (linkage map) 위에 나타나 있고, 돼지에서는 약 1,400개, 말에서는 약 350개, 닭에서는 약 900개정도가 지도위에 그 위치가 밝혀져 있다. Large insert DNA library로는 돼지의 경우 BAC과 YAC을 합해 6개가 만들어 졌으며 소의 경우 모두 8개가 만들어져 있다.

특이 유전자의 발견을 위해 genome scanning, positional cloning, DNA microarray, radiation hybrid mapping 등이 현재 많이 이용되고 있다. 단일 돌연변이가 대부분인 질적형질의 경우 DNA marker의 이용이 현재로도 용이한 상태에 왔다. 그러나 증체율, 육질, 번식성적, 산유량 등의 대부분의 경제형질의 경우 많은 연구 결과가 발표되고 있음에도 불구하고 그 내용면에서는 아쉽게도 DNA Marker를 이용할 수 있는 실제적인 단계가 아닌 유전자의 위치와 특정 양적형질의 연관을 특정의 실험 집단에서 발견했다는 보고에 그치고 있다.

이와 같은 점으로 볼 때, 이전의 농림기술개발과제로부터 얻어진 경제형질 연관 specific marker들의 경우에도 더욱 효과적으로 양돈산업에 적용시키기 위한 기술의 개발이 절실히 필요하다고 판단된다. 이전에 확보된 경제형질 연관 Microsatellite marker는 경제형질과 관련 있는 유전자 주변에 존재하므로써 경제형질을 판단할 수 있는 데 활용이 가능하다. 그러나 이러한 marker들은 실제 기능을 수행하는 유전자 부분이 아니므로 marker와 연결되어 있는 주변의 경제형질 연관 유전자를 확보하는 연구의 필요성이 대두된다.

그러므로 본 연구에서는 이러한 필요성에 따라 경제형질 연관 marker 주변의

유전자를 탐색하는 TAIL-PCR 분석기법과 Fat library를 제작하여 돼지의 경제형질과 관련된 유전자를 확보하고자 한다. 이렇게 확보된 유전자원에 대해서 분자생물학적인 분석 기법을 적용하여 유전자와 경제형질과의 연관성을 규명하고, 특이적인 유전자에 대해서는 진단기법을 개발하고자 한다. 이러한 연구결과는 경제형질이 우수한 새로운 브랜드 돈육을 만드는데 기초토대를 마련하고, 돼지 사육농가의 생산비 절감뿐만 아니라 생산성을 향상 시킬 수 있을 것이며, 경제형질이 우수한 종돈을 계속 선발하여 사양함으로써 FTA에 대응하여 국가 경쟁력 제고에 커다란 몫을 차지할 수 있을 것이다.

1. 기술적 측면

- WTO 체제하에서 수입산 돼지고기를 이제는 손쉽게 구매할 수 있게 되었고, 특히 미국과 FTA 체결이 진행되어 미국산 돼지고기는 저렴한 가격에서 유통될 것으로 예측되고 있어 성장, 등지방두께, 육질이 차별화된 브랜드 돈육을 생산하여 외국산 돈육과의 시장경쟁에서 살아남을 수 있는 길을 개발해야 한다.
- 경제형질 연관 DNA Marker 개발과 QTL 연구와는 달리 돼지의 지놈상에 성장, 등지방두께, 육질 유전자의 기능을 밝힘으로써 새로운 기능의 유전자를 국가 차원에서 새로이 얻을 수 있다.
- 지금까지 양돈 분야에서 성장, 등지방두께, 육질에 대한 연구는 DNA Marker를 이용한 연구가 주를 이루었으나 이제는 이것을 밑바탕으로 새로운 유전자를 얻는 것이 국가경쟁력 제고에 커다란 몫을 차지 할 것이다.

2. 경제·산업적 측면

- 경제형질이 우수한 돈육에 대해서는 소비자들의 선호도가 높고 브랜드육이 일반육보다 2배 이상의 가격 차이를 보이고 있다(예, 산청 솔잎 흑돼지). 또한 신선한 외국 돈육의 수입개방으로 돈육선택에 있어 혼란이 초래되는 부분을 감안 할 때 경제형질이 우수한 돼지의 개량과 고급육 생산으로 수입품종 돼지고기와 차별화 시켜 양돈산업의 경쟁력을 높일 수 있다.
- 경제형질연관 유전자를 밝혀냄으로써 그 유전자를 이용한 연구가 계속 될 경우 후발 연구자는 다른 국가로부터 연구결과에 대한 권한이나 로열티를 받게 됨으로써 경제적인 면에서 크게 이익을 가져올 것이다.
- 현재 세계적으로 유전자 확보의 추세는 유전자에 대한 특허문제로 산업화부분과 학술적인 자료도입에 심각한 문제를 일으킬 것으로 추측되는데 자국이

이러한 분위기를 빠르게 인식하여 대처하기 위해서는 유전자 확보에 많은 노력을 기울인다면 앞으로는 기능이 밝혀진 유전자를 이용하여 국가 경제적인 이익을 창출 할 수 있을 것이다.

- 따라서 경제형질에 영향을 미치는 유전자의 확보는 경제형질이 우수한 종돈의 선발용 도구로 활용되어 도체 하지 않더라도 경제형질이 우수한 종돈을 선발 할 수 있을 것이며, 즉 경제형질이 좋은 A등급의 비율을 증가시켜 경제적으로 큰 이익을 가져올 것으로 보인다. 점차 경제형질이 우수한 종돈만을 확보하게 된다면 종돈수입국에서 종돈수출국으로 전환이 가능하고 나아가 세계적인 종돈수출국으로 성장 할 수 있을 것이다.

3. 사회·문화적 측면

- 국민소득이 향상과 더불어 식생활 패턴의 변화로 육류소비가 꾸준히 증가하여 이제는 돈육의 질적 욕구도 높아지고 있는 실정이다.
- 경제형질 즉, 육질, 맛, 빛깔 등이 떨어지는 돈육은 소비자들로부터 구매의 욕을 떨어지게 만든다.
- 양돈업자는 경제형질이 우수한 돼지를 사육함으로써 수출 종돈의 사육이 늘어 날 것이며, 사양에 들어가는 손실을 최소화 할 수 있을 것이다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

경제형질 연관 유전자의 조기 진단 기법 개발을 위한 목표를 달성하기 위해 본 연구개발 과제의 연차별 연구 목표 및 내용, 이에 대한 연구범위는 다음과 같이 수행하였고, 유전자의 특성에 따라 효과적인 분석기법을 적절하게 적용하여 연구하였다.

목 표	내 용 및 범 위
<p>1. 경제형질 연관 marker를 이용한 flanking DNA cloning</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 확보된 경제형질 연관 우수 Marker 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 23개의 Marker에 대한 분석, 유용 유전자 선정 • 경제형질 연관 Marker의 재현성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 공시축을 이용한 재현성 검증 • 경제형질 연관 Marker를 이용한 TAIL-PCR 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 분리되어진 Marker의 염기서열을 이용 Primer 제작 - 경제형질 Marker Primer와 AD(Tail-PCR) primer or random primer를 이용한 PCR Condition 확립 • TAIL-PCR Product cloning <ul style="list-style-type: none"> - 확립되어진 PCR Condition을 이용한 PCR 실시 - PCR Product Elution 및 Cloning 작업

목 표	내 용 및 범 위
<p>2. 유전자 클로닝 및 유전자 특허화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 클로닝 된 유전자 Blotting <ul style="list-style-type: none"> - genomic DNA cutting (EcoRI) - p32 hybridization - x-ray film 해석 • membrane transfer 및 elution <ul style="list-style-type: none"> - blotting membrane transfer - membrane elution - elution된 DNA purification • Fat Library 제작 • elution DNA을 기초로 Sequencing <ul style="list-style-type: none"> - 순수하게 준비된 각 DNA의 96-well plate에 분주 - ABI 3100 sequencing - 전체 염기서열 분석 • 유전자의 특허화 <ul style="list-style-type: none"> - NC등록 및 특허화

목 표	내 용 및 범 위
<p>3. 경제형질 유전자의 조기 진단기법 개발 및 특허화</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 정확한 유전자의 발현양상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 경제형질에 관한 조직 채취 - RNA 추출 - Northern blotting 실시 • p32 hybridization • x-ray film 분석 • 조직의 발현 양상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 비교그룹별에 조직 채취 - 조직부위별에 따른 유전자의 expression pattern 확인 • 단백질 수준에서의 발현양상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 경제형질 조직별 조직 채취 - 각 조직별 단백질 추출 및 expression pattern 분석 • 조기진단법 개발 및 특허화

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

가축의 개량은 통계적 분석방법을 활용하여 측정된 가축의 표현형가를 분석하여 내재된 유전능력을 파악하고 개량하여 양적 형질의 개량에 괄목할 만한 성과를 이루어 왔으며 분석방법의 발전이 거듭되면서 우수 유전능력을 가지는 개체에 대한 선발의 정확도가 증가되었고 이로 인해 가축 개량의 주요 수단이 되어 왔다. 그러나 선발의 정확도 및 종축 검정에 소요되는 자원 및 소요시간 등의 한계로 이들 양적 형질의 변이를 일으키는 DNA 수준에서 쉽게 확인할 수 있는 DNA marker와의 연관을 규명하는 새로운 방법들이 모색되어 최근에는 분자유전학적인 기법에 의한 다양한 기술이 이용되고 있다. 현재 유전공학적 기법에 의해 개발되었거나 보유하고 있는 몇 가지 핵심기술에 대해서 국내외 기술현황을 살펴보고 현 기술을 이용함에 있어 문제 및 취약점이 무엇인가를 알 수 있다.

제 1 절 국내 관련기술의 현황

국내에서의 마커 관련 분자생물학적 기법에 의한 축산분야의 연구결과는 다음과 같다.

- 국내 가축의 유전자 분석으로 가금에 대한 유전자 지문을 이용한 가계분석, 오골계의 유전분석과 재래닭의 유전자 유사성 분석 (김 등, 1994; 이 등, 1995; 이 등, 1996)에 대한 기초적인 연구가 보고되고 있다. 한우에서는 한우의 특이적 RAPD 표지인자 개발 (조 등, 1994)과 축우의 DNA 지문양상 (여 등, 1996)에 관한 연구가 보고 되었다. 그리고 젓소에 있어서 PCR-RFLP 기법으로 선발도구로서 β -lactoglobulin 좌위와 κ -Casein의 유전자형 분석, RAPD-PCR 기법으로 젓소의 DNA 다형분석과 유전적 특성 (정, 1995) 및 소의 초기 수정란 성감별 (오 등, 1996)에 관한 기초적인 연구가 진행되고 있다.
- 본 연구실에서는 이미 RAPD 기법에 의한 돼지의 품종식별 및 성장, 등지방두께, 육질 연관 유전자 표식인자 규명을 위한 기술개발로 연관 DNA marker를 확보했으며, 그리고 돼지 염색체상에서 현재 밝혀져 있는 1,800개의 표지인자 중 평균거리가 3~5cM이고 보다 큰 거리도 포함된 microsatellite의 flanking sequence를 이용하여 Yorkshire종의 일당증체량이 +1.5SD 이상집단, Yorkshire종의 등심단면적이 +1.5SD 이상집단 그리고 Yorkshire종의 등지방 두께가 -1.5SD 이하집단에서 특이적으로 출현되는 DNA marker를 개발하는 연구를 수행 하였다.
- 본 연구실에서는 최근 돼지의 microsatellite를 이용하여 재래돼지의 우수한

육질과 연관된 DNA marker 개발을 위해 allele-specific PCR 기법으로 재래돼지의 유전자를 검색하고 있다. 따라서 양돈과학기술센터의 돼지의 성장, 등지방두께, 육질 연관 DNA marker의 개발 및 유용유전자 개발은 최근의 분자유전학적인 기법인 RAPD-PCR기법, DNA fingerprinting 기법, RFLP-PCR 기법, AFLP 그리고 microsatellite marker를 이용한 allele-specific PCR 기법을 통하여 경제형질과 연관 있는 MS를 확보 하였으며, marker를 통한 돼지 품종 및 돼지고기 식별 유전자 검사방법 (특허출원 10-2003-0016693)을 특허화 하여 DNA marker를 통한 유전자 검사하고 있으며, 세계적인 기술을 확보 하고 있다.

제 2 절 국외 관련기술의 현황

분자유전학의 발달로 미국, 일본, 유럽 등 기술선진국에서는 유용 유전자 자원을 확보하기 위한 연구에 대대적인 투자를 하고 있다. 대표적인 예로, 인간의 지놈 프로젝트(human genome project) 및 cDNA 프로젝트 (cDNA project)를 들 수 있다. 이러한 cDNA 프로젝트와 지놈 프로젝트를 통하여 확보된 유전자 정보는 1998년부터 database를 구축하고 있다. 이러한 지놈 관련 내용은 21세기 생물정보학 (Bioinformatics)의 근간이 되는 구조 유전학 (Structural Genomics)로 현재 많은 결과를 확보하고 있다. 유전자 확보에 있어 후발국들은 구축된 database로부터 정보를 얻고 이를 이용하여 생명과학분야의 연구를 수행하는 상태이다. 기술선진국에서 최근에 다양하게 접근하고 있는 분자유전학적 방법의 기술적인 현황을 살펴보면 다음과 같다.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), DFP (DNA fingerprinting) 분석법은 정확한 분석결과를 얻을 수 있으나 반면 분석방법이 까다롭고 소요되는 시간이 길다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 1990년대에 들어서면서부터 PCR을 이용한 많은 분석방법이 개발되어 특정형질에 대한 DNA marker의 개발이 많이 진척되었다. 이러한 PCR을 이용한 분석방법으로는 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple sequence Repeat), CAPs (Cleavable Amplified Polymorphic Sequence), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism), ISA (Inter SSR Amplification), 그리고 AS (Allele-specific) PCR기법이 있다.

또한 돼지 염색체상에 존재하는 microsatellite를 이용한 AS (allele-specific) PCR기법은 각 개체별로 나타나는 유전자형을 분석하는 방법이다. 최근 이러한

기법은 양돈 선진국에서 돼지의 연관지도 (linkage map)작성이 이루어짐에 따라 돼지 염색체 상에 표지인자가 될 수 있는 microsatellite를 확보함으로써 가능하다. 현재 돼지의 연관지도를 작성하는 곳은 The International Pig gene Mapping Project (PiGMaP) consortium map (Archibald et al. 1995), Nordic Pig Gene Map (Ellegren et al. 1994)과 United States Dept. of Agriculture (USDA) Gene map (Rohrer et al. 1994)으로 들 수 있다. 본 연구실에서도 이러한 곳의 연구결과를 바탕으로 Yorkshire종의 성장, 등지방두께, 육질 연관 DNA marker를 개발하고자 하고 있으며, 미국의 Iowa University의 Rothschild의 연구결과를 살펴보면 대략 다음과 같다.

돼지 QTL (quantitative traits loci)와 연관된 DNA marker를 찾는 연구가 진행되어 1, 2, 3, 4, 6, 7, 13 그리고 X 염색체에서 성장 및 도체율에 관련된 QTL이 보고되었으며, 1, 6 그리고 8 염색체에서 번식률에 관련된 QTL이 보고되었고, 지금은 병저항성 및 면역반응에 관련된 QTL개발에 주력하고 있다. 그러나 아직 돼지에서 stress susceptibility, fat level, meat quality, litter size 그리고 coat colors등에 관련된 유전자의 분리와 기능연구는 많이 진행되지 않은 상태이다. 현재까지 돼지의 성장, 등지방두께, 육질에 관련된 유전자로 밝혀진 것으로는 성장과 모색유전자로는 PIT1, MHC, TNF1, S0102, RYR1, CCK, 그리고 CCKAR이 있고, 돼지의 육질과 관련된 유전자로는 RYR1, CRC1, RN, SLA, H-FABP, 그리고 MSHR이 있다.

산자수와 관련된 후보유전자 (candidate gene)로는 ESR, RARG, RBP4, MTNRIA, FSHB, 그리고 PRLR이 있으며, 질병저항성 유전자와 면역저항성 (immune response traits)와 연관이 있는 유전자로는 NRAMP, FUT1, FUT2, ECF18R, OCT1, 그리고 OCT2 등이 이미 밝혀져 있다.

고기와 도체형질에 영향을 미치는 많은 단일 유전자 (single major gene)으로는 돼지의 할로테인 유전자 (HAL; halothane sensitivity gene), 산성육질 유전자 (RN; acid meat gene), 근육함량 유전자 (MU; muscle content gene) 그리고 근내지방 유전자 (intramusclar fat gene)가 보고되었다.

그 외 최근 외국의 여러 국가기관 연구소, 대학, 육종회사의 연구가 두드러지고 있다. 특히, 1998년 Plastow의 RFLP를 이용한 돼지의 QTL과 후보유전자의 이용의 연구, 1998년 Rohere와 Keele은 메산돈 (Meishan)과 백색 혼합돈의 교배를 이용한 도체 구성의 QTL mapping, 1998년 Paszek 등은 번식형질에 대한 추정 QTL로부터 microsatellite와 allelic 효과에 대해서 보고한 바 있으며, 1998년 Rattink 등은 등지방과 근내지방 조절 QTL의 연구를 실시한 바 있다.

- 1998년 Basedow 등은 microsatellite와 AFLP marker를 이용한 German 소 품종에서 유전적 변이의 추정에 대해서, 1998년 Looft 등은 bovine genome에서 AFLP marker의 genetic mapping을 보고하였다. 그리고 Groenen 등은 1998년 닭에서 AFLP와 microsatellite를 통합한 linkage mapping 연구를 수행하였으며, Plastow(1998)와 Siggens(1999) 등은 AFLP 기술을 이용한 돼지의 QTL과 genome mapping를 실시하여 연구결과를 보고하였다.
- 인간이나 식물분야의 연구기술은 축산분야에 비해 대체적으로 앞서 개발이 이루어지고 있음을 알 수 있었다. 가장 최근에는 반도체 기술과 화학합성의 기술을 유전자 분석에 적용한 DNA chip으로 기능 유전학 (Functional Genomics)와 같은 분야가 개발되어 지금까지 밝혀진 구조 유전학 (Structural Genomics)의 결과를 활용할 수 있으면서도 유전자 확보에 유리한 방법으로 부각되고 있다.

따라서 3년간의 경제형질 연관 DNA marker 연구결과를 토대로 경제형질과 연관성이 있는 51개의 ms marker를 확보하였고, 이 ms marker들의 염기서열을 이용하여 flanking DNA cloning을 함으로써 경제형질과 연관이 높은 유용 유전자들을 확보하여 경제형질이 우수한 새로운 브랜드 돈육을 만드는데 기초토대를 마련 할 수 있을 것이고, 경제형질이 뛰어난 돼지를 조기에 선발 할 수 있는 기법을 이용하여 조기 선발용으로도 이용한다면, 돼지 사육농가의 생산비 또한 절감할 수 있을 것이고, 세계적으로 경제형질이 우수한 브랜드 돼지를 개발할 수 있고, 경제형질이 우수한 종을 계속 선발하여 사양함으로써 경제 형질이 우수한 집단만을 사육하여 국가 경쟁력 제고에 커다란 몫을 차지 할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 서 설

생물의 형질은 양적형질(Quantitative trait)과 질적형질(Qualitative trait)로 구분한다. 불연속적인 변이를 나타내는 질적형질은 1개의 유전자에 의한 효과이므로 DNA marker를 이용하는 기술이 현재로도 용이하다. 그러나 가축에 있어서 성장, 육질, 번식, 육량 등의 경제적으로 중요한 형질은 대부분의 경우 양적형질에 속한다. 이런 형질들은 multiple gene에 의하여 영향을 받고, polygene에 의해 유전되므로 산업적으로 이용할 수 있는 이와 관련된 유전자 marker를 개발하는 것은 상당히 어렵다.

이와 같은 점을 감안하여 본 연구에서는 경제형질 연관 specific marker들을 이용하여 경제형질 연관 유전자들을 확보하기 위해 경제형질 연관 marker 주변의 유전자를 탐색하는 TAIL PCR 분석 기법을 이용하였다. 그리고 돼지의 fat library를 제작하여 cloning 과정을 거쳐 유전자를 확보하였다. TAIL-PCR은 marker 주변의 유전자를 찾을 수 있으나 그 주변에만 국한되어지는 단점이 있을 수 있어 이를 보완하여 더욱 많은 유전자를 확보하기 위해 fat library로부터 cloning을 수행 하였다.

확보된 유전자에 대해서는 유전자의 기능을 확인하기 위해 sequencing을 수행하고, NCBI GenBank에서 기능을 탐색하고, 유전자의 발현양상을 확인할 수 있는 분자생물학적 분석을 수행하였다. DNA 상에서 확보된 유전자의 존재여부, copy 수 등에 대한 정보를 얻기 위해 돼지의 genomic DNA를 이용한 Southern blotting을 수행하였다. 각 조직에서의 유전자 발현양상을 확인하기 위한 방법으로서는 비교하고자 하는 조직의 total RNA로부터 cDNA를 합성하여 Northern blotting와 RT-PCR을 수행하였다. 그리고 연구하는 과정에서 새로운 기술로서 Real time PCR 분석기법을 적용하여 더욱 정확한 유전자 발현양상도 확인하였다. 마지막으로 단백질 수준에서의 발현양상을 확인하는 방법으로서는 RNA 수준에서 확인되었던 조직과 동일한 조직으로부터 total protein을 분리하고 항체를 제작하여 Western blotting을 수행하였다.

본 연구에서는 더욱 많은 돼지의 경제형질 연관 유전자를 선별하기 위해 또한 이미 경제형질과의 연관성이 알려져 있는 candidate gene을 선별하였고, 경제형질이

조사되어진 실험동물을 품종별로 선발하여 경제형질과의 연관성을 재확인하였으며, 그 결과 진단기법으로의 개발이 가능한지를 분석하였다.

경제형질과 관련된 우수 유전자를 찾기 위한 여러 가지의 실험기법을 본 연구에서 적용함으로써 더욱 효과적인 연구 결과를 얻는데 최선을 다하였다. 그럼으로서 본 연구를 통해 경제형질과 연관된 유전자를 확보할 수 있었고 돼지의 경제형질 특이 유전자를 이용한 종돈 조기 진단 기술을 개발할 수 있었다.

제 2 절 경제형질 연관 marker를 이용한 flanking DNA cloning

1. 실험동물 및 샘플 준비

가. 실험동물

경제형질과 연관성이 높은 우수 marker의 재현성 검증을 위하여 2004년 5월~ 8월까지 제2 종돈능력검정소의 검정돈으로부터 요크셔 96두, 버크셔 28두, 듀록 86두, 랜드레이스 40두의 종돈을 선발하여 총 250 두의 혈액과 검정성적(체장, 일당증체량, 사료요구율, 등지방두께, 정육율)을 확보하였다. 확보한 250두의 검정성적은 Table 1과 같으며 대략 5cc 정도씩 혈액을 채혈한 후 냉장 보관하여 본 연구에 이용하였다.

Table 1에 나타낸 실험동물의 정보를 보면, Landrace(LL), Duroc(DD), Yorkshire(YY), Berkshire(BB)로 구성된 품종(Species), 성별(Sex), 이표번호(ID, Identity No.), 체장(BL, Body length), 30~90kg까지의 일당증체량(ADG, Average daily gain), 사료요구율(FC, Feed conversion), PIGLOG program을 이용한 등지방두께(BFT, Backfat thickness)와 정육율(MP, Meat percent)값이 있다.

Table 1. Experimental animals

No.	Sep	Sex	ID	BL(cm)	ADG(g)	FC	BFT(cm)	MP(%)
1	YY	Y	10-169	107	1137	2.17	1.23	62.6
2	YY	Y	10-171	107	1102	2.17	1.33	59
3	YY	X	103-97	106	906	2.48	1.54	58.7
4	YY	X	103-99	106	922	2.48	1.42	57.9
5	YY	X	102-273	106	923	2.47	1.37	58.4
6	YY	X	102-274	106	954	2.47	1.46	57.9
7	YY	Y	63-134	106	1000	2.48	1.14	54.1
8	YY	Y	63-135	106	984	2.48	1.19	57.1
9	YY	Y	92-119	107	1250	2.07	1.25	56.4
10	YY	Y	92-120	107	1102	2.07	1.41	61.3
11	YY	Y	63-146	106	1173	2.25	1.17	56.9
12	YY	Y	63-147	106	1115	2.25	1.46	60
13	YY	Y	63-172	106	1017	2.37	1.25	56.5
14	YY	Y	63-174	106	1017	2.37	1.41	57.2
15	YY	X	90-13	106	897	2.51	1.18	56.5
16	YY	X	105-6	106	1000	2.48	1.52	56.8
17	YY	Y	102-316	106	1146	2.33	1.32	58.9
18	YY	Y	102-317	106	1000	2.33	1.31	56.8
19	YY	Y	81-171	106	1103	2.29	1.14	56.5
20	YY	Y	81-172	106	1017	2.29	1.21	59
21	YY	Y	109-94	106	1000	2.38	1.21	57
22	YY	X	15-31	106	896	2.52	1.39	55.9
23	YY	X	15-32	106	896	2.52	1.28	58.3
24	YY	X	15-34	106	1000	2.46	1.75	53.8
25	YY	X	32-40	106	1000	2.37	1.07	61.4
26	YY	X	32-45	106	902	2.37	1.31	59.1
27	YY	X	32-61	106	900	2.4	1.3	57.6
28	YY	X	32-66	106	1000	2.4	1.17	61.6
29	YY	Y	67-93	106	1019	2.4	1.42	52.5
30	YY	Y	67-96	106	1019	2.4	1.36	54
31	YY	Y	67-97	106	1000	2.37	1.25	58.1
32	YY	Y	67-99	106	1034	2.37	1.42	58.9
33	YY	Y	39-1	106	1056	2.31	1.46	60.8
34	YY	Y	39-2	106	1111	2.31	1.37	62.6
35	YY	X	103-112	106	914	2.57	1.21	57.9
36	YY	X	103-113	106	886	2.57	1.34	63.1
37	YY	X	103-144	106	849	2.53	1.3	60.3
38	YY	X	15-35	106	882	2.63	1.4	56.5
39	YY	X	15-36	106	882	2.63	1.83	53.6
40	YY	Y	105-51	106	952	2.5	1.23	60.5
41	YY	X	63-178	106	925	2.4	1.46	54
42	YY	X	63-179	106	896	2.4	1.13	61.3
43	YY	Y	3-128A	106	1107	2.33	1.43	53.9
44	YY	Y	67-158	107	1311	1.93	1.29	60.9
45	YY	Y	67-159	106	1229	1.93	1.35	56.9
46	YY	Y	92-155	106	1115	2.39	1.28	61.1
47	YY	Y	92-156	106	1135	2.39	1.23	60.9
48	YY	Y	53-13	106	1111	2.35	1.3	59.6
49	YY	Y	92-147	106	1240	2.03	1.16	59.8
50	YY	Y	53-21	106	1098	2.37	1.3	56.5
52	YY	Y	92-161	106	1239	2.23	1.23	57.8
53	YY	Y	53-28	106	1000	2.52	1.09	58
54	YY	Y	53-40	106	1036	2.33	1.46	58.3
55	YY	Y	53-41	106	964	2.33	1.39	57.8
56	YY	Y	193-41	106	1245	2.21	1.28	55
57	YY	Y	193-42	106	1102	2.21	1.66	54.6
58	YY	Y	103-136	106	1016	2.37	1.37	58.8
59	YY	Y	103-138	106	1016	2.37	1.49	60.8
60	YY	Y	103-134	106	1033	2.38	0.95	61.8

61	YY	Y	103-137	106	1017	2.38	1.08	62.2
62	YY	X	103-110	106	922	2.45	1.16	62.9
63	YY	X	103-111	106	1040	2.45	1.14	63.8
64	YY	X	103-127	106	897	2.55	1.27	58.4
65	YY	X	103-129	106	882	2.55	1.32	59.7
66	YY	X	15-37	106	909	2.53	1.93	48.8
67	YY	X	15-41	106	909	2.53	1.37	55.6
68	YY	X	92-167	106	966	2.37	1.3	58.1
69	YY	X	92-168	106	1000	2.37	1.41	58.6
70	YY	X	53-34	106	1000	2.37	1.35	54.1
71	YY	X	53-38	106	1000	2.37	1.44	56.5
72	YY	X	53-24	106	952	2.4	1.22	58.8
73	YY	X	53-27	106	921	2.4	1.22	61.1
74	YY	Y	67-126	106	1135	2.21	1.73	51.7
75	YY	Y	67-128	106	1077	2.21	1.39	56.9
76	YY	Y	190-3	106	933	2.5	1.44	56.2
77	YY	X	35-58	106	938	2.48	1.83	56.4
78	YY	X	35-63	106	923	2.48	1.67	57.1
79	YY	X	93-32	106	952	2.47	1.73	59.1
80	YY	X	93-35	106	952	2.47	1.8	58.4
81	YY	Y	35-22	106	1130	2.31	1.71	58.4
82	YY	Y	35-44	106	1111	2.33	1.73	57.6
83	YY	X	32-60	106	938	2.4	1.3	57.3
84	YY	X	32-62	106	967	2.37	1.51	51.7
85	YY	X	32-61	106	1000	2.37	1.33	60.5
86	YY	X	32-84	106	983	2.47	1.23	60.3
87	YY	Y	1680	106	1200	2.33	1.41	56
88	YY	Y	1686	106	1033	2.33	1.34	56.4
89	YY	Y	67-54	106	1113	2.33	1.29	58.7
90	YY	X	93-85	106	915	2.5	1.66	59.1
91	YY	X	35-100	105	902	2.47	1.6	58.4
92	YY	X	35-101	105	902	2.47	1.68	58.8
93	YY	X	35-68	105	909	2.38	1.73	58.4
94	YY	X	35-70	105	922	2.38	1.62	58.9
95	YY	X	35-158	105	909	2.57	1.53	58.9
96	YY	X	35-159	105	909	2.57	1.5	59.2
97	BB	X	23-10	106	887	2.67	1.36	55.1
98	BB	Y	23-19	105	1000	2.47	1.2	56.9
99	BB	Y	43-194	105	1000	2.5	1.23	59.4
100	BB	Y	43-198	105	1000	2.5	1.3	52.3
101	BB	X	43-108	106	877	2.73	1.35	56.5
102	BB	Y	48-3	106	1019	2.64	1.21	61.7
103	BB	Y	48-6	106	1000	2.64	1.19	62.4
104	BB	Y	86-15	106	1000	2.33	1.62	59.1
105	BB	Y	86-22	106	1070.2	2.33	1.43	58.9
106	BB	Y	67-171	106	953	2.4	1.2	60.2
107	BB	Y	67-90	106	1050	2.35	1.17	57.1
108	BB	Y	49-14	106	948	2.38	1.6	58.4
109	BB	Y	105-104	106	968	2.47	1.5	59.1
110	BB	X	32-72	106	1000	2.43	1.23	57.8
111	BB	X	32-78	106	900	2.43	1.41	56.5
112	BB	Y	76-188	106	1053	2.37	1.47	55.4
113	BB	Y	76-177	106	1200	2.3	1.5	58.3
114	BB	Y	76-179	106	1120	2.3	1.61	54.2
115	BB	X	35-80	105	937	2.44	1.68	57.4
116	BB	X	3-41	106	848.5	2.47	1.37	55.2
117	BB	X	102-105	106	938.5	2.38	1.68	55.6
118	BB	X	106-42	106	1000	2.33	1.63	53.2
119	BB	X	36-59	106	909.1	2.37	1.67	53.8
120	BB	X	102-134	106	923.1	2.38	1.27	50.5
121	BB	X	102-142	106	892.3	2.4	1.67	56
122	BB	X	102-143	106	923.1	2.4	1.4	51.3
123	BB	X	108-93	105	935.5	2.4	1.49	54.5
124	BB	Y	159-6	106	1164	2.4	1.14	57.2

125	DD	Y	154-1	106	1241	2.03	1.28	58.9
126	DD	Y	154-7	106	1035	2.03	1.13	59.2
127	DD	Y	123-21	106	1217	2.07	1.44	58.9
128	DD	Y	123-23	106	1261	2.07	1.3	59.7
129	DD	Y	7-2	107	1283	2.08	1.27	59.7
130	DD	Y	21-130	106	1121	2.05	1.19	58.5
131	DD	Y	21-131	106	1273	2.05	1.4	59.6
132	DD	Y	9-1	106	1311	1.98	1.32	60.5
133	DD	Y	30-136	106	1273	2.05	1.26	56.9
134	DD	Y	30-132	106	1113	2.05	1.32	56.1
135	DD	Y	99-40	106	1234	2.07	1.26	60.4
136	DD	Y	99-44	106	1234	2.07	1.06	62.3
137	DD	X	62-42	106	908	2.64	1.61	50.8
138	DD	X	150-2	106	892	2.66	1.64	53.4
139	DD	X	156-4	106	900	2.62	1.2	58.3
140	DD	Y	3-1	106	1261	2.05	1.23	57.6
141	DD	Y	104-16	106	1154	2.23	1.3	59.3
142	DD	Y	13-36	106	1184	2.02	1.33	58.9
143	DD	Y	13-43	106	1245	2.02	1.35	58
144	DD	Y	62-6	106	1262	2.02	1.3	61.1
145	DD	Y	62-7	106	1107	2.02	1.14	61.8
146	DD	Y	73-44	106	1123	2.33	1.25	57.1
147	DD	Y	73-46	106	1180	2.37	1.07	57.8
148	DD	Y	74-47	106	1113	2.37	1.25	61
149	DD	Y	27-52	106	1111	2.39	1.35	55.5
150	DD	Y	2-86	106	1111	2.3	1.52	54.8
151	DD	Y	2-30	106	1135	2.03	1.47	55.9
152	DD	Y	2-31	106	1250	2.03	1.43	59.2
153	DD	Y	2-58	106	1118	2.23	1.37	58.7
154	DD	Y	7095	106	1208	1.98	1.36	59.7
155	DD	Y	7096	106	1292	1.98	1.2	59.8
156	DD	Y	191-3	106	1105	2.31	1.22	56.6
157	DD	Y	191-5	106	1100	2.31	1.53	55.8
158	DD	Y	62-24	106	1132	2.33	1.4	56.2
159	DD	Y	62-26	106	1038	2.28	1.42	53.4
160	DD	Y	62-27	106	1208	2.28	1.27	56.2
161	DD	Y	198-26	106	1107	2.25	1.59	55.7
162	DD	Y	198-28	106	1125	2.25	1.42	59.6
163	DD	Y	191-2	106	1260	2.03	1.32	57.1
164	DD	Y	198-8	106	1135	2.2	1.29	60.8
165	DD	Y	83-136	106	1107	2.37	1.17	60.7
166	DD	Y	191-8	106	1094	2.27	1.42	60.1
167	DD	Y	50-116	106	1189	2.3	1.59	53.8
168	DD	Y	3-72	106	1148	2.18	1.35	57.4
169	DD	Y	3-84	106	1167	2.18	1.3	60.8
170	DD	Y	11-25	106	1121	2.3	1.4	56.9
171	DD	Y	60-122	108	1296	1.98	1.42	58.2
172	DD	Y	60-123	107	1245	1.98	1.18	60.2
173	DD	Y	2-118	106	968	2.37	1.51	59.1
174	DD	Y	102-24	108	1125	2.03	1.37	59.6
175	DD	Y	102-25	108	1250	2.03	1.3	61.3
176	DD	Y	102-52	107	1196	2.17	1.35	61.3
177	DD	Y	102-26	107	1118	2.17	1.42	60.8
178	DD	Y	100-60	106	1039	2.35	1.41	59.4
179	DD	Y	100-64	106	1135	2.35	1.29	57.6
180	DD	Y	100-81	106	1111	2.37	1.35	59.6
181	DD	Y	99-7	106	1130	2.33	1.44	59.1
182	DD	Y	99-16	106	1111	2.33	1.33	61.3
183	DD	Y	99-17	106	1120	2.3	1.16	60.8
184	DD	Y	99-23	106	1120	2.3	1.19	61
185	DD	Y	104-22	106	1265	2.07	1.59	51.5
186	DD	Y	104-23	106	1225	2.07	1.33	60.6
187	DD	Y	104-29	106	1292	2.02	1.24	59.2

188	DD	Y	104-25	106	1250	2.02	1.37	58
189	DD	Y	104-26	106	1125	2.17	1.37	59.1
190	DD	Y	104-24	106	1250	2.17	1.37	57.6
191	DD	Y	13-13	106	1189	2.28	1.32	60.8
192	DD	X	164-8	106	950	2.67	1.74	58.2
193	DD	Y	99-80	106	1148	2.33	1.2	59.9
194	DD	Y	64-40	106	1132	2.3	1.4	58.3
195	DD	Y	104-34	106	1107	2.4	1.2	57.4
196	DD	Y	104-38	106	1109	2.31	1.52	54.4
197	DD	Y	13-28	106	1115	2.37	1.47	58.2
198	DD	Y	196-16	106	1113	2.17	1.45	59.9
199	DD	Y	196-17	106	1113	2.17	1.52	56.4
200	DD	Y	195-72	106	1054	2.42	1.29	59.7
201	DD	Y	71-61	106	1115	2.33	1.4	60.1
202	DD	Y	71-62	106	1115	2.33	1.4	58.5
203	DD	Y	113-11	106	1164	2.32	1.19	56.4
204	DD	Y	113-16	106	1154	2.33	1.1	59.1
205	DD	Y	113-19	106	1140	2.33	1.35	63.3
206	DD	Y	6-2	106	1192	2.13	1.06	59.5
207	DD	Y	6-8	106	1115	2.13	1.14	59.7
208	DD	Y	64-59	106	1265	2.05	1.27	58.5
209	DD	Y	64-62	106	1143	2.05	1.3	60.3
210	DD	Y	8000	106	1151	2.31	1.31	56.8
211	LL	X	102-14	106	1051	2.33	2.44	46.4
212	LL	X	102-15	106	915	2.33	1.95	54.1
213	LL	X	102-20	106	1000	2.4	2.4	44.8
214	LL	X	102-30	106	900	2.4	1.92	51.8
215	LL	X	102-35	106	900	2.37	1.59	54.5
216	LL	X	102-42	106	1000	2.37	1.47	51.8
217	LL	X	102-44	106	923	2.4	1.63	53.9
218	LL	X	55-9	106	1000	2.37	2.1	52.2
219	LL	X	55-12	106	1000	2.37	1.62	57.1
220	LL	X	55-18	106	968	2.38	1.4	56.1
221	LL	X	55-22	106	919	2.38	1.32	58.2
222	LL	X	145-55	105	909	2.48	1.23	61.4
223	LL	X	145-56	105	924	2.48	1.25	62.3
224	LL	X	109-55	105	908	2.58	1.35	61.6
225	LL	X	109-56	105	908	2.58	1.35	61.8
226	LL	X	145-81	105	924	2.58	1.38	60.4
227	LL	X	145-83	105	909	2.58	1.37	59.1
228	LL	X	2-80	105	921	2.5	1.3	58.4
229	LL	X	2-87	105	905	2.5	1.28	57.9
230	LL	X	102-76	105	984	2.48	1.2	59.7
231	LL	X	102-77	105	918	2.48	1.26	61.4
232	LL	Y	99-77	107	1109	2.35	1.25	58.5
233	LL	Y	99-79	107	1091	2.35	1.43	56.8
234	LL	Y	99-92	107	1036	2.38	1.22	60.7
235	LL	Y	99-106	107	1016	2.24	1.36	58.4
236	LL	Y	99-107	107	1000	2.24	1.68	56
237	LL	Y	99-110	107	1103	2.43	1.3	57.6
238	LL	Y	99-113	107	966	2.43	1.3	56.8
239	LL	X	145-31	106	877	2.58	1.28	55.9
240	LL	X	145-36	105	923	2.58	1.8	53
241	LL	Y	145-26	106	1173	2.28	1.16	55
242	LL	Y	145-29	106	1077	2.28	1.4	58.2
243	LL	Y	55-1	106	1000	2.35	1.39	56.4
244	LL	Y	55-3	106	1036	2.35	1.32	58.7
245	LL	Y	55-15	106	1135	2.21	1.35	53.9
246	LL	Y	55-18	106	1077	2.21	1.3	60
247	LL	Y	131-14	106	1053	2.33	1.2	56.4
248	LL	X	145-58	105	908	2.45	1.42	55.2
249	LL	X	9-118	106	950	2.48	1.59	55.7
250	LL	X	9-118A	106	950	2.48	1.32	60.5

나. Genomic DNA 분리

1) 연구 방법

확보된 250두 능력검정돈의 혈액으로부터 시간 소모가 적고 비교적 간편한 Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 이용하여 Genomic DNA를 분리하였다. Kit의 경우에는 적은 혈액 sample로부터 비교적 많은 DNA를 깨끗하게 분리할 수 있어 효과적이고, 또한 분리되어지는 개체간의 DNA농도 수준이 서로 비슷하여 PCR 분석에 효과적인 장점이 있다.

혈액 300 μ l로부터 분리되는 실험 방법은 Figure 1과 같았고, 분리된 genomic DNA는 agarose gel 전기영동 분석 및 spectrophotometer 분석으로 정량하여 동일한 농도로 희석하여 PCR 분석 시 적정 농도로 이용하였다.

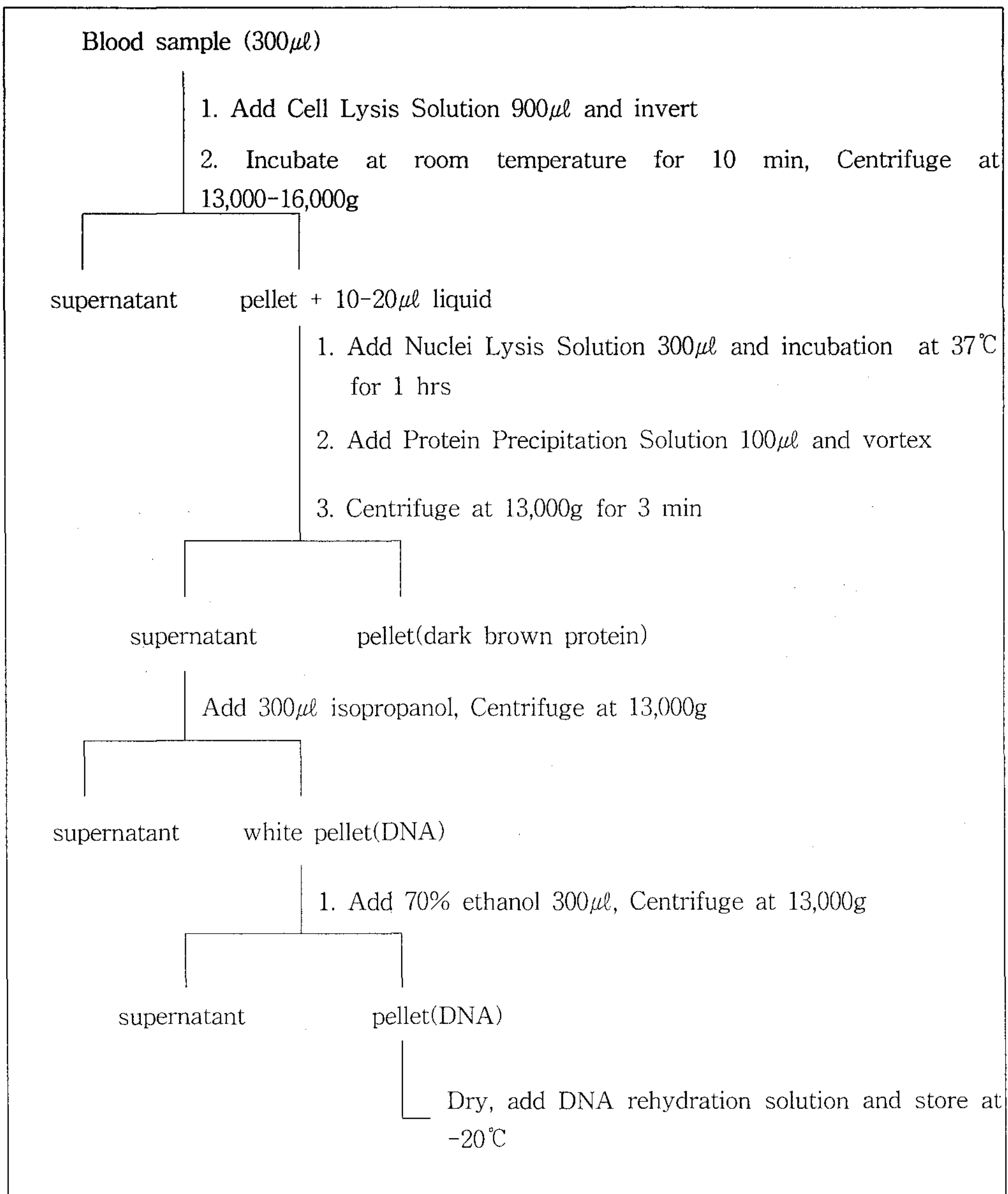


Figure 1. Methods of extraction from blood samples to Genomic DNA using Genomic DNA purification Kit.

2) 연구결과

경제형질 관련 유전자에 대한 marker 분석에 이용하였던 250두 돼지의 혈액으

로부터 genomic DNA를 분리하여 이들의 농도 및 순도를 1.0% agarose gel에 loading하여 확인하였다. Figure 2에서는 전체 250두 중 128두에 대한 DNA 분리 결과를 나타내었다. 250두의 실험동물에 대한 genomic DNA는 모두 깨끗하게 비슷한 농도로 잘 분리된 것을 확인하여 경제형질 연관 marker 재현성 검정을 위한 실험에 이용될 수 있었다.

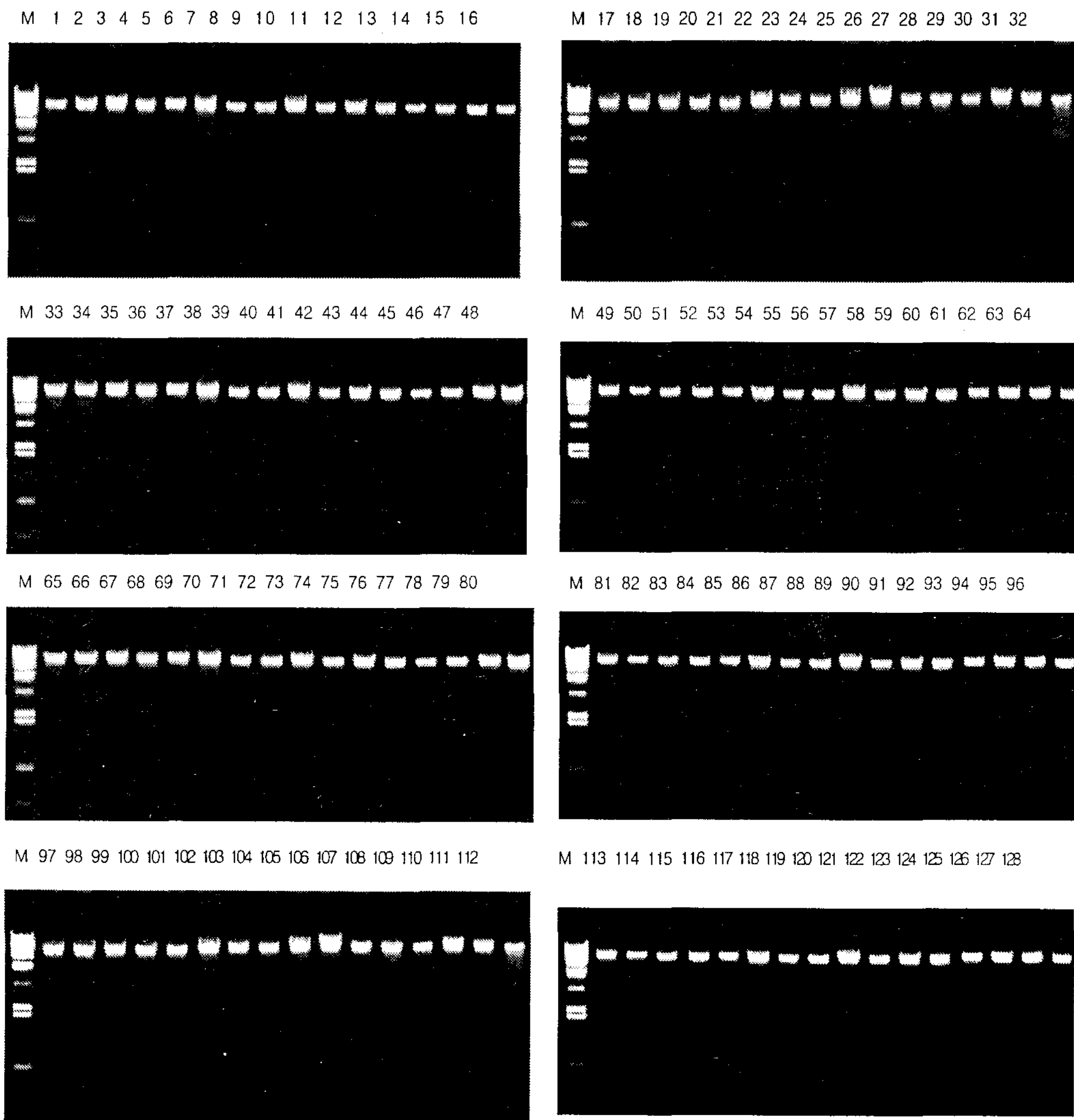


Figure 2. Extracted genomic DNA from blood of pigs in 1.0 % agarose gel electrophoresis. M; λ DNA/HindIII size marker.

2. 경제형질 연관 우수 marker 선발

이미 3년간의 실험을 통해 확보된 경제형질 연관 MS(microsatellite) marker 중 본 실험에서 사용할 것을 형질별로 경제형질 연관 marker들을 분류하였다. 대부분의 marker들은 여러 경제형질에 연관성이 높은 것을 알 수 있었고, 한 형질에만 specific하게 나타나는 것 또한 볼 수 있었다. 이러한 내용을 기초로 하여 우수 유전자만을 cloning 하기 위해 먼저 확보된 경제형질 marker 중 우수 marker 만을 확보하기 위한 재현성 검증을 실시하고자 하였다.

지방산 조성, 수분함량, 전단가, 도체중, 생체중, 육색, 지방색, pH, 가열함량 등과 연관성이 높은 marker들을 도체형질, 품질특성, 육색 및 지방색, 지방산 조성으로 크게 분류하여 아래에 나타내었고, 서로 조합시켜 경제형질과 연관성이 매우 높은 specific marker 들만을 선발하여 정리하였다. 지난 3년의 연구를 통해 각 경제형질별로 확보되어진 MS marker는 다음과 같다.

도체형질은 도체시 생체중 (LW, live weight), 도체중 (CW, carcass weight), 정육율 (DP, dressing percent), 등지방두께 (BF, backfat thickness)를 조사한 것으로서 이 형질과 연관성이 있는 33개의 DNA marker를 확인하여 다음에 나타내었다.

도 체 형 질 (33개)										
SW841	SW270	SW2435	SW1003	S0217	S0249	SW835	SW1492	SW1678	S0145	S0301
SWR2179	SW2547	S0107	S0097	SW1707	SW2404	SW2454	SW839	SW714	SW58	SW1475
S0217	SW1461	SW871	SWR1110	SW1967	S0212	SW752	SW317	SW1710	SW2066	SW1336

품질특성은 도체시 등심조직을 채취하여 이로부터 수분 (MOS, moisture), 지방 (CF, crude fat), pH, 전단가 (SF, shear force), 가열함량 (CL, heating)을 분석한 것으로서 이 형질과 연관성이 있는 45개 DNA marker를 확인하여 다음에 나타내었다.

품 질 특 성 (45개)

SW841	SW1364	SW270	SW524	SW2435	SW188	SW1513	SW10003	S0217	S0249	SW835
SWR73	SW1492	SW1678	S0145	SWR1367	S0027	S0301	SWR2179	SW2547	S0107	S0097
SW1707	SW2404	SW2454	SW714	SWR153	S0249	SW1475	S0217	SW2454	SW1380	SW871
SWR1110	SW1967	SW286	SW489	S0175	SW317	SWR1998	SW1710	SWR1806	S0161	S0214
SW1336										

육색 및 지방색을 나타내는 가장 중요한 조사항목인 육 및 지방의 밝기 (L, light), 적색도 (a, redness), 황색도 (b, yellowness)에 대해서 분석하여 이 형질과 연관성이 있는 33개 DNA marker를 확인하여 다음에 나타내었다.

육 색 및 지 방 색 (33개)

SW841	SW1364	SW270	SW2435	SW188	S0249	SW835	SWR73	S0145	SW58		
SW839	SW714	S0249	SW1369	SWR1367	SW2404	SW2547	SW1475	S0023	SW724		
S0217	SW1678	SW2454	SW1967	SWR2179	S0001	S0175	SW317	SW1336	SW1461		
SW1710	SW1873	SW2066									

지방산 조성은 육의 질을 평가하는 중요한 항목으로서 가장 중요한 지방산인 포화지방산 C14:0, C16:0, C18:0과 불포화지방산 C16:1, C18:1, C18:2, C20:4의 값을 분석하여 각 지방산과 연관성이 있는 44개 DNA marker를 확인하여 다음에 나타내었다.

지 방 산 조 성 (44개)

SW841	SW1364	SW147	SW524	SW2435	SW188	SW1513	S0217	S0249	SW835		
SWR73	SW1492	SW1678	S0145	SWR1367	S0027	S0301	SWR2179	SW1856	S0107		
S0097	SW1707	SW2404	SW839	SW2454	SW714	SWR153	SW1475	SW2451	SW58		
S0217	SW1461	S0001	S0175	SW752	SW632	S0212	SWR1998	SW724	SW1710		
SW2066	S0161	S0214	SW1380								

지난 3년 동안 “돼지의 경제형질 연관 DNA marker 개발 연구과제”를 수행

함에 따라 얻어진 경제형질 연관 marker는 모두 155개가 있었다. 이러한 도체, 품질, 육색 및 지방색, 지방조성과 같은 다양한 경제형질과 관련된 marker를 분석하고 개발하는 것은 오히려 광범위하여 효과적인 marker 개발이 어려울 수 있다고 판단하여, 본 연구에서는 경제형질 중 성장과 지방형질에 초점을 두고 이와 관련된 marker를 개발하는데 목표를 두고 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 우선 재현성 검증을 위해 선발된 능력검정돈의 체장, 일당증 체량, 사료요구율, 등지방두께, 정육율과 관련된 유전자를 확보하고자 이와 관련성이 있을 것으로 추정되는 23개의 marker를 155개로부터 선발하였다. Table 2에서 보면, 선발된 marker가 관련성이 있을 것으로 추정된 경제형질별로 분류되어 정리된 것을 확인할 수 있다. 선발된 23개 marker들이 실제 Table 2에 표시된 바와 같이 재현성있게 경제형질과 관련성이 있는지를 확인하기 위해 준비된 250두 종돈을 이용한 PCR 분석이 수행되었다.

Table 2. The selected markers for economic traits.

Traits	Marker
BL (Body length)	SW270, SWR2179
ADG (Average daily gain)	SW1707, SW147, SW270, SW1856, SW839, SW1873, SWR1998, SW835, SWR2179, S0212, SW841, SW1678, SW1369, SWR1806, SW1492, SW1513, SWR153, SW714, SW632
FC (Feed Conversion)	SW1707, SW270, SW1856, SW839, SW1873, SWR1998, SW835, S0212, SW1364, SW1678, SWR1806, SWR73, SWR153, SW1513, SW714
BFT (Backfat thickness)	SW1707, SW147, SW270, SW1856, SWR1998, SW835, S0212, SW841, SW1369, SWR1806, SW1513, SWR153
MP (Meat percent)	SW270, SW871, S0212, SW1513

3. 선발된 경제형질 연관 Marker의 재현성 검증

선발된 경제형질과 연관성이 높은 23개의 marker는 일당증체량, 등지방두께, 등심단면적 값을 토대로 채취되어진 250두의 혈액으로부터 경제형질과 연관성이 있는지를 먼저 확인하고자 marker의 재현성을 검증하였다.

가. 연구 방법

선발된 marker는 재현성 검증을 위해 fluorescence dye로 부착하여 primer pairs로 합성하였고, PCR 분석을 수행하고 결과의 확인을 위해 agarose gel 전기영동 후, 다시 Genetic Analyzer에서 정확한 유전자형을 확인하였다.

우선 선발된 marker에 대한 PCR 분석 결과를 agarose gel 전기영동 분석으로 1차 확인하였다(Figure 3). Agarose gel 전기영동에서는 작은 DNA 길이의 차이는 확인할 수 없고, Figure 3에서 보는 바와 같이 Genetic Analyzer에서 분석을 수행하기 이전에 PCR 분석이 잘 이루어졌는지를 확인하였다. SWR73 marker는 180bp 위치에서 결과를 확인할 수 있고, S0212 marker는 240bp, SW1492는 138bp, 그리고 SW1707 marker는 128bp 위치에서 모두 PCR이 잘 이루어진 결과를 확인할 수 있었다.

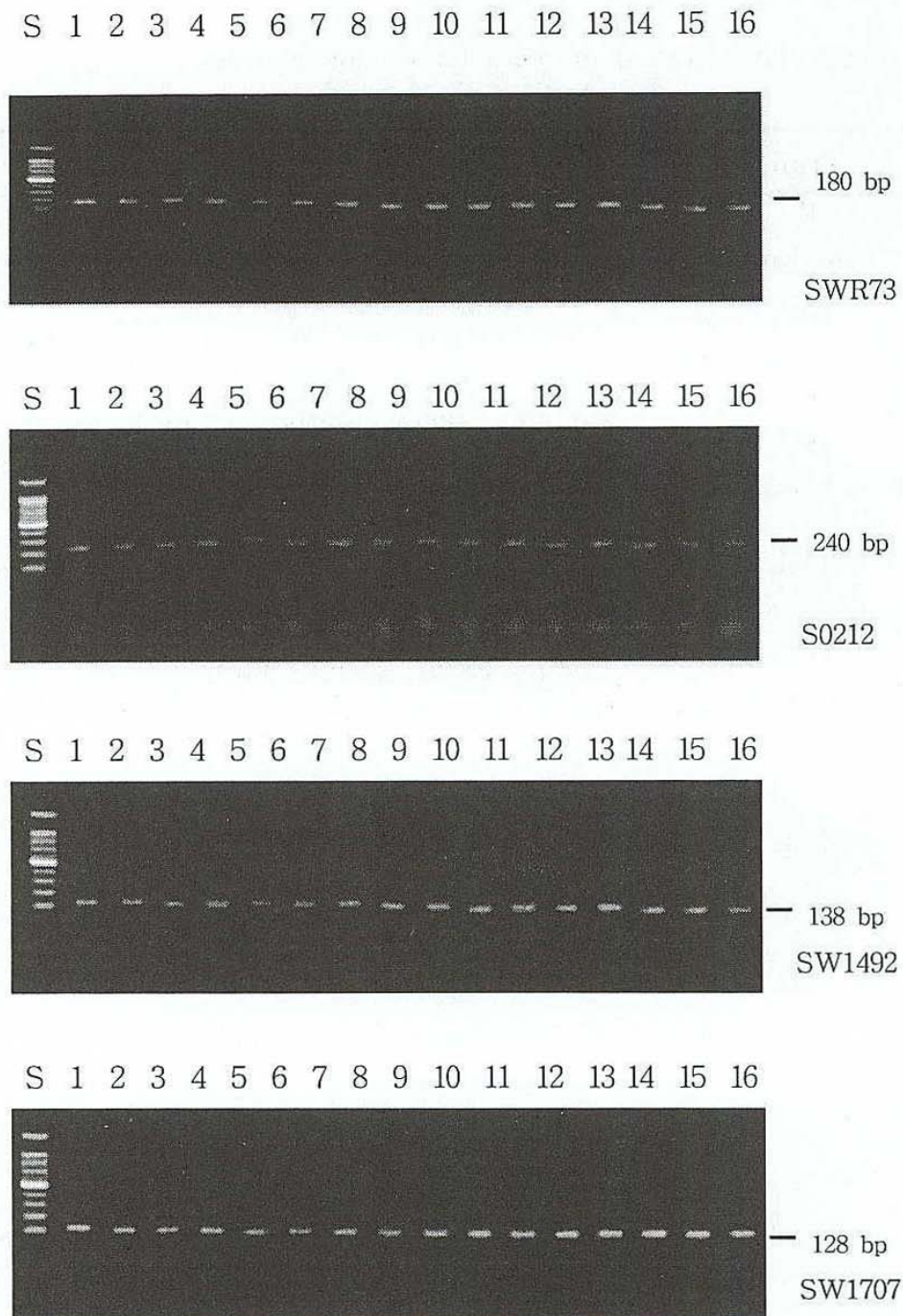


Figure 3. PCR results of selected markers(SWR73, S0212, SW1492, SW1707) in 2% agarose gel electrophoresis. S; size marker λ DNA/HindIII, number 1~16; selected experimental animals.

전기영동 분석을 통해 PCR 결과를 확인한 후 Genetic Analyzer (ABI3100, Applied Biosystems)에서 정확한 genotype 결과 분석이 이루어졌다. 선발된 marker들 중에서 6개의 marker를 multiple-injection으로 확인한 결과를 Figure 4에 나타내었다. 각 marker에 붙여진 dye의 종류에 따라 blue, green, black의

peak으로 확인할 수 있었다. 각 Sample에 대한 blue, green, black peak를 확인 하여야 하므로 1개의 multi-set 결과 전체의 량이 너무 많아 Figure 4에서는 multi set 전체 결과 중 일부만을 나타내었다.

Figure 4 에서 보면 세 종류의 dye에 따라 6-Fam dye가 labeling 되어진 SW1873-F (105-136bp), SW835-F (218-240), hex dey가 labeling 되어진 SW1492-H (116-138bp), SW147-H (211-223bp) 그리고 ned dye가 labeling 되어진 SW839-N (144-166bp), SW871-N (102-126bp)에 대한 각 개체별 genotype 결과를 한 번에 확인할 수 있다. 이들은 가로축 상단에 표기된 size에 따라 allele size를 확인할 수 있고, 소숫점 두 자리까지 분석함으로서 1 bp의 차이에 따른 allele의 차이도 확인가능하다.

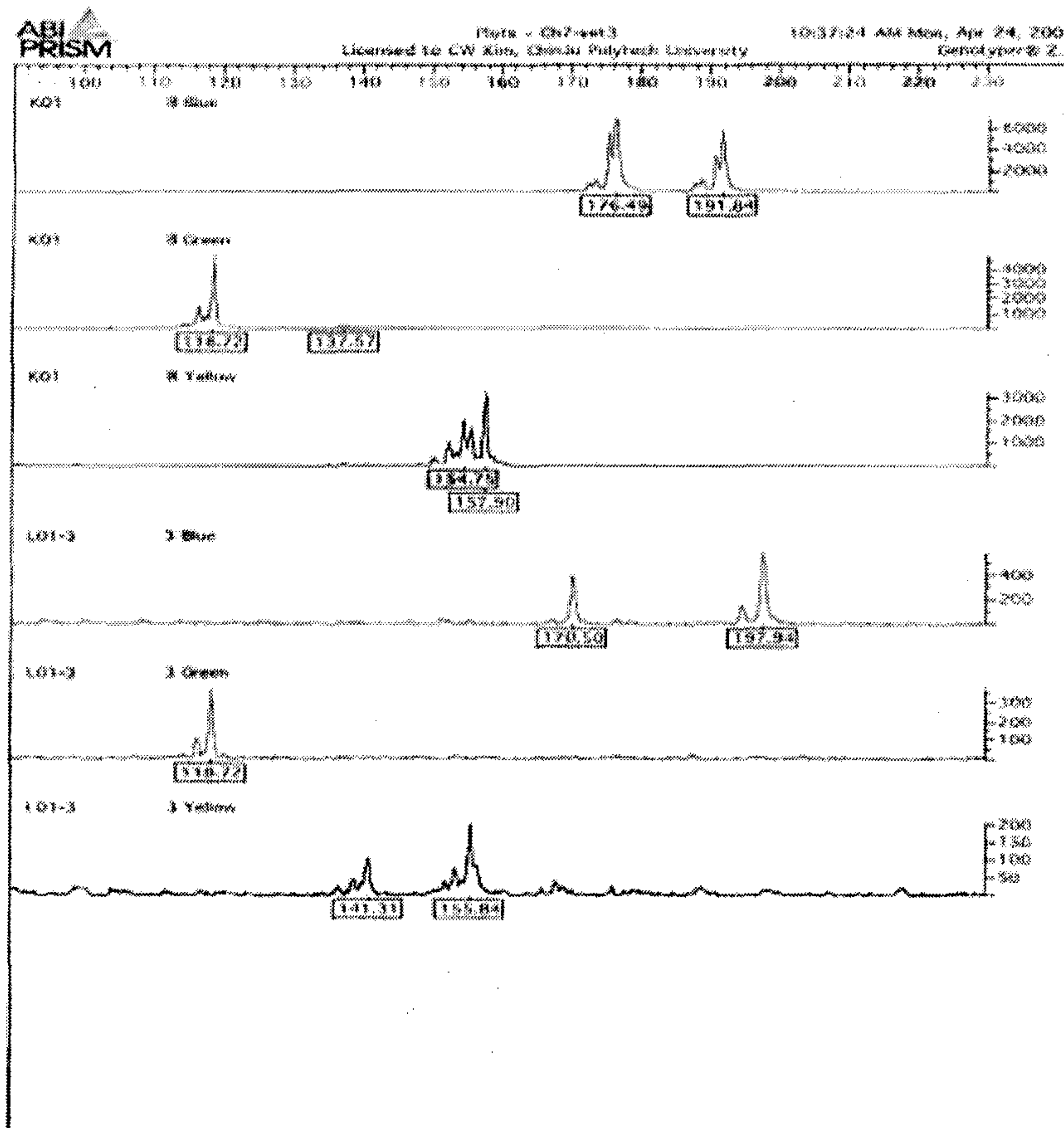


Figure 4. Peaks results analyzed by fragment analysis (ABI310, PE Biosystems). Blue peak; SW1873-F(105-136bp) and SW835-F(218-240), Green peak; SW1492-H(116-138bp) and SW147-H(211-223bp), Black peak; SW839-N(144-166bp) and SW871-N(102-126bp)

나. 연구 결과

선발된 23개의 MS marker들에 대한 genotyping 결과 모든 marker가 경제형질과의 연관성이 확인되었으며, 그 결과 Table 3에 나타낸 바와 같았다. 모든 23개의 marker는 이전에 밝혀진 MS marker의 allele range 내에서 모든 결과가 나타남을 확인할 수 있었다. 그리고 23개 marker에 대한 250두의 allele별 출현 두수도 나타내었다.

조사된 경제형질인 체장, 일당증체량, 사료요구율, 등지방두께, 정육율에 대해서 선발된 23개 marker는 모두 연관성이 있음이 재확인 되었다($p < 0.05$, Table 4). SW1707, SW1856, SWR1998, SW835은 일당증체량, 사료요구율, 등지방두께와 연관성이 있었고, SW147은 일당증체량, 등지방두께와 관련성이 있었다. SW270은 5개의 경제형질과 모두 연관성이 있었다. SW839는 일당증체량과 연관성이 있었고, SW871은 정육율과 관련성이 있었다. SW1873은 일당증체량과 사료요구율과, SWR2179는 체장과 일당증체량, SW1364는 사료요구율, S0212은 체장을 제외한 나머지 4개의 경제형질과 연관성이 있었다.

그래서 본 연구에서는 재현성검증으로 더욱 정확하게 경제형질과의 관련성이 확인되어진 선발된 23개의 marker에 대해서 TAIL-PCR 분석을 수행하였다.

Table 3. Genotyping Results for specific DNA markers.

MS	SW1707			SW147										
Alleles Species	109	111	113	211	213	215	217	219	221	223				
Total	77	160	3	3	67	5	9	70	1	21				
MS	SW270													
Alleles Species	130	132	136	138	140	144	146	150	152	154	156			
Total	9	74	5	67	6	23	13	4	25	10	4			
MS	SW1856					SW839								
Alleles Species	186	188	190	192	194	142	144	152	160	162				
Total	43	2	21	147	29	75	124	8	2	27				
MS	SW871													
Alleles Species	96	98	100	104	106	114	116	118	120	122	124			
Total	15	16	12	1	11	7	33	43	43	33	30			
MS	SW1873													
Alleles Species	101	103	105	107	109	111	119	121	123	125	127	129	131	133
Total	2	5	13	2	2	4	36	41	12	65	7	4	20	7
MS	SWR1998													
Alleles Species	161	167	169	171	173	177	181	183	187	189	199			
Total	14	3	18	26	51	34	2	40	30	2	4			
MS	SW835													
Alleles Species	216	218	220	222	224	226	230	236	238	240	242	246		
Total	1	12	19	26	5	16	23	39	71	10	3	1		
MS	SWR2179													
Alleles Species	130	142	146	148	150	152	154	156	158	160	162			
Total	1	23	32	73	15	15	44	13	9	8	3			
MS	S0212							SW1364						
Alleles Species	225	227	229	231	233	235	237	239	243	156	166	168	170	
Total	6	11	17	7	86	3	63	17	2	50	4	129	61	
MS	SW841							SW1678						
Alleles Species	153	155	167	169	171	173	175	185	99	101	109	111	113	
Total	1	19	32	41	81	53	16	1	10	1	2	153	14	
MS	SW1369					SWR1806								
Alleles Species	132	138	140	142	144	150	202	204	206	208	210	216	218	
Total	109	23	58	7	19	28	36	38	104	5	8	12	6	
MS	SW1492				SW1513					SWR73				
Alleles Species	116	121	126	131	138	137	139	143	145	147	121	130	138	
Total	11	2	2	160	16	106	23	59	6	19	68	7	58	
MS	SWR153					SW1513								
Alleles Species	219	228	235	239	243	137	139	144	147					
Total	125	7	3	4	15	17	68	10	9					
MS	SW714						SW632							
Alleles Species	146	148	157	159	164	169	217	222	226	230	233	235		
Total	45	65	17	19	49	17	15	20	13	71	5	53		

Table 4. Analysis of the association between genotype of markers and economic traits

Marker	allele	BL M±SD	ADG M±SD	FC M±SD	BFT M±SD	MP M±SD
SW1707	109	106.01±0.58	945.31±118.24 ^a	2.35±0.18 ^a	1.41±0.21 ^b	57.59±2.80
	111	105.57±0.53	969.00±59.91 ^a	2.59±0.10 ^b	1.26±0.07 ^a	57.76±3.63
	113	106.09±0.37	1155.88±89.96 ^b	2.20±0.17 ^a	1.35±0.14 ^{ab}	58.14±2.38
SW147	213	106.00±0.82	982.44±84.63 ^b	2.43±0.13	1.50±0.24 ^b	56.78±3.09
	217	105.98±0.33	1012.47±101.32 ^b	2.38±0.13	1.38±0.19 ^a	57.99±2.59
	219	105.84±0.69	939.16±45.20 ^a	2.48±0.09	1.51±0.23 ^b	57.12±3.14
SW270	132	106.14±0.44 ^b	1125.07±90.00 ^b	2.25±0.15 ^a	1.34±0.15 ^b	57.94±2.48 ^b
	138	106.28±0.54 ^b	882.00±7.07 ^a	2.70±0.04 ^b	1.36±0.01 ^b	55.80±0.99 ^a
	152	105.40±0.55 ^a	1003.80±8.50 ^{ab}	2.55±0.08 ^{ab}	1.23±0.044 ^a	58.54±4.10 ^b
SW1856	186	105.67±0.38	918.00±22.20 ^a	2.62±0.05 ^b	1.58±0.20 ^b	54.88±2.91
	192	106.10±0.38	1169.34±71.53 ^b	2.18±0.14 ^a	1.34±0.13 ^a	58.32±2.23
	194	105.82±0.83	944.50±46.41 ^a	2.48±0.09 ^b	1.55±0.23 ^b	56.81±3.25
SW839	142	106.47±0.56	1083.61±80.52 ^b	2.30±0.13 ^a	1.37±0.18	56.69±2.65
	144	105.86±0.35	933.72±43.34 ^a	2.46±0.07 ^b	1.43±0.21	58.02±2.77
	152	106.07±0.29	1080.36±86.75 ^b	2.32±0.12 ^a	1.34±0.16	57.96±2.45
SW871	116	105.70±0.58	968.67±71.36	2.59±0.11	1.26±0.09	58.90±3.41 ^b
	118	105.60±0.54	969.00±59.91	2.59±0.10	1.26±0.07	56.76±3.63 ^a
	120	105.60±0.54	969.00±59.91	2.59±0.10	1.26±0.07	56.76±3.63 ^a
SW1873	119	106.10±0.38	1163.14±76.01 ^b	2.18±0.17 ^a	1.28±0.09	59.73±1.83
	121	106.13±0.45	1162.64±79.67 ^b	2.18±0.13 ^a	1.33±0.13	58.66±2.16
	125	106.05±0.29	1149.52±99.73 ^a	2.22±0.19 ^b	1.38±0.16	57.52±2.45
SWR199 8	173	106.00±0.02	1149.29±84.65 ^a	2.19±0.16 ^b	1.29±0.12 ^a	58.27±3.01
	177	106.00±0.00	1182.67±67.09 ^b	2.11±0.06 ^a	1.37±0.08 ^b	57.17±1.96
	183	106.10±0.39	1155.54±91.41 ^a	2.20±0.17 ^b	1.35±0.15 ^b	58.16±2.36
SW835	222	106.09±0.37	1155.88±89.96 ^b	2.20±0.17 ^a	1.35±0.14 ^a	58.14±2.38
	236	105.91±0.30	938.18±38.26 ^a	2.52±0.06 ^b	1.58±0.07 ^b	58.52±0.51
	238	105.81±0.60	988.58±96.27 ^{ab}	2.43±0.15 ^b	1.51±0.22 ^b	57.03±2.55
SWR217 9	146	106.08±0.91 ^b	985.73±83.59 ^b	2.42±0.13	1.49±0.25	56.48±3.37
	148	106.02±0.83 ^b	983.35±85.12 ^b	2.43±0.14	1.50±0.24	56.76±3.13
	154	105.50±0.55 ^a	960.50±93.44 ^a	2.43±0.14	1.52±0.31	56.67±2.88
S0212	229	106.00±0.00	992.00±11.31 ^a	2.41±0.04 ^b	1.51±0.04 ^b	58.05±0.35 ^b
	233	106.00±0.82	982.44±84.63 ^a	2.43±0.13 ^b	1.50±0.24 ^b	56.78±3.09 ^a
	237	106.06±0.25	1027.25±114.64 ^b	2.34±0.18 ^a	1.30±0.16 ^a	57.87±2.03 ^b
SW1364	156	105.96±0.38	1011.82±104.77	2.38±0.11 ^a	1.40±0.19	57.57±2.66
	168	105.97±0.29	1006.92±91.48	2.51±0.12 ^b	1.39±0.21	58.69±2.61
	170	105.99±0.33	1015.96±99.50	2.38±0.13 ^a	1.37±0.19	58.11±2.57

(To be continued)

Marker	allele	BL M±SD	ADG M±SD	FC M±SD	BFT M±SD	MP M±SD
SW841	169	106.00±0.00	1063.75±135.25 ^b	2.40±0.16	1.50±0.09 ^b	56.10±1.74
	171	105.80±0.45	902.40±15.95 ^a	2.48±0.11	1.44±0.26 ^{ab}	57.14±3.32
	173	105.98±0.33	1012.47±101.32 ^{ab}	2.38±0.13	1.38±0.19 ^a	57.99±2.59
SW1678	99	106.10±0.38	1163.14±76.01 ^b	2.18±0.17 ^a	1.28±0.09	59.73±1.83
	111	106.13±0.45	1162.64±79.67 ^b	2.18±0.13 ^a	1.33±0.13	58.66±2.16
	113	106.05±0.29	1149.52±99.73 ^a	2.22±0.19 ^b	1.38±0.16	57.52±2.45
SW1369	132	106.00±0.00	1149.29±84.65 ^a	2.19±0.16 ^b	1.29±0.12	58.27±3.01
	140	106.00±0.00	1182.67±67.09 ^b	2.11±0.06 ^a	1.37±0.08	57.17±1.96
	150	106.10±0.39	1155.54±91.41 ^a	2.20±0.17 ^b	1.35±0.15	58.16±2.36
SWR1806	202	106.09±0.37	1155.88±89.96 ^b	2.20±0.17 ^a	1.35±0.14 ^a	58.14±2.38
	204	105.91±0.30	938.18±38.26 ^a	2.52±0.06 ^b	1.58±0.07 ^b	58.52±0.51
	206	105.81±0.60	988.58±96.27 ^{ab}	2.43±0.15 ^b	1.51±0.22 ^b	57.03±2.55
SW1492	116	106.08±0.91	985.73±83.59 ^b	2.42±0.13	1.49±0.25	56.48±3.37
	131	106.02±0.83	983.35±85.12 ^b	2.43±0.14	1.50±0.24	56.76±3.13
	138	105.50±0.55	960.50±93.44 ^a	2.43±0.14	1.52±0.31	56.67±2.88
SW1513	137	106.00±0.00	992.00±11.31 ^a	2.41±0.04	1.51±0.04 ^b	58.05±0.35
	139	106.00±0.82	982.44±84.63 ^a	2.43±0.13	1.50±0.24 ^b	56.78±3.09
	143	106.06±0.25	1027.25±114.64 ^b	2.34±0.18	1.30±0.16 ^a	57.87±2.03
SWR73	121	105.96±0.38	1011.82±104.77	2.38±0.11 ^a	1.40±0.19	57.57±2.66
	130	105.97±0.29	1006.92±91.48	2.41±0.12 ^b	1.39±0.21	58.69±2.61
	138	105.99±0.33	1015.96±99.50	2.38±0.13 ^a	1.37±0.19	58.11±2.57
SWR153	219	106.00±0.00	1063.75±135.25 ^b	2.40±0.16 ^a	1.50±0.09 ^b	56.10±1.74
	228	105.80±0.45	902.40±15.95 ^a	2.48±0.11 ^b	1.44±0.26 ^{ab}	57.14±3.32
	243	105.98±0.33	1012.47±101.32 ^{ab}	2.38±0.13 ^a	1.38±0.19 ^a	57.99±2.59
SW1513	137	105.50±0.58	969.25±61.50	2.39±0.11 ^a	1.27±0.07	56.65±4.30 ^a
	139	105.70±0.58	968.67±71.36	2.58±0.11 ^b	1.26±0.09	58.90±3.41 ^b
	144	105.60±0.54	969.00±59.91	2.39±0.10 ^a	1.26±0.07	56.76±3.63 ^a
SW714	146	105.99±0.04	1001.45±6.120 ^a	2.41±0.01 ^b	1.44±0.02	57.40±0.19
	148	105.77±0.12	1043.54±36.57 ^b	2.35±0.05 ^{ab}	1.48±0.06	56.61±0.62
	164	106.08±0.04	1140.93±10.08 ^b	2.22±0.02 ^a	1.36±0.02	58.11±0.23
SW632	222	106.03±0.05	1026.41±20.31 ^a	2.37±0.03	1.39±0.03	58.46±0.30
	230	105.97±0.04	1056.73±10.29 ^b	2.33±0.01	1.40±0.02	57.82±0.22
	235	106.14±0.05	1040.34±8.49 ^b	2.36±0.01	1.44±0.02	57.25±0.22

Different letters in the same column indicate a significant difference for each genotype ($p < 0.05$). BL; Body length(cm), ADG; Average daily gain(g), FC; Feed conversion, BFT; Backfat thickness(cm), MP; Meat percent(%)

4. 경제형질 연관 Marker를 이용한 TAIL-PCR 분석

가. 연구 방법

Tail-PCR은 이미 알고 있는 유전자 주위의 미지의 유전자를 탐색하기 위한 기법으로 PCR 실험기법을 기본으로 하여 DNA walking 실험 기법을 접목한 새로운 기술이다. 이 기법은 정확히 알고 있는 유전자 서열을 기준으로 알지 못하는 유전자 서열을 직접적으로 확인 및 획득 할 수 있는 방법을 제공한다. 간단하고 빠른 PCR 기본의 방법으로 genomic DNA, cDNA, total RNA sequence를 template로 사용가능하고 직접적으로 sequencing과 cloning도 가능하다.

이 연구에서는 이미 알고 있는 선발된 23개 marker의 염기서열의 정보를 이용하여 한 쪽 방향에 대한 연속적으로 제작된 primer (MS1, MS2, MS3)와 반대 방향에 random(hexamer) 혹은 AD(arbitrary degenerate) primer를 이용하여 PCR 분석을 통해서 marker 주변에 존재하고 있는 미지의 유전자를 확보하는 방법이다 (Figure 5). 이 TAIL-PCR을 통해 1차로 증폭된 PCR 산물은 정확한 유전자로서의 정확성이 다소 떨어질 수 있으므로 이 PCR 산물을 1000배로 희석시켜 다시 template로 하여 2차 PCR을 수행하고 또다시 2차 PCR 산물을 1000배로 희석시켜 3차 PCR의 template로 사용하여 3차 PCR을 수행함으로써 특이 유전자들을 얻을 수 있다.

3차까지 증폭되어진 PCR 산물은 agarose gel에서 전기영동을 통해서 확인이 가능하며, 2차 PCR 산물은 1차 PCR 산물보다 크기가 작고 3차 PCR 산물은 2차 PCR 산물보다 작기 때문에 크기에 따라 직접 확인이 가능하다. 즉 선발된 23개의 marker에서 1차 PCR을 수행하기 위한 46개 primer pair를 디자인 하였고, 다시 1차 PCR의 결과를 토대로 2차 PCR을 수행하기 위한 46개 primer pair를 디자인 하여 총 92개의 primer pair를 제작 하였다. 그러므로 23개 marker에 대해서 양쪽 방향으로 46개의 PCR 결과를 얻을 수 있었다.

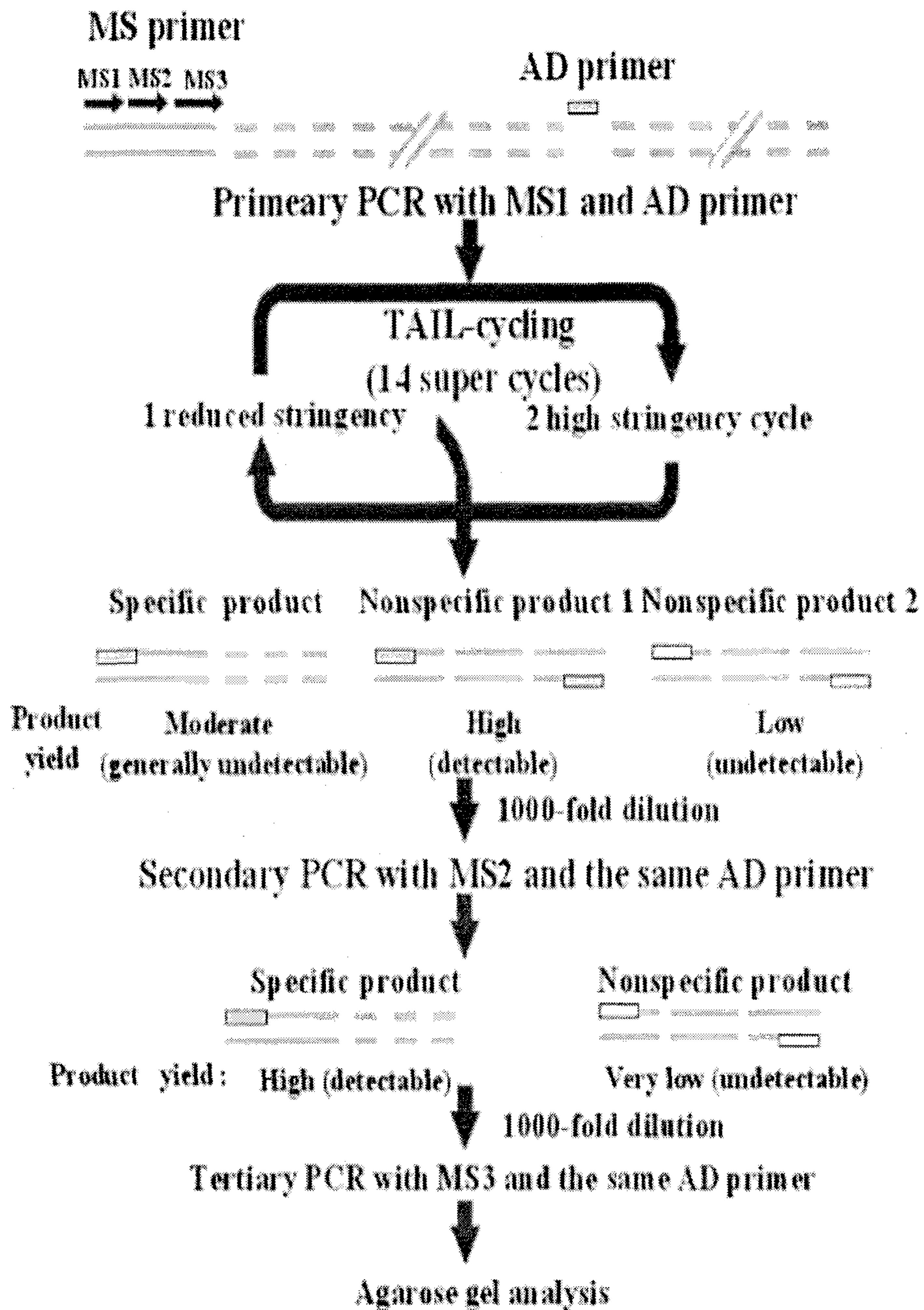


Figure 5. TAIL-PCR procedure for specific amplification of genomic sequence flanking a DNA insertion.

1) TAIL-PCR 분석을 위한 Primer 제작

경제 형질 연관 marker 주위의 유용 유전자들을 확보하기 위하여 이미 확보된 23개의 경제형질 연관 MS marker의 한쪽의 염기서열을 이용하여 TAIL-PCR용 forward와 reverse Primer 쌍들을 연속적으로 제작하고, 다른 한쪽에는 확률에 의해 이미 많은 연구에서 이용되어지고 있는 AD (arbitrary degenerate) 혹은 Random Primer를 주문제작하여 이용하였다.

재현성 검증을 통해서 확보되어진 23개의 marker 각각의 염기서열을 기준으로 연속적인 forward와 reverse 방향에 대하여 98개 primer를 제작하였다 (Table 5). Marker 자체의 sequence가 짧아 내부의 primer를 제작하기가 매우 힘들었으며 SW270, SWR1806, S0212 marker는 3쌍의 primer를 제작하였고, 나머지 marker는 2쌍의 primer를 제작하였다. Primer가 2쌍일 경우에는 1차 PCR과 2차 PCR에서 동일한 1번 primer를 이용하였다. Table 3에서 보듯이 Forward와 Reverse primer는 marker의 앞쪽과 뒤쪽을 구분하기 위하여 따로 제작 되었으며, 구분을 위해 대문자와 소문자로 구분하여 나타내었다. 각 primer 크기도 각각이며 TM 값을 조절하기도 힘들었다. 이렇게 디자인된 primer를 이용하여 Tail-PCR을 수행하였다.

Table 5. Primer pairs for TAIL-PCR.

No	Clone		Forward	Reverse	Primer size	TM
1	SW270	1	gatctttggtgagtgggaaa	TTTCCCCTCACCCTAAAGATC	21	58
		2	tcatttccttactgctcc	GGAGCAGTAAGGGAAATGA	19	58
		3	ttcctctcgcttccaaagg	CCTTTGGAAGCGAGAGGAA	19	60
2	SW1492	1	aggaatatactcatgttaactc	GAGTTAACATGAGTATATTCC	22	55.2
		2	cacatacacacaagagaaaga	TCTTTCTCTTGTGTGTATGTG	21	56.71
3	SW1678	1	gatcctttccctctggtaa	TTACCAGAGGGAAAGGATC	19	58
		2	cagacataaaatgattagcacaag	CTTGTGCTAATGATTTTATGTCTG	24	57.7
4	SW1369	1	tcaagcatcccaaagcc	GCTTTGGGGATGCTTGA	18	60
		2	cactaactcatttaagagg	CCCTCATTAATGAGTTAGTG	21	56.71
5	SW841	1	cagagaagcagagggaca	TGTCCCTCTGCTTCTCTG	18	60
		2	accagatactccctgcaa	TTGCAGGGAAGTATCTGGT	19	58
6	SWR1806	1	agttagctgtgaaataccagg	CCTGGTATTTACAGCTAACT	21	58.66
		2	acagtaaagtgaccagtc	TGACTGGGTCACTTTACTGT	20	58.35
		3	tggtccatcacaagtgattag	CTAATCACTTGTGATGGAAGA	21	56.71
7	SW632	1	gatcacagtaacacattaattca	TGAAATTAATGTGTTACTGTGATC	24	57
		2	tgggaagaagtgtaacagag	CTGTGTTACACTTCTTCCA	20	58.35
8	S0212	1	gcccacgactcaaactt	AAGGTTTGAGTCGTGGGC	18	60
		2	gaatgagtagggccatga	TGATGGCCCTAACTCATTC	19	58
		3	tggttatatgtgagatattc	GAATATCTCACATATAAGCCA	21	54.75
9	SWR153	1	atataattgaccacgttctcc	GGAGAACGTGGTCAATTATAT	21	56.71
		2	gcagcalatggagggtcc	GGAACCTCCATATGCTGC	18	60
10	SW1873	1	ggaactgcctatgcat	ATGGCATAGGGCAGTTCC	18	60
		2	ctgtagagagttaatcacag	CTGTGATTAACCTCTGTAACAG	21	56.71
11	SW1856	1	atccacaccattccagtgt	ACACTGGAATGGTGTGGAT	19	58
		2	tgaaatcacagcaatgccag	CTGGCATTGCTGTGATTCA	20	58.35
12	SW147	1	ttgcctttctccatgtgact	AGTCACATGGAGAAAGGCAA	20	58.35
		2	cacctttctttatctgttcac	GTGAACAGATAAAGAAAGGTG	21	56.71
13	SW1380	1	gatctagcccagctgaaa	TTTCAGCTGGGCTAGATC	18	57.62
		2	acagcagcctcagaggaca	TGTCCTCTGAGCTGCTGT	18	60

(To be continued)

No	Clone		Forward	Reverse	Primer size	TM
14	SW1364	1	ttcctatgtgtagcacctatg	CATAGGTGCTACACATAGGAA	21	58.6
		2	gcactccatttacacacaca	TGTGTGTGTAAATGGAGTGC	20	58
15	SW1513	1	gatccattggtgtttatcaac	GTTGATAAACAACCAATGGATC	22	57
		2	cttctaactctcatagttgg	CCAACACTATGATTAGAAG	21	56.71
16	SW835	1	atggagtttatttccactggc	GCCAGTGGAAATAAACTCCAT	21	58.66
		2	aacttggtaaacctctgactt	AAGTCAGAGGTTTACCAAGTT	21	56.71
17	SWR73	1	ttgggtctgacgttgctg	CAGCAACGTCAGACCCAA	18	60
		2	gtattagtttcaacagctacc	GGTAGCTGTTAGAACTAATAC	22	57
18	SWR2179	1	tcttccactagactgtgg	CCACAGTCTAGTGGAAGA	18	57.62
		2	gggctgaattggagccat	ATGGCTCCAATTCAGCCC	18	60
19	SW1707	1	ggaactctatctagttccttg	CAAGGAACTAGATAGAGTTCC	21	58.66
		2	actaggtgactttgctgttca	TGAACAGCAAAGTGACCTAGT	21	58.66
20	SW839	1	gaaaccaggataacaggag	CTCCTGTTATCCTGGTTTC	19	58
		2	aagaatcaggattctttggag	CTCCAAAGAATCCTGATTCTT	21	56.71
21	SW714	1	gatctcctgttagaacttgt	ACAAGTTCTAACAAGGAGATC	21	56.71
		2	cccatattcatctccagaatt	AATTCTGGAGATGAATATGGG	21	56.71
22	SW871	1	tccataagagaacatcatattgg	CCAATATGATGTTCTCTTATGGA	23	57.42
		2	cccagtgaaatggctttaattt	AAATTAAAGAACTTCACTGGG	21	57
23	SWR1998	1	gccgtgtgctttggtga	TCACCAAAGCACACGGC	18	60
		2	ctgaagaaatgccattgattc	GAATGAATGGCATTCTGCAG	21	58.66
	AD primer	1	NTCGAGTATGGAGTT			
	Random Primer(Hexamer)					

2) TAIL-PCR 분석 및 elution

확보되어진 23개의 MS marker 염기서열로부터 내부로 위치의 차이가 있는 2개 혹은 3개의 18~24-mer 까지의 forward와 reverse의 primer를 이용하고 다른 한쪽은 기존의 AD 혹은 Random primer를 이용하여 아래 Table 6의 PCR 조건을 통해서 maker 주위의 특이 유전자 확보를 실시하였다.

자세한 분석 방법은 Figure 5 의 도식을 토대로 1차 TAIL-PCR은 template DNA (20ng genomic DNA), 1×PCR buffer, 200uM의 각 dNTPs, 0.8 unit의 Taq polymerase, specific primer 1 (확인하고자 하는 유전자로부터 디자인된 primer: MS1)과 제작된 AD 또는 random primer를 이용하여 1차 PCR cycle의

조건에 따라 수행되어졌다.

2차 TAIL-PCR은 template DNA (1차 PCR product를 1000배 희석시켜 1 μ l 사용한다) 1 \times PCR buffer, 200uM의 각 dNTPs, 0.6 unit의 Taq polymerase, specific primer 2 (확인하고자 하는 유전자로부터 primer1 보다는 내부에서 디자인된 primer: MS2)와 제작된 AD 또는 random primer를 이용하여 2차 PCR cycle에 에 따라 수행되었다.

3차 TAIL-PCR은 template DNA (2차 PCR product를 1000배 희석시켜 1 μ l 사용한다) 1 \times PCR buffer, 200uM의 각 dNTPs, 0.6 unit의 Taq polymerase, specific primer 3 (확인하고자 하는 유전자로부터 primer2 보다는 내부에서 디자인된 primer: MS3)와 제작된 AD 또는 random primer이용하여 3차 PCR cycle에 따라 수행되었다. 3차까지의 tail-PCR의 결과로 얻어지는 PCR 산물이 미지의 유용 유전자가 된다.

Table 6. Condition of reaction mixture and thermal cycles to TAIL-PCR

	PCR mixture		PCR thermal cycles
Frist	Template (genomic DNA)	1.0 μ l	94 $^{\circ}$ C \times 5'
	Taq Polymerase	0.3 μ l	42 $^{\circ}$ C \times 1'
	dNTP	1.0 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 2'
	10 \times PCR buffer	1.5 μ l	94 $^{\circ}$ C \times 40''
	Primer F/R	1.0 μ l/1.0 μ l	56 $^{\circ}$ C \times 35''
	dH ₂ O	9.2 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 1'
			72 $^{\circ}$ C \times 7'
Second	Template (Frist PCR)	1.0 μ l	94 $^{\circ}$ C \times 5'
	Taq Polymerase	0.3 μ l	94 $^{\circ}$ C \times 40''
	dNTP	1.0 μ l	58 $^{\circ}$ C \times 35''
	10 \times PCR buffer	1.5 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 1'
	Primer F/R	1.0 μ l/1.0 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 1'
	dH ₂ O	9.2 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 7'
Third	Template (Second PCR)	1.0 μ l	94 $^{\circ}$ C \times 5'
	Taq Polymerase	0.3 μ l	94 $^{\circ}$ C \times 40''
	dNTP	1.0 μ l	58 $^{\circ}$ C \times 35''
	10 \times PCR buffer	1.5 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 1'
	Primer F/R	1.0 μ l/1.0 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 1'
	dH ₂ O	9.5 μ l	72 $^{\circ}$ C \times 7'

Tail-PCR의 3차 PCR 결과로 얻어지는 PCR product인 미지의 유전자를 보다 깨끗하게 확보하기 위해서는 elution 단계를 통한 정제과정을 수행하여야 한다. 확보된 성장, 등지방두께, 육질 관련 미지의 유전자들을 이용하여 flanking DNA를 cloning 하기 위해 2.5 ~ 3 %의 agarose gel에 PCR product를 loading 시킨 다음 hand-UV를 이용하여 경제형질 연관 미지의 유전자인 DNA band 만을 잘라낸다. 잘라낸 agarose 절편을 적당한 크기로 잘라서 e-tube에 넣고 2-3 배의 GEB buffer (Gel extraction kit, SolGent Co., Ltd)를 넣고 55°C에서 agarose gel을 잘 녹여 DNA를 agarose gel로부터 잘 분리해낸 다음 스핀 컬럼에 GEB buffer를 넣고 13,000 rpm으로 1분간 분리한다. 스핀 컬럼에 동일 볼륨의 80% 에탄올을 첨가 한 후 잘 섞어 준 다음 원심분리 시킨다. 그 다음 5분간 실온에서 잘 말리고 적정량의 TE로 녹인 Elution DNA와 T-vector를 이용하여 4-6 시간동안 16°C에서 ligation 시킨다. Ligation 된 DNA를 얻기 위해 transformation 한 다음 mini-prep을 실시하였다.

다. 연구 결과

선발된 23개 marker의 염기서열을 기준으로 제작된 98개 primer와 AD 또는 random primer를 이용한 Tail-PCR 실험을 통해서 얻어진 PCR Product는 1차 PCR 산물은 육안으로 구분하기가 힘들기 때문에 전기영동에서는 제외시켰으며, 2차 PCR 산물(Ⅱ)과 3차 PCR 산물(Ⅲ)을 agarose gel에서 전기영동 하였다. 이론적으로 총 23개 marker의 46개 primer pair의 PCR결과를 얻을 수 있으나, 실험 도중 PCR 결과가 형성되지 않는 경우도 발생하여 13개 marker에 26개 PCR 결과물을 확인하였다. Figure 6의 전기영동 결과에 나타난 13개 marker는 SW1678, SW1492, SWR1806, S0212, SWR153, SW1513, SW835, SWR73, SWR2179, SW1707, SW839, SW871, SW714 였으며, 그 marker 주위의 유전자들을 찾았고, 나머지 marker들에 대해서는 특이 유전자를 찾아 내지 못하였다.

2차 산물의 유전자는 1차 PCR 유전자의 내부 primer를 이용하여 증폭한 결과이며, 3차 산물의 유전자는 2차 PCR 유전자 내부 primer를 이용하여 증폭한 결과이다. 따라서 2차 PCR 산물의 band보다 3차 PCR 산물의 band의 크기가 조금 더 작게 나타났다. 즉 3차 PCR 결과가 모두 marker 주위의 특이 유전자들

이다. 반대의 결과를 나타내는 경우에는 다른 유전자의 증폭이므로 제외하였다. 또 13개 marker 각 주위의 특이 유전자는 적게는 2개에서 많게는 6개까지 확인되었으며, 결론적으로 13개 marker 주위의 특이 유전자 33개를 찾아내었고, 그 내용을 살펴보면 다음과 같다. SW1678는 ADG, FC와 관련이 있는 마커이며, 마커 뒤쪽의 두 band가 확인되었다. SW1492는 ADG와 관련이 있는 마커이며, 마커 앞쪽과 뒤쪽의 두 band가 확인되었다. SWR1806는 ADG, FC, BFT와 관련이 있는 마커이며, 마커 뒤쪽의 두 band가 확인되었다. S0212는 ADG, FC, BFT, MP와 관련이 있는 마커이며, 마커의 뒤쪽의 여섯 band가 확인되었다. SWR153는 ADG, FC, BFT와 관련이 있는 마커이며, 마커의 앞쪽과 뒤쪽 두 band가 확인되었다. SW1513는 ADG, FC, BFT, MP와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽과 뒤쪽 두 band가 확인되었다. SW835는 ADG, FC, BFT와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽과 뒤쪽 두 band가 확인되었다. SWR73는 FC와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽과 뒤쪽 두 band가 확인되었다. SWR2179는 BL, ADG와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽 둘과 뒤쪽 둘하여 넷의 band가 확인되었다. SW1707는 ADG, FC, BFT와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽과 뒤쪽 두 band가 확인되었다. SW839는 ADG, FC와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽과 뒤쪽 두 band가 확인되었다. SW871는 MP와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽 둘과 뒤쪽 하나의 세 band가 확인되었다. SW714는 ADG, FC와 관련이 있는 마커이며, 앞쪽과 뒤쪽 둘의 band가 확인되었다. 그 유전자의 clone들을 경제형질 마커와 정리하여 나타내었다 (Table 7). 이 clone들은 cloning과 sequencing을 수행하고 Genebank search를 통해서 경제형질 관련의 새로운 유전자로 확보하고 기능분석을 통하여 유전자의 특성을 분석한다. 그 다음 조기진단 기법을 개발하는데 이용 한다.

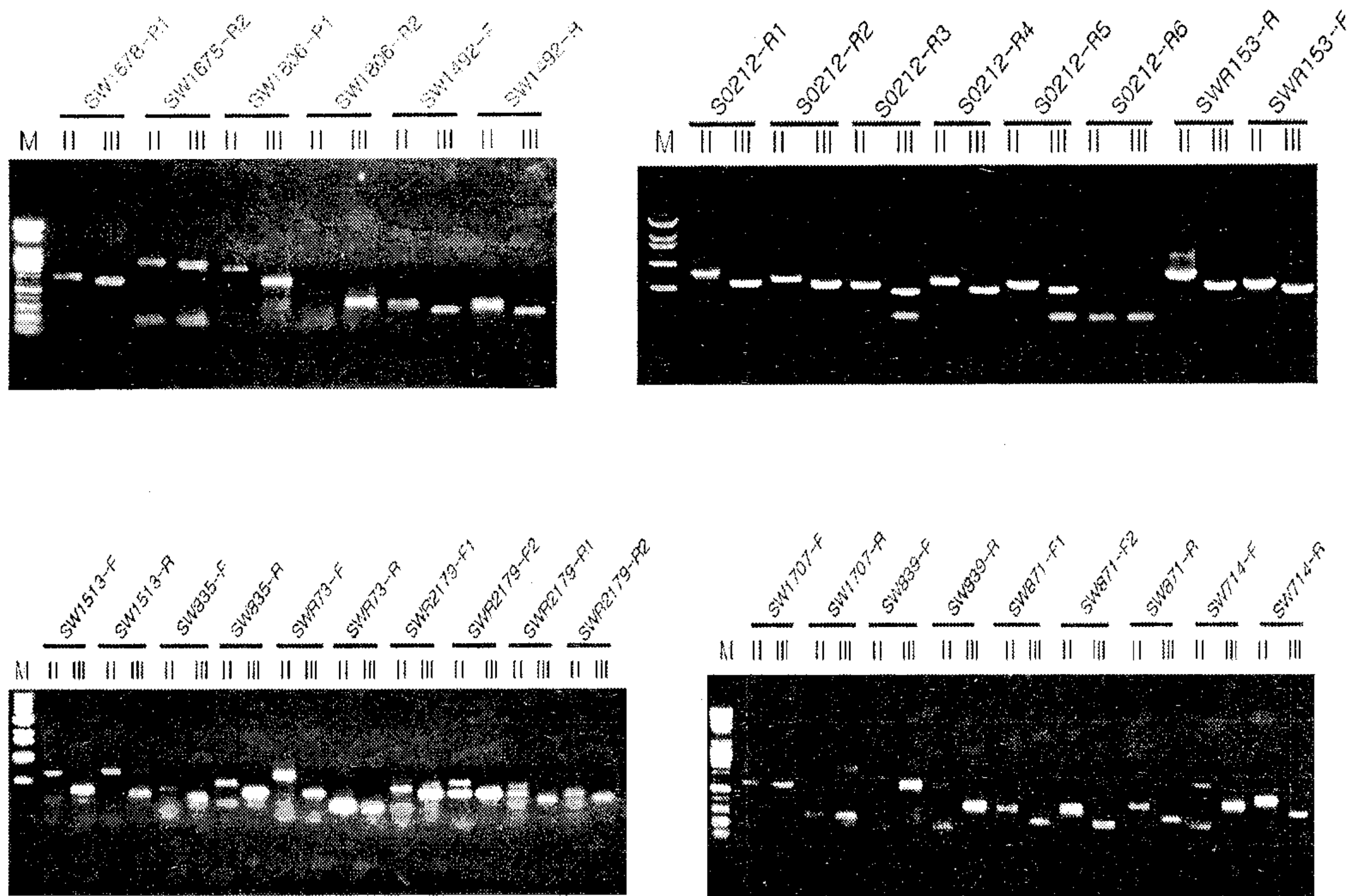


Figure 6. Specific amplification of flanking DNA by TAIL-PCR. II; 2° PCR, III 3° PCR results.

Table 7. PCR Products detected by TAIL-PCR.

No	Marker	Primer pair	Band		Size (bp)
1	SW1678	SW1678 R2/Random	上	1	650
2			下	1	700
3	SW1492	SW1492 F2/AD1	1		400
4		SW1492 R2/AD1	1		300
5	SWR1806	SW1806 R2/Random	上	1	650
6			下	1	500
7	S0212	S0212 R2/Random	上	1	550
8			下	1	500
9		S0212 R2/Random	1		470
10		S0212 R2下/Random	1		480
11		S0212 R2/AD1	上	1	460
12			下	1	220
13	SWR153	SWR153 F2/AD1	1		460
14		SWR153 R2/AD1	1		450
15	SW1513	SW1513 F2/AD1	1		355
16		SW1513 R2/AD1	1		330
17	SW835	SW835 F2/AD1	1		320
18		SW835 R2/AD1	1		400
19	SWR73	SWR73 F2/AD1	1		380
20		SWR73 R2/AD1	1		300
21	SWR2179	SWR2179 F2上/AD1	1		450
22		SWR2179 F2下/AD1	1		440
23		SWR2179 R2/AD1	1		423
24		SWR2179 R2/AD1	1		430
25	SW1707	SW1707 F2/AD1	1		560
26		SW1707 R2/AD1	1		253
27	SW839	SW839 F2/AD1	1		530
28		SW839 R2/AD1	1		380
29	SW871	SW871 F2/AD1	1		254
30		SW871 F2/AD1	1		240
31		SW871 R2/AD1	1		260
32	SW714	SW714 F2/AD1	1		350
33		SW714 R2/AD1	1		330

5. TAIL-PCR 결과물의 Gene cloning

가. 연구 방법

TAIL-PCR로 얻어진 33개의 clone의 결과물은 Taq polymerase에 의해 3'-end 쪽에 dATP가 1개 더 붙여진 형태를 가지게 된다. 그러므로 PCR 결과물에 대해서 유전자 cloning을 하기 위해서는 vector에 T가 붙여진 T-vector를 사용하게 된다 (Figure 7). PCR 결과물에서 DNA만을 순수 정제하여 T vector와 ligation하여 일반적인 Gene cloning 과정을 거치게 된다. 결과에서 확보된 유전자는 차후 유전자 특성 분석이나 기능 분석에 이용하였다.

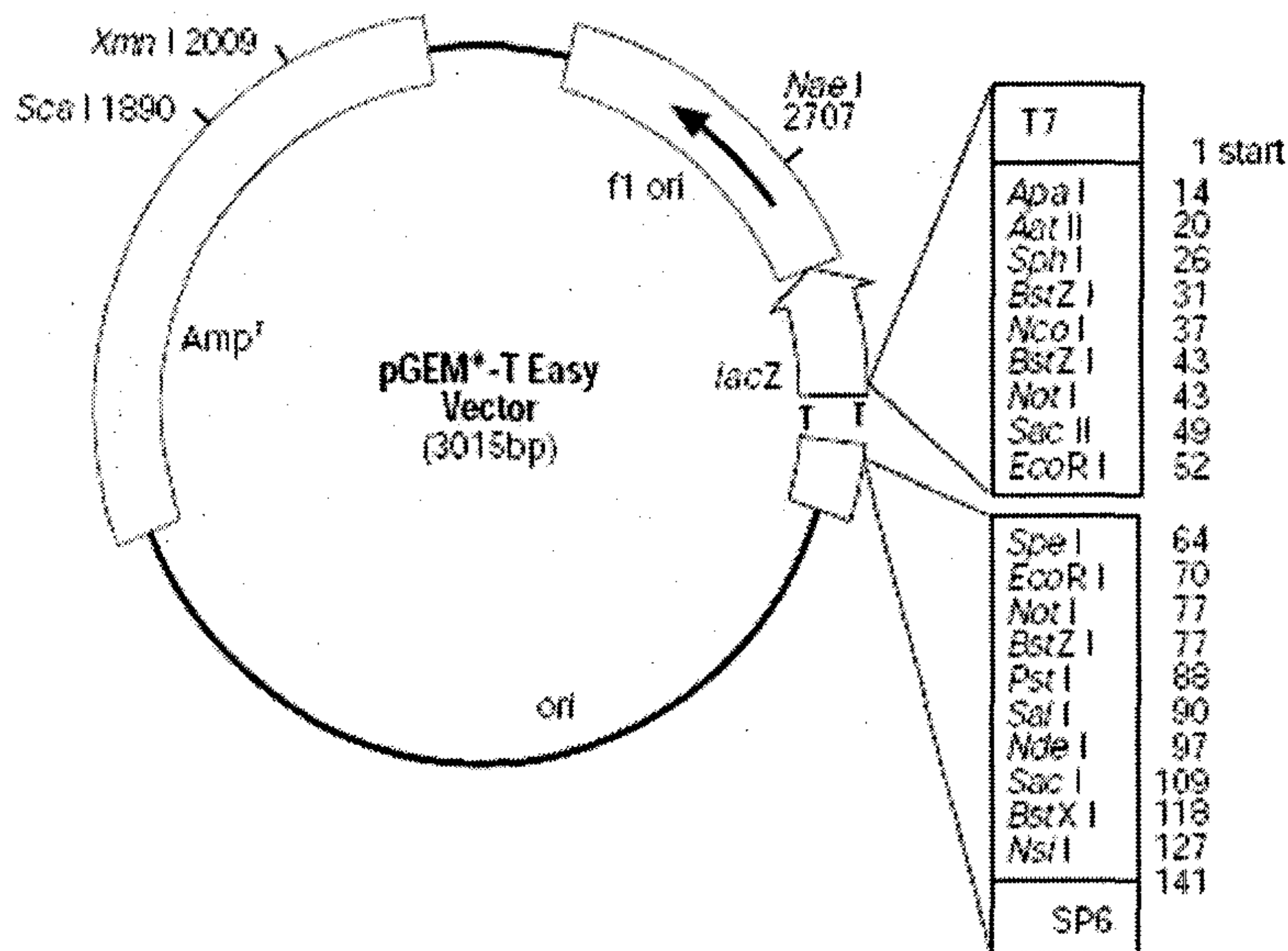


Figure 7. pGEM[®]-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

1) Transformation

XL1-Blue Competent Cells에 cloning한 TAIL-PCR 결과물을 1-2 μ l를 넣은 다음 ice에 30분간 정치시킨 후 42 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 heat shock한 다음 LB broth를 500 μ l 넣고 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

배양한 XL1-Blue를 1-2분 정도 원심분리 하여 상층액의 LB broth는 버리고 down된 XL1-Blue를 LB-ampicillin agar plate에 spreading한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 14시간에서 16시간정도 배양시켰다.

2) Mini-Preparation

각 marker에 대해서 TAIL-PCR 결과물을 LB-ampicillin agar plate에 spreading해 놓은 clone으로부터 DNA를 추출하기 위해 mini-preparation을 하였다. Transformation으로 LB-ampicillin plate에 plating하여 나타난 clone들을 멸균된 이쭉시개나 yellow tip을 이용해서 colony를 채취하여 4ml LB broth가 들어 있는 test tube에 넣어 37°C에서 12-14시간 동안 배양한 후, mini-prep kit (SolGent Co., Ltd)를 이용하여 순수 DNA를 추출하였다. 분리 정제된 DNA 중의 일부를 취하여 EcoR I 과 Xho I 제한효소로 절단하여 agarose gel에서 vector에 들어간 TAIL-PCR 결과물을 확인하였다.

생성된 23개의 각 clone들은 XL1-blue 라인의 competent Cell을 이용하여 형질전환을 수행한 후 LB 배지를 이용하여 37°C incubator에서 culture한 다음 plasmid DNA purification kit로 mini-prep 과정을 통해서 elution DNA가 포함되어 있는 plasmid DNA를 확보하였다. 확보된 plasmid DNA는 적당한 제한효소 (EcoRI, Not I, XhoI)로 digestion하여 1.5% agarose gel 상에 전기영동으로 pGEM-T easy vector (promega)로부터 cutting된 elution DNA의 size를 확인하였다.

3) PCR 증폭

Polymerase Chain Reaction (PCR)은 DNA의 양쪽 가닥을 주형으로 하여 동시에 양쪽 primer 사이의 특정 염기서열을 증폭하는 방법으로, Cetus사의 Mullis에 의하여 개발되었다. Taq (Thermus aquaticus)과 같이 고온에서 번식하는 DNA polymerase를 이용하게 되면서 반응의 특이성 및 효율이 크게 향상되었고, 분자생물학 연구에서 가장 기본이 되는 중요한 기술이다. PCR 기법의 개발은 원하는 특정 염기서열 부분만을 증폭할 수 있어 대부분의 분자생물학적 접근방법의 기초를 이루고 있다.

Mini-prep 과정을 통해서 확보된 plasmid DNA는 pGEM-T Easy vector상에 존재하는 universal primer site의 염기서열을 바탕으로 합성된 SP6와 T7 primer를 이용하여 PCR을 통한 증폭을 수행하였다. 각각의 특이 유전자에 대한 다른 크기의 유전자들을 확인하였다.

4) DNA sequencing

Sequencing PCR은 상품화되어 판매되는 BigDye Terminator kit(Applied

Biosystems, USA)를 이용하여 Table 8과 같은 PCR 반응조건에서 PCR System 9600/9700(PerkinElmer, USA)에서 실시하였다.

Table 8. BigDye terminator cyclic sequencing reaction condition.

PCR reagent condition		PCR thermal condition
Terminator Ready Reaction Mix	8.0 μ l	96°C 10'' (denaturation)
Template(plasmid DNA)	1.0 μ l(300~500ng)	50°C 5'' (annealing)
Primer(T3*)	4.0 μ l(3.2pmol)	60°C 4' (extension)
dH ₂ O	7.0 μ l	25cycles

* T3 primer sequence : 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'

Sequencing을 위해 우선 PCR 산물에 에탄올 침전법으로 DNA를 정제한다. PCR 산물의 2.5배 에탄올과 0.1배의 salt를 첨가하여 10분 동안 얼음에 꽂아 정치시킨 다음 13,000 rpm에서 15~30분 동안 원심 분리한다. 그리고 70% 에탄올을 이용하여 침전된 DNA를 washing한 다음 건조시킨다. 건조하여 확보된 PCR 산물에 25 μ l의 TSR solution을 넣어 녹인 다음 95°C에서 2분 동안 변성 과정을 거친 후 automatic DNA sequencer (Applied biosystems 3100, USA)에서 확보된 DNA의 염기서열을 분석하고 확인하였다. 분석이 확인된 유전자들은 NCBI gene search를 수행하여 그 정보를 확인하고 정리하였다.

나. 연구 결과

1) TAIL-PCR 결과물의 cloning 결과

TAIL-PCR 결과물의 cloning이 잘 이루어졌는지 확인하기 위해 vector의 sequence에 존재하는 restriction site를 이용하여 제한효소를 처리하여 insert DNA가 존재하는지 여부를 전기영동으로 확인하였다. 선발된 23개 marker 중 13개에서 미지의 유전자 33개를 얻을 수 있었다. Figure 8에서 보면 3,000 bp 위치에서 T-vector가 나타나고, 그 아래쪽의 밴드들은 모두 cloning된 DNA로서 그 크기는 300bp~800bp까지 다양하게 나타난다. Agarose gel 중간에 비어있는 부분은 결과가 없거나 크기가 확인이 되지 않아 결과에서 제외시킨 것이다.

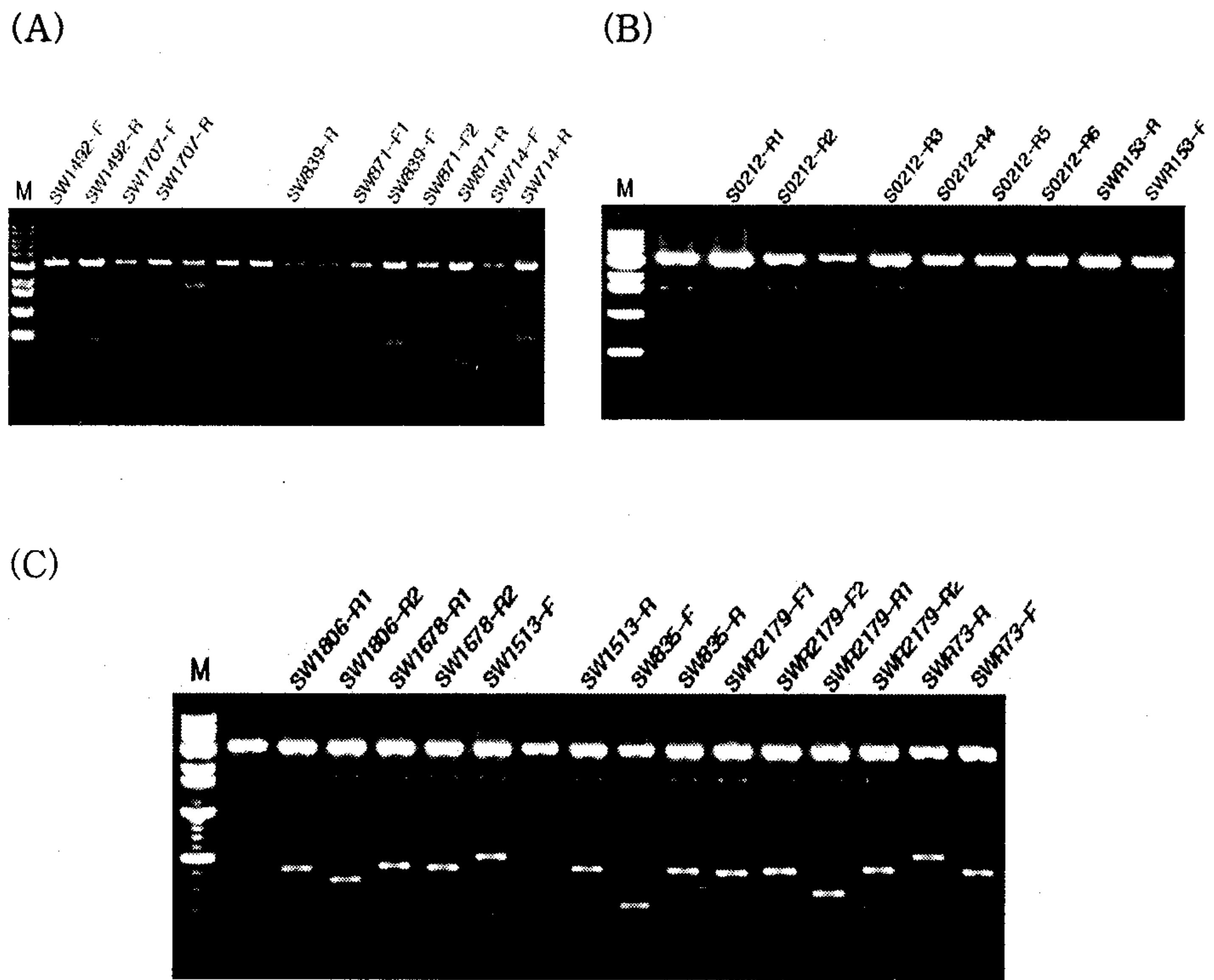


Figure 8. Cloned DNAs digested by restriction enzyme in 1.0 % agarose gel electrophoresis.

2) TAIL-PCR로 얻어진 미지의 cloned DNA의 PCR 증폭

TAIL-PCR 결과물의 cloning으로 새롭게 확인된 미지의 유전자 33개에 대해서 유전자의 Sequence 정보를 확인하고 유전자를 다량 확보하기 위해 PCR을 수행하여 농도를 증폭시켰다. Vector에 존재하는 primer를 이용하여 insert DNA 부분만을 증폭하였고, 증폭이 잘 이루어졌는지 1.5% agarose gel 상에서 확인하였다(Figure 9). 이 유전자 산물들은 모두 sequencing을 수행하여 정확한 유전자 정보를 확인 하였다.

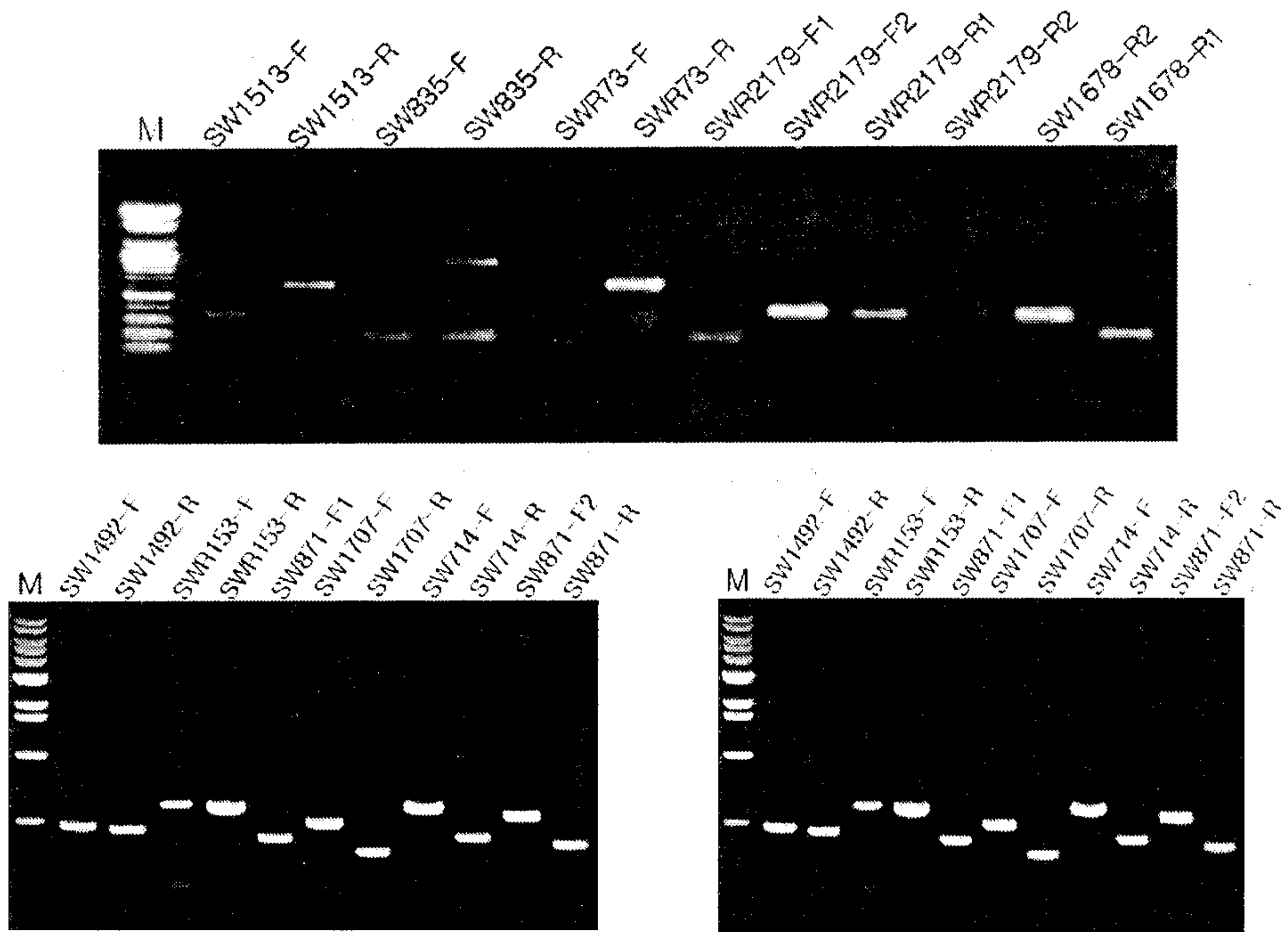


Figure 9. Amplification of cloned DNAs by PCR.

3) TAIL-PCR 분석에 의해 확보된 유전자

선발된 23개의 marker 주위로 미지의 특이 유전자를 찾기 위해 TAIL-PCR 분석을 수행하여 DNA sequencing을 통해 유전자의 정보를 확인하고 BioEdit program을 이용하여 DB화 하였다(Figure 10).

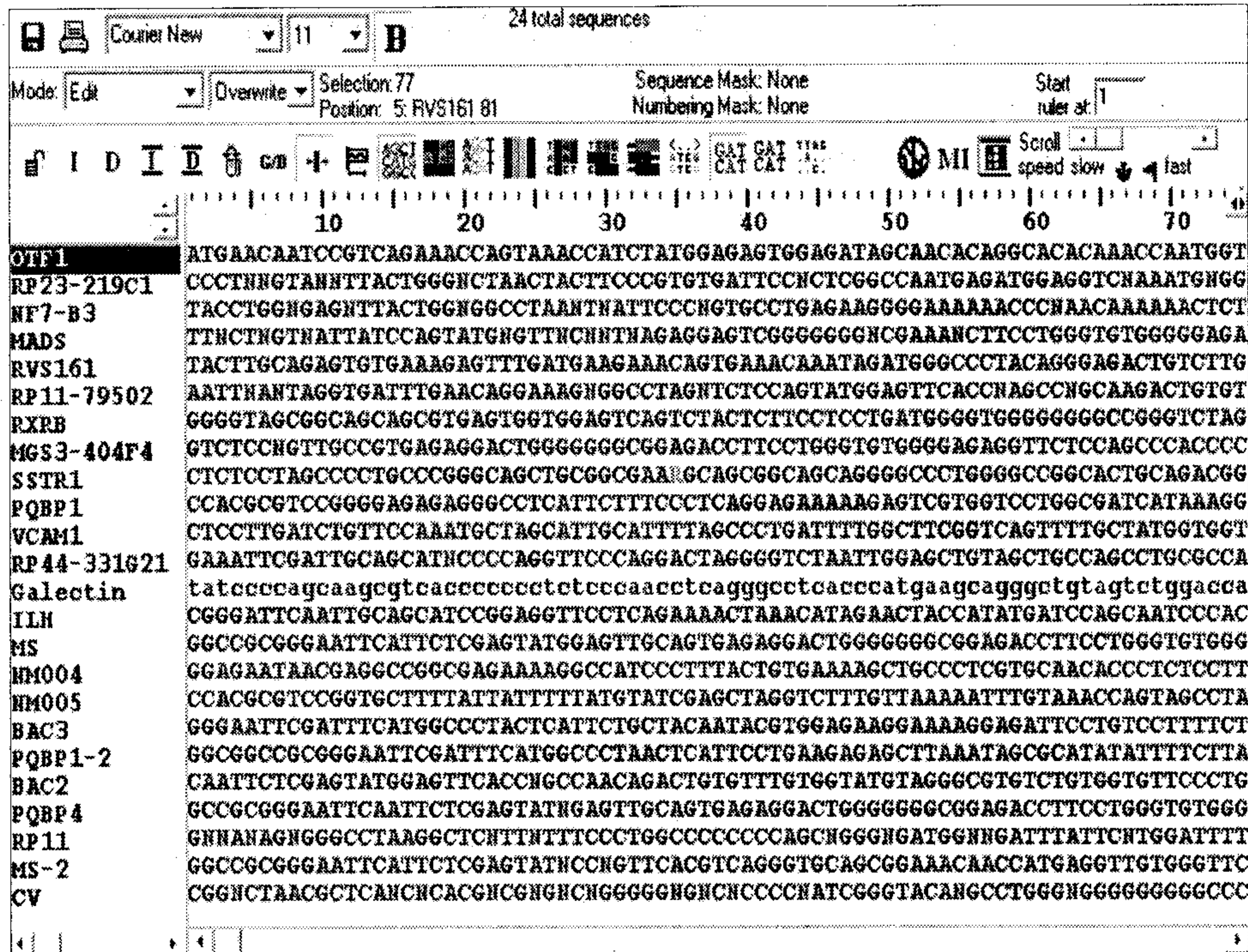


Figure 10. Sequence of new clones detected by TAIL-PCR.

선발된 23개 marker 주위로 미지의 특이 유전자는 Table 7에서 나타낸 13개 marker 주위의 33개 유전자였다. Sequencing 결과가 좋지 못한 경우 (3개), 중복되어지는 유전자인 경우 (4개), 결과산물의 크기가 너무 작은 경우 (2개), 유전자를 얻지 못한 경우 (1개)를 제외하고, 23개의 유전자가 돼지의 실제 기능을 하는 유전자 부분인 것으로 확인되었다 (Table 9).

OTF1, urate oxidase, RVS161 유전자는 성장과 연관성이 있었고, galectin-1, RXRB, PQBP1 유전자는 일당 증체량과 등지방 두께와 연관성이 있었고, VCAM1은 종의 특이성과 연관성이 있었다. 그 밖의 유전자들을 살펴보면, 쥐의 근육에서 제작되어진 BAC clone 5개, 인간의 BAC clone 1개, 돼지의 clone 1개, operon clone 1개로 8개가 나타났으며, 돼지의 ms marker DNA조각 2개, transcription factor 유전자 1개, SOMATOSTATIN RECEPTOR 유전자 1개, 박테리아 16S rRNA 1개, 형광을 인지하는 P700 유전자 1개, 돼지의 인슐린 유사 호르몬 유전자 1개로 나타났다. 또 형질과 연관성이 확인이 되지 않는 미지의 유전자인 no match gene을 2개 확보하였다. No match 유전자는 아직 전혀 GenBank에 등록되어지지 않은 유전자이기 때문에 얻어진

연구결과에 대한 선점 효과가 크므로 유전자 발현양상에 대한 지속적인 연구를 수행하였다.

그러므로 우리는 Tail-PCR을 통해 경제형질과 연관성이 있는 7개의 유전자와 no match gene 2개에 대한 유전자의 특성분석을 진행하였다.

Table 9. Genes obtained by tail-PCR.

No	Description
1	OTF1 (Octamer binding protein 1).
2	Mus musculus BAC clone RP23-219C1 from 1.
3	Uncultured bacterium clone NF7-B3 16S ribosomal RNA gene.
4	Anthoceros punctatus chloroplast gene for photosystem I P700 apoprotein A1.
5	Rhizoctonia fragariae partial mRNA for putative reduced viability upon starvation protein 161 (RVS161gene).
6	Mouse DNA sequence from clone RP23-184D5 on chromosome 4.
7	Homo sapiens BAC clone RP11-795O2 from 4.
8	RXRB (retinoid X receptor beta).
9	Musmusculus BAC MGS3-401 (Genome Systems Mouse BAC Library)complete sequence.
10	SSTR1(SOMATOSTATIN RECEPTOR 1).
11	Homo sapiens mRNA for polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene).
12	VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule 1).
13	Sus scrofa clone RP44-331G21, complete sequence.
14	S.scrofa gene for leydig Insulin-like hormone.
15	Entandrophragma cylindricum microsatellite DNA, clone pEcCIR447.
16	Musmusculus BAC MGS3-304 F3 Genome Systems Mouse BAC Library.
17	Gnetum gnemon mRNA for putative MADS domain transcription factor GGM6, partial.
18	Entandrophragma cylindricum microsatellite DNA, clone pEcCIR217.
19	Lepilemurdorsalis genomic fragment, RAPD with primer operon OPH4, clone A9c.
20	Musmusculus BAC MGS3-408 F4 (Genome Systems Mouse BAC Library)complete sequence.
21	Galectin-1 (Sus scrofa lectin galactoside-binding soluble 1), partial mRNA.
22	No match : NM 004.
23	No match : NM 005.

Tail-PCR을 통해서 9개의 유전자를 최종적으로 확보하였고, 확보된 유전자 각각에 대한 정보 내용은 다음과 같았다.

가) Galectin-1 (lectin galactoside-binding soluble-1)

Galectin-1 유전자는 SWR2179-R1 marker의 flanking sequence를 확인하는 과정에서 얻어진 것으로서 면역반응과 지방의 형성, 합성과 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. Gitt 등(1986)에 의해 인간에서 처음 발견되었으며, lectin이라는 다양한 역할을 하는 유전자들 중 galactoside와 연관이 있는 그룹들을 galectin으로 명명하였다. 본 연구에서 얻어진 Galectin-1 유전자는 기존의 galectin-1과는 다른 특이적인 sequence가 확인되어 GenBank에 등록 (Ecc No. : EF 363760)하여 지적소유권을 선점하였고, 이 유전자에 대한 유전자 발현양상에 대해서 연구하였다.

나) UOX (Urate oxidase)

UOX 유전자는 1987년 Kuehn 등에 의해서 peroxisomal enzyme이라는 것을 쥐에서 처음 발견하였고, Wu 등 (1989, 1992)이 사람의 genomic DNA에서 UOX 유전자를 분리하고 coding region의 염기서열을 밝혔다. 사람과 영장류를 제외한 대부분의 포유동물에서 urate oxidase는 간에 존재하고 (Friedman 등, 1985; Usuda 등, 1988), purine 대사의 마지막 산물로서 allantoin을 배출하게 한다. Urate oxidase의 중요성을 혈청에서의 uric acid를 조사하는 분석방법을 통해 인지할 수 있었는데 (Mahler 등, 1955), 최근 urate oxidase cDNA의 cloning과 구조 결정 분석으로 대부분의 포유동물에서는 간에서 이 유전자가 발현되어 지지 않는 것을 확인하였고, 유전자 발현에서도 tissue-specific-regulation을 나타내는 것으로 확인되어졌다 (Wu 등, 1989; Yeldandi 등, 1990과 1991; Reddy 등, 1988). 1980년대 이전에는 urate oxidase는 ascorbic acid를 합성하는 효소의 하나로 알려져 있으나, 단백질 구조를 밝힘으로써 유전자의 특성과 다른 유전자들과의 연관성에 대한 더욱 많은 연구가 진행되어지게 되었다. 이와 같이 purine 대사과정에서 urate oxidase가 제 기능을 발휘하지 못하게 되면 혈액 내에 allantoin이 축적되어 혈액 내 pH 변화를 유발하게 되는데 이는 신장 기능, 관절의 기능 저하 등 신체적으로 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 정보는 모두 돼지 이외의 다른 포유동물들에서 밝혀진 정보로서 아직까지 돼지에서의 이 유전자의 기능과 영향에 대한 연구결과는 미흡한 상황이다.

본 연구에서는 우리는 돼지에서 urate oxidase가 어떠한 기능을 할지는 정확하게 알 수 없으나 S0212 microsatellite 분석을 통해 알게 된 돼지의 유전자

염기서열로부터 primer를 제작하여 얻어진 것이므로 돼지의 조직간 유전자 발현 양상에 대해서 분석하였다.

다) OTF1 (Octamer binding protein 1)

OTF1 유전자는 돼지의 4번 염색체에 존재하는 유전자로서 SW1707 marker의 flanking sequence를 확인하는 과정에서 얻어졌다. SW1707 marker는 돼지의 도체, 품질, 지방산 조성형질에 관련된 유전자였으므로 이 유전자를 통해 얻어진 OTF1 유전자는 우선 이와 같은 형질에 관련성이 있을 것으로 분류되어졌다.

이 유전자는 1995년에 mapping하여 2,482bp의 mRNA가 GenBank (Acc. no. NM_214264)에 등록되어진 것을 확인할 수 있었다 (Tuggle 등, 1995). 우리는 이 유전자의 일부분에 align 되어진 것을 확인하여 이 유전자 전체에 대한 정보를 Genbank를 통해 확인하여 형질과의 연관성을 확인하기 위한 candidate gene으로 확보하였다. 이 유전자는 사람의 POU2F1 유전자와 95% 유사성을 가졌다. 사람의 경우 OTF1 locus는 POU2F1(OCT-1) 유전자를 encoding 한다. OCT-1 유전자는 넓게 특이적으로 발현되어지는 것은 아니지만 차별적인 유전자의 발현은 발달학적으로 조절되어지고, 이 유전자의 발현양은 다른 세포 type으로 차별화되어진다(Elizaveta 등, 2003). 그러므로 돼지에 있어서도 이 유전자의 발현은 세포의 종류, 단계 등에 영향을 미칠 것으로 생각되었고, 이 유전자에 대한 발현양상을 계속적으로 연구하였다.

라) RXRB (retinoid X receptor beta)

RXRB 유전자는 돼지의 4번 염색체에 존재하는 유전자로서 SW1513 marker의 flanking region 분석을 통해 얻어졌다. SW1513 marker는 품질, 육색, 지방산 조성과 관련성이 높은 유전자 marker로 분류되었다. 그러므로 이 marker의 TAIL-PCR 분석으로 얻어진 RXRB 유전자는 이러한 형질과의 관련된 유전자로 추정되어 확보되었다.

본 연구에서 얻어진 일부의 sequence로 GenBank 검색을 통해 1455bp의 mRNA 염기서열을 확인하였다 (Acc. no. DQ866835). RXRB 유전자는 핵에 존재하는 수용체로서 세포의 성장, 분화, 그리고 neurodevelopment를 조절하는 유전자들의 Vitamin A derivative들과 retinoid의 효과를 매개시켜 주는 역할을 한다. 다른 핵에 존재하는 주요한 수용체들 (VDR, PPAR, RAR, LXR 등)과 complex를 구성하기도 하여 ligand 결합 및 활성화에 관여하는 유전자이다. 그러므로 이 유전자의 알려져 있는 기능을 볼 때, 본 연구에서 분류한 경제형질

중 육색 및 지방산 조성과의 관련성이 있을 것으로 추정되어질 수 있는 뒷받침이 될 수 있을 것이라 보고, 우선 품질, 육색, 지방산 조성 형질 관련 candidate gene으로 확보하였다.

마) RVS161

RVS161 유전자는 돼지의 4번 염색체에 존재하는 SW1492 microsatellite marker의 Tail-PCR 결과 얻어진 flanking region의 유전자였다. SW1492는 도체, 품질, 지방산 조성과의 관련성이 높은 것으로 확인된 marker였다. 그러므로 RVS161 유전자는 우선 이러한 경제형질과의 연관성을 추정할 수 있는 유전자로 분류되었다.

RVS161 단백질은 actin cytoskeleton organization과 endocytosis 과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 특히 Rvs167 단백질의 경우에는 myosin Myo와 기능적으로 상호작용을 하고 있다. 그러므로 이 유전자는 돼지에서 근육과의 관련성이 있을 것으로 추정되어진다.

바) PQBP1

이 유전자는 SWR153 F clone과 SW835 F clone 등 여러 marker의 분석을 통해 반복적으로 얻어진 것이다. cloning 되어진 유전자를 sequencing하여 GenBank에서 검색한 결과 polyglutamine binding protein variant 4 (PQBP1 gene)와 유사성이 매우 높은 것으로 확인되었다 (Acc. no. AJ973596). SWR153와 SW835 유전자는 품질, 지방산 조성, 도체, 육색에 관련된 것으로 확보되어졌다. 그러므로 PQBP1 유전자도 이러한 경제형질과의 연관성이 있을 것으로 추정하여 확보된 유전자이다.

PQBP1은 polar amino-rich domain을 거쳐 polyglutamine 위치와 결합하는 새로운 단백질로 보고되어 있다. 전체 798개의 sequence를 가지고 있었으며, 225번부터 656번까지의 서열에서 PQBP1 gene (1133bp)과 97%의 유사성을 나타내었다. PQBP1은 핵에 위치하는 신호전달 물질이다. 뇌에서 분비되는 호르몬과의 관련성이 있었다. 이 유전자는 세포간의 신호전달, cytoplasm에서부터 핵으로 수송되어지며, 유전자의 전사를 조절함으로써 signaling cascade 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다.

사) VCAM1(Vascular cell adhesion molecule 1)

VCAM1 유전자는 돼지의 SW839 marker를 이용한 gene screening 과정을

통해 얻어졌다. SW839 marker는 도체, 육색, 지방산 조성에 관련성이 높은 유전자였다. 그러므로 이 VCAM1 유전자는 도체, 육색, 지방산 조성 과 같은 형질에 연관성이 있을 것으로 추정되어 확보된 것이다.

VCAM1 유전자는 사람에게 있어서 ESCs(embryonic stem cells)의 분화를 촉진하는 EBs(embryoid bodies)의 형성, 조절, 분화를 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이 유전자를 cloning 하는 과정에서 유전적 변이가 존재하는 정보를 알게 됨에 따라 품종별로 이 유전자를 cloning하여 sequence를 분석하였다. 그 결과, 이 유전자의 몇 개 염기부위에서 polymorphism이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 돼지의 VCAM1 유전자(GenBank Acc. no. AM268526)의 160bp 위치에서 나타나는 SNP에서 Duroc, Landrace, Yorkshire는 G를 가지는 반면, Berkshire는 T를 가지는 것으로 나타났다. 또한 63bp, 82bp, 92bp, 그리고 183bp 위치에서도 품종별 유전자 변이를 확인할 수 있었다. 이러한 품종별로 나타나는 유전적 차이는 품종뿐만 아니라 여러 경제형질과의 관련성을 분석하여 marker-assisted selection에 이용 가능성을 확인할 것이다. 추후 이 유전자에 대한 경제형질과의 관련성이 확인되면 품종별 유전적 다양성과 함께 특허를 출원하여 지적재산권을 선점하고자 한다.

VCAM1(AM268526)	1	CTCCTTGATCTGTTCCAAATGCTAGCATTGCATT	TTAGCCCTGAT	TTTGGCTTCGGTCAG	60
VCAM1-berk	1	-----	-----	TTTGGCTTCGGTCAG	15
VCAM1-duroc	1	-----	CTTTTNGNCTGNT	TTTGGCTTCGGTCAG	28
VCAM1-land	1	-----	TTTGCNT--GANN	TTGGCTTCGGTCAG	24
VCAM1-York	1	-----	TTTGNCT--GN	TTTGGCTTCGGTCAG	24
VCAM1(AM268526)	61	TTTTGCTATGGTGGTGAAGAAA	GGCACTAGG	TTTTTAAAGAGCAAGAGGACTTAATTTA	119
VCAM1-berk	16	TTTTGCTATGGTGGTGAAGAAA	GGCACTAGGGTTTTT	TTAAAGAGCAAGAGGACTTAATTTA	75
VCAM1-duroc	29	TTTTGCTATGGTGGTGAAGAAA	GGCACTAGGGTTTTT	TTAAAGAGCAAGAGGACTTAATTTA	87
VCAM1-land	25	TTTTGCTATGGTGGTGAAGAAA	GGCACTAGGGTTTTT	TTAAAGAGCAAGAGGACTTAATTTA	83
VCAM1-York	25	TTTTGCTATGGTGGTGAAGAAA	GGCACTAGGGTTTTT	TTAAAGAGCAAGAGGACTTAATTTA	84
VCAM1(AM268526)	120	ACCTAACTTTCACTGTGCCACTGAGTATTGCTATCTACTGGTTCACTGTCATAGTTGAAG			179
VCAM1-berk	76	ACCTAACTTTCACTGTGCCACTGAGTATTGCTATCTACTG	TTCACTGTCATAGTTGAAG		135
VCAM1-duroc	88	ACCTAACTTTCACTGTGCCACTGAGTATTGCTATCTACTGGTTCACTGTCATAGTTGAAG			147
VCAM1-land	84	ACCTAACTTTCACTGTGCCACTGAGTATTGCTATCTACTGGTTCACTGTCATAGTTGAAG			143
VCAM1-York	85	ACCTAACTTTCACTGTGCCACTGAGTATTGCTATCTACTGGTTCACTGTCATAGTTGAAG			144
VCAM1(AM268526)	180	CTGCAAAGTTGATGCTTTTTGTATACCTTTTTTTTTCCATGTC			222
VCAM1-berk	136	CTGCAAAGTTGATGCT	-----		150
VCAM1-duroc	148	CTGCAAAGTTGATGCT	-----		162
VCAM1-land	144	CTGCAAAGTTGATGCA	-----		158
VCAM1-York	145	CTGCAAAGTTGATGAN	-----		160

아) no match genes

No match 2 유전자는 돼지의 SW1806(NM004), SW1678(NM005) marker를 이용한 gene screening 과정을 통해 얻어졌다. SW1806는 일당증체량, 사료요구율, 등지방 두께와 관련성이 높은 marker 였고, SW1678 marker는 일당증체량, 사료요구율과 관련성이 높은 marker였다. 그러므로 이 marker의 TAIL-PCR 분석을 통해 얻어진 각 유전자들도 그와 동일한 경제형질과 관련성이 있을 것으로 추정되었다.

이 유전자들은 아직 알려지지 않은 유전자들로서 새로운 유전자로 등록을 하였으며, 각 유전자들은 관련 경제형질에 영향을 미치는 것으로 추측되어 유전자 발현 양상분석에 이용 하였다.

4) 유전자 등록

Cloning을 통해 확보된 돼지의 유전자들 중 NCBI blast search를 통해 돼지에서 등록되어지지 않은 유전자 2개와 면역반응과 지방의 합성, 지방의 합성 조절에 관여하는 것으로 알려져 있는 Galectin-1 찾을 수 있었고, 본 연구를 통해 얻어진 돼지의 신규 유전자로서 GenBank에 등록하였다. 이 유전자들에 대한 더욱 많은 연구를 진행한다면 기능을 확인할 수 있을 것이다.

신규 유전자들은 Galectin-1은 *Sus scrofa* Galectin-1(acc.no EF363760)으로 나머지는 NM004, NM005라는 임의로 이름을 붙였으며, NM004는 607bp의 유전자 서열이었으며, bankit 914722 이었다. NM 005는 687bp의 유전자였으며, bankit 913123 이었다.

앞으로 이 유전자들에 대한 더욱 많은 연구를 진행한다면 기능을 확인할 수 있을 것이다. 본 연구로서 얻어진 3개의 신규 유전자의 염기서열과 GenBank에 등록하여 얻어진 Acc. no에 대한 정보 내용은 다음과 같다.

가) Galectin-1

```

LOCUS EF363760 394 bp mRNA linear MAM 20-APR-2007
DEFINITION Sus scrofa lectin galactoside-binding soluble 1-like mRNA,
partial sequence.
ACCESSION EF363760
VERSION EF363760
KEYWORDS
SOURCE Sus scrofa (pig)
ORGANISM Sus scrofa
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
Sus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 394)
AUTHORS Kim,C.
TITLE Characterization and identification of galectin-1 from fat cDNA
library in Berkshire pigs
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 394)
AUTHORS Kim,C.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JAN-2007) Department of Animal Resources
Technology,
Jinju National University, Chilamdong 150, Jinju 660-758, Korea
COMMENT NCBI staff are still waiting for submitters to provide appropriate
sequence information.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..394
/organism="Sus scrofa"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9823"
/note="breed: Berkshire"
misc_feature <1..333
/note="similar to lectin galactoside-binding soluble 1;
galectin-1"
ORIGIN
1 tatccccagc aagcgtcacc cccctctcc caacctcagg gcctcaccca
tgaagcaggg
61 ctgtagtctg gaccaagtga ggaaggggct ctgggagggc ctaggacccg
caggccgtgg
121 ctgtggctgc agagctgagg ctctgcttt ggggtccact ggctcactgc
gcttctccac
181 ccccagggtg gcatctcctt tggccagaca gacctacca tcaagctgcc
agatgggtac
241 gaattcagtt tccccaaccg cctcaacctg gaggccatcg agtacctggc
ggccgatggc
301 gacttcaaga tcaagtgtgt ggcctttgag tgaagccagc tggcccatgg
cccccaataa
361 aggcattgcc ttgctgccc ctgaaaaaaa aaaa

```

4) NM004 ---> GenBank bankit no. 914722.

```
From gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov
=====> bankit913121
Submission 1 of a total of 1 submission(s).
--You have requested a release date of 6/1/2008--

LOCUS   bankit913121 600 bp  mRNA  linear  MAM 20-MAY-2007
DEFINITION   Unknown gene in berkshire pig.
ACCESSION   913121
VERSION
KEYWORDS
SOURCE      Sus scrofa
ORGANISM    Sus scrofa
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
            Sus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 600)
AUTHORS    kim,C.W.
TITLE      Unknown gene in berkshire pig
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 600)
AUTHORS    kim,C.W.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (20-MAY-2007) Department of Animal
Resources Technology,
            Jinju National University, Chilamdong 150, Jinju, Gyeongnam
            660-758, Korea, Jinju, Korea
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..600
                       /organism="Sus scrofa"
                       /mol_type="mRNA"
                       /db_xref="taxon:9823"
BASE COUNT   169 a   111 c   120 g   200 t
ORIGIN
1  ttcctggcc ccaactgccg tagatgcaa tctttggtc gccttgttta ggtaacccta
61  aatcaagaag gaactgttc aggttgagt cagcattta cttcagtggt tacttttaa
121  gagtgtacct ggaaagaagt tggcagttga cgttgcacac atgccagtct gcttggttt
181  agctctgttc ttaattcct tgagttaact tctgggtctt agatgtgaag agaaaggaga
241  gaccagtatg ttcagatca tcaagaagtg agccagacca ggacgtgaga tctggatcat
301  ggaagaaaga cctgctgttg agatagaatg acccagttt tattttctac attaattgtg
361  atcctgtatg atctttctt ctctatgcg agtttatgta cacaccagca tggaacacaa
421  ttccgttgtt ttcccctaga ggtgatcttt ttctgattg cttgcctgtc tctggattc
481  tattgtgtcc tcagaacctg ttttcccta tgtatgcaa ctgtatgttt ataagtgaa
541  atgtaatac attaatgat cattaacctt aaagcataaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

다) NM005 ---> GenBank bankit no. 913123.

```
From gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov
=====> bankit913123
Submission 1 of a total of 1 submission(s).
--You have requested a release date of 6/1/2008--

LOCUS   bankit913123   687 bp   mRNA   linear   MAM 20-MAY-2007
DEFINITION   Unknown gene in berkshire pig.
ACCESSION   913123
VERSION
KEYWORDS
SOURCE ; Sus scrofa      ORGANISM ; Sus scrofa
           Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
           Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
           Sus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 687)
AUTHORS   Kim,C.W.
TITLE     Unknown gene in berkshire pig
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 687)
AUTHORS   Kim,C.W.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (20-MAY-2007) Department of Animal
Resources Technology,
           Jinju National University, Chilamdong 150, Jinju, Gyeongnam
           660-758, Korea, Jinju, Korea
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..687
                       /organism="Sus scrofa"
                       /mol_type="mRNA"
                       /db_xref="taxon:9823"
BASE COUNT   191 a    135 c    193 g    168 t
ORIGIN
1  gtatcgagct aggtctttgt taaaaatttg taaaccagta gcctaagcca gtctccattt
61  agattgctaa aggaaactga actgcactga ggtccccaag ggggtggcat gttgccttac
121 agatggtaga gccagggctg ctcttctgt ctgggtctgt ctgggtctct gtggatgtca
181 ggtggaggag gacagggagg gcagagccct gtggggtag aagagagact tgacctggct
241 ttgtcacaag gtgcctccac tctgggggca ccatgggaag tttagatggg ggtccacaga
301 cacctgtgga atcctgtgtc ttccagagg gaagagtgtg tgggagggat acagccaggc
361 tctggttctg acaccttctg tgcttcttgg atctgaaact aatgaggaac acagggaggg
421 aggctctcta agggcccttc ctggaagacc ttttaggaac ttaggctga gcccttcca
481 aaggccaga ggttctctta tgtgacagcc agaggaattt ggaagggctg cccaggaga
541 agaaagagaa tgataatgat aatggtagt tccttttaa tgacagatat ttctggtgca
601 gatgaaaatc ttgtgtaaaa taaaccctac ctgaaaatct tgtgtaaagt aaaccctacc
661 aaaaatgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```


제 3 절. Fat Library 제작 및 clone 확보

돼지의 경제형질 연관 DNA marker를 개발하기 위해 일차적으로 지난 연구로부터 얻어진 Microsatellite marker의 flanking region에 존재하는 유전자를 검색하여 확보하는 TAIL-PCR 분석을 수행하여 유전자 clone을 확보할 수 있었다. 본 연구에서는 이와 더불어 경제형질 연관 marker를 확보하는 다른 방법으로서 fat library를 제작하여 이로부터 돼지의 유전자원을 확보하는 실험을 진행하였다. 돼지의 fat library로부터 얻어지는 유전자는 지방세포에서 많이 발현되어지는 유전자일 것이므로 지방합성, 등지방두께, 성장 등의 경제형질과 연관성이 있을 가능성이 높을 것이다.

또한 돼지의 품종 중 Berkshire는 지방 침착이 잘 되어 육질이 우수한 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 Berkshire종을 도축하여 지방조직으로부터 cDNA library를 제작하였고, 이로부터 clone을 확보하는 연구를 진행하였다. 그로부터 35개의 유전자를 확보하였으며, 그 중 지방의 메카니즘에 주요하게 영향을 미칠 것으로 생각되는 adiponectin, ef-hand bind, galectin 유전자에 대해서만 연구를 수행 하였다. 본 연구는 경제형질 연관 마커 주위의 유용유전자 선발 및 특성 분석에 대한 연구이기 때문에 주로 Tail-PCR을 통해서 확보되어진 유전자를 중점적으로 다루었고 육질에 영향을 미치는 중요한 인자인 지방의 유전자는 일부만 연구에 이용하였다. 특이하게도 galectin 유전자는 Tail-PCR뿐만 아니라 cDNA library로부터도 얻어진 졌으며, galectin, adiponectin, ef-hand bind 유전자는 TAIL-PCR 분석으로 얻어진 clone과 함께 유전자 sequence를 확인하고, SNP를 확인하며, 유전자 발현양상을 확인하는 과정을 수행하여 돼지의 경제형질과의 관련성을 규명하였다.

1. Fat tissue로부터 total RNA 분리

cDNA library 제작을 위해 Berkshire종을 도축하여 도축 즉시 지방조직을 채취하고 -80°C 에 냉동 보관하였다. 그런 다음 1~3g의 지방 조직을 미세하게 분쇄하여 15ml conical tube에 넣고 TRIzol-reagent (MRC.Inc) 2~8ml을 첨가한 다음 homogenizer로 조직을 완전히 간 후 10분간 실온에서 정치시킨 다음 $13,000\times g$ 로 10분간 4°C 에서 원심분리하고 상층액만 취하여 1.5ml tube로 옮겨 담았다. Chloroform 200~300 μl 를 첨가한 다음 실온에서 10분간 정치시키고 $13,000\times g$ 에서 10분간 4°C 로 원심 분리하여 맑은 상층액만 1.5ml tube로 옮겨 담

았다.

상층액을 옮겨 담은 1.5ml tube에 isopropanol 500 μ l 첨가하여 원심 분리시킨 다음 상층액을 버리고, 70% 에탄올을 넣은 다음 다시 원심 분리시켜 순수 total RNA를 얻어 0.1% DEPC-water 20 μ l에 녹인다.

분리한 total RNA는 formaldehyde gel에 전기 영동하여 결과를 확인하였고, spectrophotometer를 이용하여 $A_{260/280nm}$ 에서 흡광도로 total RNA를 정량하였다.

2. cDNA library 제작

분리된 total RNA 중 100 μ g/ μ l을 취하여 'SuperScript™ plasmid System kit (Invitrogen, USA)를 이용한 reverse transcription으로 cDNA를 합성하였다. mRNA에 Not I primer-adapter를 붙여 first strand를 합성하고, 이로부터 second strand를 합성하여, T4 DNA polymerase로 double strand cDNA를 합성하였다.

cDNA 합성 kit를 이용하여 cDNA가 얻어지면 이로부터 library를 구축하기 위해 Not I adapter 옆에 Sal I adapter를 붙여서 Not I 으로 digestion하였다. 그런 후에 column chromatography 방법으로 Not I -Sal I 말단이 부착된 우리가 원하는 크기의 cDNA를 선택하여, 여기에 plasmid pSPORT(4.1Kb) vector를 이용하여 Not I -Sal I -Cut된 cDNA를 함께 ligation 하였다. 이 과정에서 DNA가 vector에 삽입되지 않고 vector만이 다시 붙는 self-ligation이 일어날 수도 있다. Ligation 되어진 cDNA를 electroporator에서 *E. coli* (XL- I Blue competent cell)에 transformation하여 LB-ampicillin agar 고체 배지에 plating하였다. LB-ampicillin agar 배지에서는 vector로 사용한 plasmid pSPORT가 ampicillin에 저항성을 가지고 있어 다른 미생물들의 오염을 막고 우리가 원하는 clone만을 얻기 위해서이다.

3. Cloning & Sequencing

제작된 돼지의 지방조직의 cDNA library로부터 유전자원을 확보하기 위해 cloning을 실시하고, 얻어진 clone에 대해서 sequence를 확인하였다.

LB-ampicillin agar plate에 spreading해 놓은 clone으로부터 DNA를 추출하기 위해 mini-preparation을 하였다. Transformation으로 LB-ampicillin plate에 plating하여 나타난 clone들을 멸균된 이쑤시개나 yellow tip을 이용해서 colony

를 채취하여 4ml LB broth가 들어 있는 test tube에 넣어 37°C에서 12-14시간 동안 배양한 후, mini-prep kit (SolGent Co., Ltd)를 이용하여 순수 DNA를 추출하였다.

분리 정제된 DNA 중의 일부를 취하여 EcoR I 과 Xho I 제한효소로 절단하여 agarose gel에서 vector에 들어간 ESTs를 확인하였다. 결과 중 DNA의 크기가 500bp 이하인 것은 sequencing 후에 정확한 data 분석이 어렵기 때문에 우선 500bp 이상인 것만을 선택하여 -80°C에서 냉동 보관하였다.

얻어진 유전자에 대해서 Vector에 있는 primer sequence를 이용하여 확보된 clone의 DNA sequencing을 수행하였다.

4. Fat library로부터 확보된 clone

지방의 생합성이나 그 발현 mechanism을 통한 정보 획득을 위해 Berkshire의 등지방 조직에서 추출한 total RNA로부터 합성되어진 cDNA로부터 library를 제작하여 cloning 및 mini preparation을 통해 95개의 유전자를 cloning하였다. Cloning된 95개 유전자에 대해서 pSPORT vector에 존재하는 primer를 이용하여 nucleotide sequence를 확인하였고, Gene Bank Search (NCBI)를 통해 유전자의 기능과 염기서열의 유사성을 확인하였다. 그 결과, 제작된 cDNA library로부터 얻어진 clone이 중복되어지는 경우가 있어 중복되어지는 유전자를 제외시키고, 또한 유용성이 없는 유전자들은 제거하여 돼지의 형질과 연관성이 있을 것으로 추정되어지는 35개의 유전자를 확보하였다 (Table 10). Table 10에는 확보된 35개 유전자 clone에 대한 GenBank blast 검색으로 얻어진 유전자의 기능과 accession number, sequence 유사비율(identify), 유사하게 나온 sequence의 position 등을 나타내었다.

또한 돼지의 fat library로부터 확보된 유전자 clone의 내용을 간략히 나타내면 다음과 같다. 인간에서 8개의 유전자들이 확인 되었고, 돼지에서 10개의 유전자들이 확인 되었으며, 소에서 8개의 유전자들이 확인되었고, 그 외의 생물에서 6개의 유전자들이 확인되었고, 기능이 확인되지 않은 3개의 유전자들을 확인하였다.

인간에서 확인된 8개의 유전자를 살펴보면, 유전자 발현 조절에 관여하는 transcription factor의 유전자 1개, 혈관 형성 유도 조절에 관여하는 G patch domain의 유전자 1개, 세포의 형성과 파괴를 조절하는 tazarotene, tumor, sparc-like 1의 유전자 4개, 가상의 단백질 1개, 초파리와 유사한 단백질 유전자

1개로 나타났다. 다음으로 돼지에서 확인된 10개의 유전자를 살펴보면 지방의 대사조절과 연관이 있는 adiponectin, galectin-1, ed-hand band의 유전자 3개, 면역과 연관이 있는 ISG 12의 유전자 1개, 기능이 아직 밝혀지지 않은 clone으로 확인된 유전자 4개, microsatellite 관련 유전자 1개, mitochondria의 유전자 1개로 나타났다. 소에서 확인된 유전자 8개를 살펴보면 근육과 연관성이 있는 leiomodrin-1, myosin heavy chain 11의 유전자 2개, 에너지 대사와 관련이 있는 fucosidase, succinate의 유전자 2개, 유전자의 변형 및 연결에 관여하는 helicase, integrin의 유전자 2개, 가상의 단백질 유전자 1개로 나타났다. 그 밖의 생물 관련 유전자를 살펴보면, 개에서 근육과 지방과의 연관성이 있는 collagen 유전자 2개, 기능이 밝혀지지 않은 clone의 유전자 1개, 고양이에서 세포분화 관련이 있는 elongation factor 1의 유전자 1개, 어류에서 에너지 생성과 조절에 관련이 있는 eIF4G의 유전자 1개, 닭에서는 가상의 단백질 유전자 1개로 나타났다.

위의 정보를 토대로 돼지의 지방 조직에 많이 발현되어지는 유전자일 것으로 생각되어지며, 특히 기존의 유전자 정보를 토대로 지방의 메카니즘과 연관성이 확신이 되어지는 3개의 adiponectin, galectin, ef-hand bind 유전자를 선발하였다. galectin 유전자는 Tail-PCR을 통하여 이미 확보되어 있으므로 fat library로부터 실제적으로 확보된 유전자 2개였다. 이 2개의 유전자에 대해서 경제형질이 우수한 돼지의 조기 선발 기법 개발에 이용하고자 다음의 유전자 발현양상을 분석하였다.

Table 10. Genes obtained from fat cDNA library.

clone No.	Acc. No.	Function	Identify	Position
15	gi 27769216 gb BC042193.1	Homo sapiens G patch domain containing 2, mRNA (cDNA clone MGC:47636 IMAGE:5532608), complete cds	228/263 (86%)	218-477
5	gi 42734429 ref NM_012232.2	Homo sapiens polymerase I and transcript release factor (PTRF), mRNA	117/132 (88%)	488-619
3	gi 32347784 gb AY285441.1	Sus scrofa clone UMNp644.gcg microsatellite sequence	320/321 (99%)	49-368
90	gi 76653030 ref XM_608513.2	PREDICTED: Bos taurus similar to smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM1 (LOC530050), partial mRNA	81/88 (92%)	66-153
7	gi 76626174 ref XM_593801.2	PREDICTED: Bos taurus similar to Plasma alpha-L-fucosidase precursor (Alpha-L-fucosidase 2) (Alpha-L-fucoside fucohydrolase 2) (LOC515729), mRNA	297/342 (86%)	53-392
25	gi 53134244 emb AJ720655.1	Gallus gallus mRNA for hypothetical protein, clone 22o14	366/390 (93%)	144-533
68	gi 4958951 gb AF034253.1	Sus scrofa mitochondrion, complete genome	393/451 (87%)	110-557
13	gi 1848263 gb U77594.1 HSU77594	Human tazarotene-induced gene 2 (TIG2) mRNA, complete cds	39/39 (100%)	7-40
91	gi 67971791 dbj AB179187.1	QtsA-14492, similar to human hypothetical protein FLJ20519 (FLJ20519), mRNA	129/129 (100%)	78-206
66	gi 52351861 gb AY604429	Sus scrofa galectin-1(lectin galactoside-binding soluble 1), mRNA sequence	212/218 (97%)	381-595
93	gi 42627840 tpel BN000245.1 SSC000245	TPA: Sus scrofa mRNA for putative ISG12(a) protein (ISG12(a) gene)	457/466 (98%)	63-526
4	gi 57157218 dbj AB096100.1	Danio rerio mRNA for eIF4G-related protein NAT1A, complete cds	47/47 (100%)	12-58
26	gi 42734311 ref NM_014667.1	Homo sapiens vestigial like 4 (Drosophila) (VGLL4), mRNA	65/69 (94%)	300-368
82	gi 76680712 ref XM_610600.2	PREDICTED: Bos taurus similar to Leiomodrin-1 (Leiomodrin, muscle form) (64 kDa autoantigen D1)	126/136 (92%)	70-205
83	gi 76677585 ref XM_584302.2	PREDICTED: Bos taurus hypothetical LOC507649 (LOC507649), mRNA	123/134 (91%)	436-568

(To be continued)

88	gi 52426741 ref NM_016424.3	Homo sapiens cisplatin resistance-associated overexpressed protein(CROP), transcript variant 1, mRNA	239/264 (90%)	80-337
67	gi 51832610 gb AY712790.1	Felis catus elongation factor 1 alpha mRNA, complete cds	459/480 (95%)	103-579
84	gi 62530179 gb AY885253.1	Sus scrofa lectin galactoside-binding soluble 1 mRNA	150/151 (99%)	256-406
17	gi 73998927 ref XM_535041.2	PREDICTED: Canis familiaris similar to Protein C10orf86 (LOC477849), mRNA	256/306 (83%)	332-631
78	gi 74004798 ref XM_858055.1	PREDICTED: Canis familiaris similar to Collagen alpha 1(III) chain precursor, transcript variant 12 (LOC478835), mRNA	312/336 (92%)	73-408
85	gi 76643515 ref XM_611822.2	PREDICTED: Bos taurus similar to chromodomain helicase DNA binding protein 3 isoform 3 (LOC532673), mRNA	386/429 (89%)	47-464
87	gi 54261650 gb BC084580.1	Homo sapiens tumor differentially expressed 2-like, mRNA (cDNA clone MGC:90340 IMAGE:6500683)	233/245 (95%)	62-306
86	gi 52351899 gb AY610317.1	Sus scrofa clone rfhi4016b_n3.y1.abd, mRNA sequence	503/507 (99%)	62-567
6	gi 21707435 gb BC033721.1	Homo sapiens SPARC-like 1 (mast9, hevin), mRNA (cDNA clone MGC:45264 IMAGE:4939390), complete cds	427/485 (88%)	83-564
10	gi 74356516 gb BC104538.1	Bos taurus cDNA clone MGC:129100 IMAGE:8121892, complete cds	504/534 (94%)	71-602
95	gi 50881969 gb XM165930	EF-hand bind, variant, partial 1	301/326 (88%)	51-350
16	gi 50978939 ref NM_001003187.1	Canis familiaris collagen, type I, alpha 2 (COL1A2), mRNA	542/597 (90%)	65-660
89	gi 52351931 gb AY610349.1	Sus scrofa clone recc2803c_k8.y1.abd, mRNA sequence	415/418 (99%)	75-492
14	gi 52351872 gb AY989691	Sus scrofa adiponectin, mRNA sequence	522/525 (99%)	61-584
76	gi 41386714 ref NM_174830.1	Bos taurus integrin beta 4 binding protein (ITGB4BP), mRNA	527/580 (90%)	84-659
18	gi 31342657 ref NM_174178.2	Bos taurus succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A (SDHA), mRNA	465/526 (88%),	60-582
92	gi 55167421 dbj AB194101.1	Sus scrofa IgA C alpha mRNA for immunoglobulin alpha heavy chain constant region	490/494 (99%)	52-545
11	gi 76659019 ref XM_876831.1	PREDICTED: Bos taurus similar to plastin 3, transcript variant 3 (LOC505687), mRNA	318/357 (89%)	111-459
24	no match	NM001		990
19	no match	NM002		812
12	no match	NM003		600

Table 10의 확보된 clone 중 본 연구를 통해 확보되어진 돼지 3개의 no match gene을 GenBank에 등록하였다. 확보된 clone 중 galectin 유전자는 Tail-PCR과 중복되어 나타남으로 여기에서는 설명을 제외하였고, 주요 유전자에 대한 내용은 다음과 같다.

1) Adiponectin 유전자

Adiponectin 유전자도 cloning 분석을 통해 얻어진 유전자로서 1044bp의 길이였다. 본 연구에서 얻어진 유전자와 GenBank (Acc. no. AY589691)에 등록된 유전자와의 homology를 확인해 본 결과 유전적 다양성이 없이 동일한 것을 아래와 같이 확인할 수 있었다. 본 연구의 Fat library로부터 얻어진 Adiponectin 유전자는 돼지의 경제형질과의 연관성을 추정할 수 있는 candidate gene으로 확보되어, 지방 조직에서의 유전자 발현양상을 확인해 보았다.

Adiponectin	1	GGCCACCGGTNTNCTAATACGGGGCGNTTGGGGGGGGGGGATCCTGACTGCAGTCTGTGGCTCTGATTC	70
RY589691	1	-----	1
Adiponectin	71	CACACCTGAGCCCTCAGGATGCTGTTGTTGGGAGCTGTTCTACTGCTACTAGCCCTGCCAGTCTCGGC	140
RY589691	1	-----CCTCAGGATGCTGTTGTTGGGAGCTGTTCTACTGCTACTAGCCCTGCCAGTCTCGGC	58
Adiponectin	141	CAGCAAACCACCCGAGAAGCCTGGAGCACTACTGCCCATGCCCAAGGGGGCCTGCCAGGCTGGATGGCGG	210
RY589691	59	CAAGCAAACCACCCGAGAAGCCTGGAGCACTACTGCCCATGCCCAAGGGGGCCTGCCAGGCTGGATGGCGG	128
Adiponectin	211	GATCCAGGGCATECTGGCCACAACGGTACCCAGGCCCGTGATGGCAGAGATGGCGTCCCTGGCGAGAA	280
RY589691	129	GATCCAGGGCATCCTGGCCACAACGGTACCCAGGCCCGTGATGGCAGAGATGGCGTCCCTGGCGAGAA	198
Adiponectin	281	GGGTGAGAAAGGAGATACAGGCTTACTGCTCCCAAGGGTGACACTGGGGAATCTGGAGTACTGGGGTT	350
RY589691	199	GGGTGAGAAAGGAGATACAGGCTTACTGCTCCCAAGGGTGACACTGGGGAATCTGGAGTACTGGGGTT	268
Adiponectin	351	GAAGGTCCCGAGGTTTCCAGCAATCCCGGGCAGAAAAGGAGAACCTGCAGAAAGCGCCTATGTCTACC	420
RY589691	269	GAAGGTCCCGAGGTTTCCAGCAATCCCGGGCAGAAAAGGAGAACCTGCAGAAAGCGCCTATGTCTACC	338
Adiponectin	421	GTTTACGATTCAGTGTGGGCTGGAGACTCGGGTCACTGTCCCTAACATGCCCATTCGCTTTACCAAGAT	490
RY589691	339	GTTTACGATTCAGTGTGGGCTGGAGACTCGGGTCACTGTCCCTAACATGCCCATTCGCTTTACCAAGAT	408
Adiponectin	491	CTTCTACAATCAGCAAAATCACTATGATGTCACCACCTGGCAAATTCCTACTGCAACATTCCTGGGCTGTAC	560
RY589691	409	CTTCTACAATCAGCAAAATCACTATGATGTCACCACCTGGCAAATTCCTACTGCAACATTCCTGGGCTGTAC	478
Adiponectin	561	TACTTCTCCTTCCACTCAGGCTCTACTTGAAGGATGTGAAGGTCAGCCTCTACAAGAAGGACAAGGCTG	630
RY589691	479	TACTTCTCCTTCCACTCAGGCTCTACTTGAAGGATGTGAAGGTCAGCCTCTACAAGAAGGACAAGGCTG	548
Adiponectin	631	TACTCTTACCTACGACCAGTACCAGGACAAGAATGTGGACCAGGCCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCTATCT	700
RY589691	549	TACTCTTACCTACGACCAGTACCAGGACAAGAATGTGGACCAGGCCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCTATCT	618
Adiponectin	701	GGAGAAGGGGGACCAAGTCTGGCTCCAGGCATACGGGGATGAAGAGAATAATGGGGTCTATGCTGACAAT	770
RY589691	619	GGAGAAGGGGGACCAAGTCTGGCTCCAGGCATACGGGGATGAAGAGAATAATGGGGTCTATGCTGACAAT	688
Adiponectin	771	GTCAATGACTCCATCTTCACAGGCTTCTTCTCTACCACAACATTGAATGATGAGCACTGCCAACTCAGA	840
RY589691	689	GTCAATGACTCCATCTTCACAGGCTTCTTCTCTACCACAACATTGAATGATGAGCACTGCCAACTCAGA	758
Adiponectin	841	GCCTCCACCAAGCTGAGGCTTTCAGTGTTCATTAGGAGACTGATTGGATTATNTAATTGGAGGGCTNTGAA	910
RY589691	759	GCCTCCACCA-----	768
Adiponectin	911	CATTATTATTGATTGACTCATTACATACCCAAATATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTTTGGTTTTT	980
RY589691	768	-----	768
Adiponectin	981	TTTTATAGGGCTCTTGAATCTACTCTTGATCTTTAAGAATTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1040
RY589691	768	-----	768

2) ef-hand bind 유전자

ef-hand bind 유전자는 cloning 분석을 통해 얻어진 유전자로서 450bp의 길이였다. 본 연구에서 얻어진 유전자와 GenBank에 등록된 유전자와의 homology를 확인해 본 결과 유전적 다양성이 없이 동일한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 Fat library로부터 얻어진 ef-hand bind 유전자는 돼지의 경제형질과의 연관성을 추정할 수 있는 candidate gene으로 확보되어, 지방 조직에서의 유전자 발현양상을 확인해보았다.

3) No match 유전자 염기서열

Cloning을 통해 확보된 돼지의 유전자들을 NCBI blast search를 통해 3개 유전자에 대해서 특성을 확인해 보았다. 그 결과 아직까지 돼지에서 등록되어 있지 않은 유전자임을 알 수 있었고, 본 연구를 통해 얻어진 돼지의 신규 유전자로서 GenBank에 등록하였다. 이 유전자들에 대한 연구를 진행한다면 기능을 확인할 수 있을 것이다. 하지만 cDNA에서는 기존의 정보를 통해서 지방의 메카니즘과 연관된 유전자들을 찾고자 하였으므로 이 유전자들에 대해서는 차후 다음 연구에서 진행할 것이다.

각 유전자들은 NM001부터 NM003까지 임의로 붙였으며, NM001은 990bp의 유전자 서열이었으며, NCBI에 등록하여 bankit 914716이라는 number를 부여 받았다. NM002는 812bp의 유전자 서열이었으며, bankit 914720 이었다. NM003은 600bp의 유전자였으며, bankit 913121 이었다.

본 연구로서 얻어진 3개의 신규 유전자의 염기서열과 GenBank에 등록하여 얻어진 Acc. no에 대한 정보 내용은 다음과 같다.

- NM001 ---> GenBank bankit no. 914716.

```

Submission 1 of a total of 1 submission(s).
--You have requested a release date of 6/1/2008--

LOCUS bankit914716 990 bp mRNA linear MAM 20-MAY-2007
DEFINITION Unknown gene in berkshire pig.
ACCESSION 914716
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Sus scrofa
ORGANISM Sus scrofa
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
Sus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 990)
AUTHORS Kim,C.W.
TITLE Unknown gene in berkshire pig
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 990)
AUTHORS Kim,C.W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAY-2007) Department of Animal Resources
Technology,
Jinju National University, Chilamdong 150, Jinju, Gyeongnam
660-758, Korea, Jinju, Korea
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..990
/organism="Sus scrofa"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9823"
BASE COUNT 289 a 190 c 210 g 301 t
ORIGIN
1 gtgtcaaaa aagggcctgt tcgctttaa ggtggcacct cctggagcc acaatcatta
61 ggaagaaacg attctctac caggcaactc cagctggtac cagagatata gaagtacagc
121 ttgggagaca atgctttaa cccactctg tttaatctt tattctttt tctttctct
181 tttaaaaaat ataagctatg gagaaaagag ggagagaaga gcgagttagc tccttgctag
241 tggttactta ggaaggtact ggacatcatt gtattcttc ataactgct ttacaataaa
301 aaattgcagg gcatacatca gaaatgctct caggttgaca taatggagtg ttctttacc
361 atcagcgtga ttattttt ttactatttt ttgtgtgtt gttaccaga tattttctt
421 taaacagact catttttaa acttaaatt gttcaaaaag ggaactttt ttgctgctgg
481 taactgacaa catgtatcac ttgctgcaa aatagaaag tgactgtgaa aaataaatct
541 gctggggagg ggtcctccat gctagtgtca ctaaggctca ggacctgaga
tctgtctctg
601 gtacaaaatg aaacaaacaa gtgtttgaaa ggtgttaaga ccacaccagc accaccctga
661 gactttgtcc ttgacaatca ggggtgaaag gaacaggaag aggagtaggc
tgcccacaa
721 aggggtgtgcc tcacacgtga ttcaaggcc acgcagagtc atctcctgcc acccggtggg
781 cctgcccaca gtgagctgat ggtgtccac tgaccattc ttcatatgga gaaacagcct
841 ctgagagttg aattgtcttg ctcaagtgtc ttgatctgga tgtttgtgt tgttttaaag
901 acagtgttc ttgagtagca gcgactgtc caccttgctg tttaataaa gagttctatt
961 ttcataact aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

- NM002 ---> GenBank bankit no. 914720.

```

From gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov
======> bankit914720
Submission 1 of a total of 1 submission(s).
--You have requested a release date of 6/1/2008--

LOCUS bankit914720 812 bp mRNA linear MAM 20-MAY-2007
DEFINITION Unknown gene in berkshire pig.
ACCESSION 914720
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Sus scrofa
ORGANISM Sus scrofa
          Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
          Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
          Sus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 812)
AUTHORS kim,C.W.
TITLE Unknown gene in berkshire pig
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 812)
AUTHORS kim,C.W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAY-2007) Department of Animal Resources
Technology,
          Jinju National University, Chilamdong 150, Jinju, Gyeongnam
          660-758, Korea, Jinju, Korea
FEATURES             Location/Qualifiers
   source             1..812
                     /organism="Sus scrofa"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9823"
BASE COUNT          225 a   145 c   156 g   286 t
ORIGIN
    1 gccttctgt ggtctaagac agcaattacc gcggttagt tacaggaata tcgacttgg
    61 gatcagattg aaggtttga ttctgccttt gttcttaaaa tctctgtaac gaatcagagt
   121 ctgcatttcc agttgttacc ttagaggtaa taggtatagg gttattataa gaattaaatg
   181 aaattatgtt ctttaaaca cacagcagcg ttgcttctgg cccttaataa aggcttcata
   241 aatggaacag ttgttactgt gataattatg tctttatcag tatggcctac aattgtcttt
   301 ttttttttt ttagctggt tcacattact gttgttcagt actttcataa taaattata
   361 ctagtgtctt tatcagctta gccactctgt aggcttctgt ggcttcccc acatgaccca
   421 accgtacggt ttgaaagcca acccatctt tcaaggctc acctcatccc gtgtatcttt
   481 cccacaagt ttttacctc aattcttggg ttcagaagta tttattctc tgtgatggca
   541 ttgttacgt tggcatttgt ttgattgtg atgtgatgga aacttaata ggaatagatc
   601 acttgaggag catgtaaaga ggtgggggtg ttttgagatg tcccagagcc tcagaaaaga
   661 agaagacatg tcagatgtca cccatttgc ttcagagtc ctttcaagt gactgacgta
   721 tgtaaagaat gaatgtggac gtcagctcac tgatgattt tagctataat agtttatatt
   781 taaaaaaagt ttctgcaa aaaaaaaaaa aa

```


- NM003 ---> GenBank bankit no. 913121.

```

From gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov
=====> bankit914722
Submission 1 of a total of 1 submission(s).
--You have requested a release date of 6/1/2008--

LOCUS bankit914722 607 bp mRNA linear MAM 20-MAY-2007
DEFINITION Unknown gene in berkshire pig.
ACCESSION 914722
VERSION
KEYWORDS
SOURCE Sus scrofa
ORGANISM Sus scrofa
          Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
          Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
          Sus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 607)
AUTHORS Kim,C.W.
TITLE Unknown gene in berkshire pig
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 607)
AUTHORS Kim,C.W.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAY-2007) Department of Animal Resources
Technology,
          Jinju National University, Chilamdong 150, Jinju, Gyeongnam
          660-758, Korea, Jinju, Korea
FEATURES             Location/Qualifiers
   source             1..607
                     /organism="Sus scrofa"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9823"
BASE COUNT          133 a   196 c   152 g   124 t   2 others
ORIGIN
1 ggagaataac gaggccggcg agaaaaggcc atccctttac tgtgaaaagc tgcctcgtg
61 caacaccctc tcctccgag gtgggagaag ccaggcgggg cccgggaccc cgcgcagcgc
121 tcccggcagg agctgtggcc cgtcccggtt ctggtgctgc cccgcccacc cgccccatcg
181 gactgtggtt ccagctcagg aaaccacagc gcagccaccc aggagtgaca acatgcaccc
241 cccacacga ggactccccg ggcaccctg gagacggagg cttggtcttg ccaaagaaaa
301 gtctggcttc gcgcttctc cgaaccagg atgccagcat ctgccgacga cgctcgttc
361 cgccttca aaagcaaagc cgttcggggc gtggcggggc gcgntaggt catgtgattc
421 cacttgatt tctaccccg cccgcgtcct ctttccgtc tgtggatctg ctctctct
481 ggtccctgca aagctgtgt aattgtact gaagtcaaaa tgttcctgt tctccccag
541 accacttagc tatggtatat tgcaataaaa ttacttcta tattngcaa aaaaaaaaaa
601 aaaaaa

```


제 4 절. 유전자의 발현양상 분석

특히 경제형질과 높은 연관성이 있는 DNA marker 주위에서 확보되어진 유전자 7개와 fat cDNA library에서 확보되어진 3개(그 중 galectin 유전자는 중복되어 나타났다) 모두 9개의 유전자들에 대한 더욱 정확한 발현양상 특징들을 확인하기 위해 southern blotting, northern blotting, RT-PCR, real-time PCR, western blotting 등의 여러 가지 분자생물학적 기법에 의한 연구를 수행하였다. 이 분석기법들을 통하여 유전자 발현양상 분석에 의한 유용 유전자들의 정보를 확보하여 경제형질과 연관성을 확인하고 정립하여 경제형질 우수돼지의 조기 진단 기법 개발에 활용 가능한 방법들을 찾아보고자 했다.

1. 조직채취

선발된 유전자의 DNA, RNA, 그리고 Protein에서의 유전자 발현양상을 확인하기 위한 실험동물은 성축농장의 산청 Berkshire종과 (주)가야육종의 Yorkshire종을 이용하였다. 각각 60kg, 80kg, 110kg시에 3두씩을 도축하여 도축 즉시 조직을 채취하여 액체질소로 얼려 -80℃에 보관하였다. 두 품종을 이용함으로써 품종간의 유전자 발현양상을 비교 분석할 수 있었고, 성장 단계별 돼지를 도축함으로써 성장과 관련된 유전자 발현양상을 비교 분석하는 실험에 이용할 수 있었다. 또한 선발된 모든 돼지에서 각 기관을 모두 채취함으로써 기관별 특이적으로 발현되어지는 유전자를 분석하는 실험에 이용할 수 있었다. Southern blot analysis에서는 DNA를 이용하는 것이므로 이외에도 대한양돈협회 제2 종돈 능력검정소 검정돈의 혈액 샘플을 채혈하여 이용하였다. 모든 채취한 샘플은 유전자 발현양상을 분석하는 실험에 이용되어지기 전에 냉동 보관하였다.

2. Southern blot analysis

Cloning 된 DNA의 기능을 분석하기 위해 먼저 이 유전자들이 돼지 genome에 존재하는지 알아보기 위해 Southern blotting을 실시하였다. Fat cDNA library에서 확보된 3개의 유전자들은 돼지의 조직으로부터 얻어진 유전자였으므로 genome 내에 존재하는지의 여부를 확인하기 위한 Southern blotting 실험에서 제외하고 TAIL-PCR 분석으로 얻어진 9개 유전자에 대해서만 실시하였다.

가. 연구 방법

1) Genomic DNA 분리

Genomic DNA 분리방법은 figure 2에 나타난 Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA)에 의한 방법을 이용하였고, 혈액 300 μ l에 대해서 대략 0.3 μ g/ μ l 농도의 DNA를 얻을 수 있었다.

분리된 genomic DNA는 N⁺-membrane에 옮기기 전에 농도와 순도를 확인하였다. DNA는 적정 농도를 유지해야 하고, 분리된 DNA의 농도를 동일하게 맞추어 주어야 하며, 분리된 DNA의 농도가 아무리 높아도 순도가 떨어진다면 실험에 이용되어질 수 없기 때문에 agarose gel 전기영동과 spectrophotometer에서 흡광도 측정으로 정확한 농도와 순도를 확인하였다.

2) 제한효소를 이용한 절단

돼지 혈액으로부터 genomic DNA를 promega kit를 이용하여 추출한 다음 BamH I, EcoRI, HindIII, Xho I 등으로 enzyme cutting을 4 ~ 6시간 정도 37 $^{\circ}$ C에서 실시하였다. 각각 제한 효소로 cutting된 DNA를 0.8% agarose gel에 30 Volt로 O/N으로 running 하였다. 그 후 EtBr staining으로 genomic DNA cutting 여부를 확인 하였다.

3) Southern blot 제작

확인된 gel은 적당한 크기의 blot 제작을 위해 크기를 정확히 측정하고 멸균된 칼로 gel을 자른 후 double strand를 single strand로 변성시키기 위하여 denaturation solution에 20분씩 3회 staining 하였고, 증류수로 다시 씻어낸 후 고정시키기 위하여 neutralization solution을 20분씩 3회 staining 하였다.

N⁺-membrane에 transfer시키기 위하여 gel 위에 gel과 동일한 크기로 절단된 3M paper를 올리고, 그 위에 동일한 크기의 종이 타올을 올렸다. 그런 다음 10X SSC buffer를 이용해 DNA를 N⁺-membrane에 transfer 시켜 Southern blot을 제작하였다.

4) Hybridization 분석

확인된 gel을 알칼리 용액 (Denaturation solution, Neutralization solution)을 통하여 두 가닥의 DNA를 한 가닥으로 변성시키고, 고정화 시킨 다음 N⁺-membrane에 transfer, UV cross linker로 고정 시켰다. 이렇게 만들어진

N^+ -membrane에 클로닝 된 DNA에 방사선 동위원소 P^{32} 를 붙여 hybridization 하였다. 그 후 membrane washing을 한 다음 X-ray film 상에 발현 양상을 확인하였다.

나. 연구 결과

Figure 11은 gDNA를 제한 효소로 충분히 절단하여 gel에 전기영동 한 것이다. figure 11에서 보는 바와 같이 genomic DNA는 충분히 깨끗하게 절단되었다.

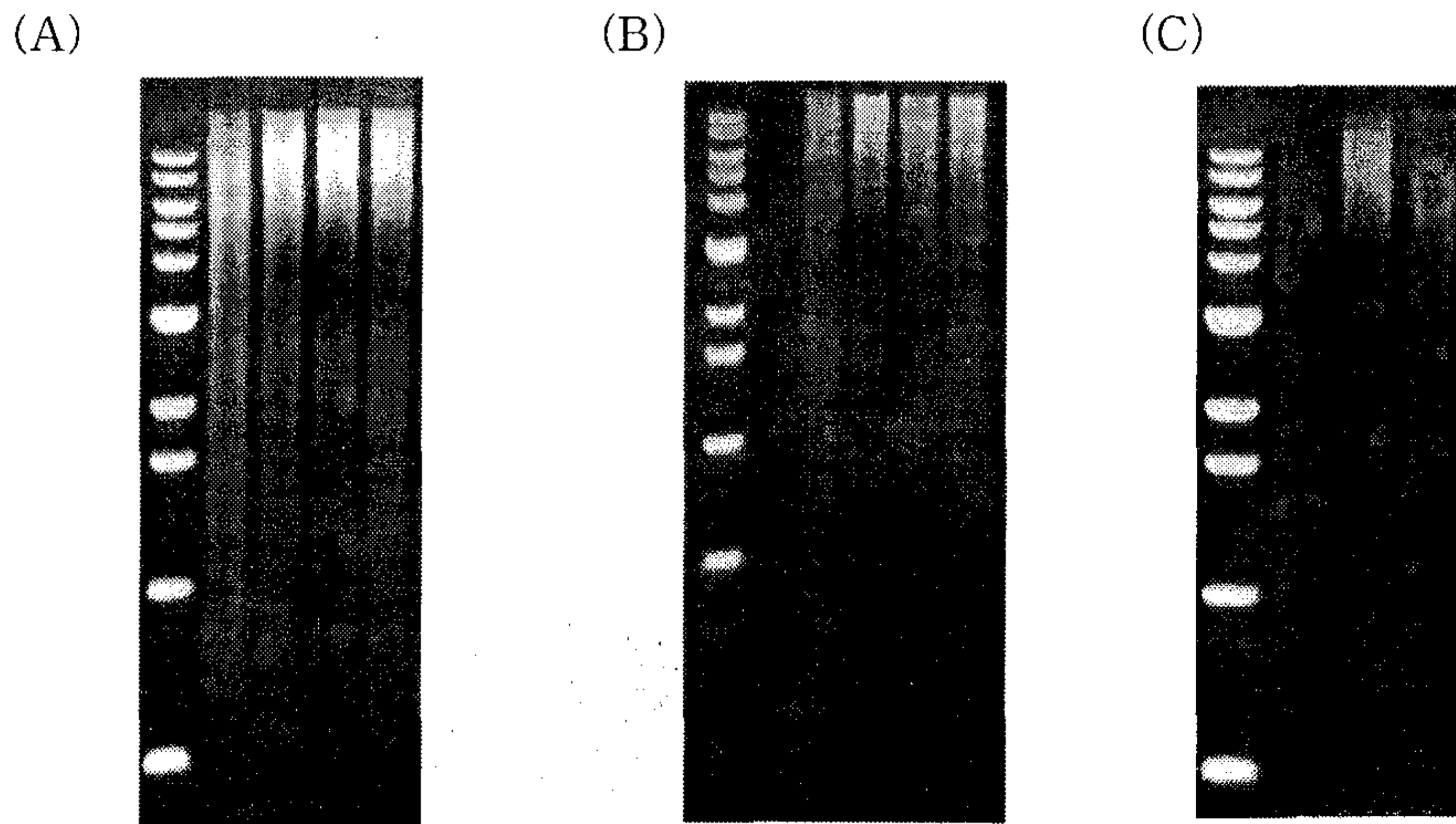


Figure 11. Restriction enzyme cutting of Genomic DNA.

그 후 전기 영동한 gel을 이용하여 blot을 제작하였고 그 결과 figure 12와 같이 TAIL-PCR에서 얻어진 7개 유전자 모두 돼지의 genome에서 존재 여부를 확인할 수 있었다. 이용한 restriction enzyme은 BamHI, EcoRI, XhoI, HindIII로서 genomic DNA에 각각 처리하여 충분히 배양하여 절단한 것을 확인하였다. 7개 유전자는 대부분이 1 copy로서 존재하였다. restriction enzyme에 따라 genome에 붙지 않는 결과가 나타날 수 있으므로 모두 2개의 제한효소를 처리하여 southern blot 분석을 실시하여 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 7개의 유전자는 돼지의 genomic DNA에 존재 한다는 것을 확인하였고, 결과를 토대로 다음실험으로 mRNA의 유전자 발현양상을 확인하였다. 즉 기능 분석을 하기 전에 돼지에 존재하는 유전자인지를 확인하는 것이 가장 기본이므로 7개 유전자에 대해 southern blot을 수행하였고 각 유전자의 기능 분석의 토대로 제공하고, 유전자와 경제형질과 연관성이 확인되면 돼지의 조기 진단 기법의 기초 토대가 될 것이다.

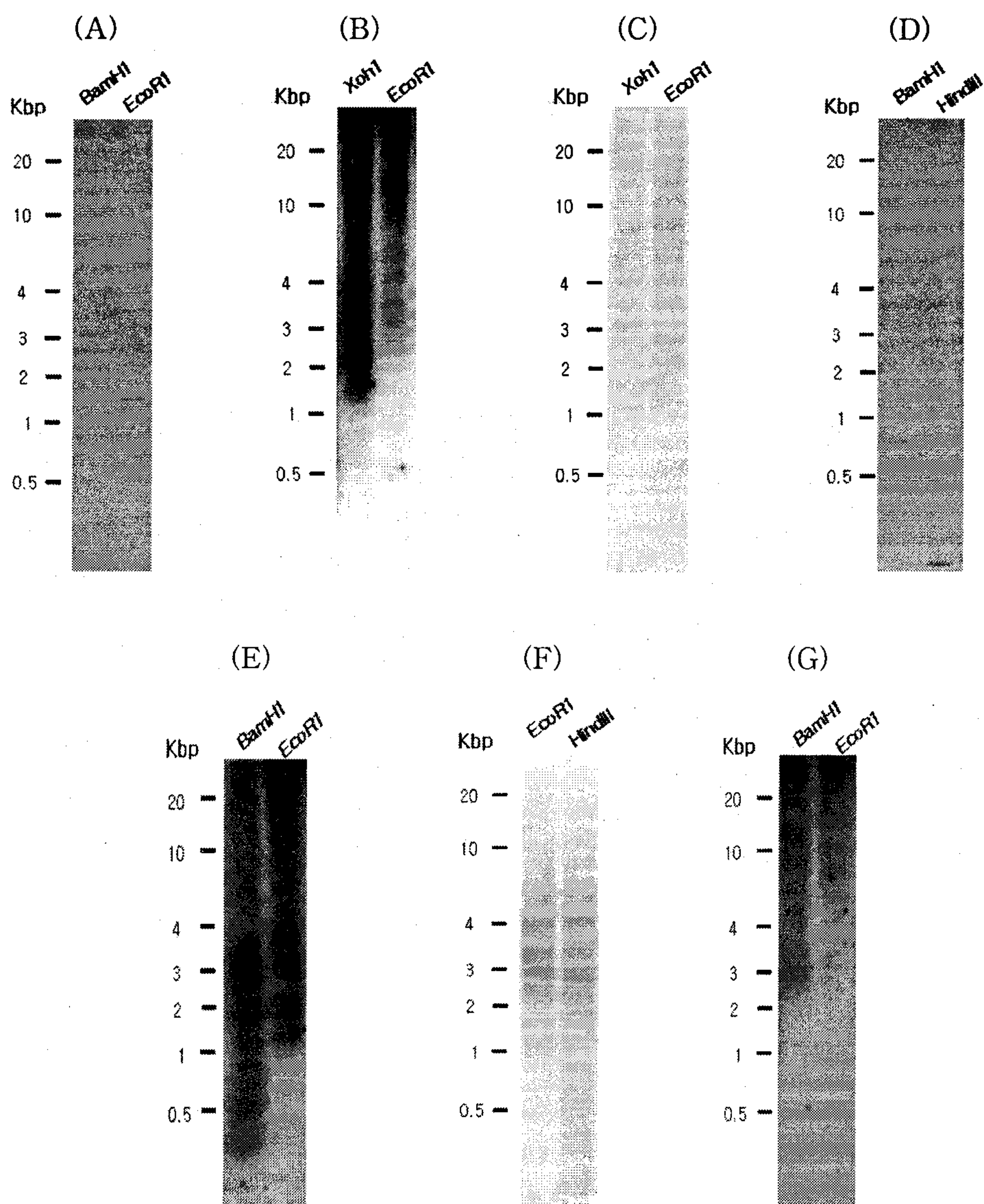


Figure 12. Southern blot analysis of genes. (A) Galectin-1, (B) Urate oxidase (C) OTF1, (D) RXRB, (E) PQBP1, (F) NM004, (G) NM005

3. Northern blot analysis

경제형질 연관 특이 유전자에 대해 RNA에 대한 유전자 발현양상을 확인하기 위해 Galectin-1과 Adiponectin 유전자는 Northern blotting을 수행하였고, 나머지

ef-hand bind, PQBP1, RXRB, OTF1, urate oxidase, NM004, NM005, RVS161, VCAM1 유전자는 RT-PCR을 수행하였다. Northern blot보다 시간과 효율성이 높은 RT-PCR을 주로 수행하였으며, 정확한 발현양상을 분석하여 경제형질과 연관성을 확인하고 경제형질이 우수한 돼지 진단 기법개발의 토대로 이용한다.

가. 연구 방법

1) Total RNA preparation

Total RNA 분리 방법은 cDNA library 제작 시 이용하였던 Trizol reagent를 이용한 방법과 동일하게 수행되어졌다. 조직별 유전자 발현양상을 확인하기 위해서 Berkshire와 Yorkshire 품종의 60, 80, 110kg 돼지의 근육, 지방조직과 내장기관 (Liver, Heart, Belly)를 채취하였고, 채취 즉시 액체질소로 냉동하여 -80℃에 보관 하였다. 냉동 보관된 조직은 막자사발에서 grinding하여 0.2 ~ 0.6g정도의 조직에 Trizol을 첨가한 후 homogenizer에 다시 분쇄한 후 total RNA를 분리/정량 하였다. Figure 13는 정량한 total RNA를 전기 영동한 결과이다.

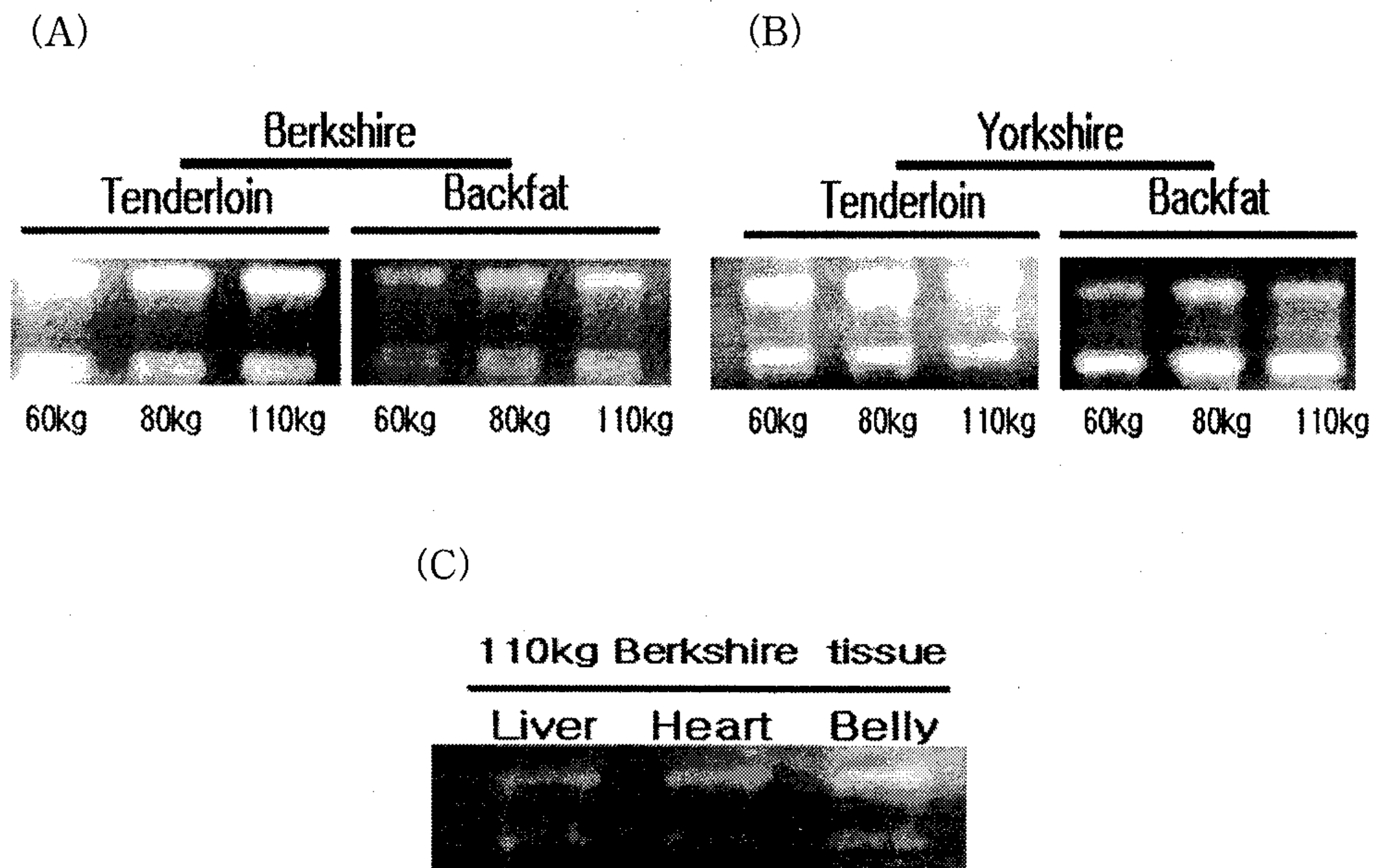


Figure 13. Results of total RNA preparation. (A) Berkshire, (B) Yorkshire, (C) Berkshire of pig weight 110kg

2) Northern blot 제작

채취한 조직으로부터 TRIzol-reagent를 이용하여 total RNA를 분리하고 RNA를 전기영동으로 확인한 다음 정량해서 1.5% formaldehyde gel에서 6-7시간 정도 전기영동 한 다음 blot의 적당한 크기를 위해 멸균된 칼로 gel을 적당한 크기로 절단하였다.

N⁺-membrane에 transfer시키기 위하여 gel 위에 gel과 동일한 크기로 절단된 3M paper를 올리고, 그 위에 동일한 크기의 종이 타올을 올렸다. 그런 다음 10X SSC buffer를 이용해 DNA를 N⁺-membrane에 transfer 시켜 Northern blot을 제작하였다.

3) Probe 제작 및 Hybridization 분석

Southern blot과 Northern blot의 hybridization을 시키기 위하여 아래 table 11과 같은 방법으로 target DNA를 증폭한 다음 에탄올 침전 방법으로 정제하였다.

정제한 target DNA에 random primer 1 μ l을 5분간 끓는 물에서 반응 시켰고 ice에 5분 이상 정치 시켰다. Klenow (MBI Inc., Canada)와 P³² dATP를 buffer에 섞어준 다음 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상 반응시켰다. 그 후에 PROBERTM (iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 반응된 probe를 정제하였다. Membrane에 probe를 hybridization 한 후, membrane을 washing하고 x-ray film 상에 mRNA의 발현양상을 확인하였다.

Table 11. PCR amplification condition.

PCR mixture(50 μ l)		Thermal cycles	
10X buffer	5 μ l	<u>35 cycles</u>	
25mM MgCl ₂	1 μ l	94 $^{\circ}$ C 5min \Leftrightarrow	94 $^{\circ}$ C 30sec
2.5mM dNTPs mix	4 μ l		55 $^{\circ}$ C 45sec
F primer	1 μ l		72 $^{\circ}$ C 1min
R primer	1 μ l		
DNA	2 μ l		
1U/ μ l Taq polymerase	0.2 μ l		72 $^{\circ}$ C 5min
dH ₂ O	34.8 μ l		
Total	50 μl		4 $^{\circ}$ C store

나. 연구 결과

1) Galectin-1 gene

이 유전자는 SWR2179-R1 microsatellite 분석을 통해 얻어진 유전자로 약 530bp의 크기를 나타내었다. Probe 제작은 아래와 같은 primer 쌍을 이용하였고, 그 크기는 350bp였다.

Forward 5' - tagtc tggac caagt gagag gaag - 3'

Reverse 5' - cagca aaggc aatgc cttta ttg - 3'

Galectin-1은 폭넓게 분포되어 있고 유전적으로 보존된 단백질의 한 집단이다. 그들은 아미노산 서열들과 탄수화물 인지 도메인에서 특이적인 polylactosamine-enriched 당 연결체들의 구조적 유사성에 의해서 정의된다. 그 기능은 면역반응의 생리적 기능, 지방세포, 염증반응 등에서 중요한 역할을 한다. 특히 지방세포에서 분비된다는 정보를 토대로 지방과 근육에서의 발현양상을 비교 분석하였다 (Figure 14). 이 결과를 보면 근육에서 보다 지방에서 더 높은 발현양상을 나타내었다. 그러나 성장에 따라 비교해 보았을 때 근육에서는 매우 낮은 발현을 나타내었으며 성장에 따라서도 발현의 차이점을 보이지는 않았고, 지방에서는 성장 초기에 발현이 높다가 80kg에서 낮아져서 다시 110kg에서 증가하는 양상을 나타내었다. 결론적으로 galectin-1은 지방에서 높은 발현을 나타냄으로서 지방의 대사에 중요하게 연관되어 있어 육질과의 연관성을 추론할 수 있었다. 좀 더 정확한 발현양상을 분석하여 경제형질 우수 종돈 조기 선발에 이용 할 것이다.

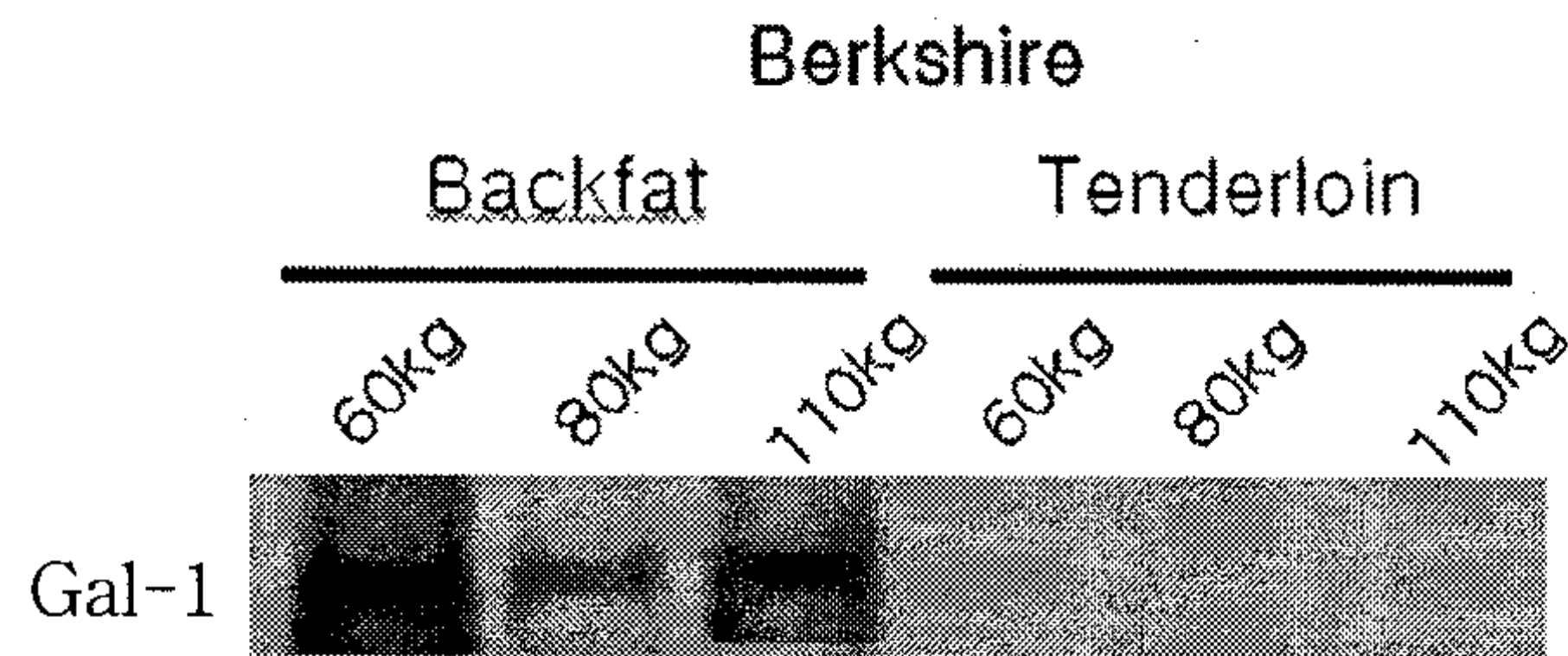


Figure 14. Expression patterns of galectin-1 by northern blotting.

2) Adiponectin gene

Adiponectin은 에너지 항상성과 당과 지질 대사 작용을 조절하는 지방세포에 의해 분비되는 호르몬이다. Maeda 등 (1996)은 지방조직 cDNA library를 제작하

고 새로운 유전자를 탐색하던 중 APM1 (Adipose most abundant gene transcript 1) 을 코딩하는 cDNA를 처음으로 분리했다.

우리가 제작한 Backfat cDNA library로부터 얻어진 전체 염기서열 약 3340bp의 유전자 염기서열로 CDS 부분을 포함하는 앞 뒤쪽의 primer 쌍들을 아래와 같이 제작하여 돼지 조직간 유전자 발현양상을 분석하였다.

Forward 5' - tagtc tggac caagt gagag gaag - 3'

Reverse 5' - cagca aaggc aatgc ctta ttg - 3'

그 유전자의 PCR 산물은 750bp였으며, 실험결과 Figure 15에서 보는 바와 같이 안심보다는 등지방 조직에서 높은 발현을 나타내었으며, 품종 간에 비교하였을 경우 요크셔보다 버크셔에서 더 높은 발현을 나타냈다. 이는 육질과의 연관성이 있다는 것을 나타낸다.

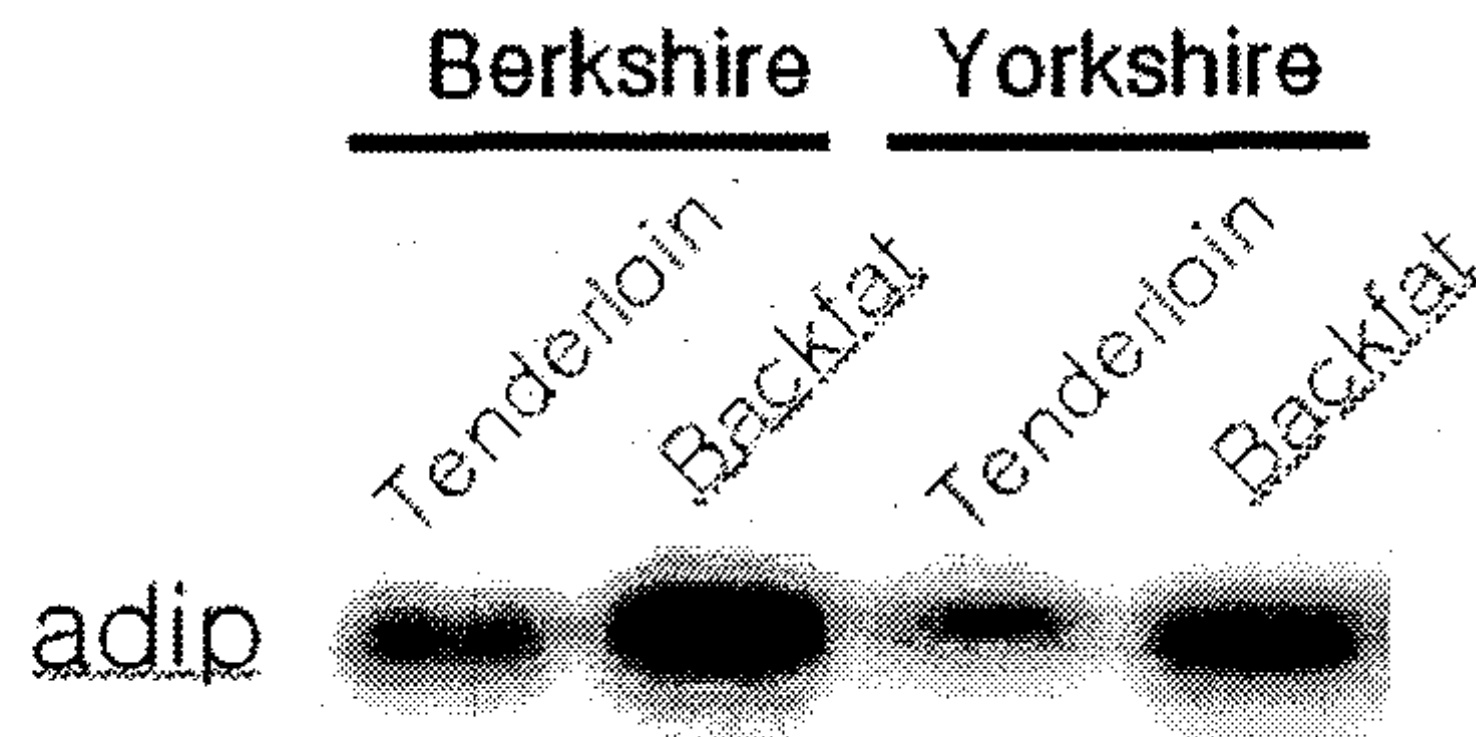


Figure 15. Expression patterns of adiponectin by northern blotting.

4. Quantitative RT-PCR analysis

확보된 ef-hand bind, PQBP1, RXRB, OTF1, urate oxidase, NM004, NM005 유전자는 어떤 조직에서 어떤 단계에서 어떻게 발현되는가를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다.

가. 연구 방법

RT-PCR 분석을 위해 이용된 total RNA는 Northern blot 분석에서 이용하였던 것과 동일하였다. 분리된 total RNA 5µg을 취하여 Superscript™ II RNase H-Revers Transcriptase (invitrogen, USA) Kit를 이용하여 first strand DNA를 합성 후 second strand DNA를 합성하였고, 각 유전자별로 제작된 primer를 이용하여 PCR을 실시하였다.

나. 연구 결과

1) Adiponectin

Adiponectin 유전자도 지방 생성과 조절, 그리고 에너지 생성 및 항상성 조절에 관여하는 것으로 알려져 있는 주요한 candidate gene이다. Fat cDNA library로부터 얻어진 전체 염기서열 약 3340 bp의 Adiponectin 유전자의 염기서열을 이용하여 앞 뒤쪽의 primer 쌍들을 제작하여 750bp PCR 산물에 대한 돼지 조직간 유전자 발현양상을 분석하였다.

Adiponectin 유전자에 대해서도 Berkshire종과 Yorkshire종의 60, 80, 110kg 체중시의 근육과 지방조직에 대한 유전자 발현양상을 확인 하였다(Figure 16). 그 결과 성장단계별로 보면, 60kg시에 가장 높은 발현량을 보이는 것으로 나타났다, 이 유전자의 특성처럼 근육보다는 지방조직에 더욱 많이 발현되어지는 것을 확인할 수 있었다.

또한 110kg Berkshire종에서 돼지의 조직별 유전자 발현양상을 확인한 결과 여기에서도 Galectin-1 유전자와 비슷한 결과를 얻을 수 있었는데 무엇보다도 지방조직에서의 가장 높은 발현량을 재확인할 수 있었고, 지방이 섞여 존재하고 있는 삼겹살 부위에서는 오히려 근육보다 더욱 적게 발현되어진 것을 확인할 수 있었다(Figure 17). 이 유전자에 대한 더욱 정확한 유전자 발현양상을 분석하여 형질과의 관련성을 확인해 볼 필요가 있으리라 생각된다.

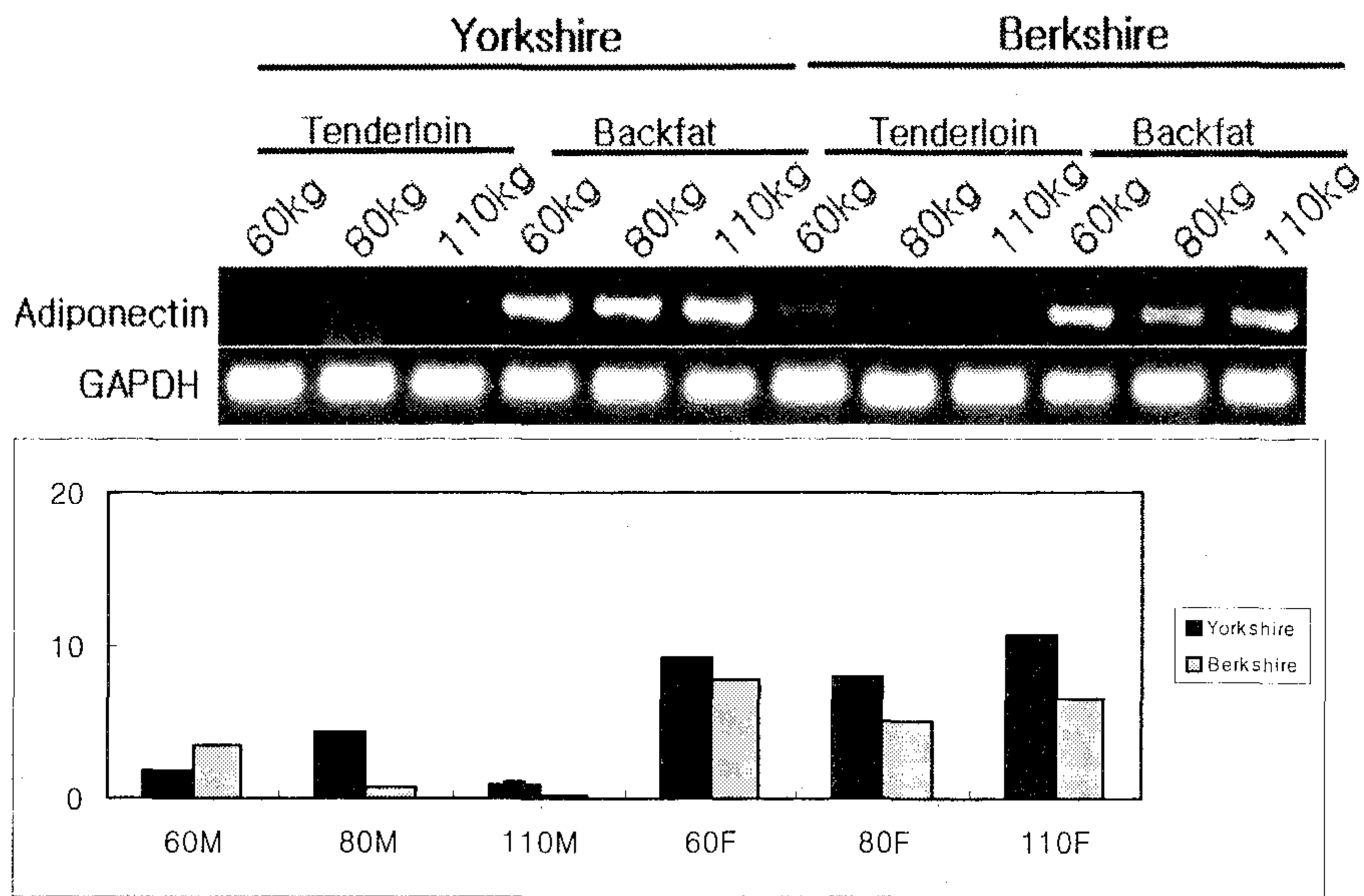


Figure 16. Expression patterns of adiponectin by RT-PCR.

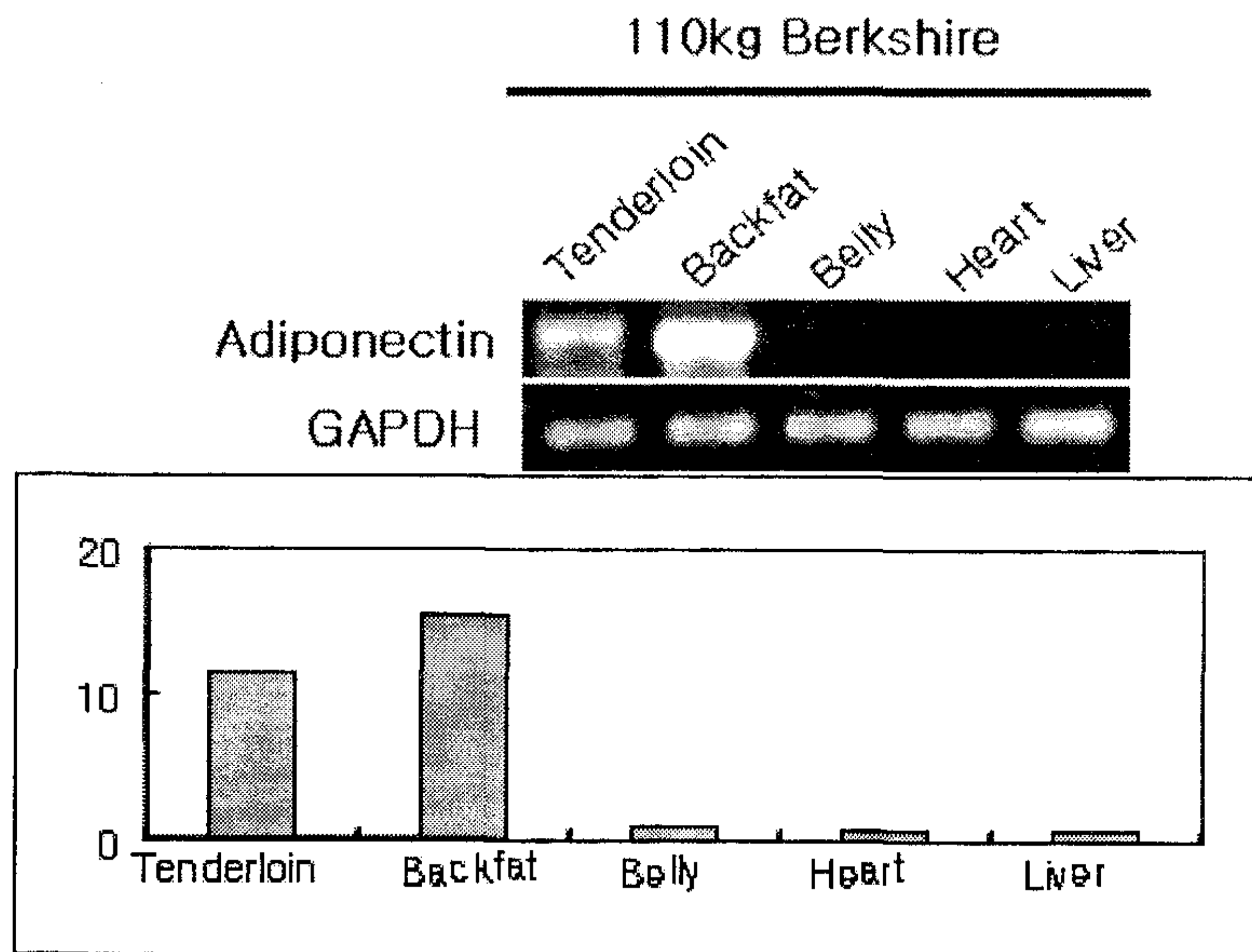


Figure 17. Adiponectin expression of tissues in 110kg Berkshire by RT-PCR

2) ef-hand bind

이 유전자는 Fat cDNA library로부터 얻어진 돼지의 유전자 염기서열로부터 primer를 제작하여 돼지의 조직간 유전자 발현양상을 분석하였다. 이용한 primer의 염기서열은 아래와 같다.

Forward 5' - gagaa ggggtg cagaa gcagc - 3'

Reverse 5' - gagcg ttagg agaac gtggg - 3'

RT - PCR로 증폭되어진 결과산물의 크기는 406bp였다. 이 유전자가 돼지의 조직에서 발현되어지는 양상을 확인하기 위해 Berkshire 품종에 대해서 성장단계별과 근육과 지방 조직간 발현양상을 확인해 보았다. 그 결과, Figure 18에서 보는 바와 같이 이 유전자는 근육조직보다는 지방조직에서 높은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었다. 이 유전자의 정확한 체내 기능은 아직 확인할 수 없었지만 조직간, 성장단계별, 그리고 품종 간 특이적인 발현양상을 나타내는 것은 확인할 수 있었다.

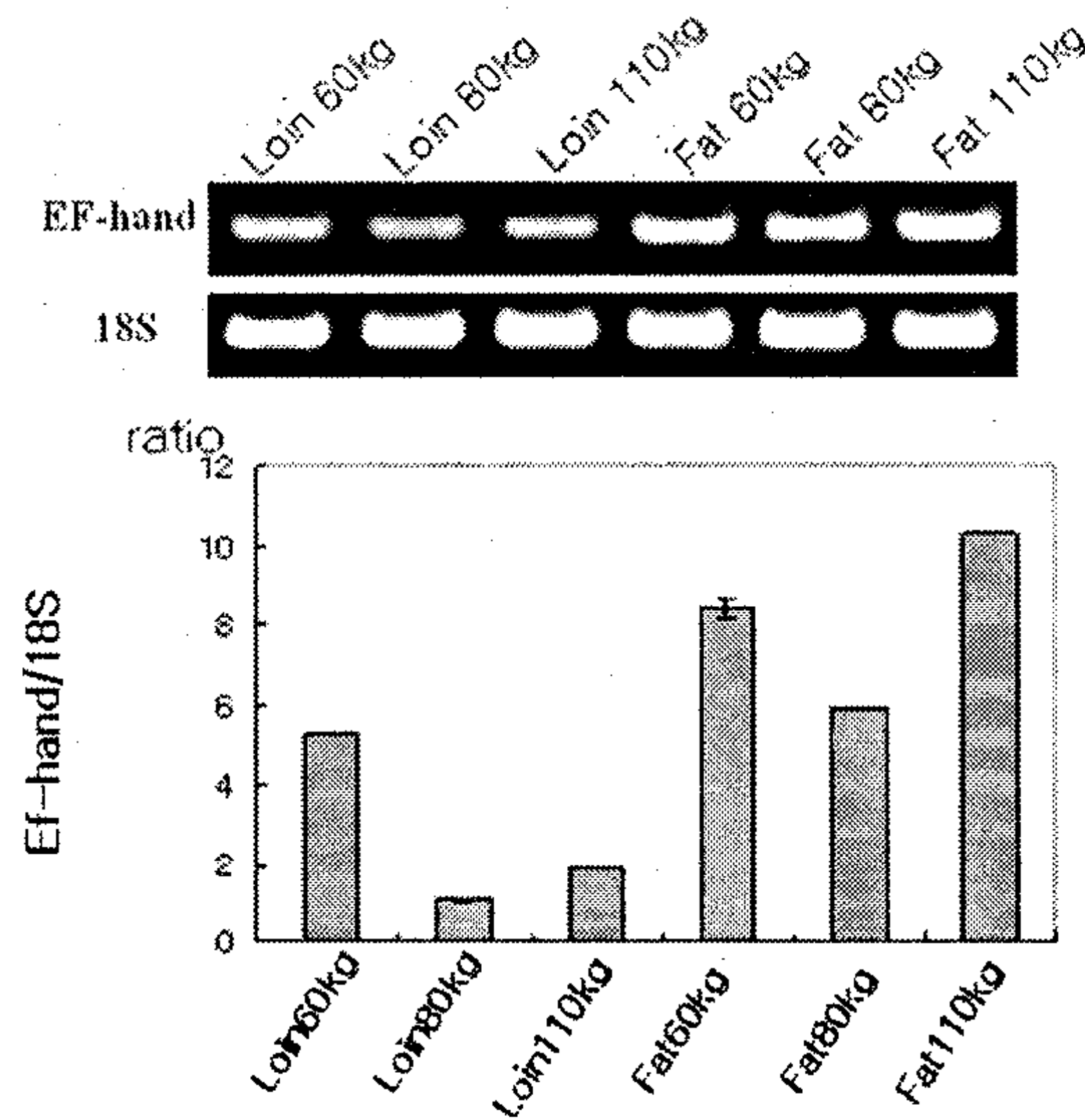


Figure 18. Expression patterns of ef-hand bind by RT-PCR.

3) Galectin-1

이 유전자는 SWR2179-R1 microsatellite 분석을 통해 얻어진 약 530bp의 유전자 염기서열로 앞 뒤쪽의 primer 쌍들을 제작하여 370bp의 PCR 결과물에 대해서 돼지 조직간 유전자 발현양상을 분석하였다.

mRNA의 발현양상 분석결과 Galectin-1 유전자는 지방에서 성장단계별과는

관계없이 두 품종 모두 높은 발현량을 보였고, 안심에서는 성장단계별 중 60kg 때 발현량이 높은 것으로 확인 되었다. 또한 두 품종간의 유전자 발현양상에 있어서의 특이적인 차이는 없는 것으로 나타났으며 근육조직보다 지방조직에서 더욱 높은 발현량을 보이는 것을 확인하였다 (Figure 19).

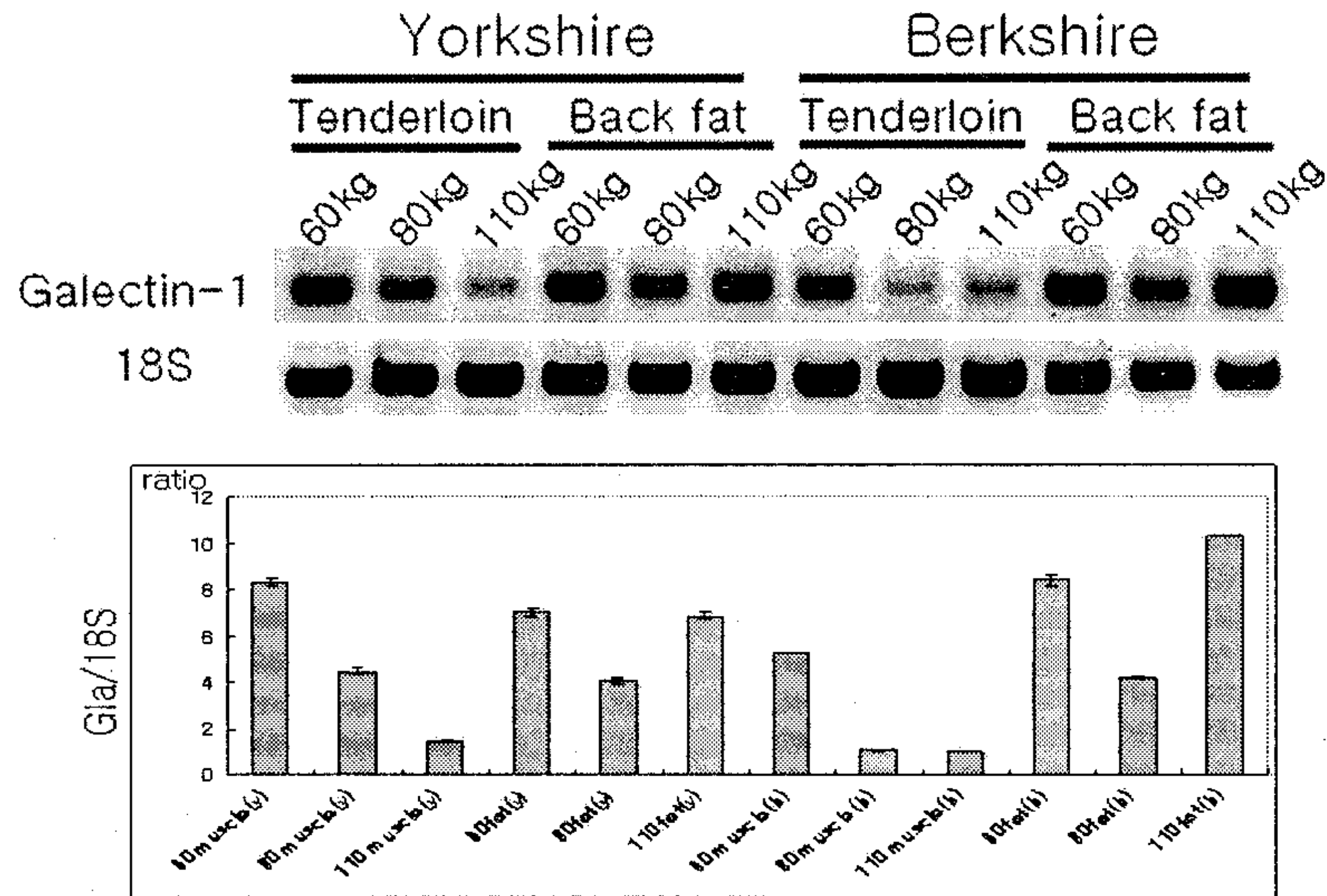


Figure 19. Expression patterns of Galectin-1 by RT-PCR.

근육조직보다 지방조직에서 더욱 높은 발현량을 나타내는 Galectin-1 유전자는 지방의 합성, 조절, 분화에 관여하는 것으로 알려져 있어 근육과 지방 조직 이외에 다른 조직에서의 이 유전자의 발현양상을 확인해 보고자 110kg Berkshire종의 심장, 간, 지방, 삼겹, 그리고 근육에 대해서 RT-PCR 분석을 수행하였다 (Figure 20). 그 결과 심장과 지방조직에서 이 유전자의 발현량이 가장 높은 것으로 나타났다. 그래서 이 유전자는 우선 지방조직에서 가장 많이 발현되는 것을 확인하였고, 이러한 사실을 토대로 이 유전자의 형질과의 연관성을 확인해 보고자 하였다.

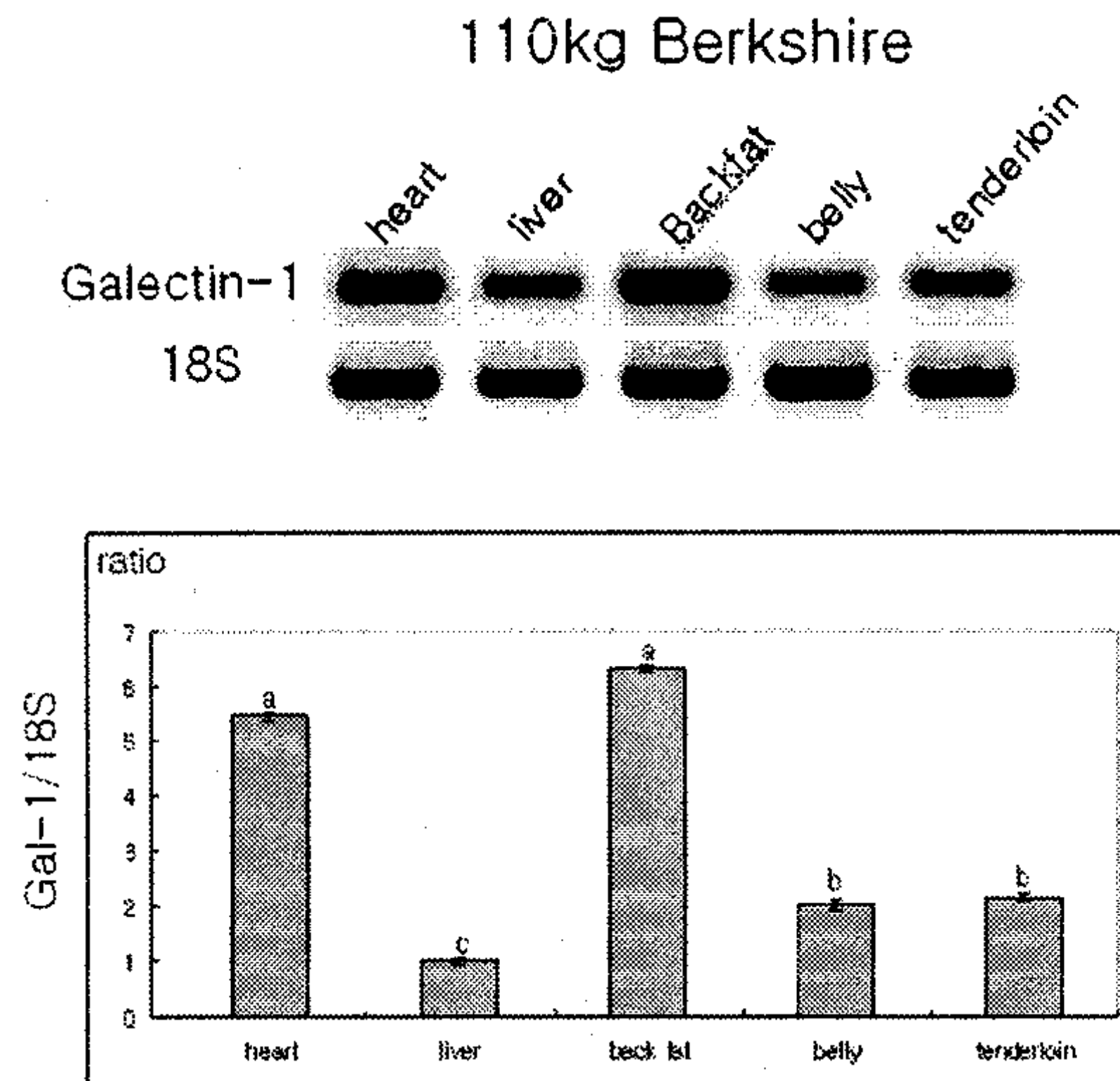


Figure 20. Galectin-1 expression of tissues in 110kg Berkshire by RT-PCR.

4) Urate oxidase

이 유전자는 S0212 microsatellite 분석을 통해 얻어진 돼지의 유전자 염기서열로부터 primer를 제작하여 돼지의 조직간 유전자 발현양상을 분석하였다. 이용한 primer의 염기서열은 아래와 같다.

Forward 5' - taact cattc atacc atacc ag - 3'

Reverse 5' - agttt cctag ggtag gagaa a - 3'

RT - PCR로 증폭되어진 결과산물의 크기는 400bp 이었다. 이 유전자가 돼지의 조직에서 발현되어지는 양상을 확인하기 위해 Berkshire 품종에 대해서 성장단계별과 근육과 지방 조직간 발현양상을 확인해 보았다. 그 결과, Figure 21에서 보는 바와 같이 이 유전자는 근육조직보다는 지방조직에서 높은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었다. 이 유전자의 정확한 체내 기능은 아직 확인하지 않았으나 조직간, 성장단계별, 그리고 품종 간 특이적인 발현양상을 나타내는 것은 확인할 수 있었다.

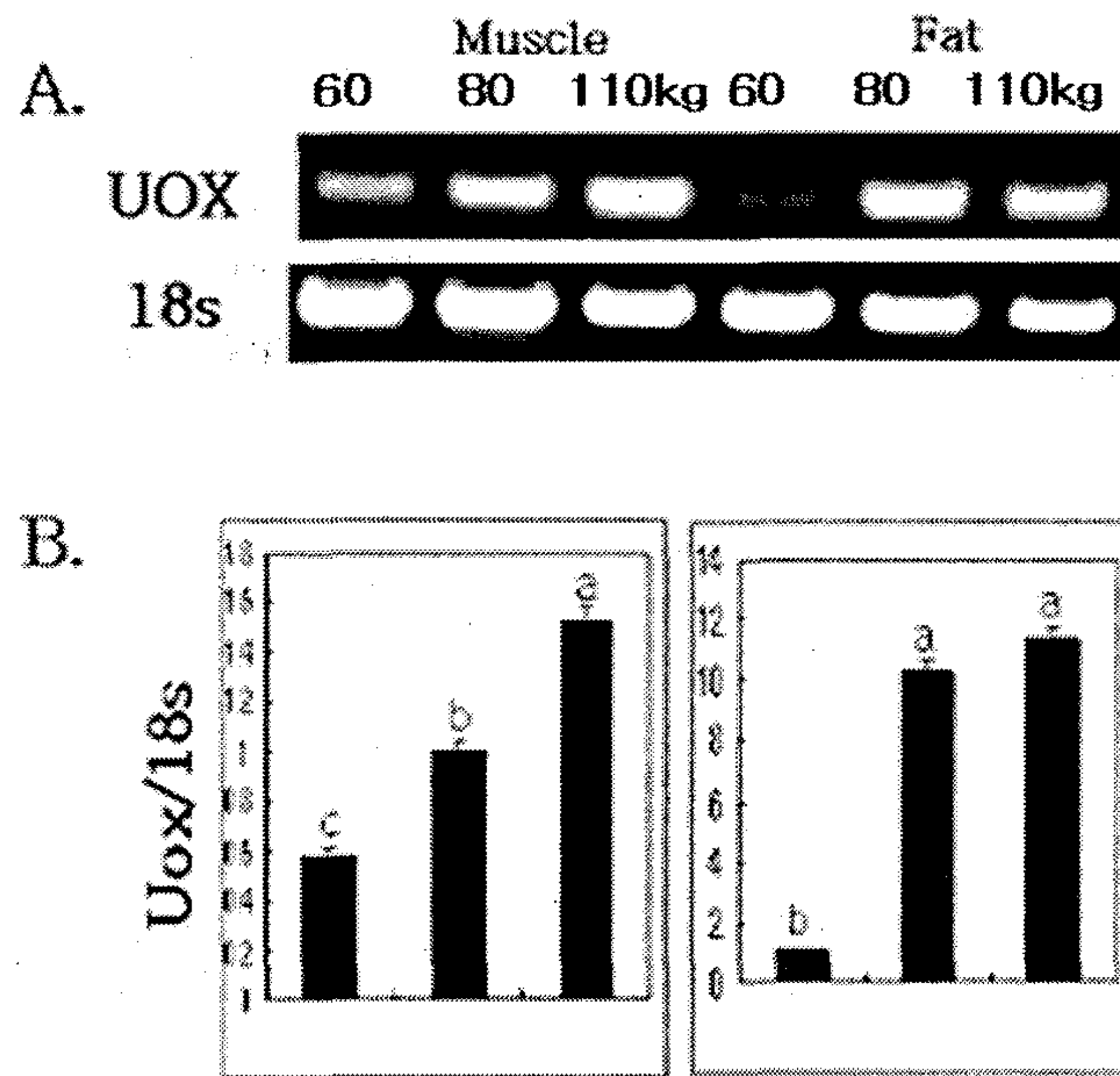


Figure 21. Expression patterns of urate oxidase in each growth stage of Muscle (loin) and Back fat (60, 80, 110kg).

5) OTF1

본 연구를 통해 얻어진 OTE1 유전자에 대해서 형질과의 관련성을 확인하고자 조직 내 유전자 발현양상을 확인하였다. 이 유전자는 figure 22에서 보는 바와 같이 110kg 시에 매우 높은 발현량을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 돼지는 110kg 시에 성성숙에 도달하고 일반 비육돈의 경우 이 시기에 도축을 하게 되어진다. 이 유전자는 세포 특이적으로 발현되어지고, 성장, 발달, 세포의 종류 등에 따라 다른 것으로 알려져 있으므로 이러한 유전적 발현양상의 특이성도 이와 연관하여 추측할 수 있게 될 것이다. 이 유전자가 110kg 시에 근육, 지방 조직에서 많이 발현되어지는 것에 관한 정확한 기능은 아직 확인할 수 없으므로 지속적인 기능분석이 수행되어야 할 것이다. 또한 유전자의 polymorphism을 분석하여 유전적 다양성과의 관련성도 확인해 볼 필요가 있을 것이다.

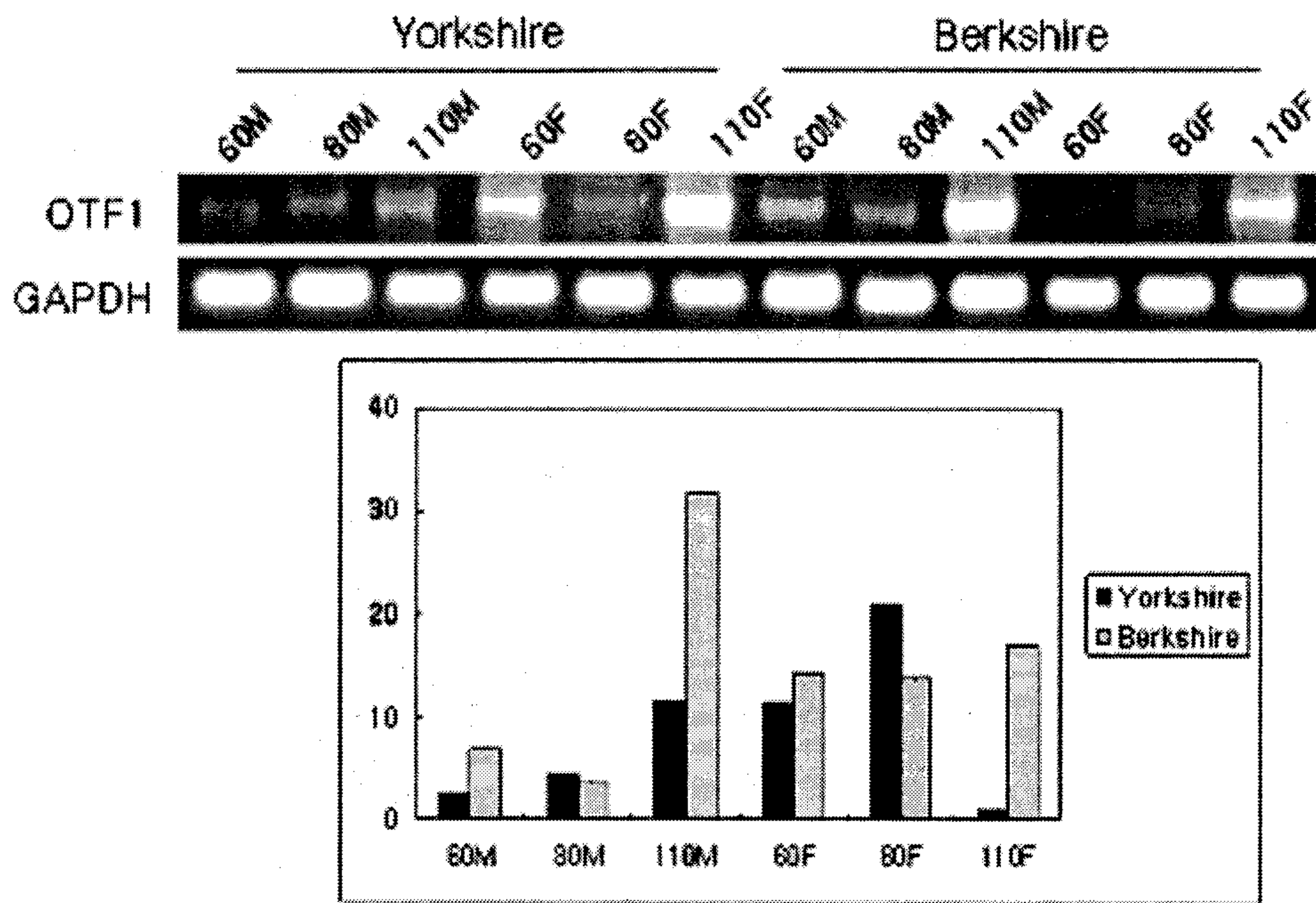


Figure 22. The expression levels of OTF1 in various tissues. (A) growth-stage and tissues, (B) growth-stage and species, and (C) species and tissues. Data are means±SE.

6) RXRB

이 유전자는 세포 내의 여러 수용체들과의 결합을 조절함으로써 세포의 성장, 분화 등에 관련되어지는 것으로 알려진 marker screening 분석을 통해 얻어진 형질 관련 candidate gene이다. 우리는 이 유전자에 대해서도 성장단계별 근육과 지방조직에서 조직 내 발현양상을 확인하였다 (Figure 23). 그 결과 Berkshire 품종은 거의 발현되어지지 않은 반면, Yorkshire 품종의 지방조직에서 매우 높은 발현양을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로서 이 유전자가 세포의 성장과 관련된 점을 볼 때 이와 관련성이 있을 수 있음을 추측해 볼 수 있다. 돼지의 경우 Berkshire 품종은 성장률이 낮고, Yorkshire 품종은 Berkshire에 비해 성장률이 높은 반면 등이나 배에서의 지방 침착은 Berkshire가 더욱 높은 것으로 알려져 있다. 우리는 이러한 결과를 통해 우선 이 유전자의 특이적인 발현양상을 통해 이 유전자와 돼지의 성장이나 지방침착과 관련성이 있음을 추정할 수 있었다. 그러므로 이 유전자에 대해서 지속적인 돼지의 성장이나 지방합성과 같

은 형질과의 관련성을 확인하고자 한다.

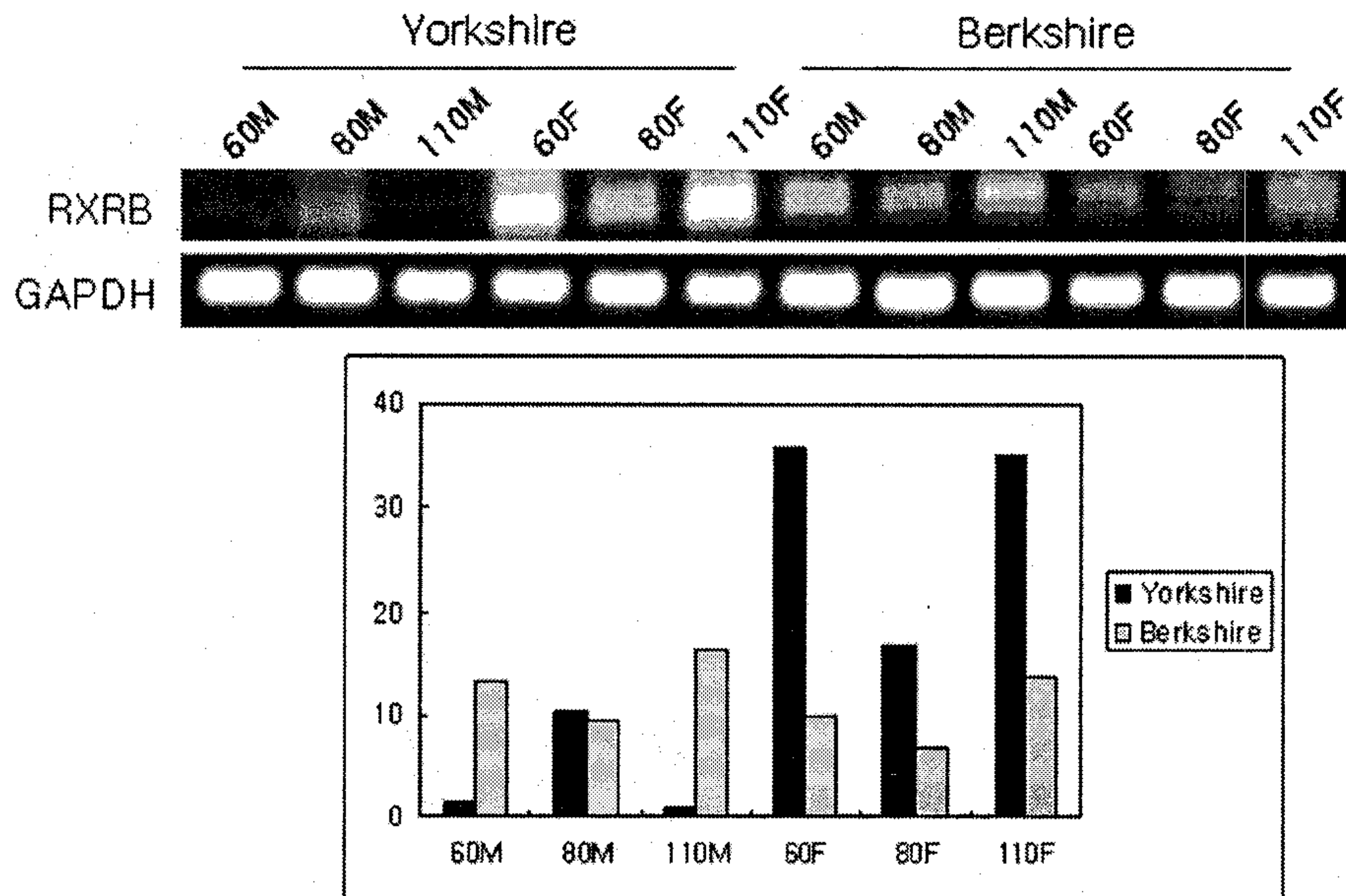


Figure 23. The expression levels of RXRB in various tissues. (A) growth-stage and tissues, (B) growth-stage and species, and (C) species and tissues. Data are means±SE.

7) PQBP1

이 유전자는 SWR153 microsatellite 분석을 통해 얻어진 돼지의 PQBP1 유전자의 염기서열로부터 primer를 제작하여 돼지의 조직간 유전자 발현양상을 분석하였다. 이용한 primer의 염기서열은 아래와 같다.

Forward 5'- gcagg tcgac catat gggag -3'

Reverse 5'- gagtg agctg atacc gctcg -3'

RT-PCR로 증폭되어진 결과산물의 크기는 380bp 이었다. 이 유전자가 돼지의 조직에서 발현되어지는 양상을 확인하기 위해 Yorkshire와 Berkshire 두 품종에 대해서 성장단계별과 근육과 조직간 발현양상을 확인해 보았다. 그 결과, Figure 24에서 보는 바와 같이 이 유전자는 근육조직보다는 지방조직에서 높은 발현량을 보이는 것을 알 수 있었다. 이 유전자의 정확한 체내 기능은 아직 확인할 수 없었으나 조직간, 성장단계별, 그리고 품종 간 특이적인 발현양상을 나타내는 것은 확인할 수 있었다.

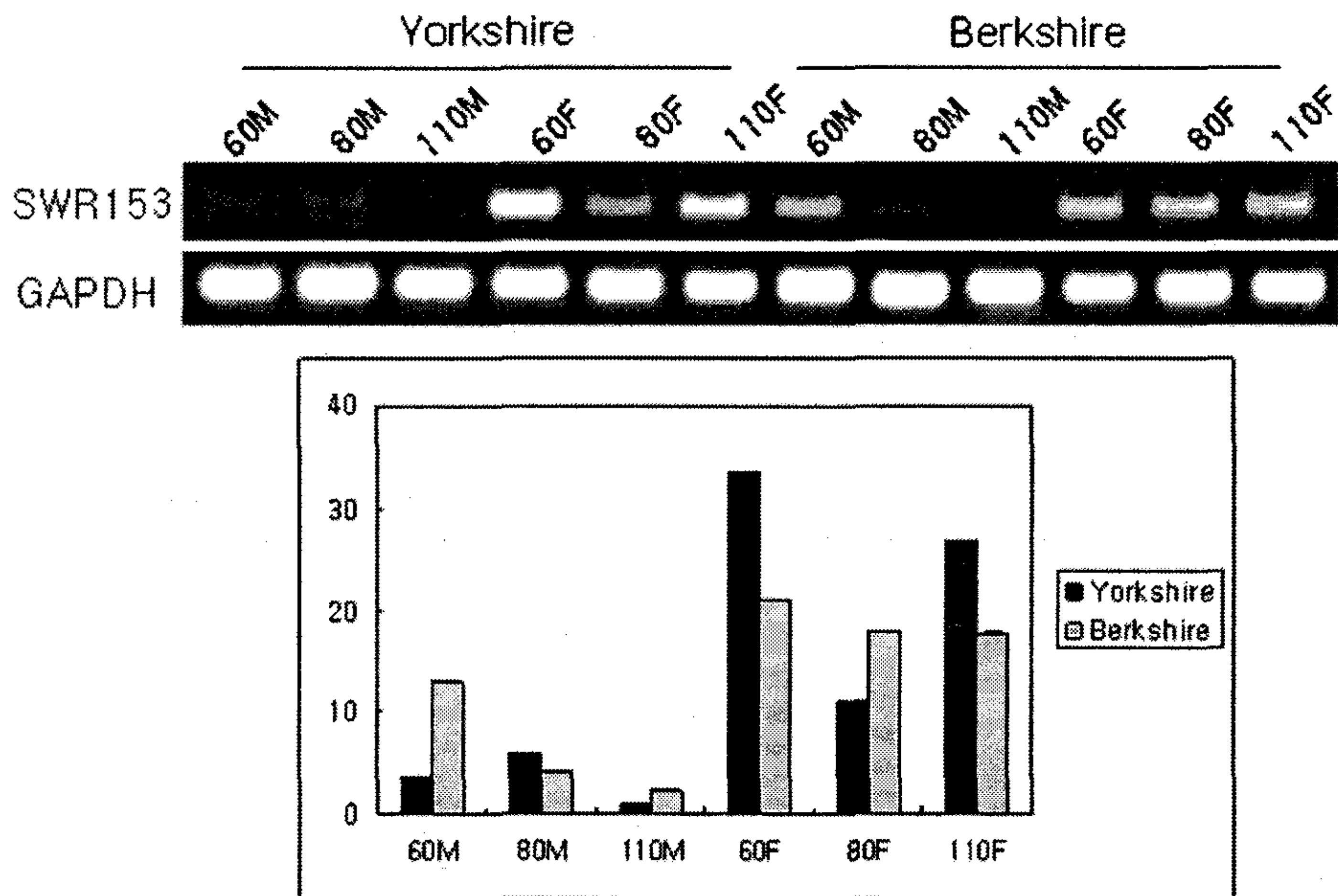


Figure 24. The expression levels of PGBP1 in various tissues. (A) growth-stage and tissues, (B) growth-stage and species, and (C) species and tissues. Data are means±SE.

8) NM004

본 연구를 수행함에 TAIL - PCR로부터 2개의 no match 유전자를 확보하였고, NM004유전자는 SW1806-R1 microsatellite 분석을 통해 얻어진 유전자로 유전자는 전체 600bp 길이로 GenBank에 등록된 상태이다. No match 유전자에 대해서는 아직까지 어떠한 기능도 밝혀진 바가 없기 때문에 이에 대한 기능을 밝히게 되면 그 효과는 아주 높지만, 반면 어떠한 접근도 하기 힘들다. 그래서 본 연구에서는 이 확보된 유전자에 대해서 우선 확보된 cDNA와 아래의 primer pair를 이용한 RT-PCR 분석을 통해 298bp PCR product를 확보하여 유전자 발현양상을 분석해 보았다.

Forward 5'- gcgtc cggga gaata acga -3'

Reverse 5'- caaga ccaag cctcc gtcg -3'

Figure 25에서 보면, Berkshire 품종에서는 성장단계에 따라 근육과 지방조직 모두에서 이 유전자의 발현량이 점차 줄어드는 것을 알 수 있고, 반대로 Yorkshire 종에서는 근육과 지방조직 모두에서 이 유전자의 발현량이 점차 증가

하는 추세를 확인할 수 있었다. 이 유전자의 발현 단백질이나 기능을 아직 확인할 수 없어서 이러한 결과에 대한 정확한 해석은 어려운 점이 있으나 대신 앞으로 이 유전자에 대한 계속적인 연구를 수행하여 좋은 결과를 얻게 된다면 큰 성과를 거둘 수 있게 될 것이다.

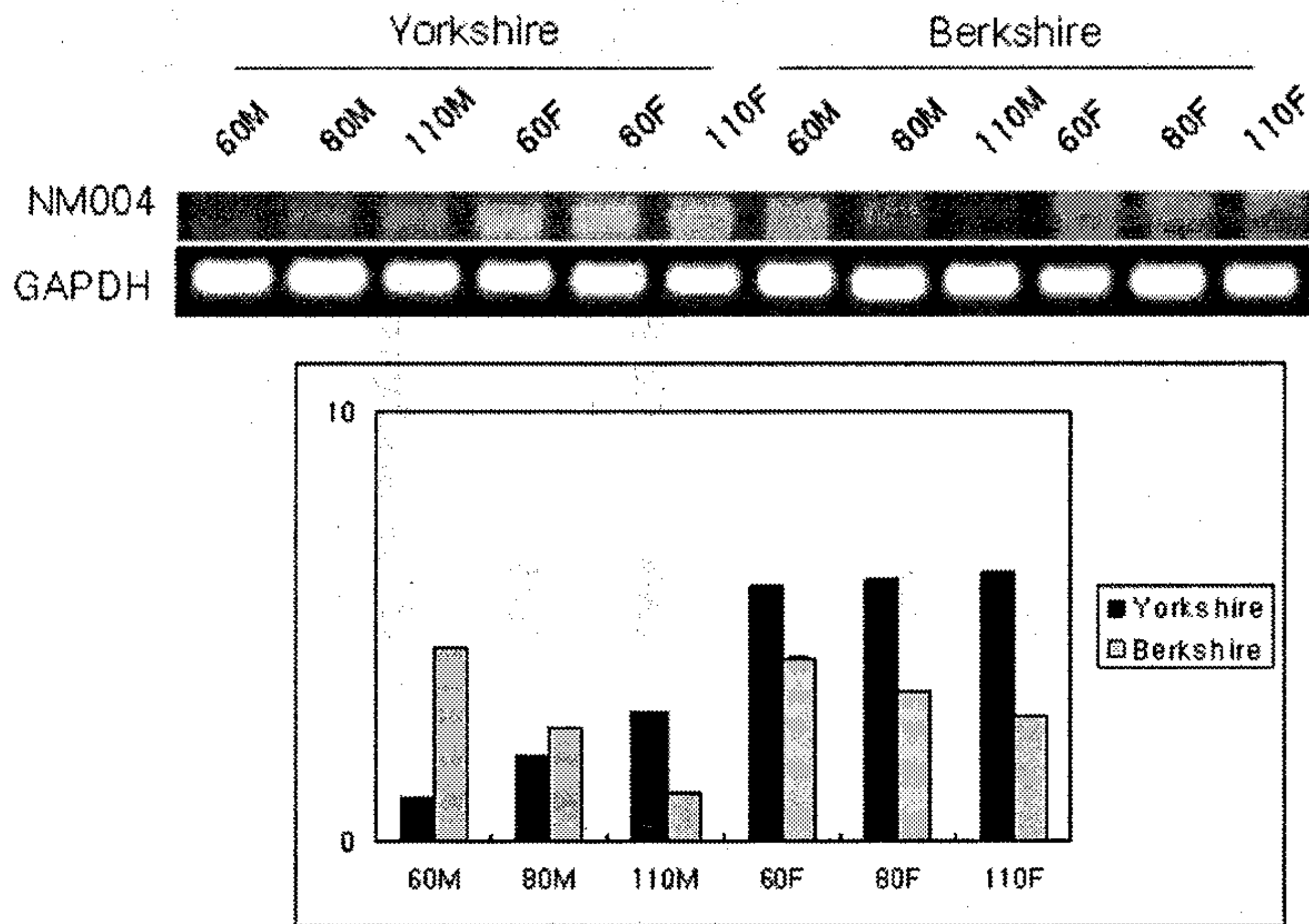


Figure 25. The expression levels of NM004 in various tissues. (A) growth-stage and tissues, (B) growth-stage and species, and (C) species and tissues. Data are means±SE.

9) NM005

이 유전자는 NM004와 마찬가지로 TAIL - PCR에서 확보된 no match 유전자로 S0212-R1 microsatellite 분석을 통해 얻어졌고, 전체 687bp 길이의 유전자이다. 이 유전자에 대해서도 이미 확보된 cDNA를 이용한 RT-PCR 분석을 수행하여 유전자 발현양상을 확인해 보았다. 다음의 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 301bp의 PCR products를 얻을 수 있었다.

Forward 5'- aggct ctggt tctga cacct -3'

Reverse 5'- actga actgc actga ggtcc -3'

이 유전자의 발현양상을 분석한 결과에서는 성장단계, 품종, 조직종류에 대한 특이성을 규명할 수 없었다 (Figure 26).

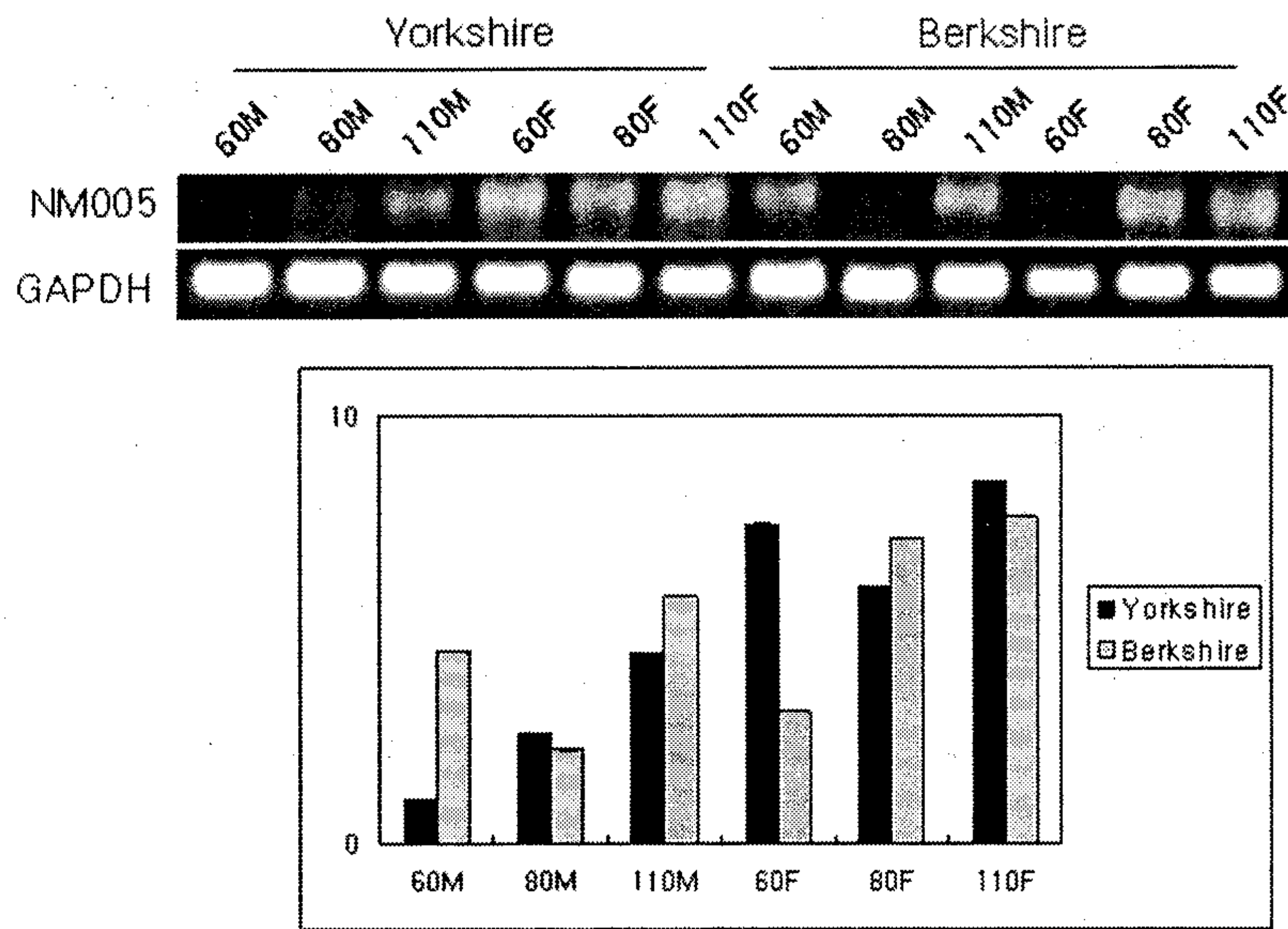


Figure 26. The expression levels of NM005 in various tissues. (A) growth-stage and tissues, (B) growth-stage and species, and (C) species and tissues. Data are means±SE.

5. Western blot analysis

가. 연구 방법

경제형질과 관련된 유전자에 대해서 단백질화되어 발현되는지 여부를 알아보고자 확보된 9개의 유전자 중 경제형질과 연관성이 가장 많이 있을 것으로 예상되는 2개의 유전자 Galectin-1과 Adiponectin의 Western blot 분석을 수행하였다. 특히 Galectin-1은 우수 돼지 진단 방법을 개발하기 위해서 western blot analysis을 통해 더욱 정확하게 발현양상을 확인하였다. 나머지 확보된 7개 유전자는 모두 하나의 유전자만 갖고는 조기 진단 방법을 개발 할 수 없었다. 따라서 7개 유전자 모두의 정보를 모아서 경제형질 조기 진단 방법을 개발하는데 이용하였으며, 7개 유전자는 western blot을 수행하지 않았다.

1) Sample 준비 및 정량

분석하고자 하는 조직을 개체별, 부위별로 채취하고 Protein Lysis buffer를 넣어 잘 풀어 준 뒤에 얼음에서 10분간 정치를 시킨 후 Sonicator나 혹은 Homogenizer에서 미세하게 분쇄한 후 세포가 파괴되고 세포 내부물질과 단백질이 용출되면 저온 초원심분리기를 이용하여 14,000rpm 4°C에서 10분간 원심 분

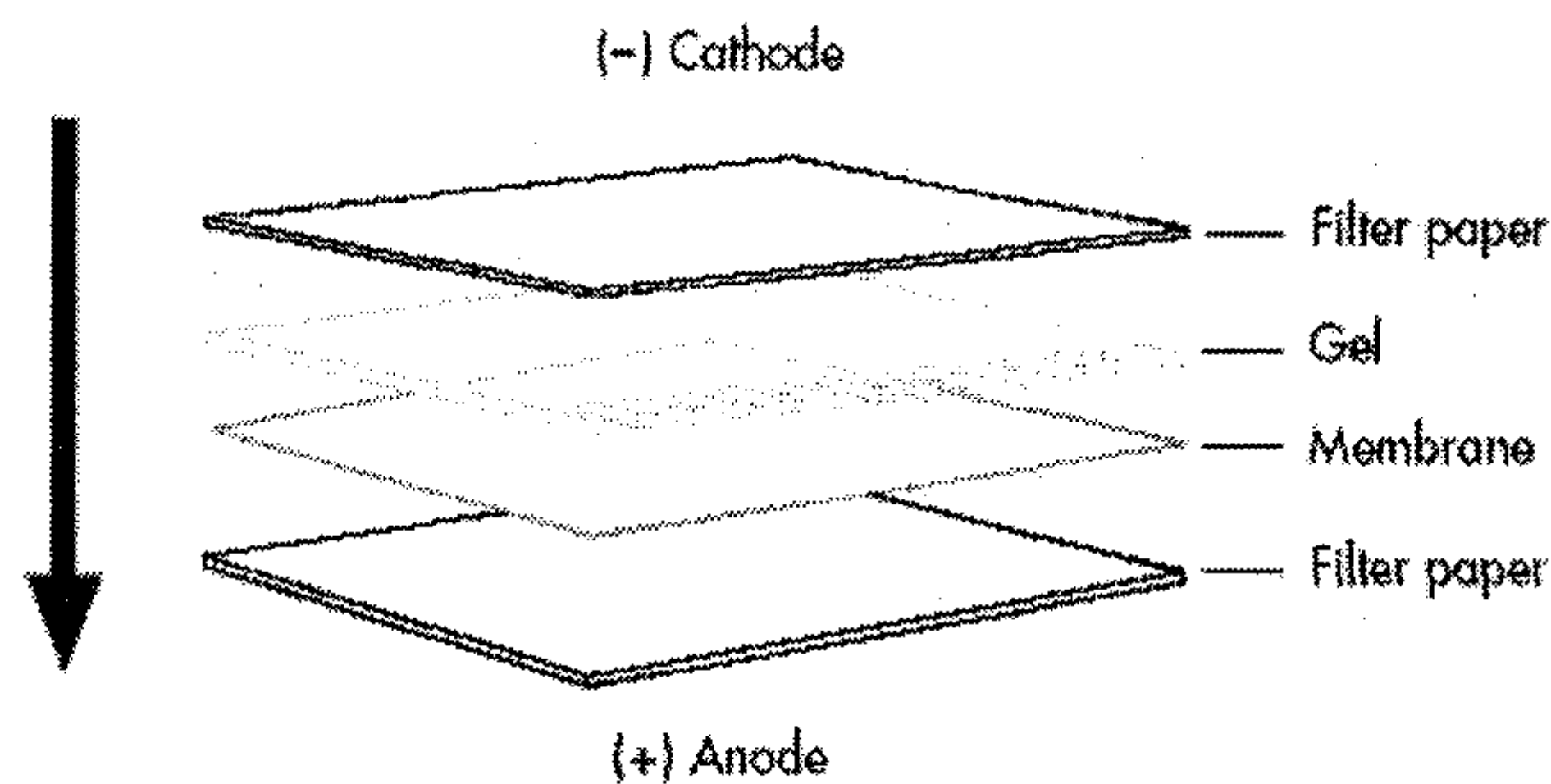
리를 하고 필요 없는 세포 덩어리나 부수물들은 버리고 상층액만을 취하여 새 튜브에 옮겨 담는다. 상층액 내에 단백질이 녹아있으며 이 단백질량을 Bradford assay 정량방법을 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다.

2) 전기영동 분석 및 확인

10 ~ 15% SDS-PAGE gel을 굳혀 준비하고, 정량된 단백질을 균일한 량 Loading한 후 100V에서 2hr 전기영동 후 조심스럽게 염색을 위한 통으로 이동하였다. Coomassie Blue R250시약으로 gel을 2hr염색시키고 destaining solution 1과 2를 이용하여 1hr 동안 단백질외의 gel상의 염색시약들을 제거하고 단백질만이 염색되었을 때 단백질의 순수도와 깨어진 상태 등을 확인하였다. 전기영동이 잘 이루어진 것이 확인된 단백질은 transfer와 blocking 실험에 이용하였다.

3) Gel Transfer & Blocking

확인된 단백질들은 100V에서 3시간 동안 전기영동한 후 준비되고, 3MM paper와 PVDF membrane은 매탄올에 1시간 동안 적시고 다시 1x transfer buffer에 담궈서 준비한 다음, 1x transfer buffer를 transfer buffer tank에 채우고 4°C 100V에서 2시간동안 전기를 흘려서 단백질들을 gel 상에서 membrane으로 이동시켰다 (그림참조). 그런 다음 PVDF membrane을 non fat milk solution에서 blocking 시킨 후 TTBS 시약에 세척하여 단백질 발현양상을 확인하기 위한 단백질 blot을 제작하였다.



4) Antibody 제작

선발된 유전자에 대해서 항체를 판매하고 있는지 정보를 확인하여 시판되고 있을 경우에는 이를 이용하여 western blot 분석을 수행하고자 하였고, 만약 시판되지 않을 경우에는 직접 제작하거나 전문업체에 제작 의뢰하는 방법을 모색

하고자 하였다. Antibody의 제작은 단백질 분석에 있어서 가장 어렵고 중요한 과정이 됨으로 분석하고자 하는 유전자의 정확한 항체를 생산하여야 하였다. 선 발된 성장, 육질, 번식 관련 유전자에 대한 항체가 모두 시판되어지는 않을 것으로 판단되었고, 항체 형성의 가능성 여부에 따라 단백질 발현양상의 확인이 결정되어질 것이라 생각되어졌다.

마) Hybridization & Development

제작해 둔 Western용 blot을 blocking solution에 BSA를 첨가하고 2hr~o/n 적신 후 blocking solution에 각 유전자의 first antibody를 처리하고 25°C에서 1 시간동안 흔들여 주었다. TTBS buffer로 15 분씩 3회 세척 후 다시 second antibody를 처리 하고 25°C에서 1 시간동안 흔들여 주었다. 그 후 blocking solution을 제거하고 TTBS buffer에 15min씩 3회 씻어 준 후 3MM paper에서 물기를 제거 후 필름 현상을 위한 준비를 하였다. Amersham 회사의 ECL이라는 발광시료 A, B를 섞어서 hybridization된 blot에 적신 후 암실로 이동하여 X-ray film으로 현상하여 각 유전자의 단백질 수준에서의 발현양상을 확인 분석 하였다.

나. 연구 결과

1) Galectin-1

클로닝된 galectin-1 유전자가 실제 단백질화 되어 발현 되어지는 지를 알아보기 위해 각 조직으로부터 단백질을 추출하여 blot을 제작하였고, 시판되고 있는 Galectin-1 항체(Abcam, England, ab25138)를 이용하여 단백질 발현 양상을 확인하였다. 조직의 종류는 RNA 발현양상을 확인하였던 RT-PCR과 Northern blot 결과와 비교하기 위해 그와 동일한 조직에서 단백질 발현양상을 확인하였다. 단백질의 발현양상을 확인한 결과에서도 RT-PCR 분석결과와 거의 동일한 결과를 확인할 수 있었다. Yorkshrie 종에 대해서는 근육보다 더욱 많은 단백질의 량을 확인할 수 있었다 (Figure 27A). 조직별 발현양상을 확인한 결과에서는 근육, 지방, 삼겹살에서 모두 많은 발현량을 확인할 수 있었다 (Figure 27B).

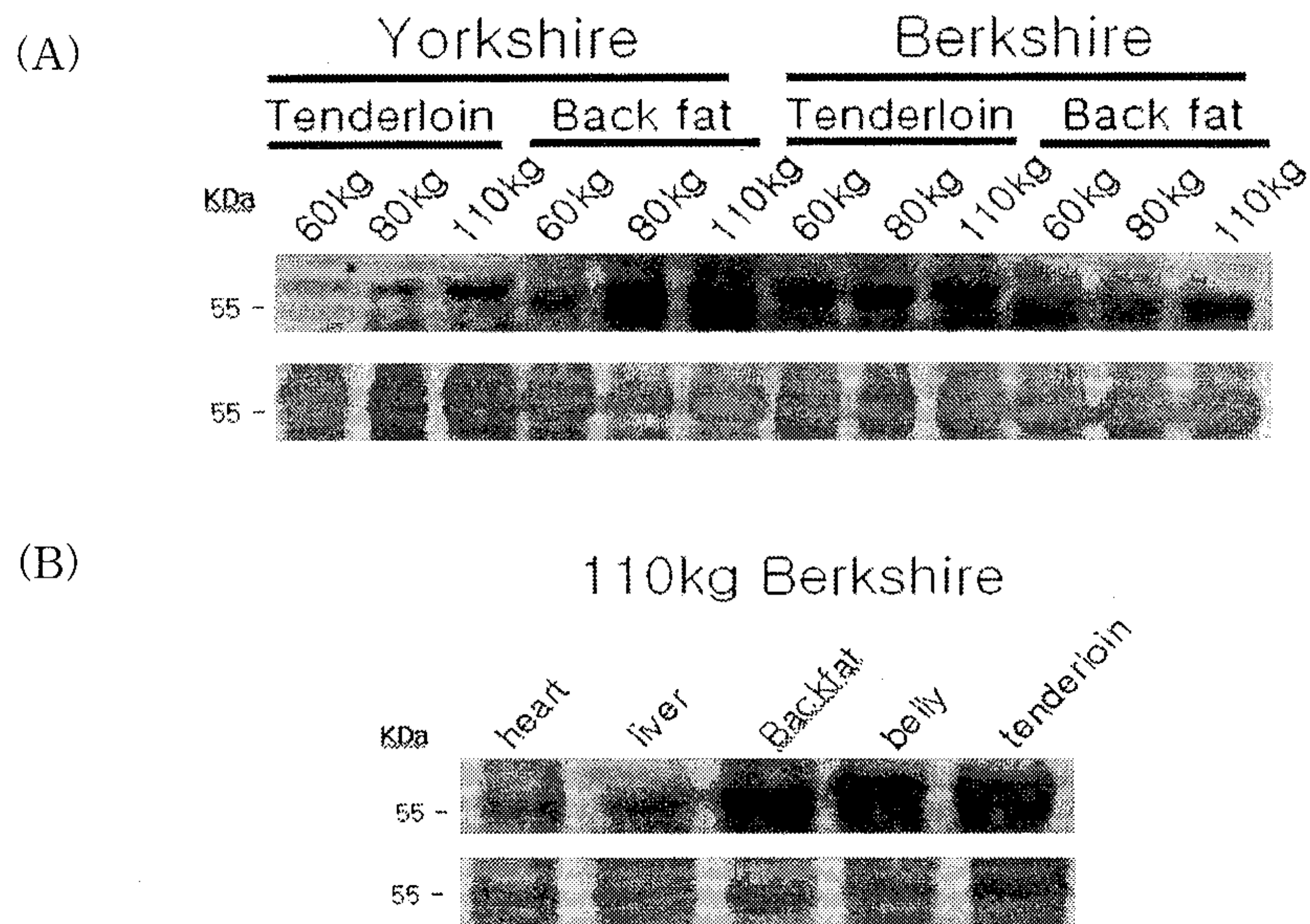


Figure 27. Western blot analysis of galectin-1 in pig tissues.

2) Adiponectin

Adiponectin 유전자에 대해서 단백질 발현양상을 확인하기 위해 western blot 분석을 수행하였고 그 결과는 Figure 28과 같았다. Figure 28 은 A와 B는 Berkshire와 Yorkshire 품종의 60, 80, 110kg시의 근육과 지방조직을 나타내고, 두 품종간에 보면 RNA에서와 마찬가지로 품종간의 단백질 발현 양상의 차이는 없는 것으로 나타났고, 두 품종 모두 근육에 비해 지방에서 현저히 높은 발현을 확인하였다. 단백질 발현양상에서도 RNA 발현양상에서와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 그래서 adiponectin 유전자는 지방조직에서 더욱 많이 생성되어 단백질로 합성되어지는 것을 확인할 수 있었다.

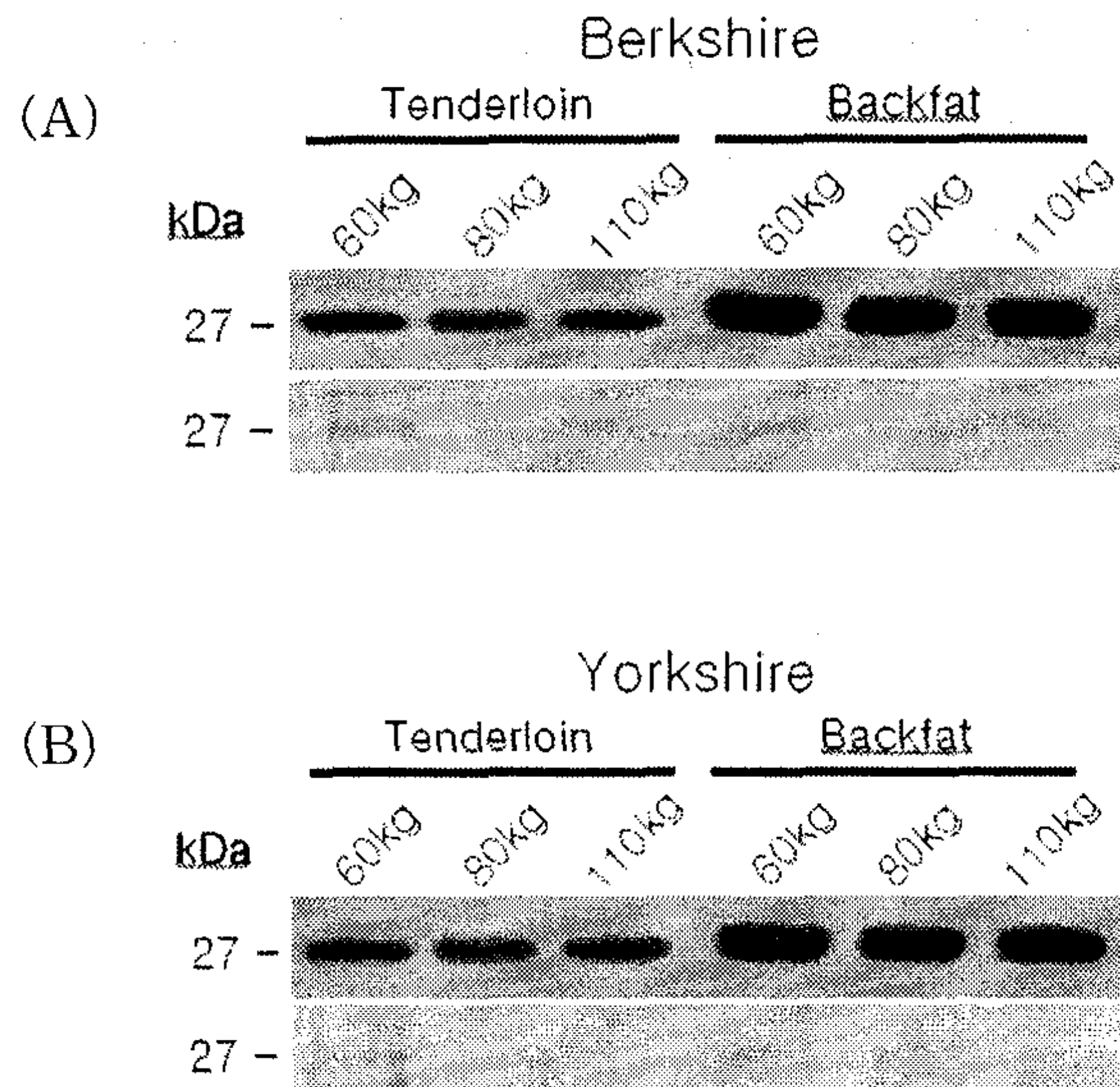


Figure 28. Western blot analysis of adiponectin.

6. Real-time PCR analysis

본 연구과제에는 Real-time PCR이 원래 계획에 포함되지 않았지만 최근 mRNA의 양을 정확히 확인할 수 있는 분석기법으로써 최근 잘 알려져 있으므로 Galectin-1 유전자에 대해 real-time PCR을 수행하였다.

본 연구를 통해 확보된 9개의 유전자 중 가장 경제형질과 관련성이 높은 것으로 나타난 Galectin-1 유전자로 RT-PCR, Northern 분석을 통해 유전자의 관련성을 1차적으로 확인되었고, 이러한 유전자 발현양상을 진단기술로 개발하고자 더욱 정확한 기법인 real-time 기법을 수행하게 된 것이다.

Real time PCR분석법은 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이다. End Point에서 PCR 증폭산물을 확인하는 기존의 PCR법에 비해서 다음과 같은 장점이 있어서 현재는 유전자 발현해석과 SNP typing 등에 있어 필수적인 기술이 되고 있다.

- DNA와 RNA의 정확한 정량이 가능하다.
- 전기영동이 필요 없이 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며, 오염의 위험성이 적다.

Real time PCR 에서는 PCR 증폭산물을 형광을 통해 검출한다. 검출방법은 크게 interchelating법과 형광표식 probe를 이용하는 2가지 방법이 있다. 본 연구에서는 interchelating 방법인 SYBR Green을 사용하여 Galectin-1 유전자에 대해서 Real time PCR 분석을 수행 하였다.

가. 연구 방법

Real-time PCR용 cDNA는 돼지의 안심과 등지방 그리고 각 기관 (삼겹, 심장, 간)에서 total RNA를 리하여 cDNA를 합성하였고 genomic DNA를 제거하기 위하여 DNase을 처리한 다음 사용하였다. real-time PCR용 primer는 돼지 galectin 유전자 sequence에서 Forward 5'- CCTGCACTTCAACCCTCGCT-3' 와 Reverse 5'- CCTCCACGACACTTCCAGGC-3'를 제작하였고, positive PCR control로 이용하기 위해 housekeeping gene인 GAPDH에서 Forward 5'-GTCGTGGAGTCCACTGGTGT-3'와 Reverse 5'-CCCATCACAACATGGG GGC-3' primer를 제작하여 이용하였다. Real-time PCR은 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)와 7500 Real time PCR system (Applied Biosystems)을 이용하여 다음과 같이 수행하였다.

먼저 cDNA 3 μ l (50ng), 5 pmole/ μ l forward와 reverse primer를 각각 1 μ l SYBR Green PCR Master Mix 10 μ l, RNase free 멸균 증류수 6 μ l를 사용하여 total 20 μ l에서 PCR을 수행 하였다. PCR 조건은 Figure 29과 같았다.

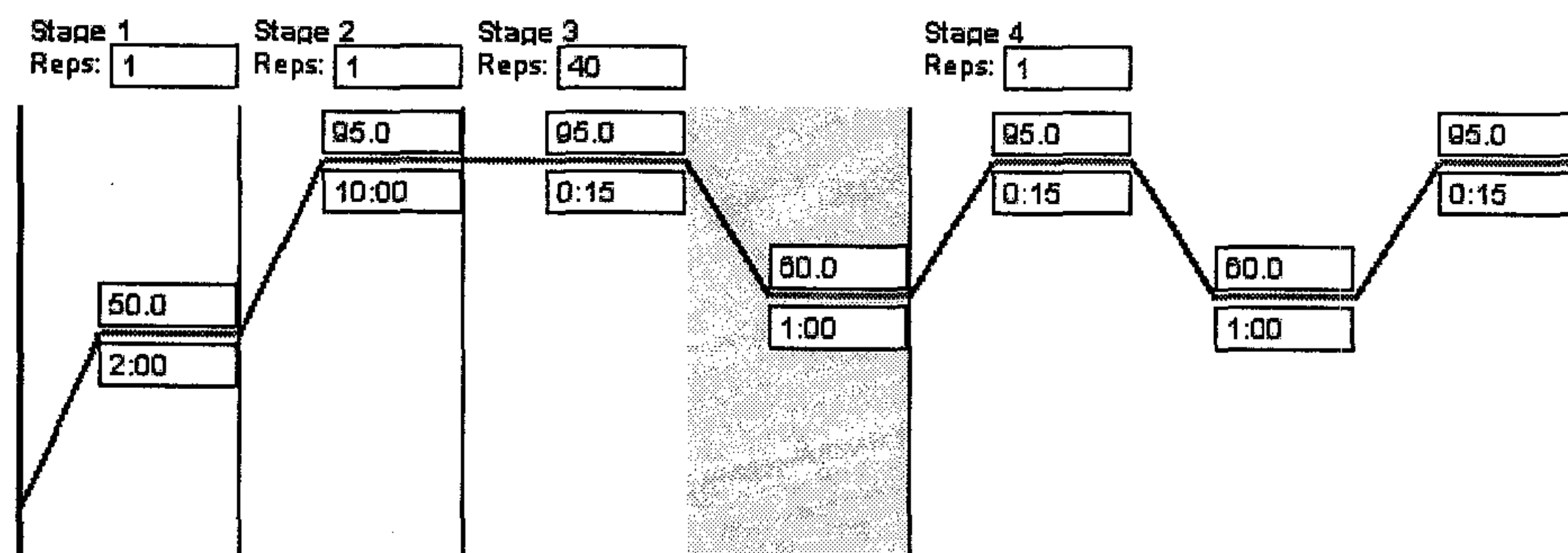


Figure 29. Real-time PCR condition of galectin-1 gene.

나. 연구 결과

연구에서 확보되어진 여러 유전자들의 더욱 정확한 분석을 위해서 산청 버크셔와 요크셔 돼지의 조직을 각 성장단계 (60kg, 80kg, 110kg)와 다양한 조직부위 (간, 심장, 삼겹, 등지방, 안심)에 대한 sample들을 채취하고 total RNA를 추출하여 농도측정을 하였다. 그 다음 동일한 양의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고 정확한 유전자의 발현양상을 분석하기 위해 성장단계별, 조직별 (지방과 근육), 품종별 (요크셔와 버크셔) 등의 다양한 방향으로 분석을 수행하였다. 다음으로 육질이 우수한 버크셔 110kg 돼지를 기준으로 각 조직별 발현양상을 알아보았으며, 이 정보를 토대로 육질과 발현양상과의 연관성을 간접적으로 추론할 수 있었다. 또한 분자생물학의 최근의 기술인 Real-time PCR을 통해 더욱 정확한 발현양상을 확인하였다.

우선 Galectin-1 유전자에 대해서 이용한 cDNA의 정량분석을 위해 standard curve를 분석한 결과는 Figure 30에 나타난 바와 같았다. Standard curve 분석을 통해 PCR로 증폭된 유전자의 정량을 확인할 수 있게 된다. Standard curve의 기울기는 -3.32값과 가장 근접할 때 이상적으로서 결과를 이용할 수 있는데, 우리의 실험에서의 기울기는 -3.59로서 실험 결과로 이용하기에 적정하였다.

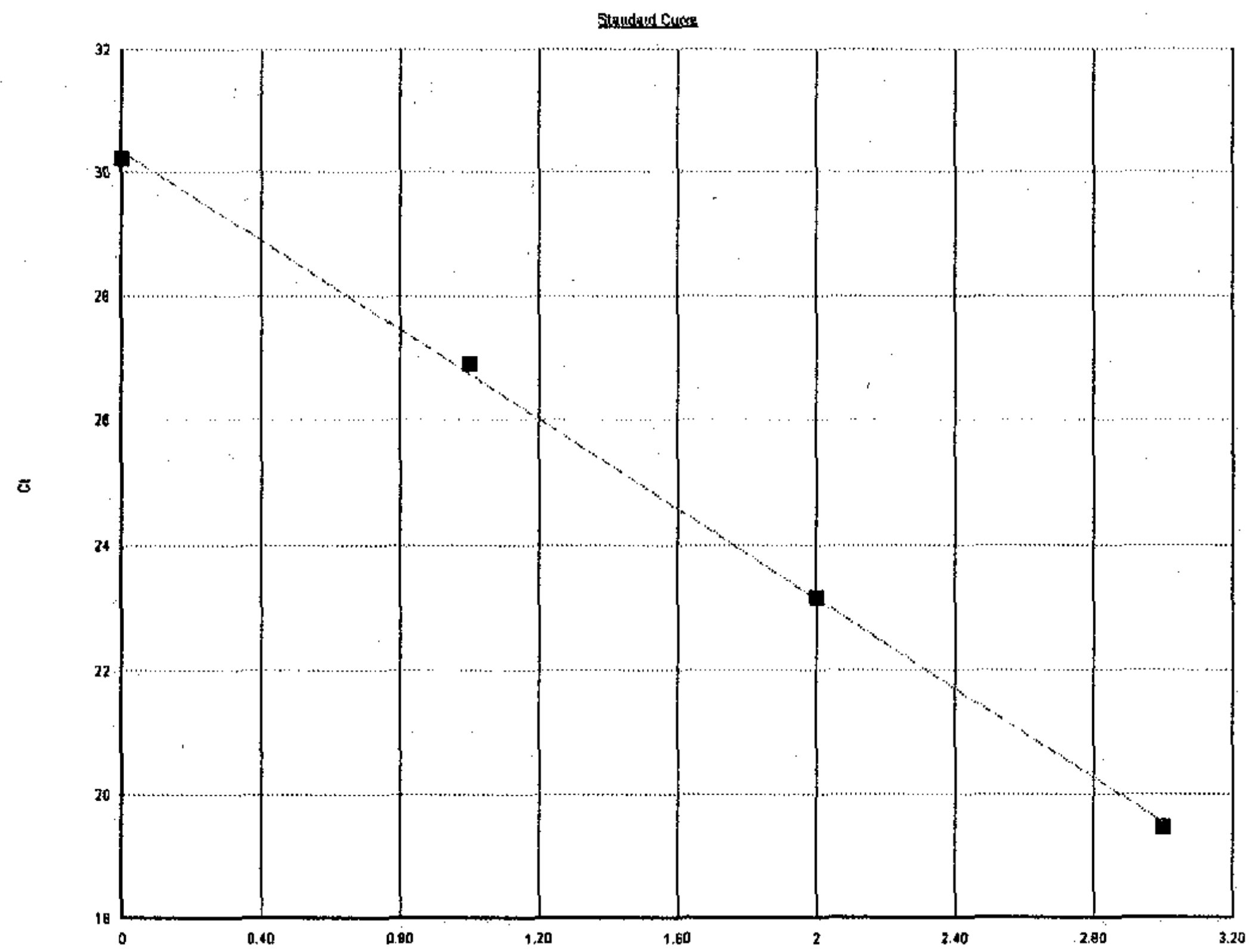


Figure 30. Regression lines between the C_T values and the input concentrations of galectin-1 gene in real time PCR detected by using SYBR Green.

Galectin-1 유전자의 Berkshire와 Yorkshire 종에 대한 성장단계별 유전자 발현량과 110kg 시 Berkshire종의 각 조직별 유전자 발현량을 Real-time PCR 분석으로 확인할 수 있었다. 분석 결과의 그래프는 Figure 31과 같았다.

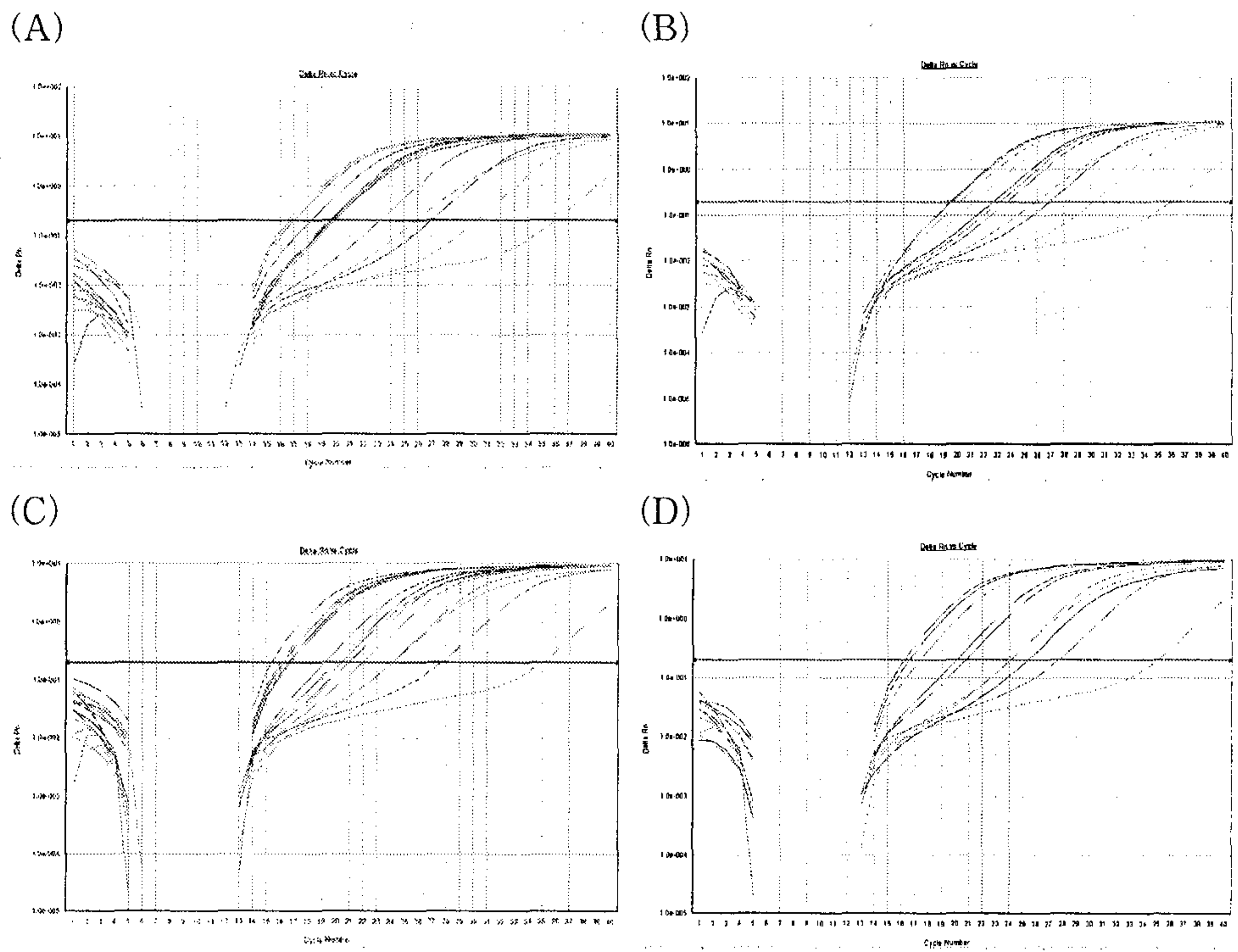


Figure 31. An example of an amplification plot for galectin-1 gene showing (A) growth stages and (B) species of tissues, and housekeeping gene GAPDH (C) species of tissues (D) growth stages on a representative plate in triplicate.

또한 Syber Green을 이용한 Real-time PCR이 제대로 잘 수행되었는지 Figure 32에서 보는 바와 같이 확인하였다. Syber Green을 이용한 PCR에서는 단일 PCR product가 나타나야만 결과를 이용할 수 있는데 Figure 32에서 보면 1개의 peak만이 나타나 본 실험에 이용한 primer가 잘 제작되었음을 확인할 수 있고, Galectin 유전자만 증폭되어 유전자 발현량을 분석할 수 있음을 확인할 수 있었다.

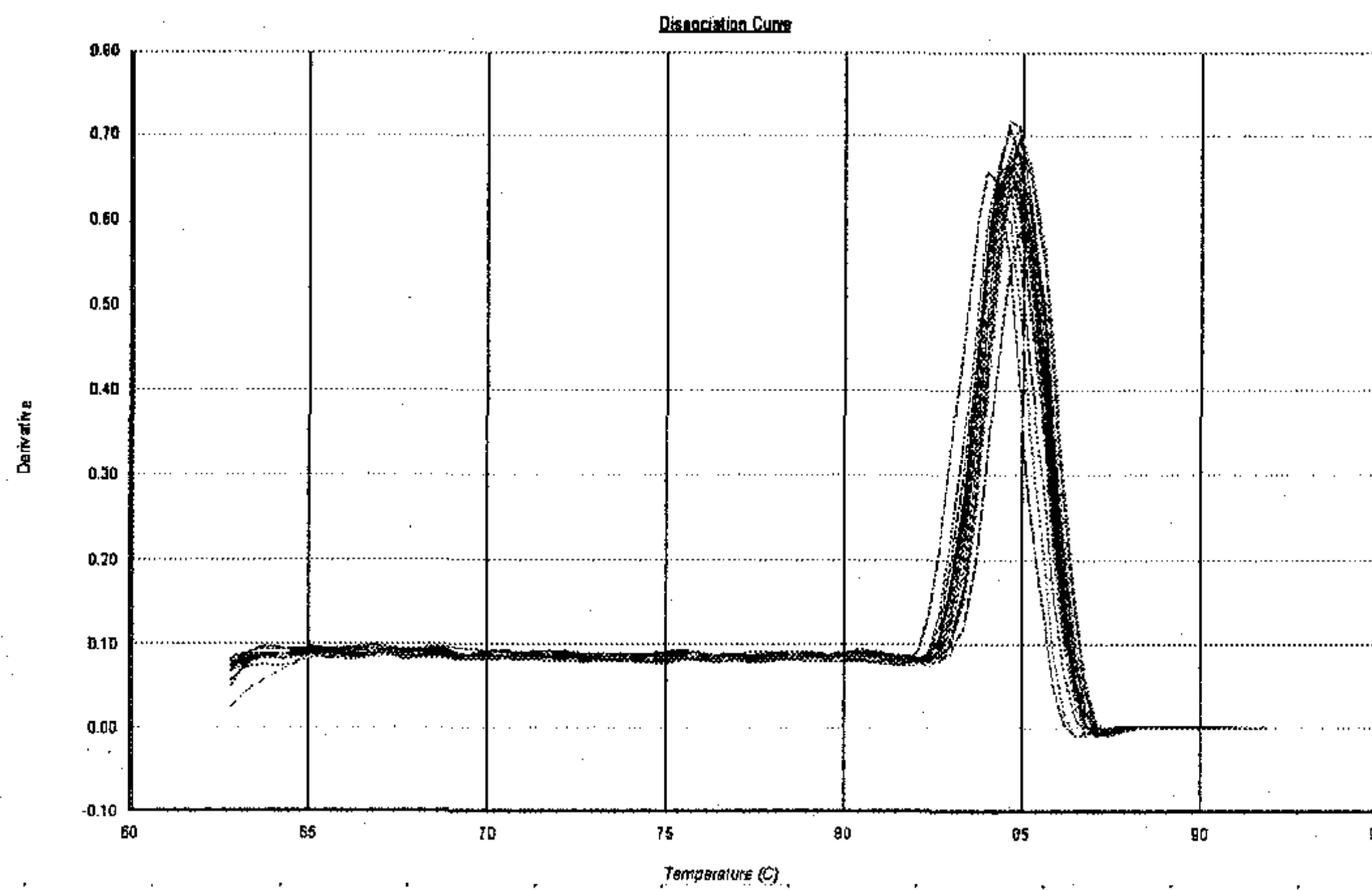
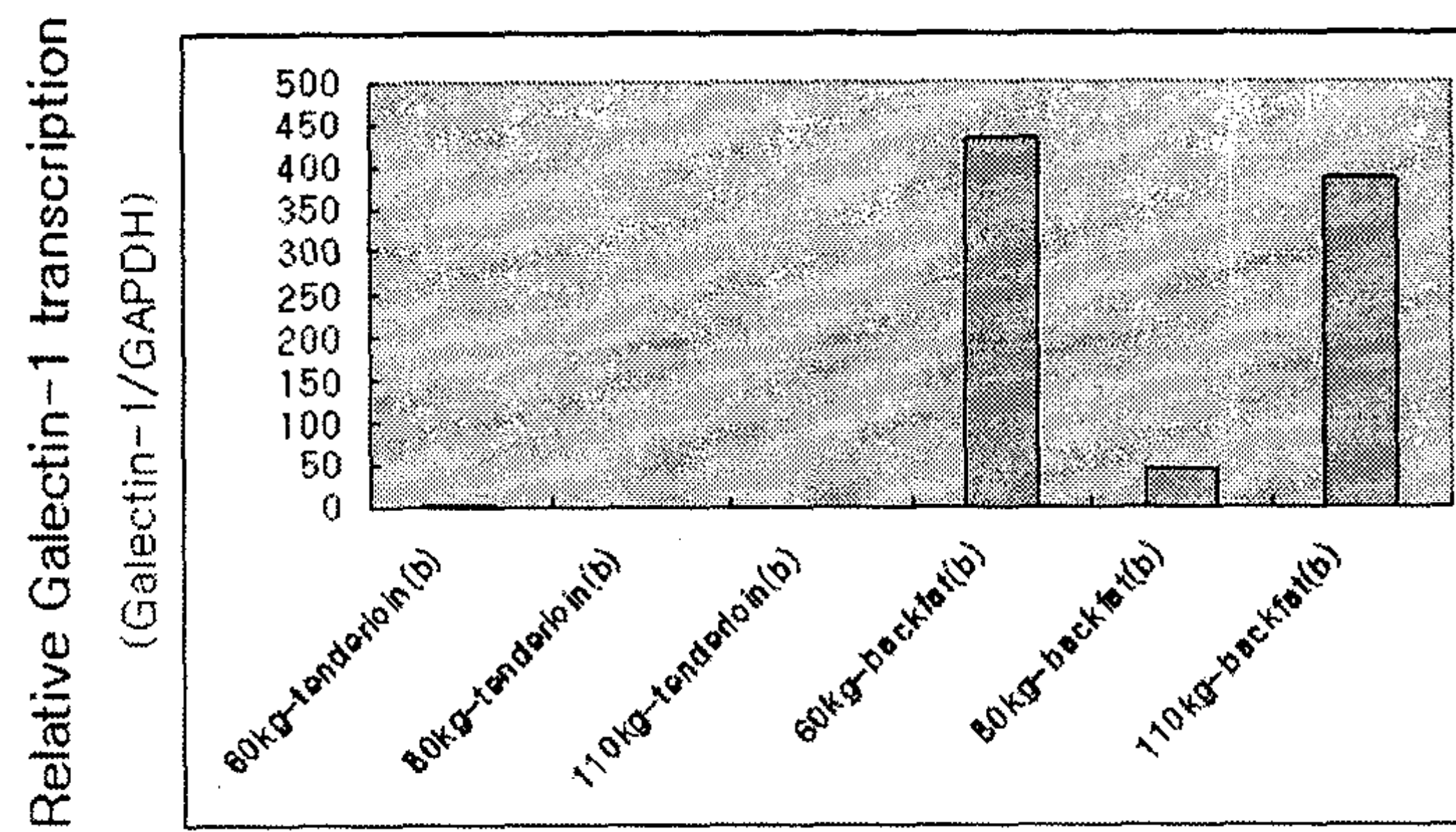


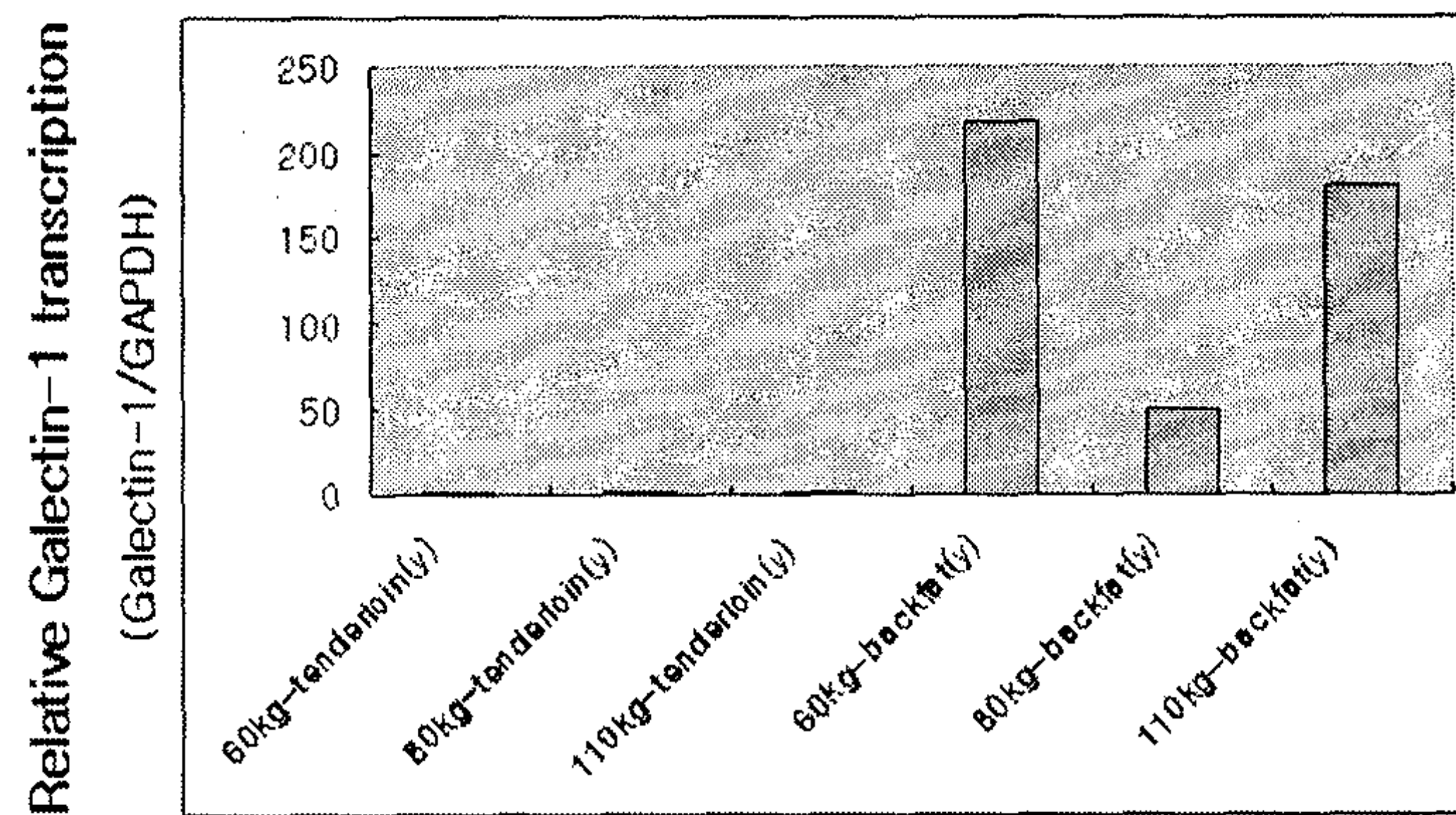
Figure 32. Melting curve analysis of PCR products obtained following 40 cycles of amplification.

이렇게 해서 얻어진 결과물에 대해서 품종별 성장단계에 따른 근육과 지방조직에서의 유전자 발현량을 정량하여 확인하였다. Figure 33는 Yorkshire종에서 근육과 지방조직의 60kg, 80kg, 110kg시의 발현량을 확인한 것인데, 근육에 비해 지방조직에서 높은 발현량을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 다른 품종인 Berkshire에서도 동일하였다. 이러한 결과는 RT-PCR 결과와 동일하였으므로 Galectin-1 유전자는 지방세포에서 많이 발현되어지는 것을 명확하게 확인할 수 있는 결과가 된다. 품종 간 비교에서는 Berkshire종이 Yorkshire종에 비해 다소 높은 발현량을 보였으나 유의적이지는 않았다. 이렇게 얻어진 결과는 육질형질과 관련한 특허를 출원하는 자료로 이용되었다.

(A)



(B)



(C)

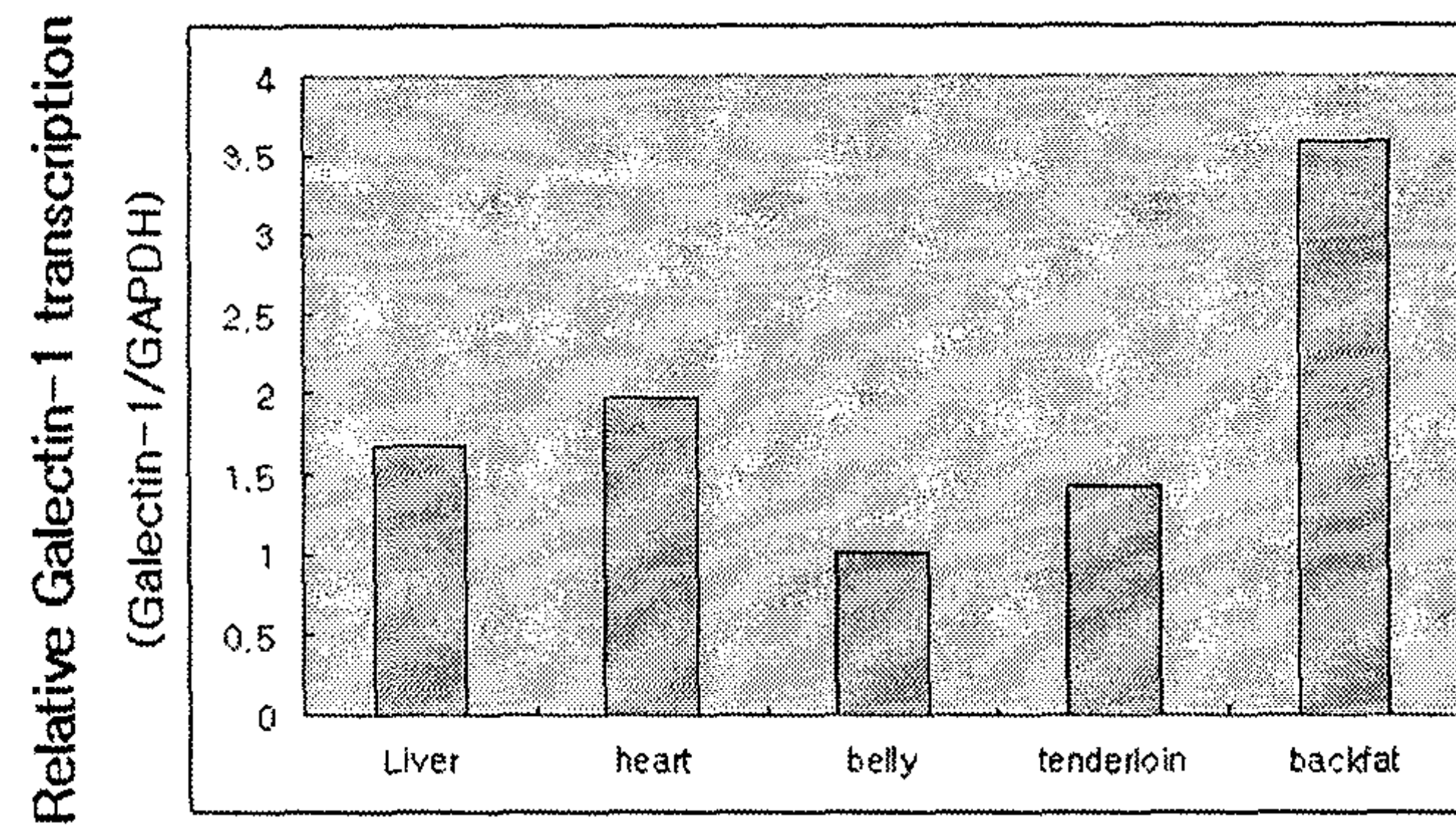


Figure 33. Evaluation by real-time PCR of transcription levels of Galectin-1. Skeletal muscle and Fat tissues at growth stage 60, 80, 110kg of (A) Yorkshire and (B) Berkshire. (C) Species of tissues in 110kg Berkshire.

제 5 절. Candidate gene의 선발 및 RFLP 분석

1. Candidate gene 선발

본 연구에서는 TAIL-PCR 분석과 Fat library 제작으로 돼지의 경제형질 관련 유전자를 확보하고자 하였다. 이와 더불어 또한 이미 돼지의 경제형질과의 관련성이 알려져 있는 candidate gene을 확인하고 이 유전자들의 variation을 확인하여 비교적 간단한 PCR-RFLP 분석으로 돼지의 조기 유전자 진단에 이용할 수 있는 유전자를 선발하여 본 연구에 이용하고자 하였다.

많은 돼지의 candidate gene 중에서 돼지의 성장이나 지방 합성과 관련성이 높은 것으로 알려져 있는 GHRH, H-FABP, 그리고 MYOG 유전자를 선발하였고, 이 유전자의 RFLP genotype을 확인하였다.

2. 실험동물 선발

본 연구에서는 대한양돈협회 제2 종돈능력검정소의 2006년 3월 ~ 2006년 12월까지의 359두(Berkshire 7두, Duroc 112두, Landrace 132두, 그리고 Yorkshire 108두) 검정종돈을 이용하였다. 검정종돈의 형질 조사 내용은 체장, 30 ~ 90kg 도달 시까지의 일당증체량, 등지방 두께와 정육율 (PIGLOG 105, SFK-technology, Denmark), 그리고 사료요구율 측정값이었다. 또한 유전자형과 품종과의 관련성을 확인하고자 성축농장 (산청, 대표: 서상식)의 Berkshire종 25두를 추가로 이용하였다. 이 Berkshire에 대해서는 경제형질을 조사하지 않아 품종에 대한 분석에만 이용되었다.

이들로부터 혈액을 채혈하였고 Wizard genomic DNA purification kit (promega, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

3. 3개 유전자에 대한 PCR-RFLP 분석

돼지의 경제형질과 연관되어 있다고 알려진 GHRH, FABP, 그리고 MYOG 유전자에 대해 다형성을 확인하고 이에 따른 primer를 제작하였다. GHRH 유전자를 위한 primer 염기 서열은 Fw: 5'-GTAAG GATGC CGCTC TGGGT-3' 와 Rev: 5'-TGCCT GCTCA TGATG TCCTG GA-3' (Baskin and Pomp, 1997), H-FABP 유전자를 위한 primer의 염기 서열은 Fw: 5'-ATTGC TTCGG TGTGT TTGAG-3' 와 Rev: 5'-GGCCA TCCCA TAGAA CT-3' (Alfonso and Arena, 2004), 그리고 MYOG 유전자를 위한 primer 염기서열은 Fw: 5'-TCTTG ACCTT GTCAT TGTGG-3' 와 Rev: 5'-CTTCC TCACA CCACC

TTAC-3' (Te pas 등, 1999, Soumillion 등, 1997) 였다.

3개 유전자의 PCR 조건은 동일하게 실시되었다. 반응액은 1X PCR buffer, 100 μ M dNTPs, 0.5 μ M primer pair, 50ng genomic DNA, 그리고 ddH₂O를 혼합하여 25 μ l이었으며, PCR 증폭과정은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 변성 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 과정을 35회 반복하고, 마지막 연장반응을 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 실시하였다 (GeneAmp PCR system 5700/9700, Applied Biosystems, USA).

PCR 결과산물에 대해서 GHRH는 AluI 제한효소로 절단하여 4% agarose gel 전기영동 분석으로 A 타입과 B 타입의 유전자형을 확인하였다. H-FABP는 MspI 제한효소로 절단하여 D 타입과 R 타입의 유전자형, 그리고 MYOG 유전자는 MspI 제한효소로 절단하여 A 타입과 B 타입의 유전자형을 2.5% agarose gel 전기영동으로 각각 확인하였다.

4. 통계분석

3개 유전자 각각에 대해서 유전자형에 따른 품종 및 형질과의 관련성을 확인하기 위해 SPSS 12.0 version을 이용한 통계분석을 실시하였다. 유전자형과 품종의 관련성을 확인하기 위해 교차 분석하였고, 형질과의 관련성을 확인하기 위해 분산분석을 실시한 후 던칸의 다중범위 검증 (Duncan's multiple range test)을 통하여 유의성을 확인하였다.

5. 연구 결과

가. PCR-RFLP 유전자형 분석 결과

GHRH 유전자는 350bp PCR 산물을 AluI 제한효소로 절단하였을 때 250bp와 100bp 밴드가 나타나는 AA 타입과 230bp와 100bp 밴드가 나타나는 BB 타입, 그리고 250, 230, 100bp 밴드가 나타나는 AB 타입으로 구분되어 진다 (Figure 34A). GHRH 유전자는 성장호르몬의 분비를 조절하는 유전자로서 1950년대 초 연구자들의 관심을 끌기 시작하여 1980년대에 구조와 기능을 알게 되었다 (Kim, 1990). 사람과 쥐의 GHRH cDNA를 이용하여 돼지에서 cloning하였고 (Moody 등, 1995), AluI GHRH 다형성을 확인함으로써 성장과의 관련성이 연구되어졌다.

H-FABP 유전자는 PCR 증폭으로 얻어진 412bp 결과물을 MspI 제한효소로 절단하였을 때 DD 타입(322, 90bp), RR 타입(412bp), 그리고 DR 타입(412, 322,

90bp)로 구분되어진다(Figure 34B). 이 유전자는 돼지의 fatness와 관련된 candidate gene으로서 3개 염기 위치에서 다형성이 확인되었는데 upstream 위치의 HinfI 과 intron 2에서 HaeIII와 MspI 이 있었다. 이 중 MspI H-FABP 다형성은 육질에 영향을 미치는 근내 지방함량과 등지방두께에 연관성이 있는 것으로 알려져 본 연구에서도 이를 이용하였다 (Gerbens 등, 1999; Nechtelberger 등, 2001).

MYOG 유전자는 353bp PCR 산물을 MspI 제한효소로 절단하여 AA 타입(353bp), BB 타입(219, 134bp), 그리고 AB타입(353, 219, 134bp)으로 나타난다. 그러나 본 연구에서 이용된 모든 실험동물에서는 품종에 관계없이 모두 BB 타입으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Figure 34C). MYOG 유전자는 MyoD gene family에 속함으로서 성장과 육의 침착과 관련성이 있는 것으로 알려져 있다.

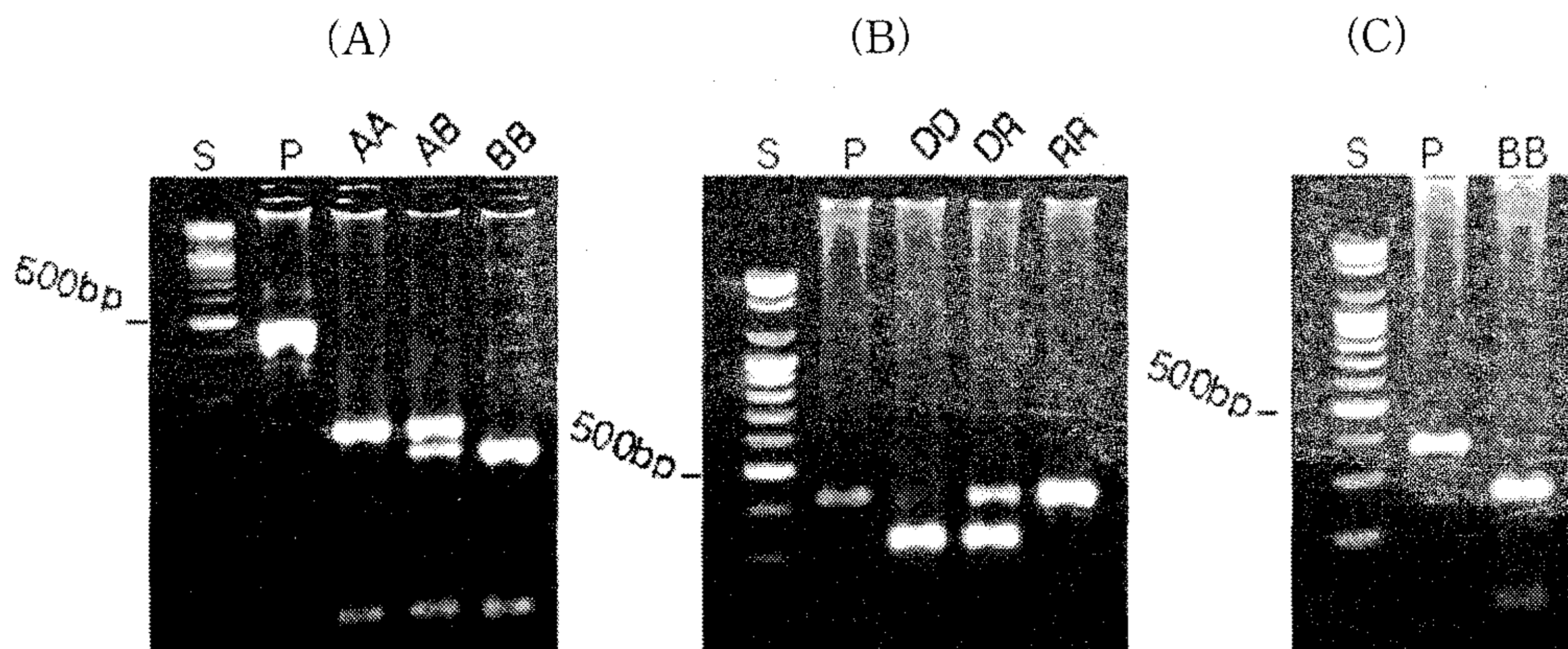


Figure 34. PCR-RFLP analysis image results of (A) GHRH, (B) F-HABP, (C) MYOG. S; 100bp ladder size marker, P; PCR product.

나. 품종과 유전자형의 연관성 분석 결과

본 연구에서 이용한 총 384두의 4품종(Berkshire 32두, Duroc 112두, Landrace 132두, 그리고 Yorkshire 108두)에 대해서 품종과 유전자의 다형성과의 연관성을 확인하기 위해 교차분석을 실시하였다 (Table 12).

품종과 GHRH 유전자의 연관성을 확인해 본 결과, Berkshire와 Yorkshire인 경우는 AB 타입이 나타나는 비율이 높은 반면, Duroc과 Landrace인 경우는

BB 타입인 경우의 비율이 높게 나타나 품종과 GHRH 유전자는 관련성이 있는 것으로 나타났다($\chi^2=34.03$, $p=.000$).

H-FABP 유전자도 유의적으로 품종과 높은 연관성을 가지는 것을 확인할 수 있었다($\chi^2=310.26$, $p=.000$) 품종이 Berkshire, Landrace, 그리고 Yorkshire인 경우는 H-FABP의 유전자형이 DD로 나타나는 비율이 90%이상으로 높은 반면 품종이 Duroc일 때에는 H-FABP 유전자형은 RR인 경우의 비율이 91.07%로 높게 나타났다. 특히 Berkshire 품종은 IMF의 함량이 높고 육질이 우수한 것으로 알려져 있어 H-FABP에서 모든 개체가 DD 타입으로 나타난 것은 큰 의미를 지닌다고 추측된다.

이와 같이 본 연구에서 이용한 GHRH와 H-FABP의 polymorphism은 모두 품종과 관련성이 매우 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 다른 연구에서는 품종에 따른 이 유전자들의 연관성에 대해서는 연구된 결과가 없어 본 연구의 결과와 어떠한 차이가 있는지는 확인할 수 없으나 유전자의 변이가 품종과 관련성이 높다는 것은 매우 중요할 것이다. MYOG 유전자는 기존의 연구에서는 유전자형이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있으나 본 연구에서 이용된 실험동물에서는 모두 동일한 유전자형을 가지는 것으로 나타났다.

Table 12. Analysis of the association between breed and genotype.

Unit: N(%)

Gene	Genotype	N	Breed				X ² (p)
			BB	DD	LL	YY	
GHRH	AA	38(9.90)	4(12.50)	7(6.25)	11(8.33)	16(14.81)	34.03** .000
	AB	150(39.06)	16(50.00)	47(41.96)	31(23.48)	56(51.85)	
	BB	196(51.04)	12(37.50)	58(51.79)	90(68.18)	36(33.33)	
H-FABP	DD	262(68.23)	32(100.00)	7(6.25)	124(93.94)	99(91.67)	310.26** .000
	DR	13(3.39)	-	3(2.68)	6(4.55)	4(3.70)	
	RR	109(28.39)	-	102(91.07)	2(1.52)	5(4.63)	
Total		384(100.00)	32(8.33)	112(29.17)	132(34.38)	108(28.13)	

** : p < 0.01

다. 형질과 유전자형의 연관성 분석 결과

유전자의 유전자형과 359두 종돈에 대해 조사된 경제형질 (체장, 일당증체량, 사료요구율, 등지방두께, 정육율)과의 연관성을 확인해 보았다 (Table 13).

그 결과, GHRH 유전자는 정육율 (MP)에 대해서 유전자형과 밀접한 관련성이 있는 것을 확인할 수 있었는데, AA 타입인 경우(M=58.46)가 BB 타입인 경우(M=57.25)보다 정육율이 1.23%정도 더 높게 나타났다(p<0.05). 그러나 다른 경제형질에 대해서는 모두 유의성이 없는 것으로 나타났다. GHRH 유전자는 등지방두께와 일당증체량에 관련성이 있는 것으로 보고 된 바 있었으나(Mauricio et al, 2005) 우리의 연구에서는 그러한 결과를 얻지 못하였다. 그러나 정육율은 일당증체량과 높은 연관성이 있으므로 이에 따른 연관성을 추정할 수 있을 것이라 본다.

H-FABP 유전자는 MspI RFLP 다형성과 형질과의 연관성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 특히 일당증체량 (ADG), 사료요구율 (FC), 그리고 등지방두께 (BFT)는 각각 매우 높은 연관성이 있는 것으로 나타났고 (p<0.01), 정육율 (MP)의 경우에도 연관성이 있는 것을 확인할 수 있었다 (p<0.05). 즉,

H-FABP가 RR 타입인 경우 (M=1140.93)는 DR타입인 경우(M=1043.54)와 DD타입인 경우 (M=1001.45)보다 일당증체량이 유의하게 높게 나타났고(F=72.79**), 사료요구율에 있어서는 H-FABP가 DD인 경우 (M=2.41)와 DR인 경우 (M=2.35)가 RR인 경우 (M=2.22)보다 더 높게 나타났으며(F=53.57**), 등지방두께는 H-FABP가 DR타입인 경우가 (M=1.48) RR타입인 경우 (M=1.36)보다 유의적으로 더 높게 나타났다 (F=5.50**). H-FABP 유전자는 근내 지방함량과 관련성이 높은 것으로 알려져 있는데 본 연구에서는 IMF를 측정하지 못해 이에 대한 연관성을 확인할 수 없었다. 그러나 등지방두께에서는 기존의 결과와 동일한 결과를 얻을 수 있었고 (Gerbens et al., 1999; Nechtelberger et al., 1991), 일당 증체량, 정육율, 사료요구율과도 관련성이 높은 것으로서 이 유전자의 다양성은 돼지의 경제형질에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

MYOG 유전자는 이 연구에서 이용한 실험동물에 대해서는 모두 동일한 BB 유전자형으로 나타나 MspI 위치의 해서 확인할 수 없었다다다형성이 경제형질에 미치는 영향에 대. 그러나 MYOG BB 유전자형은 생시 체중뿐만 아니라 등지방두께에 대한 영향이 없이 성장률과 살코기량 (lean weight)을 증가시키는데 연관된 것으로 밝혀진 바 있으나 이 유전자형의 출현율이 매우 낮아 myogenin-marker-assisted selection에 의해 형질을 향상시켜야 한다고 제안한 바 있다 (Te pas 등, 1999).

Table 13. Analysis of the association between genotype and traits.

Gene	Genotype	N	BL	ADG	FC	BFT	MP
			M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
GHRH	AA	34	106.03±.30	1026.41±118.44	2.37±.19	1.39±.18	58.46±1.75 ^A
	AB	138	105.97±.48	1056.73±120.82	2.33±.17	1.39±.19	57.82±2.58 ^{AB}
	BB	187	106.04±.67	1040.34±116.10	2.36±.18	1.43±.22	57.25±3.07 ^B
	F-value		.63	1.25	1.29	1.86	3.53 [*]
H-FABP	DD	237	106.00±.65	1001.45±95.40 ^B	2.41±.14 ^A	1.44±.22 ^{AB}	57.40±2.98 ^{AB}
	DR	13	105.77±.44	1043.54±131.85 ^B	2.35±.18 ^A	1.48±.21 ^A	56.61±2.24 ^B
	RR	109	106.08±.39	1140.93±105.22 ^A	2.22±.18 ^B	1.36±.15 ^B	58.11±2.38 ^A
	F-value		2.07	72.79 ^{**}	53.57 ^{**}	5.50 ^{**}	3.25 [*]
Total		359	106.01±.58	1045.32±118.24	2.35±.18	1.41±.21	57.59±2.80

Different letters in the same column indicate a significant difference for each genotype

* p<0.05, ** p<0.01

라. 품종별 유전자형과 형질과의 연관성 분석 결과

유전자형에 따른 형질과의 관련성을 확인해 본 결과 (Table 13), 높은 유의성을 확인할 수 있었다. 그러나 품종에 의한 영향이 있을 것으로 보아 품종에 의한 효과를 없애기 위해 각 품종별 유전자형과 형질과의 관련성을 분석해 보았다 (Table 14).

품종이 Duroc인 경우 GHRH에 따른 정육율의 값은 유의적으로 매우 높은 차이를 보였다(p<0.01). 즉 GHRH가 AA인 경우 (M=59.73)가 BB인 경우 (M=57.52)보다 정육율이 유의하게 높게 나타났다.(F=4.96^{**}). 품종이 Landrace인 경우 GHRH에 따른 사료요구율의 값은 유의한 차이를 보였다 (p<0.05). 즉 GHRH가 AA인 경우 (M=2.52)가 AB인 경우 (M=2.43)와 BB인 경우 (M=2.42)보다 사료요구율이 유의하게 높게 나타났다 (F=3.10^{*}).

품종이 Yorkshire인 경우 H-FABP에 따른 일당증체량의 값은 유의한 차이를 보였다(p<0.05). 즉 H-FABP가 DD인 경우 (M=1015.96)와 DR인 경우

(M=1063.75)가 RR인 경우 (M=902.40)보다 일당증체량이 유의적으로 높게 나타났다 (F=3.70*).

이 분석 결과를 보면 (Table 14), 품종에 의한 유전자형의 형태와 그 형태에 따른 형질에의 영향을 더욱 쉽게 확인해 볼 수 있다. Berkshire는 이용한 분석두수가 매우 작아 신뢰성 있는 결과로 인정하기 어려운 점이 있으나 GHRH 유전자에서는 AA 타입이 나타나지 않고, H-FABP 유전자에서는 DD 타입만이 존재하는 것을 확인할 수 있어 품종에 따른 유전자형의 변이를 알 수 있다. 그러나 형질에 대한 연관성은 유의적인 결과를 얻을 수 없었다. Duroc의 경우에는 GHRH 유전자에서 정육율에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있는데 다른 품종에서는 정육율에 대하여 유의적인 차이를 볼 수 없었던 점으로 보아 GHRH 유전자의 전체 정육율에 대한 연관성은 Duroc 품종에 의한 영향인 것으로 확인할 수 있다. Landrace의 경우에는 GHRH 유전자에서 사료요구율과 유의적인 관련성이 있게 나타났다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 전체 돼지에서는 유의성이 없는 것으로 나타나 이 품종에서만 나타나는 현상임을 알 수 있다. 사료요구율은 특히 일당증체량과 높은 연관성을 가지므로 유의적이지는 않았으나 일당증체량과의 관련성도 있을 것으로 예측되어진다.

F-HABP 유전자는 Yorkshire 품종에서 일당증체량과 높은 연관성이 있는 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). F-HABP 유전자는 전체적으로 경제형질과 관련성이 높았는데 품종별로 구분한 결과에서는 이 결과에서만 유의적인 결과를 얻을 수 있었다.

Table 14. Results of Analyzing the Association between genotypes divided into breed and traits.

Breed	Gene	Genotype	N	BL	ADG	FC	BFT	MP
				M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
BB	GHRH	AA	0	-	-	-	-	-
		AB	4	105.50±.58	969.25±61.50	2.59±.11	1.27±.07	57.65±4.30
		BB	3	105.67±.58	968.67±71.36	2.59±.11	1.26±.09	57.90±3.41
		F-value		.14	.00	.00	.03	.01
	H-FABP	DD	7	105.57±.53	969.00±59.91	2.59±.10	1.26±.07	57.76±3.63
		DR	0	-	-	-	-	-
		RR	0	-	-	-	-	-
		F-value		-	-	-	-	-
	Total		7	105.57±.53	969.00±59.91	2.59±.10	1.26±.07	57.76±3.63
	DD	GHRH	AA	7	106.14±.38	1163.14±76.01	2.18±.17	1.28±.09
AB			47	106.13±.45	1162.64±79.67	2.18±.13	1.33±.13	58.66±2.16 ^{AB}
BB			58	106.05±.29	1149.52±99.73	2.22±.19	1.38±.16	57.52±2.45 ^B
F-value				.62	.30	.99	2.51	4.96 ^{**}
H-FABP		DD	7	106.00±.00	1149.29±84.65	2.19±.16	1.29±.12	58.27±3.01
		DR	3	106.00±.00	1182.67±67.09	2.11±.06	1.37±.08	57.17±1.96
		RR	102	106.10±.39	1155.54±91.41	2.20±.17	1.35±.15	58.16±2.36
		F-value		.32	.15	.50	.60	.26
Total			112	106.09±.37	1155.88±89.96	2.20±.17	1.35±.14	58.14±2.38
LL		GHRH	AA	11	105.91±.30	938.18±38.26	2.52±.06 ^A	1.58±.07
	AB		31	105.81±.60	988.58±96.27	2.43±.15 ^B	1.51±.22	57.03±2.55
	BB		90	106.08±.91	985.73±83.59	2.42±.13 ^B	1.49±.25	56.48±3.37
	F-value			1.34	1.67	3.10 [*]	.59	2.31
	H-FABP	DD	124	106.02±.83	983.35±85.12	2.43±.14	1.50±.24	56.76±3.13
		DR	6	105.50±.55	960.50±93.44	2.43±.14	1.52±.31	56.67±2.88
		RR	2	106.00±.00	992.00±11.31	2.41±.04	1.51±.04	58.05±.35
		F-value		1.17	.22	.02	.02	.17
	Total		132	106.00±.82	982.44±84.63	2.43±.13	1.50±.24	56.78±3.09
	YY	GHRH	AA	16	106.06±.25	1027.25±114.64	2.34±.18	1.30±.16
AB			56	105.96±.38	1011.82±104.77	2.38±.11	1.40±.19	57.57±2.66
BB			36	105.97±.29	1006.92±91.48	2.41±.12	1.39±.21	58.69±2.61
F-value				.55	.22	1.36	1.58	2.10
H-FABP		DD	99	105.99±.33	1015.96±99.50 ^A	2.38±.13	1.37±.19	58.11±2.57
		DR	4	106.00±.00	1063.75±135.25 ^A	2.40±.16	1.50±.09	56.10±1.74
		RR	5	105.80±.45	902.40±15.95 ^B	2.48±.11	1.44±.26	57.14±3.32
		F-value		.77	3.70 [*]	1.58	1.02	1.45
Total			108	105.98±.33	1012.47±101.32	2.38±.13	1.38±.19	57.99±2.59

Different letters in the same column indicate a significant difference for each genotype * p<0.05, ** p<0.01

본 연구에서는 돼지의 경제형질에 영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있는 GHRH, H-FABP, 그리고 MYOG 유전자를 이용하여 실제로 분석하여 연관성을 확인해 보고자 하였다. 다른 연구에서와 이용한 실험동물의 차이로 다른 결과를 얻기도 하였으나 경제형질과의 연관성이 높은 결과를 보였다. 반면 MYOG 유전자는 다양성이 없는 것을 확인하여 더욱 많은 실험동물이 요구되어지는 것과 실험동물의 차이가 큰 것도 알 수 있었다.

본 연구를 통해 분석한 3개의 candidate gene에 대해서 359두 능력검정 종돈에 대한 경제형질과의 연관성을 확인한 결과 GHRH와 H-FABP 2개의 유전자에 대해서 경제형질과의 연관성이 확인되었고, 이 유전자를 이용한 진단 기법을 개발하여 특허화 하여 돼지의 선발에 이용할 수 있도록 하였다.

제 6 절. 선발 유전자를 이용한 종돈의 조기진단기법 개발 및 특허화

1. 경제형질 연관 유전자를 이용한 돼지 육질 조기 진단 기법 개발

가. 산청 버크셔의 Galectin-1 유전자의 변이

산청 버크셔의 지방 조직으로부터 확보한 많은 클론들 중 galectin-1과 관련된 두 클론을 확보하였으며, 클론 하나는 galectin-1의 전체 CDS 부분을 포함하는 돼지의 galectin-1 (AY604429)와 매우 유사한 형태로 나타났으며, 다른 클론은 돼지의 galcetin-1 (DQ367937)의 genomic DNA의 nucleotide sequence와 매우 유사하게 나타났다 (Figure 34). 유전자 서열 비교 분석결과 그림34와 같았다. 우리의 클론과 기존 돼지의 결과에서 보면 검은색의 네모 박스의 유전자 서열은 동일한 부분을 나타내며, 앞쪽의 47개의 서열이 특이한 부분으로 나타났고 뒤쪽 30개의 서열이 더 확인되었다. 또한 그 중 빨간 네모 박스 두 군데에서 galectin-1의 유전자의 변이가 있는 것을 확인하였다.



Figure 34. Alignment of obtained galectin-1(berkshire) and galectin-1(Pig: DQ367937) of nucleotide sequence.

나. Galectin-1 유전자의 PCR-RFLP 다형성 분석 기법

유전자의 내부에서 2개의 서열에 변이가 확인되어 galectin-1 유전자의 다형성 분석을 수행하였다. 첫 번째 사이트는 산청 버크셔에서는 G를 나타내었으나 기존의 돼지에서는 A로 나타났다. 이 사이트는 제한 효소 EcoO109 I에 의해 다형성이 나타난다. 하지만 내부에 또 다른 제한 효소 절단 부위가 존재하기 때문에 실험에 사용하기가 불가 하였으며, 뒤쪽의 사이트는 산청 버크셔에서는 A를

나타내었으나 기존의 돼지에서는 G로 나타났으며, 이곳의 위치를 다형성 RFLP-PCR 실험에 이용하였다. PCR 증폭은 아래의 primer쌍을 이용하였으며, 제한효소는 Rsa I 을 이용하였다.

Galectin-1 유전자를 위한 primer 염기서열은 다음과 같았다.

Forward : 5'-TGTATCCCCAGCAAGCGTCAC-3'

Reverse : 5'-CAGCAAAGGCAATGCCTTTATTG-3'

PCR을 수행한 후 PCR product를 Rsa I 제한효소로 절단하여 유전자형 결과를 2.5% agarose gel 전기영동으로 확인하고 통계 분석하였다.

Galectin-1 유전자는 PCR 증폭으로 얻어진 380 bp 결과물을 Rsa I 제한효소로 절단하였을 때 AA 타입(380bp), AB 타입(250bp), BB 타입(380, 250, 280bp)으로 구분되어진다(Figure 35).

Galectin-1 유전자는 1986년에 사람의 간암 cDNA에서 처음 발견되었다 (Gitt, 1986). 사람의 galectin-1 cDNA를 이용하여 돼지에서 처음 cloning하였고 (Marcon 등, 2005), RsaI galectin-1의 다형성은 우리의 연구에서 처음 확인하였다. 우리의 연구에서 처음으로 지방의 대사과정과 관련성이 연구되어졌다. 이 유전자는 돼지의 지방형성과 관련이 있으며, 다형성 분석은 육질에 영향을 미치는 근내 지방함량과 등지방두께에 연관성이 있는 것으로 보였다.

유전자의 유전자형과 250두 종돈에 대해 조사된 경제형질 (일당증체량, 사료요구율, 등지방두께, 정육율)과의 각 형질에 따른 효율의 높고 낮은 그룹에 대한 연관성을 확인해 보았다.

그 결과, Galectin-1 유전자는 BB 타입일 경우 등지방두께가 얇고, 일당증체량이 낮은 경우 대해 유의성을 나타내었다. 그러나 정육율 (MP)과 사료 요구율에서는 별다른 차이 없었다. 즉 BB타입을 선발할 경우 등지방 두께가 얇고 지방의 형성이 우수한 돼지를 선발할 수 있을 것이다.

M AA AB BB

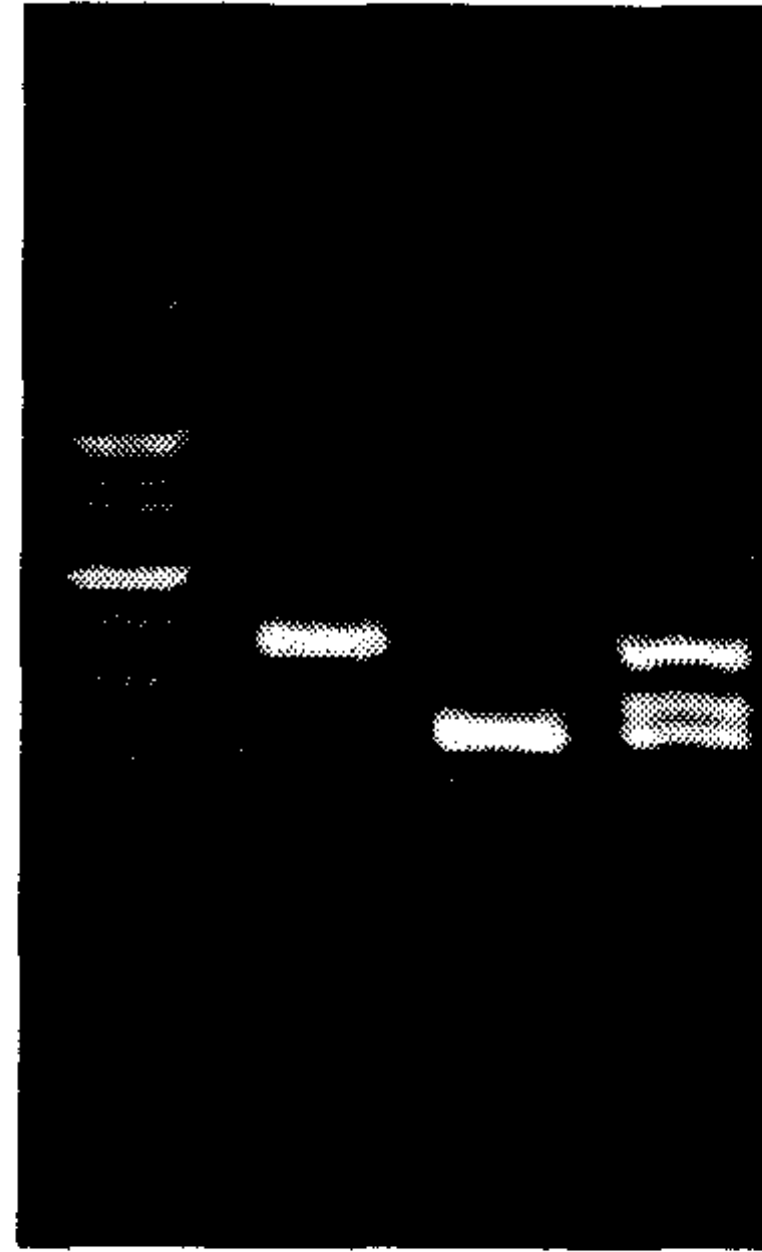


Figure 35. Gene test of Galectin-1 Genotype by PCR RFLP.

M; 100bp ladder size marker.

다. Galectin-1 유전자의 발현량을 통한 우수한 육질의 확인

Galectin-1의 CDS 부분을 포함하는 클론을 이용한 RT-PCR, real time PCR의 결과 근육과 지방조직에서 많은 발현의 차이를 나타내며, 성장단계에 따른 발현의 차이는 크게 없었다. 또한 다양한 조직 간의 실험에서도 지방조직에서 높은 발현을 나타낸다. 또한 요크셔종에서 보다 육질이 우수한 가고시마 버크셔의 계통인 산청 버크셔종에서 더 높은 발현을 나타낸다. 뿐만 아니라 단백질의 연구결과에서도 지방 조직에서 더 높은 발현을 나타내었다. 결과적으로 galectin-1의 발현이 높은 것이 좋은 육질을 나타낼 것이라는 것을 반증한다. 이를 이용하여 galectin-1의 발현량을 확인함으로써 해서 육질이 우수한 종돈을 조기 선발하는데 이용할 수 있을 것이다.

최종적으로 본 연구에서는 galectin-1 유전자를 이용한 조기 진단 기법은 현재 특허를 출원하였고(출원번호 10-2007-0050352), 육질이 우수한 종돈을 조기 선발하는데 이용할 것이다.

2. Candidate gene의 유전자 다형성을 이용한 종돈의 조기 진단 기법 개발

본 연구에서는 돼지의 일당증체량, 등지방두께, 사료요구율, 정육율 등과 관련된 유전자를 찾기 위해 이와 연관성이 높은 것으로 확인된 microsatellite marker를 이용하여 marker 주변의 유전자를 screening하였다. 이와 더불어 경제

형질과 관련성이 높은 것으로 알려져 있는 candidate gene을 선발하여 더욱 효과적인 우수 종돈 조기진단 기법을 개발하고자 하였다. 그래서 돼지에 있어서 3개의 candidate gene (GHRH, H-FABP, 그리고 MYOG)을 선발하였고, 이 유전자들에서 잘 알려져 있는 polymorphism을 이용한 genotype 분석을 실시하였다. 그 결과 GHRH와 H-FABP 유전자에 대해서 경제형질과의 연관성을 확인할 수 있었고 이 두개의 유전자를 이용한 유전자 진단 기법을 개발하여 양돈 산업에 적용하고자 하였다. 본 연구에서 개발한 2개 유전자의 진단 기법은 현재 특허를 출원하였고(출원번호 10-2007-0050318), 그 출원된 내용은 다음과 같다.

가. GHRH를 이용한 유전자 진단 기법

돼지의 GHRH 유전자의 AluI RFLP 다형성을 진단하기 위해 이 유전자의 AA, AB, BB 타입을 한번의 PCR 분석으로 진단할 수 있는 primer를 제작하여 AS (allele specific)-PCR 분석법을 개발하였다. 유전적 다형성 부위가 있는 곳에 특이적인 결합을 하는 primer를 제작하여 PCR 분석을 통해 바로 GHRH 유전자형을 바로 확인할 수 있는 유전자 진단 기법을 개발하였고, 이 내용에 대해서 특허를 출원하였다. PCR 결과물은 2.5% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다(Figure 36). 이 유전자를 통해 돼지의 정육율을 조기에 진단할 수 있을 것이다. AA 타입의 경우 정육율이 BB에 비해 1.2%정도 우수하므로 높은 정육율을 생산하는 돼지를 선발하기 위해서는 GHRH-AA타입인지를 확인하여 육종하면 될 것이다.

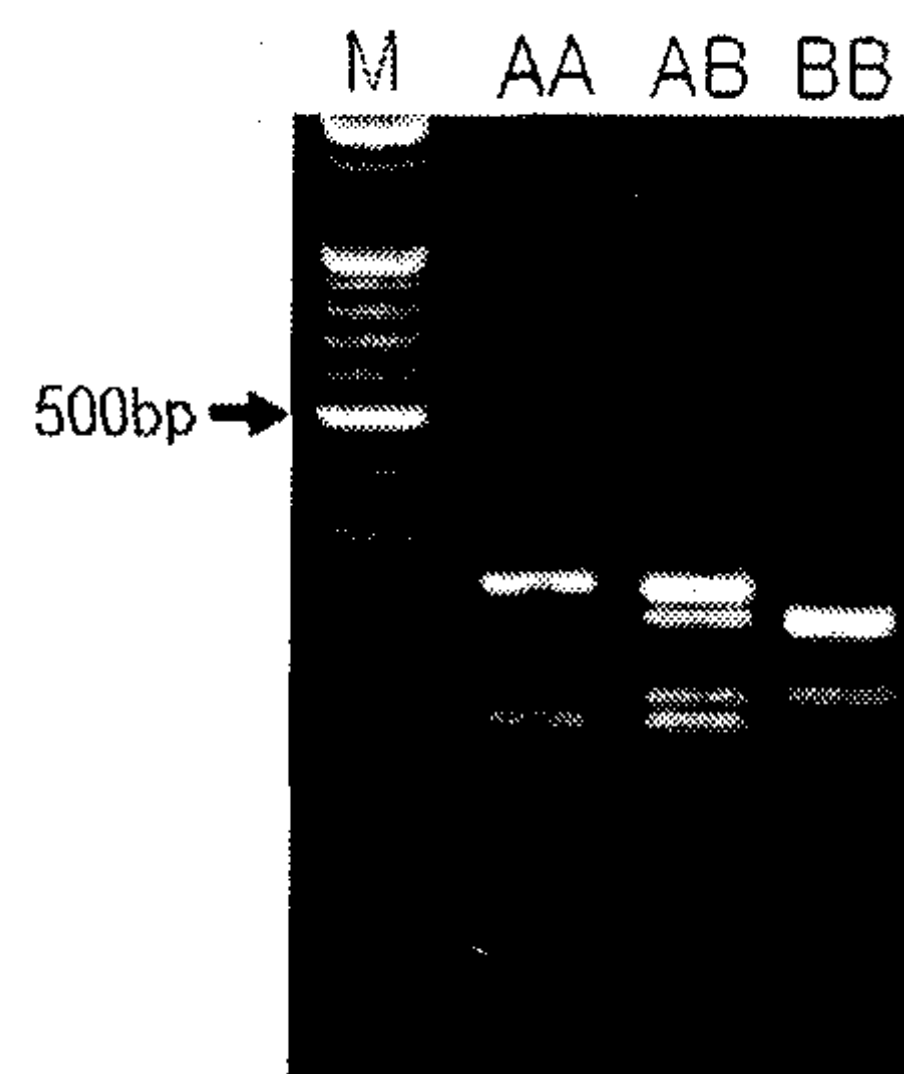


Figure 36. Gene test of GHRH Genotype by AS-PCR.

나. H-FABP를 이용한 유전자 진단 기법

돼지의 H-FABP 유전자의 MspI RFLP 다형성을 진단하기 위해 이 유전자의 DD, DR, RR 타입을 한번의 PCR 분석으로 진단할 수 있는 primer를 제작하여 AS (allele specific)-PCR 분석법을 개발하였다. 유전적 다형성 부위가 있는 곳에 특이적인 결합을 하는 primer를 제작하여 PCR 분석을 통해 바로 GHRH 유전자형을 바로 확인할 수 있는 유전자 진단 기법을 개발하였고, 이 내용에 대해서 특허를 출원하였다. PCR 결과물은 3.0% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다 (Figure 37). 이 유전자는 DD 타입보다는 RR 타입을 가지는 경우 증체량과 사료효율이 우수하고, 등지방두께가 얇고 정육율이 높아 유전자형 분석을 통해 일당증체량, 등지방두께, 정육율이 우수한 종돈을 조기에 진단할 수 있을 것이다. 또한 품종에 따라서도 다른 유전자형을 확인할 수 있어 품종식별에도 이용이 가능할 것이라 본다. Berkshire종은 DD 타입만 출현하였고, Landrace와 Yorkshire는 DD 타입의 출현율이 90% 이상으로 높았으며, Duroc은 오히려 RR 타입이 91%로 매우 높게 출현하는 것을 알 수 있었다.

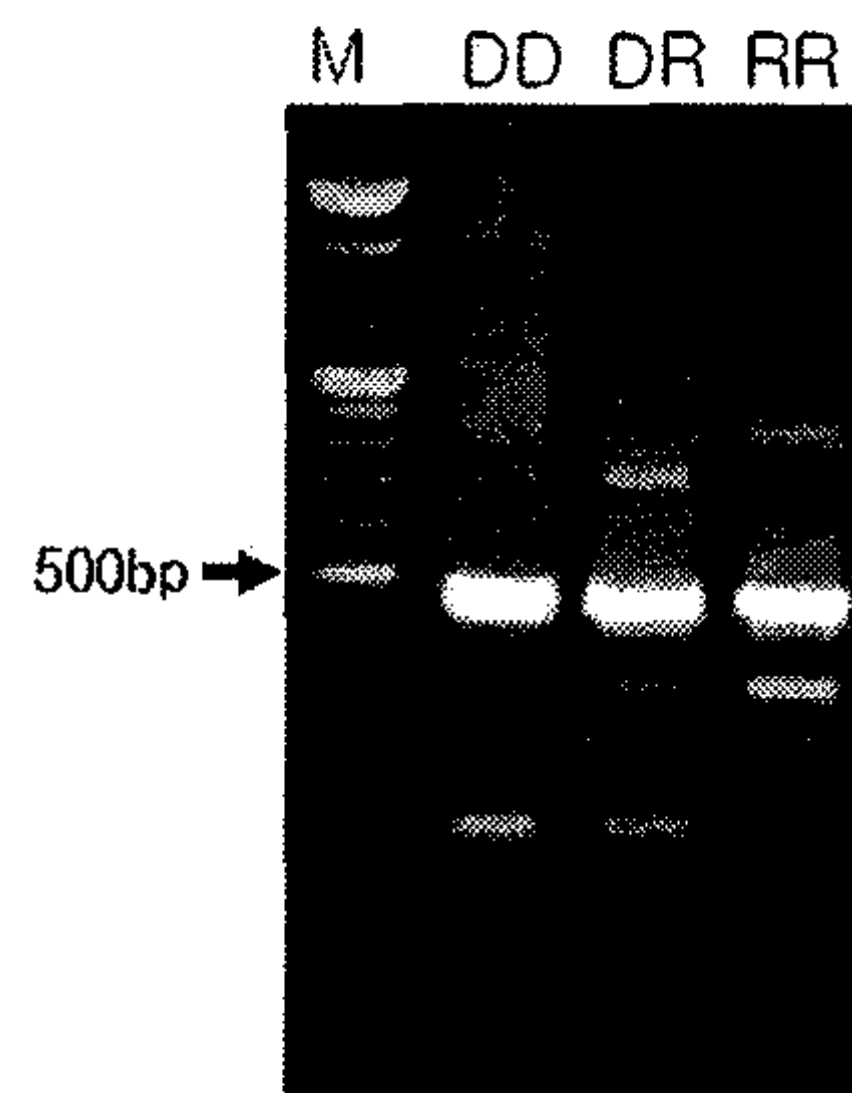


Figure 37. Gene test of H-FABP Genotype by AS-PCR.

다. 2개 유전자의 ONE-TEST Kit

AluI GHRH 분석에서 AA 타입이면서 MspI H-FABP 분석에서 RR 타입을 가지는 개체를 선발하기 위해 한번의 PCR 분석으로 2개의 유전자를 진단할 수 있다. 아직 이 PCR 분석에 대해서 조건을 확립하지 못하였으나 계속 연구를 수행하여 한번의 분석으로 성장이 뛰어나고 정육율이 높으며 등지방두께가 비교적 얇은 돼지를 선발할 수 있게 될 것이다.

3. 확보된 Clone을 이용한 경제형질 진단 방법 개발

TAIL-PCR과 Fat library 분석을 통해 돼지의 경제형질과 관련성이 있을 것으로 추정되어지는 유전자 8개를 확보할 수 있었다. 각 경제형질과 관련된 유전자에 대한 정보는 차후에 보고할 것이다. 자세한 내용은 자료 유출을 피하기 위해 여기에서 나타내지 않을 것이다.

이렇게 확보된 유전자를 이용한 돼지의 경제형질 우수 돼지의 조기 선발이 가능한 분석 방법의 대략적인 내용은 다음과 같이 진행되어질 예정에 있다.

가. 성장 진단 기법

유전자 1은 성장이 더욱 잘 될수록 높은 발현량을 나타내고, 유전자 2는 성장이 높을수록 더욱 높은 발현량을 확인할 수 있어 돼지의 조기에 발현되어지는 유전자 발현량으로서 돼지의 성장을 진단할 수 있을 것이다. 정확한 발현량에 대해서는 아직 규정할 수는 없었지만 정량에 대해서 앞으로 연구를 더 연장하여 진행한다면 명확하게 규명할 수 있으리라 생각되어진다.

나. 지방 합성 진단 기법

유전자는 지방조직에서 높은 발현량을 나타내었다. 이러한 결과가 등지방두께 등과 같은 형질에 어떠한 영향을 미치는 지 아직까지는 확인되어지지 않았으나 지방의 함량에 이 유전자들이 연관되어 있었으므로 지방의 침착과 관련된 진단에 응용할 수 있을 것이라 본다.

다. 품종 진단 기법

유전자는 품종에 따른 유전자 발현양상의 특이성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 돼지의 품종을 진단하는 기법을 개발할 수 있을 것이다. 또한 유전자는 품종별 유전적 다양성이 있는 것을 확인할 수 있었으므로 이를 이용하여 품종을 식별하는데 이용할 수 있을 것이라 생각된다.

이와 같이 본 연구를 통해 얻어진 경제형질 관련 후보 유전자를 통해 앞으로 계속적으로 연장하여 유전자 기능 분석을 수행한다면 더욱 효과적인 경제형질 진단 marker로의 개발이 가능할 것이라 본다. 아직까지 이러한 결과를 양돈농가에 직접 적용하는 것은 어려우나 본 연구를 통해 얻어진 성과로부터 앞으로 양돈 산업에 활용방안을 마련하는 좋은 자료가 될 것이라 판단한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표달성도

전 세계적으로 경제형질과의 연관성을 확인하고 경제형질에 영향을 미치는 유전적 요인을 분석할 수 있는 DNA marker는 많은 연구가들에 의해 양돈농가에 보급하고자 많은 노력을 하고 있다. 그러나 DNA marker는 기능을 하는 유전자가 아니고 짧은 서열의 반복을 나타내는 형질 특이적인 유전자 서열이다. 이 유전자 서열은 기능을 나타내는 것이 아니므로 marker 주위의 기능을 나타내는 유전자를 찾으려 시도 하였다.

우선 확보되어져 있던 경제형질 연관 DNA marker들을 이용하여 marker 주위의 다양한 유전자들을 21개 확보 하였으며, 기능이 밝혀지지 않은 2개의 유전자들까지 추가로 더 발견되었다. 이 유전자들은 특히 중요한 경제형질과 연관성이 있는 일당 증체량, 등지방두께, 사료요구율, 정육률과 연관성이 있을 것으로 생각 되어 지며, 형질과 연관성을 확인하기 위하여 유전자들의 특성을 분석하였으며, 그와 관련된 메카니즘을 추측하고 활용방안에 대한 정보로 이용 하였다. 또한 육질에 주요하게 영향을 미치는 요인인 지방 조직으로부터 library를 구축하고 클론들로부터 35개의 유전자들을 확보하였다. 또한 Tail-PCR 결과와 fat library를 통해 확보된 6개의 신규 유전자들의 유전자 등록 및 정보를 선점하여 목표치 이상의 달성도를 나타내었다.

또한 EF-hand bind, urate oxidase, OTF1, RXRB, PQBP1, galectin-1, adiponectin, NM004, NM005의 확보된 유용 유전자의 심도 있는 특성분석을 위해 southern 및 northern blot, RT-PCR, real-time PCR을 수행하였으며, 단백질 수준에서 확인하고자 western blotting도 더불어 수행하였다. 그 결과 지방과 밀접한 연관성이 있는 Galectin-1과 adiponectin이라는 주요한 두 유전자를 확인하였다.

최종의 목표인 조기 진단법 개발을 위해 Galectin-1과 Candidate gene을 이용 하였다. 우선 Galectin-1 유전자 정보를 이용한 경제형질 연관성을 이용한 분석방법으로 일당증체량과 등지방 두께에 연관성이 있는 종돈을 조기 선발하는 진단기법과 다음으로 H-FABP, GHRH, MYO의 candidate gene들을 통한 육질 검사방법을 이용한 종돈의 조기 진단 기법의 개발로 목표치 이상의 결과를 얻었으며, 이를 통해 경제형질이 우수한 종돈의 조기 선발에 이용될 수 있어 양돈 산업의 경쟁력 제고에 크게 기여할 수 있을 것이다.

구분	연구개발목표	목표의 달성도
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> •경제형질 연관 우수 marker 선발 •경제형질 연관 marker중 우수 MS확보를 위한 재현성 검증 •경제형질 연관 marker를 이용한 TAIL-PCR •TAIL-PCR Product cloning 	<p>경제형질 연관 마커의 검증과 33개의 flanking DNA를 확인하였고 유용한 유전자 23개 및 no match gene들을 확보.</p> <p>☞ 목표 이상 달성</p>
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> •클로닝 된 유전자 Blotting •membrane transfer 및 elution •Fat cDNA Library제작 •cDNA clone들을 기초로 sequencing •유전자의 특허화 	<p>Southern /Northern blotting /RT-PCR 기법으로 유용 유전자들의 특성분석, fat의 cDNA library제작 및 5개의 유전자 확보 및 유전자 등록.</p> <p>☞ 목표 이상 달성</p>
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> •정확한 유전자의 발현양상 분석 •조직의 발현 양상 분석 •단백질 수준에서의 발현양상 분석 •조기진단법 개발 및 특허화 	<p>경제형질과 밀접한 연관성이 있는 유용 유전자들의 메카니즘 예측 (real-time PCR과 western blotting), 조기진단 방법 개발.</p> <p>☞ 목표 이상 달성</p>

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여도

돼지의 경제형질 연관 DNA marker를 찾기 위한 노력은 전 세계적인 이슈로서 많은 연구가들에 의해 끊임없는 연구를 거듭하고 있다. 하지만 돼지의 경제형질 연관 DNA marker는 기능을 하는 유전자가 아니기 때문에 특정 형질과 직접적인 연관성이 있는 유전자를 찾고 경제형질 연관 유용 유전자를 발굴하여 그 특성을 분석하여 우수한 종돈의 조기 선발에 이용 가능하게 될 것이다. 뿐만 아니라 일당 증체량, 등지방 두께, 등심단면적이 동시에 우수한 종돈간의 조기 교배는 고품질의 돈육을 생산 가능하게 하고 양돈 산업의 생산성 향상에 크게 기여하게 될 것이다.

○ 우수 종돈의 조기 선발 진단 기법 개발

- 돼지 육질 검사용 프라이머 및 이를 이용한 돼지의 육질 진단 방법 (특허 출원 10-2007-0050352, 붙임 1참조) --> Galectin-1 유전자의 분석 기법
- RFLP를 이용한 돼지의 경제형질 진단 방법 (특허 출원 10-2007-0050318, 붙임 2참조) -->

Candidate gene의 유전자 다형성을 이용한 유전자 진단 기법 개발

○ 확보된 clone들을 이용한 경제형질 진단 방법 개발

- 성장, 지방합성, 품종에 대한 진단 기법

○ 연구 논문 및 학술발표

- Characterization and Identification of Galectin from fat cDNA library in Porcine (한국분자·세포생물학회, 2006, 붙임 3-1 참조)
- 돼지 육질 관련 DNA marker로부터 유용 유전자 발굴 및 발현양상 분석(동물자원과학회, 2005, 붙임 3-2 참조)
- Identification and Expression analysis of Galectin-1 from Fat in Berkshire. (AJAS 투고 중, 붙임 4참조)
- Association of GHRH, F-FABP, MYOG polymorphisms with economic traits in pig. (AJAS 투고 중, 붙임 5참조)
- Expression of adiponectin and its related genes in pig. (AJAS 투고 중)
- 돼지 Urate Oxidase 유전자의 성장단계에 따른 expression pattern 분석. (J. Agric. Tech. Res. Inst.(Jinju Nat. Univ.) 20: 145-151(2007), 붙임 6참조)

- 유용 유전자 기능 분석에 의한 unknown gene (5개)와 galectin-1 유전자 (1개)를 등록하여 지적소유권을 선점한다.
- 축산연구소, 종돈 능력 검정소, 종돈장, 각 시·군 농업기술센터를 통해 우수한 종돈 선발 기술 보급 계획임.
- 진주산업대학교 양돈 과학기술 센터에서 직접 진단 기술을 보급할 계획임.
- 양돈인들에게 개발된 기술에 대한 사업설명회, 영농기술 등 농업인 교육을 개최하여 지속적으로 홍보.

○ 사업설명회, 영농기술 등 농업인 교육(9회)

일시	장 소	참석대상	교육내용
2006.05.10	경남 함양군 소재 농원	채경실 외 15여명	•양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역 경제 활성화 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.06.01	(사)대한양돈협회 산청지부	안운섭 외 23명	•양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역 경제 활성화 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.06.17	(사)대한양돈협회 하동지부	정의근 외 20명	•양돈산업의 블루오션은 있는가? •양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역 경제 활성화 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.06.28	고성군농업 기술센터	최상림 외 20명	•양돈산업의 블루오션은 있는가? •양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역 경제 활성화 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.06.29	(사)대한양돈협회 김해지부	이성호 외 25명	•양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역 경제 활성화 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.06.29	양산시농업 기술센터	서춘계 외 15명	•양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역 경제 활성화 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.07.27	(사)대한양돈협회 창원지부	박창식 외 25명	•건강한 돼지사육을 위한 양돈장 환경관리 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.07.27	(사)대한양돈협회 함안지부	함연수 외 20명	•건강한 돼지사육을 위한 양돈장 환경관리 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.10.12	(사)대한양돈협회지부 옆 별궁식당	문영길 외 20여명	•양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역경제 활성화 사업 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)

○ 심포지움(2회)

일시	제목	장소	참석자	주요내용
2006.05.17	한국 농업의 가치혁신 전략	진주산업대학교 학생회관 대공연장	양돈관계자 등 200여명	양돈산업의 혁신역량 강화를 위한 지역경제 활성화 사업 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.12.01	FTA이후, 한국농업의 성장전략	진주산업대학교 공동실험관 세미나실	양돈관련자 등 150여명	-FTA이후, 농업경쟁력 강화를 위한 농업의 지도연구방향 -명품브랜드의 탄생과 성공비결 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)

○ 세미나 및 워크숍 (3회)

일시	제목	장소	참석자	주요내용
2005.05.13	양돈산업의 소득증대를 위한 양돈기술세미나	진주산업대학교	양돈관련자 등 200여명	차별화된 명품브랜드돈육 생산 전략 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.09.26	양돈산업 현장 HACCP 도입과 기술지원	진주산업대학교	양돈관련자 등 200여명	양돈산업 가치제고를 위한 전략 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006.11.23	양돈산업 현안점검과 미래전략수립 워크숍	진주산업대학교	양돈관련자 등 50여명	양돈기술의 연구개발 동향과 전망 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)

○ 양돈관련 교육(9회)

교육과정명	교육일시	교육대상	교육내용
2005학년도 최고양돈경영자과정	2005.04.22	교육생 20명	성공의 첫걸음은 품종이다. 올바른 품종 선택방법을 배우자 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
	2005.05.27	교육생 20명	돼지의 유전현상과 생산성 향상 방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
	2005.10.07	교육생 20명	소득을 보장할 명품 브랜드 돈육생산 전략 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
	2005.12.09	교육생 20명	유전자 검사로 생산성을 높일 수 있다. (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2006학년도 최고양돈경영자과정	2006.03.24	교육생 25명	양돈산업의 블루오션(Blue ocean)은 있는가? (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
	2006.05.12	교육생 25명	모든의 생산성 향상방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
	2006.09.08	교육생 25명	유전자 검사로 생산성을 높일 수 있다. (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
2007학년도 최고양돈경영자과정	2007.03.24	교육생 29명	양돈산업의 블루오션(Blue ocean)은 있는가? (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)
	2007.05.12	교육생 29명	모든의 생산성 향상방안 (경제형질 연관 marker를 이용한 우수 종돈선발기법 소개 및 양돈산업 적용)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

확보된 돼지 경제 형질 연관 specific DNA marker들의 유전자정보를 토대로 그와 연관성이 있는 marker 주위의 유전자를 발굴하고 그 유전자의 정확한 기능을 분석하는 연구를 수행하였다. 즉 경제형질 연관 DNA marker는 형질과의 연관성을 확인하여 큰 영향을 미치는 양적형질은 확인 가능하나 어떠한 역할에 의해서 그러한 현상이 일어나는지, marker 주변의 유전인자는 없는지에 대한 정확한 분석을 하고자 연구개발을 수행하였다. 실험결과로부터 얻어진 Cloning된 7개의 유전자들과 fat library로부터 확보된 2개의 유전자들은 경제형질과 연관이 있을 것으로 생각되어지며 이러한 유전자들에 대한 정보의 획득을 통한 유전자의 선점 및 기능 분석 정보를 수집하고 또한 경제형질과 연관성이 있을 것으로 확인이 되어있는 후보유전자 GHRH, H-FABP, MYOG 3개의 유전자의 유전자형을 분석한 정보를 토대로 종돈의 조기 선발 진단 기법개발 및 새로운 형질의 우수한 돼지 조기선발에 이용할 수 있다.

- 경제형질 연관 유전자를 개발함으로써 유용 유전자에 대한 특허가 가능.
- 경제형질 조사를 위해 종돈의 도체 및 경제형질이 떨어진 종돈의 사양에 드는 비용을 절감.
- 경제형질에 영향을 미치는 유전자를 확보함으로써 중요한 경제형질인 일당 증체량, 등지방두께, 등심단면적, 육질 등이 우수한 종돈을 조기에 선발.
- 경제형질이 우수한 돈육을 조기 선발로 브랜드 돈육을 생산 해 낼 수 있는 기본 토대를 마련.
- 경제형질이 우수한 돈육 생산이 가능하여 우수한 등급을 판정 받을 수 있으므로 생산성 향상 효과와 경제적 손실을 막음.
- 경제형질 유전자를 확보함으로써 유전자를 이용하여 외화획득을 할 수 있으며 돼지의 유전자 보유국으로의 인지도를 높일 수 있을 것으로 예상된다.
- 경제형질 유전자를 확보함으로써 FTA 체결에 의한 수입개방에서도 국제 경쟁력 확보.
- 경제형질 연관 유전자를 이용하여 경제형질이 우수한 종돈의 조기 선발용으로 활용한다면, 종돈의 구입시에 드는 외화 손실을 줄일 수 있게 되어 국가 경제에도 좋은 영향을 미치게 될 것이다.

1. 기대효과

가. 기술적 측면

- 경제형질 연관 유전자를 개발함으로써 유전자에 대한 특허가 가능해진다.
- 경제형질 조사를 위해 종돈의 도체 및 경제형질이 떨어진 종돈의 사양에 드는 비용을 절감 할 수 있다.
- 경제형질에 영향을 미치는 유전자를 확보함으로써 성장, 등지방두께, 육질이 우수한 종돈을 조기에 선발할 수 있다.
- 경제형질이 우수한 종돈을 계속 육종시킴으로써 종돈의 수출국으로써의 국제경쟁력을 가질 수 있다.
- 경제형질이 우수한 새로운 브랜드 돈육을 생산 해 낼 수 있는 기본 토대를 마련 할 수 있다.

나. 경제 · 산업적 측면

- 경제형질이 우수한 돈육 생산이 가능하여 우수한 등급을 판정 받을 수 있으므로 생산성 향상 효과와 경제적 손실을 막을 수 있다.
- 경제형질 연관 유전자를 확보함으로써 차후 그 유전자이나 유전자를 이용한 산물을 이용할 경우 후발 연구자나 국가로부터 부여 받거나 로열티를 받게 되어 경제적으로 이익을 초래 할 것이다.
- 경제형질 유전자를 확보함으로써 유전자를 이용하여 외화획득을 할 수 있으며 돼지의 유전자 보유국으로의 인지도를 높일 수 있다고 여겨진다.
- 경제형질 연관 유전자를 이용하여 경제형질이 우수한 종돈의 조기 선발용으로 활용한다면, 종돈의 구입시에 드는 외화 손실을 줄일 수 있게 되어 국가 경제에도 좋은 영향을 미치게 될 것이다.
- 경제형질이 우수한 종돈확보는 종돈 분양가격을 저렴하게 하여 농가 소득 면에서 생산비 절감효과와 생산성 향상을 가져와 소득증대의 밑거름이 되며 그러므로 국내 돈육시장의 활성화 및 국제경쟁력 강화 효과를 유발 할 것으로 보인다.

2. 활용방안

- 경제형질 연관 유용 유전자들의 정보 선점 및 특허화

- 경제형질이 우수한 새로운 브랜드 돈육을 만드는데 기초토대를 마련.
- 경제형질이 우수한 종돈의 조기 선발용 진단 기술 개발 및 농가 보급.
- 경제형질 연관 유전자를 이용한 새로운 브랜드 돈육 개발 및 농가 보급으로 생산비절감과 생산성 향상에 기여.
- 경제형질이 우수한 품종간의 교배를 통한 새로운 품종 육종 가능 및 농가 생산비절감과 생산성 향상에 기여.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

< Real time PCR 분석 기법 >

Real time PCR법은 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술이다. End Point에서 PCR 증폭산물을 확인하는 기존의 PCR법에 비해서 다음과 같은 장점이 있어서 현재는 유전자 발현해석과 SNP typing 등에 있어 필수적인 기술이 되고 있다.

- DNA와 RNA의 정확한 정량이 가능하다.
- 전기영동이 필요 없이 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며, 오염의 위험성이 적다.

그래서 본 연구에서도 유전자 발현양상 분석을 수행하는 과정에서 Galectin-1 유전자에 대해서 Real time-PCR 분석을 수행하였다.

- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:72767280.
- Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., and Brow, M.A. 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:94369440.
- C. A. Kerr, K. L. Bunter, R. Seymou, B. Shen, and A. Reverter. 2005. The heritability of the expression of two stress-regulated gene fragments in pigs. J. Anim. Sci. 2005. 83:17531765
- Chung, W.B., Chan, W.H., Chaung, H.C., Lien, Y., Wu, C.C., Huang, Y.L., 2005. Real-time PCR for quantitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 in

naturally-infected and challenged pigs. *J. Virol. Methods*, 124(1-2):11-19. [doi:10.1016/j.jviromet.2004.10.003]

Fenaux, M., Opriessnig, T., Halbur, P.G., Elvinger, F., Meng, X.J., 2004. Two amino acid mutations in the capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) enhanced PCV2 replication in vitro and attenuated the virus in vivo. *J. Virol.*, 78(24):13440-13446. [doi:10.1128/JVI.78.24.13440-13446.2004]

Maria Teresa Valenti, Francesco Bertoldo, Luca Dalle Carbonare, Giuseppe Azzarello, Sonia Zenari, Mirko Zanatta, Elena Balducci, Orazio Vinante and Vincenzo Lo Cascio. 2006. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* 2006, 6:49 doi:10.1186/1471-2407-6-49.

제 7 장. 참고문헌

- Archibald, A. L., Haley, C.S., Brown, J.F., Couperwhite, S., McQueen, H.A., Nicholson, D., Coppieters, W. *et al.*; 1995. The PiGMaP consortium linkage map of the pig(*Sus scrofa*). *Mammalian Genome* 6, 157-175.
- Basedow, M., A. Barre-Dirie, C. Looft, B. Harlizius, D. Simon and E. Kalm. 1998. The evaluation of genetic diversity of German cattle breeds using microsatellites and AFLP markers. 16th International Conference on Animal Genetics, Auckland, New Zealand, A015:15.
- Ellegren, H., Chowdhary, B.P., Johansson, M., Marklund, L., Fredholm, M., Gustavsson, I. and Andersson, L. 1994. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of recombination. *Genetics* 137, 1089-1100.
- Groenen D., Wieringa B. 1998. Expanding complexity in myotonic dystrophy. *Bioessays* Nov:20(11):901-12.
- Looft, C.H.R., M. Basedow, B.Barendse, J.Schondelmaier & E. Kalm 1998. Genetic mapping of AFLP markers in the bovine genome. 16th International Conference on Animal Genetics, Auckland, New Zealand, C002:52.
- Plastow G, Truett G.E., Walker J.A., Wilson J.B., Redmann SM Jr, Tulley RT, Eckardt GR, Lefevre M. 1998. ELISA detection of restriction site polymorphism in the pig ryanodine receptor locus. *Mamm. Genome* Aug:9(8):629-32.
- Rohrer G.A. Keele J.W. 1998. Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *J. Anim. Sci.* Sep:76(9):2247-54.
- Rohrer, G.A., L.J.Alexander, J.W.Keele, T.P.Smith and C.W. Beattie. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136:231-245
- Plastow G, Truett G.E., Walker J.A., Wilson J.B., Redmann SM Jr, Tulley

- RT, Eckardt GR, Lefevre M. 1998. ELISA detection of restriction site polymorphism in the pig ryanodine receptor locus. *Mamm. Genome* Aug;9(8):629-32.
- Wilkie P.J., Paszek A.A, Beattie C.W., Alexander L.J., Wheeler M.B., Schook L.B. 1999. A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. *Mammalian Genome* 10, 573-578.
 - Wang L, Yu T.-P, Tuggle C. K, Liu H.-C, and Rothschild M.F. 1998. A Directed Search for Quantitative Trait Loci on Chromosomes 4 and 7 in Pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 2560-2567.
 - Gdrbens F, Vdrburg FJ, Van Moerkerk HT, 똥디 B, Buist W, Veerkamp JH, te Pas MF. 2001. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs. *J Anim Sci.* Feb;79(2):347-54.
 - Liu Y.G, Norihiro M., Teruko O. and Robert F. W. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal* 8(3), 457-463.
 - Barondes S. H., Cooper D. N. W., Gitt M. A. & Leffler H., 1994. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 20807-20810.
 - 조병욱 등. 1994. Development of RAPD marker specific for Korean Cattle (HANWOO), 36(3) 263-270.
 - 정의룡 등. 1995. Analysis of DNA polymorphisms and genetic characteristics in Holstein dairy cattle using RAPD-PCR technique. *한축지* 37(5) 455-466.
 - 김재우 등. 1994, 유전자 지문을 이용한 한국 재래계의 식별, *한축지* : 36(3) 221-225.

- 대한양돈협회 공인 제 2종돈 능력검정소, 1997.
- 양돈정보, 1998.
- 여정수 등. 1996. Probe 종류에 따른 축우의 DNA 지문의 양상, 한축지 : 38(2) 139-144.
- 오봉국 등. 1996. 웅성 특이 염기서열을 이용한 소의 초기 수정란의 성감별에 관한 연구, 한축지. 38(1) 43-51.
- 이길재 등. 1996. 유전자 지문을 이용한 한국 재래닭 집단의 유전적 유사성 분석, 한축지 : 38(5) 441-448.
- 이성진 등. 1995. DNA 지문을 이용한 한국오골계의 유전 분석, 한축지 37(3) 207-215.

붙임 1-1

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2007.05.23
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2007-0050352 (접수번호 1-1-2007-0379167-37)
출원인성명 김철욱(4-1998-025596-2) 외 1명
대리인성명 원은섭(9-1998-000416-2)
발명자성명 김철욱 권은정 정원웅 박다혜 조은석 조광근 정기화 장규태 서상식

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원출차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함) "마이 특허넷"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 또한 동 코너에 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공자사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매일 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kips.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라질 수 있습니다.
2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 결론을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 밝힌 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 하나)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법 시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 친정 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 둔산동 920 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

붙임 1-2



방 식 신 사 관	당	상	심	사	관

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2007.05.23

【발명의 국문명칭】 돼지의 육질 검사용 프라이머 및 이를 이용한 돼지의 육질
판단 방법

【발명의 영문명칭】 PRIMERS FOR TESTING FLESHINESS OF PIG AND A METHOD OF
DETERMINE FLESHINESS OF PIG USING SAID PRIMERS

【출원인】

【성명】 김철욱

【출원인코드】 4-1998-025596-2

【출원인】

【명칭】 진주산업대학교 산학협력단

【출원인코드】 2-2004-022883-1

【대리인】

【성명】 원은섭

【대리인코드】 9-1998-000416-2

【포괄위임등록번호】 2006-097267-5

【포괄위임등록번호】 2006-001584-6

【발명자】

【성명】 김철욱

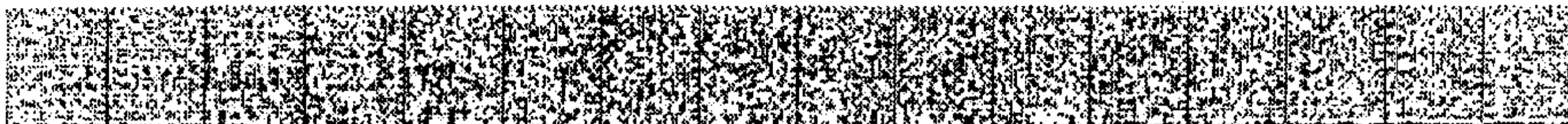
【출원인코드】 4-1998-025596-2

【발명자】

【성명의 국문표기】 권은정

【성명의 영문표기】 Kwon Eun Jung

4-1



붙임 2-1

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2007.05.23
특기사항 심사청구(우) 공개신청(무)
출원번호 10-2007-0050318 (접수번호 1-1-2007-0378996-92)
출원인 성명 김철득(4-1998-025596-2) 외 1명
대리인 성명 원은섭(9-1998-000416-2)
발명자 성명 김철득 권은정 정원중 박다해 조은석 조광근 정기화 장규태 홍성광

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인 출원은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함) "마이 특허넷"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 또한 홈 페이지 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 특별 1차 심사결과통지 예정시기를 매일 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.

※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.

 - 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 통보를 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 종결된 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 양식서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
- 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법 시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권을 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 둔산동 920 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 185-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

붙임 3 -1.

A-42 Characterization and Identification of Galectin from Fat cDNA Library in Porcine

KIM chulwook, PARK dahae and JUNG wnyong*

Department of International Livestock Industry, China National University, Chilanadong 150, Jinju Gyongnam 660-758.

*Corresponding author: wyjong@hanmail.net

Galectins are a group of β -galactoside-binding lectins that are widespread throughout all animal kingdoms. This study progressed because research is unprepared in pig. By screening specific gene related to Fat of Sanchang pig using cDNA library, a novel Galectin gene were identified. Results of southern blotting to investigate the number of copies of this gene in the genome of swine indicated that existed as more than two copies. It was suggested that there are many isoforms of this gene in the genome of swine. Also, results of cDNA chip and Reverse Transcriptase-PCR to investigate whether this gene were expressed in fat and muscle tissues, the genes were much more expressed in the fat tissue than muscle of swine with body weight of 30 kg. Expression patterns analysis of this gene in the other species, were investigated by extracting RNA from the tissues of Berkshire, Duroc, Landrace and Yorkshire. This gene were expressed higher in the Landrace of fat tissue. These data may indicate the role of Galectin as a bridging agent between fat and muscle. To determine the relation mechanism of fat or muscle and Galectin, further studies should be proceeded functional analysis.

붙임 3-2.

PA25132

돼지 육질 관련 DNA marker로부터 유용 유전자 발굴 및 발현양상 분석

김철욱, 정원용, 조복래, 박다혜

전주산업대학교 동물소재공학과

돼지의 microsatellite(MS) marker로서 경제형질과 연관된 유전자를 규명하는 연구를 수행하였고 이를 통해 특히 육질과 관련된 DNA marker를 20개 선정할 수 있었다. 이러한 MS DNA marker들은 실제 기능을 하는 유전자들이 아니며 기능을 하는 유전자 근처에서 나타나는 짧은 반복 sequence를 말한다. 본 연구에서는 이들 MS DNA marker 주위의 유용 유전자들을 TAIL(Thermal asymmetric interlaced)-PCR 또는 PCR기법을 이용하여 미지의 유전자들을 얻었다. 이 유전자들을 모두 pGEM-T easy vector에 cloning하고 Sequencing 하였으며 Blast search를 통해서 이중 육질과 연관이 있는 것으로 알려져 있는 흥미로운 유전자 3개를 선정하였다. SO212, SW1707, SW871에 대한 기본적인 분자생물학적인 실험들을 수행한 결과 Southern blotting을 통해서 돼지 genome 상에 존재 여부를 확인 했으며, Northern blotting으로 SO212는 120kg의 삼겹에서 보다는 근육에서 발현이 많이 됨을 알았고, SW1707은 별다른 발현의 차이를 보지 못했다. 또한 SW871은 SO212와 비슷한 결과를 나타내었으나 약한 발현양상만을 나타내었다. 이런 결과에서 SO212와 SW871은 육질과 연관이 있는 근육의 형성에 참여할 것이라는 것을 추측할 수 있었으며, 앞으로 기능분석을 수행해야 더 확실한 결과를 알 수 있을 것이다.

Key words : DNA marker, TAIL-PCR, 경제형질, 육질관련, MS marker

붙임 4



Asian-Australasian Journal of Animal Sciences

an official Journal of Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP)

Room 708 Sammo Sporex, 1638-32 Sillimbon-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-730, Korea

Tel : 82-2-888-6558, Fax : 82-2-888-6559, E-mail : jongkha@hotmail.com

Title :Identification and Expression Analysis of Galectin-1 from Fat in Berkshire

Manuscript No :70271

Author :Chul Wook Kim, Jung Won Youg, Cho Eun Seok, Kwon Eun Jung, Park Da Hye, Chung Ki Hwa, Chang Kyu Tae

Dear Authors,

The above manuscript has been submitted to AJAS and you are listed as a coauthor of the following manuscript.

Please complete attached Declaration by Authors and return via e-mail (jongkha@hotmail.com) or fax (82-2-888-6559).

Your return e-mail or fax will automatically mean that you have read Declaration by Authors before submission and agree with conditions specified in the declaration.

You can use Declaration by Authors at the end of this mail or download it from homepage(www.ajas.info).

Please understand that review process will begin when confirmation by all coauthors is compiled.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jongkha Ha'.

붙임 5



Asian-Australasian Journal of Animal Sciences

an official Journal of Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP)

Room 708 Sammo Sporex, 1638-32 Sillimbon-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-730, Korea

Tel : 82-2-888-6558, Fax : 82-2-888-6559, E-mail : jongkha@hotmail.com

Title :Association of GHRH, H-FAEP and MYOG polymorphisms with economic traits in pigs

Manuscript No :70291

Author :Chul Wook Kim, Da Hye Park, Eun Seok Cho, Won Youg Jung, Eun Jung Kwon

Dear Authors,

The above manuscript has been submitted to AJAS and you are listed as a coauthor of the following manuscript.

Please complete attached Declaration by Authors and return via e-mail (jongkha@hotmail.com) or fax (82-2-888-6559).

Your return e-mail or fax will automatically mean that you have read Declaration by Authors before submission and agree with conditions specified in the declaration.

You can use Declaration by Authors at the end of this mail or download it from homepage(www.ajas.info).

Please understand that review process will begin when confirmation by all coauthors is compiled.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jongkha Ha'.

돼지 Urate Oxidase 유전자의 성장단계에 따른 expression pattern 분석

김 철 욱

진주산업대학교 동물소재공학과

A expression pattern analysis of urate oxidase gene according to growth stage in porcine*

C. W. Kim

Department of Animal Resources Technology, Jinju National University

ABSTRACT

Using cDNA microarray technique which is research former time, we profiling the specific genes which is related at the growth and meat quality of economic traits. Among profiled genes, We got urate oxidase gene which perform important role to purine catabolism pathway of the uric acid. We confirmed a 613bp full-length sequence about this gene and many polymorphic site. We performed the cDNA chip and RT-PCR to confirm the relation of growth trait. We used a growth stage muscle of the pig and confirm the gene expression pattern. Especially, we could confirm most high expression at the 110kg that is processed most in the pig so that the growth is active(p<0.05). And we performed RT-PCR to reconfirm the expression of this gene about each tissues(fat, muscle, liver) at the 110kg. In this study, we could confirm the expression about a growth stage of urate oxidase, but could not confirm the association about the meat quality. We try to progress research about the impact that the expression pattern of urate oxidase gene influences on a growth or meat quality trait from now on continuously.

Key words : cDNA microarray(chip), urate oxidase, RT-PCR, gene expression

I. 서 론

계놈 연구의 결실은 박테리아에서 인간에 이르기까지 다량의 유전자 정보들을 밝혀져 되었고, 하루에도 수백개 이상 밝혀지는 새로

운 유전정보들에 대한 연구 시간 소모를 단축할 수 있는 새로운 기술의 개발이 요구되어졌다(http://www.genechip.co.kr). 이를 위한 방안으로 DNA chip 기술은 반도체 기술과 화학 합성의 기술을 유전자 분석에 적용하여 지금까지

* 본 연구는 2006년도 진주산업대학교 기성회 연구비의 지원으로 이루어졌음.