

11-15430  
00-00239  
4-01

수출전  
략형  
흑돼지의  
산자수  
증대  
기술  
개발

최종  
보고  
서

2018

농림축산식품부

수출전략기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-002394-01

수출전략형  
흑돼지의 산자수  
증대 기술 개발

최종보고서

2018. 10. .

주관연구기관 / 경남과학기술대학교  
협동연구기관 / (주)다산육종

농림축산식품부

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “수출 전략형 흑돼지의 산자수 증대 기술 개발”(개발기간 : 2013. 08. ~ 2018. 08.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 10 . .

주관연구기관명 : 경남과학기술대학교 산학협력단장 (인)  
협동연구기관명 : 다산육종 박화춘 (인)  
참여기관명 : 다산육종 박화춘 (인)

주관연구책임자 : 김 철 욱  
협동연구책임자 : 박 화 춘  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의  
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	313012-5	해 당 단 계 연 구 기 간	2013.08.26. ~2018.08.25	단 계 구 분	5년/ 5년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	수출 전략형 흑돼지의 산자수 증대 기술 개발			
연구책임자	김 철 욱	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 7명 외부: 10명	해당단계 연구개발비	정부: 1,000,000천원 민간: 335,000천원 계: 1,335,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 7명 외부: 10명	총 연구개발비	정부: 1,000,000천원 민간: 335,000천원 계: 1,335,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경남과학기술대학교			참여기업명 : 다산육종	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 본 연구의 목적은 본 연구 그룹에 의해 한국 최초로 개발된 “육질이 우수한 한국 다산 버크셔 계통”을 활용하여 산자수-항병성이 우수한 한국 버크셔 품종을 개발하는 것임.
- 기존의 육종방법에서 벗어나 분자유종 기술을 개발하고 계획 교배를 통해 산자수-항병성이 우수한 한국 버크셔 품종을 개발하고자 함.
- 본 연구를 통해 산자수 연관 유전체, 전사체, 단백체, 후성 유전체를 발굴하고 네트워크 분석을 통하여 통합 유전체 마커를 정립하였음.
- 재현성 검증을 통해 산자수 연관 통합 유전체 마커를 확립하였음.
- 이들 마커를 이용하여 경제 선발 지수에 대한 검정 및 보완하여 병합 육종 프로그램을 개발하고 추정 육종가의 비교 분석을 통해 자돈을 생산하였음.
- 연구 개시 전과 비교 시 두당 산자수가 0.7두 증가 하는 결과를 얻었음.
- 연구 성과 항목별 초과달성을 이루었으며 정성적으로도 세계최초로 버크셔 돼지의 산자수 연관 통합 유전체 마커를 개발하는 성과를 얻음.
- 연구 결과를 기술이전 및 정책 건의, 정책 활용을 통하여 개발된 기술의 기술 확산에 노력하였으며 양돈장의 컨설팅 등의 기술 지도를 통하여 해당 연구 기술 보급에 힘써 양돈장 및 종돈장의 경제적 생산성 향상을 이끌었음.
- 산자수 연관 통합 유전체 마커를 발굴하고 병합 육종 프로그램을

보고서 면수  
330

개발하여 실제 활용할 수 있는 연구 성과를 확보하여 기반을 구축한 국내 최초의 모범적인 현장적용 연구 결과임.

○ 본 연구 결과를 활용하여 종돈장, 양돈장의 종돈을 대상으로 유전자 검사를 실시하여 계획 교배에 활용한다면 산자수-항병성 증가로 부가가치를 높이고 해당 품종의 브랜드 가치를 올릴 수 있으며 생산성 향상을 통한 수익성 향상 또한 기대됨.

○ 해당 병합 육종 프로그램으로 계획 교배된 자돈의 경우 해당 산자수 연관 통합 유전체 마커의 유전적 고정을 확인하였으며 산자수가 증대 되는 결과 이외에 젓꼭지 개수가 15-16개로 평균보다 2-3개 증가하여 포유 능력 또한 향상되는 결과를 얻었음.

○ 본 연구 결과는 기초 연구 개발의 현장 적용 및 산업화의 우수 사례로 볼 수 있음.

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 증대 선발기술 개발의 기반 구축             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 증대 후보유전체마커, 후성 유전체 마커 탐색 및 확보</li> <li>- 차등발현 유전자(DEG) 정보 확보</li> </ul> </li> <li>○ 산업용 병합 육종프로그램 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존에 수행된 연구자료의 데이터베이스 구축</li> <li>- 산자수 증대 산업용 육종프로그램 개발</li> <li>- 산자수 증대 통합 육종 시스템 구축</li> <li>- 유전능력평가 프로그램 개발</li> <li>- 시뮬레이션 분석 및 계획교배 프로그램 개발</li> <li>- 육종프로그램 정확도 분석</li> <li>- 육종가 경제선발지수 개발</li> <li>- 계획교배, 사양관리 및 자돈생산</li> </ul> </li> <li>○ 산자수 증대 선발 기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 증대 유전체, 후성 유전체, 융합 유전체 조기선발기술개발</li> <li>- 재현성 검증</li> <li>- 유전자 정보 분석</li> <li>- 항병성 증대 유전체 조기 선발 기술 개발</li> <li>- 산자수 증대 조기 선발 기술의 정립</li> </ul> </li> <li>○ 산업용 병합 육종프로그램 개발 및 선발지표 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 경제선발지수에 의한 우수 후보모돈 선발</li> <li>- 산자수 증대 연관 유전자군에 대한 조절네트워크분석</li> <li>- 경제선발지수의 검정 및 보완</li> <li>- 산자수 증대 병합육종프로그램개발</li> </ul> </li> <li>○ 산업용 병합 육종프로그램 검증 및 산업화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조기선발기술에 의한 자돈의 조기선발</li> <li>- 경제선발지수의 재현성 검정</li> <li>- 다산성유전자 네트워크 모델링</li> <li>- 병합육종프로그램의 재현성 검정 및 개선</li> </ul> </li> <li>○ 산자수 증대 선발 기술 및 병합육종 프로그램 정립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 병합육종프로그램을 활용한 유전능력평가</li> <li>- 병합육종프로그램을 활용한 개체별 유전능력비교</li> <li>- 경제선발지수에 의한 재선발 및 계획교배</li> <li>- 수태율 및 배란율을 고려한 형질 개발</li> </ul> </li> <li>○ 산자수 증대 선발 기술의 확립 및 보급             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자돈 조기선발 정보 분석</li> <li>- 산자수·항병성 증대 조기선발기술의 확립</li> </ul> </li> <li>○ 산자수 개량 선발 기술의 확립 및 보급             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조기선발기술에 의한 자돈의 조기선발</li> </ul> </li> </ul>
------------------------	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 병합육종프로그램을 활용한 유전능력평가</li> <li>- 병합 육종프로그램을 활용한 개체별 유전능력 비교</li> <li>- 경제선발지수에 의한 재선발 및 계획교배</li> </ul>
연구개발성과	<p>○ RNA-Sequencing 및 Whole genome bisulfite sequencing을 통하여 태반유래 산자수 연관 DEG를 HBB를 포함한 278개 확보</p> <p>○ 차등 산자수 그룹에서 82,653 및 89,678 SNP를 확보함. 이들 중에서 missense와 nonsense, silent mutation이 각각 8,375/7,803, 33/37, 18,623/17,686 가 확보</p> <p>○ 17,704 hypomethylated DMR과 22,216 hypermethylated DMR을 확보</p> <p>○ ANKH를 포함하는 총 37개 후보 유전자의 확보</p> <p>○ 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.072와 0.067로 추정되었으며, 총산자수와 실산자수간의 유전상관은 0.99로 매우 높게 나타났음. 한편, 이유두수에 대한 유전력은 거의 0에 가깝게 추정되어 유전적 요인보다는 대부분이 환경적 요인에 기인함</p> <p>○ 육질 및 성장형질에 대한 유전력은 0.15~0.57의 범위를 나타내었으며, 육즙손실과 pH45m의 유전력은 각각 0.45와 0.48로 개량 형질로써 가능성을 나타내었음.</p> <p>○ 총산자수와 실산자수에 대한 육종가의 범위는 각각 -1.54~1.85두와 -1.24~1.32이며, 유전적 개량량의 추세는 나타나지 않음</p> <p>○ pH24의 경우 변이가 매우 작아서 개량형질로서의 재검토가 필요하며, 가열감량에 대한 육종가는 -2.33~2.13의 범위를 나타냄.</p> <p>○ 선발지수 = pH24h 육종가×70 - 가열감량 육종가로 하여 선발지수값을 구함</p> <p>○ 번식 및 육질·산육 성적자료에 대한 이상치 자료들을 제거하고 데이터베이스를 구축한 후 새로이 혈통자료를 생성하였으며, 데이터생성에서부터 결과물까지 사용자 인터페이스를 구축함으로써 프로그램의 효율성을 극대화 하였음</p> <p>○ 개량목표 달성을 위한 집단특성 분석을 추가하였으며, 원하는 시점에 유전적 개량량의 추세를 분석하며, 향후 유전체 자료의 추가에 따른 부분을 고려하였음</p> <hr/> <p>○ 자궁유래 산자수 연관 차등 발현 유전자 789개 확보</p> <p>○ hypermethylation DMR 2,230, hypomethylation DMR 2,160개 확보</p> <p>○ DMR 존재 하는 유전자를 추적 탐색하여 130여개 후보 유전자를 동정</p> <p>○ 산자수 연관 통합 유전체 마커를 선별하여 총 78개 유전자를 확보</p> <p>○ 태반 조직의 차등 발현 단백질을 PSA, RBP4를 포함한 19개 차등 발현 단백체를 확보</p> <p>○ 산자수 관련 후보 유전자 SNP 10개 확보, 단백질체에 대한 SNP는 17개 확보,</p> <p>전사체에 대한 SNP는 8개 확보하여 통합 유전체 마커 확보</p>

- 경남과학기술대학교 융합 유전체 팀에서 제공한 유전체로 연관 불평형 패턴 분석 및 유효집단 크기의 추정을 통한 집단 모수 분석
- 집단모수의 추정 및 유전체단위의 병합시물레이션 구축
- 인접 SNPs간 평균  $r^2$ 값은 0.28, 유효집단크기는 1~5세대에 31두로 추정됨
- 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.074와 0.071로 추정, 이 유두수와 포유기간과 발정재귀일령에 대한 유전력은 0.01~0.04로 낮게 추정됨.
- 경제 선발 지수의 검정 및 보완
- 경남과학기술대 융합유전체팀에서 제공한 융합유전체를 이용하여 개체별 융합 유전체 추정육종가의 산출
- 융합유전체 추정 육종가의 정확도 분석
- 추정육종가와 비교를 통한 정확도 분석
- 태반 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 10개 중 2개에 대하여 RT-qPCR로 발현 검정
- 자궁 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 8개 중 5개 검정
- 9개의 deletion mutant SNP에 대하여 PCR-RFLP수행 1개 SNP에 대해서 통계적 유의성 확인
- 8개 산자수 연관 유전자의 SNP에 대해서 PCR-RFLP수행 4개 SNP에 대해서 유의성 확인
- 모든 혈액 132두와 136두의 gDNA로부터 산자수 연관 유전자 5개의 SNP에 대하여 통계적 재현성을 검정
- 산자수 연관 유전자의 SNP 5개에 대하여 특허 출원
- 산자수 증대 후성 유전체 마커에 대하여 Bisulfite-PCR sequencing으로 재현성을 검정 하고 MSRE-PCR방법으로 진단 마커로서의 메틸화를 분석함
- 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 우선 선발 하여 molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명
- 발정재귀일령의 유전력을 추정 한 결과 0.004로 선발 지수식에서 제외 하고 총산산수만 활용
- ssBLUP을 적용하여 개체의 유전체 육종가 및 각 SNP의 effect 추정
- 후보돈 60두에 대한 유전체 육종가를 추정 후 선발
- SNP 중복 아이디 검색, 친자감별 프로그램, 부모찾기 프로그램 구축
- 후성유전체 마커, 유전체 마커, 전사체 마커의 확증
- 모든 혈액 140두와 30두의 gDNA를 이용하여 산자수 연관 DMR 유전자에 대한 재현성 검증 및 통계적 유의성 확인
- 산자수 증대 후성유전체 마커 4개 확립
- 모든 혈액 29두의 gDNA를 이용하여 산자수 연관 유전자의 SNP에 대한 재현성 검증 통계적 유의성 확인



	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 증대 유전체 마커 5개 확립</li> <li>○ 산자수가 상/하위 그룹의 자궁 조직에서 항병성 연관 DEG의 발현양상 확인</li> <li>○ 항병성 증대 전사체 마커 5개 확립</li> <li>○ 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 선발</li> <li>○ molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명</li> <li>○ 총산자수 등 표현형 및 유전체자료 입출력 폼 완성</li> <li>○ 유전체자료의 QC 기준 완성</li> <li>○ 친자감별 및 부모 찾기 프로그램 추가 완성</li> <li>○ 병합육종평가자료 출력 완료</li> <li>○ 보고서 출력 보안</li> <li>○ ssBLUP을 적용하여 산자수에 대한 개체의 유전체 육종가 및 각 SNP의 effect 추정</li> <li>○ 총산자수와 생존산자수에 대한 유전체육종가를 이용하여 후보돈을 선발</li> </ul> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 연관 통합 유전체 마커의 세대 검증을 통한 확립</li> <li>○ 산자수 연관 통합 유전체 마커를 활용하여 조기 선발 및 계획 교배하여 다산성 버크셔종을 생산 및 품종 등록 중</li> <li>○ SYT13 유전자의 기능을 탐색하고 동물 모델에서 산자수 연관성을 확인</li> <li>○ 버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량 시스템을 구축하는데 있어서 porcine 60k bead chip 자료를 1,908두를 생성</li> <li>○ Final report에서 Plink form으로 변환하고 평가자료 형태로 출력하고 총산자수와 산육형질 등 표현형 및 유전체 자료 병합 입출력 폼을 완성</li> <li>○ 유전체자료의 QC 기준, 친자감별 및 부모찾기 프로그램을 이용하여 혈통파일을 수정하고 ssBLUP방법을 이용하여 유전체육종가를 추정하여 기록이 없는 후보돈에 대한 선발</li> <li>○ 돼지의 유전자 정보를 분석하여 정확한 육종가를 조기에 제시해 개량의 속도를 증가시킴</li> <li>○ 산자수 증대 병합 육종 프로그램을 완성하여 유전체 정보를 이용한 교배프로그램으로 개량의 효율성을 상당히 높임.</li> </ul>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 융합유전체마커에 의한 조기선발기술개발</li> <li>• 산업용 육종프로그램 개발을 통한 종돈의 기초 육종가에 의한 선발 기반 조성</li> <li>• 경제선발지수 개발에 의한 후보모돈 선발의 정확도 개선</li> <li>• 병합육종프로그램 개발을 통한 종돈의 조기선발, 후보모돈의 재선발 및 선발의 정확도 향상</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 품종개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 국제 경쟁력 있는 품종을 개발하여 로얄티 지불에서 벗어나 수입대체 및 수출기반 확립</li> <li>• 종돈의 조기 선발에 기인하여 많은 후보 종돈의 사육이 필요 없어 그에 따른 생산비 절감</li> </ul> </li> <li>○ 경제적 가치 증대 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 경제적으로 우수 종돈을 현재보다 저렴한 가격에 공급함으로써 종돈장의 수익증대</li> <li>• 일반농가의 생산비를 감소시켜 농가 수익을 증대시키는 효과</li> <li>• 우리나라 소비문화에 적합한 한국 버크셔의 생산성 확대로 외국산 삼겹살 수입 대체</li> <li>• FTA에 대응한 국내 양돈 산업의 안정화 및 식량안보를 꾀할 수 있음</li> <li>• 본 연구를 통하여 총 769억원의 부가가치 창출</li> <li>• 연간 버크셔 수입대체: 연간수입두수 200두 × 350만원/두 = 7억원</li> <li>• 차별화된 브랜드 버크셔 생산: 국내사육두수의 3%까지 증가(현재 일본은 5% 증가)</li> <li>• 향후 3년간 모돈 사육두수 600두 × 20두/MSY × 54만원 × 3년 = 194.4억원</li> <li>• 산자수·항병성 증대기술개발: 0.7두 증가 × 모돈두수 3000두 × 2.4회전 = 5040두 증가, 5040두 증가 × 54만원/두 ≒ 27.2억원</li> <li>• 육종 차별화 브랜드 생산 기반 조성: 기존 LYD → LYB</li> </ul> </li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	산자수	버크셔	항병성	육종	마커
영문핵심어 (5개 이내)	litter size	Berkshire	disease resistance	breeding	marker

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1장 연구개발과제의 개요 .....	2
1절 연구개발 목적 .....	2
2절 연구개발의 필요성 .....	2
3절 연구개발 범위 .....	7
2장 연구수행 내용 및 결과 .....	11
1절 연구수행 내용 및 결과 .....	11
2절 세부 실험 방법 .....	21
3절 전체 연구개발 추진 일정 .....	53
4절 연구개발 추진 체계 .....	59
5절 연차별 연구결과 .....	61
6절 경제적 성과 .....	265
7절 연구 개발 성과 .....	266
3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	289
1절 연구목표 및 수행 결과 .....	289
4장 연구결과의 활용 계획 등 .....	295
1절 연구 성과의 활용 분야 및 활용 방법 .....	295
붙임. 참고 문헌 .....	298

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

# 제 1장. 연구개발과제의 개요

## 제 1절. 연구개발 목적

### 1. 연구개발의 최종목표

가. 본 연구에서는 한국 최초로 개발하여 보유하고 있는 “육질이 우수한 한국 다산 버크셔 계통”을 활용하여 융합유전체 분자유종 기술로 산자수·항병성 증대 조기선발기술 및 육종가로 경제선발지수를 개발한 후, 병합육종프로그램에 의한 산자수·항병성 증대 진단 기술로 자돈 및 후보 모돈의 선발 및 계획교배로 산자수, 항병성이 우수한 한국 버크셔 품종을 개발하여 수입대체 및 수출을 위한 기반을 구축하고자 함.

- (1) 복당 총산자수 : '13년 현재 7두 → '18년 10두(년간 유전적개량량 0.5두)
- (2) 복당 이유두수 : '13년 현재 6두 → '18년 9.5두(년간 유전적개량량 0.5두)
- (3) 수태율 : '13년 현재 83% → '18년 93%(년간 유전적개량량 2%)
- (4) 근교계수 : 10%이하 유지
- (5) PRRS 항체 : '13년 현재 양성 → '18년 음성화 추진

### 나. 연구개발의 최종목표를 달성하기 위한 연차별 목표

- (1) 1차년도: 산자수 증대 선발기술개발의 기반 구축
- (2) 2차년도: 산자수 증대 조기선발기술 및 병합육종프로그램 개발
- (3) 3차년도: 산자수 증대 선발 기술 및 병합육종프로그램 재현성 검증
- (4) 4차년도: 산자수·항병성 증대 선발기술 및 병합육종프로그램 정립
- (5) 5차년도: 산자수·항병성 증대 선발 기술의 확립 및 버크셔 육종

## 제 2절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구의 필요성

가. 돼지의 산자수를 증진시키는 방안은 일차적으로 다음과 같은 요건을 충족해야 함.

- (1) 산자수가 많은 모돈을 선별하여 평균 다산성의 개량
- (2) 건강한 모돈에 의한 건강한 자돈의 생산을 통한 폐사나 발육 부진을 방지
- (3) 질병 저항성이 강한 모돈 및 자돈에 의한 폐사율의 개선

나. 이와 같은 모돈이나 자돈을 개량하기 위해 국내 산자수 증대를 위한 연구는 현재 대부분

이 전통 육종 방식을 활용하고 있으나, 이는 많은 노동력과 장기간이 소요되는 단점이 있음.

다. 최근에는 첨단생명공학기술의 급속한 발달로 다양한 분자마커를 활용하여 특정 형질에 대한 과학적인 설정기준을 마련하고 이를 통해 조기에 돼지를 선발함으로써, 전통 육종의 한계를 극복하기 위한 노력들이 생겨나고 있음.

라. 따라서 이러한 추세에 맞추어 우리나라 소비자의 기호에 적합한 한국 버크셔 계통의 산자수를 증대시키기 위해 산자수를 결정하는 융합마커의 발굴을 통한 분자유종 기술의 개발 및 실용화가 매우 중요한 시점임.

마. 최근 생명공학기술의 급속한 발달로 단편적 유전자 연구에서 탈피하여, 새로운 대용량 분석 패러다임을 적용함으로써, 대량으로 분자표지 정보를 처리 분석 할 수 있는 통합오믹스 분석 기술들이 등장하고 있음.

(1) SNP는 유전자 구조 및 발현, 그리고 단백질 구조 변화에 따른 유전자의 기능 변화를 초래할 수 있기 때문에 이것은 형질을 결정하는 중요한 유전체 마커 중 하나이며, 자손에게도 유전적으로 커다란 영향을 미칠 수 있기 때문에 개체 선발을 위한 좋은 소재임.

(2) RNA Seq은 단백질 코딩 유전자의 염기서열 정보를 대량으로 빠르게 얻을 수 있는 차세대 염기서열 분석 기술 중 하나이기 때문에 이러한 기술을 단백질 코딩 유전자 내의 non-synonymous SNP를 선택적으로 대량 확보하는데 적용할 필요가 있음.

(3) 후성유전체적 조절 물질인 메틸(CH<sub>3</sub>-)화에 따른 후성유전체 마커(DNA methylation)를 탐색하여, 번식능력에 대한 유전적 요인 외에 후성 유전체가 유전되기 때문에 오랜시간 환경에 의해 만들어진 후성 유전체 마커를 탐색하여 환경적 요인을 진단함으로써, 개량의 효과를 더욱 증대시킬 필요가 있음.

바. 이러한 융합유전체(유전체, 후성유전체, 전사체) 분석기술들을 활용하여 번식능력 연관 융합유전체마커를 개발하여 이를 개체의 선발 및 검정 기법 개발에 적용함으로써, 장기간 소요되던 기존 분자유종기술의 한계를 극복해 나갈 필요가 있음.

사. 또한, 돼지의 산자수·항병성에선 polygene이 영향을 미치기 때문에 유전자뿐만 아니라 다양한 요인을 포함시키는 육종가의 검사를 통해 경제선발 지수를 개발하여 산자수·항병성을 증대시킬 필요성이 있음.

아. 융합유전체 분석기술에 의해 확보된 대량의 번식능력연관 오믹스 분자마커들을 활용하여 정확성이 높은 유전능력 조기 예측 모형을 개발함으로써, 이를 번식능력 개량을 위한 중돈 선발 기술에 적용해 나갈 필요가 있음.

자. 대량의 융합유전체 마커들 사이의 번식능력에 대한 기능적 상호작용 네트워크와 표현형을 기반으로 하는 경제선발지수를 이용하는 병합육종프로그램을 개발하여 산자수가 증대된 중돈 선발기술에 대한 효능성 검정 기술 개발이 요구됨.

차. 최근 기후변화에 따라 전 세계적으로 나타나는 구제역, 조류독감(SARS) 및 신종플루(H1N1) 등과 같이 양돈 농가에 심각한 타격을 주는 질환들이 연이어 발생되고 있는 시점이며, 다변화되어 가고 있는 기후에 기인하여 질병이 다양화될 가능성과 이에 기인하는 기회 감염(opportunistic infection)이 만연될 위험성에 직면해 있음.

카. 따라서 돼지 항병성 증대를 위해서 본 연구에서는 선행연구에서 확보한 돼지 유전체 및 후성유전체 정보를 기반으로 융합유전체 정보를 확보하고자 함

다. 따라서 상기의 내용들을 종합해 볼 때, 융합유전체마커와 경제선발지수를 활용한 자돈 조기선발기술과 후보모돈 재선발 기법을 개발하여, 두 기술을 융합한 병합육종프로그램으로 종돈 선발의 정확성을 증가시키므로써, 산자수 증대 한국 버크셔 품종의 개발로 수입대체 및 수출기반조성을 도모하고자 함.

2. 경제적 · 산업적 중요성

가. 최근 국가간 FTA, DDA에 따라 돈육 수입이 확대될 전망이며, 이와 같은 원인으로 국내 양돈산업은 더욱더 어렵게 될 전망이다(Figure 1).

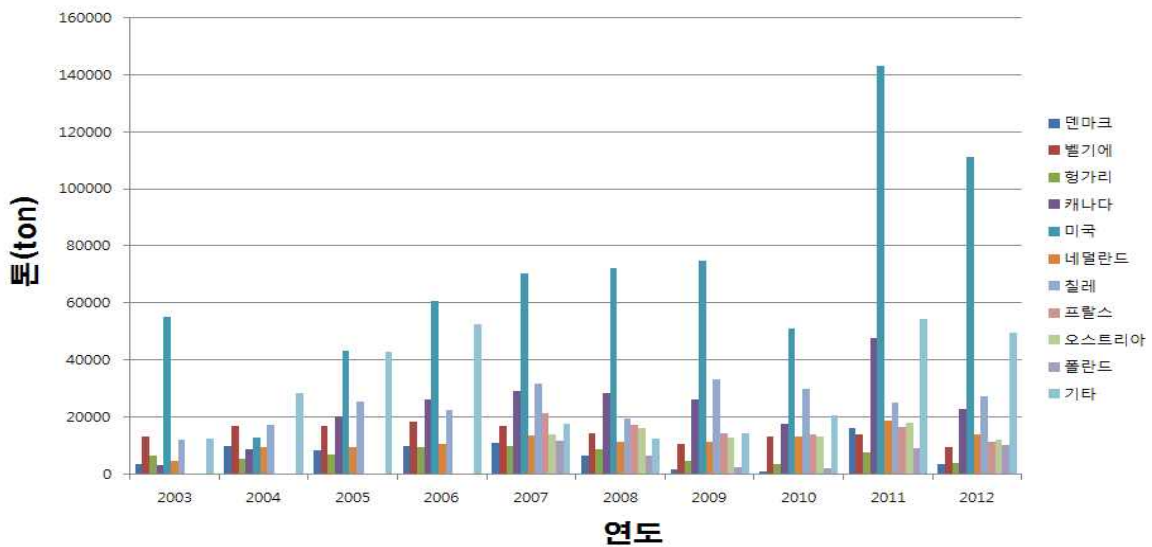


Figure 1. Import summary of pork meat.

나. Figure 1과 같이 돈육의 수입은 연도별로 지속적으로 증가하는 추세인 반면에 수출은 2003년을 제외하면, 매우 저조한 형편이고 아시아권에만 편중되어 있는 양상임. 특히, 2010~2012년 구제역에 기인하여 최근 수출이 전혀 없는 현황임(Figure 2).

다. 이러한 국내 양돈 산업의 현실 속에서도 돼지고기는 우리나라 축산물 소비량의 54%를 차지하며 가장 즐기는 육류 중 하나 임.

라. 우리나라 돈육의 소비성향은 구워먹는 문화를 선호하고 있어 돈육의 판매형태는 구워먹을 수 있는 부위인 삼겹살, 목등심, 갈비 등에 치중 되고 있음. 또한, 최근 한류유행에 기인하여 다양한 한국 음식이 국외에 시판되고 있는 추세이며, 한국인이 좋아하는 삼겹살도

그와 같은 추세를 반영하고 있기 때문에 국내시장이 포화상태가 된다면 수출을 위해 충분히 고려해 볼 필요성이 있는 것으로 판단됨.

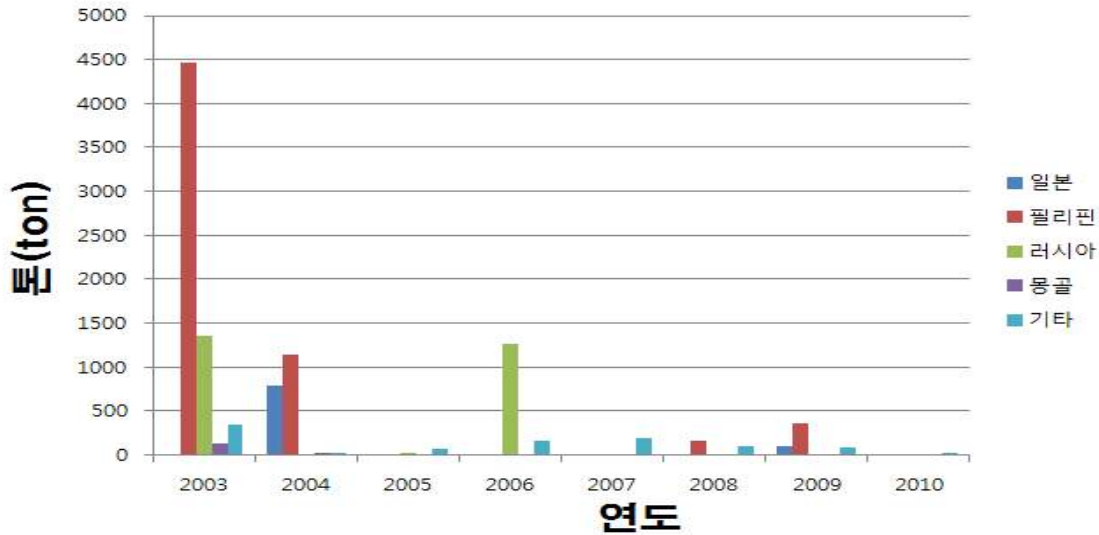


Figure 2. Export summary of pork meat.

마. 그러나 국내 사육 돼지의 95% 이상을 차지하고 있는 비육돈 생산형태인 LYD 교배조합으로 생산된 돼지고기 두당 정육량 중 구워먹을 수 있는 부위는 38.1%에 지나지 않아 수급 불균형을 초래하여 부위별 가격의 차이가 매우 큼(Table 1).

Table 1. 돼지의 부위별 중량 및 생산비율

부 위	중 량(kg)	비 율(%)	
정 육 (58.82 kg)	목등심	5.36	9.1
	삼겹살	10.11	17.2
	갈비	3.22	5.5
	항정살	3.35	5.7
	갈매기	0.35	0.6
	안심	1.15	1.9
	등심	7.05	12.0
	뒷다리	10.64	18.1
	앞다리	16.58	28.2
	등뼈	1.01	1.7
	합 계	58.82	100

자료 : 다산육종 2013년 자료

바. 또한 구워먹을 수 있는 부위가 부족하여 외국에서 구워먹을 수 있는 부위의 수입량이 지속적으로 증가하면서 국가 외화낭비를 초래 할 뿐만 아니라 국내 양돈시장을 더욱 어렵게 하고 있음.

사. 게다가 현재 사육되는 종돈은 대부분이 수입되고 있고, 이 수입 종돈(랜드레이스, 요크셔, 듀록 품종)은 외국에서 햄, 소시지와 같은 살코기 생산 위주로 품종이 육종된 것이어서 우리나라 돈육 소비 성향과는 맞지 않음.

아. 이와 같은 국내 양돈 산업의 문제점을 해결하기 위해 국내 소비자의 기호에 적합한 고품질 한국 다산버크셔 계통을 개발하였음.

**미디어다음**

뉴스 > TV박스 > 사회

**진주 산업대 한국최초 '다산 버크셔' 개발**

뉴스 > 뉴스 > 입력 2010.11.23 17:46



<미디어다음, 2010년 11월 23일>

**우리 입맛 맞는 한국 돼지 품종 개발 !**



**김철욱** 진주산업대 동물소재공학박사 교수

<KBS 뉴스, 2010년 11월 23일>

자. 그 결과 Table 2와 같이 한국인의 소비문화에 맞는 돈육을 생산할 수 있는 한국 다산 버크셔 5개 계통을 개발하여 (사)한국중축재량협회에 등록하였고, 등록된 5개 계통을 산업화하기 위해 다산육종에서 현재 사육 및 보급하고 있음.

Table 2. 돼지의 부위별 중량 및 생산비율

목표 형질	계통개발 이전의 형질 값		계통개발 이후 형질 값
	LYD 교잡종	버크셔종	
사후 pH24	5.65	5.75	5.9 이상
가열감량	25%	21%	18% 이하

자료 : “육질이 우수한 한국 버크셔 계통 육종” 과제 최종 보고서, 2011년

차. 한국 다산버크셔 계통은 육질이 우수하지만 낮은 산자수(9두)와 이유두수(7두)로 번식효율이 저조한 단점이 있음. 즉, 한국 다산버크셔 계통은 한국인의 돈육 소비문화에 적합한 장점에도 불구하고, LYD 교잡종에 비해 산자수가 낮기 때문에 일반 양돈 농가에 한국 다산버크셔 계통을 널리 보급시키는 것에 한계가 있음.

카. 돼지의 산자수는 다른 형질에 비하여 매우 높게 평가되지만, 상대적으로 유전력이 낮고 개량에는 어느 정도 한계가 있어 쉽게 이루어지지 못하고 있는 실정임.

타. 최근에는 산자수와 이유두수 개량을 위한 돼지 산자능력 검정사업의 중요성이 재인식되어 국내에서는 물론 특히 유럽에서는 산자수가 많은 모돈의 집단을 만들어 그 집단에서 지속적으로 우수계통을 육성하고 있는 데 이를 하이퍼 프로리픽 라인(Hyper-prolific line)이라고 함.



- 파. **암돼지 개량**은 주로 **번식 능력과 모돈의 강건성**에 주안점을 두어 개량하며 그 주요 항목은 산자수, 포유개시두수, 생시체중, 21일령 복당체중, 21일령 육성수 등임. 본 조건을 충족하여 번식능력이 갖추어진 개체 선발은 모돈의 내구성과 강건성을 충분히 고려한 성장 단계별로 제1차선발은 체중 30 kg 때가 좋으며, 제2차 선발은 체중 90 kg일 때가 가장 적합함.
- 하. 미국, 영국, 일본 등의 선진국에서도 다산성 계통의 육성을 위하여 중국 재래종인 메이시안(Meishan)종의 유전자를 수입하여 돼지 산자수 개량에 많은 연구가 활발히 진행되고 있음. 최근 **글로벌 전염병**은 전 세계 시민들의 **안전**을 위협하는 **즉각적이고 현실적인 안보 이슈로 등장**하고 있음(2040년을 향한 대한민국의 꿈과 도전 과학기술 미래비전, 2010, 교육과학기술부, KISTEP).
- 가. 구제역, 조류독감(SARS) 및 신종플루(H1N1)의 사례에서 보듯이, **전염병**은 국제 여행객을 통해 **전 세계에 급속히 확산**되고, 심지어는 국지적으로 경제 활동이나 사회 체제를 마비시킬 수도 있음.
- 나. 또한, 국내 양돈산업은 **계절의 다변성**으로 인한 **환경적인 스트레스**에 기인하여 상대적으로 질병에 대한 **저항성이 매우 낮아 생산성 저하, 폐사율 증가 및 전염병 확산의 위험성**을 항상 내포해 왔음.
- 다. 최근 **소모성 질환**의 증가에 따른 **양돈 전반에 걸친 폐사율 증가**로 인한 생산성 저하는 수입개방 및 생산비용 증가와 더불어 양돈 산업의 기반을 흔들고 있는 중요한 문제임.
- 라. 이와 같이 낮은 질병 저항성은 신종 질병의 발생을 및 전파율이 높은 악순환을 되풀이함에도 불구하고, 항세균성, 항바이러스성, 면역능력 개선 등과 같이 **항병성이 우수한 돼지 품종이 현재 전무한 상태**임.
- 마. 따라서 **한국인의 소비문화와 한류 유형을 국외에 유도할 수 있는 돼지를 양돈농가에 널리 보급하여, 선호부위에 대한 생산성을 확대시켜 수급불균형을 해소하고, 국가 간 FTA에 대응한 양돈농가의 국제 경쟁력 제고를 위해서, 한국 다산버크셔 계통의 산자수를 증대시키기 위한 기술 개발이 반드시 필요함.**
- 바. 또한, 기후변화에 따른 신종 질병과 식량위기에 적극적으로 대처하고 사회 안정화에 기여할 수 있도록 현재의 사육환경시스템에서 돼지의 항병성을 증대시킬 수 있는 기술의 개발이 절실한 시점임.

## 제 3절. 연구개발 범위

### 1. 1차년도: 산자수 증대 선발기술개발의 기반 구축

가. 기존의 연구자료 및 결과를 통합한 데이터베이스(DB) 구축

나. 육종가(모돈 이력, 강건성, SNP 등)를 활용한 버크셔 기초 돈군 자료 정립

다. 버크셔 산자수 우수 증돈 선발(G0) 및 계획교배

라. 산자수 연관 후보유전체마커 탐색 및 확보

마. 산자수 연관 후보후성유전체마커 탐색 및 확보

바. 산자수 연관 육종프로그램 개발

(1) 기초 통계량 분석

(2) 유전능력 평가 프로그램 개발

(3) 육종프로그램 정확도 분석

사. 표현형조사에 의한 산자수 증대 경제선발지수개발

아. 자돈 생산(G1)

## 2. 2차년도: 산자수 증대 조기선발기술 및 병합육종프로그램 개발

가. 경제선발지수에 의한 G1우수 후보모돈 선발 및 계획 교배

나. 산자수 증대 조기선발용 유전체마커 개발

다. 산자수 증대 조기선발용 후성유전체마커 개발

라. 융합유전체마커 상호작용 네트워크 모델 개발

마. 유전능력 평가 모형 개발

바. 융합유전체마커에 의한 산자수 증대 조기선발기술개발

사. 융합유전체마커와 경제선발지수를 활용한 병합육종프로그램 개발

(1) 병합육종능력평가 프로그램 설정

(2) 병합육종프로그램 정확도 분석

(3) 병합통계량 분석 및 병합 시뮬레이션 구축

아. 자돈 생산(G2)

## 3. 3차년도: 산자수 증대 선발 기술 및 병합육종프로그램 재현성 검정

가. 융합유전체마커에 의한 G2 자돈 조기선발

나. 경제선발지수에 의한 G2 후보모돈 재선발 및 계획교배

다. 산자수 증대 유전체마커의 재현성 검정

- 라. 산자수 증대 후성유전체마커의 재현성 검정
- 마. 산자수 증대 융합유전체마커의 재현성 검정
- 바. 산자수 증대 경제선발지수의 재현성 검정
- 사. 병합육종프로그램 선발기법의 재현성 검정
- 아. 유전능력 평가 모형 보완
- 자. 자돈 생산(G3)

#### 4. 4차년도: 산자수·항병성 증대 선발기술 및 병합육종프로그램 정립

- 가. 융합유전체마커에 의한 G3 종돈 조기선발
- 나. 항병성관련 후보유전체마커의 탐색 및 확보
- 다. 후보모돈의 항병성관련 유전 형질 검사 및 선별
- 라. 경제선발지수에 의한 G3 후보모돈의 재선발 및 계획교배
- 마. 산자수 증대 유전체마커의 검정기술 정립
- 바. 산자수 증대 후성유전체마커의 검정기술 정립
- 사. 산자수 증대 융합유전체마커의 검정기술 정립
- 아. 산자수 증대 경제선발지수의 검정기술 정립
- 자. 유전적 변이와 genomic context의 상관도 분석
- 차. 병합육종프로그램의 선발기법을 이용한 개체 능력 평가
- 카. 병합육종프로그램을 통한 산자수 증대기술의 정립
- 타. 자돈 생산(G4)

#### 5. 5차년도: 산자수·항병성 증대 선발 기술의 확립 및 버크셔 육종

- 가. 융합유전체마커에 의한 G4 종돈 조기선발
- 나. 경제선발지수에 의한 G4후보모돈 재선발 및 계획교배
- 다. 산자수·항병성 증대 유전체마커의 검정기술 확립
- 라. 산자수·항병성 증대 후성유전체마커의 검정기술 확립
- 마. 산자수·항병성 증대 융합유전체마커의 검정기술 확립

- 바. 산자수·항병성 증대 경제선발지수의 확립
- 사. 유전능력 평가 모형 확립
- 아. 병합육종프로그램 추정 육종가의 산출 및 정확도 비교
- 자. 병합육종프로그램의 확립
- 차. 자돈 생산(G5)
- 카. 산자수·항병성 증대기술의 확립 및 버크셔 육종

## 제 2장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1절. 연구수행 내용 및 결과

#### 1. 연구수행 내용 및 결과의 요약

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2013)	융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발	산자수 증대 후보유전체마 커 확보와 차등발현 유전자(DEG) 정보 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ G0종돈의 태반으로부터 확 보된 mRNA의 pooling</li> <li>○ mRNA의 전처리 및 RNA-seq</li> <li>○ 확보된 후보유전자의 다양 한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 대 한 각종 변이(SNV, Indel) 의 탐색</li> <li>○ 산자수 증대 후보유전체마 커 확보</li> <li>○ 산자수 우열집단 간의 DEG 정보 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HBB를 포함한 278 DEGs 확보</li> <li>• 낮은 및 높은 산자수에 서 각각 82,653 및 89,678 SNPs 확보됨. 이 들 중에서 missense와 nonsense, silent mutation이 각각 8,375/7,803, 33/37, 18,623/17,686(낮은산자수 /높은 산자수)가 확보됨.</li> </ul>
		산자수 증대 후보후성유전 체 마커 탐색 및 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ G0종돈의 태반조직에서 확 보된 gDNA의 pooling</li> <li>○ Bisulfite 처리 및 nucleotide seq</li> <li>○ 게놈 수준에서 DNA 메틸 화 분석</li> <li>○ 확보된 후보유전자의 다양 한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 따 른 DNA메틸화 부위의 프 로파일링</li> <li>○ 후보후성유전체마커 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 17,704 hypomethylated DMR과 22,216 hypermethylated DMR을 확보</li> <li>• ANKH를 포함하는 총 37 후보 유전자의 확보</li> </ul>
	병합육종 프로그램을	산업용 병합 육종프로그램	○ 기존에 수행된 연구자료의	• 총산자수와 실산자수에

	<p>활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량 시스템 개발 및 버크셔 육종</p>	<p>개발</p>	<p>데이터베이스 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국 버크셔 모돈집단(600두 규모)에서 산자수 조사 및 혈통정보 확보</li> <li>- 혈통정보에 따른 산자수 DB 구축</li> <li>- 구축된 DB를 바탕으로 산자수 우열집단 조성</li> <li>○ 산자수 증대 산업용 육종 프로그램 개발</li> <li>- 기초돈군조성(G0): 상하 각 200두 돈군 조성</li> <li>○ 산자수 증대 통합 육종 시스템 구축</li> <li>- 통합 DB 구축: 기수행된 연구자료 + 검정자료</li> <li>- 조사된 raw data를 활용한 실용적 DB 구축</li> <li>○ 유전능력평가 프로그램 개발</li> <li>○ 시뮬레이션 분석 및 계획교배 프로그램 개발</li> <li>○ 육종프로그램 정확도 분석</li> <li>○ 육종가 경제선발지수 개발</li> <li>○ 계획교배, 사양관리 및 자돈생산(G1)</li> <li>○ 정액성상검사 : 년 2회실시</li> </ul>	<p>대한 유전력은 각각 0.072와 0.067로 추정되었으며, 총산자수와 실산자수간의 유전상관은 0.99로 매우 높게 나타났음. 한편, 이유두수에 대한 유전력은 거의 0에 가깝게 추정되어 유전적 요인보다는 대부분이 환경적 요인에 기인함</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 육질 및 성장형질에 대한 유전력은 0.15~0.57의 범위를 나타내었으며, 육즙손실과 ph45m의 유전력은 각각 0.45와 0.48로 개량 형질로써 가능성을 나타내었음.</li> <li>• 총산자수와 실산자수에 대한 육종가의 범위는 각각 -1.54~1.85두와 -1.24~1.32이며, 유전적 개량량의 추세는 나타나지 않음</li> <li>• Ph24의 경우 변이가 매우 작아서 개량형질로서의 재검토가 필요하며, 가열감량에 대한 육종가는 -2.33~2.13의 범위를 나타냄.</li> <li>• 선발지수 = ph24h 육종가×70 - 가열감량 육종가로 하여 선발지수값을 구함</li> <li>• 번식 및 육질·산육 성적 자료에 대한 이상치 자료들을 제거하고 데이터</li> </ul>
--	--	-----------	---	--

				<p>베이스를 구축한 후 새로이 혈통자료를 생성하였으며, 데이터생성에서부터 결과물까지 사용자 인터페이스를 구축함으로써 프로그램의 효율성을 극대화 하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 개량목표 달성을 위한 집단특성 분석을 추가하였으며, 원하는 시점에 유전적 개량량의 추세를 분석하며, 향후 유전체 자료의 추가에 따른 부분을 고려하였음</li> </ul>
2차년도 (2014)	융합유전체 마커에 의한 한국버크셔의 산자수 증대 기술개발	<p>산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현유전자 확보</p>	<p>○ RNA-seq을 통하여 산자수에 따른 차등 발현 유전자 789개 DEG를 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G1 종돈의 자궁으로부터 확보된 mRNA의 pooling</li> <li>• mRNA의 전처리 및 RNA-seq수행</li> <li>• 산자수 증대 후보 유전체 마커 확보</li> <li>• 산자수 우열집단간의 DEG정보 확보</li> </ul>
		<p>산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보</p>	<p>○ 산자수에 따른 DMR분석을 통하여 hypermethylation DMR을 2,230개, hypomethylation DMR 2,160개 확보</p> <p>○ DMR이 존재하는 유전자를 탐색해 본 결과 130여개의 후보 유전자를 동정</p> <p>○ methylation과 expression의 연관성을 분석하여 산자수 연관 통합 유전체 마커를 선발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G1종돈의 자궁조직에서 확보된 gDNA의 pooling</li> <li>• bisulfite처리 및 nucleotide seq</li> <li>• 계놈 수준에서 DNA methylation 분석</li> <li>• 확보된 후보 유전자의 다양한 유전체 부위 (promoter, UTR, intron, exon)에 따른 DNA methylation 프로파일링</li> <li>• 후보 후성유전체</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ DMR에 의해 발현량이 조절되는 총 78개 유전자를 확보</li> </ul>	<p>마커 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA-seq과 Bisulfite-seq 결과로 통합 유전체 마커 선발 기술을 이용하여 methylation과 expression의 상관관계가 있는 유전자들을 선발</li> </ul>
		산자수 증대 후보 단백질체 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 태반 조직으로부터 차등 발현하는 단백질을 LC-MS/MS 분석을 통하여 확보</li> <li>○ PSA와 RBP4를 포함한 19개 차등 발현 단백체를 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수 연관 유전체의 통합적인 분석을 위하여 Protein 수준에서 산자수 연관 단백체를 Shotgun proteomics 방법으로 분석.</li> <li>• label-free 방법을 이용하여 산자수 관련 차등 발현 단백체를 분석</li> </ul>
		산자수 관련 유전자의 SNP 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 관련 유전자의 SNP를 탐색하여 10개 SNP 확보</li> <li>○ 단백질체에 대한 SNP는 17개 확보</li> <li>○ 전사체에 대한 SNP는 8개 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수 관련 유전자의 SNP 탐색 및 확보</li> <li>• 산자수에 따른 차등 발현 유전자의 SNP 탐색</li> <li>• 프로테오믹스 결과로 얻은 차등 발현 단백체를 암호화하는 유전자의 SNP 탐색</li> </ul>
병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종	G1 후보모돈선발		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1차년도에 개발된 경제선발지수로 후보모돈 선발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1차년도에 개발된 경제선발지수로 후보모돈 선발</li> </ul>
	산자수 증대 연관 유전자군에 대한 조절네트워크 분석		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 경남과학기술대학교 융합 유전체 팀에서 제공한 유전체로 연관 불평형 패턴 분석 및 유효집단 크기의 추정을 통한 집단 모수 분석</li> <li>○ 집단모수의 추정 및</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전체 선발, 연관 불평형 패턴 분석 및 유효집단 크기의 추정을 통한 실험 집단에 대한 집단 모수 분석</li> <li>• 집단 모수의 추정 및 유전체 단위의 병합</li> </ul>



		<p>유전체단위의 병합시뮬레이션 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 인접 SNPs간 평균 <math>r^2</math>값은 0.28, 유효집단크기는 1~5세대에 31두로 추정됨</li> <li>○ 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.074와 0.071로 추정, 이유두수와 포유기간과 발정재귀일령에 대한 유전력은 0.01~0.04로 낮게 추정됨.</li> </ul>	<p>시뮬레이션 (coalescent simulation) 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 연관분석을 통한 후보 유전자군에 대한 데이터베이스 기반의 기능적 분석(functional analysis)</li> </ul>
	경제선발지수의 검정 및 보완	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 경제 선발 지수의 검정 및 보완</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 경제선발지수의 검정 및 보완</li> </ul>
	산자수 증대 병합육종프로그램개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 경남과학기술대 융합유전체팀에서 제공한 융합유전체를 이용하여 개체별 융합 유전체 추정육종가의 산출</li> <li>○ 융합유전체 추정 육종가의 정확도 분석</li> <li>○ 추정육종가와 비교를 통한 정확도 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 융합유전체 선발 분석 기법을 통한 개체별 융합유전체 추정육종가의 산출</li> <li>• 융합유전체 추정육종가의 정확도 분석</li> <li>• 추정육종가 (Estimated Breeding Value (EBV))와의 비교를 통한 정확도 분석</li> <li>• 산자수 증대 표현형 추정육종가와 융합유전체 추정육종가를 이용한 병합육종프로그램 개발</li> </ul>
	품종 육종 및 정액검사	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 총산자수에 대한 이유두수, 포유기간 및 발정재귀일령의 표현형 상관계수는 거의 0에 가까우며, 유전상관의 경우</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 계획교배, 사양관리 및 자돈생산(G2)</li> <li>• 정액성상검사 : 년 2회 실시</li> </ul>

			<p>발정재귀일령은 부(-)로 나타남</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 총산자수에 대한 출생년도별 유전적 개량량의 추세는 유의적인 수준(<math>p &lt; 0.05</math>) 에서 나타나지 않았음</li> <li>○ 계획 교배, 사양관리 및 자돈생산 (G2)</li> <li>○ 정액 정상검사: 년 2회 실시</li> </ul>	
3차 년도 (2015)	융합유전체마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발	자돈 조기 선발 (G2) 정보 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ PCR-RFLP, RT-PCR, bisulfite seq 등 수행</li> <li>○ 융합유전체마커의 재현성 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 태반 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 10개 중 2개에 대하여 RT-qPCR로 발현 검정</li> <li>• 자궁 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 8개 중 5개 검정</li> <li>• 9개의 deletion mutant SNP에 대하여 PCR-RFLP수행 1개 SNP에 대해서 통계적 유의성 확인</li> <li>• 8개 산자수 연관 유전자의 SNP에 대해서 PCR-RFLP수행 4개 SNP에 대해서 유의성 확인</li> </ul>
		산자수 증대 조기 선발 기술의 재현성 검증 경제 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 증대 유전체마커 재현성 검정</li> <li>○ G2 종돈에서 gDNA 샘플 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모든 혈액 132두와 136두의 gDNA로부터 산자수 연관 유전자 5개의 SNP에 대하여 통계적 재현성을 검정</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ PCR-RFLP, sequencing 등을 이용한 genotype 분석</li> <li>○ 유전체마커의 재현성 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수 연관 유전자의 SNP 5개에 대하여 특허 출원</li> </ul>
		지수의 재현성 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 증대 후성유전체마커 재현성 검정</li> <li>- G2 종돈의 gDNA 샘플 확보</li> <li>- Bisulfite sequencing을 이용한 DNA 메틸화 분석</li> <li>- 후성유전체마커의 재현성 검정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수 증대 후성 유전체 마커에 대하여 Bisulfite-PCR sequencing으로 재현성을 검정 하고 MSRE-PCR방법으로 진단 마커로서의 메틸화를 분석함</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ SNVs의 생화학적 기능 분석</li> <li>- SNVs를 포함한 유전자의 클로닝 및 단백질 분리</li> <li>- 분리된 단백질들의 생화학적 기능 분석 (효소활성 측정, 기질 결합 분석, 기질 해리 분석, 생리적 기능 등)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 우선 선발 하여 molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명</li> </ul>
병합육종 프로그램을 활용한 한국 다산 머크서 산자수 개량 시스템 개발 및 머크서 육종		산업용 병합 육종 프로그램 검증 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 경제 선발 지수의 재현성 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발정재귀일령의 유전력을 추정한 결과 0.004로 선발 지수식에서 제외하고 총산산수만 활용</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다산성 유전자 네트워크 모델링</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ssBLUP을 적용하여 개체의 유전체 육종가 및 각 SNP의 effect 추정</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발 마커의 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 후보돈 60두에 대한 유전체 육종가를 추정 후 선발</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 병합 육종 프로그램의 재현성 검정 및 개선</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SNP 중복 아이디 검색</li> <li>• 친자감별 프로그램</li> <li>• 부모찾기 프로그램</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 품종 육종 및 정액 검사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 보유중인 웅돈 13두 검사</li> <li>• 육안관찰 및 pH 삼투압측정</li> </ul>
4차 년도 (2016)	융합유전체마 커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발	자돈 조기 선발 (G3) 정보 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ MSRE-PCR, PCR-RFLP, RT-PCR 등 수행</li> <li>○ 융합유전체 마커의 재현성 검증을 통한 검정기술 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 후성유전체 마커, 유전체 마커, 전사체 마커의 확증</li> </ul>
		산자수 증대를 위한 융합유체 마커의 재현성 검증 및 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 증대 후성유전체 마커의 재현성 검증</li> <li>○ G3 종돈에서 gDNA 샘플 확보</li> <li>○ MSRE-PCR을 이용하여 산자수에 대한 유전자별 메틸화 상태 확인</li> <li>○ 산자수 형질과 메틸화 상태 간의 통계적 유의성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모든 혈액 140두와 30두의 gDNA를 이용하여 산자수 연관 DMR 유전자에 대한 재현성 검증 및 통계적 유의성 확인</li> <li>• 산자수 증대 후성유전체 마커 4개 확립</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수 증대 유전체 마커의 재현성 검정</li> <li>○ G3 종돈에서 gDNA 샘플 확보</li> <li>○ PCR-RFLP를 이용한 유전자형 분석</li> <li>○ 산자수 형질과 유전자형간의 통계적 유의성 확인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모든 혈액 29두의 gDNA를 이용하여 산자수 연관 유전자의 SNP에 대한 재현성 검증 통계적 유의성 확인</li> <li>• 산자수 증대 유전체 마커 5개 확립</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항병성 증대 전사체</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수가 상/하위 그룹의</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 마커의 확립</li> <li>○ G1 종돈에서 total RNA 샘플 확보</li> <li>○ RT_PCR를 이용한 유전자별 전사체 발현 양상 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자궁 조직에서 항병성 연관 DEG의 발현양상 확인</li> <li>• 항병성 증대 전사체 마커 5개 확립</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ SNVs의 생화학적 기능 분석</li> <li>○ SNVs를 포함한 유전자의 클로닝 및 단백질 분리</li> <li>○ 분리된 단백질들의 생화학적 기능 분석 (효소활성 측정, 기질 결합 분석, 기질 해리 분석, 생리적 기능 등)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 선발</li> <li>• molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명</li> </ul>
산자수 증대 선발 기술 및 병합 육종 프로그램 정립	병합 육종 프로그램 정립	○ 총산자수에 대한 개량도 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1산차의 총산자수에 대한 개량도는 2014년 대비 1.45두 증가</li> </ul>
		○ 병합육종프로그램의 검정, 보완 및 정립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 총산자수 등 표현형 및 유전체자료 입출력 폼 완성</li> <li>• 유전체자료의 QC 기준 완성</li> <li>• 친자감별 및 부모 찾기 프로그램 추가 완성</li> <li>• 병합육종평가자료 출력 완료</li> <li>• 보고서 출력 보안</li> </ul>
		○ 병합 육종 프로그램을 활용한 유전능력 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ssBLUP을 적용하여 산자수에 대한 개체의 유전체 육종가 및 각 SNP의 effect 추정</li> </ul>
		○ 경제선발지수의 재현성	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 총산자수와</li> </ul>

			검증	생존산자수에 대한 유전체육종가를 이용하여 후보돈을 선발
			○ 정액성상 검사	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 보유중인 웅돈 9두 검사</li> <li>• 육안관찰 및 pH 삼투압 측정</li> </ul>
5차년도 (2017)	산자수 증대 선발 기술의 확립 및 보급	산자수 항병성 증대 선발 기술의 확립	○ 융합유전체마커에 의한 G4 종돈 조기선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 기 확보된 산자수 연관 유전체 마커 및 후성유전체 마커를 활용하여 조기 선발하여 계획 교배를 실시</li> <li>• 자돈의 유전자 검사를 통한 유전자 고정을 확인</li> <li>• 젓꼭지 개수가 15-16개로 증가되어 있어 산자수 뿐만아니라 포유능력 증대까지도 확인하였음.</li> </ul>
			○ 경제선발지수에 의한 G4후보모돈 재선발 및 계획교배	
			○ 산자수·항병성 증대 유전체마커의 검정기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세대추적을 통하여 산자수 연관 통합 유전체 마커의 분석을 수행하였으며 이를 토대로 산자수 증대 유전자 마커를 확립하였음.</li> </ul>
		○ 산자수·항병성 증대 후성유전체마커의 검정기술 확립		
			○ 산자수·항병성 증대 융합유전체마커의 검정기술 확립	
	산자수 개량 선발 기술의 확립 및 보급	산자수가 많은 버크셔 육종	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 산자수·항병성 증대 경제선발지수의 확립</li> <li>○ 유전능력 평가 모형 확립</li> <li>○ 병합육종프로그램 추정 육종가의 산출 및 정확도 비교</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 버크셔의 유전체 정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량 시스템을 구축하기 위해 porcine 60k bead chip자료를 1,908두를 생성하였음.</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 병합육종프로그램의 확립</li> <li>○ 자돈 생산(G5)</li> <li>○ 산자수·항병성 증대기술의 확립 및 버크셔 육종</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• final reports에서 plink form 으로 변환 하고 평가자료 형태로 출력하고 총 산자수와 산육형질 등 표현형 및 유전체 자료 병합 입출력 폼을 완성</li> <li>• ssBLUP을 이용하여 유전체 육종가를 추정하여 후보돈의 선발</li> </ul>
--	--	--	--	---

다음과 같은 최종 연구 결과를 확보하였음.

1. 산자수-항병성 연관 통합 유전체 마커 발굴
2. 산자수 진단 유전자 선발 키트 개발
3. 병합육종 프로그램 개발
4. 산자수가 증가된 다산 버크셔종 개발 (등록 준비중)

## 제 2절. 세부 실험 방법

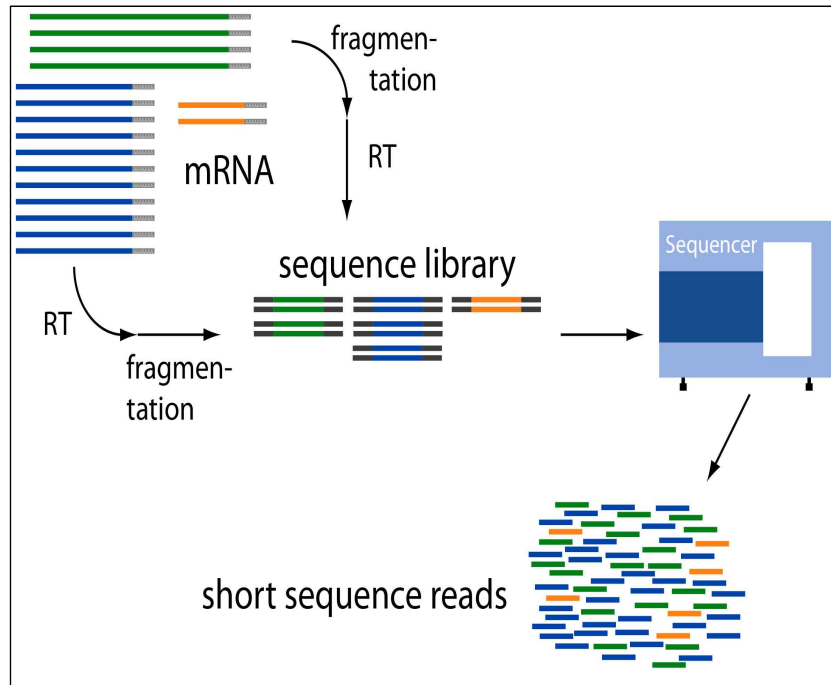
1. 융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발

### 가. mRNA sequencing에 의한 산자수 연관 DEG 분석

#### (1). 시료 채취 및 mRNA preparation

샘플의 채취는 전라북도 남원시에 소재하는 다산육종의 버크셔 모돈으로부터 수행했다. 산자수 연관 차트를 참조하여 평균 산자수가 11두인 high group (higher litter size)과 평균 산자수가 7두 인 low group (lower litter size)에 대해 분만 직후에 태반을 수거하고 동일 부위에 일정량을 절취한 후 액체질소로 급 냉동하였다. Total RNA는 태반, 자궁 조직의 일정량을 절취한 후 TRI-reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 분리하였다. mRNA는 RNA-Seq sample preparation kit (Illumina, Inc., San Diego, CA; Jung et al., 2012)에 의해 수행되었다.

산자수 연관 후보유전체마커의 탐색을 위해 RNA Seq에 대한 전체적인 흐름은 Figure 1과 같다.



**Figure 1.** Overview of next-generation transcriptome sequencing.

## (2). mRNA sequencing protocol (Illumina TruSeq RNA prep kit)

RNA 정제도는 NanoDrop8000 spectrophotometer에서 총 RNA extract의 1ul를 분석하는 것에 의해 결정되었다. 총 RNA integrity는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer를 사용하여 체크되었으며, RNA integrity Number (RIN) 값으로써 8이상 것을 기준으로 하였다. mRNA sequencing libraries는 manufacturer's instructions (Illumina TruSeq RNA Prep kit v2)에 따라서 조제되었다. mRNA는 총 RNA 2ug를 사용하여 2회 반복 정제되었고, poly-T oligo-attached magnetic beads를 사용하여 정제되었고, 단편화되었다. 단편화된 RNA 조각은 무작위 hexamers (random hexamers)로 primer되었고, reverse transcriptase에 의해 1<sup>st</sup> cDNA로 역전사되었다. RNA template는 제거되었고, dsDNA가 합성되었다. 말단 수복(end repair), A-tailing, adaptor ligation, cDNA template purification, PCR에 의해 정제된 cDNA의 enrichment가 수행되었다. 증폭된 libraries의 질은 capillary electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent)에 의해 입증되었다.

SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용에 의한 qPCR 다음에, pool에 동일한 양으로 tag된 libraries와 병합하였다. Cluster generation은 cBot automated cluster generation system (Illumina)에 flow cell에서 수행되었다. Flow cell은 HISEQ 2500 sequencing system (Illumina)에 loading되었고, 2x100bp read length로서 sequencing이 수행되었다.

## (3). 전사체 정보 분석 방법

### (가). 필터링



이 연구에서는 낮은 품질의 서열을 제거하기 위해서 먼저 서열 정보 중 N으로 나타난 염기의 비율이 전체 서열의 10% 이상 포함되어 있거나, Q20 미만의 염기가 40%이상인 리드가 제거되었으며, 평균 품질이 Q20 이하인 리드 역시 제거 하였다. 필터링 전 과정은 내부에서 제작된 프로그램에 의해서 수행되었다.

#### (나). 서열 정렬

서열 정렬 및 분석에 사용된 참조 유전체는 Ensembl (Flicek P. et al., 2013)에서 제공된 정보를 이용하였으며 72버전이 사용되었다. 필터링된 서열은 STAR 2.3.0e (Dobin et al, 2013)를 이용하여 유전체 서열에 정렬되었으며, 서열 정렬과정에서 ensembl 72버전의 유전자 정보가 사용되었다.

#### (다). 발현량 측정

발현량 측정은 Cufflinks v2.1.1 (Trapnell C. et al, 2010)를 이용하여 계산되었다. 발현량 측정을 위해서 ensembl 72 버전의 유전자 정보가 사용되었으며, non-coding 유전자 영역이 -mask 옵션을 이용하여 발현량 측정에서 제외하였다. 발현량 측정의 정확성을 높이기 위하여 multi-read-correction과 frag-bias-correct 옵션이 추가로 사용되었으며, 다른 옵션은 기본값으로 사용되었다.

#### (라). DEG 분석

특이발현 유전자 분석을 위해서 HTSeq-count v0.5.4p3(Anders S. et al, 2014)을 이용하여 각 유전자의 리드 숫자가 계산되었으며, intersection-nonempty 규칙과 Paired-end 서열을 고려한 계산이 이루어졌다. 계산된 각 유전자의 리드 숫자를 이용하여 TCC(Sun J. et al, 2013)를 이용한 특이 발현 유전자 분석을 수행하였다. TCC 옵션은 반복을 고려한 iDEGES/edgeR 방법을 이용하였으며, 특이발현 유전자 선택은 multiple-testing 과정에서 생기는 오류를 보정한 Q-value를 기준으로 하였으며 0.05 미만을 기준값으로 하였다.

#### (마). Gene Ontology 분석

Gene Ontology(GO)는 유전자의 특성을 Biological process(BP), Cellular Component(CC), Molecular Function(MF)의 3가지 기준에서 분류한 데이터베이스로 현재 선택된 유전자가 가지고 있는 기능에 대한 정보를 제공해 준다. 특이발현 유전자 분석으로 선택된 유전자의 특성을 알기 위해서 Gene Ontology를 이용한 경향성 분석을 수행하였으며, Fisher의 정확성 검증 (Fisher R. A., 1922)을 이용하여 p-value<0.001을 기준으로 유의미한 Gene Ontology 분류를 선택하였다.

### 나. Bisulfite sequencing에 의한 whole genomic methylation 분석

#### (1). Genomic DNA preparation

공시된 버크셔 산자수 high와 low 샘플로부터 Wizard genomic DNA purification kit (promega, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 냉동 태반, 자궁조직은 액체질소의 존재하에서 grinding한 후, 10~20mg에 cell lysis solution 600 $\mu$ l을 첨가한다. 65 $^{\circ}$ C에서 15~30분

간 배양한 후, 17.5ul 20mg/ml proteinase K를 첨가하여 55°C에서 gentle shaking으로 overnight 또는 3시간(1시간 간격으로 vortexing) 동안 배양한다.

실온으로 cooling 한 후, 200 ul protein precipitation solution을 첨가하고 20sec 동안 high speed에서 vortexing한다. 5분 동안 ice에서 chill하여, 13,000~16,000xg에서 4min 동안 원심 분리한다. 침전된 단백질은 tight white pellet를 형성한다. DNA를 유지하는 상등액을 주의 깊게 회수하고, 600ul isopropanol을 첨가한다. DNA가 보일 수 있는 형태인 white thread-like strands를 형성할 때까지 inverting에 의해 solution를 gently mix한다. 실온에서 13,000~16,000 xg에서 1min 동안 원심분리한다. DNA는 작은 white pellet이고, 상등액은 주의 깊게 decanting하여 제거한다. 70% 에탄올을 600ul 첨가하고, DNA를 세척하도록 몇 번 gently inverting한 후, 13,000~16,000xg에서 1min 동안 원심분리한다. 에탄올을 완전히 제거하고, 건조하여 실험에 사용한다.

## (2). Genomic DNA isolation

준비된 genomic DNA 샘플들에 대한 quality control(QC)를 위해, Nanodrop(Tecan)을 이용한 OD값(기준치: 260/280 > 1.6, 260/230 > 1.6) 및 Quant-iT BR assay kit (Invitrogen) fluorescence 농도값(기준치 6ug 이상)을 측정했다. QC에 통과된 Genomic DNA는 sonication 처리를 통해 100-300bp 단편으로 절단했다. 각 DNA fragment는 Paired-End DNA Sample Prep Kit(Illumina; San Diego, CA, USA)을 이용하여 end-repair, 3'-A overhang, adaptor ligation을 수행하였다. 200-300bp의 DNA 단편들에 대해 gel extraction kit (Qiagen)을 이용하여 size-selection을 실시하였다. EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymoresearch)을 이용하여 2ug Input들에 대해 denaturation, Bisulfite conversion, Desulfonation을 수행했다. 회수된 Bisulfite-converted DNA는 PCR amplication을 통해 우라실(unmethylated cytosine은 우라실로 변환됨)을 티민으로 전환시켰다. Bisulfite-converted DNA 결과물은 Agilent 2100 Analyzer (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA)상에서 Quant-iT™MdsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 QC를 수행하였다. qPCR 후, 최종 결과물인 DNA library에 대해 Illumina HiSeq 2000 platform을 이용하여 100-bp paired-end sequencing을 수행했다.

구체적인 방법은 다음과 같음.

➤ Publication

**epicentre**  
an illumina company

**APPLICATION NOTES**

**EpiGenome™ Methyl-Seq Kit: a novel post-bisulfite conversion library prep method for methylation analysis**

Epigenetics is increasingly becoming an important field of research, and the ability to detect and quantify DNA methylation accurately is now critical for numerous fields of study, including disease biology and gene expression. The differential reactivities of methylated and non-methylated cytosines in DNA with sodium bisulfite forms the basis for their identification in the genome by sequencing. Current whole-genome bisulfite sequencing methods require substantial amounts of starting DNA to compensate for the loss due to bisulfite-mediated DNA degradation. To address issues with sample preparation, we have developed the EpiGenome™ Methyl-Seq Kit, which utilizes a novel pre-library bisulfite conversion scheme to prepare whole-genome bisulfite sequencing libraries with no sample loss and with only 50 ng of input genomic DNA.

DNA methylation is not evenly distributed in the mammalian genome. In human somatic cells approximately 60%–80% of all CpGs (1% of total DNA base) are methylated. Numerous methods are available to investigate methylation patterns, including those that are enrichment based (e.g., as methylated DNA immunoprecipitation sequencing (MeDIP-seq), restriction enzyme based (e.g., methylation-sensitive restriction enzyme sequencing (MSRE-seq) and bisulfite based (e.g., reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) and whole-genome bisulfite sequencing (WGBS)). Of these, the only method that captures the complete methylome of a given sample is WGBS, as only through this approach—in which unmethylated cytosines are converted to thymine, we describe a novel library construction method, called EpiGenome™ Methyl-Seq, for preparing sequencing libraries from bisulfite-converted genomic DNA. This “post-bisulfite conversion” library construction method uses bisulfite-treated single-stranded DNA as template for the subsequent addition of adaptor sequences required for cluster generation and sequencing. Thus, single-stranded DNA fragments independent of size and position of strand breaks remain viable templates for library construction, eliminating the loss of fragments and the selection bias associated with a post-library construction bisulfite conversion strategy. EpiGenome does not require Cytosine deamination as an enzyme for bisulfite conversion, or methylated

- Sample Input: ≥ 50 ng
- Highly diverse libraries
- No sample loss
- Uniform coverage
- Low rate of PCR duplication

➤ WG BS-Seq Protocol Using EpiGenome™ Methyl-Seq Kit

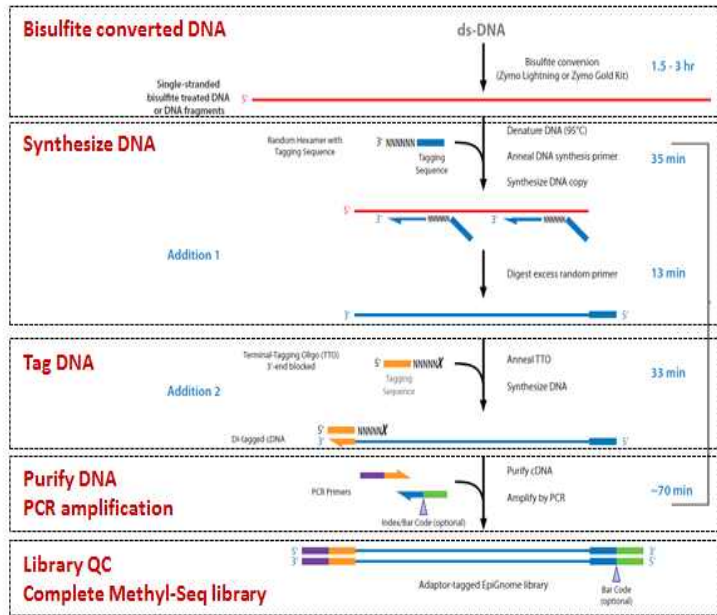


Figure 2. WGBS method

- (가) 제1협동과제에서 조성한 산자수에 따른 우열 집단의 개체 각각에 대해서 태반과 자궁 내막 조직을 채취함.
- (나) 채취된 조직으로부터 genomic DNA (gDNA) purification kit를 이용하여 genomic DNA 분리.
- (다) 분리한 gDNA는 PCR 분석에 이용하기 위해 Nanodrop® ND-1000 spectrophotometer에 의한 흡광도 측정과 전기영동분석을 통해 정확한 농도와 질적 상태를 확인함.
- (라) Bisulfite kit을 사용하여 bisulfite 처리함.
- (마) PCR amplification, library construction.
- (바) 수집된 DNA fragment들을 Illumina GAIIX system으로 sequencing하여 methylation된 게놈부위를 생물정보학적으로 분석함(Figure 3).
- (사) 산자수 우열집단의 결과를 분석하여 대량 후보후성유전체마커를 확보.

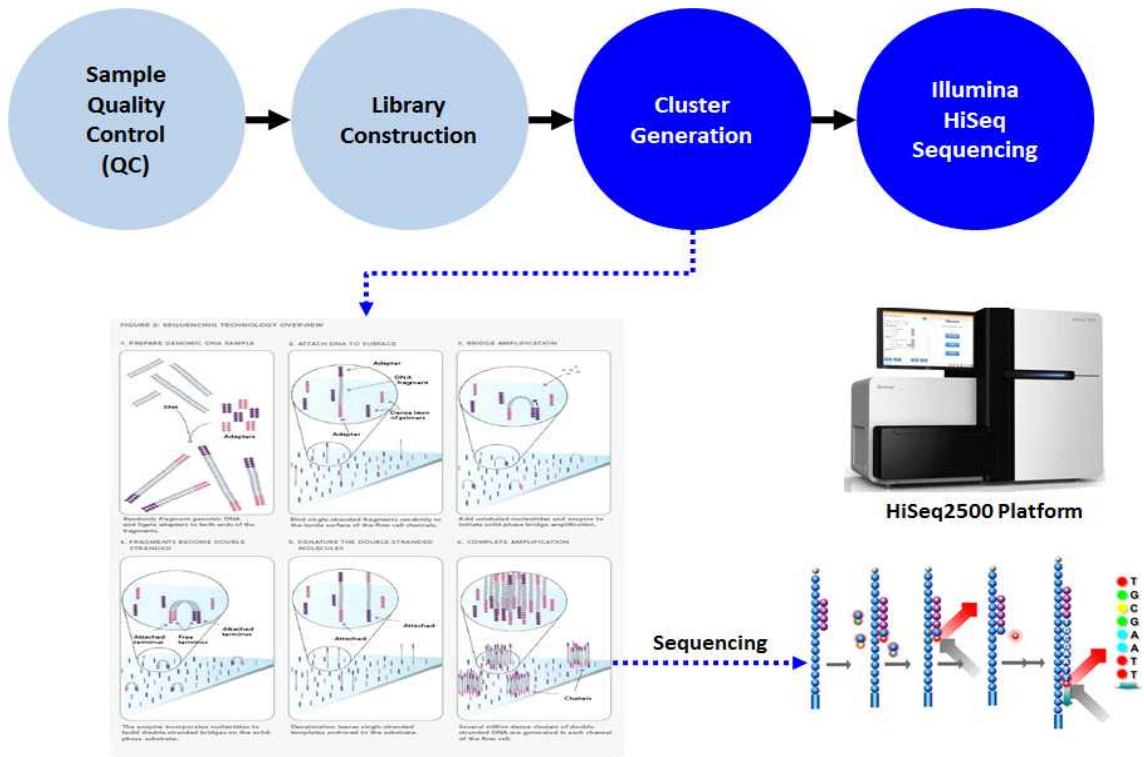


Figure 3. Illumina Sequencing reader

(아) 차등 메틸화 영역을 생물정보학 기술을 이용하여 분석 (Figure 4).

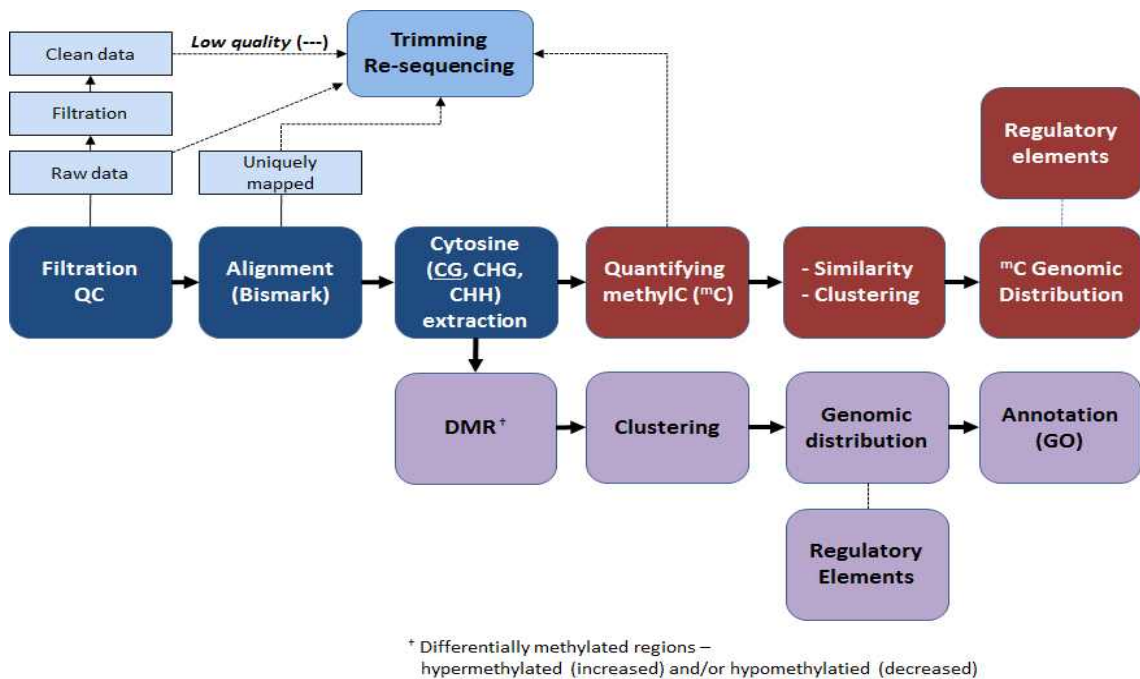


Figure 4 Bioinformatic analysis method for DMR

DNA Methylation Pipeline은 Bisulfite 처리가 된 시퀀싱 샘플들로부터 사이토신 사이트를 리스트 형태로 추출하고, 유전체 내에서 의미 있는 영역 혹은 전체 유전체 상의 메틸레이션 레

벨 분포 및 패턴을 분석했다. 이를 위해 1) 각 Bisulfite 처리된 샘플 리드들을 분석 대상의 지놈 레퍼런스에 정렬하고, 2) 정렬된 BAM 파일로부터 사이토신 리스트를 추출했다. 3) 각 샘플 별 사이토신 리스트를 기반으로 메틸레이션 레벨이 차이가 나는 영역 (DMR, Differential Methylated Region)을 탐색하였다. 분석에 사용한 대상 지놈 레퍼런스는 susScr3 version을 사용하였고, Gene Annotation은 Ensemble 72버전을 사용하였다.

### (3). 분석 대상 레퍼런스에 대한 서열 얼라인먼트

Bisulfite 처리가 된 리드들을 분석 대상 지놈에 bisulfite 변환을 고려한 정렬을 수행하였다. 이 때, 정렬시 사용되는 중요 파라미터들은 20N 이하이며, 각각 허용될 mismatch 개수(0)와 정렬을 시작할 때 기본적으로 사용될 seed 문자열의 길이(20)를 각각 의미한다. 사용한 툴은 bismark0.9.0 버전 패키지의 bismark모듈을 이용하였다. Bisulfite 시퀀싱에 의해 증폭된 리드들 중, 중복(duplication)된 리드들을 제거되었다. 이를 위해 사용한 모듈은 bismark0.9.0 패키지의 deduplicate\_bismark\_alignment\_output.pl였다. 최종 정렬된 bam file로부터 메틸레이션 사이트를 추출하고 각 사이트당 메틸레이션된 레벨을 계산하였다. 사용한 툴은 bismark 0.9.0 패키지의 bismark\_methylation\_extractor와 bismark2bed를 사용하였다.

### (4). Genomic distribution 분석

결과에 제시된 대부분의 플로팅은 각 사이토신 리스트를 파싱하여, R 3.0.2 기반의 여러 그래프 모듈을 사용하였다. 대부분의 리포트들은 크게 1) 특정 영역에 측정된 메틸레이션 레벨을 누적시켜 평균을 구하는 density 개념 플롯팅과 2) 메틸레이션 레벨들을 서로 비교하여 계층적인 클러스터링을 수행하는 heatmap, 그리고 3) 전체 지놈상에서 전반적인 메틸레이션 레벨을 시각화하는 circus plot 형태의 그래프로 분류되었다. 유전자 영역 혹은 리핏 서열들과 같이, 생물학적으로 의미가 있는 영역을 빈(bin)으로 나눈 뒤, 각각의 평균 메틸레이션 레벨을 계산하였다. 각, 빈의 개수는 각 영역당 50개를 사용하였으며, 인접한 up1k, down 1k 영역은 10개의 bin으로 나누었다. 각 샘플들의 유사성 정도를 비교하기 위해서, 계층적인 클러스터링을 수행하는 R 모듈이며, 전체 지놈을 100kbp로 나누고 각 메틸레이션 레벨을 유사한 정도에 따라 계층적으로 시각화하였다. 전체 지놈을 원형으로 매핑한 후, 전반적인 메틸레이션 레벨을 해당 위치에 해당하는 원에 도식화하였다.

### (5). DMR Prediction

DMR은 서로 다른 샘플들의 후성유전체 내에서 DNA 메틸레이션 수준이 유의미하게 차이를 보이는 genomic region을 의미한다. Sliding window 전략을 이용하는 swdmr을 사용하여, 각 윈도우별로 메틸레이션 레벨이 차이가 나는 영역을 통계 테스트하여 유의미한 영역을 DMR로 예측하였다. 주요 옵션은 1000-bp window size, 10개 이상의 사이토신 포함 (CpG, CHG, CHH 별), 1.2 fold change (두 영역이 차이가 나기 위한 두 샘플의 메틸레이션 레벨에 대한 비율), 유의하다고 판단 되는 유의수준에 대한 임계값인 p-value (0.0001)와 p-value에서 다중 샘플링에 의해 의존적인 확률값을 배제한 통계값인 FDR(False Discovery Rate)에 대한 임계값 (0.01)을 적용하였다.

## 다. proteomics 방법으로 산자수 증대 후보 단백질 선발

- (1) Shotgun proteomics방법에 의한 산자수 관련 단백질 대량 분석
- (2) 산자수 high/low그룹에서 단백질을 추출하여 시료별 동일량의 단백질을 S-S bond reduction 및 alkylation후 trypsin을 처리하여 peptide단편으로 만든 후 LC-MS/MS분석
- (3) raw data file은 프로테오믹스 전용 분석 프로그램 (Proteome Discoverer version1.4)에서 Sequest algorithm으로 분석 및, 돼지 proteome database를 활용하여 peptide 및 단백질을 동정

**라. 융합유전체마커로 산자수 증대 조기선발기술개발**

- (1) 확보된 유전체 마커와 후성유전체마커 정보의 병합
- (2) 산자수와 연계되는 융합유전체마커의 탐색 및 확보
- (3) PCR-RFLP 또는 bisulfite seq에 의해 탐색 및 검정
- (4) 확보된 융합유전체마커를 활용한 조기선발기술 개발
- (5) 융합유전체마커의 정확도 분석 및 확립
- (6) 확보된 융합유전체마커를 제1협동과제에 제공할 통한 중돈 조기선발

**마. PCR-RFLP방법으로 산자수 증대 유전자 마커 확립**

- (1) 산자수 증대 유전체마커로서 확립을 위한 PCR-RFLP 분석을 통한 구체적인 연구방법은 다음과 같음.
  - (가) 특정 SNP locus에 대한 primer 제작 및 restriction enzyme 확인.
  - (나) 분리된 genomic DNA와 제작된 primer를 포함한 PCR reaction mixture 준비.
  - (다) 적절한 annealing Tm을 바탕으로 PCR 반응.
  - (라) 특정 restriction enzyme으로 PCR product를 cutting함으로써, genotype calling.
  - (마) 산자수 증대 유전체마커로 확립
  - (바) PCR
    - ① 선발된 각 유전자에 대해 NCBI에서 유전자의 염기서열을 확보하여 PCR을 위한 Primer를 제작.
    - ② 혈액에서 분리된 genomic DNA와 제작된 primer를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR 분석을 수행.

Temperature	Time
95°C	5 min

95°C	30 sec	}	35~40 cycle
58°C~65°C	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	5 min		
4°C			∞

Gene	PCR (temp, cycle)
Rhophilin associated tail protein 1 (ROPN1)	60°C, 35cycle
N-acetyltransferase 9 (NAT9)	62°C, 35cycle
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)	62°C, 40cycle
Estrogen receptor 2 (ESR2)	62°C, 35cycle
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	60°C, 35cycle
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	62°C, 35cycle
CytochromecoxidasesubunitII (COX2)	58°C, 35cycle
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	65°C, 35cycle

③ PCR 반응 유무 확인을 위해 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인.

(사) enzyme cutting

- ① 선발된 각 유전자의 primer 제작 서열 중 SNP에 대한 restriction enzyme site를 확인.
- ② restriction enzyme을 이용하여 PCR product를 아래와 같은 조건에서 cutting.

Gene	Restriction enzyme	temp (°C), time
Rhophilin associated tail protein 1 (ROPN1)	Hae III	37, over night
N-acetyltransferase 9 (NAT9)	Alu I	37, over night
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)	Dde 1	37, over night
Estrogen receptor 2 (ESR2)	Hsp92 II	37, over night
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	BsaH I	37, over night

Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	Mbo II	37, over night
Cytochrome c oxidase subunit II (COX2)	BsrB I	37, over night
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	Xcm I	37, over night

③ cutting 결과 확인을 위해 2.5~4% agarose gel에서 전기영동으로 확인.

(아) size 및 genotype 확인

① 제작된 primer 서열 내의 SNP의 restriction enzyme site를 확인.

② restriction enzyme site를 기준으로 하여 genotype에 따른 size를 확인.

Gene	PCR product size (bp)	genotype size (bp)
Rhophilin associated tail protein 1 (ROPN1)	253	TT: 253 TC: 253+191+62 CC: 191+62
N-acetyl transferase 9 (NAT9)	431	GG: 431 AG: 431+295+136 AA: 295+136
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)	128	AA: 128 AG: 128+93+35 GG: 93+35
Estrogen receptor 2 (ESR2)	218	GG: 202+16 AG: 142+60+16 AA: 142+60+16
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	438	Allele 1: 346+15 Allele 2: 147+105+60
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	361	Allele 1: 346+15 Allele 2: 200+146+15
Cytochrome c oxidase subunit II (COX2)	555	Allele 1: 555 Allele 2: 386+169
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	700	AA: 700 AB: 700+510+190 BB: 510+190

#### 바. 확립된 유전체 마커의 기능 분석

(1) 유전체 마커에 의한 유전자 발현 변화 조사: promoter 또는 UTR 부위의 SNP 및 DNA methylation 양상을 이용하여 영향 받는 유전자 발현 조사

(2) 단백질 암호화 부위의 SNP에 의한 non-synonymous mutation의 단백질 기능 변화 조



사를 위하여 아래와 같은 연구 방법을 수행

(가) RT-PCR에 의한 SNP를 포함한 cDNA 분리

(나) 분리된 cDNA의 단백질 expression vector에 cloning

(다) Single nucleotide mutation을 포함한 유전자의 단백질 발현 체계 구축

(라) 대장균에서 단백질 발현, 분리 및 정제

(마) 분리된 단백질의 생화학적 특성 규명 및 기능 분석

(바) 기능이 밝혀진 산자수 증대 유전체마커 확보

**사. RT-PCR 및 Realtime-qPCR을 통하여 DMR/DEG correlation 유전자들의 재현성을 검증 및 항병성 유전자 탐색**

(1) RT-PCR 방법

(가) 시료 준비

① 조직에서 total RNA 분리 : TRIzol® Reagent (MRC)

㉠ 1.5 ml 튜브에 조직 100 mg과 TRIzol 1 ml을 넣어 homogenizer 한다.

㉡ 상온에서 10분간 반응시킨다.

㉢ 4 °C, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 한다.

㉣ 새로운 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮긴다.

㉤ Chloroform 200 µl를 넣고 invert 5회를 한다.

㉥ 상온에서 10분간 반응시킨다.

㉦ 4 °C, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리 한다.

㉧ 새로운 1.5 ml 튜브에 상층액을 옮긴다.

㉨ Isopropanol 500 µl를 넣고 invert 5회를 한다.

㉩ 4 °C, 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 한다.

㉪ 상층액을 버리고 70% ethanol 500 µl 넣어 washing 한다.

㉫ 4 °C, 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 한다.

㉬ 상층액을 버리고 air-dry 한다.

㉭ DEPC water 또는 RNase-free water 50 µl를 넣어 녹인다.

② cDNA 합성 : SuperScript® II RT (Invitrogen)

Step	Component	Volume
1	cDNA solution (2 ug)	Variable
	RNase-free water	Variable
	Oligo d(t)	1 µl
	10 mM dNTP	1 µl
	Total volume	12 µl
65 °C 5 min		

Chill on ice		
2	5x first strand buffer	4 $\mu$ l
	0.1 M DTT	2 $\mu$ l
	RNase inhibitor	1 $\mu$ l
	SuperScript II enzyme	1 $\mu$ l
	Total volume	8 $\mu$ l
42 °C 50 min		
70 °C 15 min		
3	RNase H	1 $\mu$ l
37 °C 20 min		

### ③ PCR 반응

Component	Volume per reaction
cDNA	2 $\mu$ l
D.W	8.2 $\mu$ l
10X buffer	1 $\mu$ l
2.5 mM dNTP	1.2 $\mu$ l
F-R primer	1-1 $\mu$ l
e-Taq	0.1 $\mu$ l
Total volume	15 $\mu$ l

㉞ Stock 조건

㉞ PCR 조건

Step	Time	Temperature
Incubation	5 min	95 °C
Denaturing	20 sec	95 °C
annealing	20 sec	60 °C
extending	20 sec	72 °C
Incubation	7 min	72 °C
Hold	Indefinite	40 °C

### ④ 전기영동 및 band intensity 분석

㉞ 2% agarose gel에서 PCR 산물을 확인.

㉞ imagej software를 이용하여 band의 intensity를 측정하여 유전자별 mRNA 발현량을 정량.

## (2) Realtime-qPCR: SYBR® Green Real-Time PCR Master Mixes

(가) Stock 조건

Component	Volume per reaction
cDNA	1
RNase-free water	2
2x SYBR master mix	5 $\mu$ l
F-R primer	0.5-0.5 $\mu$ l
Total volume	10 $\mu$ l

(나) qPCR 반응 조건

Step	Time	Temperature
PCR initial activation step	5 min	95 °C
Two-step cycling		
Denaturation	5 sec	95 °C
Combined annealing/ extension	10 sec	60 °C
Number of cycles	40	

(다) 정량

- ① qPCR 반응 후 역가 (threshold) 설정하여 역가와 증폭곡선의 교차점을 Ct값으로 산출.
- ② 주형으로 사용한 total RNA 샘플은 mRNA의 함량이 다를 가능성이 있으므로 housekeeping 유전자의 발현량으로 mRNA량을 보정.
- ③  $\Delta\Delta$ Ct법을 적용하여 유전자에 대한 각 샘플에 대해 PCR 증폭 효율을 조사하여 정량 계산에 적용.

아. 산자수 연관 유전자의 SNP와 자궁유래 deletion mutant SNP의 genotype과 산자수 형질간의 상관관계 분석

(1) PCR-RFLP방법을 이용한 산자수 연관 유전자의 SNP의 genotype 분석

(가) PCR

- ① 선발된 각 유전자에 대해 NCBI에서 유전자의 염기서열을 확보하여 PCR을 위한 Primer를 제작.
- ② 혈액에서 분리된 genomic DNA와 제작된 primer를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR 분석을 수행.

Temperature	Time
95°C	5 min

95°C	30 sec	}	35~40 cycle
58°C~65°C	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	5 min		
4°C			∞

Gene	PCR (temp, cycle)
Rhophilin associated tail protein 1 (ROPN1)	60°C, 35cycle
N-acetyltransferase 9 (NAT9)	62°C, 35cycle
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)	62°C, 40cycle
Estrogen receptor 2 (ESR2)	62°C, 35cycle
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	60°C, 35cycle
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	62°C, 35cycle
CytochromecoxidasesubunitII (COX2)	58°C, 35cycle
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	65°C, 35cycle

③ PCR 반응 유무 확인을 위해 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인.

(나) enzyme cutting

- ① 선발된 각 유전자의 primer 제작 서열 중 SNP에 대한 restriction enzyme site를 확인.
- ② restriction enzyme을 이용하여 PCR product를 아래와 같은 조건에서 cutting.

Gene	Restriction enzyme	temp (°C), time
Rhophilin associated tail protein 1 (ROPN1)	Hae III	37, over night
N-acetyltransferase 9 (NAT9)	Alu I	37, over night
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)	Dde 1	37, over night
Estrogen receptor 2 (ESR2)	Hsp92 II	37, over night

Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	BsaH I	37, over night
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	Mbo II	37, over night
Cytochrome c oxidase subunit II (COX2)	BsrB I	37, over night
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	Xcm I	37, over night

③ cutting 결과 확인을 위해 2.5~4% agarose gel에서 전기영동으로 확인.

(다) size 및 genotype 확인

① 제작된 primer 서열 내의 SNP의 restriction enzyme site를 확인.

② restriction enzyme site를 기준으로 하여 genotype에 따른 size를 확인.

Gene	PCR product size (bp)	genotype size (bp)
Rhopilin associated tail protein 1 (ROPN1)	253	TT: 253 TC: 253+191+62 CC: 191+62
N-acetyl transferase 9 (NAT9)	431	GG: 431 AG: 431+295+136 AA: 295+136
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)	128	AA: 128 AG: 128+93+35 GG: 93+35
Estrogen receptor 2 (ESR2)	218	GG: 202+16 AG: 142+60+16 AA: 142+60+16
Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	438	Allele 1: 346+15 Allele 2: 147+105+60
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	361	Allele 1: 346+15 Allele 2: 200+146+15
Cytochrome c oxidase subunit II (COX2)	555	Allele 1: 555 Allele 2: 386+169
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	700	AA: 700 AB: 700+510+190 BB: 510+190

(2) PCR-RFLP 방법을 이용하여 자궁 유래 deletion mutant SNP의 genotype 분석

(가) PCR

- ① 선발된 각 유전자에 대해 NCBI에서 유전자의 염기서열을 확보하여 PCR을 위한 Primer를 제작.
- ② 혈액에서 분리된 모든 150여두의 genomic DNA와 제작된 primer를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR 분석을 수행.

Temperature		Time
95°C		5 min
95°C	30 sec	} 35 cycle
60°C~62°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C		5 min
4°C		∞

Gene	PCR (temp, cycle)
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4 (MLLT4)	62°C, 35cycle
KIAA0825 ortholog (KIAA0825)	60°C, 35cycle
Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 3 (DACT3)	62°C, 35cycle
Kinesin family member 21B (KIF21B)	62°C, 35cycle
NIMA-related kinase 8 (NEK8)	62°C, 35cycle
Cyclin-dependent kinase 20 (CDK20)	62°C, 35cycle
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)	62°C, 35cycle
Calmin (calponin-like, transmembrane) (CLMN)	62°C, 35cycle
PITPNM family member 3 (PITPNM3)	62°C, 35cycle

- ③ PCR 반응 유무 확인을 위해 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인

(나) enzyme cutting

- ① 선발된 각 유전자의 primer 제작 서열 중 SNP에 대한 restriction enzyme site를 확인.
- ② restriction enzyme를 이용하여 PCR product를 아래와 같은 조건에서 cutting.

Gene	Restriction enzyme	temp (°C), time
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4 (MLLT4)	Gsul	30°C, over night
KIAA0825 ortholog (KIAA0825)	StyI	37°C, over night
Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 3 (DACT3)	BsrI	65°C, over night
Kinesin family member 21B (KIF21B)	StuI	37°C, over night
NIMA-related kinase 8 (NEK8)	NheI	37°C, over night
Cyclin-dependent kinase 20 (CDK20)	KpnI	37°C, over night
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)	PstI	37°C, over night
Calmin (calponin-like, transmembrane) (CLMN)	DdeI	37°C, over night
PITPNM family member 3 (PITPNM3)	MaeI	37°C, over night

③ cutting 결과 확인을 위해 2.5~4% agarose gel에서 전기영동으로 확인.

(다) size 및 genotype 확인

① 제작된 primer 서열 내의 SNP의 restriction enzyme site를 확인.

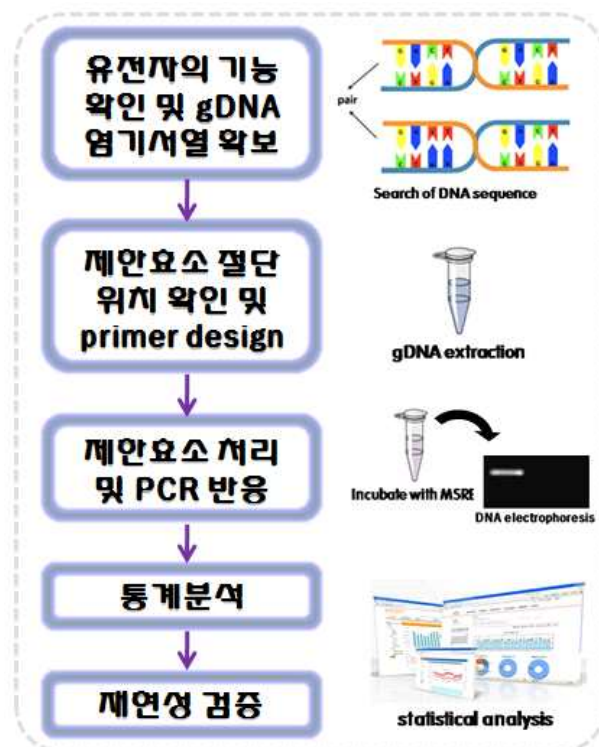
② restriction enzyme site를 기준으로 하여 genotype에 따른 size를 확인.

Gene	PCR product size (bp)	genotype size (bp)
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 4 (MLLT4)	492	GG: 304+188 TT: 492
KIAA0825 ortholog (KIAA0825)	525	CC: 338+187 GG: 525
Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 3 (DACT3)	388	GG: 226+162 AA: 388
Kinesin family member 21B (KIF21B)	450	TT: 450 AA: 253+197
NIMA-related kinase 8 (NEK8)	525	CC: 525 TT: 293+232
Cyclin-dependent kinase 20 (CDK20)	556	CC: 226+330 TT: 556
Proprotein convertase subtilisin/kexin	482	CC: 302+180

type 9 (PCSK9)		AA: 482
Calmin (calponin-like, transmembrane) (CLMN)	401	GG: 401 TT: 106+295
PITPNM family member 3 (PITPNM3)	503	CC: 503 TT: 177+326

자. 산자수 연관 후성 유전체 마커의 검증

(1) Methylation-sensitive restriction enzyme (MSRE) PCR



(가) 시료 준비

- ① Genomic DNA 분리 : DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
- ② Bisulfite 처리 : EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN)
- ㉞ Stock 조건



Component	Volume per reaction
DNA solution (1 ng~2 ug)	Variable (maximum 20 $\mu\text{l}$ )
RNase-free water	Variable
Bisulfite Mix	85 $\mu\text{l}$
DNA protect buffer	35 $\mu\text{l}$
Total volume	140 $\mu\text{l}$

㉞ Bisulfite 반응 조건

Step	Time	Temperature
Denaturation	5 min	95 °C
Incubation	25 min	60 °C
Denaturation	5 min	95 °C
Incubation	85 min (1 h 25 min)	60 °C
Denaturation	5 min	95 °C
Incubation	175 min (2 h 55 min)	60 °C
Hold	Indefinite	20 °C

(나) DNA digestion과 정제

① Msp I (CCGG, NEB) 처리

㉞ Stock 조건.

Component	Volume per reaction
gDNA (10ng/ $\mu\text{l}$ )	Variable
DW	Variable
10X buffer	1 $\mu\text{l}$
100X BSA	0.1 $\mu\text{l}$
Msp I	0.2 $\mu\text{l}$
Total volume	10 $\mu\text{l}$

㉞ 37°C에서 1시간 반응.

㉞ 65°C에서 20분간 heating, - 4°C에서 보관.

② 반응 산물을 정제 : MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN).

③ 농도 측정 : Nanodrop.

(다) Primer design

① NCBI에서 유전자 gDNA 서열 확보.

- ② Msp I (CCGG) recognition site 확인.
- ③ CpG site 확인: Methprimer (design MSP/BSP primers and CpG islands software)
- ④ CpG site와 Msp I site를 포함하여 primer design.

(라) PCR amplification

- ① Stock 조건.

Component	Volume per reaction
DNA solution (10ng)	Variable
D.W	Variable
10X buffer	1.5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	1.2 $\mu$ l
10p F-R primer	1-1 $\mu$ l
H-Taq (SolGent)	0.1 $\mu$ l
Total volume	15 $\mu$ l

- ② PCR 반응 조건 : ABI PCR 9700 machine.

Step	Time	Temperature
Incubation	5 min	95 °C
Denaturing	30 sec	95 °C
annealing	30 sec	60 °C
extending	30 sec	72 °C
Incubation	5 min	72 °C
Hold	Indefinite	40 °C

(라) 전기영동: 1.5% agarose gel에서 PCR 산물을 확인.

(2) Bisulfite sequencing

(가) 시료 준비

- ① Genomic DNA 분리 : DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).
- ② Bisulfite 처리 : EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN).
- ③ Stock 조건

Component	Volume per reaction
DNA solution (1 ng~2 ug)	Variable (maximum 20 $\mu$ l)
RNase-free water	Variable

Bisulfite Mix	85 $\mu\text{l}$
DNA protect buffer	35 $\mu\text{l}$
Total volume	140 $\mu\text{l}$

㉞ Bisulfite 반응 조건

Step	Time	Temperature
Denaturation	5 min	95 °C
Incubation	25 min	60 °C
Denaturation	5 min	95 °C
Incubation	85 min (1 h 25 min)	60 °C
Denaturation	5 min	95 °C
Incubation	175 min (2 h 55 min)	60 °C
Hold	Indefinite	20 °C

(나) PCR amplification

① Stock 조건

Component	Volume per reaction
DNA solution (10ng)	2 $\mu\text{l}$
D.W	37.8 $\mu\text{l}$
10X buffer	5 $\mu\text{l}$
2.5mM dNTP	2 $\mu\text{l}$
10p F-R primer	1-1 $\mu\text{l}$
H-Taq (SolGent)	0.2 $\mu\text{l}$
Total volume	50 $\mu\text{l}$

② PCR 반응 조건 : ABI PCR 9700 machine

Step	Time	Temperature
Incubation	5 min	95 °C
Denaturing	30 sec	95 °C
annealing	30 sec	60 °C
extending	30 sec	72 °C
Incubation	7 min	72 °C
Hold	Indefinite	40 °C

(다) 에탄올 침전 (PCR 산물 정제)

- ① 여러 개의 PCR 산물을 1.5 ml 튜브에 혼합.
- ② PCR 산물 1 volume에 100% 에탄올 3 volume과 3M sodium acetate (pH 5.0) (에탄올 양의 1/10)를 넣음.
- ③ 3~4회 inverting 한 뒤 -70 °C에서 1시간 반응.
- ④ 4 °C에서 13,000 rpm 10분 원심분리.
- ⑤ 상층액을 버린 뒤 70% 에탄올 500  $\mu$ l를 넣음.
- ⑥ 4 °C에서 13,000 rpm 5분 원심분리 시킴.
- ⑦ 상층액을 버리고 상온에서 air-dry.
- ⑧ 증류수 40  $\mu$ l를 넣어 녹임.

(라) TA cloning : T-blunt PCR cloning kit (SolGent)

① Stock 조건

Component	Volume per reaction
PCR 산물 (최소 20 ng)	0.5 ~ 4 $\mu$ l
6X buffer	1 $\mu$ l
vector	1 $\mu$ l
D.W	Variable
Total volume	6 $\mu$ l

② Transformation

- ㉠ T blunt 반응액을 competent cell 100  $\mu$ l에 넣음.
- ㉡ 얼음에서 5~30분간 반응.
- ㉢ 42 °C에서 30초간 heat shock을 주고, 얼음에 2분간 안정화.
- ㉣ 실온으로 예열된 LB 배지 900  $\mu$ l를 첨가.
- ㉤ 37 °C에서 1시간 200 rpm으로 흔들어서 배양.
- ㉥ ampicillin (50  $\mu$ g/ml)과 kanamycin (50  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB plate에 200  $\mu$ l의 용액을 취해 spreading.
- ㉦ 37 °C에서 16시간 배양하여 colony가 생성되었는지 확인.
- ㉧ LB 배지 (ampicillin과 kanamycin 첨가)에 단일 colony를 채취하여 200 rpm으로 혼

들어 16시간 배양.

㉔ 배양액을 plasmid DNA prep.

㉕ prep 산물을 sequencing하여 특정 부위의 methylation 정도를 분석.

#### 차. SNV의 생화학적 기능 분석

(1) Molecular docking simulation 및 energy minimization calculation

(가) PCSK9와 LDLR의 binding을 조사하기 위하여 Cambridge Crystallographic Data Center로부터 얻어진 GOLD 4.1 program (Genetic Optimization for Ligand Docking)을 사용하여 Molecular docking simulation을 수행하였음.

(나) 이러한 program은 protein binding sites와의 docking flexible ligands에 대한 a genetic algorithm를 계산하는데 이용하였고, binding conformations을 예측하기 위하여 scoring functions과 결합된 genetic algorithm (GA)을 계산하였음.

(다) Energy minimization (EM) calculations은 docked structures를 refine하기 위해서 DS 2.5 (Accelrys Inc., San Diego, USA)를 사용하여 수행되었음.

(라) Smart Minimizer EM algorithm은 the conformation을 relax시키고, 어떤 bad contacts를 제거하기 위하여 사용되었음.

(2) Molecular dynamics (MD) simulations of PCSK9 and LDLR

(가) MD simulations은 CHARMM27와 GROMACS 4.5.3 package를 이용하여 수행함. 보조인자와 기질의 topologies을 확인하기 위해 SwissParam을 이용하였음. 검증 목적으로 ParamChem와 MATCH 이용하여 SwissParam의 topologies와 비교하였음.

(나) 단백질 표면에 1.5nm 워터박스를 생성하여 aqueous environment이 되도록 TIP3P water model을 이용하였음. Energy minimization를 위해 steepest descent algorithm을 이용하여 2,000 kJ/mol 모델의 품질을 향상시키고, NVT equilibration을 해줌. short range의 상호작용은 cut-off value를 적용하였고, long range 상호작용은 particle mesh Ewald (PME) method로 계산함.

(다) 동일한 조건에서 VMD, Discovery studio (DS) v3.1, 그리고 GROMACS를 이용해 4반복 분석을 수행함. 주성분 분석은 Essential dynamics analysis를 이용함.

#### 카. 산자수 증대 유전체 마커의 재현성 검증

(1) PCR-RFLP 방법을 이용한 재현성 검증

(가) 시료 준비

① 1차 140두, 2차 132두, 3차 29두의 모든 혈액을 채취.

② 채취된 혈액으로부터 genomic DNA 분리 : DNeasy Blood & Tissue Kit

(QIAGEN)

- ③ 추출한 genomic DNA 농도 및 질적 상태 확인: Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000 spectrophotometer

(나) PCR amplification

- ① 산자수 연관 유전체 마커의 염기서열과 SNP 위치를 NCBI에서 확인.  
② SNP와 제한효소 위치를 포함하여 PCR을 위해 primer 제작.  
③ 1차, 2차, 3차 모든 혈액의 genomic DNA를 이용하여 아래와 같은 조건으로 PCR 반응을 수행.

(다) Enzyme cutting

No.	Gene	Restriction enzyme	temp (°C), time
1	NAT9	Alu I	37, over night
2	IGFBP2	Mbo II	37, over night
3	IGFBP3	BsaH I	37, over night
4	MAP3K3	Xcm I	37, over night
5	DACT3	Bsr I	65, over night

- ① Enzyme cutting 결과 확인을 위해 3% agarose gel 전기영동을 통해 확인.

## 2. 병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종

### 가. 도체평가 및 시료처리

사육된 돼지는 도축당일 스트레스를 줄이기 위해 아침 일찍 농장에서 농장근처의 Y도축장으로 이송하여 1일간 계류를 실시하였다. 계류이후 도축을 실시하였고, 생체중, 도체중, 등지방두께, 지육율 및 등급판정은 예냉 1일 이후에 냉도체 등급판정을 실시하였다. 등급판정은농림부 고시 제2001-38호(MAF.2001.6.2.)에 의한 “축산물등급판정세부기준”에 의해 도체중량과 등지방두께를 측정하여 1차 등급판정 후 외관 및 육질 평가를 통해 최종 등급을 평가하였다. 도축장 소속 가공장에서 각 처리구별로 좌 등심을 분할 정형하여 암수 구분하여 각각 10두씩 취하여 ice 박스에 담아 2시간 이내에 실험실로 이송한 이후 육질분석을 실시하였다. 일반성분 및 콜레스테롤 분석용 시료는 실험실시 전까지 20 냉동 보관하였으며, pH, 육색, 지방색, 보수력, 가열감량 진단가는 도축 48시간후에 실험을 실시하였다.

산자수 상위/하위 그룹의 실험군 선발 돼지의 출산 즉시 태반 조직을 채취하여 PBS wash 후 액체 질소에 얼려 보관 후 DNA 및 RNA 분리 하였다. 산자수 상위/하위 그룹의 실험군 선발 돼지의 도축 후 장기 적출 시 자궁 조직을 채취하여 PBS wash후 액체 질소에 얼려 보관

후 DNA 및 RNA 분리 하였다.

#### 나. 일반성분 분석

일반성분은 AOAC (2000) 방법에 따라 수분, 지방, 단백질 및 회분을 측정하였다. 콜레스테롤 분석을 위한 지방의 추출은 Folch 등(1957) 방법에 따라 세절육 10 g을 250 ml 삼각플라스크에 넣고 chloroform:methanol (2:1) 혼합용액 150 ml를 첨가한 다음 2,500 rpm에서 3분간 균질화시킨 다음 지질을 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 하층을 취하여 농축하여 지질을 추출하였다. 추출된 지방은 Zanardi 등(1998)의 방법에 따라 추출한 지질 0.1 g에 비누화 시약 5 ml와 1 ml internal standard(5 $\alpha$ -cholesteae 0.5 mg)를 넣고 시료를 균질화 하여 마개를 한 다음 60% KOH 8 mL와 Sol A 40 ml (ethanol:methanol:isopropylalchol=90:5:5)를 넣고 100 에서 환류냉각관이 부착된 상태에서 1시간 가열 후 냉각하고 벤젠 층으로 흡수시킨 후 1N KOH 200 ml, 0.5N KOH 40 ml, 증류수 순으로 pH 7정도가 될 때까지 수세하였다. 이후 감압 농축하여 internal standard (scoraren)으로 녹여 GC로 분석하였다. GC 분석조건은 column SPB-1, 0.53 mm i.d  $\times$  30 m  $\times$  2.65  $\mu$ m film thickness, detector는 Flame ionization detector (FID)였다.

#### 다. pH, 보수력, 가열감량

도축후 48시간 이후에 등심근의 pH는 근막, 지방 등을 제거한 후 세절한 시료 10 g을 증류수 90 mL와 함께 균질기(T25B, IKA Sdn. Bhd., Malaysia)로 13,500 rpm에서 20초간 균질하여 pH메타(8603, Metrohm, Swiss)로 측정하였다. WHC (water holding capacity)는 마쇄한 시료를 80 의 항온수조에서 30분간 가열한 다음 냉각하여 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 무게를 측정하여(시료 무게 유리 수분 무게)/시료 무게  $\times$  100의 식으로 환산하여 계산하였다. 가열감량은 제5늑골 직상부의 배최장근을 일정한 두께(4 cm)로 절단하여 지퍼백에 포장하고 80 항온수조에서 1시간 가열(심부온도가 65 $^{\circ}$ C)후 물기를 제거하고 4 에서 2시간 방치후에 실시하였다.

#### 라. 육색 및 지방색 측정

육색 및 지방색은 색차계 (CR-400, Minolta Co., Japan)를 사용하여 동일한 방법으로 5회 반복하여 명도(lightness, CIE L\*), 적색도(redness, CIE a\*) 황색도(yellowness, CIE b\*)를 측정하였으며 이때 표준색판은 L\*=89.2, a\* =0.921, b\* = 0.783으로 하였다.

#### 마. 전단가 측정

신선육 및 조리육의 전단가(shear force)는 Instron 3343 (US/MX50, A D Co., USA)을 이용하여 측정하였다. 신선육은 근육방향과 수평으로  $\phi$ 0.65 x 2.00 cm로 자른 후 근육 방향과 직각 방향으로 knife형 plunger를 이용하여 절단하여 10반복 측정하였고, 조리육은 80 에서 1시간 가열한 가열육을 이용하여 4 에서 2시간냉장시킨 이후 근육방향과 평행이  $\phi$ 16.50x2.00

cm로 자른 후 근육방향과 직각방향으로 knife 형 Inger를 이용하여 절단하여 7반복 측정하였다. 이때 측정 조건은 load cell 10 kg, adapter area 30 mm<sup>2</sup> 이었다.

## 바. 번식형질

$$y_{tijkml} = \mu + l_{ti} + f_{tj} + b_{tk} + a_{tl} + p_{tl} + e_{tijkml} \quad (\text{모형 I})$$

위에서,  $y_{tijkml}$  = t번째 번식형질에 대한 관측치,  $\mu$  = 전체평균,  $l_{ti}$  = i번째 산차의 고정효과,  $f_{tj}$  = j번째 분만주차의 고정효과,  $b_{tk}$  = k번째 교배웅돈의 임의효과,  $a_{tl}$  = l번째 개체의 상가적 유전효과,  $p_{tl}$  = l번째 개체의 영구환경효과,  $e_{tijkml}$  = 임의오차이다.

## 사. 육질 및 성장형질

$$y_{tijkl} = \mu + s_{ti} + b_{tj} + a_{tk} + e_{tijkl} \quad (\text{모형 II})$$

위에서,  $y_{tijkl}$  = t번째 육질 및 산육형질에 대한 관측치,  $\mu$  = 전체평균,  $s_{ti}$  = i번째 성별의 고정효과,  $b_{tj}$  = j번째 출생년도의 고정효과,  $a_{tk}$  = k번째 개체의 상가적 유전효과,  $e_{tijkl}$  = 임의오차이며, 유전모수와 육종가는 각각 VCE와 PEST 프로그램을 이용하여 추정하였다.

## 아. 돼지 정자수의 계수

정자의 생존을 검사에는 SYBR-14(Syber Green) 및 PI(Propidium Iodide)를 이용하여 염색한다. 살아있는 정자는 SYBR-14에 염색되어 녹색을 나타내며, 사멸된 정자는 PI에 염색되어 오렌지색으로 나타낸다. 정액을 100 nm의 SYBR-14 및 12 uM의 PI에 5~10분간 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석한다.

## 자. 돼지 정자의 활력 검사

정자의 운동성을 검사하기 위해서는 정자 내 미토콘드리아를 선택적으로 염색할 수 있는 형광시약인 Rhodamin-123를 이용한다. 정액을 0.53uM의 Rhodamin-123에 26~27°C에서 30분간 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석한다.

## 차. 정액 오염균주에 대한 항생제 내성검사

총 7종의 샘플로부터 잠재적 병원성 균주를 분리한 후, 균주를 동정한 결과 5 균주로 확인이 되었고, 그 균주에 대한 항생제 내성 검사를 실시하였다. 항생제 내성검사는 paper disc 방법으로 수행하였고, 항생제는 정액희석제에 사용 가능한 Amikacin, Gentamicin, Penicillin, Streptomycin 등의 4종을 사용하였다. 항생제의 농도는 정액희석제에 사용되는 최대 농도인 300 ppm에서 순차적으로 희석하여 300, 150, 75, 32.5 ppm의 4 종류의 농도로 내성 검사를 실시하였다.

## 카. 통계 분석

SAS program (Statistics Analytical System, USA, 1999)의 GLM(General Linear Model) 방법으로 분석하였다. 처리 평균 간의 평균값 비교를 위해 Duncan의 다중검정(Multiple Range Test)을 이용하여 유의성 검정( $\alpha = 0.05$ )을 실시하였다.



#### 타. 산자수 증대 병합육종프로그램 개발

- (1) 기존에 수행된 연구자료 및 결과 데이터베이스 구축
- (2) 산자수 증대 산업용 육종프로그램 개발
  - (가) 기초돈군조성( $G_0$ ) : 한국 버크셔 계통 모돈 상하 각 200두로 분류
  - (나) 기 수행된 SNP 자료 분석 및 돈군 분류에 활용
- (3) 다산성 계통조성을 위한 통합 육종 시스템 구축
  - (가) 통합 DB 구축: 기 수행된 연구자료 + 검정자료
  - (나) 조사된 raw data를 활용한 실용적 DB 구축
- (4) 유전능력평가 프로그램 개발
- (5) 표현형에 의한 경제선발지수 개발
- (6) 시뮬레이션 분석 및 계획교배 프로그램 개발
- (7) 육종프로그램 정확도 분석
- (8) 정액성상검사 : 년 2회 실시

#### 파. 산자수 증대 병합육종프로그램 및 선발지표 개발

- (1) 다산성유전자 조절네트워크 구축
  - (가) 융합유전체 선발 및 연관 분석을 위한 연관 불평형 패턴 분석
  - (나) 유효집단 크기의 추정을 통한 실험 집단에 대한 집단 모수 분석
  - (다) 집단 모수를 추정하고 유전체 단위의 병합시뮬레이션(coalescent simulation)을 구축
  - (라) 연관분석을 통한 후보유전자군에 대한 데이터베이스 기반의 기능적 분석 (functional analysis)
  - (마) 융합유전체 선발 분석 기법을 통한 개체별 융합유전체 추정육종가의 산출
  - (바) 융합유전체 추정육종가의 정확도 비교
  - (사) 산자수 연관 유전자군에 대한 조절 네트워크 분석
- (2) 산업용 경제선발지수 개발(economic selection index)
- (3) 병합육종프로그램 개발
  - (가) 융합유전체 및 표현형 추정육종가에 의한 병합육종프로그램 개발

(4) 정액성상검사 : 년 2회 실시

#### 하. 산자수 증대 병합육종프로그램 재현성 검정

(1) 다산성유전자 조절네트워크 재현성 검정

(가) 융합유전체 선발 분석 기법을 통한 개체별 유전체 추정육종가의 산출

(나) 유전체 추정육종가의 정확도 비교

(다) 산자수 연관 유전자군에 대한 조절 네트워크 분석

(라) 표현형 추정육종가와 비교를 통한 정확도 분석

(마) 병합육종프로그램의 재현성 검정 및 보완

(2) 다산성에 관여하는 단백질코딩유전자 등, 유전체의 기본 단위 사이의 기능적 관계 망을 모델링하고 다산성의 정도와 배아 및 새끼의 발달 능력을 예측하는 모델을 수립

(가) 다산성에 관계된 유전 요인의 상호 작용 네트워크를 모델링

(나) 유전자의 상호 작용 네트워크를 모델링

(다) 다산성 유전자 네트워크를 모계 품종의 다산성을 구분하는 기본적인 판별 자료 배열로 사용

(3) 산업용 경제형질 개발 : 총산자수, 발정재귀일령, LP5

(4) 산업용 경제 선발지수를 활용한 선발 및 교배시스템 구축

(5) 정액성상검사 : 년 2회 실시

(6) 선발 및 계획교배

#### 가. 산자수 증대 병합육종프로그램의 정립

(1) 병합육종프로그램을 활용한 유전능력평가

(2) 병합 육종프로그램을 활용한 개체별 유전능력비교

(3) 조기 선발 및 계획교배

(가) G relation matrix를 활용하여 근친도를 고려한 교배

(나) 개발 프로그램을 구동하여 개체들간의 혈연관계를 추정

(다) 추정값을 근거로 근친도를 최소화 하여 종모돈/종빈돈 교배 개체들을 결정함

- (4) 각 형질에 대하여 추정된 육종가 값을 근거로 종모돈/종빈돈 최적 조합을 설정
- (5) 산자수가 우수한 개체 선발 및 교배
- (6) 산자수 증대 병합육종프로그램의 정립
- (7) 정액성상검사 : 년 2회 실시
- (8) 수태율 및 배란율을 고려한 형질 개발

#### 나. 산자수 증대 기술의 확립 및 보급

- (1) 병합육종프로그램을 활용한 유전능력평가
- (2) 병합 육종프로그램을 활용한 개체별 유전능력 비교
- (3) 조기 선발 및 계획교배
  - (가) G relation matrix를 활용하여 근친도를 고려한 교배
  - (나) 개발 프로그램을 구동하여 개체들간의 혈연관계를 추정
  - (다) 추정값의 근거로 근친도를 최소화 하여 종모돈/종빈돈 교배 개체들을 결정함
- (4) 각 형질에 대하여 추정된 육종가 값을 근거로 종모돈/종빈돈 최적 조합을 설정
- (5) 산자수가 우수한 개체 선발 및 교배
- (6) 정액성상검사 : 년 2회 실시
- (7) 산자수 증대 기술의 확립
- (8) 산자수 증대 버크셔 육종 및 보급

#### 다. SNP정보를 이용한 유전체 육종가(GEBV) 추정

- (1) ssBLUP(Single Step BLUP)에 의한 총산자수와 발정재귀일령의 유전체 육종가 추정

$$y_{ijkl} = \mu + f_{ti} + l_{tj} + a_{tk} + p_{tk} + e_{ijkl}$$

위에서,  $y_{ijkl}$  = t번째 번식형질에 대한 관측치,  $\mu$  = 전체평균,  $f_{ti}$  = i번째 분만주차의 고정효과,  $l_{tj}$  = j번째 산차의 고정효과,  $a_{tk}$  = k번째 개체의 상가적 유전효과,  $p_{tk}$  = k번째 개체의 영구환경 효과,  $e_{ijkl}$  = 임의오차이며, 위의 선형모형은 다음과 같은 행렬식으로 나타낼 수 있다.

$$y = Xb + Za + Wp + e$$

위에서,  $y = n \times 1$  vector of observation,

$b = p \times 1$  vector of fixed effect

$a = q \times 1$  vector of additive genetic random effect

$p = q \times 1$  vector of permanent environmental random effect

$X(n \times p)$ ,  $Z(n \times q)$  and  $W(n \times q)$  known incidence matrix corresponding to  $b$ ,  $a$ , and  $p$ ,

$e = n \times 1$  vector of residual effect

(2) 혼합모형방정식(MME; mixed model equation)은 다음과 같다.

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + \alpha_1 H^{-1} & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + \alpha_2 I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \\ \hat{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}$$

위에서,  $\alpha_1 = \sigma_e^2 / \sigma_a^2$ ,  $\alpha_2 = \sigma_e^2 / \sigma_{pe}^2$  이며,  $H = A + A_\Delta$  일 때,

$$H = \begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & G \end{bmatrix} = A + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G - A_{22} \end{bmatrix} \text{이며,}$$

$A$  = 혈통정보에 의한 혈연계수행렬(Conventional numerator relationship matrix),  $A_\Delta$  = 유전체 정보의 관계를 나타내는 변형행렬(matrix modified to account for genomic relationship),

$G$  = 유전체 혈연관계행렬 (genomic relationship matrix)이다.

$$H = A + \begin{bmatrix} A_{12}A_{22}^{-1} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I \\ I \end{bmatrix} (G - A_{22}) \begin{bmatrix} I & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{22}^{-1}A_{21} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \text{일 때,}$$

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix} \text{이다.}$$

위에서,  $I$  = 단위행렬(identity matrix).  $A_{22}^{-1}$  = 유전체정보를 가지고 있는 개체들의 혈연계수행렬의 역행렬이다.

#### 라. 유전체 육종가의 신뢰도

육종가의 신뢰도( $r^2$ )는 예측분산오차(Prediction error variance; PEV)의 값을 이용하여 계산하였으며, 수식은 아래와 같다.

$$r^2 = 1 - \left( \frac{PEV}{\sigma_a^2} \right)$$

#### 마. SNP 표지인자 효과 및 마커 분산 추정

각 SNP 표지인자별 효과는 아래와 같이 GEBV의 역 연산방식을 통하여 추정할 수 있다.

$$\hat{a}_g = Z\hat{u}$$

여기서,  $\hat{a}_g$  는 유전체 육종가(GEBV)벡터, Z는 SNP의 계수행렬,  $\hat{u}$ 는 SNP 효과벡터이다. 이를 분산의 식으로 변환하면 아래와 같다.

$$G^* = ZDZ'\lambda$$

여기서, D는 가중치 벡터이다. 위의 두 개 수식을 이용하여 아래와 같이 SNP효과에 대한 수식으로 변환할 수 있다.

$$\hat{u} = \lambda DZ' G^{*-1} \hat{a}_g = DZ' (ZDZ')^{-1} \hat{a}_g$$

또한 SNP표지인자 효과에 대한 분산을 추정하는 식은 아래와 같다

$$\hat{\sigma}_{u,i}^2 = \hat{u}_i^2 2p_i(1-p_i)$$

상기의 수식을 이용하여 SNP표지인자별 가중치 벡터, 유전체 육종가, SNP표지인자별 효과를 다음과 같은 과정을 통하여 추정할 수 있다.

- (1)  $D(0)=I$
- (2)  $\hat{a}_g$  계산
- (3)  $\hat{u}_{(t)} = \lambda D_{(t)} Z' G_{(t)}^{-1} \hat{a}_g$
- (4)  $d_{i(t+1)}^* = \hat{\sigma}_{u,i}^2$
- (5)  $D_{(t+1)} = \frac{\text{tr}(D_{(0)})}{\text{tr}(D'_{(t+1)})} D'_{(t+1)}$  (표준화)
- (6)  $G_{(t+1)} = ZD_{(t+1)}Z'\lambda$
- (7) 반복 시행 (2 또는 3회)

#### 바. 선발지수(총산자수+포유두수+발정재귀일령)

번식형질들에 대한 유전모수와 육종가를 추정한 후, 이들을 평균 0, 표준편차 1로 표준화하고 경제적 가중치를 곱하여 선발지수값을 산출

#### 샤. 산업용 병합육종프로그램 개발

- (1) C++builder 언어로 프로그래밍
  - (가) 우수 종돈의 선발을 위해 번식관련 형질들을 입력하고 이를 바탕으로 자료분석 및 육종가를 추정하여 우수 종돈의 선발을 위한 기초자료 및 결과치 출력.
  - (나) 개별 설치프로그램으로 풀다운 메뉴를 선택하여 해당 기능을 수행

## (2) 추가된 주요기능

(가) 유전체정보 중복개체 출력

(나) 유전체정보를 이용한 친자감별

(다) 유전체정보를 이용한 부모 찾기

## 야. 정액 정상검사

### (1) 돼지 정자수의 계수

(가) 정자의 생존율 검사에는 SYBR-14(Syber Green) 및 PI(Propidium Iodide)를 이용하여 염색한다. 살아있는 정자는 SYBR-14에 염색되어 녹색을 나타내며, 사멸된 정자는 PI에 염색되어 오렌지색으로 나타낸다. 정액을 100 nm의 SYBR-14 및 12  $\mu$ M의 PI에 5~10분간 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석한다.

### (2) 돼지 정자의 활력 검사

(가) 정자의 운동성을 검사하기 위해서는 정자 내 미토콘드리아를 선택적으로 염색할 수 있는 형광시약인 Rhodamin-123를 이용한다. 정액을 0.53 $\mu$ M의 Rhodamin-123에 26~27°C에서 30분간 염색한 후 유세포 분석기를 이용하여 분석한다.

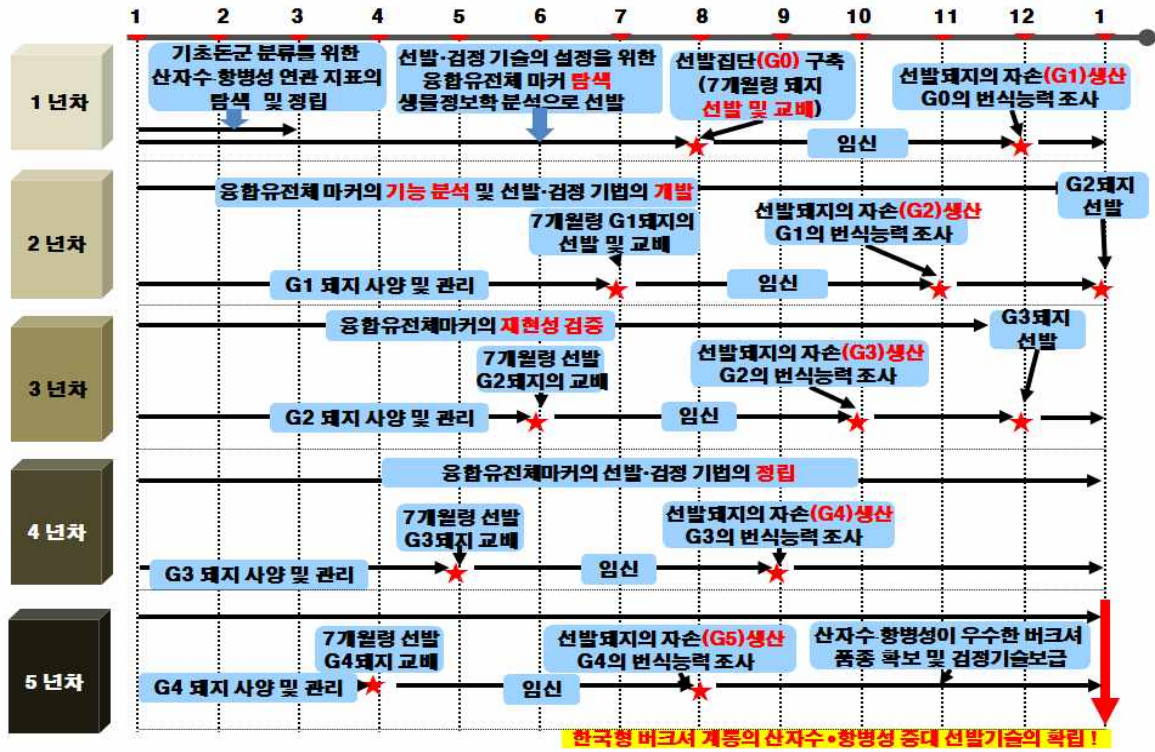
### (3) 정액 오염균주에 대한 항생제 내성검사

(가) 총 7종의 샘플로부터 잠재적 병원성 균주를 분리한 후, 균주를 동정한 결과 5 균주로 확인이 되었고, 그 균주에 대한 항생제 내성 검사를 실시하였다. 항생제 내성검사는 paper disc 방법으로 수행하였고, 항생제는 정액희석제에 사용 가능한 Amikacin, Gentamicin, Penicillin, Streptomycin 등의 4종을 사용하였다. 항생제의 농도는 정액희석제에 사용되는 최대 농도인 300 ppm에서 순차적으로 희석하여 300, 150, 75, 32.5 ppm의 4 종류의 농도로 내성 검사를 실시하였다.

### (4) 통계 분석

(가) SAS program (Statistics Analytical System, USA, 1999)의 GLM(General Linear Model) 방법으로 분석하였다. 처리 평균 간의 평균값 비교를 위해 Duncan의 다중검정 (Multiple Range Test)을 이용하여 유의성 검정( $\alpha = 0.05$ )을 실시하였다.

### 제 3절. 전체 연구개발 추진 일정



1. 1차년도 추진 일정

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획												소요 연구비
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
산자수 증대 선발 기술 개발의 기반 구축	산자수 증대 후보 마커의 탐색 및 확보	████████████████████												45,000
	산자수 증대 후보유전체 마커 확보와 DEG 정보 확인	██												45,000
	산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보								████████████████					40,000
산업용 병합 육종 프로그램 개발	기존에 수행된 연구자료의 데이터베이스 구축	██████████												20,000
	산자수 증대 산업용 육종 프로그램 개발			████████████████████										20,000
	산자수 증대 통합 육종 시스템 구축						████████████████							20,000
	유전능력평가 프로그램 개발								████████████████████					27,000
	자돈생산(G1)										████████████████			50,000



2. 2차년도 추진 일정

(단위 : 천원)

세부과제명	세부연구내용	월 단위 추진계획												소요 연구비
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발	산자수 증대 유전체 조기선발기술개발	████████████████████												45,000
	산자수 증대 후성유전체 조기선발기술개발	████████████████████												45,000
	산자수 증대 융합유전체 조기선발기술개발								████████████████					40,000
병합육종프 로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종	G1우수 후보모돈 선발	██████████												20,000
	조절네트워크 분석			████████████████										20,000
	경제선발지수의 검정						████████████████							20,000
	병합육종프로 그램개발							████████████████						27,000
	자돈생산(G2)										████████████			50,000



4. 4차년도 추진 일정

(단위 : 천원)

일련 번호	세부 연구내용	월 단위 추진 계획												소요 연구비
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	자돈 조기 선발 정보 분석	■	■	■										13,000
2	항병성 관련 유전체의 탐색 및 확보	■	■											6,500
3	항병성 증대 유전체 조기 선발 기술의 정립		■	■	■	■	■							26,000
4	산자수 증대 통합유전체마커 재현성 검정					■	■	■	■	■				39,000
5	산자수 증대 후성 유전체마커 재현성 검정					■	■	■	■	■				39,000
6	SNVs의 생화학적 기능 분석									■	■	■	■	6,500
7	조기선발기술에 의한 G3자돈의 조기선발	■	■	■										3,000
8	병합육종프로그램을 활용한 유전능력평가			■	■	■	■	■						4,000
9	경제선발지수에 의한 재선발 및 계획교배						■	■	■					5,000
10	병합육종프로그램의 정확도 검정, 보완 및 정립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12,700
11	자돈생산 (G4)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	110,300
12	정액검사										■	■	■	2,000

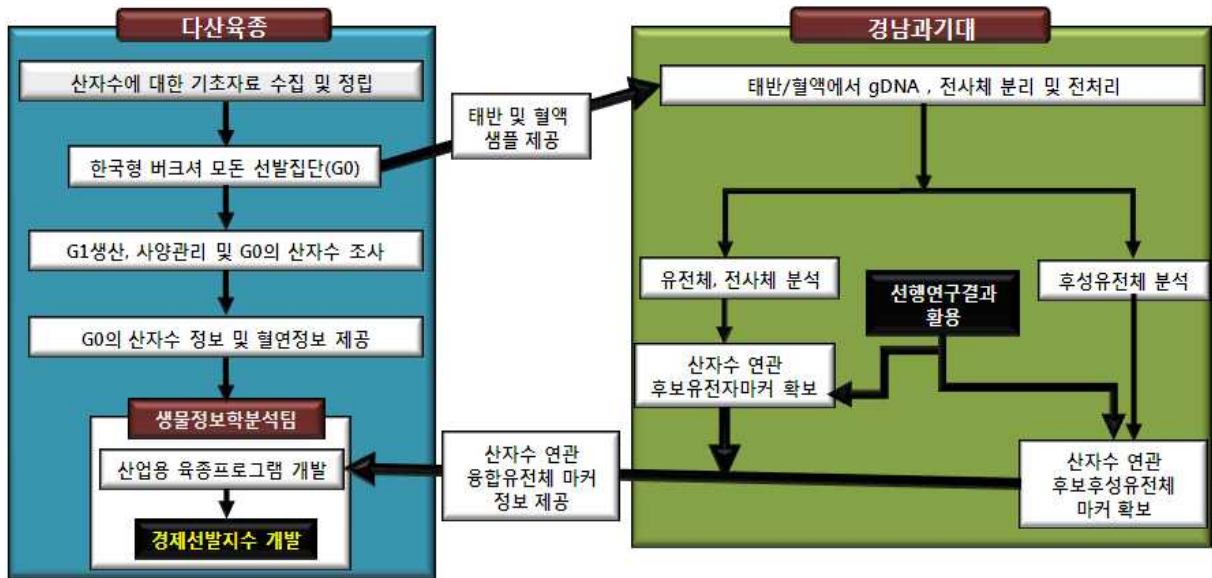
5. 5차년도 추진 일정

(단위 : 천원)

일련 번호	세부 연구내용	월 단위 추진 계획												소요 연구비
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	자돈 조기선발 정보 분석	■	■	■										12,000
2	산자수·항병성 증대 융합유전체 마커의 검정기술 확립			■	■	■	■	■						10,000
3	산자수·항병성 증대 경제선발지수의 확립						■	■	■					5,840
4	산자수·항병성 증대 기술의 확립						■	■	■					5,000
5	산자수·항병성 증대된 버크셔 품종 개발									■	■	■	■	5,000
5	조기선발기술에 의한 G4자돈의 조기선발	■	■	■										3,000
6	병합육종프로그램을 활용한 유전능력평가			■	■	■	■	■						4,000
7	경제선발지수에 의한 재선발 및 계획교배						■	■	■	■				5,000
8	병합육종프로그램의 정확도 검정, 보완 및 정립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12,700
9	자돈생산 (G5)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	110,300
10	정액 검사										■	■	■	2,000

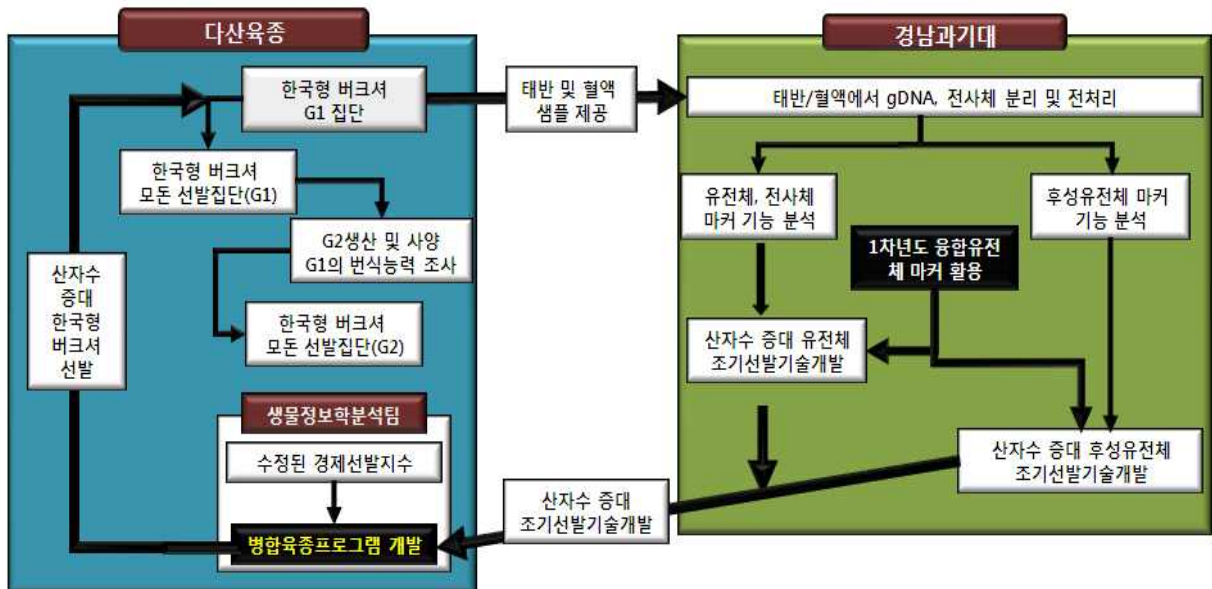
## 제 4절. 연구개발 추진체계

### 1. 1차년도 추진체계



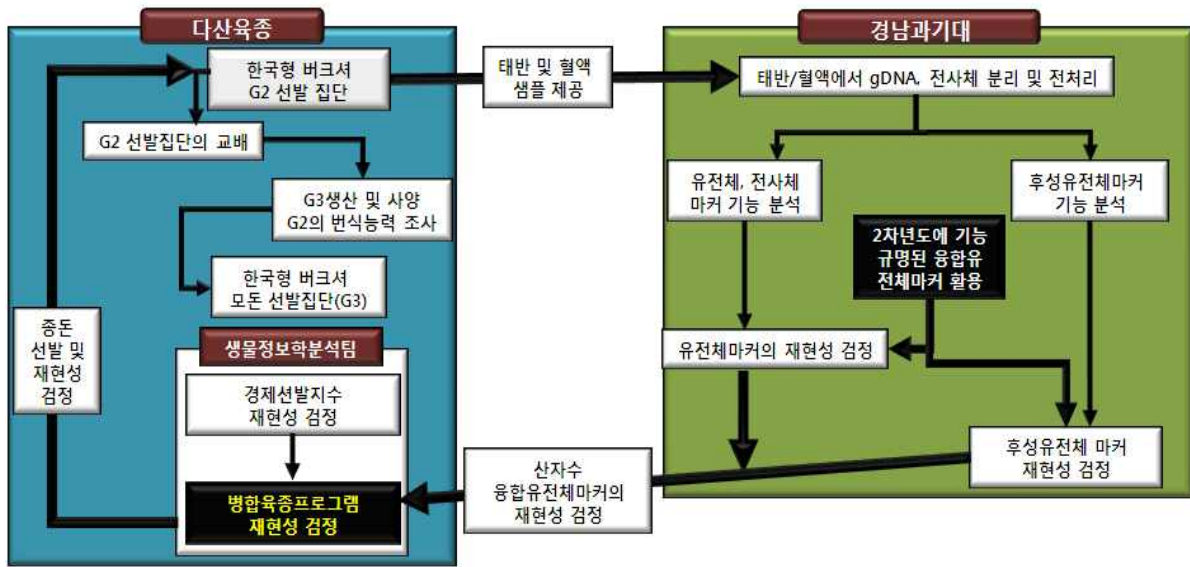
### 산자수 증대 선발기술개발의 기반 구축

### 2. 2차년도 추진체계



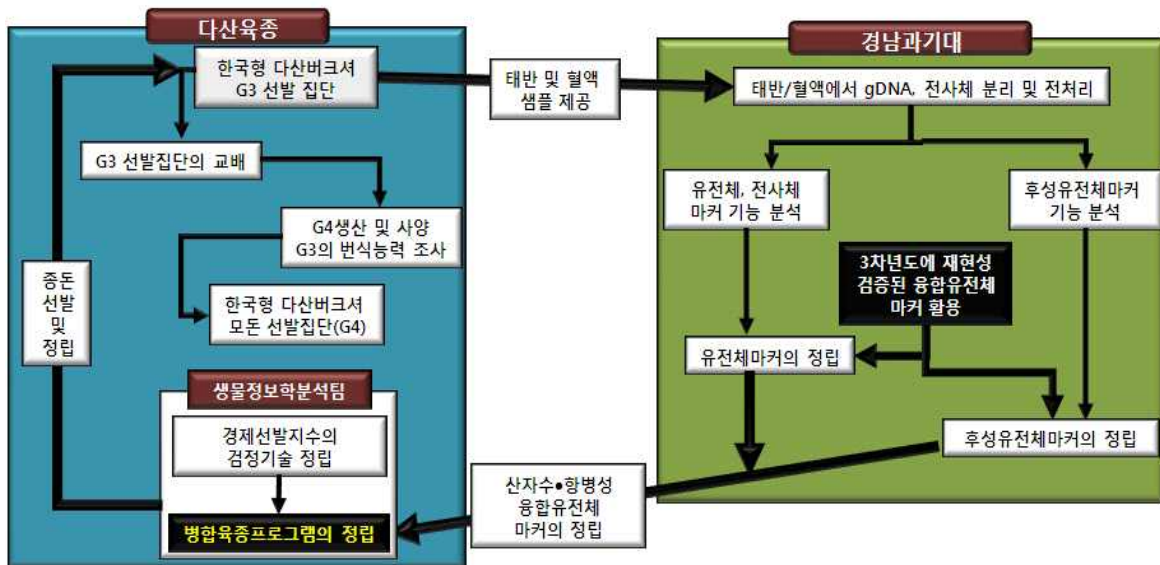
### 한국형 버크셔 계통의 산자수 증대 선발기술 및 병합육종프로그램 개발

3. 3차년도 추진 체계



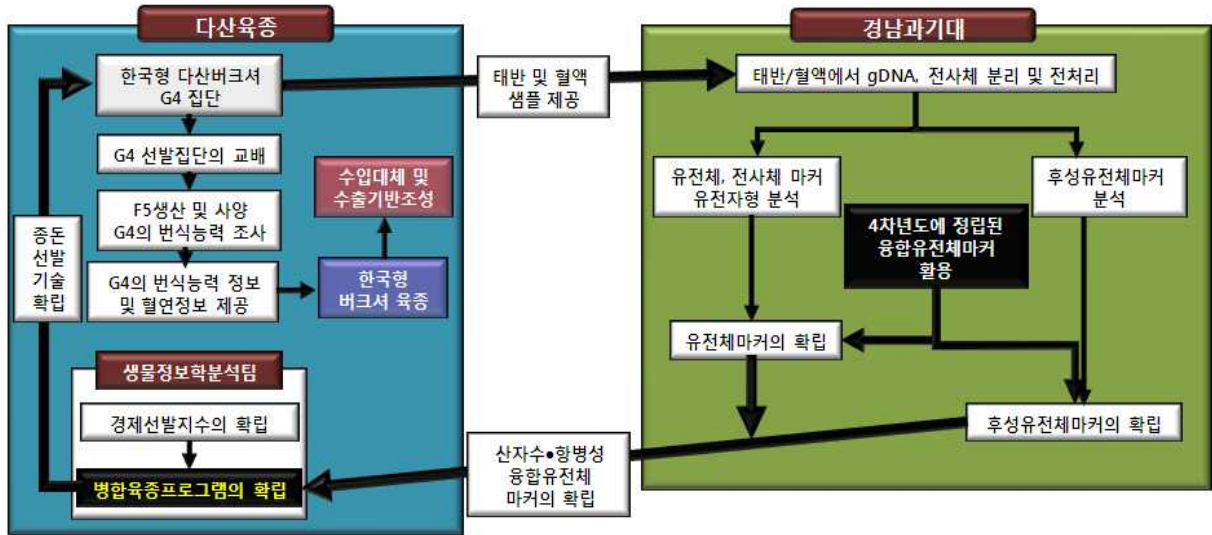
산자수 증대 선발기술 및 병합육종프로그램의 재현성 검증

4. 4차년도 추진 체계



산자수·항병성 증대 선발기술 및 병합육종프로그램의 정립

5. 5차년도 추진 체계



## 산자수·항병성 증대 선발기술의 확립 및 버크셔 육종

### 제 5절. 연차별 연구 결과

#### 1. 1차 년도 연구 결과

##### 가. 융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발

##### (1) 태반 샘플 채취 결과

모든 태반 샘플은 다산육종에서 보유하고 있는 500두 모든 증대 중에서 평균 산자수가 7두 이하와 12두 이상이 되는 것을 선정하여 동일한 산차 (2산차) 각각 3두씩 선발하여 실험에 이용하였다(Table 1). 적절한 크기로 절단된 태반 샘플은 채취와 동시에 액체질소에서 급냉동하여 실험실로 운반하여 DNA와 RNA 분리에 사용하였다. 분리된 DNA와 RNA는 RNA-seq과 bisulfite seq을 위한 재료로서 quality를 평가한 후 사용하였다.

Table 1. Results of sampling according to litter sizes of Berkshire sows

	Species	Sequencing ID	Pooled Samples
Lower litter size	Mammal/Pig	BP1279	BP1279
			BPO-1
			BP852
Higher litter size	Mammal/Pig	BP14463	BP641
			BP1446

##### (2) RNA seq 결과

### (가) RNA seq의 quality 분석 결과

낮은 산자수(TN1307R3720)와 높은 산자수(TN1308R4083)로부터 RNA를 분리하고 RNA-seq을 수행하였다. 수행된 결과로서 총 read수는 47,641,439(높은 산자수)와 45,940,962(낮은 산자수)로 나타났으며, 이 중에서 properly paired read는 각각 29,141,890(61.17%)와 28,078,596(61.12%)의 read 수를 보였다(Fig. 1).



Fig. 1. Alignment statistics.

Reference genome에 의한 총 *Sus scrofa* 유전자의 수는 25,323개로 예측되었고, transcripts의 수는 30,587개로 나타났다(Table 2).

Table. 2. Transcriptome analysis report (Reference-based)

#### Reference Genome

Species	Sus scrofa		
Source	Ensembl	Release	72
Genes	25,323	Transcripts	30,587

#### Data and Analysis

Samples	TN1307R3720(TN1307R3720), TN1308R4083(TN1308R4083)
DEG analysis	• TN1307R3720 vs TN1308R4083 (TN1307R3720-TN1308R4083)

### (나) DEG의 종합적 결과

DEG를 분석해 본 결과, DEG를 보이는 유전자는 278개로 나타났다(Fig. 2, Table 3 and 4). 높은 산자수 그룹은 낮은 산자수 그룹에 비교하여 high expression을 보이는 유전자는 37개이



며, low expression을 보이는 유전자는 241개로 분석되었다. DEG에 따른 clustering 결과는 Fig. 3과 같이 나타났다. DEG의 Pearson correlation의 분석 결과에서 0.962 이상의 높은 상관관계가 있는 것으로 나타났다(Fig. 4).

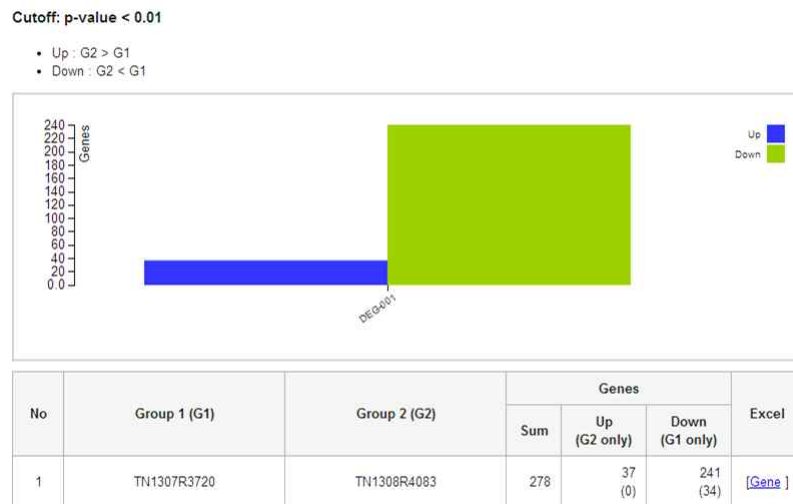


Fig. 2. Summary of differentially expressed genes (DEGs).

Table 3. up-regulated DEGs

No	Accession	Name	Chr	Val_1	Val_2	log <sub>2</sub> (Val_2/Val_1)	p-value	q-value
1	ENSSSCG00000023987	-	2	154.23	1628.16	3.4	0	0
2	ENSSSCG00000016900	-	16	894.51	2994.01	1.74	2.42E-05	0.005243
3	ENSSSCG00000014725	HBB	9	21151.9	65691.4	1.63	2.67E-05	0.005596
4	ENSSSCG00000010312	PLAU	14	971.13	3032.21	1.64	6.39E-05	0.011612
5	ENSSSCG00000021865	INHBA	18	35.82	236.18	2.72	6.84E-05	0.012154
6	ENSSSCG00000012347	ALAS2	X	1043.77	3127.68	1.58	0.000109	0.018402
7	ENSSSCG00000029488	ADAMTS1	13	42.78	245.23	2.52	0.000146	0.023577
8	ENSSSCG0000002623	GSTA2	7	79.6	360.81	2.18	0.00015	0.023992
9	ENSSSCG00000010224	EGR2	14	419.89	1294.49	1.62	0.000216	0.032185
10	ENSSSCG00000018086	ND4L	MT	1964.15	5440.28	1.47	0.000227	0.033423
11	ENSSSCG00000013784	DNAJB1	2	7182.98	18692.7	1.38	0.00039	0.052332
12	ENSSSCG00000011951	NFKBIZ	13	125.37	452.27	1.85	0.000482	0.062452
13	ENSSSCG00000004509	LIPG	1	380.09	1082.43	1.51	0.000704	0.083152
14	ENSSSCG00000017698	CCL4	12	6.96	90.45	3.7	0.000746	0.086822
15	ENSSSCG00000023279	SH3TC2	2	13.93	117.59	3.08	0.000819	0.092984
16	ENSSSCG00000028322	BTG2	9	6824.77	16474.6	1.27	0.001063	0.116301
17	ENSSSCG00000011877	CD86	13	347.26	966.85	1.48	0.001066	0.116301
18	ENSSSCG00000003065	PLAUR	6	595.02	1562.84	1.39	0.001078	0.11682
19	ENSSSCG00000015334	PDK4	9	6502.39	15538.9	1.26	0.001216	0.130291
20	ENSSSCG00000003451	PDPN	6	212.93	623.12	1.55	0.001435	0.150372
21	ENSSSCG00000015476	CHI3L1	9	1458.68	3499.55	1.26	0.001705	0.168598
22	ENSSSCG00000007554	ZFAND2A	3	185.07	537.7	1.54	0.002075	0.194241
23	ENSSSCG00000007032	PLAT	17	2211.91	5009.12	1.18	0.002909	0.248255

24	ENSSSCG0000007978	HBA	3	6759.1	14894.7	1.14	0.003268	0.272125
25	ENSSSCG0000006595	IVL	4	1531.32	3460.35	1.18	0.003396	0.281262
26	ENSSSCG0000009482	SPRY2	11	250.74	646.24	1.37	0.004216	0.331832
27	ENSSSCG00000013408	ADM	2	847.75	1923.65	1.18	0.004421	0.342885
28	ENSSSCG00000015595	ATF3	9	2873.59	6166.93	1.1	0.005055	0.365167
29	ENSSSCG0000008953	IL8	8	23.88	121.61	2.35	0.005452	0.388535
30	ENSSSCG00000013067	PHERO	2	18.91	107.54	2.51	0.005504	0.390473
31	ENSSSCG0000004261	-	1	196.02	507.55	1.37	0.006047	0.418313
32	ENSSSCG00000017723	CCL2	12	135.32	374.88	1.47	0.006398	0.430809
33	ENSSSCG00000003766	DNAJB4	6	1054.71	2269.38	1.11	0.006946	0.450294
34	ENSSSCG00000011265	XIRP1	13	19.9	106.53	2.42	0.00711	0.451729
35	ENSSSCG00000011208	ZNF385D	13	452.73	1025.14	1.18	0.00753	0.472748
36	ENSSSCG00000006070	COX6C	4	1339.28	2827.18	1.08	0.007639	0.477697
37	ENSSSCG00000003155	PPP1R15A	6	2548.22	5244.3	1.04	0.00823	0.50079

Table 4. down-regulated DEGs

No	Accession	Name	Chr	Val_1	Val_2	$\log_2$ (Val_2/Val_1)	p-value	q-value
1	ENSSSCG00000000251	KRT1	5	2441.75	2.01	-10.2	0	0
2	ENSSSCG00000000248	KRT5	5	3237.76	44.22	-6.19	0	0
3	ENSSSCG00000012178	EIF2S3	Y	901.48	0	-9.81	0	0
4	ENSSSCG00000026430	DDX3Y	Y	812.92	0	-9.66	0	0
5	ENSSSCG00000024610	KRT4	5	2931.3	89.45	-5.03	0	0
6	ENSSSCG00000028522	KRT10	12	1523.36	41.21	-5.21	0	0
7	ENSSSCG00000005394	ALDOB	1	488.55	0	-8.93	0	0
8	ENSSSCG00000008596	-	3	421.88	0	-8.71	0	0
9	ENSSSCG00000023945	-	13	476.61	2.01	-7.89	0	0
10	ENSSSCG00000030160	COL18A1	13	2037.78	125.63	-4.02	0	0
11	ENSSSCG00000016442	ABP1	18	318.4	0	-8.31	0	0
12	ENSSSCG00000011453	ITIH4	13	573.13	18.09	-4.99	0	0
13	ENSSSCG00000002709	-	6	908.44	58.29	-3.96	0	0
14	ENSSSCG00000017433	KRT14	12	944.26	66.33	-3.83	0	0
15	ENSSSCG00000011837	MFI2	13	461.69	17.09	-4.76	0	0
16	ENSSSCG00000024816	CEBPB	17	264.67	2.01	-7.04	0	0
17	ENSSSCG00000016159	CPS1	15	260.69	2.01	-7.02	0	0
18	ENSSSCG00000001724	MEP1A	7	213.93	0	-7.73	0	0
19	ENSSSCG00000005832	MAMDC4	1	925.36	77.39	-3.58	0	0
20	ENSSSCG00000016247	TM4SF20	15	200	0	-7.64	0	0
21	ENSSSCG00000011663	RBP2	13	192.04	0	-7.58	0	0
22	ENSSSCG00000012179	ZFY	Y	186.07	0	-7.53	0	0
23	ENSSSCG00000015068	APOA4	9	216.91	3.02	-6.17	0	1E-07
24	ENSSSCG00000030013	-	15	190.05	2.01	-6.56	0	4E-07
25	ENSSSCG00000003080	IGSF23	6	155.22	0	-7.27	0	4E-07

26	ENSSSCG00000029864	EIF1AX	Y	147.26	0	-7.19	0	9E-07
27	ENSSSCG00000006106	CDH17	4	227.86	6.03	-5.24	0	9E-07
28	ENSSSCG00000011723	MME	13	194.03	3.02	-6.01	0	9E-07
29	ENSSSCG00000021728	LGALS2	5	145.27	0	-7.18	0	1.1E-06
30	ENSSSCG00000009179	MTTP	8	279.6	12.06	-4.53	0	1.1E-06
31	ENSSSCG00000013231	C1QTNF4	2	14059.5	2634.21	-2.42	0	1.2E-06
32	ENSSSCG00000026547	SLC45A3	9	4845.7	865.34	-2.49	0	1.2E-06
33	ENSSSCG00000023949	PIM3	5	465.67	41.21	-3.5	0	0.000002
34	ENSSSCG00000007371	HNF4A	17	131.34	0	-7.03	0	4.9E-06
35	ENSSSCG00000005395	-	1	148.26	1	-7.2	0	0.000005
36	ENSSSCG00000014633	PRKCDBP	9	577.11	65.33	-3.14	0	0.000005
37	ENSSSCG00000014055	CDHR2	2	201.99	6.03	-5.07	0	6.2E-06
38	ENSSSCG00000023662	CHST3	14	6174.04	1242.23	-2.31	0	6.8E-06
39	ENSSSCG00000008595	APOB	3	122.39	0	-6.93	0	1.26E-05
40	ENSSSCG00000016284	-	15	119.4	0	-6.89	0	1.78E-05
41	ENSSSCG00000017444	KRT15	12	148.26	2.01	-6.2	0	1.83E-05
42	ENSSSCG00000002866	CEBPA	6	1048.74	175.88	-2.58	1E-07	2.23E-05
43	ENSSSCG00000017445	KRT13	12	2625.83	547.75	-2.26	1E-07	3.92E-05
44	ENSSSCG00000016196	VIL1	15	218.9	12.06	-4.18	2E-07	5.83E-05
45	ENSSSCG00000010437	PAPSS2	14	7256.61	1679.42	-2.11	2E-07	0.000063
46	ENSSSCG00000015249	ADAMTS8	9	546.26	78.39	-2.8	3E-07	8.93E-05
47	ENSSSCG00000025858	ELN	3	4986.99	1181.93	-2.08	4E-07	0.000125
48	ENSSSCG00000017120	SLC6A19	16	100.5	0	-6.64	5E-07	0.000162
49	ENSSSCG00000001906	CYP1A1	7	385.07	48.24	-3	7E-07	0.00021
50	ENSSSCG00000008294	ACTG2	3	4245.71	1034.19	-2.04	7E-07	0.00022
51	ENSSSCG00000007549	CYP2W1	3	573.13	95.48	-2.59	1.1E-06	0.000329
52	ENSSSCG00000011277	CCK	13	179.1	10.05	-4.16	1.3E-06	0.000398
53	ENSSSCG00000020694	DSG1	6	165.17	8.04	-4.36	1.4E-06	0.00042
54	ENSSSCG00000010036	SLC5A1	14	193.03	14.07	-3.78	2.8E-06	0.000811
55	ENSSSCG00000024092	KRT77	5	84.58	0	-6.39	4.1E-06	0.001151
56	ENSSSCG00000028846	-	13	1637.79	410.06	-2	4.8E-06	0.00132
57	ENSSSCG00000022484	CH242-228L8 .2	X	275.62	33.17	-3.05	4.9E-06	0.001326
58	ENSSSCG00000020785	DES	15	2366.13	621.12	-1.93	4.9E-06	0.001326
59	ENSSSCG00000030921	APOA1	9	442.78	75.38	-2.55	5.4E-06	0.001427
60	ENSSSCG00000029796	KBTBD11	15	310.44	43.22	-2.84	7.1E-06	0.001841
61	ENSSSCG00000009138	CFI	8	356.21	55.28	-2.69	7.7E-06	0.001942
62	ENSSSCG00000023498	-	6	413.92	70.35	-2.56	7.7E-06	0.001942
63	ENSSSCG00000017548	NGR	12	228.85	25.13	-3.19	9.5E-06	0.002345
64	ENSSSCG00000002368	LTBP2	7	1467.64	382.92	-1.94	1.06E-05	0.002586
65	ENSSSCG00000023137	-	6	339.3	53.27	-2.67	1.13E-05	0.00272
66	ENSSSCG00000024772	TOMM40	6	163.18	12.06	-3.76	1.21E-05	0.002856
67	ENSSSCG00000000892	HAL	5	427.85	78.39	-2.45	1.32E-05	0.003056

68	ENSSSCG00000022758	PECR	15	900.48	217.09	-2.05	1.33E-05	0.003056
69	ENSSSCG00000006820	EPS8L3	4	73.63	0	-6.19	1.81E-05	0.00409
70	ENSSSCG00000006932	CLCA4	4	162.19	13.07	-3.63	1.95E-05	0.004351
71	ENSSSCG00000006604	CRNN	4	215.92	25.13	-3.1	2.07E-05	0.004556
72	ENSSSCG00000026626	-	6	360.19	64.32	-2.49	2.49E-05	0.005333
73	ENSSSCG00000029613	SYNM	1	691.53	164.83	-2.07	2.72E-05	0.005596
74	ENSSSCG00000005750	-	1	311.44	51.26	-2.6	2.72E-05	0.005596
75	ENSSSCG00000029074	-	12	12679.4	4050.31	-1.65	2.92E-05	0.005913
76	ENSSSCG00000004181	VNN1	1	136.32	9.04	-3.91	2.98E-05	0.005967
77	ENSSSCG00000002901	UPK1A	6	187.06	20.1	-3.22	3.34E-05	0.006606
78	ENSSSCG00000012852	CDHR5	2	163.18	15.08	-3.44	3.74E-05	0.007314
79	ENSSSCG00000014031	-	2	816.9	211.06	-1.95	4.05E-05	0.007813
80	ENSSSCG00000007507	PCK1	17	156.22	14.07	-3.47	4.47E-05	0.008511
81	ENSSSCG00000025543	FABP2	8	186.07	21.11	-3.14	4.72E-05	0.008895
82	ENSSSCG00000006712	REG4	4	66.67	0	-6.05	4.78E-05	0.008898
83	ENSSSCG00000000245	-	5	242.78	36.18	-2.75	5.23E-05	0.009618
84	ENSSSCG00000015864	MYO7B	15	98.51	4.02	-4.61	6.76E-05	0.012147
85	ENSSSCG00000015691	-	15	62.69	0	-5.96	8.39E-05	0.014757
86	ENSSSCG00000009250	PRKG2	8	234.82	37.19	-2.66	9.52E-05	0.016552
87	ENSSSCG00000012147	S100G	X	72.64	1	-6.18	9.64E-05	0.016585
88	ENSSSCG00000016728	IGFBP1	18	162.19	18.09	-3.16	0.000103	0.017474
89	ENSSSCG00000014232	LOX	2	627.85	167.84	-1.9	0.000127	0.021165
90	ENSSSCG00000003974	CITED4	6	69.65	1	-6.11	0.000142	0.023378
91	ENSSSCG00000008461	ZFP36L2	3	2627.82	885.44	-1.57	0.000145	0.023577
92	ENSSSCG00000029328	TNFRSF6	2	287.56	56.28	-2.35	0.000156	0.024749
93	ENSSSCG00000016746	NPC1L1	18	68.66	1	-6.09	0.000161	0.024981
94	ENSSSCG00000002527	ANKRD9	7	270.64	51.26	-2.4	0.000163	0.024981
95	ENSSSCG00000030778	MFI2	13	68.66	1	-6.09	0.000161	0.024981
96	ENSSSCG00000008557	EMILIN1	3	1284.56	410.06	-1.65	0.000181	0.027476
97	ENSSSCG00000026923	-	14	624.87	173.87	-1.85	0.000194	0.029261
98	ENSSSCG00000011862	MUC13A	13	55.72	0	-5.79	0.000228	0.033423
99	ENSSSCG00000027593	-	12	7133.23	2602.05	-1.45	0.000236	0.033967
100	ENSSSCG00000002831	IRX3	6	548.25	149.75	-1.87	0.000236	0.033967
101	ENSSSCG00000005930	SLC45A4	4	1572.12	529.66	-1.57	0.000257	0.036561
102	ENSSSCG00000002512	DEGS2	7	516.41	140.71	-1.88	0.000276	0.039009
103	ENSSSCG00000007530	PPP1R3D	17	510.44	139.7	-1.87	0.000298	0.041761
104	ENSSSCG00000009558	F10	11	71.64	2.01	-5.16	0.000303	0.042085
105	ENSSSCG00000002558	KIAA0284	7	5464.6	2033.2	-1.43	0.000339	0.046683
106	ENSSSCG00000016228	-	15	52.74	0	-5.71	0.000352	0.048038
107	ENSSSCG00000023333	FCN2	1	469.64	127.64	-1.88	0.000361	0.048785
108	ENSSSCG00000013614	CNN1	2	1988.03	714.58	-1.48	0.00043	0.05716
109	ENSSSCG00000002444	FBLN5	7	270.64	59.3	-2.19	0.000461	0.060819

110	ENSSSCG00000026732	-	7	252.73	53.27	-2.25	0.000467	0.06101
111	ENSSSCG00000010947	FBP2	10	160.2	24.12	-2.73	0.000514	0.066091
112	ENSSSCG00000017581	COL1A1	12	5194.95	1997.02	-1.38	0.000531	0.067695
113	ENSSSCG00000000385	SLC39A5	5	49.75	0	-5.63	0.000546	0.068511
114	ENSSSCG00000009942	DAO	14	49.75	0	-5.63	0.000546	0.068511
115	ENSSSCG00000005001	RPL10L	1	299.5	71.36	-2.07	0.000571	0.07112
116	ENSSSCG00000021503	BCHE	13	158.21	24.12	-2.71	0.000582	0.071949
117	ENSSSCG00000003109	TMEM160	6	137.31	18.09	-2.92	0.000587	0.072018
118	ENSSSCG00000014965	ENDOD1	9	258.7	57.29	-2.18	0.000595	0.07238
119	ENSSSCG00000017447	-	12	77.61	4.02	-4.27	0.000635	0.075565
120	ENSSSCG00000023212	CPI17	6	189.05	34.17	-2.47	0.00063	0.075565
121	ENSSSCG00000005485	AMBP	1	48.76	0	-5.6	0.000632	0.075565
122	ENSSSCG00000004632	GLDN	1	279.6	66.33	-2.08	0.000714	0.083676
123	ENSSSCG00000007816	IL21R	3	348.25	92.46	-1.91	0.000768	0.088725
124	ENSSSCG00000000664	A2ML1	5	159.2	26.13	-2.61	0.00082	0.092984
125	ENSSSCG00000023215	MAOB	X	253.73	58.29	-2.12	0.000823	0.092984
126	ENSSSCG00000012536	PLP1	X	46.77	0	-5.54	0.000848	0.095178
127	ENSSSCG00000006029	NUDCD1	4	45.77	0	-5.51	0.000983	0.108802
128	ENSSSCG00000012236	OTC	X	45.77	0	-5.51	0.000983	0.108802
129	ENSSSCG00000007574	SDK1	3	310.44	83.42	-1.9	0.001219	0.130291
130	ENSSSCG00000012699	FHL1C	X	1582.07	612.07	-1.37	0.001274	0.135309
131	ENSSSCG00000009132	ENPEP	8	228.85	53.27	-2.1	0.001314	0.138628
132	ENSSSCG00000028878	BCAR1	6	1697.49	668.35	-1.34	0.001447	0.150653
133	ENSSSCG00000022258	-	17	176.12	35.18	-2.32	0.001478	0.152793
134	ENSSSCG00000001785	MESDC1	7	540.29	179.9	-1.59	0.001538	0.158019
135	ENSSSCG00000022553	TNRC18	3	310.44	86.43	-1.84	0.001577	0.160936
136	ENSSSCG00000007927	PPL	3	5934.24	2502.55	-1.25	0.00161	0.163309
137	ENSSSCG00000001873	CSPG4	7	1138.29	436.19	-1.38	0.001667	0.167443
138	ENSSSCG00000021610	CHPF	15	1809.92	725.64	-1.32	0.001672	0.167443
139	ENSSSCG00000002265	FAM174B	7	179.1	37.19	-2.27	0.001703	0.168598
140	ENSSSCG00000013579	CD209	2	884.56	328.65	-1.43	0.001727	0.169657
141	ENSSSCG00000002524	AMN	7	41.79	0	-5.38	0.001784	0.174204
142	ENSSSCG00000017012	SLIT3	16	1362.17	536.69	-1.34	0.001815	0.176197
143	ENSSSCG00000011850	MUC4	13	3788	1596	-1.25	0.001867	0.180129
144	ENSSSCG00000009722	SPOCK3	14	92.54	10.05	-3.2	0.001955	0.186011
145	ENSSSCG00000025924	IGFBP5	15	839.79	313.57	-1.42	0.001963	0.186011
146	ENSSSCG00000022280	DACT3	6	193.03	43.22	-2.16	0.001946	0.186011
147	ENSSSCG00000024018	SLC16A3	12	213.93	51.26	-2.06	0.001996	0.187918
148	ENSSSCG00000025423	KCNK5	7	1897.48	780.92	-1.28	0.002148	0.198261
149	ENSSSCG00000015404	-	9	357.21	109.55	-1.71	0.002155	0.198261
150	ENSSSCG00000009672	SCARA5	14	455.71	150.76	-1.6	0.002138	0.198261
151	ENSSSCG00000005845	TOR4A	1	79.6	7.04	-3.5	0.002173	0.198681

152	ENSSSCG00000017192	EVPL	12	7741.18	3375.93	-1.2	0.002254	0.204928
153	ENSSSCG00000013088	LRR10B	2	107.46	15.08	-2.83	0.002408	0.217734
154	ENSSSCG00000026610	RNF10	14	625.86	229.15	-1.45	0.002669	0.239911
155	ENSSSCG00000007485	BCAS1	17	761.18	289.45	-1.39	0.002721	0.243176
156	ENSSSCG00000009513	SLC15A1	11	4680.53	2062.34	-1.18	0.002898	0.248255
157	ENSSSCG00000002392	IRF2BPL	7	1389.03	571.87	-1.28	0.002826	0.248255
158	ENSSSCG00000025805	-	3	80.6	8.04	-3.33	0.002866	0.248255
159	ENSSSCG00000029675	MMP8	9	91.54	11.05	-3.05	0.002885	0.248255
160	ENSSSCG00000010792	PRAP1	14	46.77	1	-5.54	0.002913	0.248255
161	ENSSSCG00000026978	ROS1	1	46.77	1	-5.54	0.002913	0.248255
162	ENSSSCG00000025578	ALDH1A2	1	135.32	25.13	-2.43	0.002919	0.248255
163	ENSSSCG00000005094	TMEM30B	1	2730.31	1177.91	-1.21	0.002859	0.248255
164	ENSSSCG00000006312	GPA33	4	116.42	19.1	-2.61	0.003139	0.265603
165	ENSSSCG00000000211	AQP5	5	2358.17	1021.12	-1.21	0.003231	0.271918
166	ENSSSCG00000025510	SLC13A2	18	37.81	0	-5.23	0.003256	0.272125
167	ENSSSCG00000017885	SMTNL2	12	244.77	69.35	-1.82	0.003602	0.295572
168	ENSSSCG00000010322	ZNF503	14	299.5	92.46	-1.7	0.003606	0.295572
169	ENSSSCG00000028460	S1PR5	2	229.85	63.32	-1.86	0.003651	0.297145
170	ENSSSCG00000013501	CREB3L3	2	81.59	9.04	-3.17	0.003662	0.297145
171	ENSSSCG00000006693	PDZK1	4	36.81	0	-5.19	0.003789	0.305841
172	ENSSSCG00000007993	SOLH	3	1477.59	630.16	-1.23	0.003842	0.308572
173	ENSSSCG00000004735	-	1	335.32	109.55	-1.61	0.004021	0.321278
174	ENSSSCG00000022317	SLC38A10	12	1646.74	712.57	-1.21	0.004086	0.32488
175	ENSSSCG00000005967	FAM84B	4	701.48	275.38	-1.35	0.004123	0.326125
176	ENSSSCG00000031023	CD24	1	9899.35	4579.97	-1.11	0.004291	0.336089
177	ENSSSCG00000025993	SGPP2	15	1316.4	562.82	-1.23	0.004362	0.339983
178	ENSSSCG00000005380	-	1	741.28	296.49	-1.32	0.004495	0.346897
179	ENSSSCG00000000050	-	5	848.74	346.74	-1.29	0.004543	0.347746
180	ENSSSCG00000011355	COL7A1	13	655.71	257.29	-1.35	0.00455	0.347746
181	ENSSSCG00000012001	ROBO1	13	230.84	66.33	-1.8	0.004645	0.353319
182	ENSSSCG00000007369	JPH2	17	213.93	59.3	-1.85	0.004681	0.354306
183	ENSSSCG00000005751	COL5A1	1	4951.17	2282.45	-1.12	0.004736	0.356831
184	ENSSSCG00000003603	COL16A1	6	449.75	163.82	-1.46	0.004762	0.357056
185	ENSSSCG00000012394	GJB1	X	942.27	392.97	-1.26	0.004845	0.359846
186	ENSSSCG00000022645	H2AFX	9	250.74	75.38	-1.73	0.004867	0.359846
187	ENSSSCG00000028623	RARRES1	13	250.74	75.38	-1.73	0.004867	0.359846
188	ENSSSCG00000004012	THBS2	1	1443.76	630.16	-1.2	0.00495	0.364156
189	ENSSSCG00000021173	-	1	572.13	221.11	-1.37	0.004972	0.364156
190	ENSSSCG00000012832	MXRA5	X	19938	9414.21	-1.08	0.005035	0.365167
191	ENSSSCG00000025146	-	6	1927.33	860.32	-1.16	0.005044	0.365167
192	ENSSSCG00000012576	CHRD1	X	53.73	3.02	-4.16	0.005094	0.366295
193	ENSSSCG00000023675	-	10	73.63	8.04	-3.19	0.005394	0.386132

194	ENSSSCG00000023784	-	9	965.16	410.06	-1.23	0.005608	0.396096
195	ENSSSCG00000012982	SIPA1	2	323.38	109.55	-1.56	0.005641	0.396672
196	ENSSSCG00000016609	SLC13A1	18	41.79	1	-5.38	0.00569	0.398322
197	ENSSSCG00000010527	MARVELD1	14	197.01	54.27	-1.86	0.005743	0.400274
198	ENSSSCG00000005610	SLC2A8	1	709.44	291.46	-1.28	0.006055	0.418313
199	ENSSSCG00000021753	-	18	64.68	6.03	-3.42	0.006223	0.428062
200	ENSSSCG00000021015	-	12	5607.88	2662.35	-1.07	0.006331	0.430809
201	ENSSSCG00000008550	SLC5A6	3	436.81	163.82	-1.41	0.006305	0.430809
202	ENSSSCG00000010109	SCARF2	14	312.43	106.53	-1.55	0.006377	0.430809
203	ENSSSCG00000027275	HHLA2	13	51.74	3.02	-4.1	0.006399	0.430809
204	ENSSSCG00000013079	DAGLA	2	523.38	205.03	-1.35	0.006441	0.431767
205	ENSSSCG00000014255	SLC12A2	2	876.6	374.88	-1.23	0.006633	0.442791
206	ENSSSCG00000009545	COL4A2	11	28634.4	13917.8	-1.04	0.006822	0.448552
207	ENSSSCG00000024812	-	3	1063.67	466.34	-1.19	0.006795	0.448552
208	ENSSSCG00000016034	COL3A1	15	64826.9	31585.4	-1.04	0.006833	0.448552
209	ENSSSCG00000027302	-	2	1073.62	471.36	-1.19	0.006823	0.448552
210	ENSSSCG00000027956	SSH3	2	761.18	320.61	-1.25	0.006862	0.448606
211	ENSSSCG00000010479	RBP4	14	729.34	305.53	-1.26	0.006911	0.449981
212	ENSSSCG00000005843	LCN15	1	32.84	0	-5.03	0.006973	0.450294
213	ENSSSCG00000022289	PCDH1	2	3083.54	1453.29	-1.09	0.007004	0.45045
214	ENSSSCG00000014625	TRIM3	9	433.82	164.83	-1.4	0.007044	0.451165
215	ENSSSCG00000005177	SH3GL2	1	273.63	90.45	-1.6	0.007079	0.451589
216	ENSSSCG00000008004	FAM173A	3	299.5	102.51	-1.55	0.007194	0.455291
217	ENSSSCG00000008664	FAM84A	3	2112.41	982.93	-1.1	0.007301	0.460165
218	ENSSSCG00000029421	-	1	507.45	202.01	-1.33	0.007695	0.479312
219	ENSSSCG00000007583	-	3	82.59	12.06	-2.78	0.007792	0.482051
220	ENSSSCG00000010120	C22ORF39	14	154.23	39.2	-1.98	0.007825	0.482051
221	ENSSSCG00000013896	MPV17L2	2	320.39	113.57	-1.5	0.007831	0.482051
222	ENSSSCG00000016600	TMEM229A	18	1118.39	502.52	-1.15	0.008144	0.497497
223	ENSSSCG00000013377	USH1C	2	31.84	0	-4.99	0.00813	0.497497
224	ENSSSCG00000023404	FAM89A	14	487.56	194.98	-1.32	0.008506	0.515583
225	ENSSSCG00000026422	GPER	3	130.35	30.15	-2.11	0.008562	0.517026
226	ENSSSCG00000002545	ZFYVE21	7	101.49	19.1	-2.41	0.008626	0.518894
227	ENSSSCG00000011963	TOMM70A	13	569.15	235.18	-1.28	0.008671	0.519635
228	ENSSSCG00000012083	RIPK4	13	3121.35	1503.54	-1.05	0.008728	0.52105
229	ENSSSCG00000003514	HSPG2	6	7683.47	3790.01	-1.02	0.008985	0.534405
230	ENSSSCG00000025632	-	4	141.29	35.18	-2.01	0.009221	0.54042
231	ENSSSCG00000008695	MFSD10	8	588.05	246.24	-1.26	0.009205	0.54042
232	ENSSSCG00000015326	COL1A2	9	57464.8	28771.3	-0.998	0.009223	0.54042
233	ENSSSCG00000003371	GPR153	6	1270.63	584.93	-1.12	0.009169	0.54042
234	ENSSSCG00000021991	-	13	445.76	176.89	-1.33	0.009296	0.542717
235	ENSSSCG00000008701	LREAP1	8	5730.26	2823.16	-1.02	0.009338	0.543128

236	ENSSSCG00000023423	FAM100B	12	807.95	355.78	-1.18	0.009412	0.545432
237	ENSSSCG00000013338	SLC5A12	2	30.84	0	-4.94	0.009483	0.54755
238	ENSSSCG00000016784	ANKH	16	2273.6	1090.47	-1.06	0.00952	0.54769
239	ENSSSCG00000008722	-	8	340.29	126.64	-1.43	0.009612	0.550986
240	ENSSSCG00000002696	VATIL	6	102.49	20.1	-2.35	0.009668	0.552217
241	ENSSSCG00000017459	KRT20	12	37.81	1	-5.23	0.00974	0.554311



Fig. 3. Clustering of DEG.

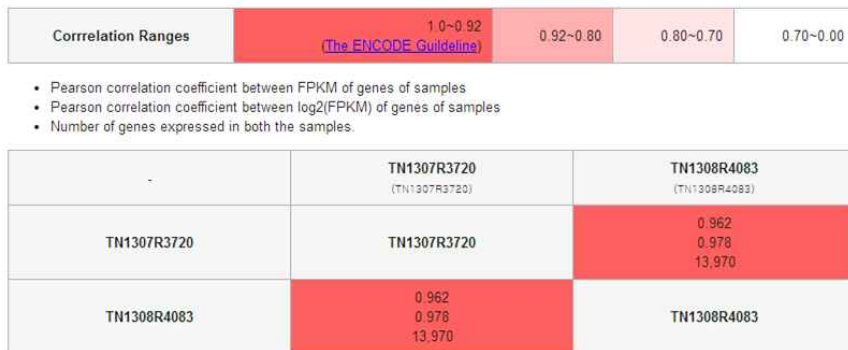


Fig. 4. Pearson correclation.

(다) DEG의 기능별 분류 결과

Read된 유전자의 분석결과, 양 그룹에서 detection된 총 유전자의 타입은 19,545였고, 그 중 알려진 low와 high 산자수 그룹에서 각각 14,824와 14,511개의 유전자가 mapping되었다(Fig. 5). 이 중에서 novel gene은 감지되지 않았다.

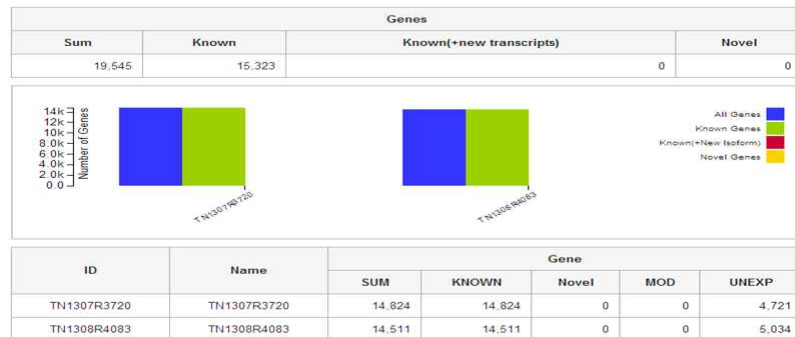


Fig. 5. Expression model.

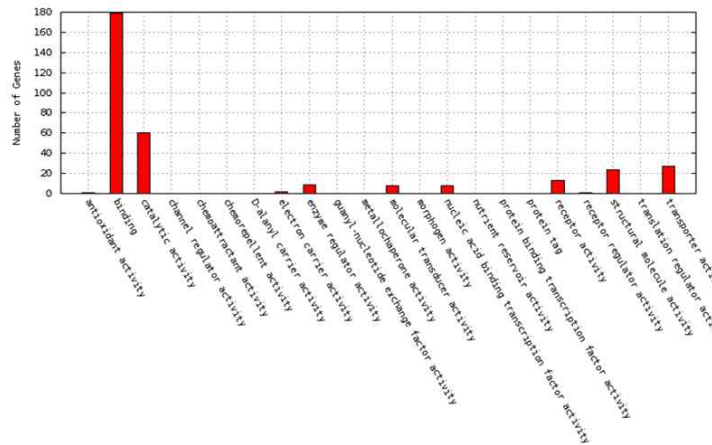


DEG 유전자를 기능별로 molecular function, biological process, cellular component에 따라 분류되었다(Table 5). 총 278 DEG 중 gene ontology 분석이 가능한 DEG는 117개 이었으며, gene ontology는 1,727개이었다. 이들 중 유의미한 DEG category는 molecular function, biological process, cellular component에 대해 각각 3, 6, 6개가 존재하였다. Molecular function에서 binding에 연관된 유전자가 179개로 가장 많은 수를 유지하였고, category는 molecular function, carbon-carbon lyase activity로 분류되었다(Fig. 6). 구체적인 기능적 분류는 structural molecule activity, fructose-bisphosphate aldolase activity, aldehyde-lyase activity 등이었다.

**Table 5. Gene ontology enrichment**

Cutoff: p-value < 0.001

No	Name	# DEG	# GO	molecular_function	biological_process	cellular_component
DEG-001	TN1307R3720 vs TN1308R4083	117	1727	3 / 306 (1.0%)	6 / 1275 (0.5%)	6 / 146 (4.1%)



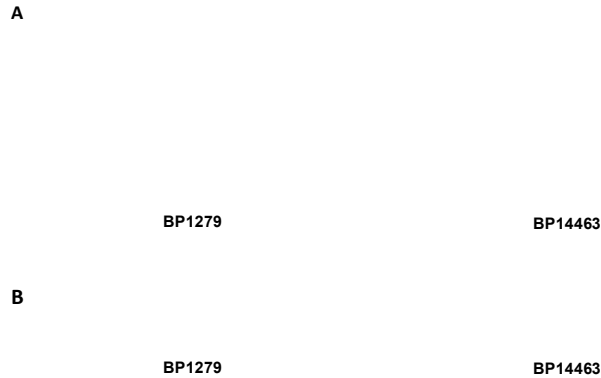
No.	ACC	p-value	Category	# Transcripts	Definition	Link
1	<a href="#">GO:0005198</a>	6.548702e-07	molecular_function	14	structural molecule activity	<a href="#">[AmiGO]</a> <a href="#">[QuickGO]</a>
2	<a href="#">GO:0004332</a>	9.88023e-05	carbon-carbon lyase activity	2	fructose-bisphosphate aldolase activity	<a href="#">[AmiGO]</a> <a href="#">[QuickGO]</a>
3	<a href="#">GO:0016832</a>	0.0003414347	carbon-carbon lyase activity	2	aldehyde-lyase activity	<a href="#">[AmiGO]</a> <a href="#">[QuickGO]</a>

**Fig. 6. Molecular function of DEG.**

Biological process는 single organism process, cellular process, metabolic process, biological regulation등이 높은 분포도를 보였다(Fig. 7). 이 category는 single-multicellular organism process, organic substance metabolic process, biological process, cellular response to inorganic substance, cellular response to chemical stimulus, establishment of localization 등으로 분류되었다. Cellular component는 cell, cell part, membrane, organelle 등의 순서로 존재했다(Fig. 8). Category는 cell part, keratin filament, cell part, cellular component 등으로 분류되었다.

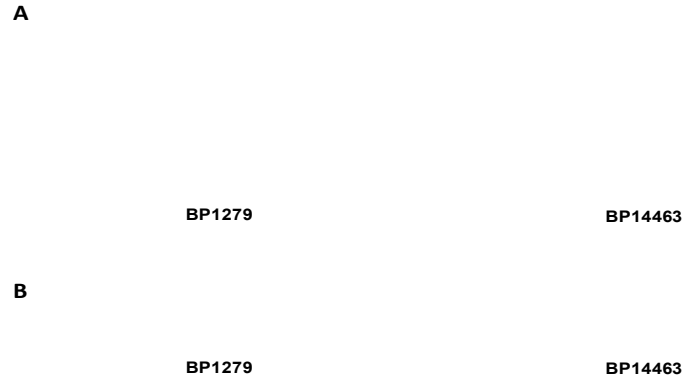


1% 및 0.1%의 정확도를 나타낸다. 생산된 raw sequence 데이터의 평균 quality가 전체적으로 QS30 이상에서 분포되므로 두 샘플 모두 high quality를 나타내는 것을 알 수 있다. 전체 BS-seq 데이터에서 nucleotides의 구성비의 분석결과는 A와 T의 구성비는 약 80% (40%:40%)이며, G와 C의 구성비는 약 20%(10%:10%)인 것으로 나타났다.



**Fig. 9. Sequence Quality control. (A) Quality Score (QS).** This view shows an overview of the range of quality values across all bases at each position in the FastQ file. X- and Y-axes indicate each position of sequences and QS, respectively. (B) Sequence content across all bases. This plots out the proportion of each base position in a file for which each of the four normal DNA bases has been called. X- and Y-axes indicate each position of sequences and composition rate of nucleotides, respectively.

총 합계된 GC count는 normal distribution보다 15% 이상 클 경우 비정상적이지만, 정상적인 범위내에 나타났다(Fig. 10A). 두 샘플에서는 약 20~25%에서 높은 분포를 나타내고 있었다. 다양한 library 구축에서 대부분 sequences는 최종 세트에서 단지 1회로 되어질 것이다. Duplication의 낮은 수준은 표적 서열의 coverage의 매우 높은 수준을 지시하지만, duplication의 높은 수준은 enrichment bias의 어떤 종류를 지시하는 것 같다(eg PCR over amplification). 이 모듈은 세트안에 모든 서열에 duplication의 정도를 카운트하고 duplication의 다른 정도와 서열의 상대적 수를 보여주는 plot를 나타낸다. 따라서 본 plot에서 나타난 결과는 두 샘플에서 비교적 낮은 sequence duplication level을 나타내는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 10B).



**Fig. 10. GC content (A) and sequence duplication level(B).** (A) This measures the GC content across the whole length of each sequence in a file and compares it to a modeled normal distribution of GC content. X- and Y-axes indicate each position of sequences and read per GC count, respectively. (B) X- and Y-axes sequence duplication level and % duplicate relative to unique, respectively.

**(나) Sequencing summary 및 CG, CHG, CHH에서 sequence depth**

Raw data의 생산량(10x)이 낮은 상태에서 PCR duplication level이 낮아 mapping 결과로부터 PCR deduplication 단계는 생략되었다. 총 raw reads의 수는 낮은 산자수(BP1279)와 높은 산자수(BP14463)가 396,699,088과 422,836,798이었다(Table 6). Mapped reads는 각각 72.26%와 70.55%였으며, uniquely mapped reads의 수는 260,135,422(65.56%)와 269,776,674(63.80%)였다. 두 샘플은 데이터 생산량 및 맵핑율이 유사한 것으로 나타났다.

**Table 6. Sequencing summary from genomic DNA of Berkshire placenta**

	Sample	
	BP1279	BP14463
Raw reads (No.)	396,699,088	422,836,798
(Read depth, X)	13.75 (X)	14.66 (X)
Mapped reads (No.)	286,652,998	298,318,078
(%)	(72.26%)	(70.55%)
Uniquely mapped reads (No.)	260,135,422	269,776,674
(%)	(65.56%)	(63.80%)

DNA methylation은 cytosine에서 발생한다. CG, CHG, CHH 세 가지 content로 나누어 분석을 실시했으며, 평균 sequence depth는 5.63~6.64를 나타내었다(Table 7). Reference의 서열 대비 CG, CHG, CHH는 81.16~84.07%를 cover하고 있는 것으로 나타났다.

**Table 7. Sequence depth for cytosines including CG, CHG and CHH**



**Fig. 11. Sequence depth for CG, CHG, and CHH.** These results exhibit cumulative distribution according to sequence depth to aligned CG, CHG, and CHH. X- and Y-axes indicate sequence depth and cumulative distribution, respectively.

**(다) Methylcytosine mapping의 summary 및 methylation의 분포**

Methylation이 발생한 site를 counting한 결과 CG가 18,955,910~19,270,603 (81.60~82.96%)에 의해 우월적으로 methylation이 발생하였다(Table 8). 상대적으로 CHG나 CHH는 2.28~2.76%로 매우 낮은 methylation을 보였다. 낮은 산자수는 CG methylation이 높은 산자수 군에 비교하여 314,693에 의해 높게 관찰되었다. 그러나 CHG나 CHH는 상반되는 결과로서 높은 산자수에서 238,512와 605,263으로 높은 수준을 보였다.

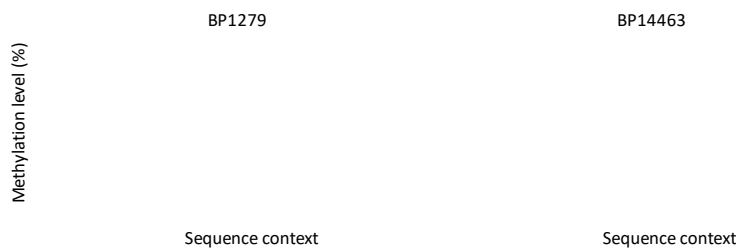
**Table 8. Summary for methylcytosine mapping**

		Sample	
		BP1279	BP14463
CG	No. <sup>m</sup> CG (% †)	19,270,603 (82.96)	18,955,910 (81.60)
CHG	No. <sup>m</sup> CHG (%)	2,167,423 (2.47)	2,405,935 (2.76)
CHH	No. <sup>m</sup> CHH (%)	6,557,750 (2.28)	7,163,013 (2.51)

\* H : A, C, T

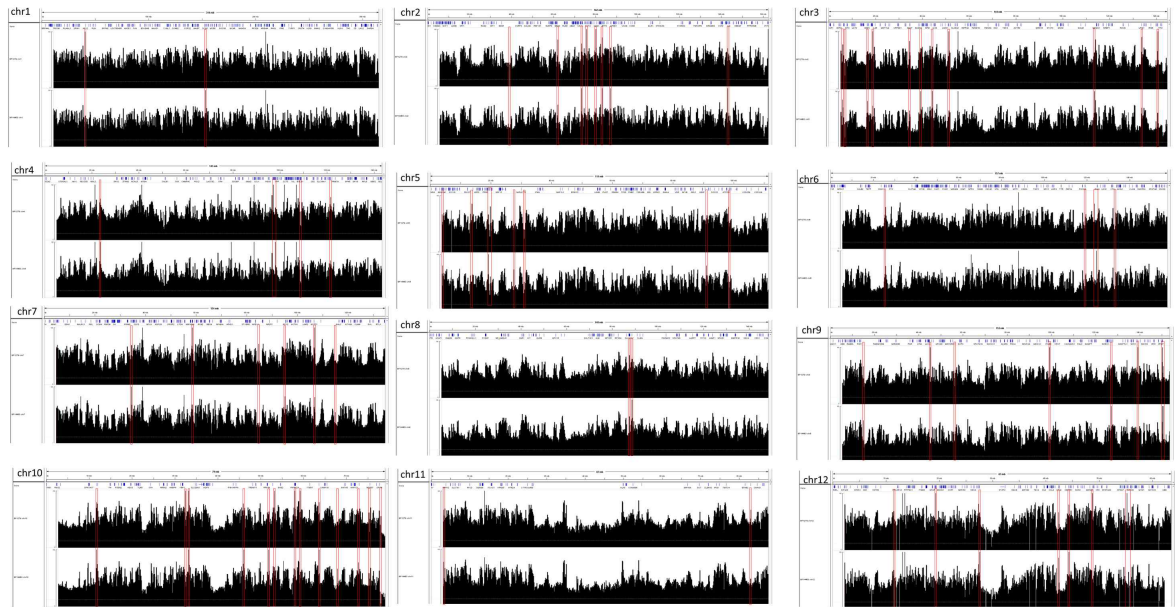
† # of <sup>m</sup>CGs / # of CGs in alignment

CG의 평균 methylation level은 산자수에 따라 각각 53.64와 50.27%로 보이며, CHG와 CHH는 매우 낮은 평균 수준인 약 0.50~0.56%를 나타내었다(Fig. 12). CG methylation은 낮은 산자수가 높은 산자수 군에 비교하여 3.57%가 높은 것으로 나타났다.



**Fig. 12. The average global methylation level of CG, CHG, and CHH.**

Genome wide CpG methylation 분포는 Fig. 13에서 보여지는 바와 같이 genomic wide 분포가 다양한 것으로 나타나고 있다. 상염색체에서는 chr2, 3, 10에서 비교적 크게 차이가 나타나는 DMR 영역들이 많이 분포되는 것으로 나타났다. 그러나 Chr1, 8, 11, 13은 많은 차이를 보이는 DMR이 매우 저조한 것으로 관찰되었다. ChrM은 양 샘플에서 methylation이 매우 저조한 것으로 관찰되었다.



**Fig. 13. Distribution of chromosome-wide DNA methylation level.** Bar graphs of these reflect the average global methylation level. X- and Y-axes indicate a number of nucleotide of chromosome and methylation level (%), respectively. Top and bottom panels of each chromosome mark lower and higher litter sizes, respectively.

CHG 및 CHH methylation 분포는 genome-wide에서 특이적으로 관찰되는 패턴이 보이지 않았다(data not shown). 이것은 CpG에 비교할 때 상대적으로 매우 낮은 methylation에 의해 나타나는 현상으로 추정된다. CG, CHG, CHH methylation level별 분포도는 CG는 CHG 및 CHH에 비교하여 50% 수준 이상에서 증가된 분포를 나타냈다(Fig. 14).

BP1279

BP14463

CG

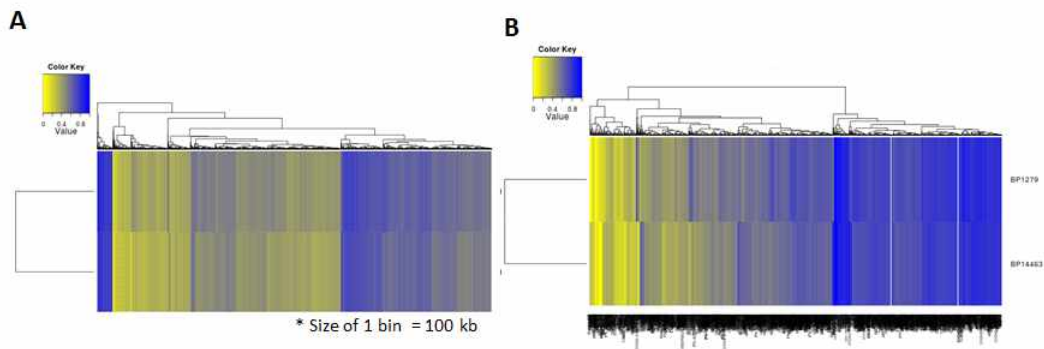
CHG

CHH

**Fig. 14. Distribution chart of CG, CHG, and CHH methylation.** X- and Y-axes indicate distribution range in units of 10% and distribution (%) of methylcytosine, respectively.

**(라) 산자수 그룹간에 global methylation의 상관관계**

두 샘플 사이에서 common하고  $\geq 5$  depth에 해당하는 methylcytosine 사이에 유사성을 분석하였다. 본 Hierarchical clustering에서 노란색은 낮은 methylation이고, 파란색은 높은 methylation을 나타낸다. Fig. 15에서 보이는 바와 같이 methylation된 부위에 대한 두 샘플 사이에 pearson correlation values는 전체 CG와 유전자 부위에 대해 각각 0.946과 0.913으로 매우 높은 상관관계가 있었다. 특히, 전체 CG 메틸화보다 유전자 부위의 메틸화에 따른 DMR이 명확하게 나타나는 것을 볼 수 있다(Fig. 15A and B). 이 결과로 볼 때 두 그룹 사이의 유전자들에는 DMR이 존재하며, 이들은 유전자의 발현과 직접적인 연관성을 가질 것으로 예측된다.



**Fig. 15. Correlation of global methylation level between different samples.** The results were analyzed for similarity between the methylcytosine corresponding to 5 depth or more to maintain in common between both samples. (A) Analysis of similarity of methylation level for CG in whole genome. (B) Analysis of similarity of methylation level for CG in whole gene.



(마) Mapped methylated CG (<sup>3</sup>CG) 종합적인 결과 분석

Mapped <sup>3</sup>CG에 대한 분석 결과는 유전자의 coding과 연관된 영역에 있어서 높은 산자수 그룹에서 메틸화가 모두 약간 높은 것으로 관찰되었다(Table 9). 그러나 non-genic region에 대한 메틸화 분석 결과에서 낮은 산자수 그룹에서 78,893 만큼 높은 것으로 나타났다. 메틸화의 빈도는 intergenic regions, intron, coding exon, upstream 1 kb at TSS, downstream 1 kb at TTS, 3'-UTR, 5'-UTR 순으로 높게 나타났다.

Table 9. Summary of mapped <sup>3</sup>CG

	BP1279	BP14463
Upstream 1 kb at TSS	1,045,970	1,056,660
5'-UTR	336,333	343,421
Coding exon	1,741,769	1,762,204
Intron	13,916,756	13,950,724
3'-UTR	397,382	399,818
Downstream 1 kb	690,042	696,330
Other (non-genic region)	28,550,258	28,471,365

유전자 부위에 대한 평균 CG methylation level을 측정해 본 결과 TSS (transcription start site) 주위에서 methylation이 수준이 낮아지고 gene body 부분에서 평균 50% 수준으로 나타나는 것으로 관찰되었다(Fig. 16). 또한, TTS (transcription termination site)에서는 gene body 보다 약간 낮은 methylation 빈도가 관찰되었다. 산자수 그룹에 따른 gene body에서 methylation 빈도 분포 패턴은 일반적으로 유사한 것으로 나타났다.

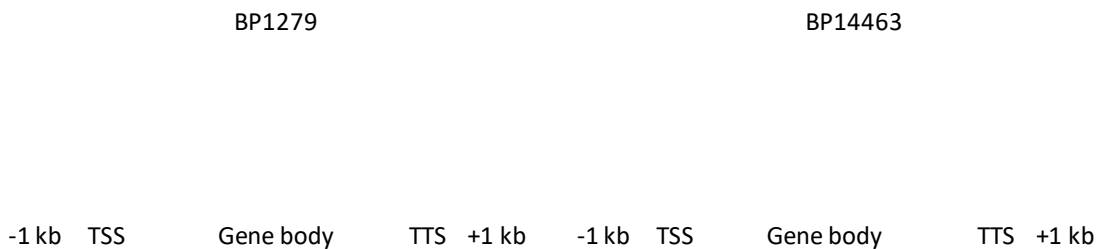


Fig. 16. Average CpG methylation level relative to genes. X-axis marks upstream 1 kb at TSS, TSS, gene body, TTS, and downstream 1 kb at TTS. Y-axis indicates average methylation level (%).

TE body 및 해당 flanking region에 대한 메틸화 빈도는 gene body에 비교하여 약간 높은 수준으로 측정되었다(Fig. 17). Intragenic region에 대한 메틸화 빈도의 분석결과로서 (Fig. 18), upstream 1 kb는 TSS쪽으로 향하면서 메틸화 수준이 감소하였고, 5'-UTR은 낮은 메틸레이션 수준을 유지한 반면에, 나머지 coding regions (CDS), intron, 3'-UTR, downstream 1 kb (DW1KB)에서는 50~60%의 메틸화 수준이 형성되었다. 특히, intron과 3'-UTR에서 메틸레이션 수준이 다른 영역보다 더 높은 것으로 관찰되었다.

BP1279

BP14463

-1 kb 5' TE 3' +1 kb -1 kb 5' TE 3' +1 kb

**Fig. 17. Average CpG methylation level relative to TEs.** X-axis marks upstream 1 kb at TE, TE body, and downstream 1 kb at TE. Y-axis indicates average methylation level (%).

BP1279

BP14463

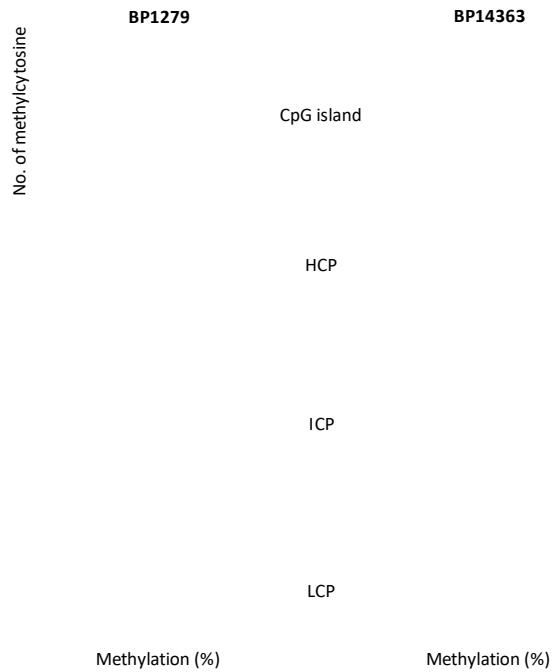
**Fig. 18. Average CpG methylation level relative to different intragenic regions.** X-axis marks upstream 1 kb at TSS, 5'-UTR, CDS, Intron, 3'-UTR, and downstream 1 kb at TTS. Y-axis indicates average methylation level (%).

#### (바) CpG island, HCP, ICP, LCP에 CpG methylation level의 분포 분석

Weber et al. (2007; Nat. Genetics 39, 457-466)에 의해 소개된 분류 방법에 따라 HCP (high-CpG promoter), ICP (intermediate-CpG promoter), LCP (low-CpG promoter)로 분류하고 메틸화의 분포도를 분석하여 보았다. 그 결과 CpG island에서는 낮은 메틸화 빈도를 보이는 영역인 0~50% 영역에서 낮은 산자수 그룹에 비교하여 높은 산자수 그룹에서 더 높은 메틸화 빈도를 보였다(Fig. 19). HCP, ICP, LCP는 60% 이하에서 높은 산자수 그룹이 낮은 산자수 그룹에 비교하여 높은 메틸화 빈도가 관찰되었다.

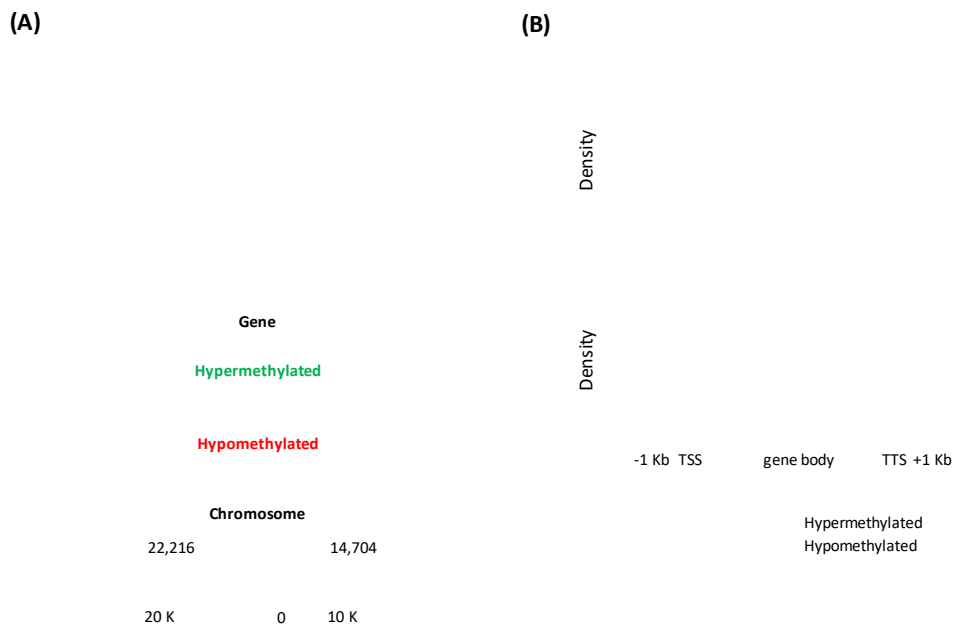
#### (사) 산자수 그룹에 따른 DMR의 분석

높은 산자수 그룹을 기준으로 하여 DMR을 분석하였다. Hypomethylated DMR은 genome-wide에서 전체적으로 일정하게 분석되어 있는 양상을 보이고 있다(Fig. 20). Hypermethylated region은 높은 산자수가 높게 나타난 반면에, hypomethylated region은 낮은 산자수 그룹에서 높게 나타났다. hypomethylated DMR은 14,704개 였으며, Hypermethylated DMR은



**Fig. 19. Distribution of CpG methylation levels in CpG island, HCP, ICP, and LCP.** X- and Y-axes marks distribution range in unit of 10% and number of methylcytosine, respectively.

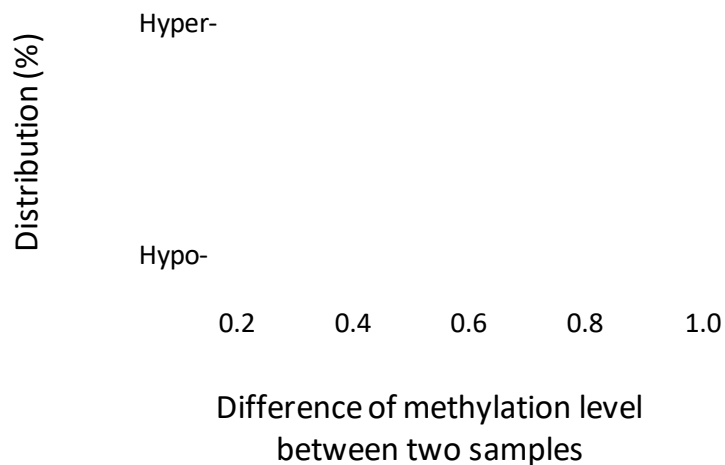
22,216개로 genome에 전반적으로 분석되어 있다(Fig. 20A). 유전자에 대한 DMR 밀도는 hypermethylated DMR이 hypomethylated DMR보다 높은 분포를 보였다. Hypermethylated DMR은 주로 유전자의 5'쪽에서 분포도가 높게 나타났으며, hypomethylated DMR은 gene body에서 비교적 감소된 분포를 나타내었다(Fig. 21). 또한, DMR에서 평균 CG methylation level 차이의 분포는 50~60% 차이가 가장 큰 분포를 나타내었다(Fig. 22).



**Fig. 20. Genomic feature of CG-DMRs between low and high groups associated with fecundity.** (A) Circos plotting for predicted DMRs and (B) distribution of DMRs relative to genes and TEs.

**No. of methylcytosine**

**Fig. 21. Distribution of DMRs in different genomic regions.** Black and gray rectangles indicate hyper- and hypomethylated regions, respectively.



**Fig. 22. Distribution of difference of CG methylation level between two samples.**

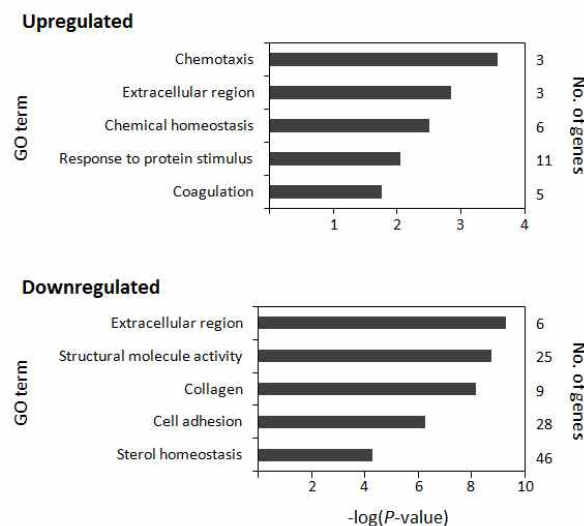
#### (4) DME와 DEG의 비교 분석 결과

DNA methylation에 따르는 유전자의 발현 변화 양상을 분석하기 위해 DME와 DEG 정보를 비교 분석하였다. 우선 DEG 정보에 대해 산자수 연관성에 대해 분석해 본 결과 Fig. 23과 같이 나타났다. 총 278 DEG 중에서 산자수와 연관이 있는 유전자는 122개로 분석되었다.



**Fig. 23. Identification of DEGs between low and high groups associated with fecundity.** (A) DEG selection method and identification, (B) Known fecundity-related genes.  $P < 0.01$  and fold change  $\geq 1.5$ -fold were applied as a condition for the difference of expression value (FPKM) between the BP1279 and BP14463 is judged to be significant. As those of red point corresponds to the DEG, downregulated and upregulated genes were identified by 241 and 37 pieces, respectively.

DEG 정보에 대해 GO enrichment 분석을 수행한 결과, 유의미성 ( $-\log(p\text{-value})$ ) 정보를 나타내는 값이 커질수록 해당 GO term의 유의미성이 높아지는 것으로 나타났다(Fig. 24). Upregulated와 downregulated genes에 대한 KEGG pathway 분석 결과에서 pathway 내에서 유의미 있게 발현이 변화된 유전자들을 나타내었다(Fig. 25). 특히 화살표로 된 경우에서 이웃하고 있는 유전자와 같이 발현이 변화하였거나 하위 경로 유전자들과 같이 발현 변화된 경우를 표기하고 있다. 예로써 PLAU, CPS1, OTC, ABP1, ECM 등이 해당된다.



**Fig. 24. Results of GO enrichment analysis.** GO enrichment analysis was done to up-

and down-regulated genes.

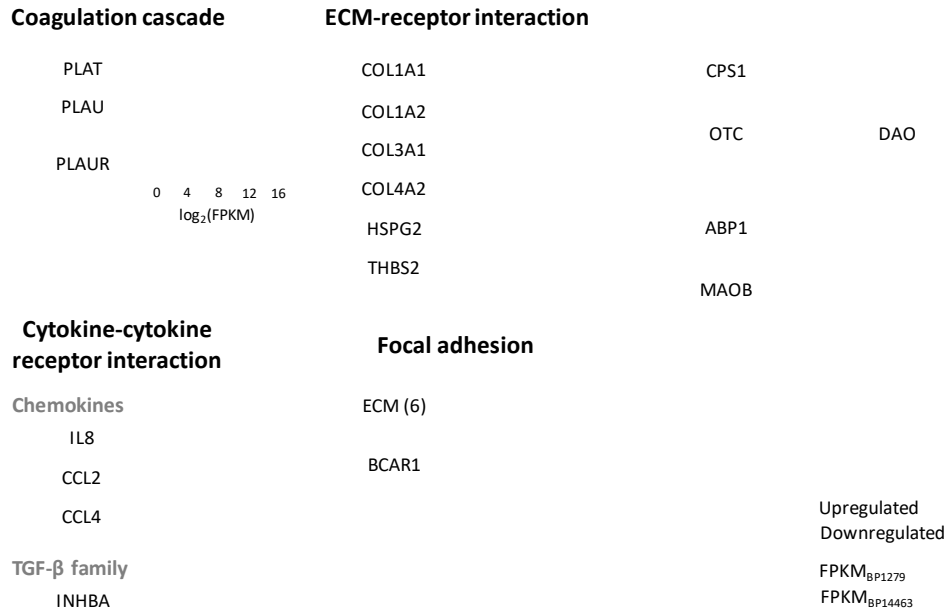


Fig. 25. Results of analysis of KEGG pathway for up- and down-regulated genes.

산자수 연관하여 DEG와 DMR이 positive correlation을 보이는 영역을 분석하였다. 그 결과 Fig. 26에서 보여지는 바와 같이 대부분이 DEG와 DMR이 down-regulated position에서 positive correlation을 보였다. Positive correlation을 보이는 유전자는 promoter와 exon에 대해 각각 44와 51개를 보였다(Fig. 27). Negative correlation은 15와 33으로 상대적으로 낮게 나타났다. Promoter와 exon에 대한 CG-DMR과 DEG를 최종적으로 정리한 결과는 Fig. 28과 같이 나타났다. 이 결과에서 보여지는 바와 같이, integrative profile에서, up-regulated gene은 PLAUR만이 존재했다. 나머지 37개의 유전자는 모두 down-regulation되는 것으로 나타났다.

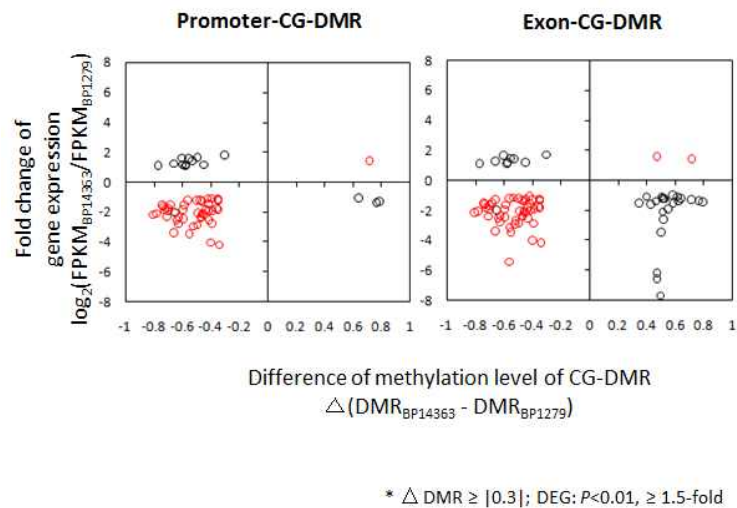


Fig. 26. Profile of CG-DMR and DEG between low- and high-fecundity groups. DEGs were selected to be associated with promoter CG-DMR and exon CG-DMR. The red and black dots on the Figure indicate DEG and DMR to be presumed as the positive and

negative correlations, respectively.

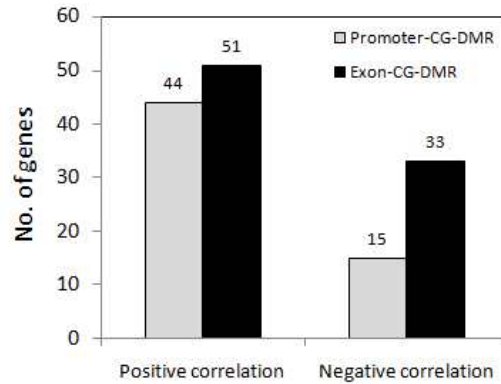


Fig. 27. Correlation of genes with differential expression and DNA methylation.

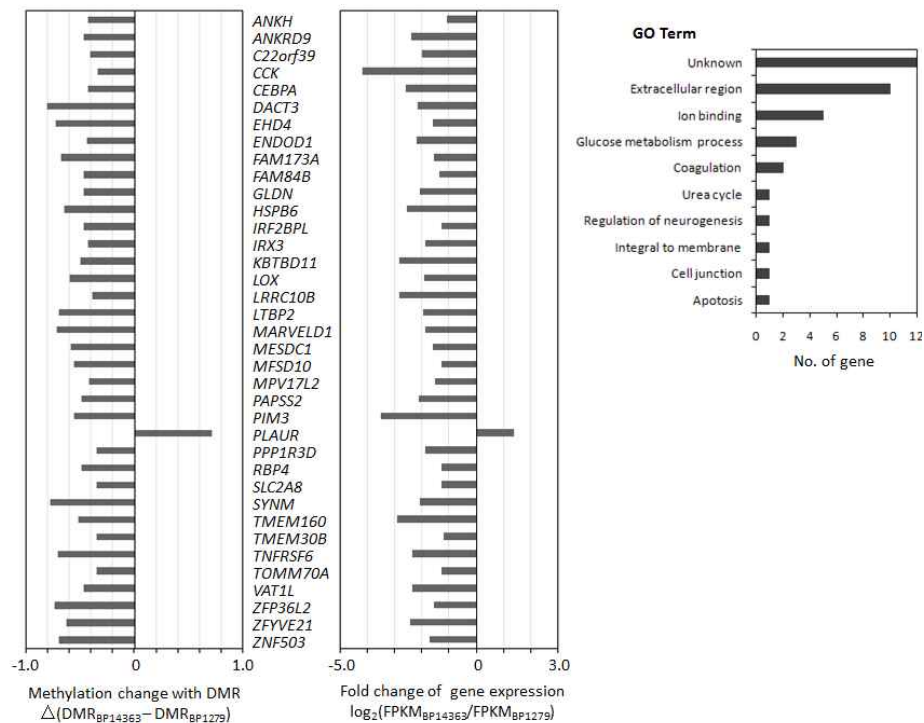


Fig. 28. DEGs with CG-DMRs over promoter and exonic regions.

이상의 결과를 종합해 보면, 산자수에 따른 모든 그룹으로부터 태반을 샘플링하여 DEG와 DMR을 분석해 본 결과, upregulated gene은 1개 유전자가 존재했으며, downregulated gene은 37개가 존재하는 것으로 나타났다. 이들 유전자들에 대해 재현성 실험과 기능성을 분석하여 산자수 연관 분자 마커로서의 가능성에 대해 검토할 예정이다.

#### 나. 병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종

##### (1) 경제형질에 대한 유전능력 평가

##### (가) 종돈의 선발 및 사양관리 결과

본 과제에서 개발하는 병합육종프로그램은 종돈육종을 위한 프로그램으로는 국내에서는 처음으로 시도되는 개량용 TOOL들을 모두 사용할 수 있도록 실용성과 산업적응성에 역점을 두고 설계하고 있다. 유전능력평가는 1차년도에는 전통적인 BLUP-ANIMAL MODEL을 사용하며, 연구년차가 진행됨에 따라 다른 유전적인 자료가 확보됨에 따라 G-BLUP, SS-BLUP 등 다양한 분석과 분석모형을 검토 및 개발할 예정이다.

종돈의 선발과 교배는 보유돈 중에서 육종가와 표현형 산자수에 근거하여 우수한 종빈돈을 선발하였으며, 세대개념보다는 연구년차 개념으로 산업돈군의 개량방식을 수용하여 교배하고 있다. 연구1년차 교배에서 생산된 암컷자돈 1000여두중에서 150두정도 선발하였으며, 선발의 정확도와 개량정도에 따라 돈군의 크기를 조정하려 한다.

버크셔종에서 총산자수와 이유두수간의 차이는 백색종과 다르게 사양기술의 적용과 개발이 요구된다. 버크셔종의 특징중에 하나가 산자수가 적으며 사산이 백색계에 비하여 거의 1.7배정도이다. 최근에는 분만전 사양관리전환과 유도분만제의 미사용으로 30%정도 개선되었으며, 향후에도 지속적인 사양관리 기술개발이 필요하다.

육질위주의 개량체계에서 부계계통인 버크셔종에서 산자수를 도입하여 개량을 시도하는데는 많은 어려움이 있다. 그러나 이러한 연구가 건강개념의 단백질생산이 요구되는 향후에는 우리나라의 양돈산업 및 육류산업의 크게 기여하리라고 생각한다.

**(나) 번식형질**

모돈 2,511두와 웅돈 88두에 대한 2,599개의 기록 중 총산자수가 0인 개체와 missing 인 자료는 삭제하였으며, 분석에 이용된 자료는 총 2,457개였다. 평균 총산자수와 실산자수는 각각 8.65두와 7.65두였으며, Fig. 1과 2에서와 같이 약간 왼쪽으로 치우친 정규분포 형태를 나타내고 있었다. 그리고 이유두수와 포유기간은 각각 5.77두와 25.65일로 조사되었고 비정규 분포를 나타내고 있었으며(Fig. 3과 4), 번식형질에 대한 자료의 분포 및 특성은 Table 1에 제시하였다.

**Table 1. 번식형질자료의 분포 및 특성**

번식형질	기록수	평균	표준편차	최소값	최대값	왜도
총산자수	2,457	8.65	2.95	1	21	-0.07
실산자수	2,457	7.65	2.58	0	17	-0.33
이유두수	2,457	8.77	1.67	0	19	-2.76
포유기간	2,457	25.65	4.70	0	42	-2.75



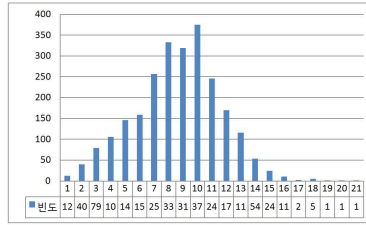


Fig. 1. 총산자수의 분포

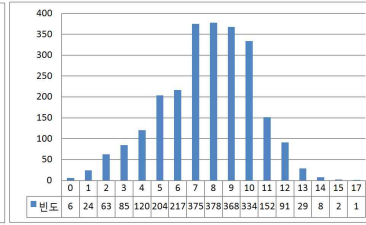


Fig. 2. 실산자수의 분포

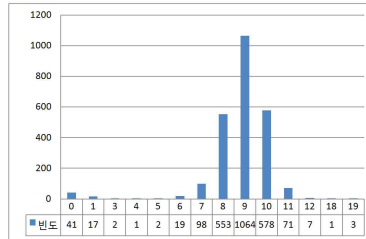


Fig. 3. 이유두수의 분포

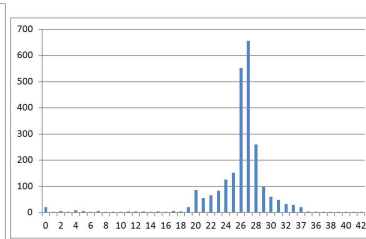


Fig. 4. 포유기간의 분포

(다) 육질 및 성장형질

육질 및 성장에 관한 12개 형질에 대한 자료 1,953개를 수집한 후 생년월일, 측정일 또는 성별오류인 개체의 기록은 삭제하였으며, 분석에 이용된 자료는 총 1,942개였다. 자료의 특성 및 분포는 Table 2와 Fig. 5부터 Fig. 16에 나타내었다.

Table 2. 육질 및 성장자료의 분포 및 특성

육질성장형질	기록수	평균	표준편차	최소값	최대값	왜도
도체중(kg)	1942	86.62	5.67	71.00	111.00	0.20
등지방(mm)	1942	25.11	5.23	12.00	46.00	0.19
Ph45m	1942	6.06	0.29	5.30	6.90	-0.03
Ph24H	1941	5.78	0.22	5.02	6.74	0.92
명도	1941	49.05	3.18	38.01	58.43	-0.01
적색도	1942	8.47	4.34	2.63	19.95	1.17
황색도	1942	3.59	1.48	0.12	8.29	0.23
보수력	1942	57.90	11.10	10.00	130.00	0.17
육즙손실량(%)	1942	4.14	2.07	0.11	25.37	1.38
가열감량(%)	1942	23.80	6.00	6.81	46.16	-0.50
전단력(kg)	1942	2.82	0.76	0.07	6.64	0.96
근내지방도	1942	2.64	1.06	0.67	10.15	1.26

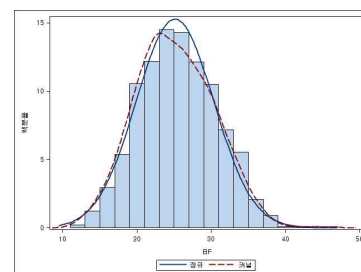
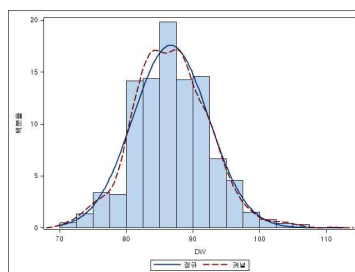


Fig. 5. 도체중

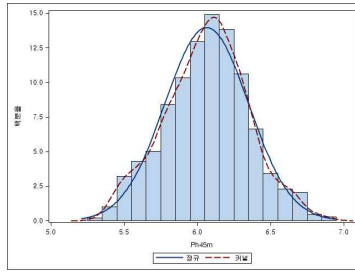


Fig. 6. 등지방

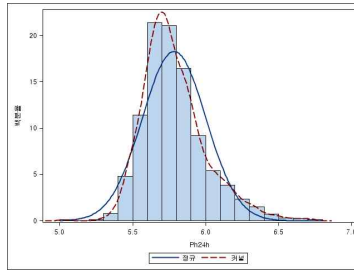


Fig. 7. Ph45m

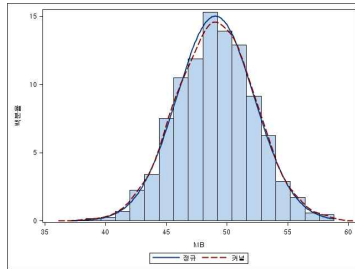


Fig. 8. Ph24h

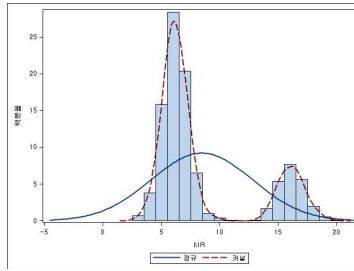


Fig. 9. 명도

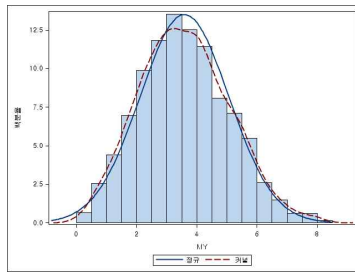


Fig. 10. 적색도

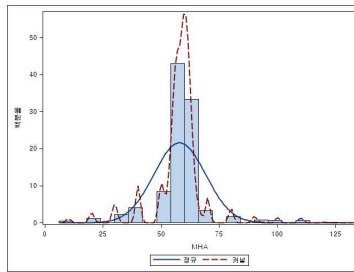


Fig. 11. 황색도

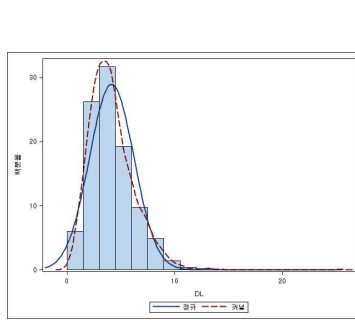


Fig. 12. 보수력

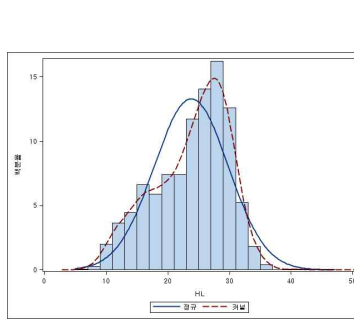


Fig. 13. 육즙손실량

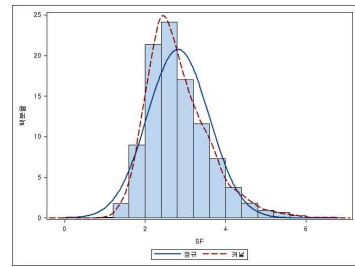


Fig. 14. 가열감량

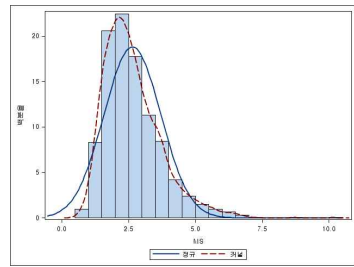
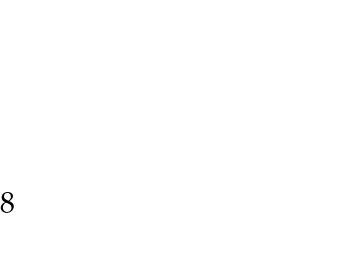


Fig. 15. 전단력



Fig. 16. 근내지방도



(라) 유전모수

Table 3. 번식형질에 대한 유전모수

자료	번식형질	상가적	영구환경	교배웅돈	오차	유전력	반복력	웅돈(%)
A	총산자수	0.6110	0.7520	0.0485	7.1091	0.072	0.160	0.006
	실산자수	0.4353	0.7006	0.0361	5.3121	0.067	0.175	0.006
	이유두수	0.0079	0.0545	0.0144	2.6101	0.003	0.023	0.005
B	총산자수	0.5884	0.7011	0.0438	7.0692	0.070	0.153	0.005
	실산자수	0.4399	0.6758	0.0359	5.2035	0.069	0.176	0.006
	이유두수	0.0004	0.0138	0.0058	0.8933	0.000	0.015	0.006

<sup>A</sup>2,457, <sup>B</sup>2,399 (이유두수 3두이하 제거)

총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.072와 0.067로 다소 낮게 추정되었으며 (Table 3), 이러한 원인은 폐쇄 축군에 따른 유전자 변이의 감소 때문인지 분석 자료의 수가 적어서 발생하는 오류인지 향후 자료가 더 많이 축적되면 재분석하는 것이 바람직하다고 본다. 한편 이유두수에 대한 유전력은 거의 0에 가깝게 추정되었으며, 이유두수는 유전적 요인보다는 대부분이 환경적 요인에 기인한다고 할 수 있다.

총산자수와 실산자수간의 유전상관은 0.99로 매우 높았으며 (Table 4), 이러한 결과는 총산자수와 실산자수 중 하나의 형질만으로도 번식형질의 선발이 가능하다는 것을 나타내었다.

Table 4. 총산자수와 실산자수에 대한 분산·공분산 및 유전상관계수

Variable	분산·공분산		유전상관계수	
Animal	0.5979 <sup>a</sup>	0.5022	0.0702 <sup>a</sup>	0.9877
		0.4324 <sup>b</sup>		0.0667 <sup>b</sup>
PE	0.7623	0.6701	0.0895	0.9147
		0.7040		0.1086
Boar	0.0464	0.0361	0.0055	1.0000
		0.0281		0.0043
Residual	7.1101	5.5989	0.8348	0.9108
		5.3153		0.8203
Phenotype	8.5168	6.8073	1.0000	0.9164
		6.4797		1.0000

<sup>a</sup>총산자수, <sup>b</sup>실산자수

육질 및 성장형질에 대한 유전력은 0.15~0.57의 범위를 나타내었다. 육즙손실과 pH45m의 유전력은 각각 0.45와 0.48로 개량 형질로써 가능성을 나타내었다 (Table 5). 가열감량과 명도 및 황색도간 유전상관은 각각 0.68과 0.62로 가장 높았으며, 육즙손실과 육색간 유전상관계수는

0.34~0.53의 유의적인 범위를 나타내었다.

**Table 5. 육질 및 성장형질에 대한 유전력 및 상관계수**

육질성장형질	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
도체중 (1)	<b>0.37</b>	0.27	0.29	-0.05	-0.24	-0.08	-0.19	-0.12	0.00	-0.36	-0.04	0.04
등지방 (2)	0.26	<b>0.57</b>	0.16	0.07	-0.30	0.01	-0.19	0.18	-0.14	-0.28	-0.30	0.27
Ph45m (3)	-0.02	-0.02	<b>0.48</b>	0.06	-0.45	0.23	0.01	-0.32	-0.05	-0.23	0.04	0.14
Ph24H (4)	0.00	0.07	0.10	<b>0.15</b>	-0.33	-0.51	-0.51	0.20	-0.41	0.05	-0.32	0.13
명도 (5)	-0.05	-0.04	-0.17	-0.13	<b>0.19</b>	0.03	0.75	-0.10	0.53	0.68	0.14	0.16
적색도 (6)	0.04	0.10	-0.03	-0.12	-0.07	<b>0.36</b>	0.41	-0.01	0.34	0.11	-0.02	0.03
황색도 (7)	-0.06	-0.02	-0.05	-0.32	0.57	0.40	<b>0.28</b>	-0.25	0.43	0.62	0.19	-0.02
보수력 (8)	0.02	0.05	-0.10	0.02	-0.01	-0.03	-0.05	<b>0.21</b>	0.04	0.06	-0.06	-0.08
육즙손실 (9)	0.03	0.00	-0.27	-0.27	0.35	0.20	0.34	0.01	<b>0.33</b>	0.20	0.05	-0.22
가열감량(10)	-0.08	-0.16	-0.15	-0.19	0.33	0.12	0.40	-0.03	0.28	<b>0.45</b>	0.44	0.09
전단력 (11)	-0.03	-0.19	-0.14	-0.15	0.04	0.04	0.09	-0.02	0.23	0.32	<b>0.39</b>	-0.17
근내지방(12)	0.06	0.33	0.11	-0.01	0.14	0.18	0.26	-0.02	-0.04	-0.02	-0.16	<b>0.43</b>

대각행렬 : 유전력, 상상각행렬 : 유전상관, 하삼각행렬 : 표현형 상관

**(마) 육종가**

번식형질에 대한 육종가를 추정하여 Table 6에 제시하였다. 총산자수의 육종가는 -1.54~1.85 두의 범위를, 실산자수는 -1.24~1.32의 범위를 나타내었다. 유전적 개량의 추세는 나타나지 않았다(Table 7).

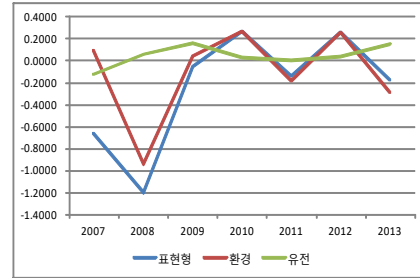
**Table 6. 모돈의 번식능력 평가**

순위	종모돈	생년월일	상태	기록수	평균 총산자수 <sup>a</sup>	평균 실산자 수 <sup>a</sup>	총산자 수능력 <sup>b</sup>	실산자 수능력 <sup>b</sup>
1	BN4619	20100312	SERVED	7	14.14	12.00	1.85	1.32
2	BP641	20110522	SERVED	4	12.25	11.00	1.51	1.07
3	BP1862	20111008	SERVED	3	13.33	10.67	1.50	1.02
4	BP2490	20111218	LACT	2	12.00	9.50	1.37	0.82
5	BP4757	20120709	WEANE D	1	15.00	12.00	1.35	0.97
.	.	.	.	.	.	.	.	.
285	BN8970	20101210	SERVED	5	6.20	6.00	-1.27	-0.95
286	BP357	20110430	SERVED	4	5.50	4.75	-1.54	-1.24

<sup>a</sup>표현형, <sup>b</sup>육종가

**Table 7. 총산자수에 대한 유전적 개량량 (두수)**

분만년도	기록수	표현형	환경	유전
2007	2	-0.6626	0.0900	-0.1300
2008	26	-1.2010	-0.9447	0.0522
2009	155	-0.0561	0.0400	0.1572
2010	427	0.2601	0.2620	0.0340
2011	556	-0.1410	-0.1825	0.0019
2012	555	0.2545	0.2585	0.0416
2013	730	-0.1818	-0.2886	0.1515



육질 및 산육형질에 대한 육종가를 추정한 후 현시점에서 가장 중요하다고 판단된 경제형질인 PH24와 가열감량에 대한 모돈별 육종가를 Table 7에 제시하였다. Ph24의 경우 변이가 매우 작아서 개량형질로서의 재검토가 필요하며, 가열감량의 육종가는 -2.33~2.13의 범위를 나타내었다. 선발지수는 Ph24와 가열감량의 표준편차를 이용하였으며, 선발지수식 = ph24h 육종가 × 70 - 가열감량 육종가로 하여 선발지수값을 구하였다 (Table 8).

Table 8. 모돈의 육질 및 산육능력 평가

순위	종모돈	생년월일	상태	기록수	평균 ph24h <sup>a</sup>	평균 가열감량 <sup>a</sup>	PH24h 능력 <sup>b</sup>	가열감량 능력 <sup>b</sup>	선발지수
1	BP937	20110619	SERVED	5	5.90	14.05	0.05	-1.62	5.12
2	BP641	20110522	SERVED	3	5.90	15.76	0.05	-1.55	5.05
3	BN9728	20110313	LACT	6	6.03	15.56	0.05	-0.39	3.89
4	BP933	20110619	SERVED	2	5.79	13.55	0.03	-1.47	3.57
5	BN4305	20100429	SERVED	1	5.64	13.22	0.03	-1.27	3.37
81	BP273	20110415	SERVED	2	5.52	19.73	-0.04	2.13	-4.93
82	BN8992	20101215	SERVED	2	5.75	18.84	-0.06	1.06	-5.26

<sup>a</sup>표현형, <sup>b</sup>육종가

## (2) 산업용 병합 육종프로그램

### (가) 프로그램 개요

육종프로그램은 번식성적, 육질·산육성적, 주유전자(마커자료) 자료를 이용하였으며, 혈통자료는 번식성적과 육질·산육성적을 병합한 후 새로이 생성하였다.

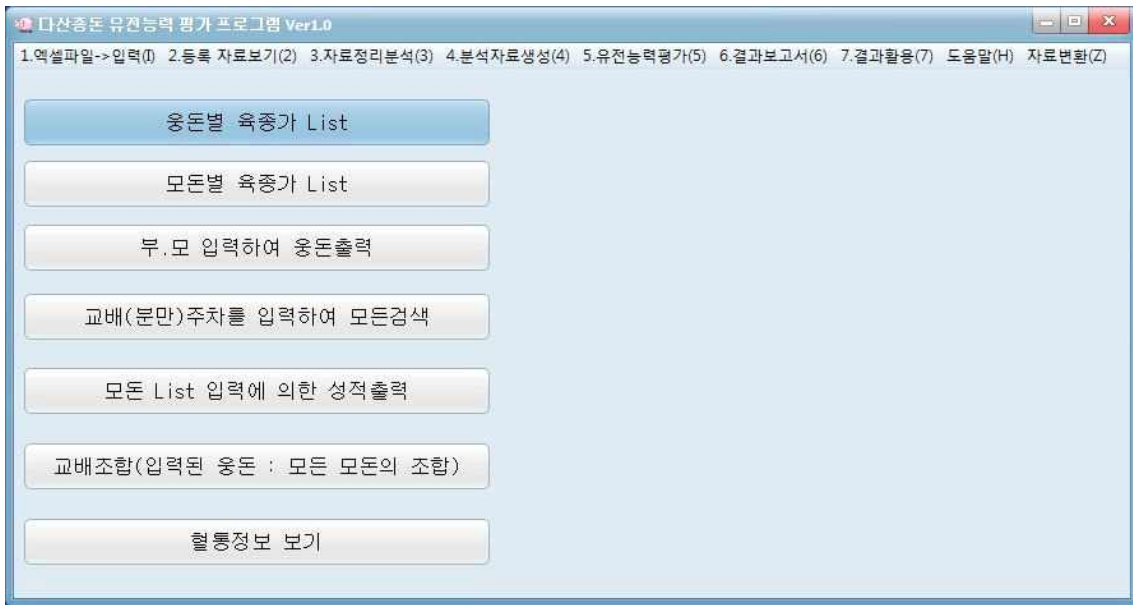
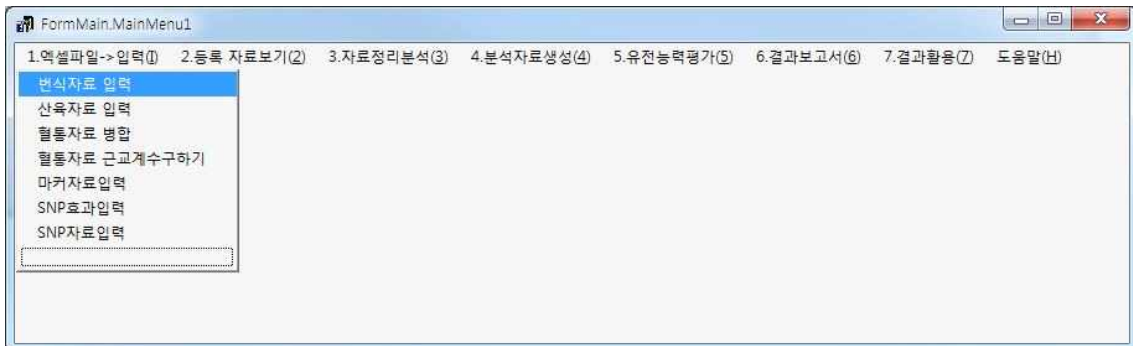


Fig. 17. 프로그램 창

(나) 엑셀파일->입력 ==> 번식자료입력



Excel파일 열기(E) 실행(기존자료 삭제됨)(Z)

SowTag	Sire	Dam	Sex	BoarTag	BirthDate	ServDate	FarrDate	WeanDate	ServWeek	Fa
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BN1993	20090708	20100331	20100724	20100724	201013	20
1-5	93436002AM	80049001AM	1	514-3	20090708	20100916	20110108	20110203	201037	20
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BK9295	20090708	20110208	20110603	20110623	201106	20
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BK3948	20090708	20110814	20111208	20120105	201133	20
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BK9295	20090708	20120109	20120504	20120531	201202	20
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BN9353	20090708	20120605	20120926	20121025	201223	20
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1993	20090716	20100411	20100804	20100826	201015	20
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1993	20090716	20100927	20110120	20110210	201039	20
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1200	20090716	20110215	20110610	20110707	201107	20

산육자료 입력

Excel파일 열기(E) 실행(기준자료 삭제됨)(Z)

일련번호	개체번호	생일	도축일자	모돈	웅돈	분석_기관	성_(1 암, 2 거세)	도체중_(kg)
759	BK2-344	20090909	20100405	BK198	BK6353	과학원	1	89
762	BK2-347	20090904	20100405	BK198	BK5990	과학원	2	87
767	BK2-352	20090908	20100405	BK198	BK8211	과학원	1	83
768	BK2-353	20090908	20100405	BK198	BK8211	과학원	1	85
769	BK2-354	20090908	20100405	BK198	BK8211	과학원	2	88
771	BK2-356	20090910	20100405	BK198	BK3429	과학원	1	82
773	BK2-358	20090910	20100405	BK198	BK3429	과학원	2	84
774	BK2-359	20090910	20100405	BK198	BK3429	과학원	2	87
776	BK2-361	20090831	20100405	514-3	BK6749	과학원	2	88
778	BK2-363	20090909	20100405	514-3	BK6749	과학원	1	85
780	BK2-365	20090910	20100405	BK198	BK6004	과학원	2	89
787	BK2-372	20090912	20100405	BK7502	BK6881	과학원	2	83
791	BK2-376	20090911	20100405	514-3	BK0-3	과학원	1	86

PerFor2Db

마커자료 입력

Excel파일 열기(E) 실행(기준자료 삭제됨)(Z)

F1	F2	F3	meat quality	growth	muscle	growth	growth1	F8	F9	F10	F11	F12	F13
	개체		PRKAG3	IGF2	FABP3		MC4R	F4	CAST	HMGAI	Nramp	PRLR	FUT1
1	BN92	AA	CG	HH	AG	CC	FF	TT	GG	AB	Nn		
2	BP67	AA	GG	Hh	AG	CC	FF	TT	GG	AB	nn		
3	BP67	AA	CG	hh	AG	CC	FF	TT	GG	AB	Nn		
4	BP67	AA	GG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	AB	Nn		
5	BP67	AA	GG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	AB	Nn		
6	BP67	AA	GG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	AA	Nn		
7	BP67	AA	GG	Hh	AG	CC	FF	TT	GG	BB	Nn		
8	BP67	AA	CG	hh	GG	CC	FF	TT	GG	AB	NN		
9	BN89	AA	GG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	AA	NN		
10	BN93	AA	CG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	BB	Nn		
11	BP67	AA	CG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	AA	Nn		
12	BP12	AA	GG	Hh	GG	CC	FF	TT	GG	AA	NN		

Maker2Db

(다) 등록 자료보기 ==> 혈통자료

FormMain.MainMenu1

1.엑셀파일->입력(1) 2.등록 자료보기(2) 3.자료정리분석(3) 4.분석자료생성(4) 5.유전능력평가(5) 6.결과보고서(6) 7.결과활용(7) 도움말(H) 자료변환(Z)

혈통자료  
 번식자료  
 산육자료  
 마커자료  
 SNP효과자료  
 SNP자료

합동자료

개체ID검색(M) 삭제(D)

SowTag	Sire	Dam	BirthDate	DVector	CI	Record	Record_P	Sum_Total
▶ 10-1	75499004AM	76689008AM	2009-07-16	0.50	0.00			
10-1-1	42826002AM	42939011AM	2004-01-16	0.50	0.00			
10-3	75499004AM	76689008AM	2009-07-16	0.50	0.00			
103-5	61457005AM	49970006AM	2004-02-12	0.50	0.00			
1-1	41585003AM	61061005AM	2004-07-02	0.50	0.00			
11-6	62030001AM	43175009AM	2004-06-20	0.50	0.00			
11-7	85595003AM	95832003AM	2009-07-16	0.50	0.00			
11-9	62030001AM	43175009AM	2004-06-20	0.50	0.00			
12-10	61838001AM	55608008AM	2004-06-12	0.50	0.00			
12-2	85595003AM	91943006AM	2009-07-16	0.50	0.00			
12-3	85595003AM	91943006AM	2009-07-16	0.50	0.00			
12-9	61838001AM	55608008AM	2004-06-12	0.50	0.00			
14-5	75499004AM	91950004AM	2009-07-23	0.50	0.00			

10-1 | 1/3572 | PediReg

번식자료

ID검색(M) 삭제(D)

SowTag	Sire	Dam	Sex	BoarTag	BirthDate	ServDate	FarrDate
▶ 1-5	93436002AM	80049001AM	1	BN1993	2009-07-08	2010-03-31	2010-07-24
1-5	93436002AM	80049001AM	1	514-3	2009-07-08	2010-09-16	2011-01-08
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BK9295	2009-07-08	2011-02-08	2011-06-03
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BK3948	2009-07-08	2011-08-14	2011-12-08
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BK9295	2009-07-08	2012-01-09	2012-05-04
1-5	93436002AM	80049001AM	1	BN9353	2009-07-08	2012-06-05	2012-09-26
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1993	2009-07-16	2010-04-11	2010-08-04
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1993	2009-07-16	2010-09-27	2011-01-20
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1200	2009-07-16	2011-02-15	2011-06-10
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1993	2009-07-16	2011-07-12	2011-11-05
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BK3948	2009-07-16	2011-12-12	2012-04-07
10-1	75499004AM	76689008AM	1	BN1365	2009-07-16	2012-05-07	2012-09-03
11-7	85595003AM	95832003AM	1	BN1993	2009-07-16	2010-04-21	2010-08-15

1-5 | 1/3592 | ReProdReg

산육자료

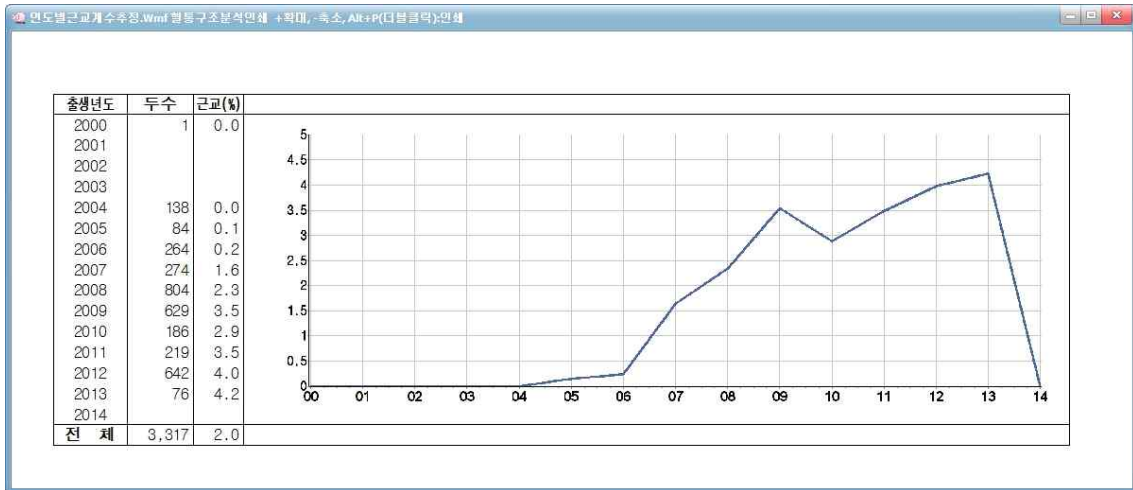
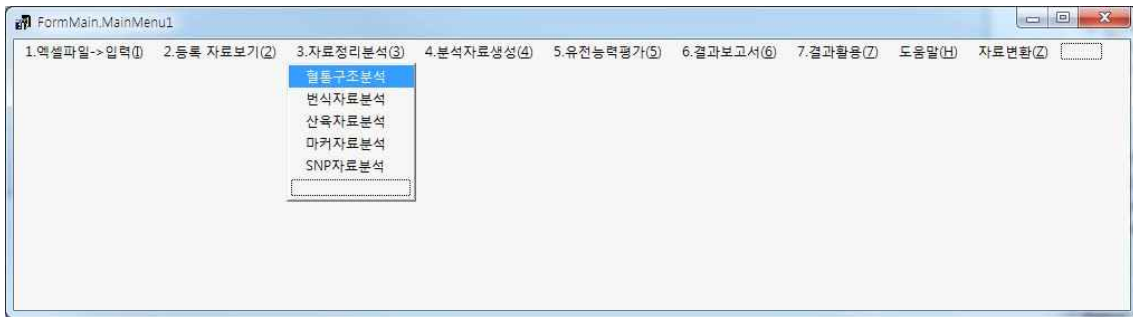
ID검색(M) 삭제(D)

SN	SowTag	BirthDate	CullDate	Sire	Dam	Organ	Sex	DW
▶ 744	BK2-329	2009-07-02	2010-04-05	BK3948	BK1495	과학원	1	
746	BK2-331	2009-08-01	2010-04-05	BK3948	BK4139	과학원	1	
748	BK2-333	2009-08-14	2010-04-05	BK198	BK3878	과학원	2	
751	BK2-336	2009-08-20	2010-04-05	514-3	BK5569	과학원	1	
757	BK2-342	2009-08-31	2010-04-05	BK4452	BK6285	과학원	1	
759	BK2-344	2009-09-09	2010-04-05	BK198	BK6353	과학원	1	
762	BK2-347	2009-09-04	2010-04-05	BK198	BK5990	과학원	2	
767	BK2-352	2009-09-08	2010-04-05	BK198	BK8211	과학원	1	
768	BK2-353	2009-09-08	2010-04-05	BK198	BK8211	과학원	1	
769	BK2-354	2009-09-08	2010-04-05	BK198	BK8211	과학원	2	
771	BK2-356	2009-09-10	2010-04-05	BK198	BK3429	과학원	1	
773	BK2-358	2009-09-10	2010-04-05	BK198	BK3429	과학원	2	
774	BK2-359	2009-09-10	2010-04-05	BK198	BK3429	과학원	2	

BK2-329 | 1/1638 | PerForReg



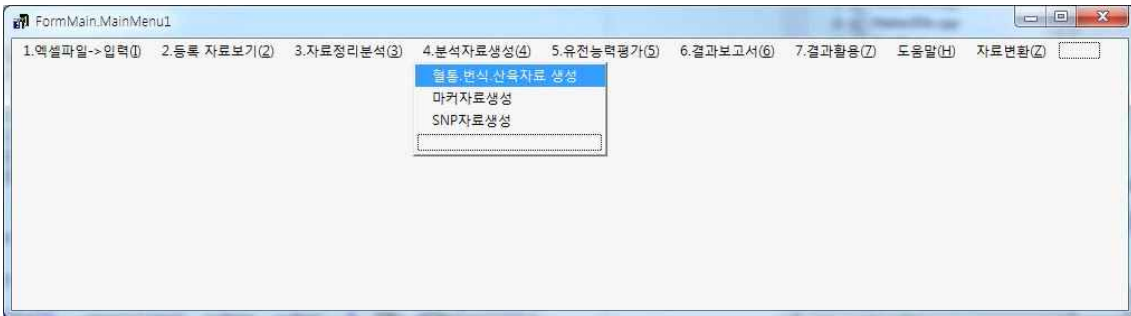
(라) 자료정리분석 ==> 혈통구조분석



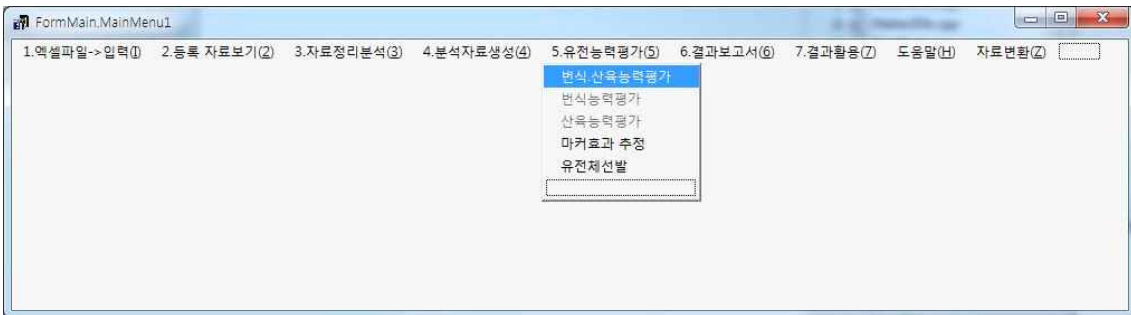
산차	기록수	분만년도	기록수	분만월	기록수
1	700	2007	2	1	272
2	529	2008	26	2	180
3	431	2009	155	3	295
4	327	2010	427	4	193
5	253	2011	556	5	194
6	175	2012	555	6	243
7	143	2013	791	7	181
8	91	2014	192	8	228
9	42			9	226
10	12			10	238
11	1			11	242
				12	212
전 체	2,704		2,704		2,704

산육형질	기록수	평균	표준편차	최소값	최대값
도체중(kg)	1,634	86.64	5.65	71.00	111.00
등지방(mm)	1,634	25.18	5.21	12.00	46.00
ph45m	1,634	6.06	0.28	5.30	6.90
ph24H	1,634	5.78	0.22	5.02	6.74
명도	1,634	49.08	3.18	38.93	58.43
적색도	1,634	8.63	4.46	2.63	19.95
황색도	1,633	3.63	1.51	0.12	8.29
보수력	1,609	57.83	11.26	10.00	130.00
육즙손실량(%)	1,634	4.13	2.09	0.11	25.37
가열감량(%)	1,634	23.74	6.00	7.57	46.16
전단력(kg)	1,633	2.81	0.76	0.07	6.64
근내지방도	1,633	2.63	1.05	0.67	10.15

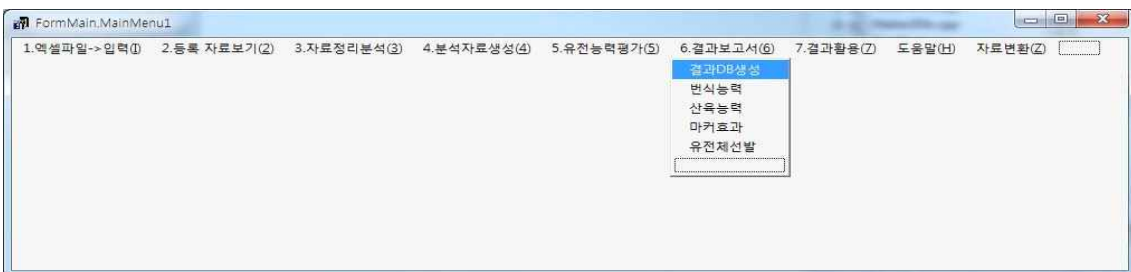
(마) 분석자료생성



(바) 유전능력평가



(사) 결과보고서



번식능력 보고서

중부돈 후보중부돈 종모돈 후보종모돈

### 종모돈 번식능력 평가

종모돈	생일	상태	기록수	평균총산자수	평균실산자수	총산자수능력	실산자수능력
▶ BP641	2011-05-22	SERVED	5	12.40	10.80	1.54	1.08
BN4861	2010-03-11	SERVED	8	12.50	10.13	1.34	0.82
BP6050	2012-11-13	SERVED	1	14.00	9.00	1.26	0.76
BP2473	2011-12-17	SERVED	3	13.00	12.00	1.19	0.97
BP4757	2012-07-09	SERVED	1	15.00	12.00	1.19	0.87
BP4041	2012-05-10	SERVED	2	11.50	11.00	1.09	0.97
BP3403	2012-03-19	LACT	2	12.00	10.00	1.09	0.72
BN4336	2010-01-13	SERVED	7	12.57	11.29	1.08	1.03
BP4930	2012-07-25	SERVED	2	10.50	9.50	1.08	0.81
BN9728	2011-03-13	SERVED	5	12.00	10.40	1.06	0.73
BP5377	2012-09-13	SERVED	2	11.00	10.00	1.03	0.86
BP3756	2012-04-14	SERVED	3	10.33	9.00	1.00	0.59
BP1428	2011-08-27	LACT	4	10.00	10.00	0.97	0.98
BP3283	2012-03-05	SERVED	3	12.00	10.67	0.97	0.81
BN8352	2010-10-28	SERVED	6	11.33	9.17	0.97	0.46
BP4112	2012-05-15	SERVED	2	10.00	8.00	0.95	0.57
BN9928	2011-03-24	SERVED	5	10.20	8.40	0.92	0.58
BP2109	2011-11-05	LACT	3	11.67	8.67	0.90	0.45
BP2612	2012-01-01	LACT	3	11.33	10.33	0.88	0.85
BN2670	2010-02-18	LACT	8	10.13	9.25	0.88	0.81
BN4860	2010-03-11	WEANED	8	9.88	8.88	0.87	0.66
BP7566	2013-03-22	WEANED	1	9.00	6.00	0.87	0.66
BP1238	2011-07-31	SERVED	4	11.50	10.25	0.86	0.77

BP641 1/294 ReProdReport

산육능력 보고서

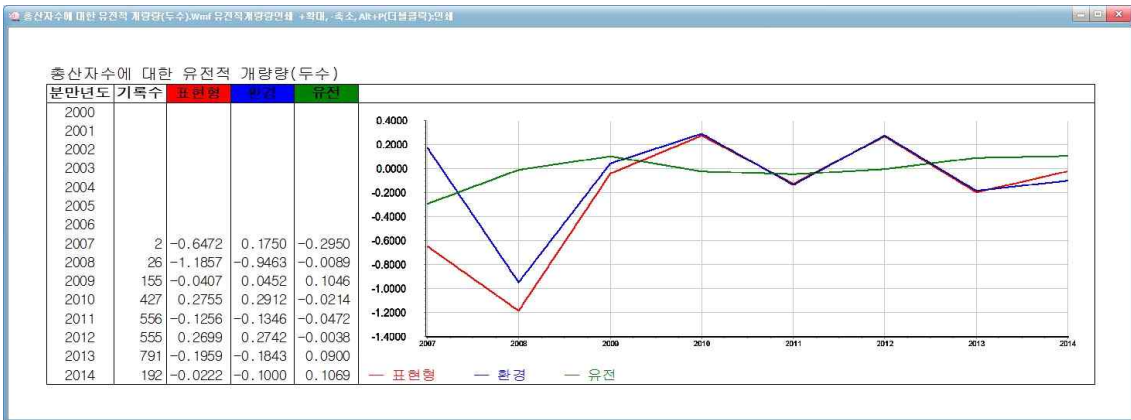
중부돈 후보중부돈 종모돈 후보종모돈

### 종모돈 산육능력 평가

종모돈	생일	상태	기록수	평균ph24h	평균가열감량	PH24H능력	가열감량능력	선발지수
▶ BP641	2011-05-22	SERVED	3	5.90	15.76	0.06	-1.11	5.31
BP937	2011-06-19	SERVED	5	5.90	14.05	0.06	-1.09	5.29
BN9728	2011-03-13	SERVED	6	6.03	15.56	0.06	-0.04	4.24
BP614	2011-05-20	SERVED	2	6.30	12.03	0.04	-1.33	4.13
BP933	2011-06-19	WEANED	2	5.79	13.55	0.04	-0.93	3.73
BN8690	2010-11-16	SERVED	1	5.88	8.07	0.02	-1.91	3.31
BN7965	2010-10-01	SERVED	3	6.05	15.23	0.02	-1.02	2.42
BN8352	2010-10-28	SERVED	5	6.03	14.56	0.03	-0.20	2.30
BN6597	2010-08-04	SERVED	2	6.09	12.58	0.02	-0.73	2.13
BN9006	2010-12-18	WEANED	2	6.08	13.25	0.00	-1.76	1.76
BN9849	2011-03-18	LACT	3	5.98	14.52	0.02	-0.24	1.64
BN4729	2010-02-10	SERVED	3	5.93	12.50	0.01	-0.79	1.49
BP440	2011-05-06	WEANED	3	5.92	14.84	0.02	0.17	1.23
BN7982	2010-10-01	LACT	1	5.90	11.28	0.01	-0.36	1.06
BP685	2011-05-27	SERVED	2	6.05	10.66	0.00	-0.86	0.86
BN4764	2010-02-20	SERVED	1	5.89	10.35	0.00	-0.83	0.83
BP852	2011-06-12	SERVED	2	6.06	11.54	0.00	-0.72	0.72
BP1118	2011-07-09	LACT	3	6.05	12.41	0.01	0.07	0.63
BP388	2011-04-29	SERVED	2	5.72	18.43	0.02	0.82	0.58
BP298	2011-04-22	LACT	4	5.76	13.58	0.00	-0.48	0.48

BP641 1/76 PerForReport

(아) 결과 활용



### (3). 정액 성장 검사

#### (가) 1차 검사

버크셔의 정액은 채취 2일차에 90.3%의 생존율을 보인 반면에 요크셔는 84.6%의 생존율을 나타내어 초기 생존율은 버크셔가 요크셔에 비교하여 5.7% 높은 것으로 나타났다(Fig. 18과 19). 그러나 8일차에서는 버크셔 정자의 생존율이 72.9%이고, 요크셔는 83%로 분석되었다. 동일 기간 동안에 버크셔는 17.4%가 감소된 반면에 요크셔는 1.6%만이 감소되는 경향성을 보였다. 그러나 버크셔는 5일 이내에 평균 생존율이 90.2%로 높게 유지되는 것으로 나타났다. 요크셔는 초기 생존율이 낮지만, 버크셔보다 장기 생존율이 높은 것으로 나타났다. 정자의 활력도는 분석기간 동안 버크셔와 요크셔는 평균 활력도가 90.9%와 86.8%로 높게 유지되는 편이었

다(Fig. 18과 20). 그러나 요크셔는 8일차에 평균활력도 보다 6.2% 감소되는 경향성을 보였다. 이것은 시간이 경과하여도 요크셔는 높은 생존율을 보이지만 활력도가 낮아지는 경향성이 있다.

명호	DAY 2		DAY 3		DAY 5		DAY 8		비고
	생존율	활력	생존율	활력	생존율	활력	생존율	활력	
Berkshire	90.3	90.4	89.8	91.1	90.5	91.4	72.9	90.5	매우 양호
Yorkshire	84.6	86.4	84.7	87.9	87.8	92.2	83.0	80.6	매우 양호

Fig. 18. 정자의 생존율 및 활력도 검사 결과.

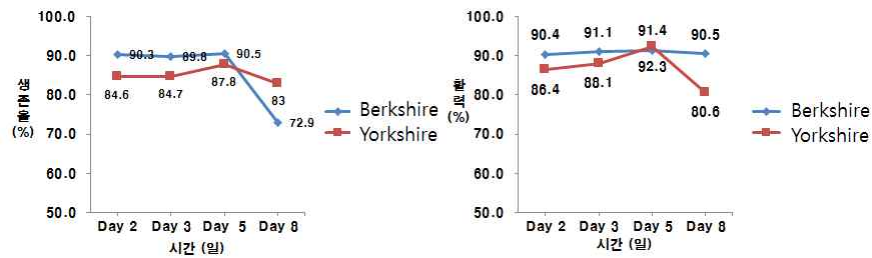


Fig. 19. 채취된 2일차 정자의 생존율.

A; 버크셔 정자 2일차 생존율 검사 결과, B; 요크셔 정자 2일차 생존율 검사 결과.

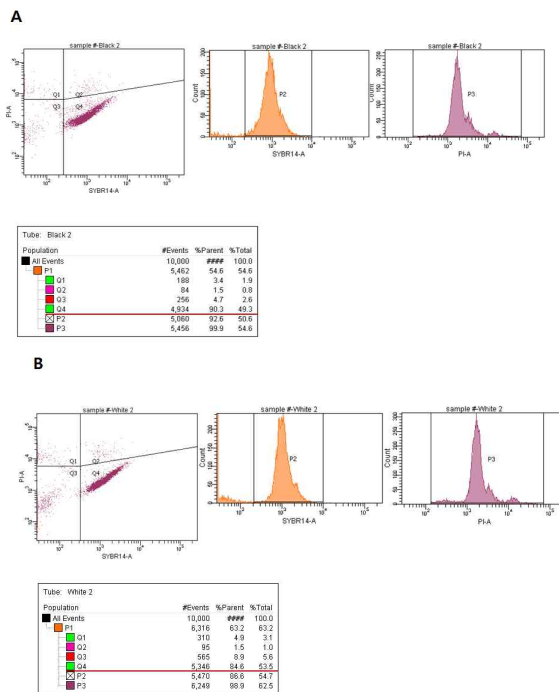


Fig. 20. 채취된 2일차 정자의 활력도 조사.

A; 버크셔 정자 2일차 활력도 검사 결과, B; 요크셔 정자 2일차 활력도 검사 결과.

(나) 2차 검사 결과

정액의 총 7 샘플로부터 잠재적 병원성 균주를 분리하여 동정한 결과, 2 *Bacillus* sp., *Enterococcus* sp., 2 *Proteus* sp., 등의 균주가 동정되었다(data not shown). 2 *Bacillus* sp.는 항생제에 내성이 없었다(Fig. 21과 22). *Enterococcus* sp.는 사용된 모든 항생제에 대해 저항성이 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 23). *Proteus* sp. (7217-D)는 penicillin에 대해서만 저항성을 보였지만, *Proteus* sp. (7217-E)(Fig. 24). 또, 다른 *Proteus* sp. (7217-E)는 사용된 항생제에 대해 전혀 내성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 25).



Fig. 21. *Bacillus* sp. (2770-A)의 항생제 내성검사. 1; 300 ppm, 2; 150 ppm, 3; 75 ppm, 4; 32.5 ppm.



Fig. 22. *Bacillus* sp. (2770-B)의 항생제 내성검사. 1; 300 ppm, 2; 150 ppm, 3; 75 ppm, 4; 32.5 ppm.

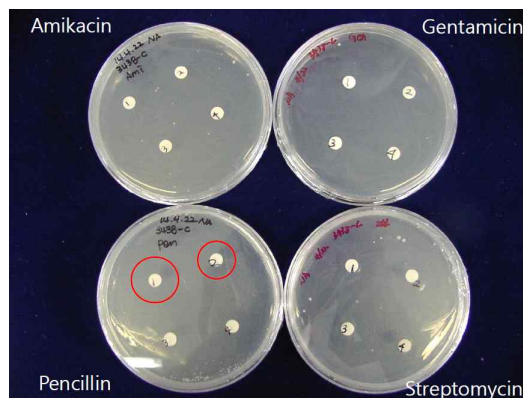


Fig. 23. *Enterococcus* sp. (3438-C)의 항생제 내성검사. 1; 300 ppm, 2; 150 ppm, 3; 75 ppm, 4; 32.5 ppm.



Fig. 24. *Proteus* sp. (7217-D)의 항생제 내성검사. 1; 300 ppm, 2; 150 ppm, 3; 75 ppm, 4; 32.5 ppm.



Fig. 25. *Proteus* sp. (7217-E)의 항생제 내성검사. 1; 300 ppm, 2; 150 ppm, 3; 75 ppm, 4; 32.5 ppm.

이상의 결과로 볼 때 정액의 채취 및 취급시 주의 하지 않을 경우 돼지의 수태율에 영향을 미칠 수 있는 다양한 미생물 균주에 오염될 가능성이 있다. 따라서 정액의 취급시 소독 및 보관에 세심한 주의가 필요한 것으로 판단된다.

## 2. 2차 년도 연구 결과

### 가. 융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발

#### (1) 자궁 샘플 채취 결과

모든 태반 샘플은 다산육종에서 보유하고 있는 500두 모든 중에서 평균 산자수가 7두 이하와 12두 이상이 되는 것을 선정하여 각각 3두씩 선발하여 실험에 이용하였다(Fig. 1). 적절한 크기로 절단된 자궁 샘플은 채취와 동시에 액체질소에서 급속히 냉동하여 실험실로 운반하여 DNA와 RNA 분리에 사용하였다. 분리된 DNA와 RNA는 RNA-seq과 bisulfite seq을 위한 재료로서 quality를 평가한 후 사용하였다.

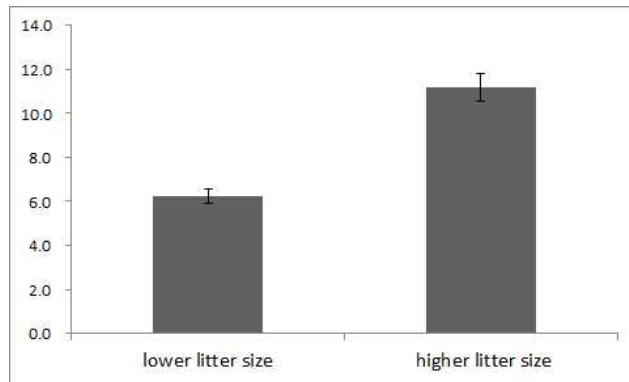


Fig. 1. Results of sampling according to litter sizes of Berkshire sows

## (2) RNA seq 결과

### (가) RNA seq의 기본분석 결과

본 과제의 2차년도에서는 돼지의 산자수와 강한 연관성이 있을 것으로 사료되는 번식과 관련된 조직 중에서도 자궁을 선택 하여 차등 발현 전사체를 분석 하였다. 각각 낮은 산자수와 높은 산자수의 돼지 집단에서 대표할 수 있는 돼지개체를 선발하여 RNA-seq을 통하여 실험 하였고, 이때 일반적으로 산자수가 많다고 알려져 있는 돼지 요크셔종과 버크셔종의 차등 발현 유전자도 탐구 하였다. 이를 통하여 중간 차이를 이해하고 버크셔종의 산자수를 개량 시킬 수 있는 유전자 선발에 기초 자료를 확보 하였다. 먼저 요크셔와 버크셔종의 산자수 low/high의 전사체 발현 패턴의 상관관계를 분석 한 결과 요크셔종에서는 0.916 버크셔종에서는 0.870의 유사성이 나타나 버크셔종은 산자수에 따른 차등 발현 유전자가 월등히 많다는 점을 알 수 있었다(Fig. 2).

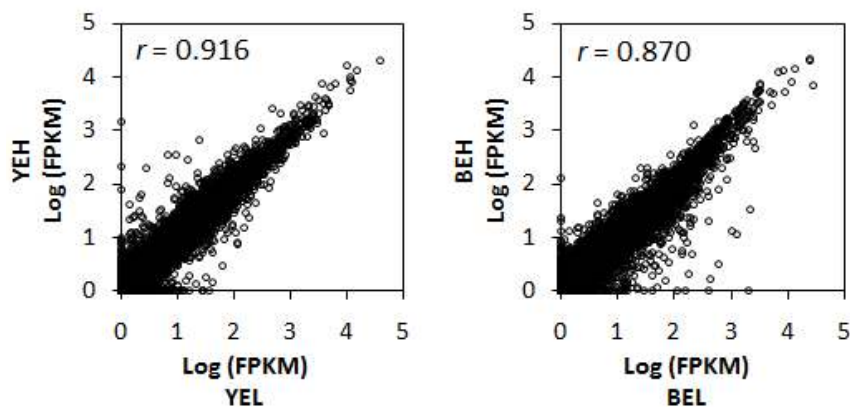


Fig. 2. Correlation of expression between different samples.

또한 발현되는 유전자를 확인해본 결과 유의적 read값을 가지는 결과들이 증가 혹은 감소하는 패턴으로 잘 분석되어졌고, 그림 Fig. 3에서 보는 것과 같이 유의적 증가 유전자는 붉은색 유의적 감소 유전자는 초록색으로 표시 되었다. 발현량의 차이는 log값으로  $-/+5$  사이에 대부분 분포하지만 10이상의 월등한 차이를 보이는 유전자들도 확인된 것을 알 수 있었다.



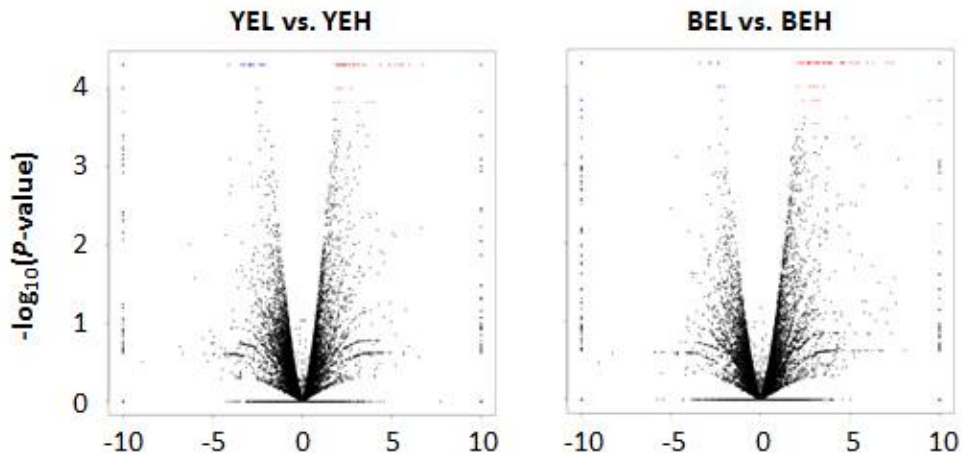


Fig. 3. Identification of DEGs between high and low samples.

#### (나) DEG의 종합적 결과

DEG를 분석해 본 결과, 버크셔종에서는 DEG가 789개 확보 되었으며, 그 중 538개 유전자가 산자수가 높은 그룹에서 증가 하였고 251개 유전자가 감소하였다. 요크셔종에서는 700개의 DEG가 확보되었는데 산자수가 높은 그룹에서 증가하는 유전자가 412개, 감소하는 유전자가 287개로 각각 확인되었다. 이들 중에서 버크셔와 요크셔 두 종 모두에서 증가하는 유전자는 160개, 감소하는 유전자는 45개가 탐지 되었다. 각 DEG에 대한 heat map은 아래 그림과 같다 (Fig. 4).

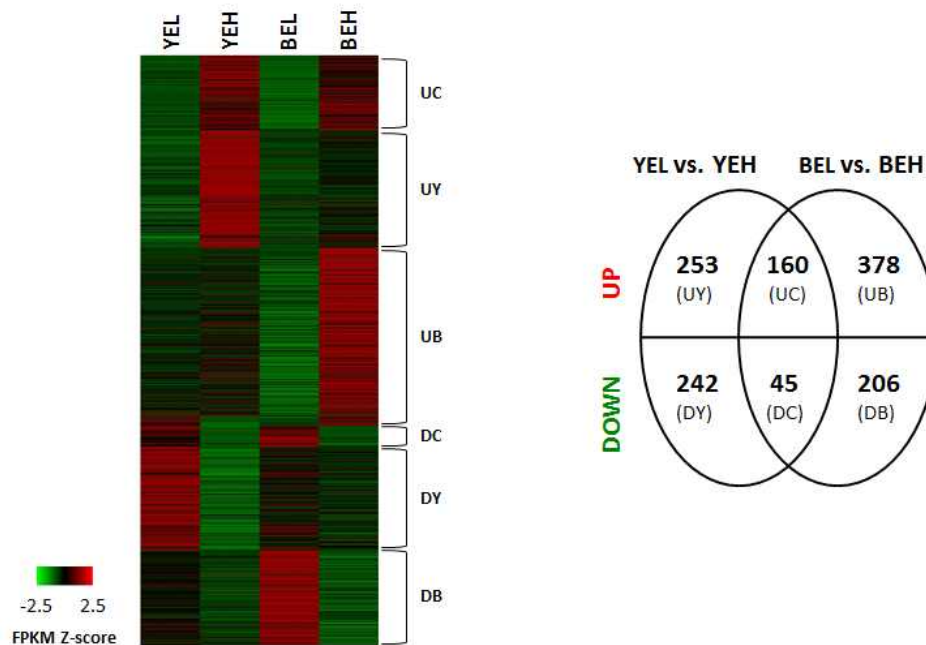


Fig. 4. Number of identified DEGs.

각 DEG 유전자에 대한 fold change의 frequency는 다음과 같다(Fig. 5). 대부분의 DEG들은 차등 발현 정도가 비슷한 양상으로 확인이 되지만 특이적으로 발현이 감소하는 -1, -2 부분에

서는 요크셔종의 DEG가 많이 확인 되었고 버크셔종에서는 차등 발현 유전자의 정도가 훨씬 높은 부분에서도 측정이 된 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

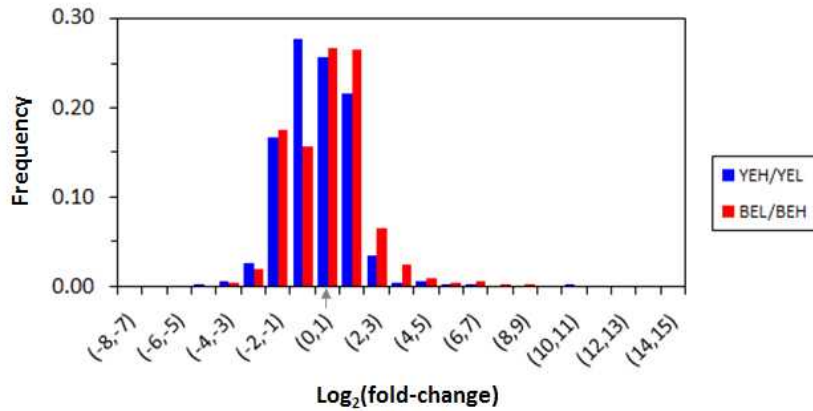


Fig. 5. Frequencies of fold change in DEGs.

전체 DEG 중에서 유전자의 특이성을 고려해 기능별로 나누어 본 결과 산자수에 연관성이 있는 유전자와 전사 인자 등의 유전자를 확인 할 수 있었다(Fig. 6). 버크셔종과 요크셔종에서 특이적으로 관찰되는 산자수 관련 유전자와 전사인자 등의 수를 Table 1에 기술하였다.

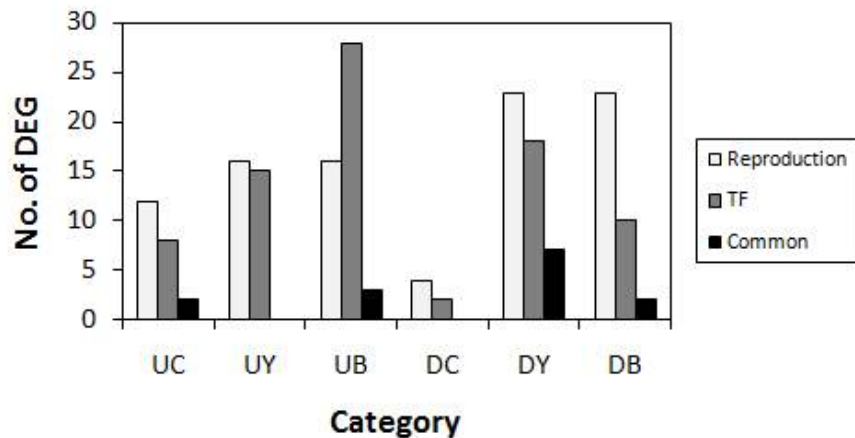


Fig. 6. Number of DEGs related to reproduction and transcriptional factors.

Table 1. Number of DEGs related to reproduction and transcriptional factors.

	UC	UY	UB	DC	DY	DB
Reproduction	12	16	16	4	23	23
TF	8	15	28	2	18	10
Common	2	0	3	0	7	2

전체 DEG 유전자들 중에서 read 값의 정확성 및 정밀도가 높은 유전자들의 리스트는 다음과 같다(Table 2). 산자수가 높은 버크셔종의 자궁에서 발현량이 높은 유전자와 발현량이 낮은 유전자를 나타내고 있다.

Table 2. Up-regulated DEGs in higher litter size of Berkshire pigs

GeneName	Reproduction	Description	EXP: BEL	EXP: BEH
PTGER2	PTGER2	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype	12.88	115.52
ABCA1	ABCA1	ATP-binding cassette sub-family A member 1	9.36	42.2
SAL1	-	Salivary lipocalin	4.52	135.18
SLC28A3	-	Solute carrier family 28 member 3	20.07	218.94
Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	1.31
Nptx1	-	Neuronal pentraxin-1	1.87	11.09
PITPNC1	-	Cytoplasmic phosphatidylinositol transfer protein 1	21.85	163.03
APOD	-	Apolipoprotein D	16.17	100.94
SIK1	-	Serine/threonine-protein kinase SIK1	10.63	64.61
ATP13A4	-	Probable cation-transporting ATPase 13A4	2.02	16.98
HPGD	HPGD	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]	18.01	187.08
KSR2	-	Kinase suppressor of Ras 2	1.22	16.1
NOS1	NOS1	Nitric oxide synthase, brain	3.83	53.7
PCDH15	-	Protocadherin-15	0.55	4.98
DKK1	-	Dickkopf-related protein 1	7.23	55.09
FFAR4	-	Free fatty acid receptor 4	1.81	46.66
STC1	-	Stanniocalcin-1	2.06	30.23
RBP4	RBP4	Retinol-binding protein 4	10.51	1287.57
DEFB1	-	Beta-defensin 1	21.8	196.7
MFSD6	-	Major facilitator superfamily domain-containing protein 6	19.22	76.18
FAM124B	-	Protein FAM124B	1.64	20.8
C2orf72	-	Uncharacterized protein C2orf72	0.43	16.61
Kif1b	-	Kinesin-like protein KIF1B	2.93	16.89
Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	0.65
Gria1	-	Glutamate receptor 1	2.6	36.12
Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	1.49
TUBA4B	-	Putative tubulin-like protein alpha-4B	0	1.26
UPTI	-	Uterine plasmin/trypsin inhibitor	2.11	612.85
CYP24A1	-	1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase, mitochondrial	3.38	25.72
TRPV6	-	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6	7.13	169.74
Trpv5	-	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5	1.72	23.95
SYT13	-	Synaptotagmin-13	1.09	175.21
LAO	-	L-amino-acid oxidase	0	2.49
SLC12A2	SLC12A2	Solute carrier family 12 member 2	15.25	192.21
SLC27A6	-	Long-chain fatty acid transport protein 6	15.32	60.92
SPON1	-	Spondin-1	8.06	48.52
ANKRD34B	-	Ankyrin repeat domain-containing protein 34B	3.58	25.23

Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	1.48
Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	2.19
BAIAP3	-	BAI1-associated protein 3	2.46	12.66
XDH	-	Xanthine dehydrogenase/oxidase	0.29	11.82
CDH17	-	Cadherin-17	3.33	37.53
CA2	-	Carbonic anhydrase 2	3.85	35.09
PREX2	-	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein	5.03	25.35
KIAA1324	-	UPF0577 protein KIAA1324	2.3	78.2
ERBB3	-	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	11.36	84.9
CD69	-	Early activation antigen CD69	1.86	41.48
ADAMTS18	-	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 18	6.64	33.02
MEP1B	-	Meprin A subunit beta	0.65	423.92
MOCOS	-	Molybdenum cofactor sulfurase	25.19	129.85
FCGBP	-	IgGfC-binding protein	0	1.77
Slc30a2	-	Zinc transporter 2	18.08	78.82
Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	1.2
GCNT2	-	N-acetylglucosaminyl-transferase, isoform A	14.93	74.29
SLC24A4	-	Sodium/potassium/calcium exchanger 4	0.5	69.02
UABP-2	-	Uteroferrin-associated basic protein 2	0	108.78
Pol	-	Retrovirus-related Pol polyprotein LINE-1	0	1.9
NMU	-	Neuromedin-U	3.61	209.62
FAM13A	-	Protein FAM13A	7.19	34.53
COLCA1	-	Colorectal cancer-associated protein 1	0.74	6.18
MFSD4	-	Major facilitator superfamily domain-containing protein 4	3.4	20.75
AGR2	-	Anterior gradient protein 2 homolog	18.58	408.49
LHFPL3	-	Lipoma HMGIC fusion partner-like 3 protein	1.55	16.84
SLC26A4	-	Pendrin	12.55	76.8
CACNA1E	-	Voltage-dependent R-type calcium channel subunit alpha-1E	0.35	2.95
ETV1	-	ETS translocation variant 1	1.55	11.96
COBL	-	Protein cordon-bleu	8.09	47.42
COBL	-	Protein cordon-bleu	6.88	59.97
MUC6	-	Mucin-6	0	8.35
Dclk2	-	Serine/threonine-protein kinase DCLK2	0	395.04
Cacna1b	-	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	0	49.08
CACNA1B	-	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	0	737.38
CACNA1B	-	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit	0	11.86

		alpha-1B		
CACNA1B	-	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	0	2.64
ATL3	-	Atlastin-3	0	9.26
SLC39A2	-	Zinc transporter ZIP2	45.75	285.46
ACP5	-	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	16.51	1197.48
KCNJ16	-	Inward rectifier potassium channel 16	0	7.25
GRIA1	-	Glutamate receptor 1	2.11	22.63
CYP26A1	-	Cytochrome P450 26A1	7.66	45.84
FIGF	-	Vascular endothelial growth factor D	1.9	13.31

Table 3. Down-regulated DEGs in higher litter size of Berkshire pigs.

GeneName	Reproduction	Description	EXP: BEL	EXP: BEH
LIPG	-	Endothelial lipase	70.29	15.98
PIF1	-	ATP-dependent DNA helicase PIF1	2.74	0
CEL	-	Bile salt-activated lipase	1	0
ZPLD1	-	Zona pellucida-like domain-containing protein 1	1.5	0
KIF5C	-	Kinesin heavy chain isoform 5C	10.96	0.98
CCNB1	CCNB1	G2/mitotic-specific cyclin-B1	40.16	7.23
SDCBP2	-	Syntenin-2	63.14	8.57
GDF5	-	Growth/differentiation factor 5	0.88	0
GLRX	-	Glutaredoxin-1	40.7	8.27
HBA	-	Hemoglobin subunit alpha	197.08	25.04
FBXO32	-	F-box only protein 32	56.91	11.16
UPK3A	-	Uroplakin-3a	159.14	32.82
HBB	-	Hemoglobin subunit beta	1213.83	219.09
CENPF	-	Centromere protein F	5.74	1.05
ADCY8	ADCY8	Adenylate cyclase type 8	4.82	0
MYD88	-	Myeloid differentiation primary response protein MyD88	4.39	0

또한 요크셔, 버크셔종의 산자수 low/high에 따라 유전자 발현량의 correlation을 pearson correlation분석 방법으로 분석하였을 때 요크셔는 산자수에 따라 0.922, 버크셔는 0.887의 연관성을 가지는 것으로 확인하였고 높은 산자 그룹에서 요크셔 및 버크셔 종별 상관관계는 0.869, 낮은 산자 그룹에서 품종별 상관관계는 0.875로 나타났다(Fig. 7).

	YEH (TN1410R3373-TN1410R3374- TN1410R3375)	YEL (TN1410R3376-TN1410R3377- TN1410R3378)	BEH (TN1410R3379-TN1410R3380- TN1410R3381)	BEL (TN1410R3382-TN1410R3383- TN1410R3384)
-	-	0.922	0.869	0.856
YEH	-	0.922	0.869	0.856
YEL	0.922	-	0.893	0.875
BEH	0.869	0.893	-	0.887
BEL	0.856	0.875	0.887	-

Fig. 7. Pearson correclation.

(다) DEG의 기능별 분류 결과

DEG 유전자들을 기능별로 분류하였다. 먼저 KEGG 분석방법을 이용하여 버크셔종의 산자수가 높은 그룹에서 발현이 증가 혹은 감소하는 유전자들을 기능별로 분류 할 수 있었다. 그 결과 산자수가 높은 그룹에서 발현이 증가 하는 유전자들은 ErbB3 pathway, ECM-receptor interaction, Focal adhesion, Biosynthesis of unsaturated fatty acids 등에 관여 하는 유전자들이 있었고 산자수가 높은 그룹에서 발현이 감소하는 유전자들은 분류한 결과 세포분열, p53 신호 전달, 케모카인 신호전달, 생식호르몬 신호전달 등에 관련된 기능 등의 그룹으로 나눌 수 있었다(Table 4 and Table 5).

Table 4. KEGG pathway analysis with up-regulated DEG in Berkshire pigs.

Category	Term	Genes	Count
BIOCARTA	h_ErbB3Pathway:Neuroregul in receptor degradation protein-1 Controls ErbB3 receptor recycling	ERBB3, EGF, NRG1	3
BIOCARTA	h_cblPathway:CBL mediated ligand-induced downregulation of EGF receptors	PDGFRA, SH3KBP1, EGF	3
KEGG_PATH WAY	hsa04512:ECM-receptor interaction	TNXB, TNC, ITGA2, COL5A3, SDC4, LAMA2, LAMA3, COL6A6, ITGB8, ITGA8, COL1A2, GP1BA, COL11A1, THBS4	14
KEGG_PATH WAY	hsa04510:Focal adhesion	TNXB, BCAR1, TNC, ITGA2, IGF1, COL5A3, FLNB, LAMA2, LAMA3, COL6A6, ITGB8, ITGA8, COL1A2, PDGFRA, EGF, PIK3R3, FIGF, COL11A1, THBS4	19
KEGG_PATH WAY	hsa01040:Biosynthesis of unsaturated fatty acids	PECR, ACOT7, ELOVL2, SCD5, ACOT4	5
KEGG_PATH WAY	hsa04640:Hematopoietic cell lineage	CR2, TFRC, CSF3R, ITGA2, GP1BA, ANPEP, IL6R, CD14, IL1A	9
KEGG_PATH WAY	hsa04010:MAPK signaling pathway	FGFR2, FGF7, TAOK1, PTPN5, CACNG5, FGF10, FGF12, FLNB, DUSP4, FOS, DUSP1, ELK4, PDGFRA, CACNA1E, PLA2G3, EGF, IL1A, CD14, CACNA1B	19
KEGG_PATH WAY	hsa05215:Prostate cancer	FGFR2, PDGFRA, CREB3L1, LEF1, IGF1, FOXO1, CREB3L4, PIK3R3, EGF	9
KEGG_PATH WAY	hsa00561:Glycerolipid metabolism	LPL, PPAP2C, DGKH, GK, AGPAT3, PPAP2B	6
KEGG_PATH WAY	hsa00270:Cysteine and methionine metabolism	LDHB, CTH, GOT1, ENOPH1, CDO1	5
KEGG_PATH WAY	hsa05200:Pathways in cancer	FGFR2, FGF7, EPAS1, LEF1, ITGA2, FOXO1, IGF1, FGF10, FGF12, LAMA2, FOS, LAMA3,	21

		CDKN2B, PAX8, SLC2A1, PDGFRA, CSF3R, HHIP, EGF, PIK3R3, FIGF	
KEGG_PATHWAY	hsa05218:Melanoma	FGF7, PDGFRA, IGF1, FGF10, FGF12, PIK3R3, EGF	7
KEGG_PATHWAY	hsa00600:Sphingolipid metabolism	SGPP1, PPAP2C, B4GALT6, PPAP2B, GLB1	5
KEGG_PATHWAY	hsa04960:Aldosterone-regulated sodium reabsorption	SGK1, FXYP4, IGF1, PIK3R3, INSR	5
KEGG_PATHWAY	hsa05414:Dilated cardiomyopathy	LAMA2, ACTC1, ADCY9, ITGB8, ITGA8, CACNG5, IGF1, ITGA2	8

**Table 5. KEGG pathway analysis with down-regulated DEGs in Berkshire pigs.**

Category	Term	Genes	Count
KEGG_PATHWAY	hsa04110:Cell cycle	CDK1, TTK, ESPL1, MCM2, SFN, MCM3, MCM4, MCM5, CDC25B, CCNB1, CCNB3, CCNB2, PLK1, BUB1, BUB1B, MYC	16
KEGG_PATHWAY	hsa04115:p53 signaling pathway	CCNB1, CDK1, CCNB3, CCNB2, RRM2, SFN, THBS1, IGFBP3, SESN1	9
KEGG_PATHWAY	hsa04062:Chemokine signaling pathway	ADCY2, NCF1, ADCY8, CXCL9, CX3CL1, CCL5, CXCL12, CCL4, CCL17, CXCL10, PLCB4, CXCL14, CCR4, JAK3, SHC3	15
KEGG_PATHWAY	hsa04914:Progesterone-mediated oocyte maturation	CCNB1, CDK1, CCNB3, ADCY2, CCNB2, ADCY8, PLK1, BUB1, CDC25B	9
KEGG_PATHWAY	hsa04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	IL2RB, IL6, GDF5, CXCL9, TNFSF15, IL6R, CX3CL1, CCL5, CXCL12, CCL4, CCL17, CXCL10, PRLR, CXCL14, CCR4, GHR	16
KEGG_PATHWAY	hsa04114:Oocyte meiosis	CCNB1, CDK1, ADCY2, CCNB2, ADCY8, PLK1, SGOL1, BUB1, ESPL1	9
KEGG_PATHWAY	hsa05020:Prion diseases	EGR1, C1QB, IL6, C5, CCL5	5
KEGG_PATHWAY	hsa04916:Melanogenesis	WNT4, WNT7B, FZD10, ADCY2, PLCB4, ADCY8, EDN1, WNT7A	8
KEGG_PATHWAY	hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway	FOS, IL6, MYD88, CXCL9, CCL5, CCL4, SPP1, CXCL10	8
KEGG_PATHWAY	hsa04540:Gap junction	CDK1, ADCY2, PLCB4, ADCY8, PDGFD, TUBA1C, HTR2A	7
KEGG_PATHWAY	hsa00480:Glutathione metabolism	ODC1, GGT5, GSTA4, RRM2, GGT1	5
KEGG_PATHWAY	hsa00330:Arginine and proline metabolism	ODC1, ARG2, ALDH2, ALDH4A1, OAT	5

KEGG_PATHWAY	hsa03030:DNA replication	MCM2, MCM3, MCM4, MCM5	4
BIOCARTA	h_il6Pathway:IL 6 signaling pathway	FOS, IL6, IL6R, JAK3	4

또한 GO enrichment analysis를 통하여 버크셔와 요크셔 두 종에서 확인된 DEG 유전자들의 기능 분석을 한 결과 아래 그림에서와 같이 biological process, cellular component, molecular function 등 크게 기능적인 분류를 세 가지로 할 수 있었으며, 그 중 버크셔종에서 기능별 분류가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 버크셔종의 산자수가 높은 그룹에서 증가한 유전자들을 기능적 그룹으로 분류하면 enzyme linked receptor protein signaling pathway, regulation of cell proliferation, intrinsic to membrane, extracellular region part에 관여하는 그룹으로 나눌 수가 있었다. 이는 산자수를 결정하는 많은 요소들 중에서 호르몬의 신호전달이나 세포 신호 전달 등에 관여 하는 유전자들의 발현이 높게 나타났을 것으로 시사하고 있으며 기존의 사람에 대한 연구보고와 그 경향성이 일치하여, 버크셔종의 산자수를 개량하는데 있어서 좋은 결과를 얻었음을 확인할 수 있었으며 또한 버크셔종의 산자를 결정하는 생체 내 매커니즘을 규명하는데 있어서 중요한 지표가 될 수 있을 것으로 판단되었다 (Fig. 8).

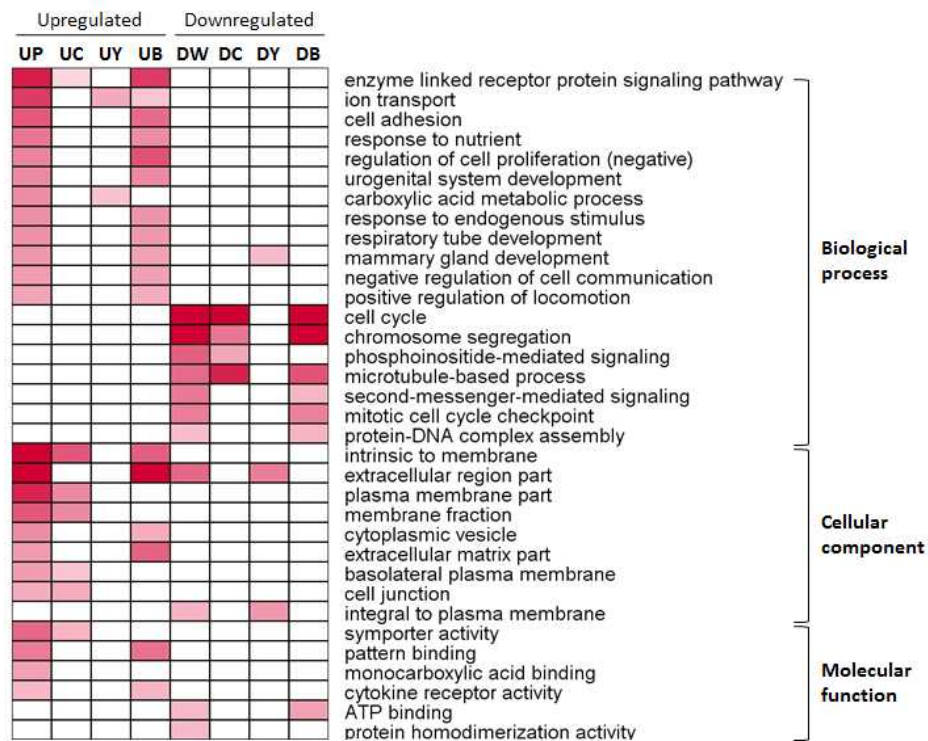


Fig. 8. Gene ontology annotations for DEGs.

### (3) Bisulfite seq 결과

#### (가) Base methylation 분석

Bisulfite 처리된 genomic DNA를 sequencing한 결과는 Fig. 9과 같이 CpG와 CHG 두 부분에서 나타났으며, 버크셔 요크셔 두 종별 산자수 low/high에 따라 전체적 methylation 되는 양



상은 비슷한 것으로 나타났다(Fig. 9).

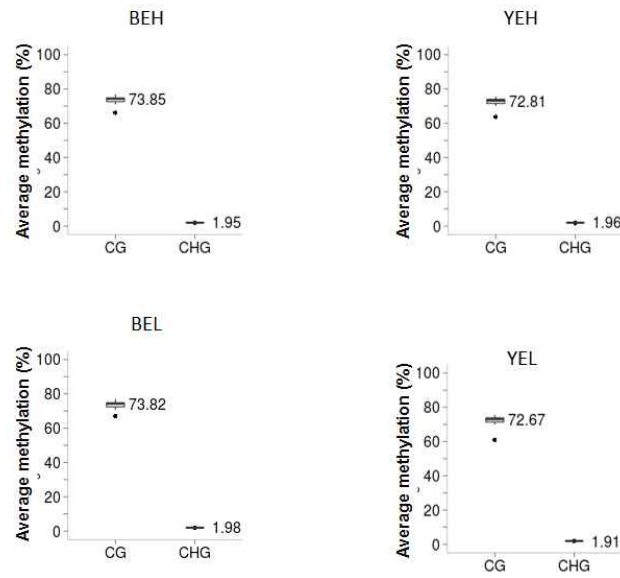
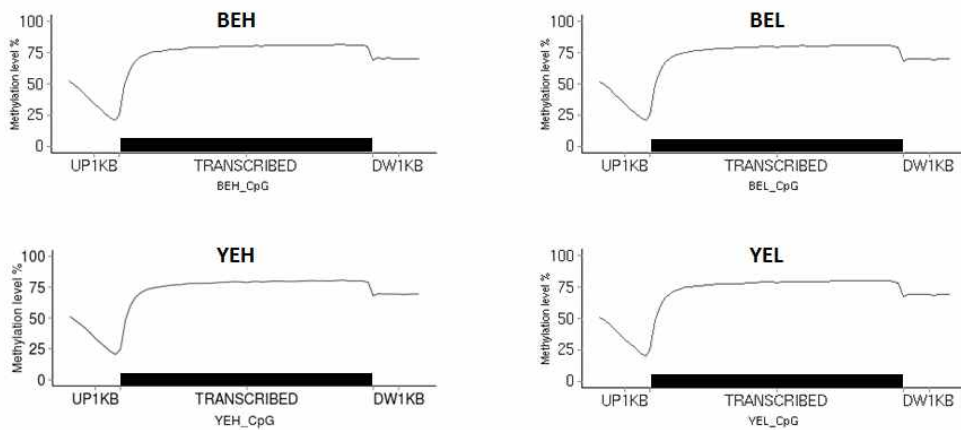


Fig. 9. Distribution of global CpG, CHG methylation level(%) annotations for DEGs.

이들 methylation 중 대부분은 CpG 사이트에서 발견되는데 genomic distribution을 확인 해 본 결과 아래 그림과 같이 transcription start site인 TSS를 중심으로 upstream 1kb, 혹은 gene body쪽에서 methylation이 증가하는 패턴을 보이고 TSS 지역에서는 발현량이 급격히 감소하는 결과를 얻었는데 이는 일반적인 methylation pattern 메커니즘과 일치하는 데이터이다 (Fig. 10).



\* Gene body (transcribed region) bins : 50 , Upstream 1 kb at TSS, Downstream 1 kb at TTS :10 bins

Fig. 10. Genomic distribution of CpG methylcytosines.

전체 genome서열 중에서 Differentially methylated site(DMS)로 확인된 부분은 아래와 같다.

요크셔와 버크셔종에서 각각 10% 이상 methylation이 된 genome은 11.5%와 12.0%로 나타났고, 20% 이상 methylation된 genome은 2.5%와 2.9%로 각각 확인되었다(Fig. 11).

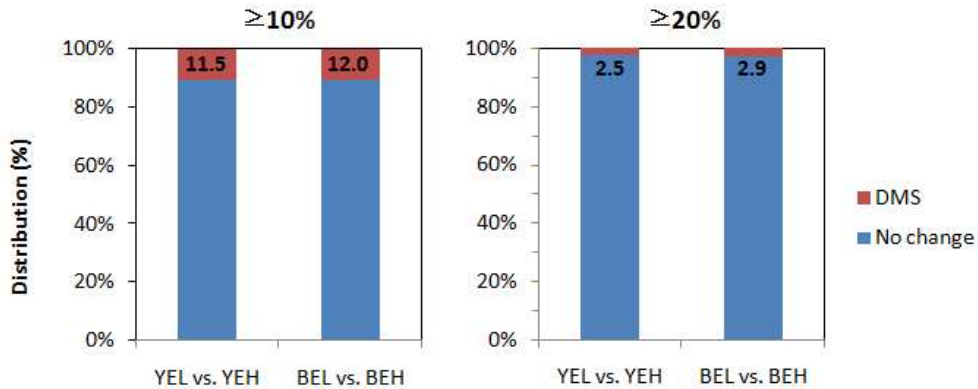
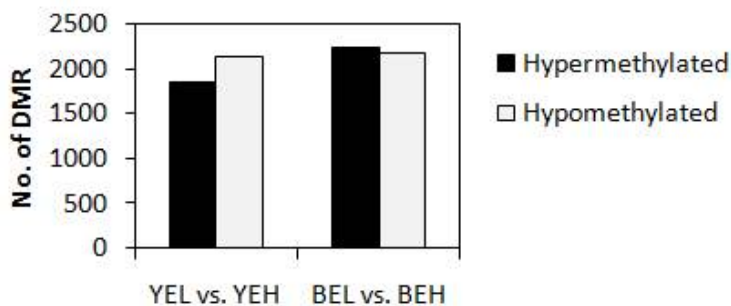


Fig. 11. Distribution of differentially methylated CpG sites (DMSs).

또한 요크셔와 버크셔종의 산자수에 따른 methylation 정도를 분석한 결과는 다음과 같다. 산자수가 높은 그룹에서 methylation 정도가 높은 hypermethylation과 methylation 정도가 낮은 hypomethylation을 분석한 결과, 요크셔종에서는 hypermethylated site 1,847개, hypomethylated site 2,142개로 분석되었고 버크셔종에서는 hypermethylated site 2,230개, hypomethylated site 2,169로 측정되었다(Fig. 12). 각 methylation site에서 DMR의 fold change를 분석 해본 결과 Fig. 13에서 보는 것과 같이 요크셔종이 버크셔종과 비교했을 때 hypomethylation되는 DMR이 좀 더 많은 것을 확인 할 수 있었다. DMR분석에서 확보한 hypermethylation 과 hypomethylation site들은 후성유전체를 이용한 산자수 증대의 선발 도구로 이용할 것이다.



	YEL vs. YEH	BEL vs. BEH
Hypermethylated	1847	2230
Hypomethylated	2142	2169

Fig. 12. Number of DMRs in CpG sites.

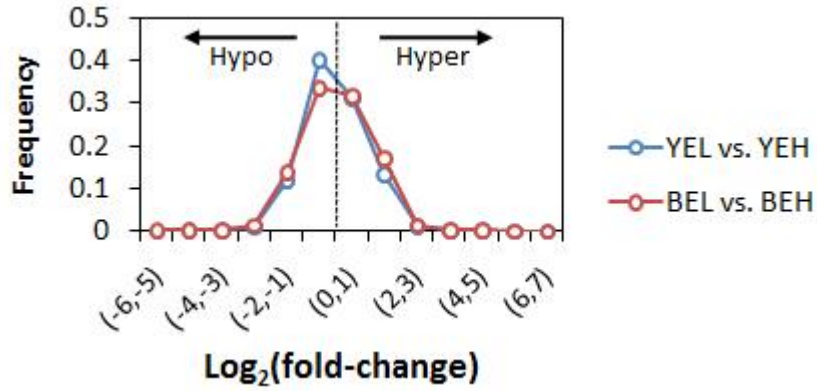


Fig. 13. Fold change of DMRs in CpG sites.

또한 버크셔종에서 CpG의 methylation 수를 fold change로 변환하여 dot graph로 나타내면 버크셔종에서는 hypomethylated site보다 hypermethylation site가 비교적 우세한 것을 확인 할 수 있었으며, hypermethylation site에서 평균적으로 더 높은 fold change 값을 가지는 것은 알 수 있었다(Fig. 14).

각각 다른 genomic regions에서 DMR의 패턴이 어떻게 나타나는지를 알아보기 위하여 TSS, 5'-UTR, CDS, Intron, 3'-UTR 등으로 genomic regions을 구분하여 DMR을 분석 하였다. 그림 Fig. 15과 Fig. 16에서 보이는 것처럼 버크셔종과 요크셔종의 DMR의 위치는 genomic region에 다양하게 분포 하고 있음을 알 수 있었다.

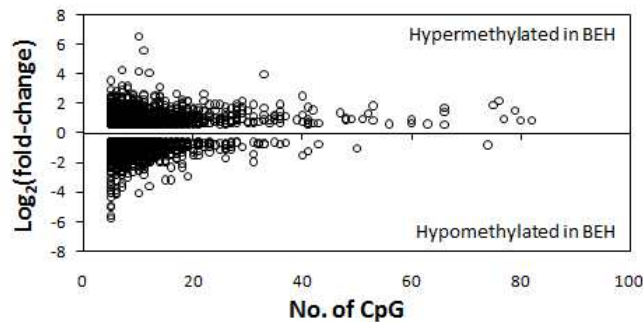


Fig. 14. Number of CpG and fold change of CpG methylation..

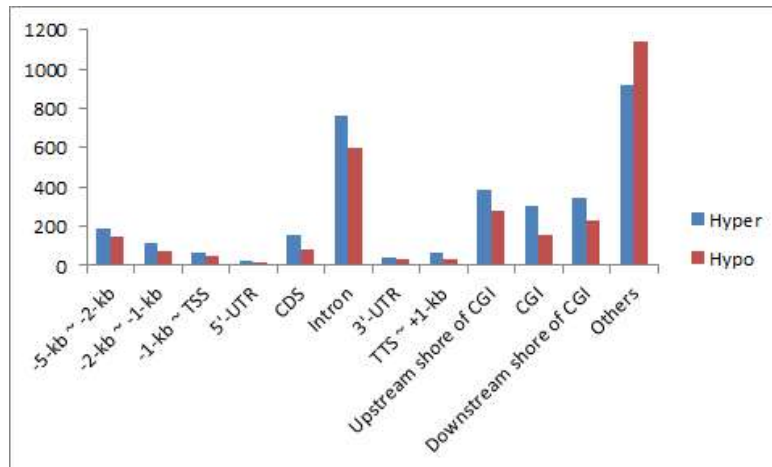


Fig. 15. Number of DMR in different genomic regions of Berkshire pigs.

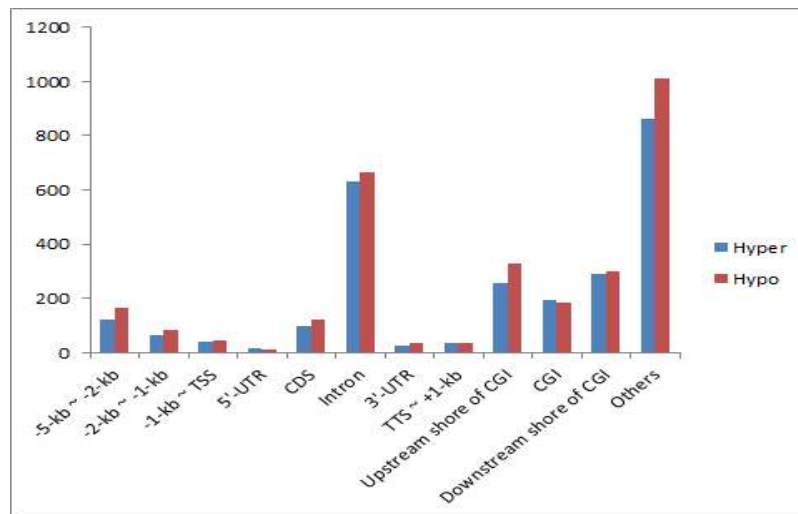


Fig. 16. Number of DMR in different genomic regions of Yorkshire pigs.

#### (나) Methylation 기능 분석

위의 결과와 같이 버크셔와 요크셔종의 DMR을 분석하여 Hyper-혹은 Hypo-methylation 정도를 genome상에서 확인하였고 이런 methylation 차이를 내는 위치를 암호화하는 유전자들을 선별하여 각 유전자들이 어떤 기능을 하는지에 대해 네트워크 분석을 수행하여 유전자들을 기능에 따라 분류하였다. 아래 그림에서 보는 것처럼 cytoskeleton organization, blood vessel development, cell morphogenesis involved in differentiation, regulation of cellular component size 등과 관련된 biological process 카테고리나 cell-cell junction, plasma membrane part, synapse part 등과 관련된 cell cycle 그룹, 마지막으로 protein homodimerization activity와 GTPase activity를 포함한 molecular function 그룹으로 기능별 분석을 할 수 있었다(Fig. 17).

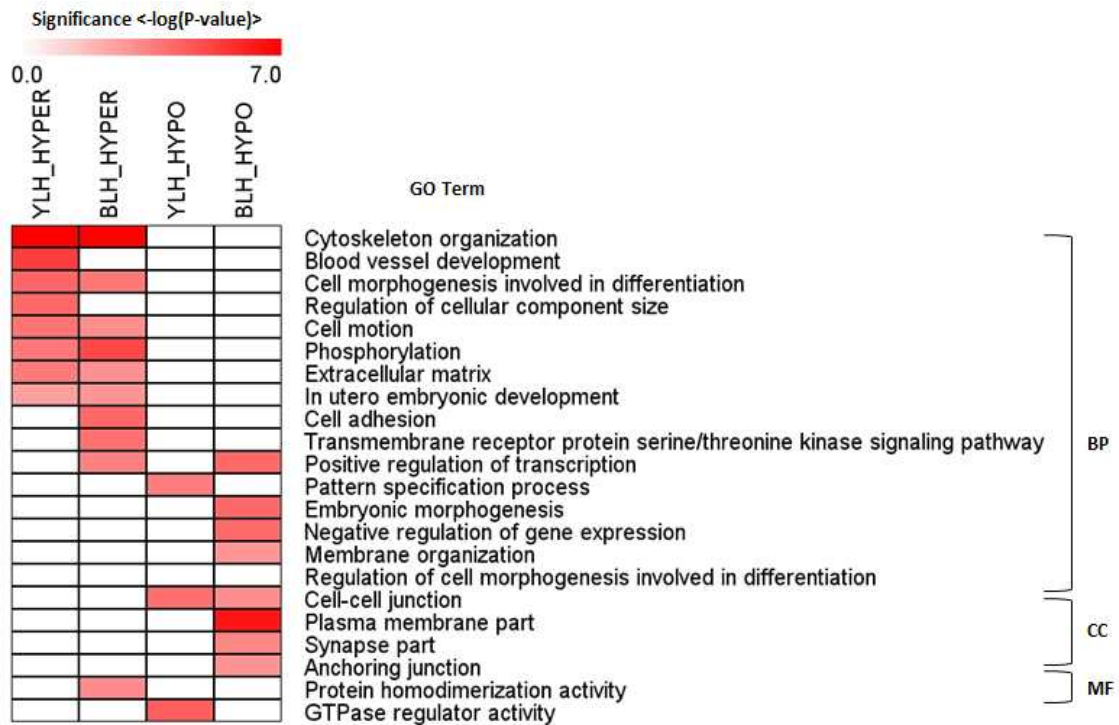


Fig. 17. GO enrichment for genes related to DMRs.

또한 요크셔와 버크셔종의 low/high 산자수에 따른 DMR패턴을 Hyper-혹은 Hypo-methylation으로 정하여 heat map을 작성하였을 때 다음 그림에서 보는 것처럼 버크셔와 요크셔 두 종에서 공통으로 hypermethylation 되는 DMR이 162개, 두 종에서 공통으로 hypomethylation 되는 DMR은 130개로 확인되었다(Fig. 18). 두 종에서 모두 hypermethylation으로 DMR이 확인된 유전자들은 cytoskeleton organization, protein tyrosine kinase activity, regulation of synapticttransmission 등의 기능과 유의한 연관성을 나타냈으며, 두 종에서 모두 hypomethylation으로 DMR이 확인된 유전자들은 transcription regulator activity 기능에 유의한 연관성을 보이는 것으로 분석되었다. 또한 요크셔종에서 hypermethylation으로 확인된 DMR이 버크셔종에서는 hypomethylation으로 나온 DMR 18개와, 반대로 요크셔종에서 hypomethylation으로 확인된 DMR이 버크셔종에서는 hypermethylation으로 나온 DMR 13개를 최종 분석하였다. 이러한 결과는 아마도 두 종간의 다른 산자수를 가지는 차이에서 비롯된 methylation pattern의 변화일 것으로 사료된다. 결론적으로 두 종에서 공통으로 확인된 DMR 들은 산자에 영향력이 크다고 예상 할 수 있으며, 이들 DMR은 총 323개의 유전자에서 발생하는 것으로 확인하였다. 323개의 유전자 중에서 기능이 알려진 유전자는 110개로 후성 유전체 마커 개발에 이용할 것이다.

DMR과 DEG의 상관관계가 있다고 밝혀진 유전자는 HTR2A, GPRASP1, ARHGEF37, CPXM2, VTCN1, SYT13, CREG1, TFF2이며 그 기능은 다음과 같다. HTR2A(5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A)는 G-protein coupled excitatory receptor에 영향을 미치고, secondary messenger로써 phospholipase C와 D를 활성화시키며, 전

두엽 피질의 pyramidal cell에서 높게 발현된다. GPRASP1 (G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1)은 리소좀의 정렬을 조절하며, G-protein coupled receptor의 재순환과 다양한 기능을 down regulation 하는 것으로 알려져 있다. ARHGEF37 (Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 37)은 RhoGTPase의 활성을 향상시킴으로써 RhoA를 활성화 시키고, RhoA-Rho-kinase 역할에 영향을 미친다. CPXM2 (Carboxypeptidase X (M14 family), member 2)는 metallocarboxypeptidase를 활성화시킨다. VTCN1 (V-Set Domain Containing T Cell Activation Inhibitor 1)은 B7 costimulatory protein family member로 T cell의 활성화, 증식, 사이토카인의 생성 및 발생을 억제함으로써 T cell 매개체인 다양한 면역반응을 부정적으로 조절한다고 알려져 있으며, IL-2 생산을 제한하고 CD4+와 CD8+ cell의 cell cycle을 arresting하는 것이 대표적이다. SYT13(Synaptotagmin 13)은 extracellular N-terminal transmembrane domain과 cytoplasmic C terminal region에 C2 domain (C2A, C2B)가 연결되어 있다. 이는 membrane과 연관된 vesicle transport protein으로 알려져 있다. CREG1(Cellular Repressor Of E1A-Stimulated Genes 1)은 세포성장과 분화의 transcriptional control에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 이것은 세포증식의 촉진과 세포분화를 억제시키고, transcriptional 활성화와 cellular transformation을 하여 상반되는 작용을 한다. TFF2 (Trefoil Factor 2)은 small peptide 구성요소로서 위 점막에서 발현되며, 위 점막을 보호하는데 영향을 미친다고 알려져 있다.

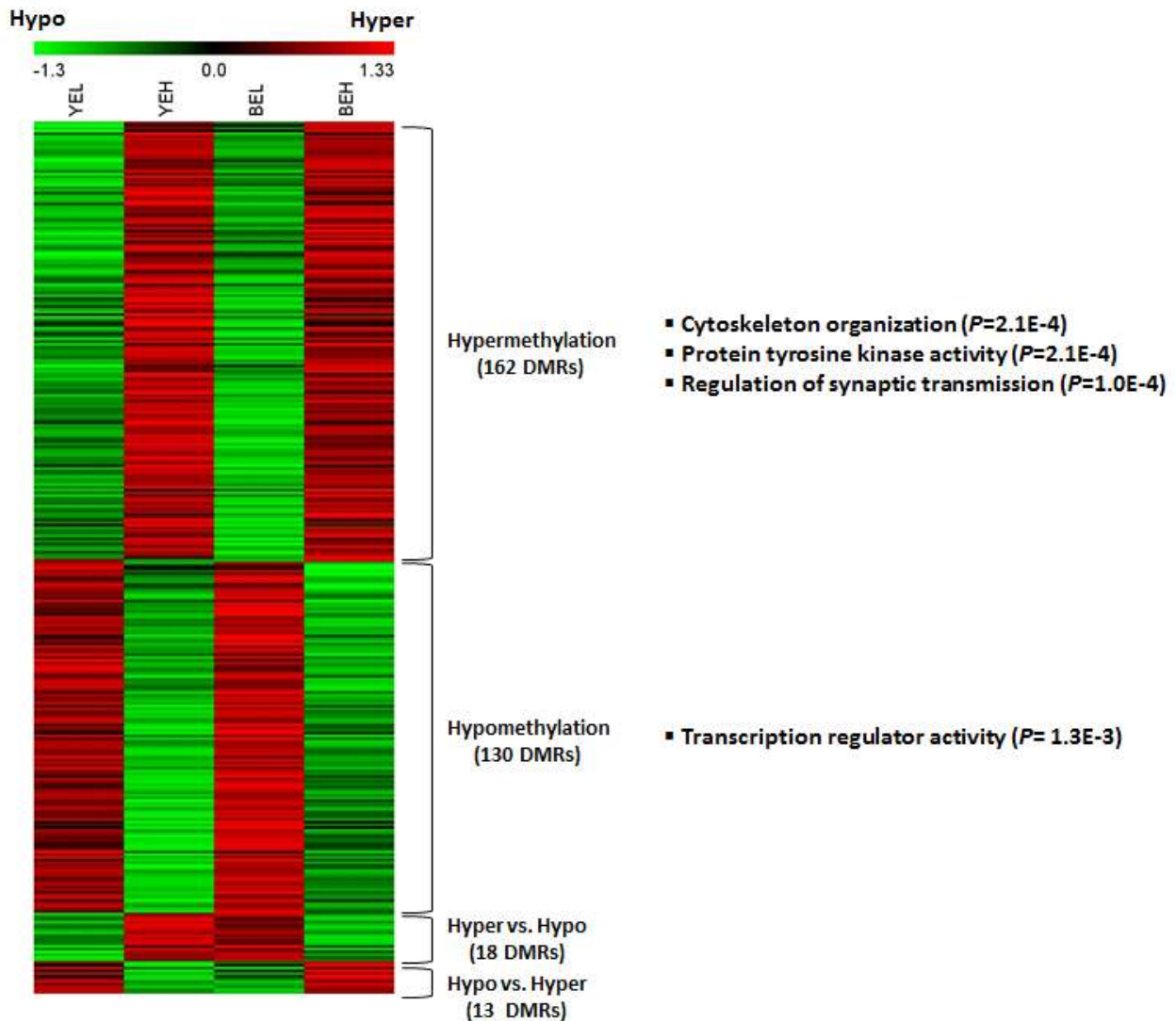


Fig. 18. DMRs overlapped between the two groups.

#### (4) RNA-seq결과와 Bisulfite seq 결과의 융합 분석

RNA-seq분석을 통한 유전자의 차등 발현과 bisulfite seq 분석을 통한 DNA methylation 패턴을 융합적으로 분석해 보았다. 일반적으로 잘 알려진 DNA methylation의 기능은 유전자의 발현을 억제 하는 것이다. 유전자의 발현량이 낮아져 있고, methylation 정도가 높게 확인된 유전자와 발현량이 높으며 methylation 정도가 hypomethylation인 유전자를 각각 탐구하였다. 아래 그림에서 보는 것과 같이 x축과 y축이 methylation 정도와 발현량의 정도를 표시 하는 것인데 그림상의 2사분면과 4사분면에 위치한 dot들이 DMR-DEG 상에 correlation이 있는 유전자들이다. 이를 토대로 DMR이 존재하는 genomic regions을 상세하게 탐구해본 결과 붉은색으로 표시한 유전자들이 발현량에 차이를 내는 유전자이면서 DMR이 promoter region에 존재하는 유전자들이다. 이 유전자들은 promoter에 methylation정도에 따라서 발현량이 달라졌을 것으로 예상되며 이는 후성 유전학적 마커와 전사체 간의 통합적 선별 유전체의 확립에 중요한 결과물이다(Fig. 19).

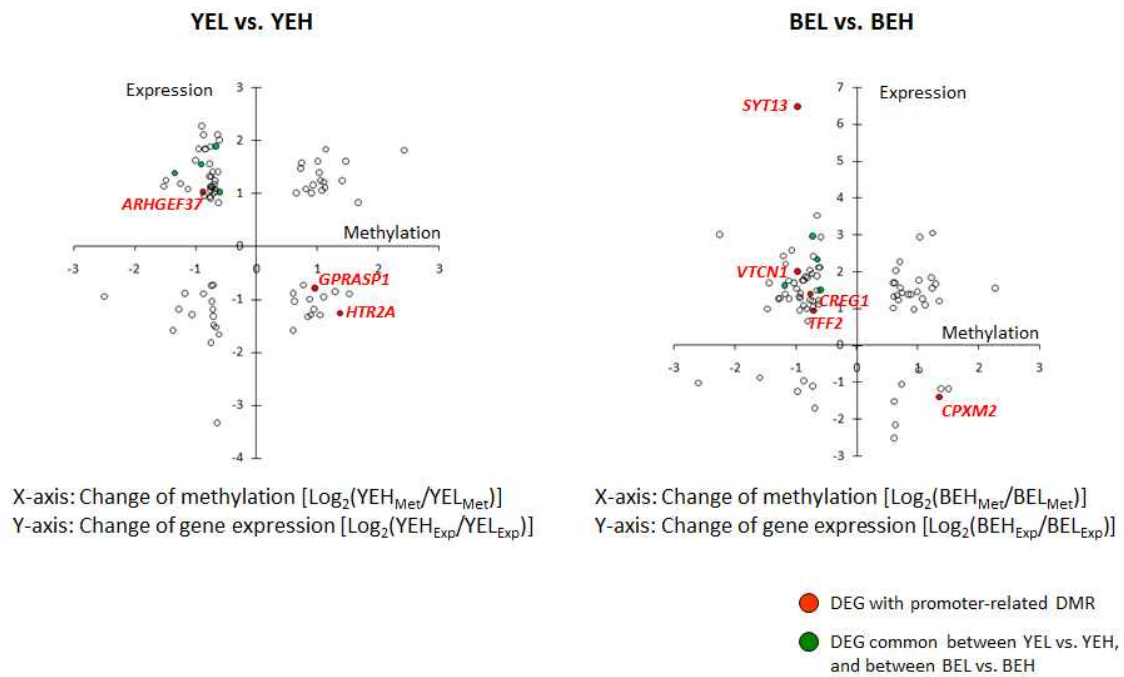


Fig. 19. Correlation between DMRs and gene expression.

#### (5) 1차년도 RNA-seq결과의 재현성 실험

1차년도 RNA-seq실험은 버크셔 돼지의 태반에서 차등 발현 유전자를 분석하였다. 총 588개의 DEG를 얻었고 이들 중에서 129개의 유전자가 산자수와 연관성이 있는 것으로 확인되었다. 이들 중 16개의 유전자는 산자수가 많은 그룹에서 증가하고, 나머지 113개의 유전자는 감소하는 것으로 확인되었다. DEG 중에서 의미 있다고 생각되는 후보 유전자들을 선발하여 RT-qPCR을 통한 재현성 분석 실험을 하였다. Egr2, phero, endothelial lipase의 세 개 유전자의 결과는 아래 그림과 같다(Fig. 20). 또한 이 세 개 유전자의 RNA-seq결과는 Table 6과 같은데 fold change에 대한 민감도는 RT-qPCR에 의한 재현성 실험에서 현저히 크게 확인되었다.

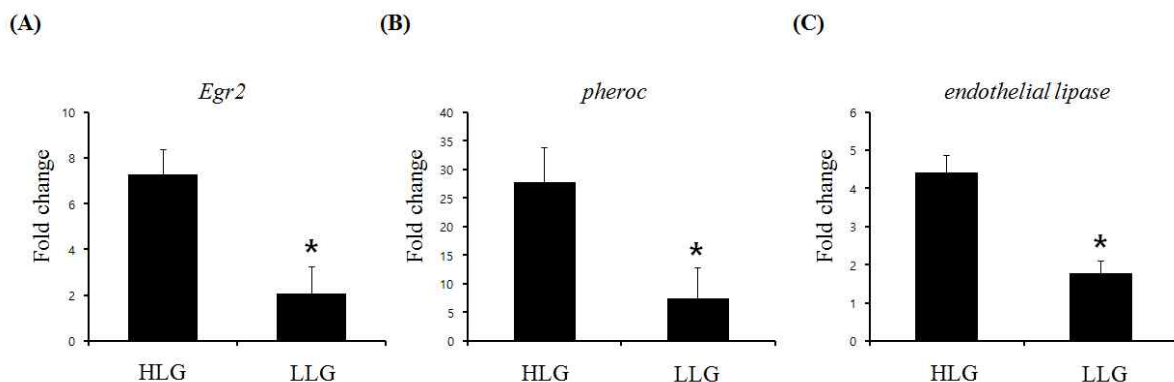


Fig. 20. RT-qPCR analysis with DEGs in placenta of Berkshire pigs.



**Table 6. Representative three DEG analyzed with placenta of Berkshire pigs.**

Accession	symbol	description	lower	higher	log <sub>2</sub> fc	p-value
ENSSSCG0000010224	EGR2	Sus scrofa early growth response 2 (EGR2)	420.00	1,290.00	1.62	0.000
ENSSSCG0000004509	LIPG	Sus scrofa lipase, endothelial (LIPG)	380.00	1,080.00	1.51	0.001
ENSSSCG0000013067	PHERO	Sus scrofa pheromaxin C subunit (PHERO)	18.90	108.00	2.51	0.006

Egr2 유전자는 early growth response2이며 DNA-binding 하는 transcription factor 이면서 또한 E3 SUMO-protein ligase로 잘 알려져 있다. 기존 보고에서 Egr2는 glucocorticoid에 의해서 발현이 억제 되고 반면 Wnt signal에 의해서 촉진된다고 알려져 있다. 이런 Wnt신호는 glucocorticoid에 의한 효과는 만회한다고 한다. 또한 Wnt신호는 태반의 전구체인 trophoblast와 태반의 발생과 분화에 중요한 신호전달물질로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 Wnt신호의 세포내 신호 전달의 하위에 있는 분자인 TCF12, beta-catenin 등의 발현을 확인 해 본 결과 산자수에 따라서 차이가 없는 것을 확인하였고, Wnt신호의 ligand인 Wnt 9b 10a 11등의 발현량을 확인 해 본 결과 Wnt9b의 발현이 산자수가 많은 그룹에서 증가 되어 있는 것을 발견 하였다. 아마도 이러한 Wnt 9b의 증가가 Egr2의 발현을 유도 하였다고 생각한다.

lipase는 그 역할이 lipids의 소화와 전달을 담당하는데 IL-6, leptin, TNF-alpha, CRP등에 의하여 발현이 유도되고 반면 adiponectin과 같은 지방세포 분화에 중요한 물질에 의해서 발현이 억제 되는 것이 잘 알려져 있다. 본 연구에서 버크셔 돼지의 태반 조직에서 이들 사이토카인의 발현량을 확인해본 결과 IL-6가 산자수가 높은 그룹에서 증가되어 있는 것을 확인하였다. IL-6에 의해서 endothelial lipase가 발현이 유도 되었을 것으로 사료 된다. 또한 태아의 모체로부터의 영양공급은 태아의 성숙에 아주 중요한 역할을 하는데 초기 영양공급 물질로 중요한 것은 glucose, free amino acids, ketone bodies, free fatty acids 등이다. Triglyceride lipase gene family는 triglycerides와 phospholipids를 수용화 시키고 endothelial lipase는 이러한 triglyceride lipase gene family 중에서도 태반에서 발현이 잘 되는 것으로 알려져 있다. 또한 endothelial lipase의 mRNA 발현량이 intrauterine growth restriction에서 30%정도 감소되어 있는 것이 연구 발표 되어 태반에서 endothelial lipase가 영양물질의 공급에 중요한 역할을 할 것으로 사료 된다(Fig. 21).

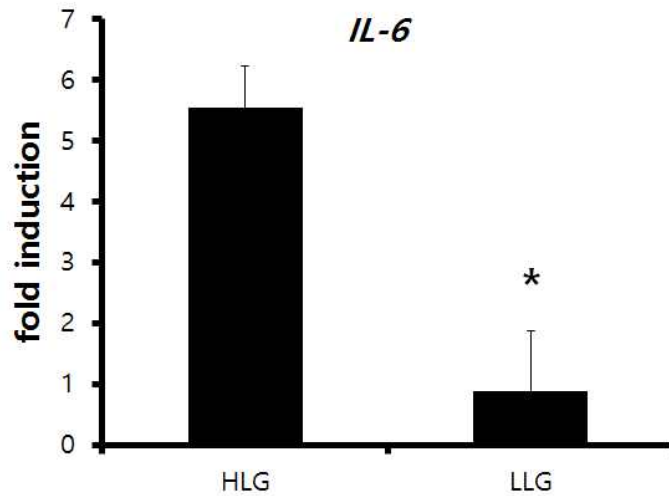
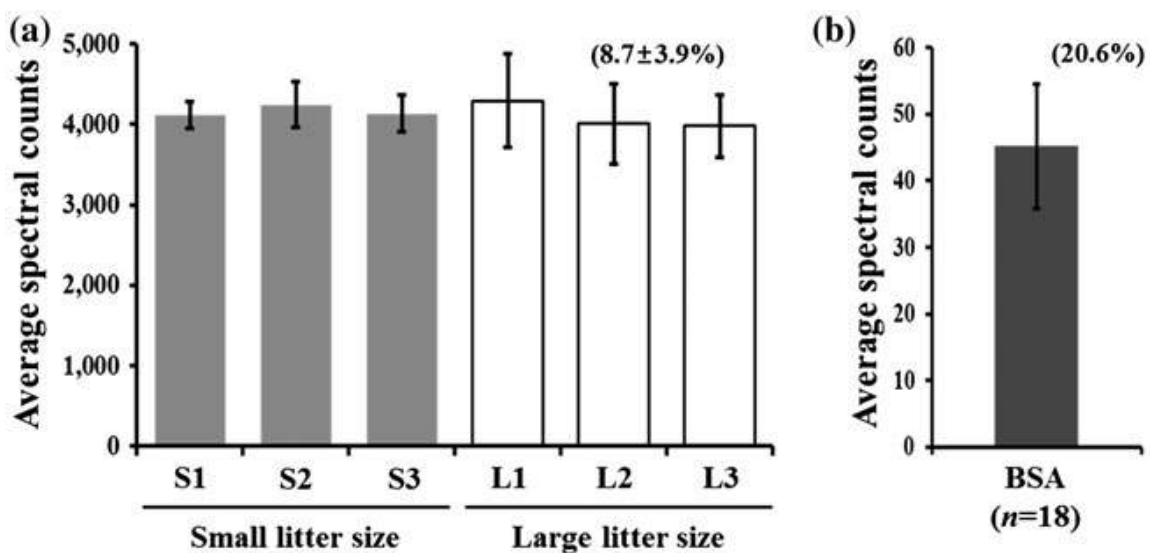


Fig. 21. RT-qPCR analysis with IL-6 gene in placenta of Berkshire pigs.

(6) 산자수에 따른 버크셔 품종의 태반에서 차등 발현하는 단백질의 분석

산자수에 따른 버크셔 품종의 태반을 채취하여 gel-free and label-free 상대정량 프로테오믹스 방법으로 산자수에 따른 차등 발현 하는 단백체를 분석하였다. soluble protein을 추출하여 in-solution tryptic digestion을 한 후 liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis를 수행 하였다. 평균 spectral count는 그림 Fig. 22에서 볼 수 있듯 산자가 낮고 높은 버크셔 돼지 그룹에서 8.7% 내외의 수치 안에서 비슷한 수준을 이루는 것으로 확인 할 수 있었고 internal control인 BSA실험에서 20.6%라는 차이가 나왔기 때문에 단백질체 분석에 응용 되는 기법에서 최소 20%이상 차이가 나는 단백질체들을 유의한 수준이라고 판단 할 수 있다.



**Fig. 22. Average spectral counts from placental proteins (a) and externally spiked bovine serum albumin (BSA) (b).**

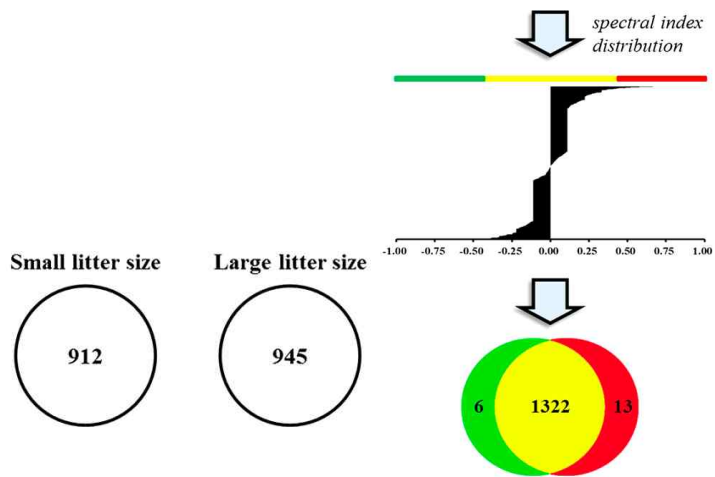
산자수가 낮은 그룹에서 912개 산자수가 높은 그룹에서 945개의 단백질 spectral counting 방법에 의해서 확보 되었는데 spectral index 방법으로 확보된 단백체를 다시 환산하여 분석하여 1,341개의 단백질체가 두 그룹에서 발견이 되고 특이적으로 산자수가 낮은 그룹에서만 발현하는 6개 단백질, 산자수가 높은 그룹에서만 발현하는 13개의 단백질을 확보 할 수 있었다 (Fig. 23). Table 7에서 확인 할 수 있듯이 산자수가 낮은 그룹에서 발현이 증가 되어 있는 단백질로는 prenylcysteine oxidase-like, PGK-1 like, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16-like isoform2, Calpain small subunit 1, Two-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial-like, Cytosolic nonspecific dipeptidase가 동정되었다. 산자수가 높은 그룹에서 발현이 증가 하는 단백질로는 Alpha-N-acetylgalactosaminidase -like, Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8-like, Retinol dehydrogenase 16-like isoform 1, NADPH-cytochrome P450 reductase, phosphoglycerate mutase2, Rsa-related protein Rab-2A, V-type proton ATPase subunit B, brain form, Puromycin-PSA isoform 1, RBP 4 precursor 등이 확인 되었다. 이들 중 산자에 연관성이 있다고 알려진 puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA)과 retinol-binding protein 4(RBP4) 단백질에 대해서 태반조직으로 Western blotting 실험을 수행하여 재현성이 확보 되는 것을 관찰 하였다(Fig. 24). 이러한 결과로부터 PSA와 RBP4가 버크셔 돼지의 생산성 연관 형질에 중요한 마커 유전자가 될 수 있음을 알 수 있었다. 또한 위 결과를 버크셔 돼지의 분자유종에 응용하여 산자를 증대 시킬 수 있는 기초 자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

**Table 7. list of differentially expressed proteins according to litter size.**

Acc. No.	Protein name	Species	Litter size		Litter size		Litter size		Spl <sup>d</sup>
			Small	Large	Small	Large	Small	Large	
			Avg.	Avg.	Avg.	Avg.	Avg.	Avg.	
			IS <sup>a</sup>	IS	PSC <sup>b</sup>	PSC	SC <sup>c</sup>	SC	
<i>Highly expressed in SLSG</i>									
XP_003354827.1	Prenylcysteine oxidase-like	Sus scrofa	37.3	9.3	10.1	0.8	4.4	0.4	-0.596
XP_003135255.2	PGK 1-like, partial	Sus scrofa	39.2	2.8	34.8	5.2	7.6	1.0	-0.576
XP_003358946.1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16-like isoform 2	Sus scrofa	15.3	2.2	11.6	1.9	13.3	2.2	-0.556
NP_999483.1	Calpain small subunit 1	Sus scrofa	38.7	0.0	18.4	0.0	3.4	0.0	-0.556
XP_003134939.3	Two-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondriallik	Sus scrofa	26.0	4.7	6.6	0.9	6.3	0.9	-0.483
NP_001230636.1	Cytosolic nonspecific dipeptidase	Sus scrofa	40.7	7.7	10.9	1.6	5.22	0.7	-0.480
<i>Highly expressed in LLSG</i>									

XP_003484358.1	Alpha-N-acetylgalactosaminidase-like	Sus scrofa	36.1	97.2	8.2	17.2	2.0	5.1	0.465
XP_003122402.2	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 8-like	Sus scrofa	24.7	71.2	5.0	11.0	1.7	3.2	0.472
XP_00335527.1	Retinol dehydrogenase 16-like isoform 1	Sus scrofa	75.0	189.1	12.0	29.8	3.9	10.9	0.485
NP_001123431.1	NADPH-cytochrome P450 reductase	Sus scrofa	27.0	38.4	4.3	11.1	2.1	4.9	0.487
NP_001128440.1	Phosphoglycerate mutase 2	Sus scrofa	31.8	63.8	11.1	22.0	3.4	8.1	0.491
XP_001926739.2	Rsa-related protein Rab-2A	Sus scrofa	3.6	42.4	1.3	13.7	0.2	2.1	0.492
XP_003483427.1	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Sus scrofa	24.8	97.3	7.1	18.6	3.4	9.0	0.520
XP_003131575.2	Puromycin-PSA isoform 1	Sus scrofa	12.1	54.8	2.8	13.0	3.4	11.6	0.548
NP_999222.1	RBP 4 precursor	Sus scrofa	0.0	40.7	0.0	14.6	0.0	2.0	0.556
XP_003123362.1	Lysosomal alpha-mannosidase-like isoform 1	Sus scrofa	0.0	30.6	0.0	5.8	0.0	4.0	0.556
XP_003481702.1	Ras-related protein Rap-1b	Sus scrofa	9.3	48.4	8.3	28.4	1.3	5.3	0.578
NP_001230745.1	Solute carrier family 7 (orphan transporter), member 4	Sus scrofa	4.0	35.4	0.6	5.0	0.3	2.3	0.667
XP_00335526.1	Short-chain dehydrogenase/reductase family 9C member 7-like	Sus scrofa	15.3	57.2	4.1	23.0	1.6	6.9	0.684

<sup>a</sup>Average ion score. <sup>b</sup>Average peptide sequence coverage. <sup>c</sup>Average spectral count. <sup>d</sup>Spectral index.



**Fig. 23.** Schematic illustration of the detected protein number in small and LLSG from the extracted proteins in each porcine placenta. Notes: Upper panel, total number of proteins identified in the small and LLSG; middle panel, SpI obtained from non-redundantly identified proteins containing 1,341 proteins; and lower panel, number of commonly and differentially expressed proteins at 99% confidence level.

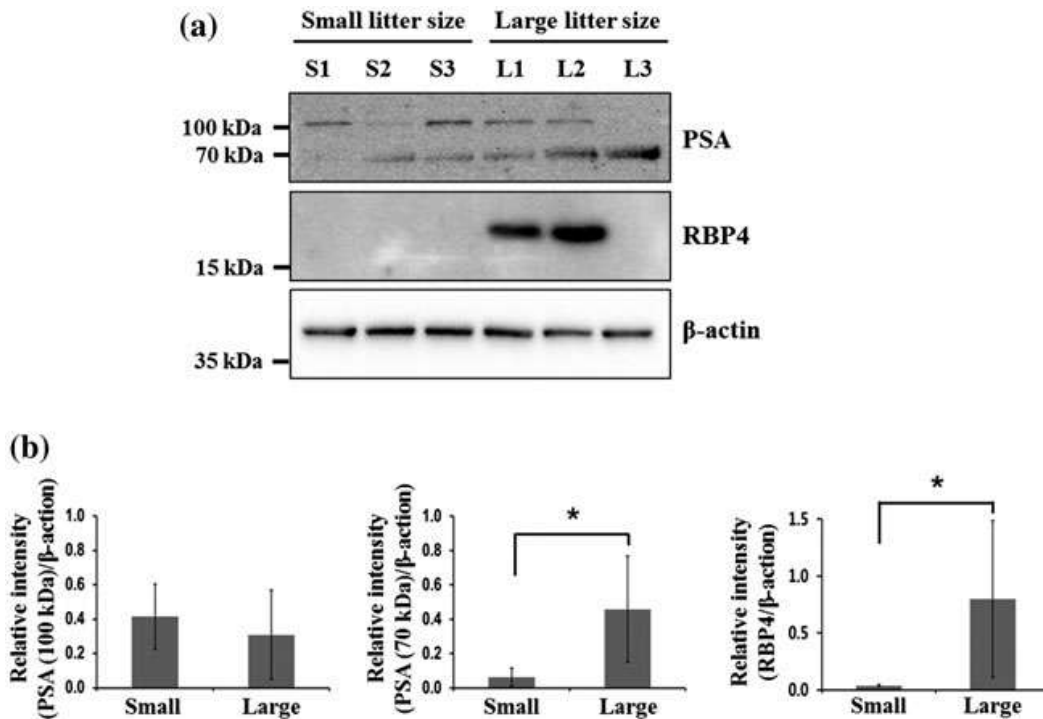


Fig. 24. Western blot analysis of PSA and RBP4 in SLSG and LLSG. Total soluble proteins (20  $\mu$ g) from SLSG and LLSG were separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the gels were blotted onto PVDF membranes. The immunoblot signals of PSA and RBP4 were detected and compared between SLSG and LLSG (a). Relative expression levels were determined by dividing the intensity of either PSA isoform or RBP4 by that of  $\beta$ -actin (b). Beta-actin was used as the loading control.

### (7) 산자수에 따른 후보 유전자의 SNP탐색

산자수에 따른 후보 유전자의 SNP탐색을 하기 위하여 본 연구에서는 RNA-seq을 통해 얻은 결과로 RNA-DNA-Difference (RDD) 분석을 하여 유용유전자 (차등 발현이 확인된 전사체, 단백질체, 후성유전체등을 포함하는 통합유전체마커)의 SNP를 탐구 하였다.

#### (가) reference 를 통한 후보 유전자의 SNP탐색

##### ① MAP3K3 - c.67 C>T, c.86 C>T

8품종 (Meishan, Mangalitza, Duroc, Pietrain, German Landrace, Hampshire, Husum Red Pied, German Large White)을 이용하여 PCR Product의 sequencing 실험을 통해 21개 돼지 후보 유전자의 36개 SNP를 식별할 수 있었다. 돼지 EST 배열을 이용하여 Primer를 제작하여 PCR-RFLP 실험을 수행하였다. 96 German Large White의 산자수와 관련해서 통계 분석 한 결과 genotype ( $p < 0.001$ ), alleles ( $p < 0.05$ ), trend of allele ( $p < 0.001$ )의 significant effect를 4개의 SNP에서 확인할 수 있었다. (MAP3K3, KDR, ERBB2IP, PPARD) (Spötter A. et al. 2010).

## ② ESR2 - c.949 A>G, Met/Val (exon5)

Iberian 돼지의 난소 RNA sample에서 ESR2 exon 5, 949 위치에서 A/G SNP를 발견하였고, 이 SNP는 Met/Val 아미노산 변화를 확인할 수 있었다. PCR-RFLP 실험으로 두 Iberian 돼지 집단을 genotype결과를 이용하여 산자수의 잠재적인 영향을 평가하였다 (Muñoz G. et al., 2004).

## ③ NAT9 - c.699 A>G

NAT9 유전자는 재생에 관여하는 중요한 유전자이다. RACE-PCR을 통해서 NAT9 유전자의 cDNA 서열을 확보하였고, NAT9 유전자는 비장, 대장, 폐, 지방, 근육, 심장, 간, 신장, 난소 등의 조직에서 발현을 확인하였다. mRNA 699bp 위치의 A/G 변이와 8 품종의 mutation 자리에서 확실한 유전자형과 대립 유전자 빈도의 차이를 확인하기 위해 PCR-RFLP 실험을 설계하고 Large white 100두와 Landrace 100두를 산자수 형질과 SNP와의 연관성 평가한 결과 NAT9 유전자의 SNP와 산자수 형질과 관련되어 있음을 확인하였다 ( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는 NAT9 유전자가 돼지의 산자수를 증가시키기 위한 선택에 유용한 후보 유전자가 될 수 있음을 확인할 수 있다 (Jiugang Z et al. 2012).

## ④ ROPN1 - c.536 T>C

돼지 EST 서열에 기초하여 RACE-PCR을 통해 ROPN1 유전자 cDNA 서열을 확보하였고 다형성 분석을 통해 mRNA 536bp 위치에서의 T/C 돌연변이, Cys/Arg 아미노산 변형을 확인하였다. PCR-RFLP 통해 돼지 8 품종에서 T/C 변이 위치에서 확실한 유전자형과 대립 유전자 빈도 차이를 분석 하였다. Large white 100 두 Landrace 100두의 SNP 와 산자수 형질과 연관성을 분석 한 결과 Large white 모돈에서 first parity ( $p < 0.01$ ), all parities ( $p < 0.05$ )의 산자수 형질과 연관성을 확인할수 있었고, Landrace 모돈에서는 all parities ( $p < 0.01$ ) 산자수 형질과 연관성을 확인하였다. 따라서, ROPN1 유전자는 돼지의 산자수 형질을 증가시키기 위한 선택에 유용한 후보 유전자로 사용될 수 있다 (Lan J et al. 2012).

## ⑤ NR4A1 - c.796 A>G (intron 5)

NR4A1 유전자는 배란 과정에서 잠재적인 역할을 하고 있는 핵 수용체를 코딩하는 초기 유전자이다. 본 논문에서는 4870bp CDS 와 돼지 NR4A1 유전자의 intron 서열을 확인하였다. RT-PCR을 통해 NR4A1 유전자는 난소, 자궁, 신장, 심장에서 높게 발현되고 다른 조직에서는 발현되지 않음을 확인하였다. Large white와 Meishan 돼지 intron 및 CDS 서열을 비교하여 intron 5의 A/G 서열의 SNP를 확인하였고, 이에 대한 PCR-RFLP 유전자형 분석을 수행하였다. Large white와 experimental synthetic Line (DIV) 모돈 두 집단에서 SNP 및 산자수 형질과의 연관성을 분석 하였다. 통계학적 분석은 first parity에 DIV 모돈의 AG 는 GG에 비해 1.805이상의 산자수가 높은 것을 확인 하였다 ( $p < 0.05$ ). Large white의 all parities는 GG 유전자형보다 AA 유전자형 보다 총 산자수 0.877 및 살아있는 돼지 0.780 더 높은 것을 확인하였고 ( $p < 0.05$ ), AG 유전자형과 비교하면 총 산자수가 AA 유전자형 돼지보다 0.780더 높은 것을 확인하였다 ( $p < 0.05$ ). 이러한 결과를 통해 NR4A1 유전자가 두 집단에서 산자수와 관련되어 있

음을 확인하였고, 돼지에 산자 수를 증가시키기 위한 유용한 마커로 사용될 가능성이 있다 (Liu LQ et al., 2011).

⑥ IGFBP3, COX2, IGFBP5

7개 SNP에 대해 (IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP5, CPT1A, COX2, SLC22A5, OCTN2) Finnish Yorkshire 280두와 Landrace 271두에서 PCR-RFLP 실험으로 유전자형 분석 후 번식 효율과의 영향을 분석 했다. Finnish Yorkshire 집단에서 4개의 SNP만 분석이 되었다. 요크셔 데이터에서 CPT1A, IGFBP3, IGFBP5 SNP 에서 분만 시간 및 분만 간격에 큰 영향을 확인 하였다. Landrace 집단에서 산자수 형질에 큰 영향을 미치는 6개 SNP를 확인하였다. 그중 COX2 유전자는 parities >1의 산자수에서 0.3 새끼 돼지 증대 효과를 확인하였다. 이러한 결과는 암태지의 번식 능력을 향상시키기 위한 마커로 사용될 수 있다 (Sironen AI et al., 2010).

→ IGFBP3 - c.114 A>G (intron2), COX2 - c.172 A>G (intron9), IGFBP5 - c.107 C>A (intron2)

(나) 프로테오믹스결과로 얻은 단백체를 암호화 하는 유전자의 SNP탐색

2차년도에서는 산자수에 따른 차등 발현 단백질을 분석하기 위하여 태반 조직을 이용한 프로테오믹스 실험이 수행 되었다. 단백질을 암호화하는 유전자를 검색한 후 RNA-seq결과에서 확보한 SNP결과를 분석하여 산자수 선발을 위한 통합 유전체 마커를 선정 하였다 (Table 8).

Table 8. SNP of genes associated with litter size

Gene	Position	SNP	EFFECT	Amino Acid
PCYOX1L	157294159	c.86-1629G>A	intron_variant	c.86-1629G>A
	157294202	c.86-1586T>C	intron_variant	c.86-1586T>C
	157294790	c.86-998T>A	intron_variant	c.86-998T>A
	157294810	c.86-978T>C	intron_variant	c.86-978T>C
	157294826	c.86-962T>C	intron_variant	c.86-962T>C
	157295061	c.86-727A>G	intron_variant	c.86-727A>G
	157297075	c.293-875A>G	intron_variant	c.293-875A>G
	157303905	G>GC	intergenic_region	n.null_nullinsC
	157304121	C>T	intergenic_region	.
	157304158	G>A	intergenic_region	.
157304300	A>G	intergenic_region	.	
CAPNS1	40920578	c.*263A>T	3_prime_UTR_variant	.
	40920772	c.*457G>T	3_prime_UTR_variant	.
CNDP2	165547874	c.1359-4T>A	splice_region_variant& intron_variant	.
RAB2A	79258001	c.*814A>G	3_prime_UTR_variant	.
RBP4	114775286	c.156G>A	transcript	p.Gly52Gly
MAN2B1	66706929	c.76G>A	missense_variant	p.Gly26Ser

(다) RNA-seq을 통한 DEG 유전자의 SNP탐색

1차년도 RNA-seq을 통하여 태반에서 차등 발현 하는 DEG를 탐색하였다. 588개 유전자들이 탐지되었고 그 중 산자수에 연관이 있다고 알려진 유전자들을 기능에 따라 분석 한 결과 산자수가 높은 그룹에서 증가 하는 유전자 16개, 감소하는 유전자 113개로 확인 되었으며, 이들 DEG유전자들 중 유의하게 재현성이 검증 된 유전자들의 SNP를 탐색 하였다 (Table 9).

Table 9. SNP of genes associated with litter size

Gene	Position	SNP	EFFECT
EGR2	71511329	A>G	intergenic_region
	71511434	T>C	intergenic_region
	71512117	TGAATTCTG>T	intergenic_region
	71512836	A>AT	intergenic_region
	71512837	T>TA	intergenic_region
	71512951	C>T	intergenic_region
LIPG	108638792	c.36C>T	ENSSSCT00000023900
	108652815	c.735C>T	ENSSSCT00000023900

나. 병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종

(1) 연관불균형 및 유효집단 크기

○ 선행연구에서 수집된 버크셔 897두에 대한 SNPs자료(Illumina Porcine 62k SNP chips)와 경남과학기술대학교 융합유전체 연구팀에서 제공한 SNP 를 이용하여 연관불평형(LD)와 유효집단 크기를 추정하였다.

(가) 유효성검사 (Quality Control)

- ① 소수대립유전자빈도 1% 미만, SNP 결측률 10% 초과, 개체 중 결측률 10% 초과, HW 불평형 카이제곱검정 23.93 ( $p < 0.000001$ ), 성염색체, 위치정보 없는 SNPs는 제거
- ② 잔여 결측 유전자형은 EAGLE 프로그램을 이용하여 대체 (Imputation)



Table 1. 염색체별 단일염기다형성(SNP) 쌍의 수, 평균  $r^2$ , 인접 SNPs간  $r^2$

염색체	SNP쌍의 수	평균 $r^2$	인접 SNPs간 $r^2$
1	10,380,846	0.043	0.317
2	2,368,576	0.040	0.256
3	1,284,003	0.039	0.255
4	3,608,641	0.037	0.290
5	1,277,601	0.033	0.261
6	1,500,778	0.042	0.235
7	3,227,070	0.039	0.347
8	1,562,028	0.046	0.275
9	2,222,886	0.037	0.242
10	651,511	0.032	0.223
11	824,970	0.044	0.265
12	405,450	0.046	0.256
13	3,887,866	0.037	0.256
14	4,959,675	0.046	0.341
15	1,809,753	0.035	0.283
16	694,431	0.042	0.249
17	823,686	0.042	0.275
18	323,610	0.048	0.275
<b>합 계</b>	-	<b>0.041</b>	<b>0.282</b>

(나) 유효집단크기는 1~5세대에서 31두 현세대에서 25두로 추정됨

세대	유효집단크기
1 ~ 5	30.89
5 ~ 10	54.93
10 ~ 15	71.81
15 ~ 20	82.16
20 ~ 25	91.32
25 ~ 30	101.63
30 ~ 35	109.45
35 ~ 40	119.78
40 ~ 45	124.82
45 ~ 50	130.10

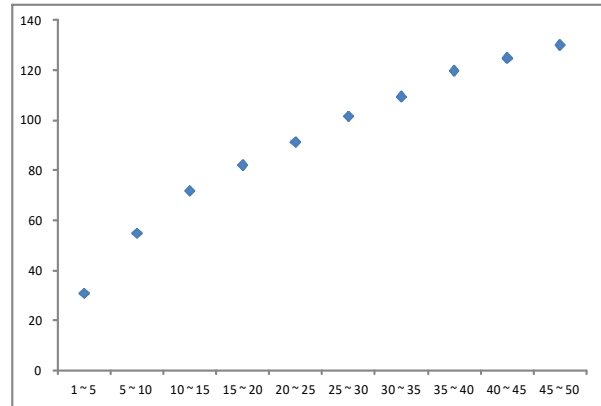


Fig. 1. 세대별 유효집단 크기

## (2) 경제형질별 유전모수 및 육종가 추정

(가) 모든 789두에 대한 번식기록, 총 3,560개를 수집한 후, 총산자수가 0이거나 missing인 자료는 삭제하였으며, 분석 이용된 자료는 총 3,078개였다. 평균 총산자수와 실산자수는 각각 8.58두와 7.61두였으며, Fig. 2에서와 같이 약간 왼쪽으로 치우친 정규분포 형태를 나타내고 있었다. 그리고 이유두수, 포유기간은 및 발정재귀일령은 각각 8.95두, 25.90일과 9.23일로 조사되었고 비정규 분포를 나타내고 있었다(Fig. 2). 번식형질에 대한 자료의 분포 및 특성은 Table 2에 제시하였다.

Table 2. 번식형질의 분포 및 특성

번식형질	기록수	평균	표준편차	최소값	최대값
총산자수 (두)					
실산자수 (두)	3,560	8.58	2.86	1.00	22.00
이유두수 (두)	3,545	7.61	2.52	1.00	17.00
포유기간 (일)	3,521	8.95	1.36	1.00	19.00
발정재귀일령 (일)	3,537	25.90	4.16	1.00	48.00
	3,097	9.23	13.29	1.00	173.00

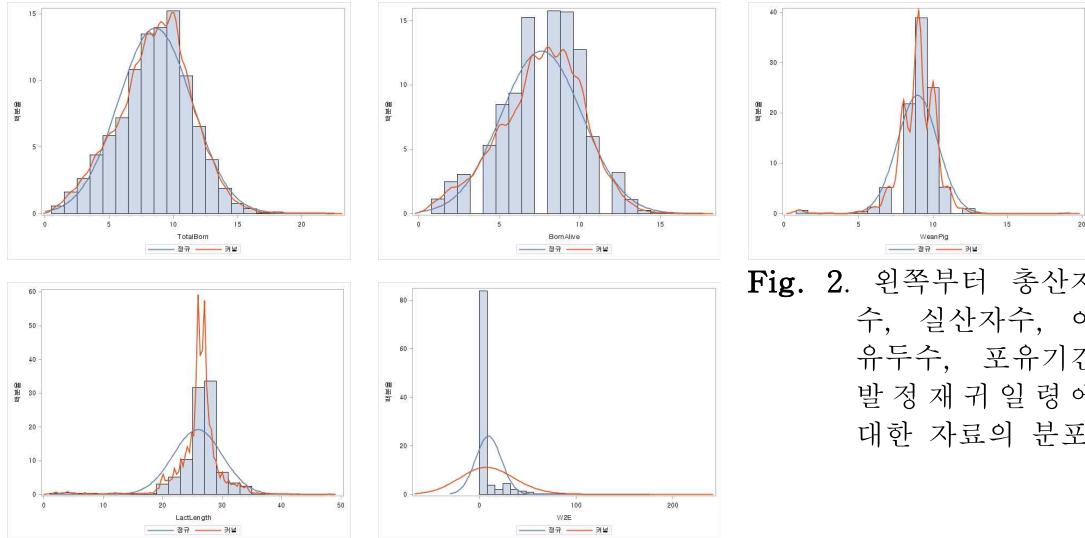


Fig. 2. 왼쪽부터 총산자수, 실산자수, 이유두수, 포유기간, 발정재귀일령에 대한 자료의 분포

(나) 유전모수 및 상관계수

- ① 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.074와 0.071로 총산자수가 실산자수에 비해 약간 높게 추정되었다. 이유두수와 포유기간과 발정재귀일령에 대한 유전력은 0.01~0.04로 낮게 추정되었으며, 산자수와 비교해 볼 때, 유전적 요인보다는 대부분이 환경적 요인에 기인한다고 할수 있다.

Table 3. 번식형질들에 대한 분산성분 및 유전모수

번식형질	$\sigma_a^2$	$\sigma_{pe}^2$	$\sigma_e^2$	$h^2$	$r$
총산자수 (두)	0.550	0.603	6.295	0.074	0.155
실산자수 (두)	0.413	0.584	4.794	0.071	0.172
이유두수 (두)	0.046	0.011	1.193	0.036	0.045
포유기간 (일)	0.279	0.020	6.409	0.042	0.045
발정재귀일령 (일)	1.223	20.307	117.609	0.009	0.155

- ② 총산자수와 실산자수간의 유전상관은 0.98로 매우 높았으며(표 3), 이러한 결과는 총산자수와 실산자수 중 하나의 형질만으로도 번식형질의 선발이 가능하다는 것을 의미한다.
- ③ 산자수형질들에 대한 이유두수, 포유기간 및 발정재귀일령의 표현형 상관계수는 거의 0에 가깝게 추정되어 이들간 상관성이 거의 존재하지 않은 것으로 나타났다.
- ④ 유전상관의 경우 발정재귀일령은 부(-)의 상관을 나타내었다. 표현형적으로는 산자수가 많으면 발정재귀일령은 길어진다는 의미이나 유전상관의 관점에서는 산자수가 많으면 발정재귀일령은 짧아지는 현상은 다산종돈만의 특성인지 심도 있는 분석이 필요하다고 하겠다.

Table 4. 번식형질들간의 유전(상삼각) 및 표현형 상관 (하삼각)

번식형질	1	2	3	4	5
1. 총산자수 (두)		0.98	0.12	0.06	-0.45
2. 실산자수 (두)	0.91		0.14	0.02	-0.35
3. 이유두수 (두)	0.03	0.04		0.24	-0.57
4. 포유기간 (일)	0.09	0.06	0.00		-0.78
5. 발정재귀일령 (일)	0.05	0.04	0.02	-0.02	

(다). 육종가 추정

① 번식형질들에 대한 1,015두의 육종가를 추정 한 후 이들 값을 표준화 하였다.

Table 5. 번식형질에 대한 육종가 및 표준화된 육종가 (개체=1,015두)

번식형질	육종가				표준화된 육종가			
	평균	표준편차	최소값	최대값	평균	표준편차	최소값	최대값
총산자수 (두)	0.03	0.37	-1.13	1.09	0	1	-3.09	2.84
실산자수 (두)	0.03	0.32	-0.91	1.02	0	1	-2.98	3.11
이유두수 (두)	-0.01	0.11	-0.38	0.39	0	1	-3.41	3.78
포유기간 (일)	-0.04	0.24	-0.85	0.73	0	1	-3.38	3.22
발정재귀일령 (일)	0.09	0.61	-1.50	2.01	0	1	-2.63	3.16

(라) 출생년도별 유전적 개량량

① 총산자수에 대한 출생년도별 유전적 개량량의 추세는 유의적인 수준( $p < 0.05$ )에서 나타나지 않았으며, Top 10% 개체의 육종가를 이용한 경우도 같은 결과였다.

Table 6. 총산자수에 대한 출생년도별 평균 육종가

출생년도	모든개체	Top 10%
2006	0.213	0.760
2007	0.140	0.664
2008	0.132	0.671
2009	-0.120	0.580
2010	-0.106	0.794
2011	0.042	0.721
2012	0.121	0.676
2013	0.051	0.683
2014	0.059	-

② 총산자수에 대하여 Top 30% 이하는 High group, Top 70% 이상은 Low group, 나머지는 Mid group로 분류하여 유전적 개량량을 추정하였으나 유의적인 수준( $p < 0.05$ )에서 개량량의 추세는 나타나지 않았다.

Table 6. 총산자수에 대한 출생년도별 그룹별 평균 육종가

출생년도	High	Mid	Low
2006	0.554	0.066	-0.250
2007	0.462	0.072	-0.330
2008	0.474	0.089	-0.380
2009	0.444	0.040	-0.446
2010	0.546	0.068	-0.535
2011	0.524	0.039	-0.425
2012	0.506	0.080	-0.441
2013	0.468	0.043	-0.448
2014	0.417	0.097	-0.305

### (3) 선발지수 산출

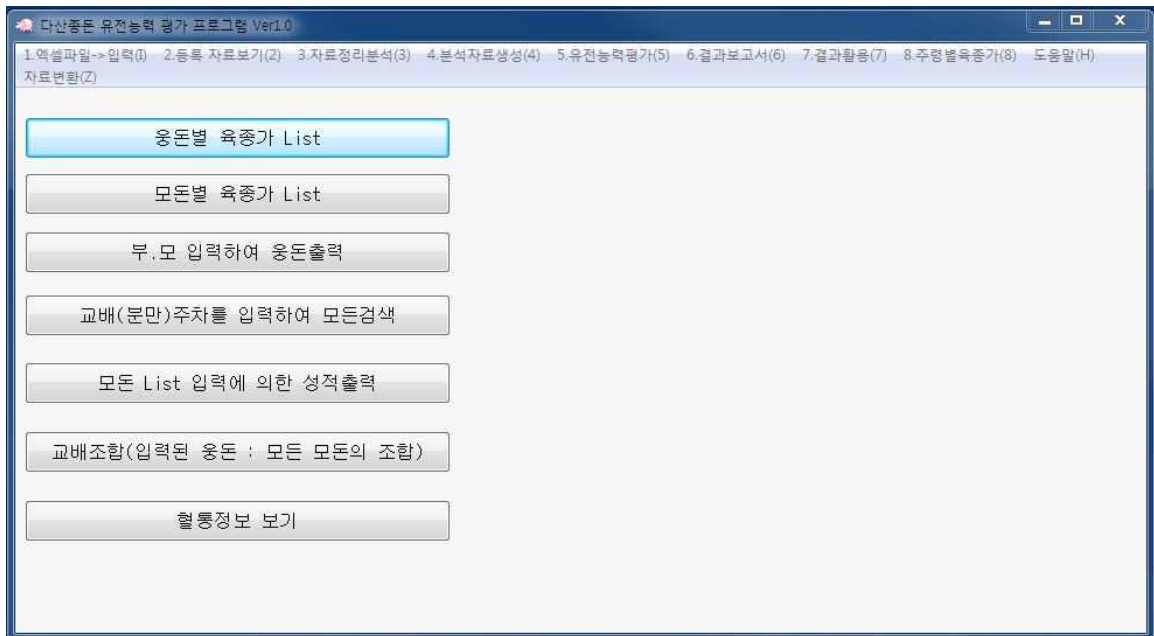
(가) 육종가를 표준화(평균=0, 표준편차=1)한 후 선발지수식 산출 (모든 6마리 표출 예)

$$\text{① 선발지수} = \text{총산자수} \times 60 + \text{포유두수} \times 20 - \text{발정재귀일령} \times 20$$

ID	육종가			표준화된 육종가			선발지수	순위
	총산자수	이유두수	발정재귀일	총산자수	이유두수	발정재귀일		
BN4619	1.06	0.23	-1.26	2.76	2.29	-2.23	255.80	1
BP8297	0.70	0.32	-1.50	1.80	3.13	-2.63	222.86	2
BP8357	0.84	0.21	-1.18	2.17	2.10	-2.10	214.18	3
BP5671-1	0.88	0.19	-1.09	2.28	1.91	-1.95	213.89	4
BN4336	1.09	0.10	-0.56	2.84	1.07	-1.08	213.24	5
BP4608	0.73	0.22	-1.46	1.88	2.19	-2.56	207.65	6

### (4) 산업용 병합육종프로그램 개발

(가) 추가된 메뉴

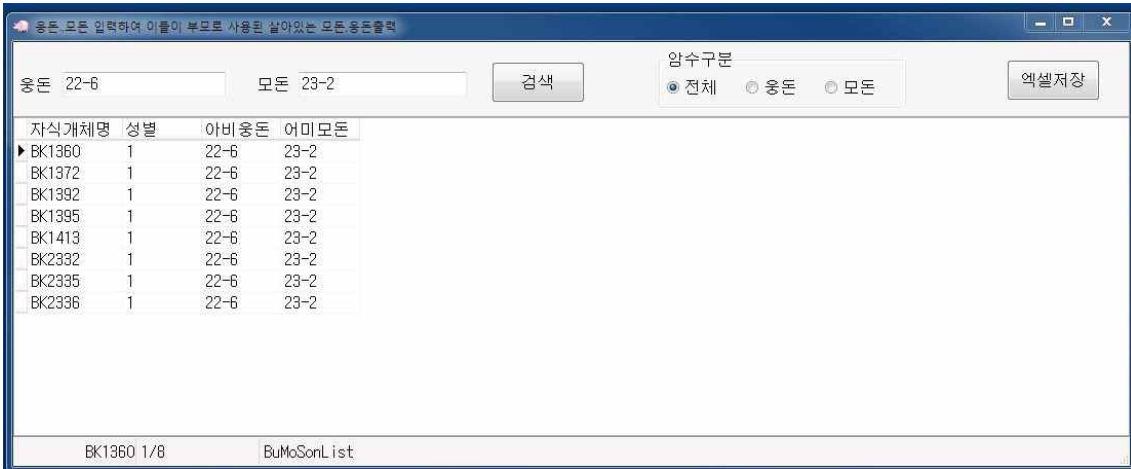


① 총산자수 순으로 웅돈 및 모돈 표시(전체, 생존 선택가능)

웅돈명	평균총산자	평균실산자	Record	육종가(총산자)	육종가(실산자)	근교계수	교배주차	상태	생존
BP6752			0	0.51	0.48	0.0469		ACT	L
B0123			0	0.42	0.45	0.0137		ACT	L
BP7285			0	0.4	0.38	0.0000		ACT	L
BP7217			0	0.35	0.35	0.0000		ACT	L
B01961			0	0.31	0.24	0.0722		ACT	L
BP4378			0	0.27	0.1	0.0000		ACT	L
B0551			0	0.21	0.26	0.0796		ACT	L
BP8692			0	0	0.15	0.0117		ACT	L
BP5085			0	-0.29	-0.07	0.0000		ACT	L

모돈명	평균총산자	평균실산자	Record	육종가(총산자)	육종가(실산자)	근교계수	교배주차	상태	생존
BP1882	13.33333	10.66667	3	1.71	1.13	0.0000	201327	REM	D
BP641	12.4	10.8	5	1.55	1.03	0.0000	201427	REM	D
BN4619	13	11	8	1.5	1.04	0.0000	201339	REM	D
BK3704	13.33333	9.66667	3	1.39	0.66	0.0000	201104	REM	D
BK6345	11.22222	9.77778	9	1.32	0.95	0.0000	201218	REM	D
BN4861	12.5	10.125	8	1.31	0.79	0.0000	201407	REM	D
BP1434	10.25	8.5	4	1.28	0.95	0.0156	201330	REM	D
BF3	12.14286	11.71429	7	1.28	1.28	0.0000	201206	REM	D
BK7877			0	1.27	0.74	0.0000		REM	D
BP6050	14	9	1	1.23	0.75	0.1328	201448	SERVED	L
BP2473	13	12	3	1.19	0.96	0.0625	201414	REM	D
BP4757	15	12	1	1.18	0.84	0.0332	201436	SERVED	L
BP590	9.6	8.6	5	1.14	0.68	0.0000	201349	REM	D

(나) 부돈, 모돈을 입력하여 자돈을 출력(암,수,전체 선택가능)

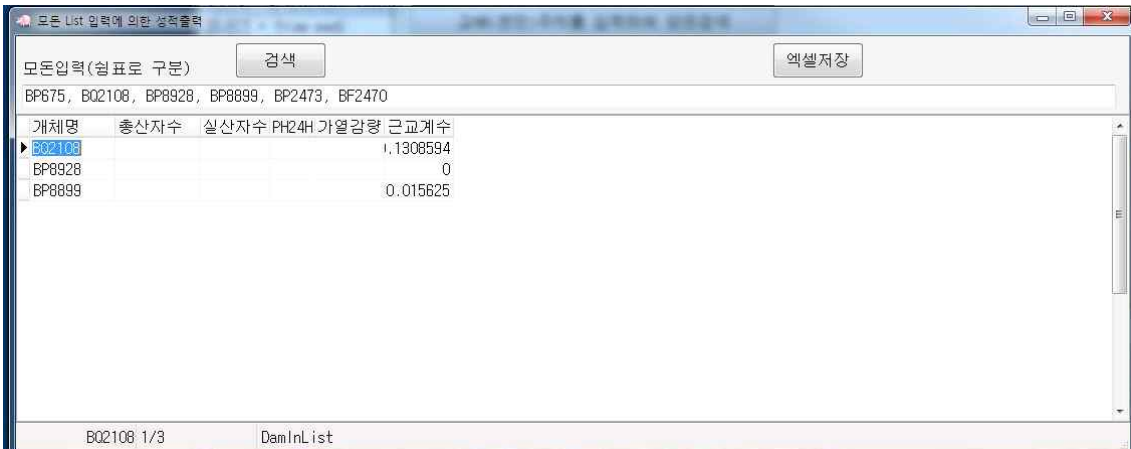


(다) 교배(분만)주차를 입력하여 모돈 검색(평균총산자 순서로)



(라) 모돈 List입력에 의한 성적출력

① 모돈을 입력하여(쉽표로 구분하여 여러마리 입력 가능) 성적을 출력한다



(마) 교배조합(입력된 웬돈 : 모든 모든의 조합)

① 용돈을 입력하여 모든 모돈과의 교배조합을 출력

용돈	모돈	총산자수	실산자수	PH24H	가열감량	근교계수
▶ 150	BP4757	15	12			0.019
150	BP6050	14	9			0.020
150	BP3840	14	9			0.020
150	BP1446	13	12	5.82	16.76	0.016
150	BN4336	13	11	5.89	17.56	0.078
150	BP5735	13	11			0.000
150	BP3403	12	10			0.000
150	BP3283	12	11			0.000
150	BP6449	12	5			0.039
150	BP6818	12	8			0.018
150	BN9728	12	10	6.03	15.56	0.014
150	BP2109	12	9			0.039
150	BP23	12	11	5.81	16.56	0.000
150	BP4041	12	11			0.000

(바) 상태와 교배주차를 입력하여 용돈을 출력

① 교배주차는 입력 또는 교배주차전체를 선택가능

② 프린트 인쇄도 가능,

후보돈	생일	교배주차	상태	기록수	평균총산자수	평균실산자수	총산자수능력	실산자수능력
BP5641	2012-10-05	201436	SERVED	2	10.50	10.50	0.56	0.62
BP923	2011-06-19	201449	SERVED	5	9.60	8.20	0.56	0.57
BP7595	2013-03-23	201443	SERVED	0			0.56	0.48
BP8269	2013-05-25	201446	SERVED	0			0.56	0.47
BP8461	2013-06-06	201439	SERVED	0			0.55	0.58
BP7445	2013-03-16	201439	SERVED	0			0.55	0.47
BP23	2011-03-31	201439	SERVED	4	11.50	10.75	0.54	0.65
B03617	2014-06-13		SERVED	0			0.54	0.40
BP5581	2012-09-30	201448	SERVED	1	9.00	7.00	0.53	0.37
BP4017	2012-05-07	201438	SERVED	3	10.67	9.00	0.53	0.31
▶ BP6184	2012-11-24	201449	SERVED	1	6.00	6.00	0.52	0.59
BP733	2011-06-03	201436	SERVED	5	11.00	10.40	0.52	0.51
B03483	2014-06-06		SERVED	0			0.52	0.50
BP3901	2012-04-28	201434	SERVED	2	10.50	8.50	0.50	0.42
B01671	2014-02-08	201444	SERVED	0			0.49	0.45
BP7450	2013-03-15	201442	SERVED	1	10.00	9.00	0.49	0.40
BP7523	2013-03-20	201449	SERVED	0			0.48	0.35
BP4619	2012-06-25	201443	SERVED	1	10.00	10.00	0.48	0.33
BP7156	2013-02-20	201438	SERVED	1	10.00	7.00	0.47	0.32
BP6446	2012-12-22	201440	SERVED	0			0.47	0.18
BP3188	2012-02-26	201438	SERVED	2	10.00	9.00	0.45	0.62

(사) 산자수에 대한 마커효과를 고려한 선발

① MAS(marker assisted selection) 이용한 선발기법

$$y = Xb + Zu + Zp + ZQq + e$$



위에서,  $y$  = 표현형의 기록의 벡터,  $X$  = 고정효과와 관련된 디자인 행렬,  $b$  = 고정효과  
의 벡터

$Z$  = 랜덤효과의 디자인 행렬,  $u$  = 상가적 유전자들의 랜덤효과 벡터,  $p$  = 영구환경효과  
의 벡터

$Q$  = 표지인자에 대한 디자인 행렬,  $q$  = 표지인자의 효과,  $e$  = 랜덤오차 벡터.

② 마커들에 대한 개체들의 유전자형들을 입력하고 유전자형들을 0, 1, 2로 수치변환 후  
모형에 추가하여 효과값(각 마커들에 대한 회귀계수) 추정. 만약 마커가 한개일 때,

$$\text{총 육종가} = BV + \text{유전자형} \times \text{회귀계수}$$

③ 마커효과(회귀계수)가 0.1일 때,

$$\text{Fig1} : 0.6 \text{ (BV) 유전자형(CC;0) } \text{TEBV} = 0.6 + 0 \times 0.1 = 0.6$$

$$\text{Fig2} : 0.4 \text{ (BV) 유전자형(CT;1) } \text{TEBV} = 0.4 + 1 \times 0.1 = 0.5$$

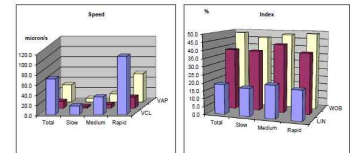
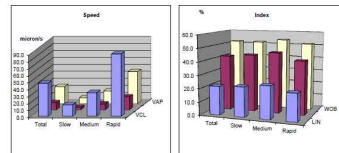
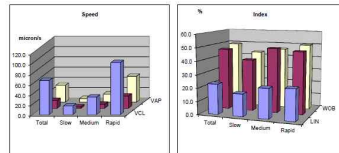
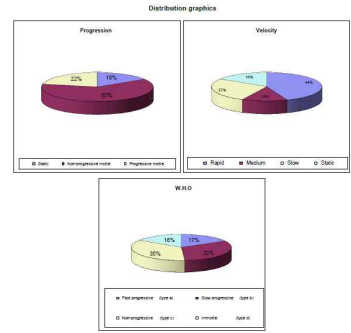
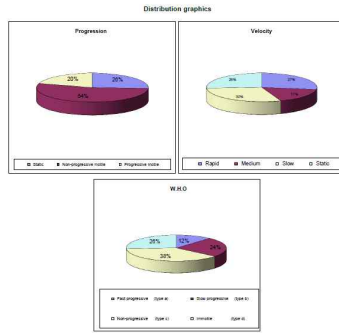
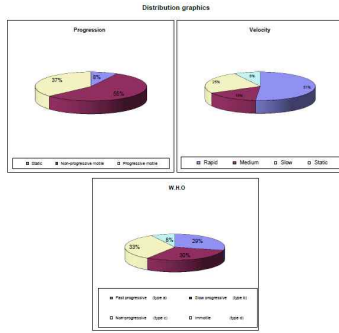
$$\text{Fig3} : 0.2 \text{ (BV) 유전자형(TT;2) } \text{TEBV} = 0.2 + 2 \times 0.1 = 0.4$$

④ 마커가 대립유전자 아니고 MS인 경우 Class variable로 모형에 삽입 후 효과 추정

## (5) 정액 성상검사

(가) 웅돈 10두에 대한 정액 검사 실시

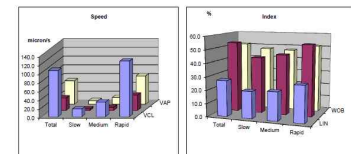
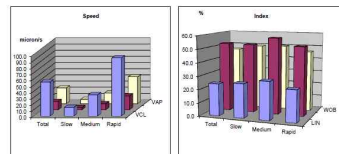
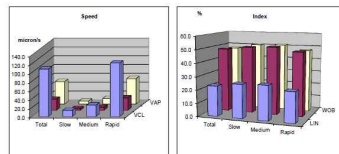
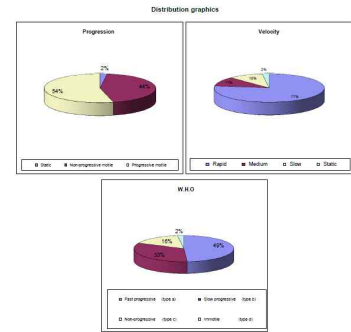
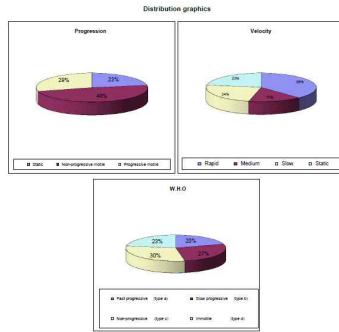
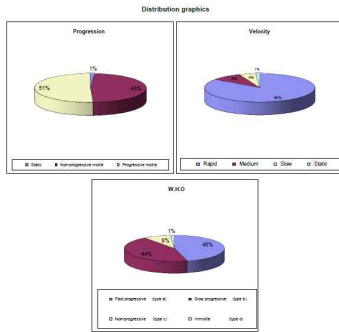
이표	측정 (2015년)	01.14	01.15	01.16	01.19	01.20	NA배지	육안관찰
		1일차	2일차	3일차	6일차	7일차	균 배양	
BP 8692	pH	6.70	6.63	6.66	6.60	6.65	X	정자수 많음 활발
	삼투압	274	271	270	270	275		
BQ 551	pH	6.74	6.63	6.63	6.55	6.46	X	정자수 많음 보통
	삼투압	278	273	275	273	272		
BQ 1961	pH	6.80	6.76	6.72	6.58	6.60	X	정자수 많음 보통
	삼투압	275	272	272	271	274		
L 2774	pH	6.67	6.70	6.61	6.54	6.56	X	정자수 많음 활발
	삼투압	273	271	271	270	274		
BP 4378	pH	6.79	6.81	6.79	6.76	6.81	X	적자수 적음 느림
	삼투압	271	266	267	266	271		
BP 5085	pH	6.73	6.76	6.70	6.65	6.73	X	정자수 적음 보통
	삼투압	274	272	270	271	272		
BP 7217	pH	6.74	6.71	6.62	6.51	6.51	X	정자수 많음 활발
	삼투압	269	267	272	268	270		
LA 7952	pH	6.85	6.88	6.82	6.76	6.82	X	정자수 적음 보통
	삼투압	275	273	278	273	272		
L 2770	pH	6.86	6.85	6.84	6.83	6.84	X	정자수 적음 느림
	삼투압	272	272	274	272	271		
BP 3438	pH	6.81	6.80	6.74	6.69	6.74	X	정자수 많음 활발
	삼투압	270	266	273	267	267		



BP 8692 (전진강함, 활동성강함)

BQ 551 (전진중간, 활동성중간)

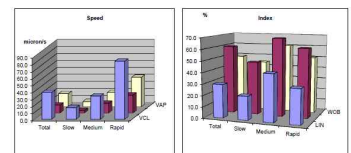
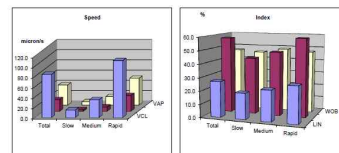
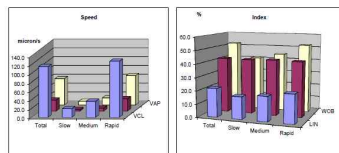
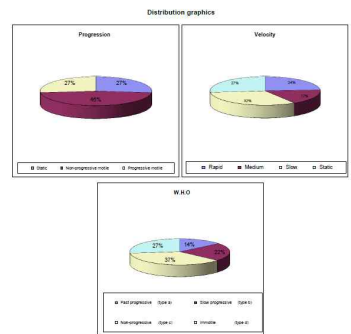
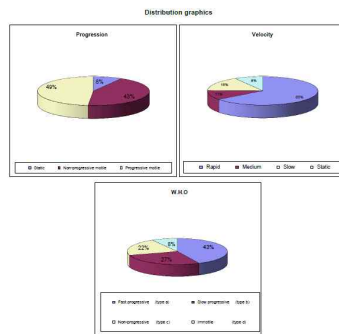
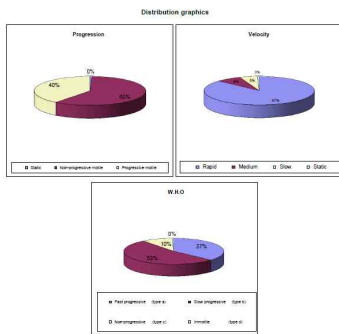
BQ 1961 (전진중간, 활동성중간)



L 2774 (전진우수, 활동성우수)

BP 4378 (전진중간, 활동성강함)

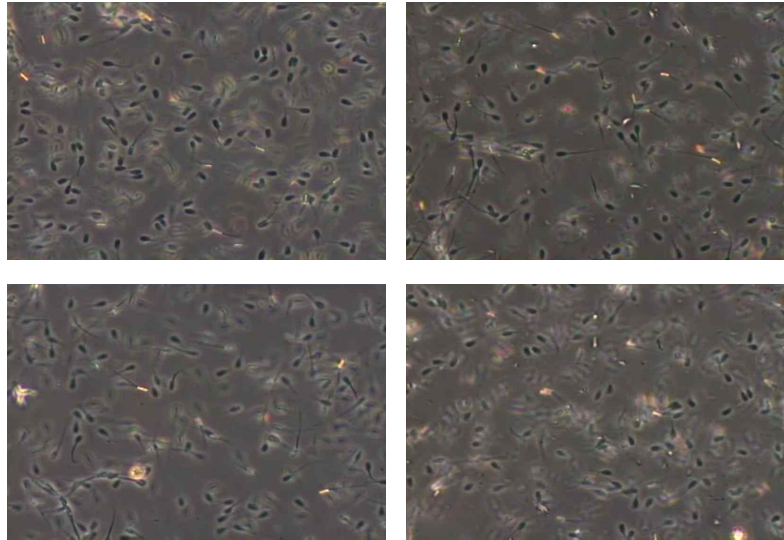
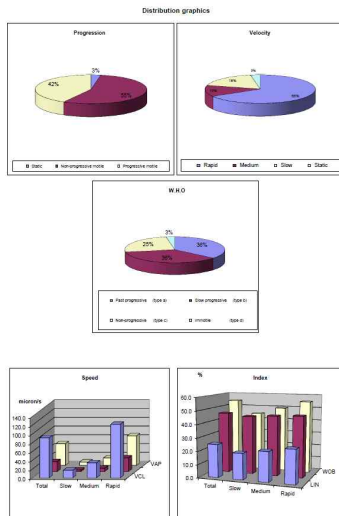
BP 5085 (전진우수, 활동성우수)



BP 7217 (전진강함, 활동성강함)

LA 7952 (전진우수, 활동성우수)

L 2770 (전진중간, 활동성중간)



BP 3438

< BP 8692개체의 4일차 5일차 6일차 9일차 육안검사 예시>  
5일차까지는 정자의 활력이 우수하며 인공수정에 사용하는데 무리가 없으나 6일차부터는 활력이 현저히 줄어드는 것을 볼 수 있다.

### 3. 3차 년도 연구 결과

#### 가. 융합 유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 조기 선발 기술 개발

##### (1) 태반 조직 유래 산자수 연관 DMR/DEG correlation 유전자의 재현성 검증

1차년도에 수행 하였던 차등 산자수를 가지는 두 그룹의 (산자수 high/low, high group: 평균 산자수 12두 이상 및 low group: 평균 산자수 7두 이하) 태반 조직으로부터 DMR/DEG 분석을 advance analysis를 수행 하여 산자수 연관 DMR과 DEG 즉, relroduction-related DMR (R-DMR) 과 reproduction-related DEG (R-DEG)를 분석함. 분석 조건은 아래와 같음 (Fig. 1)

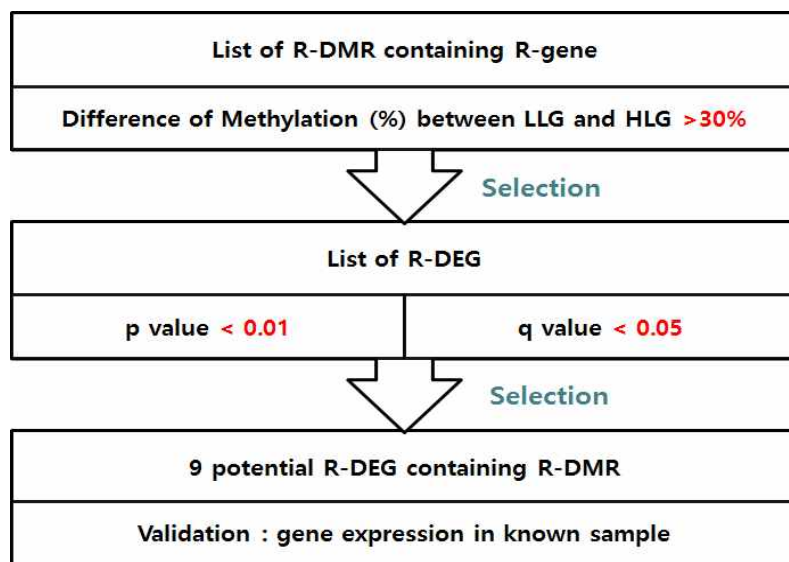


Figure 1. Analysis flowchart for R-DEG containing R-DMR

분석 결과 총 10개의 유전자에 대하여 R-DEG가 확인이 되었으며 이들 유전자의 genomic region에서 R-DMR이 확인이 되었음. R-DEG에 해당하는 유전자의 이름, 산자수가 높고 낮은 그룹에서의 발현량 및 fold change와 메틸화에 대한 차이는 아래 표와 같음.

**Table 1. List of R-DEG containing R-DMR**

Gene	Expression value in LLG	Expression value in HLG	Log2(fold change)	p-value	q-value	Methylation difference (HLG-LLG)
SLC6A19	100	0	-6.64	5.00X10 <sup>-7</sup>	1.61X10 <sup>-4</sup>	-53.3
EPS8L3	73.6	0	-6.19	1.81X10 <sup>-05</sup>	4.09X10 <sup>-3</sup>	-43
COL18A1	2040	126	-4.02	4.49X10 <sup>-17</sup>	7.1X10 <sup>-14</sup>	-40.7
ABP1	318	0	-8.31	9.97X10 <sup>-17</sup>	1.43X10 <sup>-13</sup>	-40.6
SLC45A4	1570	530	-1.57	2.56X10 <sup>-4</sup>	3.6X10 <sup>-2</sup>	-37.2
PRKG2	235	37.2	-2.66	9.52X10 <sup>-5</sup>	1.65X10 <sup>-2</sup>	-36.8
CLCA4	162	13.1	-3.63	1.95X10 <sup>-5</sup>	4.35X10 <sup>-3</sup>	-34.3
PCK1	156	14.1	-3.47	4.47X10 <sup>-5</sup>	8.51X10 <sup>-3</sup>	-33.1
F10	71.6	2.01	-5.16	3.03X10 <sup>-4</sup>	4.20X10 <sup>-2</sup>	32.8

일반적으로 DNA methylation의 효과로는 gene expression의 억제가 잘 알려져 있어서 DNA methylation-Gene expression 간의 관계는 negative correlation의 관계를 갖는 것으로 잘 알려져 있음. 하지만 본 연구의 결과로 DMR/DEG간의 correlation이 있는 유전자는 총 10개로 확인이 되었으며 그 중 9개 유전자가 DNA methylation이 감소하면서 동시에 Gene expression도 감소하는 positive correlation 관계에 있는 것으로 확인이 되었음. 최근 여러 권위 있는 학술지에 gene body 영역에서의 DNA methylation은 mRNA의 발현을 억제 한다 기 보다 오히려 증가 시킨다고 보고되고 있어 많은 과학자들에 의해 DNA methylation과 Gene expression 사이의 positive correlation의 역할 및 관계에 대해서 주목 받고 있고 본 돼지 유전체의 결과 역시 비슷한 패턴이 확인됨 (Fig. 2).

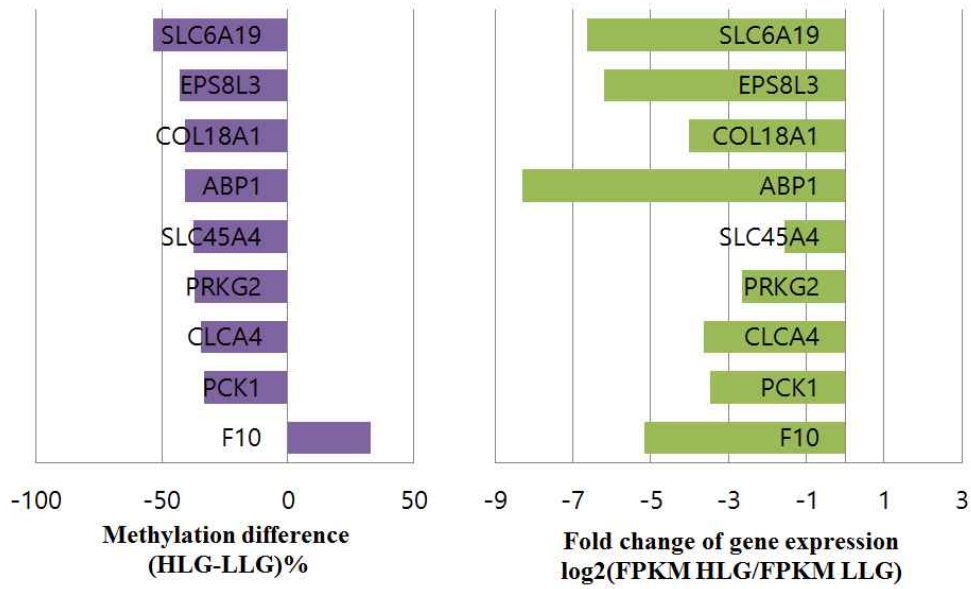


Figure 2. R-DEG positively correlated with R-DMR

R-DEG 중 9개 유전자에 대해서 아래 표와 같은 프라이머 서열로 (Table 2) RT-PCR 및 RT-qPCR을 통해 재현성 검정을 수행 한 결과

Table 2. list of primer sequence for R-DEG

No.	Gene name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size (bp)
1	COL18A1	CTTCTCGCTGGTTCTTCT	AGCCGGCCCAATGAACAC	196
2	ABP1	AATTTCTACGCGGGGCTCAA	GGTCGACGCGGTAATTCAC	241
3	SLC45A4	CCTACAACCTCGGGCGTGAA	CTTGATGTCGTGGTACTGGC	281
4	PRKG2	GGTTCGTAACCCAAACA	CACCACATCCTGAAGCTTGTT	249
5	CLCA4	TGCTATAGACCCTGCTGTGC	TGCAACAATGATATCAGCGT	211
6	PCK1	TCCGACCTTCTTGACCATC	GCCTCTTGATGACACCCTCT	283
7	SLC6A19	ATCCATCCGGCGCTGAAG	TCGCGGTACCAGAAGTAGTC	218
8	EPS8L3	TGGATCACAGGACCTCTACC	ATGACGCCCTAGAACCCTAAA	153
9	F10	CAAGTCCTGCATCTCCACAG	CACTATCCGGACCAGGCTG	226

PCK1과 PRKG2 두개의 유전자에 대하여 재현성이 확인되었음 (Fig. 3). 특히나 PCK1 유전자는 bioinformatics 결과에서 보다 재현성 실험에서 fold change에 대한 민감도가 월등히 높은 것으로 보여짐.

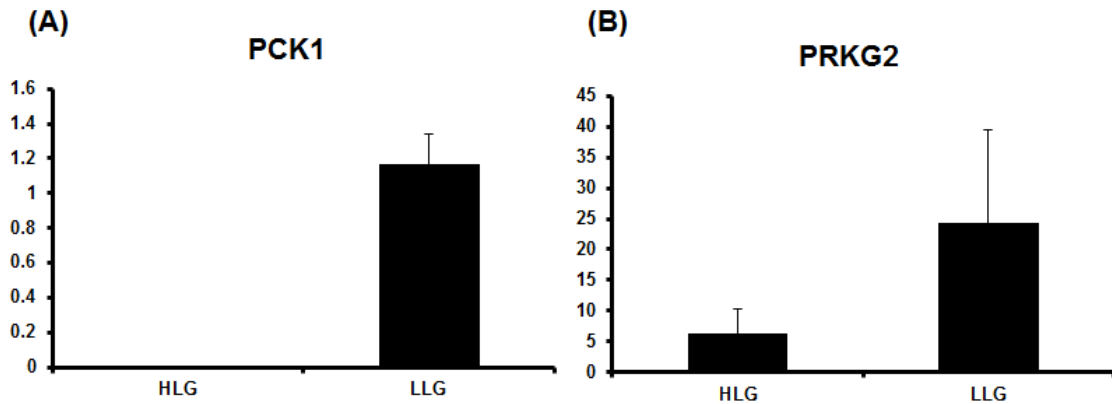


Figure 3. mRNA expression of R-DEG (PCK1 and PRKG2)

(2) 태반 조직 유래 산자수 연관 DEG의 태반 내에서의 분자 유전학적 기능을 규명

2차년도에 분석한 RNA-Seq 분석 결과로 산자수 연관 차등 발현 전사체에 대한 재현성 검증 및 전사체들 간의 상호 관계에 대한 분석을 하였음 3차년도에서는 이에 대한 후속 연구로서 산자수 연관 차등 전사체들의 발현이 어떠한 메커니즘에 의해 조절 될 것인지에 대한 분석을 수행하였음. Bioinformatics 결과 및 RT-qPCR을 통한 재현성 검증 실험 결과를 Fig. 4에서 제시함. EGR2와 PHEROC 및 LIPG 세가지 유전자를 대표적으로 RT-qPCR에 의해서 재현성을 확보 하였고 세가지 유전자 모두 validation 결과가 민감한 것으로 확인이 됨.

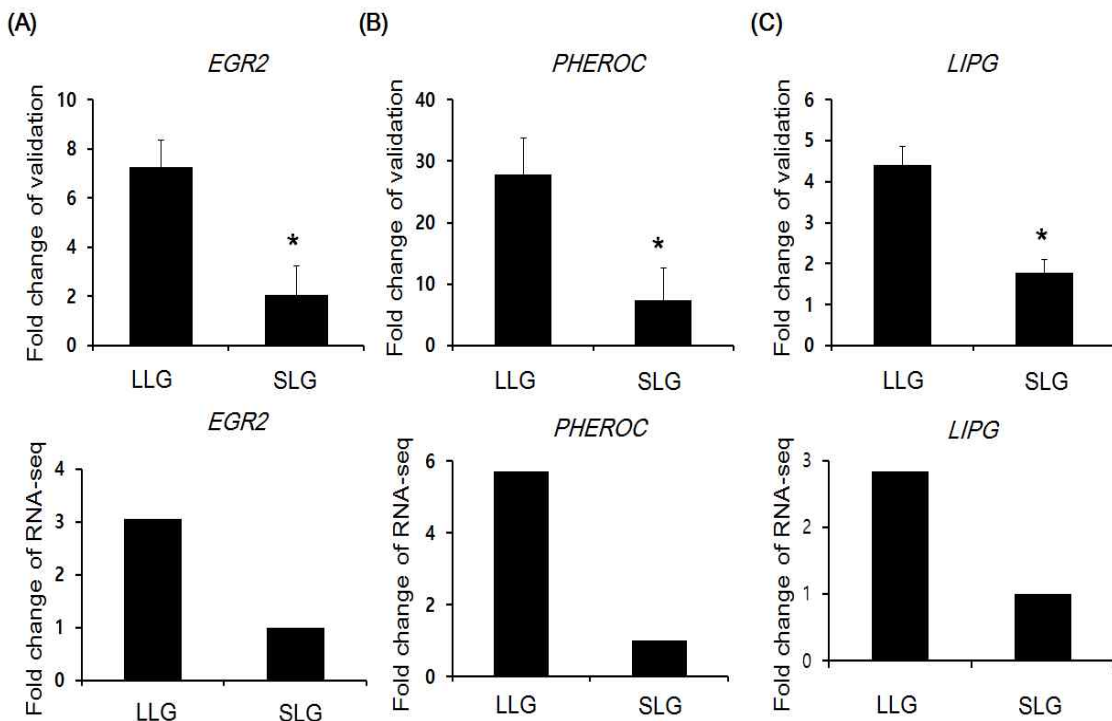
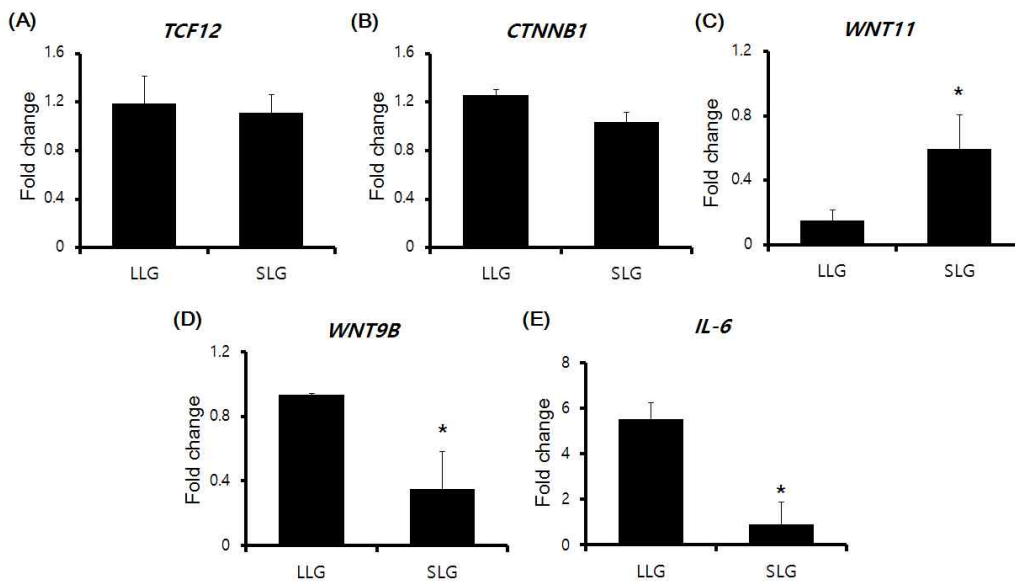


Figure 4. RT-qPCR and fold change of RNA-Seq

이번 3차년도에서는 이들 차등 발현 전사체 중 EGR2와 LIPG의 발현이 산자수가 높은 돼지

의 태반에서 증가 한다는 것을 확인 하고 이 두 개의 유전자가 태반에서 하는 역할과 어떤 신호 전달에 의해서 발현이 촉진 되었는지 그 메커니즘을 밝힘. 먼저 EGR2는 Early growth response2의 약자로 DNA에 결합하는 전사 조절 인자로서 E3 SUMO ligase의 기능을 가짐. 선행 연구로부터 glucocorticoid등에 의해서 발현이 억제 되는 반면 Wnt signaling에 의해서 발현이 촉진 되는 것이 밝혀져 있었으며 또한 Wnt 신호 전달은 trophoblasts와 태반의 분화와 발달에 굉장히 큰 역할을 하는 것으로 보고된 바 있음. 이에 본 과제를 수행 하는 연구자들은 Wnt 세포 신호 전달 체계에 관련이 있는 유전자들 예를 들어 TCF,beta-catenin과 같은 전사 조절인자나 다양한 Wnt ligand들의 subfamily들의 발현을 산자수 high와 low그룹에서 조사하였음. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 Wnt9B 유전자의 발현양이 산자수가 많은 그룹에서 증가 하는 것으로 확인하여 산자수가 많은 돼지의 태반에서 Wnt9B의 발현 증가가 EGR2의 발현 촉진을 유도 하여 Wnt 세포 신호전달에 의한 태반의 분화 및 발달을 촉진 시켜 산자수를 높게 결정 할 것으로 예상 할 수 있음 (Fig. 5). 위의 산자수에 따른 차등 발현 전사체를 이용한 연구 결과와 차등 발현 전사체들 간의 역할 및 메커니즘을 연구 하여 Plos one 저널에 게재하였음.



**Figure 5. mRNA expression of candidate upstream signaling molecules**

또한 LIPG유전자의 경우 내피의 리파아제를 말하며 (endothelial lipase) 이는 triglycerides, fats, oils 등의 지질을 소화하고 전달 하는데 아주 중요한 역할을 하는 유전자이며 이전 보고에서 IL-6, leptin, TNF $\alpha$ , CRP등에 의해서 발현과 활성이 촉진 되고 반대로 adiponectin에 의해서는 억제 되는 것이 알려져 있음. 본 연구에서 이들 후보 유전자들의 발현을 확인해본 결과 IL-6가 산자수가 많은 돼지의 태반에서 발현이 증가 되어 있었으며 TNF $\alpha$ 등은 차이가 없는 것으로 결론을 내릴 수 있었음. 또한 다른 염증 유발 사이토카인들을 확인해 본 결과 IL-1b 유전자의 발현 역시 산자수가 많은 돼지의 태반 조직에서 증가 되어 있음을 확인 함. 결론적으로 산자수가 많은 돼지의 태반에서 염증 유발 사이토카인 중 IL-1b 와 IL-6 등이 발현이 증가됨



으로써 LIPG의 발현을 증가 시키고 이로서 지질 대사를 활발하게 하며 태아가 모체로부터 받을 수 있는 영양분의 수송이 유용하게 되어 산자수가 증진 될 것이라는 결론을 내릴 수 있음 (Fig. 5).

위와 같은 산자수 연관 차등 전사체의 돼지 태반 내에서 기능에 대한 예측을 다음과 같이 요약 할 수 있음 (Fig. 6)

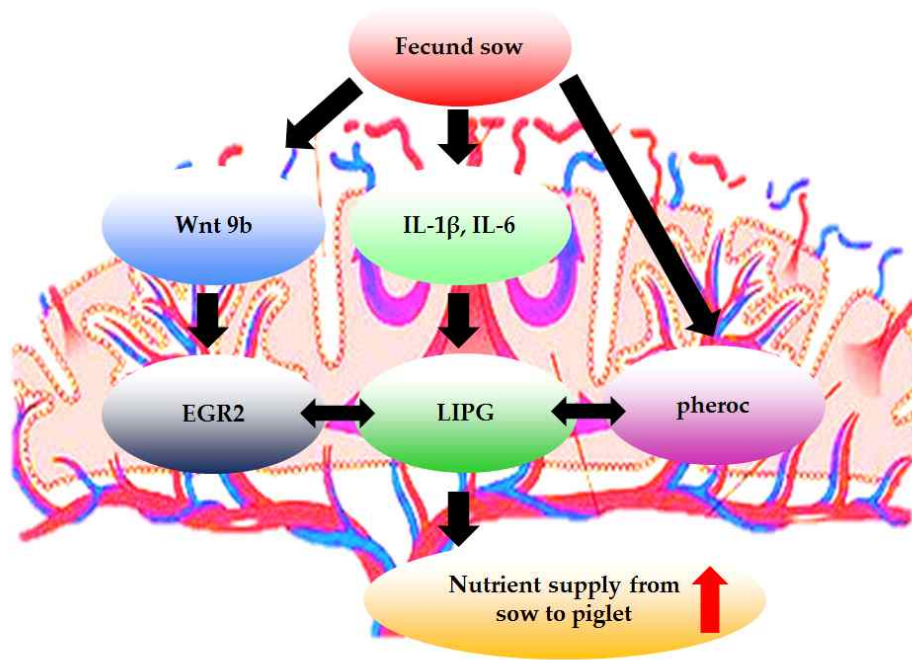


Figure 6 signaling pathways in the placenta of fecund sows

### (3) 자궁 조직 유래 DMR/DEG correlation 유전체에 대한 재현성 검증

산자수 상 하위 그룹의 자궁 내막 조직에서 RNA 및 DNA를 분리하여 RNA-Seq와 Whole Genome Bisulfite Seq (WGBS)을 수행 하여 DNA methylation과 Gene expression상의 상관관계를 분석하였음. 현재까지 유전자의 발현을 조절 하는 프로모터 영역에서의 메틸레이션이 Gene expression에 긴밀한 영향력을 미친다고 보고되어 있기 때문에 본 연구자들은 프로모터 영역에서 차등 메틸화가 관찰 되는 유전자들 중에서 전사체의 발현량이 차이나는 유전자들을 우선 선별하였음. HTR2A, GPRASP1, ARHGEF37, ARHGEF37, CPXM2, VTCN1, SYT13, CREG1 및 TFF2 의 8개의 유전자가 프로모터 상의 methylation수준과 mRNA의 발현량 사이에 negative correlation을 가지는 것으로 확인되었음 (Fig. 7). 8개 유전자의 발현량을 확인 하기 위한 프라이머 서열은 다음과 같음 (Table 3). 이들 8개 유전자 중 HTR2A, VTCN, SYT13, CREG1, 및 TFF2 유전자에 대해서 RT-qPCR에 의한 재현성이 검증되었음 (Fig. 8). 먼저 TFF2 유전자는 trefoild motif를 최소한 하나라도 가지는 단백질이며 상피 조직에서 안정화 된 상태로 분비 되는 단백질임. 기능은 자세히 밝혀지지 않았지만 mucus 층을 안정화 시켜

서 상피 세포를 보호 하거나 재생 할 때 중요한 역할을 할 것으로 예상 되며 또한 TFF2는 혈장 내에 임신 기간 동안 높은 수준으로 측정 되며 또한 재대혈에서도 높은 양이 관찰됨. 산자수가 높은 그룹의 자궁 조직에서 TFF2의 발현이 증가 되어 있음을 확인 하였고 이는 TFF2 유전자가 아마도 자궁 내막에서 태아의 착상이나 성장에 중요한 역할을 할 것으로 사료됨. VTCN1 유전자는 V-set domain containing T cell activation inhibitor 1으로서 B7 (H4) costimulatory 단백질에 속하며 antigen-presenting cell의 표면에서 발현하여 T-cell의 표면과 receptor-ligand 결합을 하는 것으로 알려져 있음.

VTCN1의 발현은 임신 초기에 CD1c(+) myeloid 세포에서 증가 하여 초기 면역 조절 작용에 큰 역할을 할 것으로 사료됨. VTCN1유전자의 발현은 산자수가 높은 그룹의 자궁 조직에서 증가 하는 것으로 확인 되어 임신 초기 단계에서 태아 착상 및 유지에 중요한 역할을 할 것으로 여겨짐. CREG1 유전자는 cellular repressor of E1A-stimulated genes1로 아데노 바이러스 E1A 단백질에 대해서 전사 활성을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져짐. 세포 성장이나 분화에 전사 조절 기능을 하며 임신 중기에 태반에서 발현이 증가 하는 것으로 보고됨. 아직까지는 자궁에서는 그 기능이 연구된 바가 없지만 산자수가 많은 그룹의 자궁 조직에서 발현량이 감소되는 패턴으로 보아 CREG1의 발현이 감소해야지만 태아가 자궁에서 잘 자라거나 발달 할 수 있을 것으로 예상됨. SYT13 유전자는 synaptotagmin13으로 synaptotagmin은 pre-synaptic 엑손 말단의 막에 존재 하며 homo나 hetero의 이분자체 결합분자임. 현재까지 연구 보고는 뇌 신경생물학에서의 SYT 유전자의 기능에 집중 되어져 왔기 때문에 자궁에서의 역할에 대해서 유추해 볼 수 있는 근거는 없지만 생쥐의 정자 머리부분에서 Synaptotagmin이 위치하여 수정 될 때 exocytosis에서 유용한 역할을 한다고 알려져 있음. exocytosis가 번식에서 하는 역할을 고찰 해 볼 때 태반에서 엑소솜의 역할, 정자와 난자의 결합, 임신 기간 내에 인슐린 분비 등이 있을 수 있는데 SYT13 유전자의 발현량을 살펴보면 산자수가 높은 자궁 조직에서 발현량이 증가 되어 있는 것을 확인 할 수 있고 게다가 산자수가 많은 그룹과 적은 그룹에서의 발현의 fold change 차이가 극명하게 차이가 나는 것을 확인 할 수 있음. 이에 따라 산자수가 많은 그룹의 자궁 내에서 SYT13 유전자의 발현은 수정과 착상 유지 등에 필요한 exocytosis 역할을 충실 하게 해 내어 산자수가 증가 되는데 기여 한다고 유추 할 수 있음 (Fig. 8).

Table 3. primer sequence used the validation of DEG by RT-qPCR

Gene name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size (bp)
HTR2A	CCATCCAGAACCCCATCCAT	ATCATCCGCAAGTAAGCAGC	170
GPRASP1	AAGGAGGAAGTGTCTGGCTC	CAATTCCAACAGCGCCAGAG	202
ARHGEF37	TGTCATCAAGGTGAACAGCAG	CAAGGCCTGTTCGTAGCTG	157
CPXM2	CGGAGAAGGCCAAGGTTTAG	GTGGAGCTGGAAGTCTGTGA	172
VTCN1	CGTGCTCTACAACGTCACAA	GACAGAGAGGCAGGAGTACC	194
SYT13	GGACTATGACCGGCAAAGG	CCTCAGGGTCAGTGTGAGG	235
CREG1	TGCAGCAATCAGTAGGCAAC	GGCCAGGTTTTTCATCTCAGG	217
TFF2	CTGGCCATCCTCCTCCTG	GACGCACTCCTCAGACTCTT	222

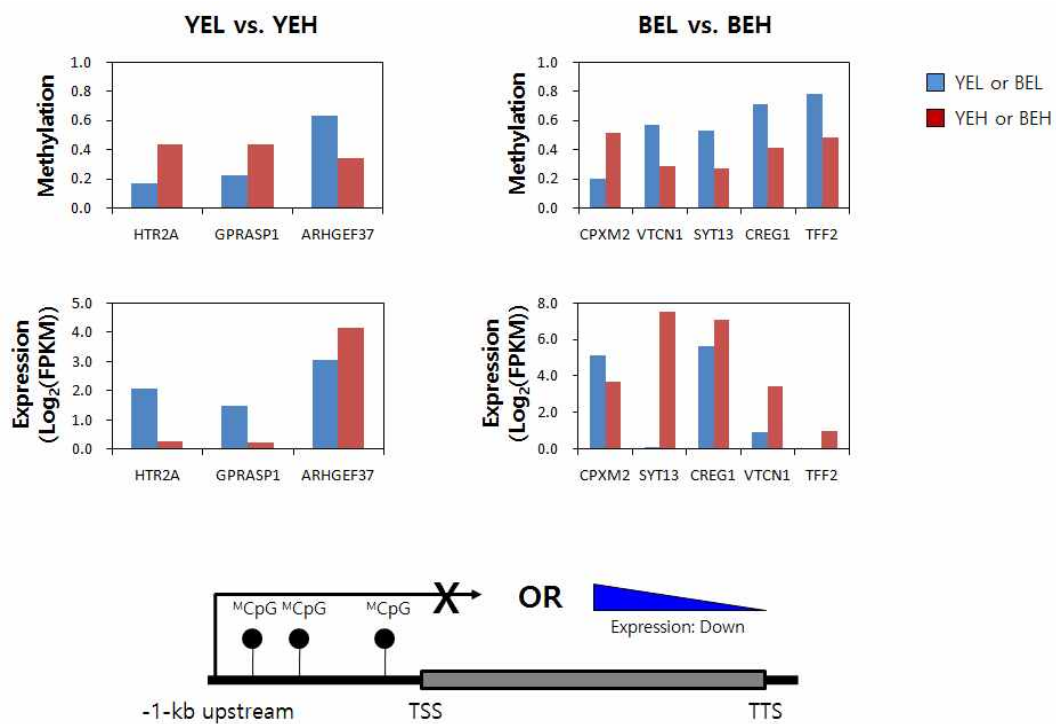


Figure 7 DEGs with promoter-related DMR

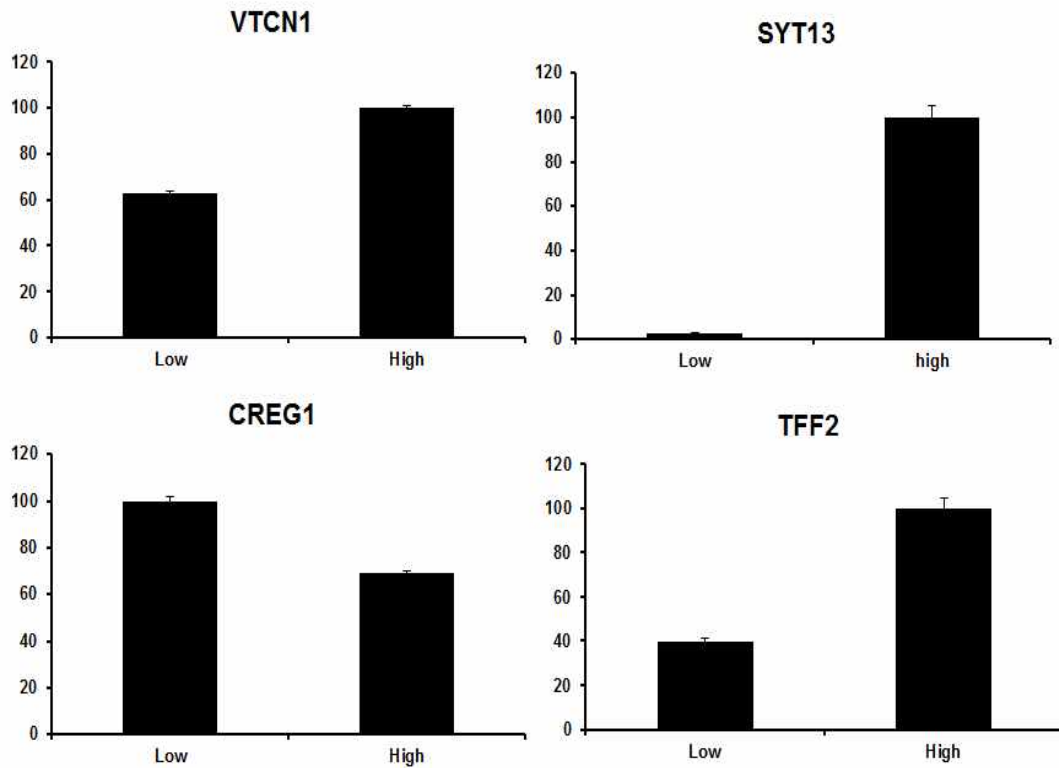


Figure 8 The validation of DEGs by RT-qPCR

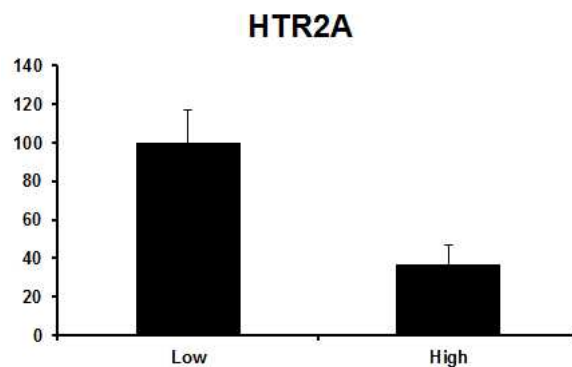


Figure 8 The validation of DEGs by RT-qPCR

후속 연구로서 SYT13 의 유전자의 기능을 확인하고 차등 발현이 subfamily 중 SYT13에만 국한 되는 것인지 또한 자궁에서 발현이 증가 되어 있는 양상이 다른 조직에서 SYT13의 발현을 확인 해 보았을 때와 어떤 차이가 나는지를 확인함. SYT의 subfamily는 돼지에서 16개가 확인되었음. 본 연구에서 이용한 SYT 유전자의 확인용 프라이머 서열은 다음과 같음 (Table 4).

Table 4. primer sequences of SYT subfamily

No.	Gene name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size (bp)
1	SYT1	AACCAAAAATGGTGAGCGAG	CTATGGCAATTAAGGCCAC	201
2	SYT2	TCTGCAAGAAGTGCTGCTGTA	GACGTAAGGGTCCGAGGTG	290
3	SYT3	ACCATGTCAGGCGACTACG	CAGAAGGACAATGCCACAGA	210
4	SYT4	CTCCTGGTCTGGTAGCCTTG	GGCACAGGTCCGATCACTAT	246
5	SYT5	GAAAGAACC GTAAGACCCTGC	GTCTATGTA ACTCCGGCCCA	274
6	SYT6	GTCTTCGACTTTGACCGCTT	TGGATCTGAGTAGCCCGTGA	252
7	SYT7	GATGGTGGTGCTATCCTTGG	CTGGTGAGGGAGTTGACGAG	237
8	SYT8	CAGGAAGCACAGGCATCA	CCTCCAGGTATCCACATCG	208
9	SYT9	CCTGTTCTCGGGTAGCAAAG	TTGAGCTGTCTTCGGATTGA	267
10	SYT10	GCCTGCAATAAAAATCAGCC	CTTCTTCCTGTTGCCCTCA	299
11	SYT11	GCCCCAGATCCTTATGTCAA	CTCGCAGACCTCTCCAGT	270
12	SYT12	AGTATGGCGAGACCTACGCA	TCACGGAGGAGATGGAGTTC	237
13	SYT13	CGACCCTGACACTGACCCT	CGGGAGGTAGCTGATGATA	188
14	SYT14	TTGGATTTTTGTCAGCCGTT	CATGGAATGGTGTGTTCTGG	254
15	SYT15	AGAGGCTTCGTGCCTTGTT	CCAGTCTCGGCTTTGGATAG	161
16	SYT16	CCTGGCAAGTTCATGTCGT	TGGCTCAGATAGAACAGCCC	214
17	SYT17	GCTACACCTTCGAGATCCCC	CTGAACCTTGGCTGACATCT	297

SYT subfamily member (SYT1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17) 유전자에 대해서 산자수가 많고 적은 두 그룹에서 채취한 자궁 조직에서 mRNA 발현을 확인 해 본 결과 산자수가 많은 그룹에서 SYT15와 17 두 개의 유전자를 제외한 나머지 유전자들이 발현이 증가 하는 패턴을 보였음. 또한 산자수가 많고 적은 두 그룹에서 SYT subfamily의 발현의 차이는 SYT13을 포함하여 SYT2, 5, 7, 9에서 가장 극명하게 나타나는 것으로 보이고 나머지 유전자 들은 그 정도가 심하지 않지만 산자수가 많은 그룹에서 발현이 증가 하는 패턴으로 결과가 확인됨. SYT13의 발현이 자궁에서 증가 하는 양상을 보였기에 이런 발현의 증가가 자궁 특이적 인지 확인하기 위하여 여러 장기로부터 얻은 RNA 샘플에서 SYT13의 발현량을 확인해본 결과 소장에서 발현이 가장 컸고 대장과 자궁에서도 발현이 확인되었음. 하지만 다른 조직에서의 발현은 감지되지 않았음.

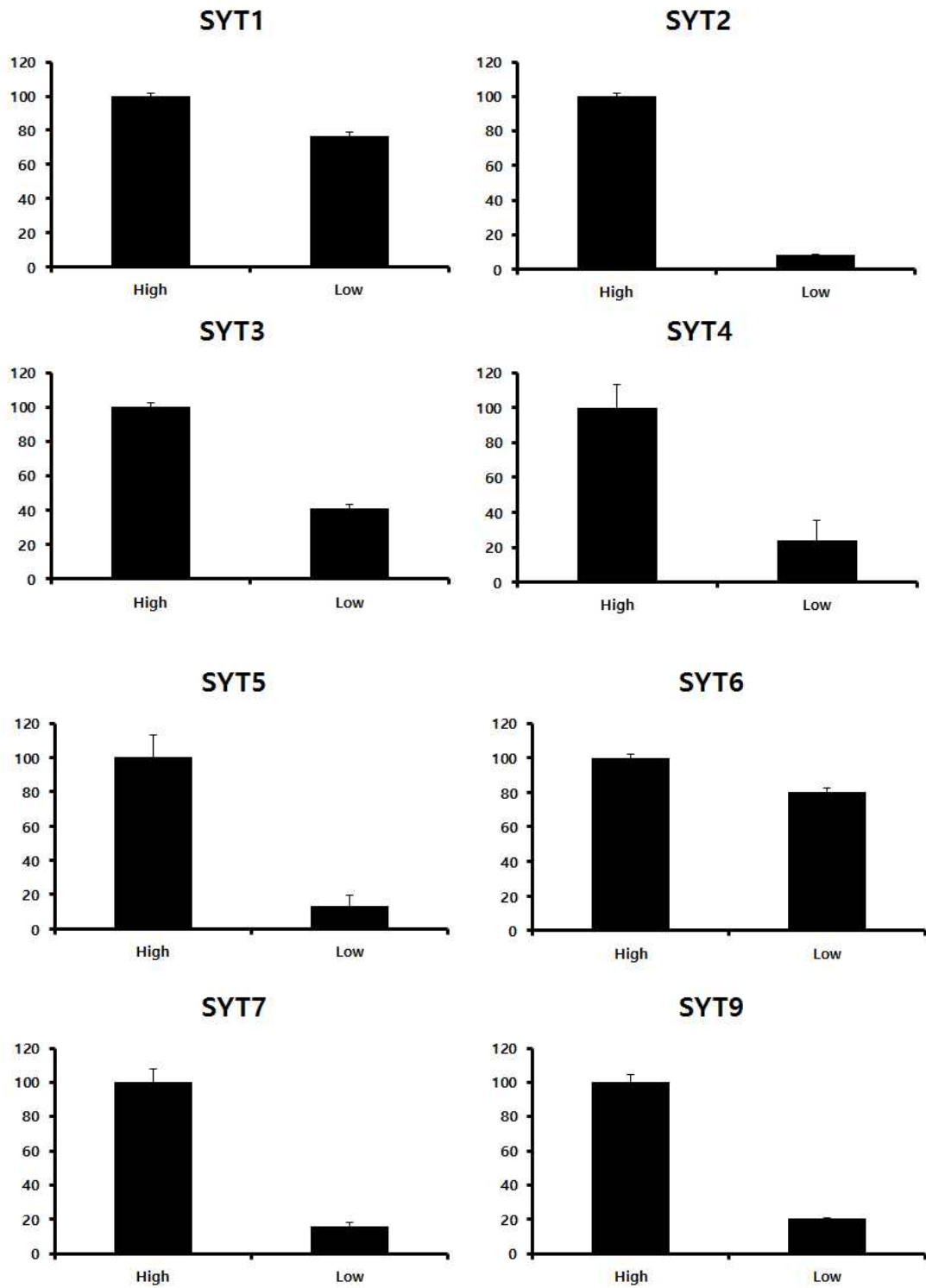


Figure 9 mRNA expression of SYT subfamily members.

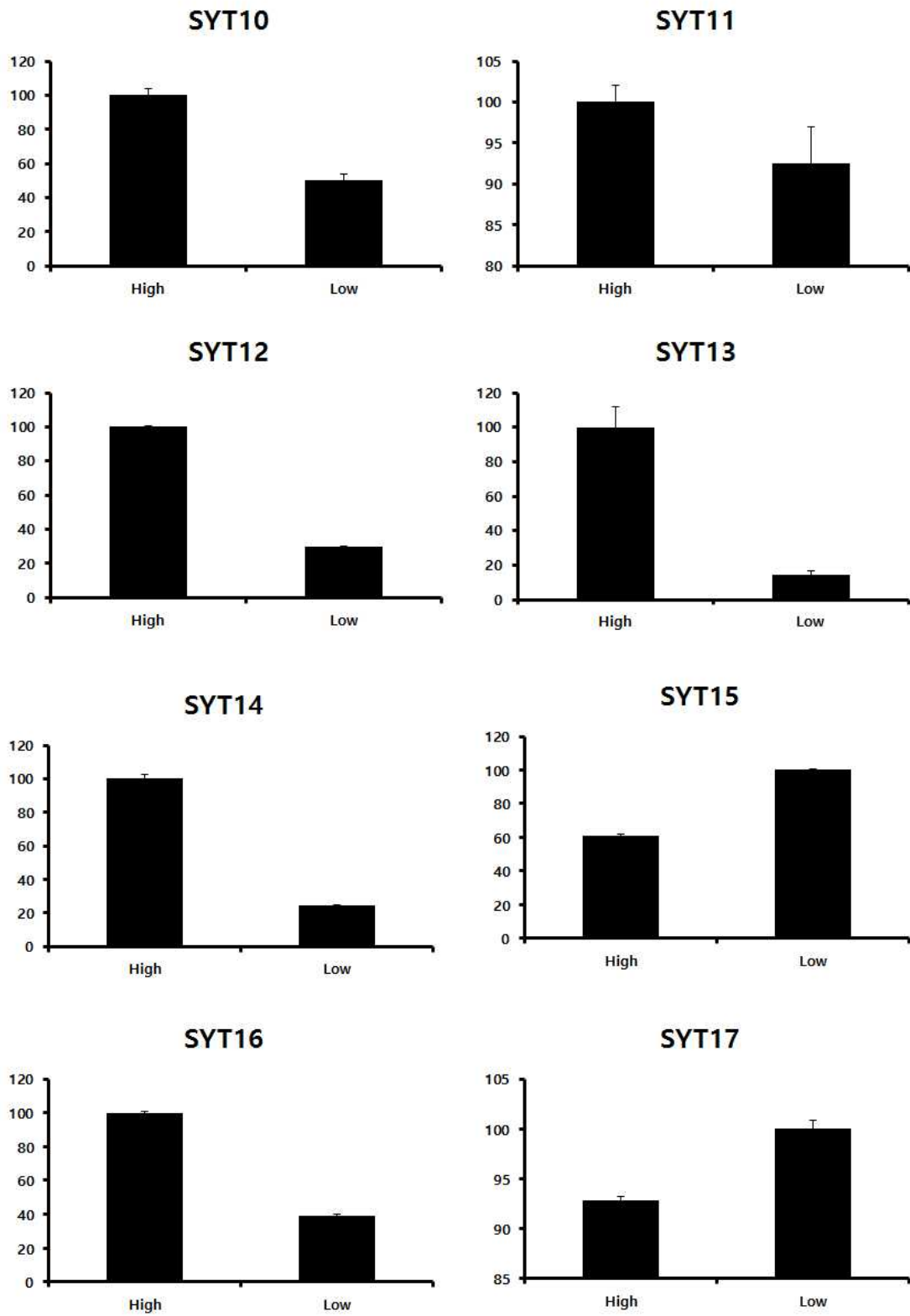


Figure 9 mRNA expression of SYT subfamily members.

(4) 산자수 연관 유전자의 SNP와 산자수 형질과의 연관관계를 PCR-RFLP방법으로 검증

산자수 연관 유전자의 SNP search 및 SNP 유전자 위치 정보 탐색, 유전자형 분석 방법에 대한 PCR-RFLP연구 방법 고찰, 제한 효소 선택, 실험 조건 수립으로 분석을 진행 함. 전체적인 연구 개요는 다음과 같음 (Fig. 10).

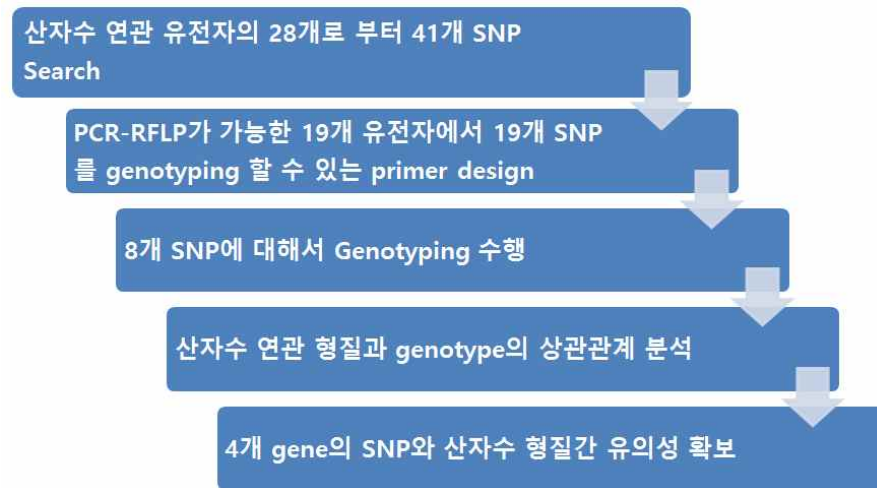


Figure 10 chart flow of analysis of SNPs in litter size associated gene.

다형질 평가모형은 총산자수와 실산자수 = 전체평균 + 산차 + 분만주차 + 영구환경효과 + 개체효과 + 오차 이고, 번식형질들에 대한 개체의 육종가를 추정하기 위한 다형질 평가모형은 다음과 같음  $y_{ijkl} = \mu_t + l_{ti} + f_{tj} + a_{tk} + p_{tk} + e_{ijkl}$ , 위에서,  $y_{ijkl}$  =  $t$ 번째 번식형질 (총산자수, 실산자수의 관측치),  $\mu_t$  =  $t$ 번째 형질의 전체 평균,  $l_{ti}$  =  $t$ 번째 번식형질의  $i$ 번째 산차의 고정효과,  $f_{tj}$  =  $t$ 번째 형질의  $j$ 번째 분만주차의 고정효과,  $a_{tk}$  =  $t$ 번째 형질의  $k$ 번째 개체의 육종가,  $p_{tk}$  =  $t$ 번째 형질의  $k$ 번째 개체의 영구환경효과,  $e_{ijkl}$  =  $t$ 번째 형질의 임의오차임.  $Var(a) = A \otimes \sigma_a^2$ ,  $Var(p) = I \otimes \sigma_p^2$ ,  $Var(e) = I \otimes \sigma_e^2$ ,  $A$  = 개체들 간의 상가적 유전 혈연관계를 나타내는 혈연계수행렬이며,  $I$  = 단위행렬.

다산종돈의 모돈을 다형질 평가 모형을 이용하여 총산자수와 실산자수 그리고 두 산자수정보에 의한 육종가를 계산 하여 산자수가 많고 적은 돼지 136두와 132두의 혈액 샘플에서 gDNA를 채취하여 해당 산자수 연관 유전자의 SNP의 유전자형을 분석 한 후 통계적 유의성을 분석하였음. 산자수 연관 유전자 중에서 통계적 유의성을 보였던 4가지 유전자는 NAT9, IGFBP2, IGFBP3 및 MAP3K3 임. 실험에 사용된 산자수 연관 SNP의 4개의 위치 정보 및 프라이머 서열과 두차례에 걸친 통계분석 결과는 다음과 같음.



Table 5. The SNP information of NAT9

Gene name		NAT9
Locus		chr12_NC_010454.3
SNP position		mRNA 699
SNP -seq	Reference seq	A
	Variant seq	G

Table 6. 1<sup>st</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		NAT9
traits	평균총산자	0.1006
	평균실산자	0.2183
	육종가 (총산자)	<b>0.0209</b>
	육종가 (실산자)	<b>0.0421</b>

Table 7. 1<sup>st</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP		NAT9		
Model		Codominant		
Genotype		AA (76)	AG (56)	GG (8)
traits	평균총산자	8.266±2.532	8.371±2.253	10.165±1.256
	평균실산자	7.402±2.232	7.376±2.006	8.736±1.419
	육종가 (총산자)	<b>0.041±0.826</b>	<b>0.042±0.793</b>	<b>0.855±0.163</b>
	육종가 (실산자)	<b>0.109±0.625</b>	<b>0.079±0.610</b>	<b>0.652±0.154</b>

Table 8. 2<sup>nd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		NAT9
traits	평균총산자	<b>0.0298</b>
	평균실산자	0.1901
	육종가 (총산자)	<b>0.0200</b>
	육종가 (실산자)	0.0796

Table 9. 2<sup>nd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP		NAT9		
Model		Codominant		
Genotype		AA (72)	AG (52)	GG (8)

traits	평균총산자	8.759±1.942	8.538±1.754	10.405±1.025
	평균실산자	7.799±1.744	7.642±1.508	8.778±1.255
	육종가 (총산자)	0.180±0.792	0.082±0.788	0.911±0.169
	육종가 (실산자)	0.219±0.615	0.119±0.588	0.621±0.185

Table 10. Experimental condition of NAT9 SNP

Gene name	NAT9
Primer	F: GGC CGT GAG CAG TGT CTT
	R: CCC TCA ACT CTG GCT CCA
Enzyme	Alu I
Tm	59°C
PCR product size	431 bp
Genotype size	GG:431bp, AG:431+295+136bp, AA:295+136bp

Table 11. The SNP information of IGFBP3

Gene name		IGFBP3
Locus		chr18_48.8
SNP position		Intron2, 114
SNP-seq	Reference seq	A
	Variant seq	G

Table 12. 1<sup>st</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		IGFBP3
traits	평균총산자	0.0190
	평균실산자	0.0307
	육종가 (총산자)	0.0046
	육종가 (실산자)	0.0025

Table 13. 1<sup>st</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP	IGFBP3		
Model	Codominant		
Genotype	AA	AB	BB
	(50)	(74)	(6)

traits	평균총산자	8.791±1.787	8.519±2.360	11.110±1.913
	평균실산자	7.743±1.582	7.472±2.058	9.568±1.252
	육종가 (총산자)	0.251±0.779	0.011±0.776	1.027±0.208
	육종가 (실산자)	0.212±0.580	0.081±0.590	0.933±0.128

Table 14. 2<sup>nd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		IGFBP3
traits	평균총산자	0.2637
	평균실산자	0.1639
	육종가 (총산자)	<b>0.0283</b>
	육종가 (실산자)	<b>0.0097</b>

Table 15. 2<sup>nd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP		IGFBP3		
Model		Codominant		
Genotype		AA (55)	AB (69)	BB (6)
traits	평균총산자	8.808±1.776	8.716±1.925	9.998±1.044
	평균실산자	7.789±1.543	7.774±1.646	9.055±1.341
	육종가 (총산자)	<b>0.274±0.788</b>	<b>0.087±0.767</b>	<b>0.917±0.227</b>
	육종가 (실산자)	<b>0.230±0.572</b>	<b>0.151±0.587</b>	<b>0.902±0.181</b>

Table 16. Experimental condition of IGFBP3 SNP

Gene name	IGFBP3
Primer	F: CAA GTC TCA AGC ACG GAC AC
	R: GCC AGG GGC TCT CTC TTT T
Enzyme	BsaH I
Tm	58℃
PCR product size	438 bp
Genotype size	Allele I:438bp, Allele II:326+112bp

Table 17. The SNP information of IGFBP2

Gene name		IGFBP2
Locus		Chr6_49
SNP position		Intron 2, 135
SNP-seq	Reference seq	A
	Variant seq	T

Table 18. 1<sup>st</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		IGFBP2
traits	평균총산자	0.0007
	평균실산자	0.0328
	육종가 (총산자)	0.0147
	육종가 (실산자)	0.0525

Table 19. 1<sup>st</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP		IGFBP2		
Model		Codominant		
Genotype		AA (2)	AB (53)	BB (73)
traits	평균총산자	7.915±0.120	9.754±2.227	8.361±1.843
	평균실산자	6.915±0.827	8.319±1.814	7.516±1.714
	육종가 (총산자)	0.090±0.919	0.415±0.790	0.002±0.764
	육종가 (실산자)	0.160±0.410	0.337±0.580	0.074±0.606

Table 20. 2<sup>nd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		IGFBP2
traits	평균총산자	0.0056
	평균실산자	0.0286
	육종가 (총산자)	0.0244
	육종가 (실산자)	0.0582

Table 21. 2<sup>nd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP		IGFBP2		
Model		Codominant		
Genotype		AA (2)	AB (53)	BB (78)
traits	평균총산자	7.915±0.120	9.502±1.828	8.450±1.868
	평균실산자	6.915±0.827	8.303±1.542	7.562±1.670
	육종가 (총산자)	0.090±0.919	0.431±0.758	0.054±0.774
	육종가 (실산자)	0.160±0.410	0.366±0.563	0.115±0.600

Table 22. Experimental condition of IGFBP2 SNP

Gene name	IGFBP2
Primer	F: GGA ACT TGC TCA CCC TTG TC
	R: CAG GAA GAA GCC CAG GTA TG
Enzyme	Mbo II
Tm	58°C
PCR product size	361 bp
Genotype size	Allele I:346+15bp, Allele II:200+146+15bp

Table 23. The SNP information of MAP3K3

Gene name	MAP3K3	
Locus	Chr12_15223144	
SNP position	Genomic 62265	
SNP -seq	Reference seq	C
	Variant seq	T

Table 24. 1<sup>st</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		MAP3K3
traits	평균총산자	0.0021
	평균실산자	0.0125
	육종가 (총산자)	0.0189
	육종가 (실산자)	0.0794

Table 25. 1<sup>st</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		MAP3K3		
Model		Codominant		
Genotype		AA (102)	AB (36)	BB (1)
traits	평균총산자	8.059±2.469	9.683±1.990	7.290±.
	평균실산자	7.174±2.226	8.381±1.605	6.710±.
	육종가 (총산자)	-0.001±0.808	0.421±0.732	-0.490±.
	육종가 (실산자)	0.070±0.628	0.331±0.537	-0.150±.

Table 26. 2<sup>nd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits

SNP		MAP3K3
traits	평균총산자	0.7160
	평균실산자	0.2624
	육종가 (총산자)	0.1391
	육종가 (실산자)	0.2393

Table 27. 2<sup>nd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype

SNP		MAP3K3		
Model		Codominant		
Genotype		AA (96)	AB (36)	BB (1)
traits	평균총산자	8.632±1.973	9.264±1.700	7.290±.
	평균실산자	7.696±1.756	8.189±1.440	6.710±.
	육종가 (총산자)	0.117±0.828	0.396±0.679	-0.490±.
	육종가 (실산자)	0.159±0.631	0.345±0.502	-0.150±.

Table 28. Experimental condition of MAP3K3 SNP

Gene name	MAP3K3
Primer	F: CAA ATG GCG AAA ACA TGG GTC
	R: AGC ACA AAT AGA CCC TGC CGA A
Enzyme	Xcm I
Tm	58°C
PCR product size	700 bp
Genotype size	AA:700bp, AB:700+510+190bp, BB:510+190bp

결과적으로 4개의 gene에 대한 SNP가 산자수 형질에서 최소한 하나라도 유의한 결과를 나타내었으며 이를 이용하여 다산의 버크셔 종의 조기 선발하는 기술 개발 방법으로 특허 출원 하였음.

**(5) 자궁유래 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP와 산자수 형질과의 관계를 PCR-RFLP방법으로 검증**

산자수가 많고 적은 두 그룹에서부터 RNA를 채취하여 RNA-DNA Difference를 조사한 결과 총 80개의 deletion mutant가 확인이 되었고 (Table 29) 이들 중 aminoacid stop 위치가 N-term쪽에 치우쳐있는 즉, deletion의 길이가 긴 SNP를 우선적으로 선발. PCR-RFLP가 가능한 12개의 SNP에 대해서 primer를 design하고 restriction enzyme을 선정 하며 genotyping을 PCR-RFLP방법으로 수행. 위에 언급하였던 산자수 연관 형질과의 상관관계를 통계적으로 분석. 총 132두와 136두의 모돈으로부터 SNP의 유전자형을 분석 하였고 1차와 2차에 걸쳐 통계적 유의성을 확인함. 연구의 전체적 흐름은 다음 그림과 같음 (Fig. 11).

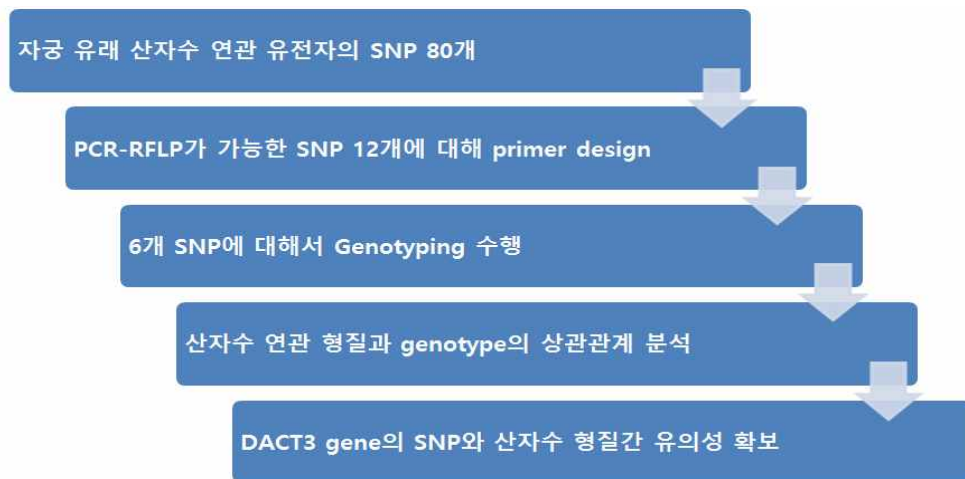


Figure 11 Flow of investigation of deletion mutant SNP in genes associated with litter size.

Table 29. candidated deletion mutant of SNP from endometrium

ANN[*].GENE	ANN[*].HGVS_C	ANN[*].HGVS_P
MLLT4	c.4204G>T	p.Glu1402*
LCA5	c.1141G>T	p.Glu381*
SLC28A2	c.684G>A	p.Trp228*
SYNM	c.1693A>T	p.Lys565*
CLPX	c.1264G>T	p.Glu422*
NIN	c.2020G>T	p.Glu674*
SYNE2	c.1901T>A	p.Leu634*
NFIB	c.1444C>T	p.Arg482*
MPDZ	c.2416G>T	p.Glu806*
KIAA2026	c.4889C>A	p.Ser1630*
WIZ	c.2404C>T	p.Gln802*
WIZ	c.2407A>T	p.Lys803*
HK3	c.2070C>A	p.Tyr690*
KIAA0825	c.732C>G	p.Tyr244*
GIN1	c.1450G>T	p.Glu484*
CCDC112	c.816G>A	p.Trp272*
SEC24A	c.44G>A	p.Trp15*
CUX1	c.2369C>A	p.Ser790*
TMC5	c.249C>G	p.Tyr83*
CCDC88A	c.2362C>T	p.Gln788*
DNMT3A	c.616A>T	p.Lys206*
RDH14	c.184G>T	p.Glu62*
ENSSSCG00000024481	c.2365C>T	p.Gln789*
PTGFRN	c.2299G>T	p.Glu767*
PLA2G6	c.1902G>A	p.Trp634*
ENSSSCG00000000911	c.242G>A	p.Trp81*
DACT3	c.96G>A	p.Trp32*
ACAP3	c.1218T>A	p.Cys406*
ENSSSCG00000003715	c.1034C>A	p.Ser345*
PCSK9	c.1140C>A	p.Cys380*

HSPB11	c.310G>T	p.Glu104*
SLA-5,SLA-5	c.530G>A,c.530G>T	p.Trp177*,p.Trp177Leu
SLA-2,SLA-2	c.502C>T,c.502C>A	p.Gln168*,p.Gln168Lys
ENSSSCG00000022976	c.427G>T	p.Glu143*
BBS4	c.486C>A	p.Tyr162*
THTPA	c.577A>T	p.Lys193*
CLMN	c.1933G>T	p.Glu645*
ENSSSCG00000002528	c.1780G>T	p.Glu594*
FAM200B	c.1666G>T	p.Glu556*
ENSSSCG00000008847	c.1246A>T	p.Arg416*
PRDM5	c.201T>A	p.Tyr67*
ANKRD42	c.1849G>T	p.Glu617*
ENSSSCG00000014971	c.1295C>A	p.Ser432*
CCDC15,CCDC15	c.2296G>T,c.2296G>A	p.Glu766*,p.Glu766Lys
ZBED6	c.2694G>A	p.Trp898*
CDHR3	c.167C>A	p.Ser56*
CEP350	c.2171C>A	p.Ser724*
KIF21B	c.888T>A	p.Cys296*
FAM124A	c.1300G>T	p.Glu434*
CACNA1G	c.5338A>T	p.Lys1780*
NEK8	c.703C>T	p.Gln235*
PITPNM3	c.1534C>T	p.Gln512*
SOCS7	c.1717A>T	p.Lys573*
CAND2	c.963C>A	p.Cys321*
IGSF10	c.1204A>T	p.Lys402*
ARHGFEF26	c.163C>T	p.Arg55*
BOC	c.943C>T	p.Gln315*
DZIP3	c.1387C>T	p.Gln463*
DOPEY2	c.5880G>A	p.Trp1960*
PRDM15	c.2977A>T	p.Arg993*
CDK20	c.508C>T	p.Arg170*
ZNF605	c.563C>G	p.Ser188*
IGLV-7,IGLV-7	c.333T>G,c.333T>C	p.Tyr111*,p.Tyr111Tyr
LYST	c.2423T>A	p.Leu808*
ZNF25	c.703C>T	p.Gln235*
PARG	c.1696A>T	p.Lys566*
ENSSSCG00000010676	c.100C>T	p.Gln34*
MKI67	c.3322C>T	p.Gln1108*
STOX2	c.967A>T	p.Lys323*
ENSSSCG00000016118	c.2860C>T	p.Arg954*
PIKFYVE	c.4533G>A	p.Trp1511*
ENSSSCG00000029683	c.402C>A	p.Cys134*
KIF1A	c.939G>A	p.Trp313*
C5ORF42	c.2071C>T	p.Gln691*
CYFIP2	c.76C>T	p.Gln26*
TSHZ2	c.2796T>A	p.Cys932*
ZNF212	c.616G>T	p.Glu206*
AMER1	c.2206A>T	p.Lys736*
ENSSSCG00000029204	c.200C>G	p.Ser67*
PLXNA3	c.2970C>A	p.Cys990*

산자수 연관 deletion mutant SNP에 대한 genotyping raw data 결과는 다음과 같음 (Fig. 12). MLLT4와 CDK20 gene은 모두 hetero type SNP만 탐지된 반면 KIF21B, NEK8, PCSK9,



CLMN, 및 PITPNM3 유전자는 Wild type만 확인이 되어서 통계적 유의성을 살펴 볼 수가 없었음. 하지만 KIAA0825와 DACT3 두개의 유전자는 hetero type과 wild type 두가지의 genotype이 확인되어 통계 분석 결과 DACT3유전자의 SNP 유전형에 따라서 산자수 연관 형질에 통계적으로 유의한 결과를 도출 할 수 있었음. 이 중 DACT3의 SNP 위치 정보 및 실험 조건은 Table 30와 31에서 제시하였고 통계분석의 결과는 Table 32 ~ Table 35과 같음.

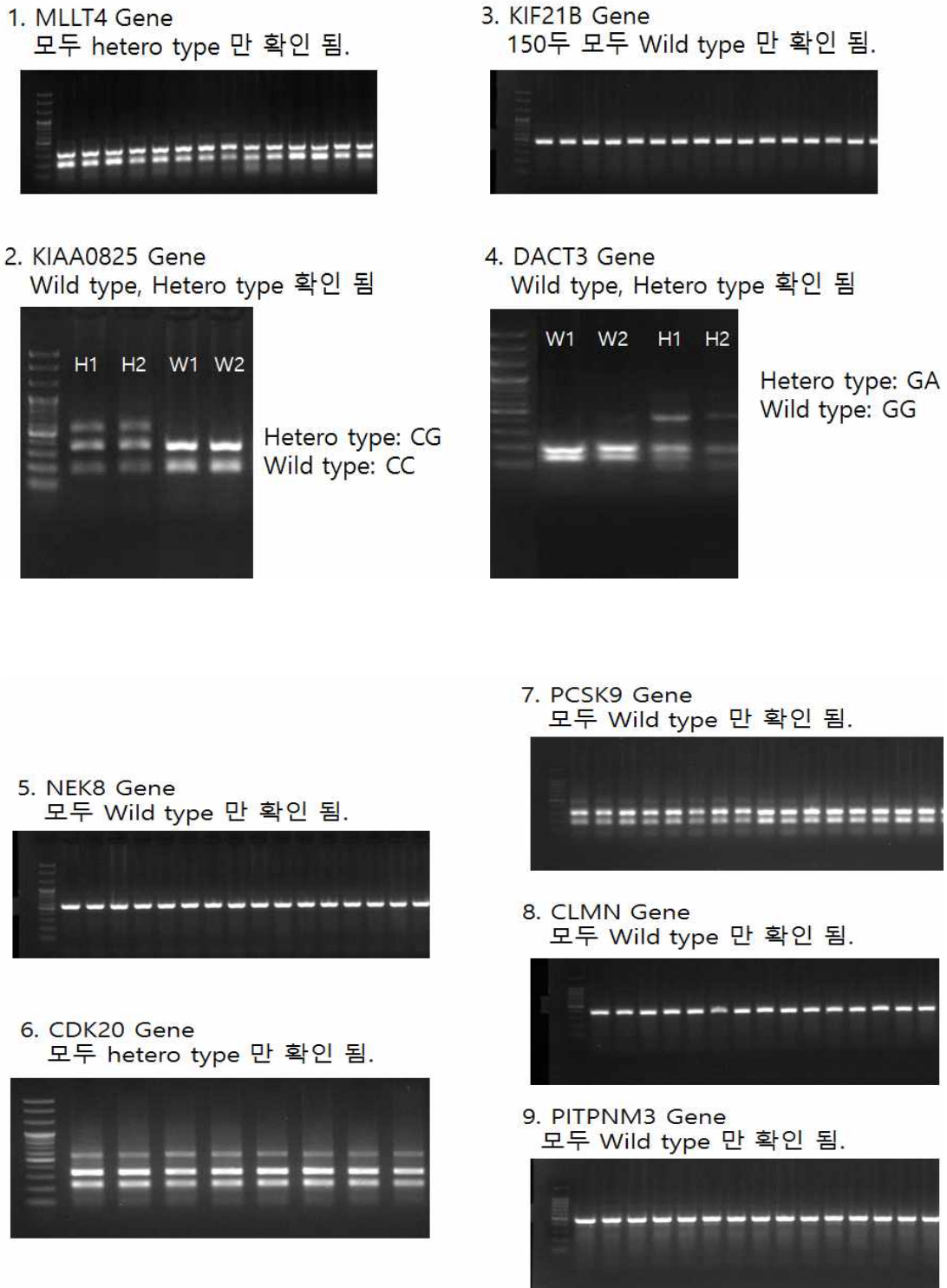


Figure 12 Analysis of genotyping using PCR-RFLP method.

Table 30. The SNP information of DACT3

Gene name		DACT3
Locus		Chr6_NC_010448.3
SNP position		cDNA 96, genomic 375
SNP -seq	Reference seq	G
	Variant seq	A

Table 31. The information of primer sequence and enzyme of DACT3

Gene name		DACT3
Primer	F:	GGCGCCTATGCAGATGAGAC
	R:	GGCCCCTCACCAGCTGCTCT
Enzyme	Bsr I	
Tm	65°C	
PCR product size	388 bp	
Genotype size	GG:226+162bp, AA:388bp	

Table 32. p-value of statistical analysis result

SNP		DACT3
traits	평균총산자	0.0129
	평균실산자	0.0264
	육중가 (총산자)	0.0089
	육중가 (실산자)	0.0133

Table 33. The result of mean and std value of reproductive traits

SNP		DACT3	
Model		Codominant	
Genotype		GA (7)	GG (125)
traits	평균총산자	6.719±1.800	8.756±2.093
	평균실산자	6.157±1.463	7.755±1.847
	육중가 (총산자)	-0.640±0.250	0.167±0.800
	육중가 (실산자)	-0.389±0.243	0.189±0.605

Table 34. p-value of statistical analysis result

SNP		DACT3
traits	평균총산자	0.0030
	평균실산자	0.0039
	육중가 (총산자)	0.0050

	육종가 (실산자)	0.0064
--	-----------	--------

Table 35. The result of mean and std value of reproductive traits

SNP		DACT3	
Model		Codominant	
Genotype		AA (72)	AG (52)
traits	평균총산자	6.533±1.646	8.768±1.917
	평균실산자	5.914±1.107	7.800±1.678
	육종가 (총산자)	-0.660±0.263	0.199±0.792
	육종가 (실산자)	-0.406±0.259	0.219±0.593

결과적으로 DACT3유전자는 실산자수, 총산자수, 실산자수에 대한 육종가, 총 산자수에 대한 육종가 4가지 산자수 연관 형질에서 모두 통계적 유의성을 가지는 것으로 두차례의 검증 결과 확인 되었음. 위의 결과들을 토대로 산자수 연관 유전자의 SNP 4개와 DACT3의 SNP 총 5개의 SNP를 산자수 연관 유전자를 이용한 다산성 돼지의 조기 선발 기술 개발 방법으로 특허 출원 하였음

#### (6) 산자수 연관 후성 유전체 마커의 검증

차등 산자수를 가지는 두 버크셔 집단으로부터 얻은 gDNA로 WGBS를 수행한 결과 차등 메틸화 영역을 가지는 130여개의 유전자를 선발 할 수 있었음. 이번 3차년도에서는 gDNA 샘플로 bisulfite PCR sequencing과 MSRE-PCR 방법등을 이용하여 산자수 연관 DNA의 메틸화를 분석하였음. Bisulfite PCR sequencing은 gDNA에 Bisulfite를 처리하여 T-vector에 클로닝 및 sequencing 단계로 확인함. Bisulfite 처리를 하면 methylation이 된 cytosine은 cytosine 그대로 methylation이 되지 않은 cytosine 은 uracil 로 변형되기 때문에 sequencing 하였을 때 cytosine으로 읽히는지 혹은 thymine으로 읽히는지에 따라서 methylation 유무를 분석 할 수 있음. 아래에서 DMR로 선발 된 유전자 중에서 GBP1유전자의 sequencing 결과를 보여주고 있음 (Fig. 13).

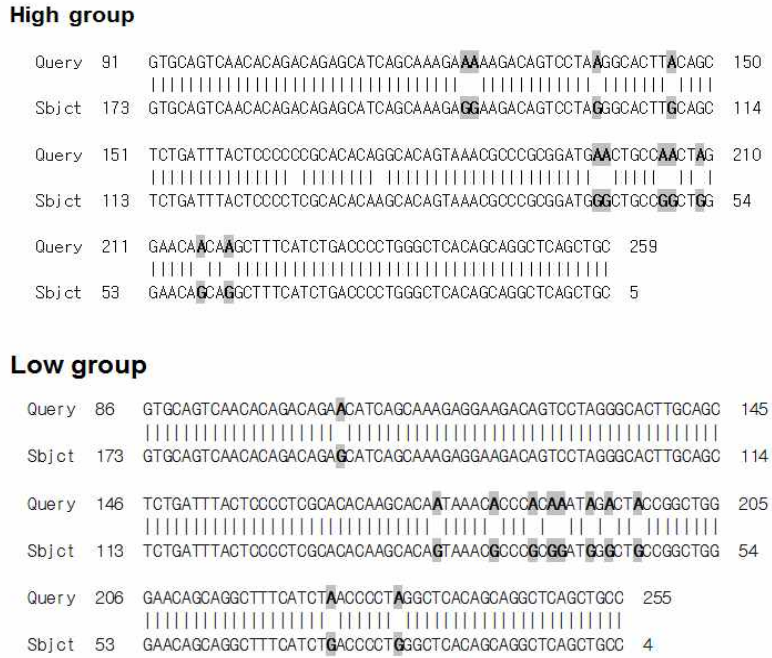


Figure 13 Result of bisulfite PCR-sequencing of GBP1 gene.

Bisulfite PCR-sequencing 결과를 토대로 CpG island (CGI)의 위치의 methylation 유무에 따라 methylation이 일어나지 않은 CGI는 ○로 methylation이 일어나는 CGI는 ●로 도식화 하여 methylation을 분석 하였음 (Fig. 14).

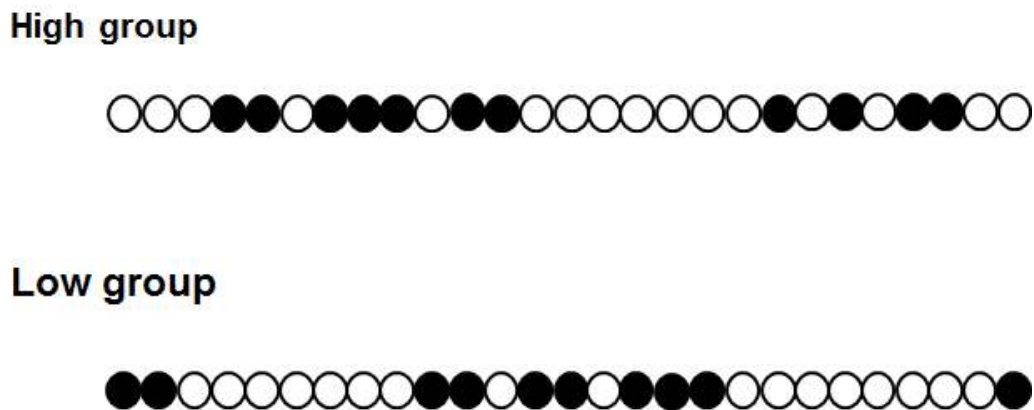


Figure 14 Result of bisulfite PCR-sequencing of GBP1 gene.

또한 MSRE-PCR 방법으로 methylation을 분석하였음. MSRE-PCR 방법은 methylation specific restriction enzyme을 이용한 PCR방법으로 methylation이 일어나는 위치에는 restriction enzyme에 의해 cut이 되지 않고 반대로 methylation이 일어나지 않은 곳에서는 cut이 되어 methylation이 일어날 것으로 예상 되는 genomic region을 포함 하는 PCR primer를 이용하여 증폭 한다면 methylation이 일어나는 위치에서는 cut이 되지 않아서 PCR에 의해 증폭이 되고 methylation이 일어나지 않은 위치에서는 cut이 되어서 PCR에 의해 증폭이 되지 않

는 것을 확인 할 수 있음. 이에 따라 PCR 결과 산물은 전기영동방법으로 밴드를 확인 할 수도 있고 또한 qPCR을 통하여 Ct값을 구하고 메틸화 되는 정도를 두 그룹 간에 상대적 비교가 가능함. 산자수 연관 유전자 중 MLLT4유전자에 대해서 메틸화의 정도를 MSRE-PCR방법으로 분석 함. 아래 결과에서 알 수 있듯이 MSRE처리를 한 후 qPCR의 dCt값을 분석해 보면 산자수가 높은 그룹에서 dCt가 높게 나타나는 것을 확인 하였고 (Fig. 15), dCt값으로 PCR의 product 양의 상대적인 양을 환산해 보았을 때 산자수가 많은 그룹에서 product 양이 감소 하는 것으로 확인이 되어 메틸화가 감소된 hypomethylation 된 영역이라는 것을 알 수 있었음 (Fig. 16). 또한 자궁 조직에서 WGBS 실험을 하여 DMR을 확보 하였지만 자궁의 채취는 쉽지가 않고 양돈 현장에서 접목을 하려면 반드시 샘플의 확보 및 진단 방법이 용이 해야만 하기 때문에 조직 특이적 DMR에 대한 재현성 실험이 혈액에서 반드시 이루어져야 함. 본 연구 그룹에서는 자궁 유래 DMR들을 혈액 샘플에서 재현성을 확인 하고 두 번에 걸친 다른 돈군을 형성 하여 차등 DNA methylation 영역을 분석하였음.

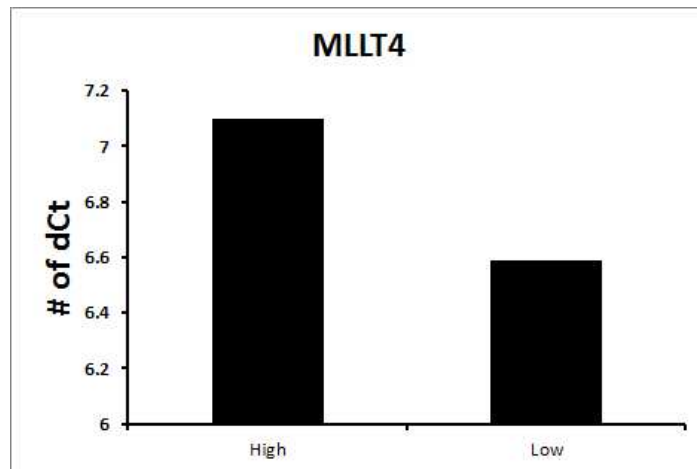


Figure 15 The number of delta Ct value.

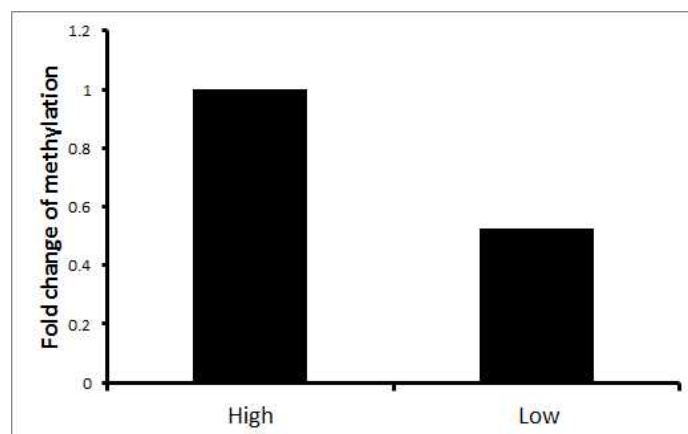


Figure 16 Fold change of methylation.

### (7) 산자수 연관 deletion mutant SNP에 대한 생화학적 기능 분석

산자수 연관 deletion mutant SNP 중에서 PCSK9유전자의 molecular docking simulation program을 이용한 binding analysis를 수행. PCSK9은 proprotein convertase subtilisin kexin type 9를 말하며 자궁 유래 RNA-Seq 연구 결과 cDNA 서열의 1125위치의 C>A로 변이 되어 아미노산 서열 375번째 Cys>Stop으로 끝나는 deletion mutant가 존재 하게 됨. 전체 아미노산의 길이가 692개이고 그 중에 절반 정도의 위치에 해당하는 375번째 위치에서 SNP에 의한 stop codon변이가 일어나는 것으로 확인 되어 PCSK9의 단백질의 기능 손실이 예측 됨. 본 연구에서는 PCSK9과 결합 한다고 알려져 있는 binding partner인 LDLR (low density lipoprotein receptor) 과의 결합 능력이 wild type과 SNP간에 어떻게 달라지는지를 확인함. PCSK9은 72kDa 무게의 단백질 이며 prodomain, Catalytic, C-terminal domain 이렇게 세가지의 도메인이 X-ray 구조분석에 의해 연구된바 있음. LDLR은 ectodomain은 epidermal growth factor precursor homology domain인 ligand binding domain에 L1-L7에 해당하는 일곱 번 반복 구조가 있고 LDLR의 EGF like domain과 PCSK9의 catalytic domain을 통하여 결합하는 것을 확인 (Fig. 17).

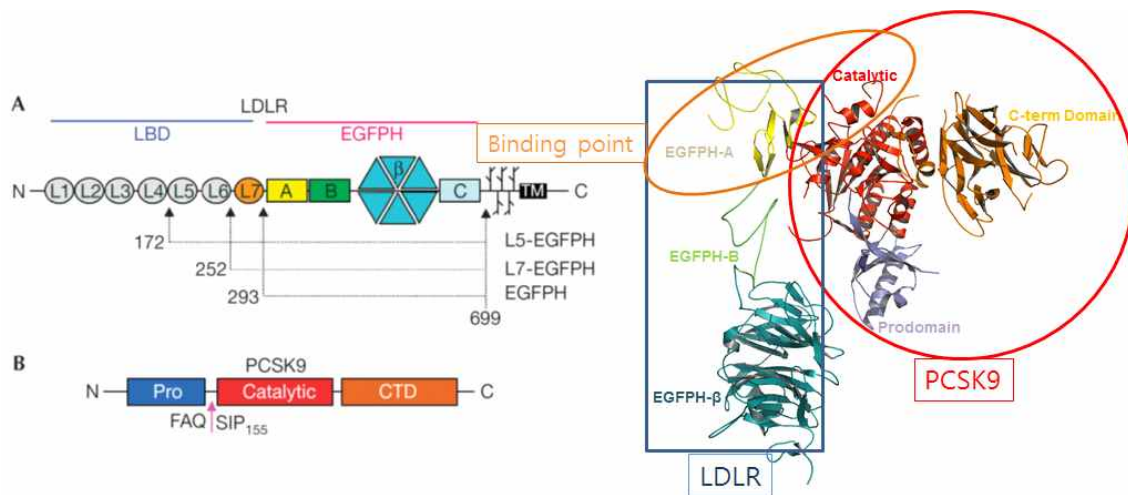


Figure 17 The 3D structure of LDLR and PCSK9.

구조 분석을 통하여 PCSK9과 LDLR가 결합 하는 접속 위치의 구조를 자세히 보여주고 있음 EGFPH-A (Yellow)로 표시된 부분과 PCSK9의 catalytic domain (Red)로 표시된 부분이 서로 결합 하는 것을 알 수 있음 (Fig. 18).

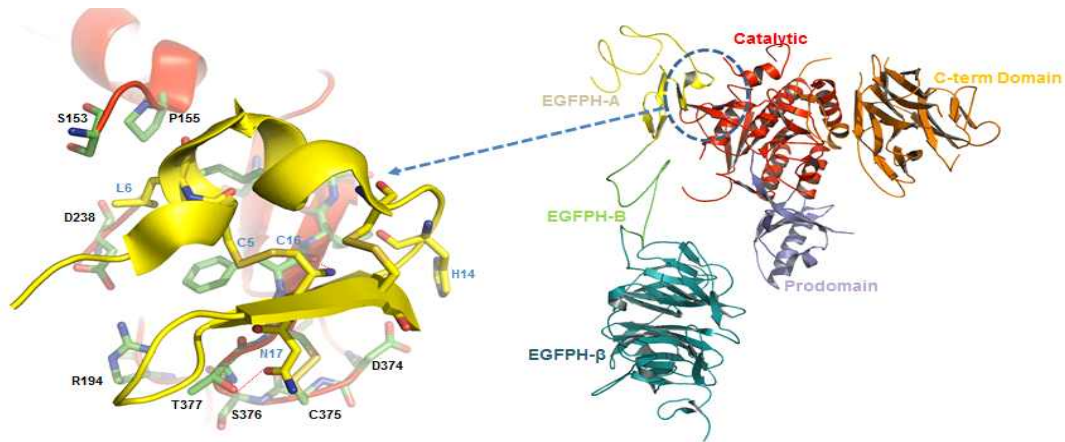


Figure 18 The binding interface of LDLR and PCSK9.

PCSK9의 wild type과 deletion mutant의 LDLR 과의 결합에 어떤 차이를 내는지에 대해서 조사함. C-375-C378사이에서 disulfite bond 형성 되는데 이때 deletion mutant는 PCSK9과 LDLR의 결합을 잃는 것으로 예측됨 (Fig. 19).

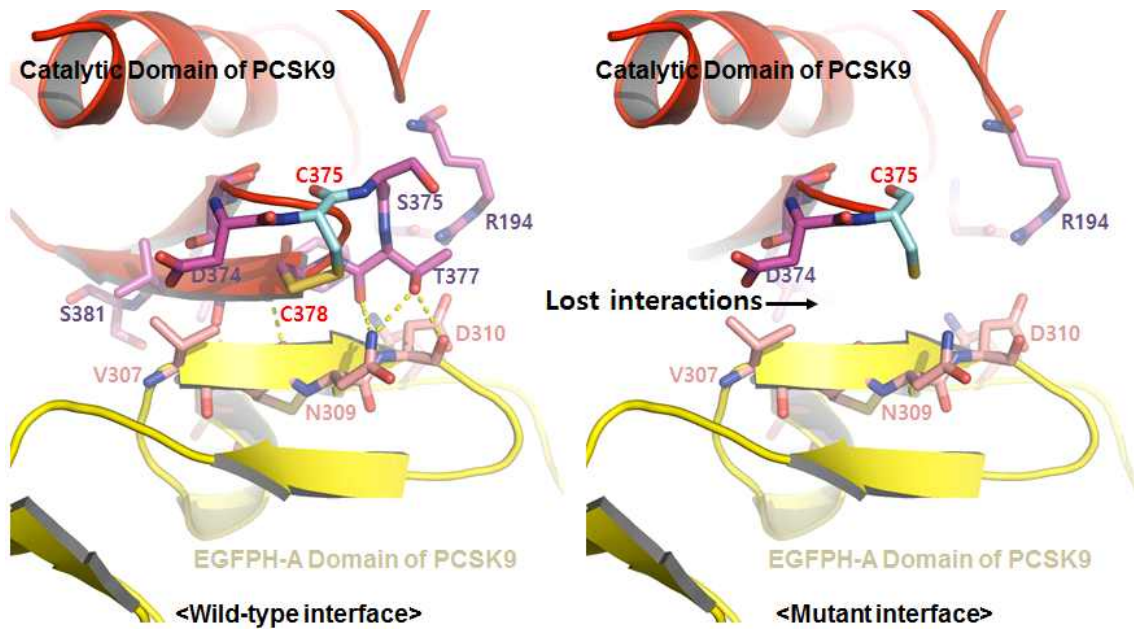


Figure 19 The comparison of binding interface between wild type and mutant in PCSK9 gene and LDLR.

나. 병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종

(1) 분석자료

(가) 버크셔 집단의 유전체 전장 SNP 자료

후보돈을 포함한 종축 1,992두에 대한 Illumina Porcine SNP 60k (1,612두) & Porcine SNP 70k (380두) chip 분석 결과로 생성된 공통 단일염기다형 표지인자의 유전자형 정보 중 염색체상의 위치정보가 확인되지 않은 SNP, 결측률이 10%이상, 다형성이 없는 경우, 모두 이형인 경우를 제외하고 분석에 이용된 SNP는 총 31,720개였다.

(나) 표현형 자료

버크셔 모돈 1,097두의 총산자수 및 발정재귀일령에 대한 4,431개의 기록을 수집하였으며, 총산자수와 발정재귀일령의 평균은 각각 8.53두와 8.82일로 나타났다. 총산자수는 약간 왼쪽으로 치우친 정규분포 형태를 나타내고 있는 반면 발정재귀일령은 오른쪽으로 크게 치우친 분포를 나타내었으며, 번식형질 자료의 분포 및 특성은 표 1에 제시하였다.

Table 1. 번식형질자료의 분포 및 특성

번식형질	기록수	평균	표준편차	최소값	최대값	왜도
총산자수 (두)	4,431	8.53	2.85	0	22	-0.16
발정재귀일령 (일)	3,861	8.86	12.87	3	173	5.34

(2) 번식형질에 대한 유전체 육종가 추정

(가) 유전모수

- ① 총산자수와 발정재귀일령에 대한 유전력은 각각 0.110과 0.004로 추정되었으며, 발정재귀일령은 유전적 요인보다는 대부분이 환경적 요인에 기인한다고 할 수 있다.

Table 2. 번식형질들에 대한 분산성분 및 유전모수

번식형질	$\sigma^2_a$	$\sigma^2_{pe}$	$\sigma^2_e$	$h^2$	r
총산자수 (두)	0.850	0.542	6.365	0.110	0.180
발정재귀일령 (일)	0.514	20.852	117.724	0.004	0.154

- ② 총산자수와 발정재귀일령에 대한 반복력은 각각 0.180와 0.154로 추정되었다.
- ③ 총산자수와 발정재귀일령의 표현형 상관계수는 0.045로 거의 0에 가깝게 추정되어 이들간 상관이 거의 존재하지 않은 것으로 나타났다.



- ④ 총산자수와 발정재귀일령을 이용한 선발지수식에 의한 선발은 효율성이 거의 없으므로 총산자수만 가지고 유전체 육종가를 추정하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

(나) 유전체 육종가

① BLUP과 ssBLUP 추정치에 대한 정확도 비교

ssBLUP에서 추정된 유전체 육종가(GEBV)와 기존의 혈통정보만을 이용한 BLUP 방법에서 추정된 육종가(EBV)간의 상관분석을 실시하였다(Fig. 1). GEBV와 EBV의 상관계수는 0.74, 회귀식은  $y = 0.09 + 0.94X (r^2 = 0.55)$ 으로 추정되었다.

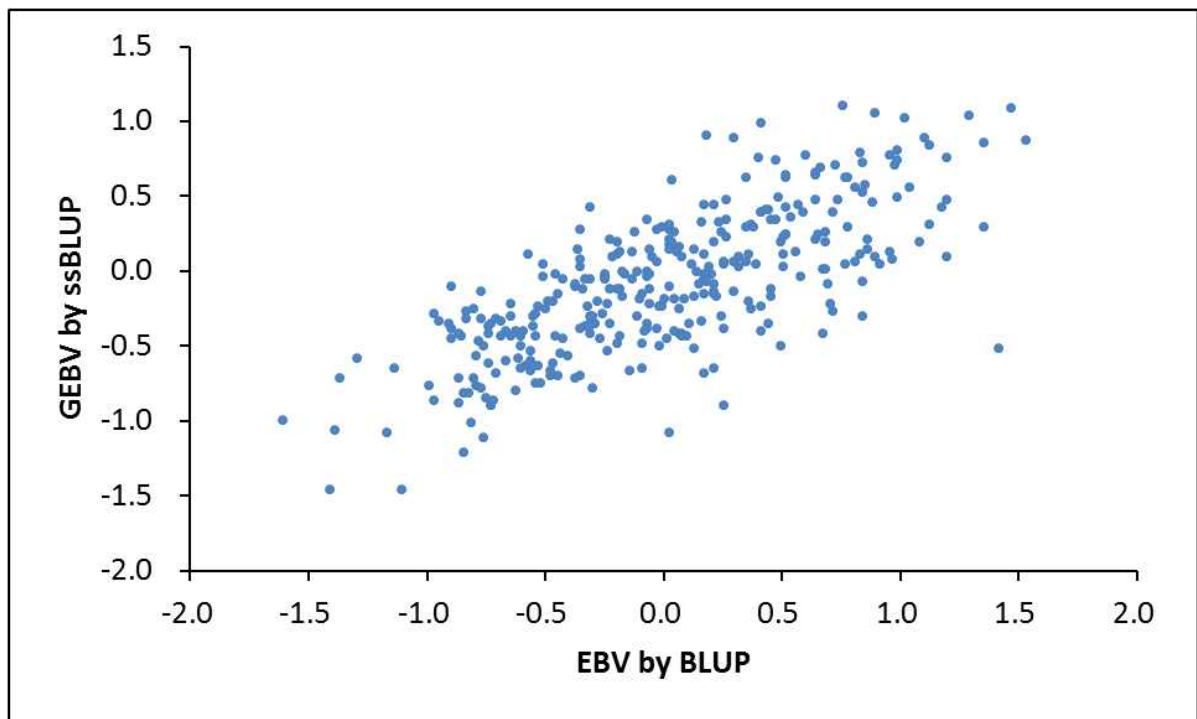


Figure 1 EBV와 GEBV의 상관관계.

추정된 육종가의 정확도는 검정자료의 수 및 혈통정보, 유전력 등의 요인에 따라 차이가 발생하게 되므로 총산자수에 대한 표현형의 유무 (sows with record, sow without record)로 구분하여 BLUP과 ssGBLUP에서 얻어진 육종가의 정확도를 추정하였다 (Table 3). ssBLUP 방법을 이용하였을 경우 정확도가 기존의 BLUP방법을 이용하였을 때보다 높게 나타났고 표현형 자료가 없는 개체에서 정확도의 차이는 더 크게 나타났으며, 표현형이 없는 후보축 (young animal) 에서 상대적으로 높은 정확도의 차이를 나타내었다. 이러한 원인은 기존의 BLUP에서 이용되는 혈연계수 행렬을 모든 표지인자 유전자형의 유사도에 기인한 유전체 관계행렬 (genomic relationship matrix)로 대체하고 멘델리안샘플링 (mendelian sampling)을 고려함으로써 정확도가 향상한 것으로 생각된다.

Table 3. 생존모든 331두에 대한 육종가(EBV)와 유전체육종가(GEBV)의 정확도 비교

Method	전 체 (331두)	Sows with record (271두)	Sows without record (60두)
BLUP	0.327 ± 0.119	0.364 ± 0.094	0.159 ± 0.060
ssBLUP	0.385 ± 0.131	0.418 ± 0.103	0.233 ± 0.139

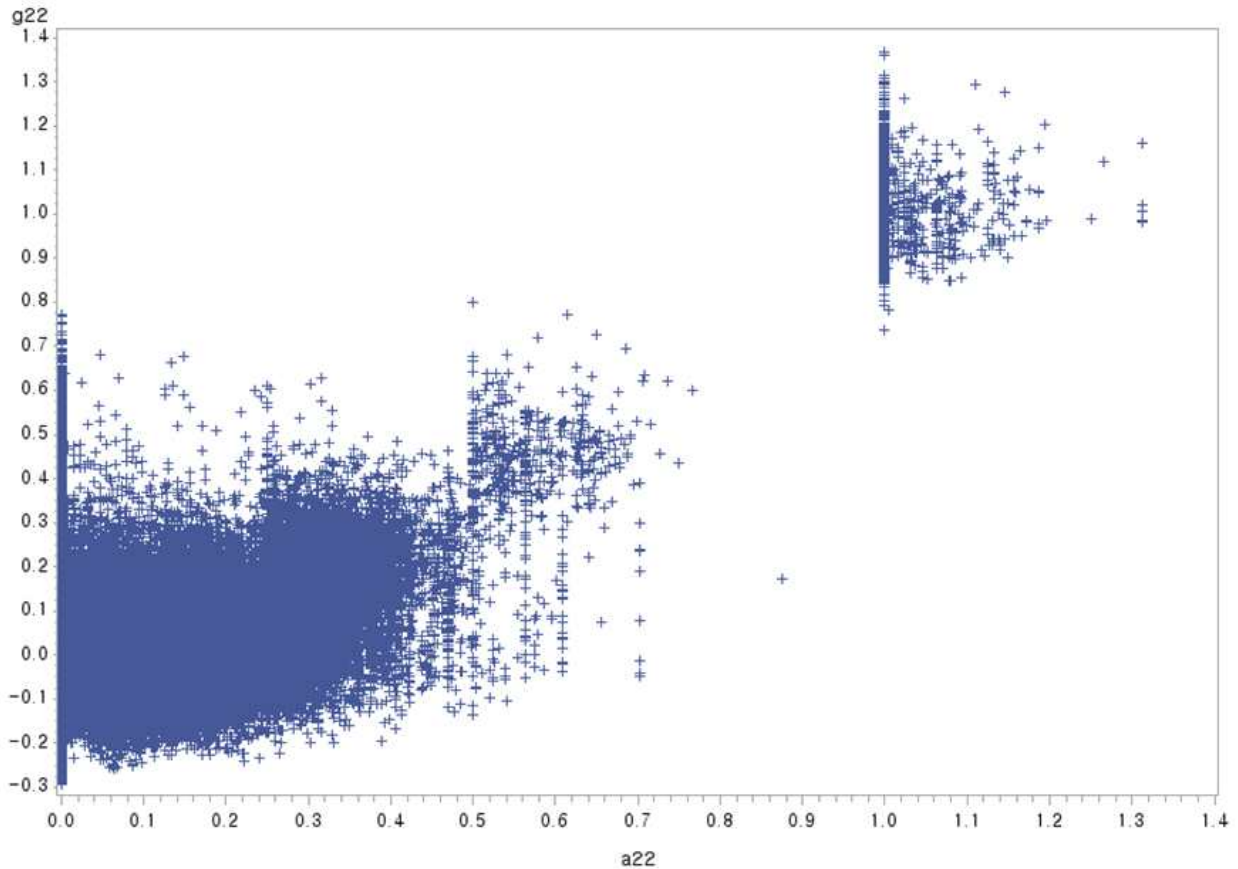


Figure 2 혈연계수행렬(a22)과 유전체관계행렬(g22)의 관계.

② 총산자수 기록을 가지고 있는 종돈 271중 우수 개체 30두에 대한 유전체육종가 정보와 총산자수 기록이 없는 후보돈 60두 리스트를 표 4에 제시하였다.

Table 4. 총산자수 기록이 없는 후보돈 60두 리스트

순위	명호	성별	생년월일	유전체육종가	정확도
1	BQ7606	1	20150421	1.42	0.05
2	BQ8445	1	20150606	1.20	0.24
3	127-3	1	20150421	1.19	-0.07
4	BQ8156	1	20150522	1.13	0.27

5	121-10	2	20150417	1.08	-0.12
6	BQ9225	1	20150726	0.96	0.14
7	107-8	1	20150411	0.86	-0.14
8	BQ8207	1	20150525	0.84	0.24
9	BQ7195	1	20150228	0.83	0.33
10	128-10	2	20150421	0.68	-0.20
11	BQ9035	1	20150713	0.45	0.39
12	BQ8703	1	20150621	0.41	0.35
13	BQ8800	1	20150628	0.39	0.18
14	BQ8641	1	20150618	0.36	0.35
15	BQ8788	2	20150627	0.27	0.35
16	BQ8802	1	20150628	0.25	0.16
17	BQ7148-1	1	20150222	0.25	0.23
18	BQ8184	1	20150524	0.24	0.25
19	BQ8727	1	20150623	0.21	0.20
20	BQ9104	1	20150718	0.16	0.26
21	129-1	1	20150422	0.13	-0.09
22	BQ7132	1	20150317	0.12	0.32
23	BQ6701	1	20150127	0.09	0.27
24	BQ9184	1	20150723	0.07	0.28
25	BQ8644	1	20150618	0.06	0.33
26	BQ9379	1	20150809	0.03	0.33
27	BQ8481	1	20150607	0.03	0.25
28	BQ8001	1	20150510	0.02	0.44
29	BQ7968	1	20150509	0.02	0.15
30	BQ8817	1	20150628	-0.02	0.20

순위	명호	성별	생년월일	유전체육종가	정확도
31	BQ7186	1	20150314	-0.07	0.36
32	BQ8249	1	20150531	-0.08	0.27
33	BQ8728	1	20150623	-0.09	0.19
34	129-2	2	20150422	-0.11	-0.08
35	BQ8652	1	20150618	-0.11	0.31
36	BQ8865	1	20150703	-0.18	0.33
37	BQ8753	1	20150625	-0.20	0.18
38	BQ8002	1	20150510	-0.23	0.37
39	BQ8097	1	20150517	-0.25	0.29
40	BQ7166	1	20150224	-0.26	0.31

41	BQ9089	1	20150717	-0.30	0.23
42	BQ7648	1	20150424	-0.43	0.32
43	BQ8660	1	20150619	-0.45	0.23
44	BQ8683	1	20150623	-0.49	0.24
45	BQ8099	1	20150517	-0.51	0.30
46	BQ8659	1	20150619	-0.55	0.26
47	BQ7430	2	20150408	-0.60	0.29
48	BQ8471	1	20150607	-0.67	0.26
49	BQ8665	1	20150619	-0.69	0.20
50	BQ3047	2	20140509	-0.71	0.38
51	BQ7148	1	20150222	-0.74	0.15
52	BQ9185	2	20150723	-0.74	0.30
53	BQ8717	1		-0.77	0.31
54	BQ8177	1	20150523	-0.77	0.19
55	BQ9068	1	20150714	-0.78	0.35
56	BQ9174	1	20150722	-0.84	0.35
57	BQ8663	1	20150619	-0.86	0.21
58	BQ9136	1	20150719	-0.90	0.26
59	BQ8245	1	20150531	-0.91	0.42
60	BQ8741	1	20150623	-0.99	0.30

(다) Maker 효과 추정

- ① 유전체육종가로부터 Back solution을 한 후 각 SNP 효과를 추정하여 Fig. 3에 나타내었다.

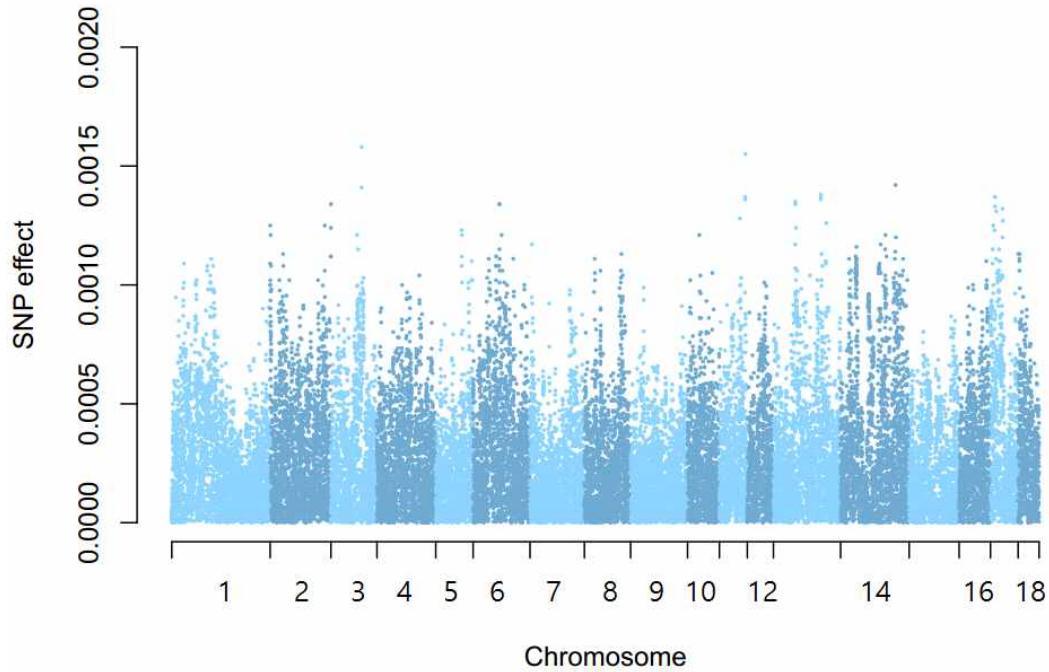


Figure 3 총산자수에 대한 염색체별 SNP의 효과.

Table 5. 총산자수에 대한 염색체별 SNP effect (상위 15개)

SNP	염색체	bp	Effect
H3GA0056247	3	101704758	0.00157964
ALGA0063949	11	81905831	0.00155049
ASGA0066298	14	126288515	0.00141776
ASGA0100307	3	101510973	0.00140815
ALGA0072286	13	153425171	0.00137690
ASGA0052010	11	81585578	0.00136919
ASGA0075391	17	11203694	0.00136851
ALGA0072282	13	153438019	0.00136554
ALGA0063928	11	81728668	0.00136479
ALGA0072288	13	153413009	0.00136254
ASGA0085784	2	162298086	0.00134230
ALGA0114670	6	74627362	0.00134075
H3GA0055046	6	74682817	0.00133830
ALGA0093217	17	10830675	0.00133020

### (3). 병합육종프로그램의 재현성 검증 및 개선

#### (가) 프로그램 개요

- ① SNP정보를 가지고 있는 개체들의 중복검사, 친자감별 및 부모 찾기 실행



## ② 친자감별 로직

㉠ 부모 모두 유전체 자료가 있는 경우 (8개 경우 reject를 구해야 한다)

- 부가 0이고 모가 0일 때 자식이 1이거나 2이면 오류
- 부가 0이고 모가 1일 때 자식이 2이면 오류
- 부가 0이고 모가 2일 때 자식이 0이거나 2이면 오류
- 부가 1이고 모가 0일 때 자식이 2이면 오류
- 부가 1이고 모가 2일 때 자식이 0이면 오류
- 부가 2이고 모가 0일 때 자식이 0이거나 2이면 오류
- 부가 2이고 모가 1일 때 자식이 0이면 오류
- 부가 2이고 모가 2일 때 자식이 0이거나 1이면 오류

㉡ 부만 유전체 자료가 있는 경우

- 부가 0일 때 자식이 2이면 오류
- 부가 2일 때 자식이 0이면 오류

㉢ 모만 유전체 자료가 있는 경우

- 모가 0일 때 자식이 2이면 오류
- 모가 2일 때 자식이 0이면 오류

Table 6. ID가 중복인 개체들 검색 및 일치율 점검 출력 예

순번	비교순번	일치율	개체번호	비교개체	생년월일	부	모	성별	칩1	칩2
891	1322	99.9	BP9059	BP9059	2013-07-12	BP3748	BP4298	1	70K	60K
899	1229	99.9	BP4378	BP4378	2012-06-10	BN1365	BP686	2	70K	60K
883	1275	99.9	BP8420	BP8420	2013-06-02	BP675	BP3960	1	70K	60K
860	1047	99.8	BP1447	BP1447	2011-08-27	BK9295	BN2240	1	70K	60K
867	1059	99.8	BP5349	BP5349	2012-09-11	BK3948	BP1118	1	70K	60K
848	1420	99.8	BP8785	BP8785	2013-06-21	BP1289	BP2518	1	70K	60K
908	1338	99.8	BP6752	BP6752	2013-01-18	BP675	BN2670	2	70K	60K
930	1228	99.8	BP7755	BP7755	2013-04-06	BP1354	BN9928	1	70K	60K
884	1292	99.8	BP8461	BP8461	2013-06-06	BP1289	BP4041	1	70K	60K
779	1325	99.8	BP6183	BP6183	2012-11-24	BP1365	BN8817	1	70K	60K
902	1331	99.8	BP7285	BP7285	2013-02-28	BN9353	BN9636	2	70K	60K
706	1424	99.8	BP7566	BP7566	2013-03-22	BP675	BP641	1	70K	60K
762	1075	99.8	BP6015	BP6015	2012-11-09	BP1354	BN5717	1	70K	60K
709	1241	99.8	BP7398	BP7398	2013-03-08	BP1289	BN7965	1	70K	60K
724	1432	99.8	BP7445	BP7445	2013-03-16	BP675	BP3283	1	70K	60K
719	1244	99.8	BP7450	BP7450	2013-03-15	BP1354	BP3177	1	70K	60K
888	1271	99.8	BP8282	BP8282	2013-05-28	BP1354	BP3083	1	70K	60K
898	1327	99.8	BP8692	BP8692	2013-06-05	BP2111	BP4262	2	70K	60K
911	1226	99.8	BP5085	BP5085	2012-08-11	BN9353	BP1364	2	70K	60K
1033	1050	99.8	BP1273	BP1273	2011-08-06	BK9295	BN2738	1	70K	60K
1017	1036	99.8	BP2673	BP2673	2012-01-13	BK3948	BK8387	1	70K	60K
829	1388	99.8	BP4757	BP4757	2012-07-09	BN1365	BP299	1	70K	60K
1024	1227	99.8	BP8921	BP8921	2013-06-29	BP1289	BN9035	1	70K	60K
887	1248	99.8	BP8703	BP8703	2013-06-21	BN9353	BP1141	1	70K	60K
721	1252	99.8	BP7371	BP7371	2013-03-08	BP675	BP34	1	70K	60K
657	1243	99.7	BP7406	BP7406	2013-03-16	BP1289	BP2500	1	70K	60K
897	1269	98.3	BP8917	BP8917	2013-06-29	BP1289	BN9035	1	70K	60K
938	941	59.8	BP8250	BP8250	2013-05-25	BP1354	BP1472	1	70K	70K
987	1236	59.6	BP6446	BP6446	2012-12-22	BN1365	BP683	1	70K	60K
710	1242	54.5	BP7628	BP7628	2013-03-29	BP1354	BN4668	1	70K	60K
900	906	54.5	BP6444	BP6444	2012-12-20	BP1354	BP424	2	70K	70K
882	976	54.2	BP3000	BP3000	2012-02-04	BN1365	BN5615	1	70K	70K
1019	1235	54.0	BP4647	BP4647	2012-06-26	BN1365	BN4764	1	70K	60K
689	742	53.0	BP4570	BP4570	2012-06-23	BN1365	BN2831	1	70K	70K
656	1238	52.7	BP7315	BP7315	2013-03-07	BP1354	BN4869	1	70K	60K
903	1389	52.6	BP7217	BP7217	2013-02-22	BP1289	BN9700	2	70K	60K
725	1232	50.5	BP7474	BP7474	2013-03-14	BN9353	BN4729	1	70K	60K
743	1230	50.0	BP4813	BP4813	2012-07-13	BN1993	BP438	1	70K	60K

Table 7. 친자감별 일치율 점검 출력 예

명 호	출생년도	Sire	Dam	멘델에러	일치율
BQ6641	2015-01-24	BP7285	BP5642	36	100
BQ7165	2015-02-24	BP7217	BP7547	41	100
BQ7015	2015-02-15	BP7217	BP2435	4190	87
BQ6713	2015-01-29	BP4378	BN9378	29	100
BQ6689	2015-01-27	BP7217	BP2529	44	100
BQ7170	2015-02-24	BP3438	BQ1190	24	100
BQ7016	2015-02-15	BP7217	BP2435	46	100
BQ6777	2015-02-01	BP7217	BP4262	58	100
BQ6723	2015-01-29	BP7217	BP310	7580	76
BQ7174	2015-02-24	BP3438	BQ1190	41	100
BQ7034	2015-02-16	BP7217	BQ1299	28	100
BQ6874	2015-02-08	BP6083	BN9373	40	100
BQ6817	2015-02-05	BP3438	BP8938	29	100
BQ6510	2015-01-16	BP7285	BP5961	6968	78
BQ7036	2015-02-16	BP7217	BQ1299	36	100
BQ6970	2015-02-13	BP6083	BP7371	41	100
BQ6930	2015-02-10	BP6083	BP2261	21	100
BQ6596	2015-01-22	BP3438	BP8420	4643	85
BQ7068	2015-02-17	BP8692	BP689	3899	88
BQ6986	2015-02-13	BP6083	BP5110	39	100
BQ6977	2015-02-13	BP6083	BP7371	42	100
BQ6601	2015-01-22	BP7285	BP8385	19	100
BQ7149	2015-02-23	BP3438	BP7595	36	100
BQ6989	2015-02-13	BP4378	BQ1230	21	100
BQ6994	2015-02-13	BP8692	BP7406	3131	89
BQ7168	2015-02-24	BP7217	BP7547	45	100
BQ7072	2015-02-17	BP8692	BP689	3940	87
129-1	2015-04-22	119176007A	117086001A	0	0
BQ7012	2015-02-15	BP7217	BP1269	45	100

(4) 정액성상 검사 (2016.03.31.)

(가) 정액의 pH 분석

① pH 검사는 수소이온 농도를 측정하는 것으로 본 실험에선 Istek사의 pH meter로 측



정하였다

- ② 측정 전 pH 4, 7, 10의 표준용액을 활용하여 분석기기를 교정한 뒤 정액 5ml을 이용하여 측정하였다.

	명호	채취날짜	2일차	3일차	6일차	7일차
1	YG7109	3/29	6.86	6.95	6.96	6.95
2	118-6	3/28	6.87	6.92	6.91	6.93
3	128-10	3/28	6.84	6.86	6.85	6.99
4	121-10	3/28	6.92	6.98	6.99	6.82
5	Y638-5	3/29	6.93	7.03	7.07	7.05
6	6775	3/28	-	6.91	6.90	6.86
7	6776	3/28	-	6.87	6.82	6.76

(나) 정액의 삼투압 측정

- ① 삼투압은 빙점강하도 측정 장치를 사용하며 본 실험에서 사용된 기기는 OSMOMAT 030D모델을 이용하였다.

- ② 분석 전 장비를 증류수와 조정용액으로 교정한 뒤 정액 50 $\mu$ l를 이용하여 측정하였다.

(단위 : mOSM/kg)

	명호	채취날짜	2일차	3일차	6일차	7일차
1	YG7109	3/29	298	297	294	298
2	118-6	3/28	302	300	297	301
3	128-10	3/28	299	296	297	299
4	121-10	3/28	301	298	297	298
5	Y638-5	3/29	298	299	293	297
6	6775	3/28	-	294	292	296
7	6776	3/28	-	297	296	299

(다) 정액의 활력도 검사

	명호	채취날짜	2일차	3일차	6일차	7일차
1	YG7109	3/29	(+-)	(++)	(+)	(+)
2	118-6	3/28	(+)	(++)	(++)	(++)
3	128-10	3/28	(++)	(++)	(++)	(++)
4	121-10	3/28	기형 및 미성숙	(+-)	(+-)	(-)
5	Y638-5	3/29	(-)	(+-)	(+-)	(+-)
6	6775	3/28		(+)	(+)	(+)
7	6776	3/28		(+-)	(++)	(+)

\* 활력표기 : 직선적 직진운동, 선회운동, 진자운동으로 구분하여 표시

(+++)	가장 활발한 진진운동	(+-)	선회 또는 진자운동
(++)	활발한 진진운동	(-)	움직임이 거의 없음

(+)	완만한 전진운동		
-----	----------	--	--

(5) 정액성상 검사 (2016.04.08.)

(가) 정액의 pH 분석

	명호	채취날짜	4일차	7일차	8일차	10일차
1	LG6235	4/3	6.92	6.90	6.95	6.89
2	L459-1	4/4	6.88	6.79	6.77	6.78
3	BQ7083	4/4	6.76	6.65	6.68	6.56
4	6661	4/3	6.73	6.72	6.72	6.73
5	Y930-4	-	6.87	6.83	6.85	6.88
6	YG7183	4/5	6.92	6.88	6.89	6.95

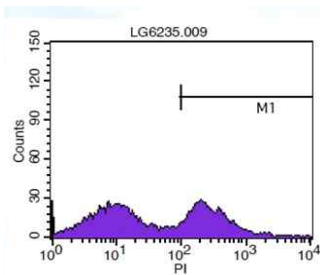
(나) 정액의 삼투압 측정

	명호	채취날짜	4일차	7일차	8일차	10일차
1	LG6235	4/3	297	296	269	292
2	L459-1	4/4	299	298	298	295
3	BQ7083	4/4	299	300	295	295
4	6661	4/3	296	297	299	293
5	Y930-4	-	301	303	300	299
6	YG7183	4/5	294	296	296	294

(다) 정액의 활력도 검사

	명호	채취날짜	4일차	7일차	8일차	10일차
1	LG6235	4/3	(++)	(+)	(+-)	(-)
2	L459-1	4/4	(+)	(+)	(+)	
3	BQ7083	4/4	(+++)	(++)	(++)	(++)
4	6661	4/3	(++)	(++)	(++)	
5	Y930-4	-	(++)	(++)	(+)	
6	YG7183	4/5	(++)	(+)	(+-)	

(라) 정액의 생존율 검사 (7일차 실시)

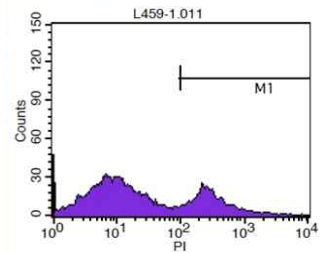


File: LG6235.009  
 Sample ID: LG6235  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 11-Apr-16  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: PI (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	193.23	40.57	267.39	30.23	1
M1	96, 9910	4164	41.64	41.64	440.81	293.06	166.02	252.55	162

**LG6235 생존율 : 58.36%**

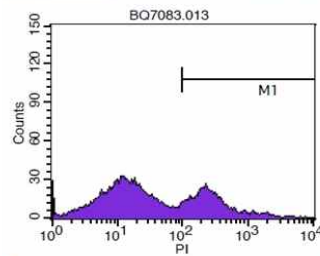


File: L459-1.011  
 Sample ID: L459-1  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 11-Apr-16  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: PI (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	137.98	25.45	293.20	15.12	1
M1	96, 9910	2953	29.53	29.53	432.51	298.64	151.72	259.46	203

**L459-1 생존율 : 70.47%**

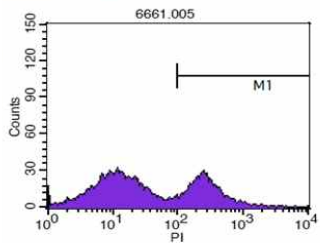


File: BQ7083.013  
 Sample ID: BQ7083  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 11-Apr-16  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: PI (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	145.16	34.56	281.32	23.08	1
M1	96, 9910	3202	32.02	32.02	411.56	275.55	156.66	235.01	235

**BQ7083 생존율 : 67.98%**

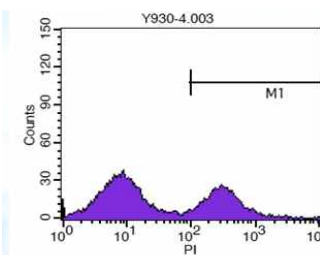


File: 6661.005  
 Sample ID: 6661  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 11-Apr-16  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: PI (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	141.15	35.69	257.53	22.88	230
M1	96, 9910	3499	34.99	34.99	370.36	275.80	146.97	248.05	230

**6661 생존율 : 65.01%**

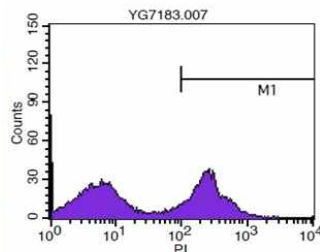


File: Y930-4.003  
 Sample ID: Y930-4  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 11-Apr-16  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: PI (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	165.53	31.57	263.79	14.59	8
M1	96, 9910	3658	36.58	36.58	431.20	317.32	148.43	298.27	228

**Y930-4 생존율 : 63.42%**

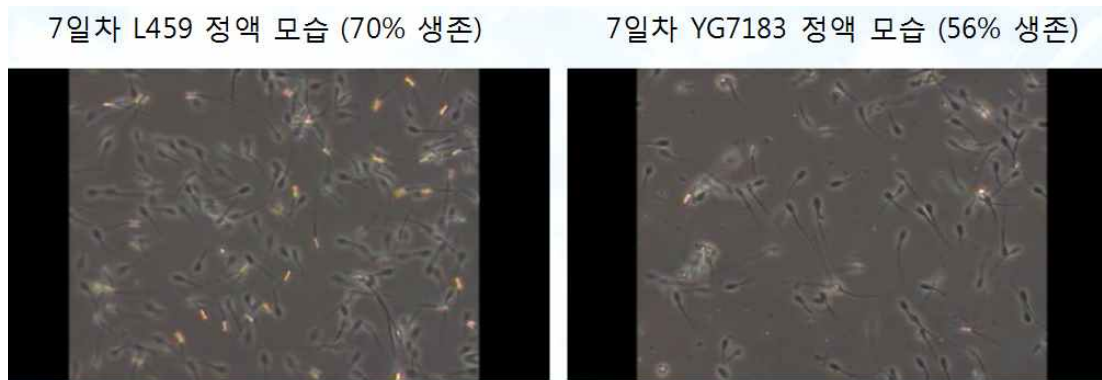


File: YG7183.007  
 Sample ID: YG7183  
 Tube: Untitled  
 Acquisition Date: 11-Apr-16  
 Gated Events: 10000  
 X Parameter: PI (Log)

Log Data Units: Linear Values  
 Patient ID:  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Gate: No Gate  
 Total Events: 10000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	149.75	31.91	218.90	21.29	1
M1	96, 9910	4306	43.06	43.06	331.25	264.83	132.00	245.82	283

**YG7183 생존율 : 56.94%**



#### 4. 4차 년도 연구 결과

##### 가. 융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발

###### (1) 자궁 조직 유래 산자수 연관 DMR의 선별 및 후성유전체 마커의 확립

산자수 연관 DMR의 재현성 검증을 통하여 최종적으로 산자수 증대를 위한 후성유전체 마커를 확립하는 전체적인 연구 개요는 다음과 같음 (Fig. 1)

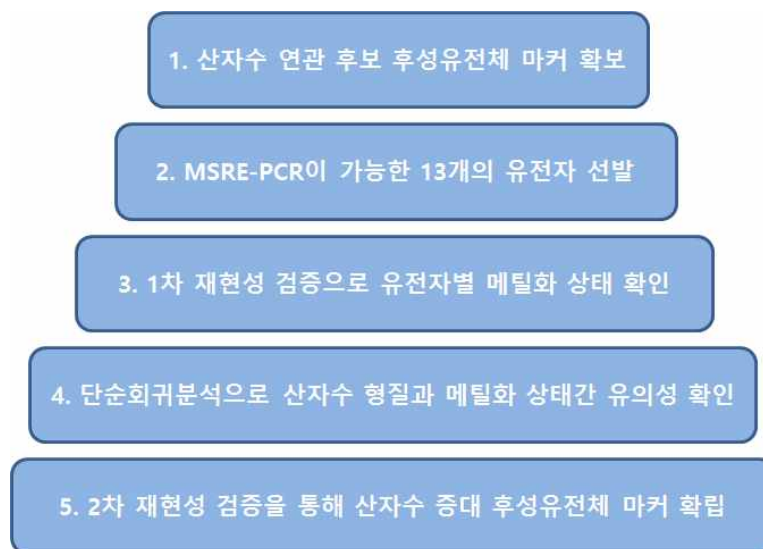


Figure 1 Chart flow of analysis DMRs in reproductive traits associated gene.

후성유전체학적 분석 방법인 MSRE-PCR을 이용하여 산자수 연관 DMR에 대한 재현성 검증하기 위하여 후보 DMR 유전자를 선별하였음. MSRE-PCR이 가능한 DMR 유전자 13개를 선별하였고, 유전자들의 정보는 아래 표와 같음 (Table 1).

**Table 1. The information of candidate DMRs**

No.	Gene name	No. of CpG	Pattern	Log2 (BEH/BEL)	P-value (P<0.01)	FDR (Q<0.01)	Methylation difference (H-L)
1	HOXB3	31	Hypo	-1.918	9.65E-10	2.13E-07	0.3332
2	PPAP2B	7	Hypo	-1.289	1.35E-06	6.97E-05	0.2552
3	ZPBP	50	Hypo	-1.014	1.32E-14	1.89E-11	0.2201
4	SMC1A	12	Hypo	-0.979	0.0011	0.0054	0.2020
5	MLLT4	19	Hypo	-0.614	5.59E-05	0.0009	0.2248
6	GBP1	7	Hyper	4.251	0.0094	0.0098	-0.2311
7	IGFBP4	6	Hyper	2.813	0.0022	0.0069	-0.2148
8	TGFB2	10	Hyper	1.522	0.0024	0.0073	-0.3227
9	TBX3	20	Hyper	1.323	1.92E-07	1.59E-05	-0.3340
10	MDF1	12	Hyper	1.278	0.0035	0.0088	-0.2397
11	IDO1	12	Hyper	1.204	0.0079	0.0093	-0.2577
12	SCAF8	7	Hyper	0.795	0.0012	0.0055	-0.2976
13	KIF25	13	Hypo	1.522	0.0005	0.0035	0.3314

MSRE-PCR을 수행하기 위해 선발된 13개 유전자의 genomic DNA의 서열을 확보하여 각 유전자의 서열에서 MSRE (*Msp* I/*Hpa* II ; CCGG)의 위치와 CpG를 확인하여 아래 표와 같이 primer를 제작하였음 (Table 2).

**Table 2. The information of primer sequence used MSRE-PCR**

No.	Gene	Primer sequence	size (bp)
1	homeobox B3 (HOXB3)	F: GGAGGAGGAGGCAGTGGT R: ACAGGTAGCGGTTGAAGTGG	157
2	phosphatidic acid phosphatase type 2B (PPAP2B)	F: TCCGCTGGTGGCCTTGGACA R: AAAGGAAACGCAGTTATCGG	159
3	zona pellucida binding protein (ZPBP)	F: TCAGGTGAGGCGTCGGCAT R: CGTCATCAATGTCCAGTCCT	162
4	structural maintenance of chromosomes 1A (SMC1A)	F: TGGCTCTGGTGAGATAAGCC R: GGTTCGCAACACTTCTGGTT	112
5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to, 4 (MLLT4)	F: GTGTGTTTTGTTTGCTTTAA R: ACCGTGAGGACGCGGAGTCA	195
6	guanylate binding protein 1, interferon-inducible (GBP1)	F: GGCAGCTGAGCCTGCTGTGA R: GTGCAGTCAACACAGACAGA	170
7	insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4)	F: ATGCTGGGACTCCGGCCCCAA R: AACGTTTTCTGCTGACCCAT	196
8	transforming growth factor,	F: TGCGACCCATGCTTATCTAT R: AGGCCCGGAGTTTCATTTTT	193

	beta 2 (TGF-β2)		
9	T-box 3 (TBX3)	F: CGAATGTTCCCTCAGAGGTC R: ATGTCGTTGGCTCTCACGAT	212
10	MyoD family inhibitor (MDFI)	F: TGGGGGTGTCTGAGTCTTCT R: GTGTGTGCCTGCAGAGTAGG	185
11	indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1)	F: CGCCTCCGCTATCTGATCT R: TAGAAAAGGGCAGCATTTGG	130
12	SR-related CTD-associated factor 8 (SCAF8)	F: TTAGTCCGAGCCCCTCTGA R: TCCTCTGTGTTTTCAAAAAGCTT	154
13	kinesin family member 25 (KIF25)	F: GGCGGGTATTATAACTGAGT R: CAGCAGGGCAGCGCCATCGA	138

차등 산자수를 가지는 모든 두 그룹의 (산자수 상/하) 혈액에서 genomic DNA을 분리하여 table 1.1.3에 기입된 13개의 유전자에 대해 1차, 2차에 걸쳐 재현성 검증을 실시하였음. 1차 검증에서 모든 140두에 대해 MSRE-PCR 방법으로 유전자별 메틸화 상태를 확인한 결과, IGFBP4, MLLT4, ZBPB, TGF-β2 유전자에서 산자수 상/하 그룹간의 메틸화 차이를 확인함 (Fig. 2).

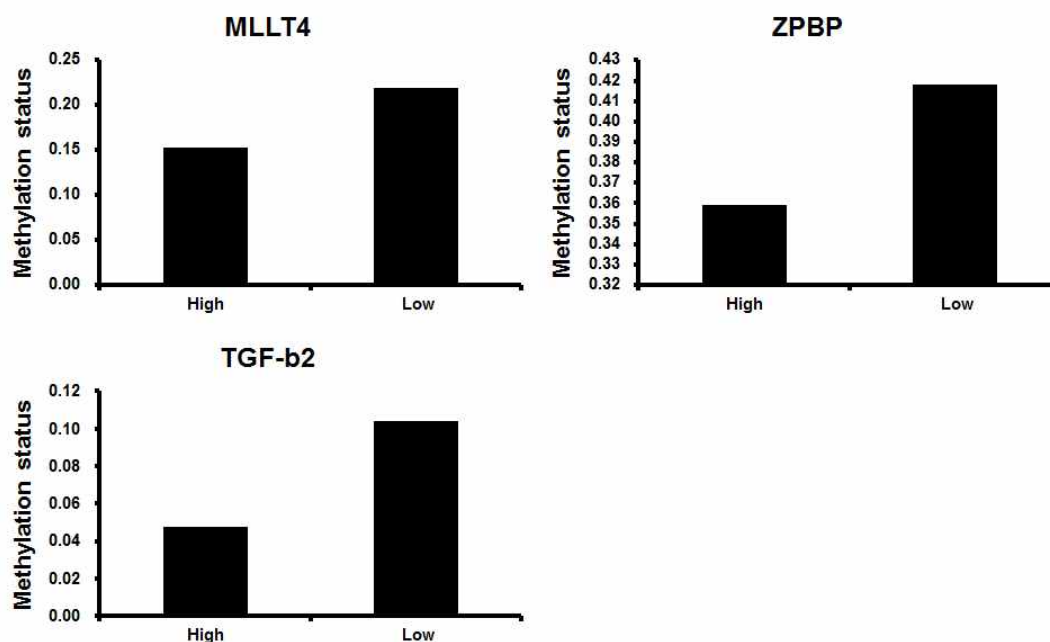


Figure 2 methylation status of DMR.

통계적 유의성을 확인하기 위해 단순회귀 분석을 수행함. 그 결과 1차 모든 140두에 대한 재현성 검증 결과 MLLT4, ZBPB, TGF-β2 유전자와 평균 총산자수간의 통계적 유의성을 확인하였음. 또한 2차 30두에 대한 재현성 검증 결과에서도 4개 유전자 모두 통계적 유의성을 확인

하였음. 그 결과는 다음과 같음 (Table 3-8).

단순회귀 분석의 모형은  $y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon_1$  으로  $y =$  종속변수로서 독립변수에 영향을 받을 것으로 생각되는 변수,  $\beta_0 =$  상수,  $\beta_1 =$  회귀계수,  $\varepsilon_1 =$  잔차 의미.

**Table 3. 1<sup>st</sup> linear regression result of association between TGF- $\beta$ 2 methylation status and litter size**

분산분석					
모형	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률
회귀모형	64.777	1	54.701	14.680	0.000
잔차	492.962	135	3.726		
합계	557.738	136			
계수					
모형	비표준화 계수	표준화 계수		t	유의확률
	B	표준오차	베타		
상수	8.007	0.214		37.389	0.000
TGF- $\beta$ 2	-6.989	1.824	-0.313	-3.831	0.000

**Table 4. 2<sup>nd</sup> linear regression result of association between TGF- $\beta$ 2 methylation status and litter size**

분산분석					
모형	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률
회귀모형	54.114	1	54.114	8.190	0.008
잔차	191.619	29	6.608		
합계	245.733	30			
계수					
모형	비표준화 계수	표준화 계수		t	유의확률
	B	표준오차	베타		
상수	5.210	1.159		4.495	0.000
TGF- $\beta$ 2	20.794	7.266	0.469	2.862	0.008

TGF- $\beta$ 2 유전자는 transforming growth factor, beta 2로 세포 분화, 증식, 발달 및 사멸에 관여하는 cytokine이며, 자궁 내막과 임신초기에 높게 발현되어 자궁내막에 수정란 착상 시 면역 억제와 기질세포 및 영양막 세포의 분화가 촉진되는 것으로 알려짐. Figure 2에서 차등 산자수 두 그룹의 메틸화 차이를 비교한 결과, 산자수 상위 그룹에서 저메틸화 상태를 확인함. 일반적으로 알려진 유전자의 메틸화와 발현의 negative correlation 일 때, 저메틸화가 확인된 산자수 상위 그룹에서 TGF- $\beta$ 2 유전자 발현이 높게 됨으로써 돼지의 자궁내막에 수정란의 착상률을 높이고 영양막 세포의 분화를 촉진하여 태반 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 예상되어 산자수 증대를 위한 후성유전체 마커로 활용 가능 할 것으로 사료됨 (Table 3-4).

Table 5. 1<sup>st</sup> linear regression result of association between MLLT4 methylation status and litter size

분산분석						
모형	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률	
회귀모형	64.777	1	64.777	17.739	0.000	
잔차	492.962	135	3.652			
합계	557.738	136				
계수						
모형	비표준화 계수		표준화 계수		t	유의확률
	B	표준오차	베타			
상수	8.179	0.232			35.216	0.000
MLLT4	-3.757	0.892	-0.341		-4.212	0.000

Table 6. 2<sup>nd</sup> linear regression result of association between MLLT4 methylation status and litter size

분산분석						
모형	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률	
회귀모형	53.867	1	53.867	8.142	0.008	
잔차	191.866	29	6.616			
합계	245.733	30				
계수						
모형	비표준화 계수		표준화 계수		t	유의확률
	B	표준오차	베타			
상수	5.771	0.985			5.860	0.000
MLLT4	8.176	2.865	0.468		2.853	0.008

MLLT4 유전자는 myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to, 4으로 또다른 명칭은 AF6/afadin으로 불리며 세포의 adherens junction 형성에 중요한 역할을 하여 세포 극성, 이동, 생존, 증식 및 분화에 관여 하는 것으로 알려짐. Figure 2에서 차등 산자수 두 그룹의 메틸화 차이를 비교한 결과, 산자수 상위 그룹에서 저메틸화 상태를 확인함. 유전자의 메틸화와 발현의 negative correlation 일 때, 저메틸화가 확인된 산자수 상위 그룹에서 MLLT4 유전자의 발현이 높게 나타나면 세포골격 형성을 도와 난모세포 발생 및 성장에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상되어 산자수 증대를 위한 후성유전체 마커로 활용이 가능 할 것으로 사료됨 (Table 5-6).



Table 7. 1<sup>st</sup> linear regression result of association between ZPBP methylation status and litter size

분산분석						
모형	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률	
회귀모형	26.663	1	26.663	3.697	0.057	
잔차	1002.579	139	7.213			
합계	1029.243	140				
계수						
모형	비표준화 계수		표준화 계수		t	유의확률
	B	표준오차	베타			
상수	8.643	0.311			27.780	0.000
ZPBP	-2.222	1.156	-0.161		-1.923	0.057

Table 8. 2<sup>nd</sup> linear regression result of association between ZPBP methylation status and litter size

분산분석						
모형	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률	
회귀모형	7.119	1	7.119	0.865	0.360	
잔차	238.615	29	8.228			
합계	245.733	30				
계수						
모형	비표준화 계수		표준화 계수		t	유의확률
	B	표준오차	베타			
상수	7.149	1.293			5.530	0.000
ZPBP	9.774	10.508	0.170		0.930	0.360

ZPBP 유전자는 zona pellucida binding protein으로 수정 과정에서 난모세포의 투명대를 붕괴하여 정자의 침투를 돕는 역할을 하는 것으로 알려짐. Figure 2에서 차등 산자수 두 그룹의 메틸화 차이를 비교한 결과, 산자수 상위 그룹에서 저메틸화 상태를 확인함. 유전자의 메틸화와 발현의 negative correlation 일 때, 저메틸화가 확인된 산자수 상위 그룹에서 ZPBP 유전자가 높게 발현되면 수정 능력을 향상시킴으로써 번식효율을 증대 시킬 것으로 예상되어 산자수 증대를 위한 후성유전체 마커로 활용이 가능 할 것으로 사료됨 (Table 7-8).

결과적으로 3개 유전자의 메틸화 상태가 평균 총산자수에서 유의한 결과를 확인함으로써 유전자별 메틸화 상태가 버크셔종의 산자수 형질에 영향을 미치는 것으로 판단. 이 유전자들을 이용하여 산자수가 증대된 버크셔종을 조기 선발하기 위한 후성유전체 마커로 활용이 가능 할 것으로 사료됨.

## (2) 산자수 증대 유전체 마커의 확립 및 계획교배

산자수 증대 유전체 마커의 확립 및 계획교배를 위한 전체적인 연구 개요는 다음과 같음 (Fig. 3).

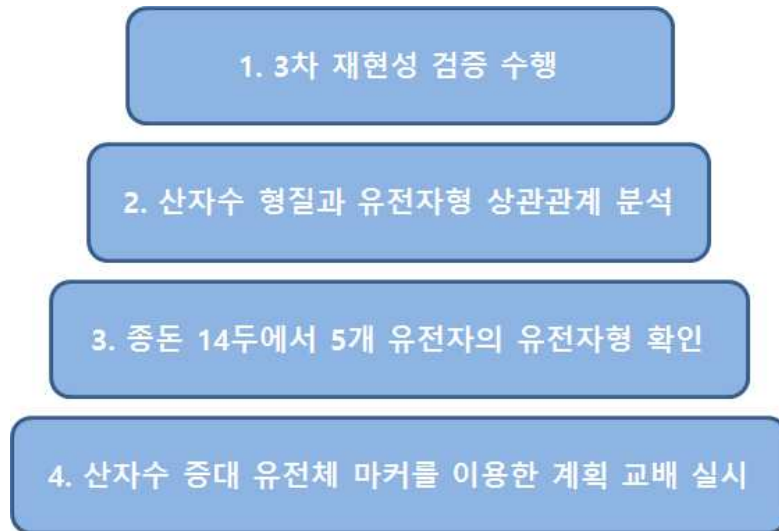


Figure 3 Chart flow of analysis SNPs in litter size associated gene.

3차년도에 확보된 산자수 연관 유전자는 총 5개이며, 그에 대한 SNP 정보는 Table 9와 같으며, 산자수 연관 유전자들에 대한 3차 재현성 검증 위해 Table 10의 primer를 이용하여 PCR-RFLP를 실시하였음.

Table 9. The information of SNPs

No.	Gene	location	Genotype	position
1	NAT9	chr12_NC_010454.3	A/G	g.4241
2	IGFBP2	Chr12_NC_010454.4	C/T	g.62266
3	IGFBP3	Chr15_NC_010457.5	T/A	g.3721
4	MAP3K3	chr18_NC_010460.4	A/G	g.25299
5	DACT3	Chr6_NC_010448.4	G/A	g.375

Table 10. Primer sequence used the validation of SNPs by PCR-RFLP

No.	Gene	Primer sequence	°C, cycle
1	N-acetyltransferase 9 (NAT9)	F: GGCCGTGAGCAGTGTCTT R: CCCTCAACTCTGGCTCCA	62, 35
2	Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	F: GGAACTTGCTCACCCCTTGT C R: CAGGAAGAAGCCCAGGTAT G	60, 35
3	Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)	F: CAAATGGCGAAAACATGGG TC R: AGCACAAATAGACCCTGCC GAA	62, 35
4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 (MAP3K3)	F: CAAGTCTCAAGCACGGACA C R: GCCAGGGGCTCTCTCTTTT	65, 35
5	Dishevelled binding antagonist of beta catenin 3 (DACT3)	F: GGCGCCTATGCAGATGAGA C R: GGCCCCTCACCAGCTGCTCT	62, 35

산자수 증대 유전체 마커에 대한 재현성 검증은 버크셔종의 모든 30두(차등 산자수 상/하)과 중빈돈 14두의 혈액에서 분리한 genomic DNA 이용하여 PCR-RFLP를 통해 검증하였음. PCR 산물에 각 유전자의 서열을 특이적으로 인식하는 제한효소를 처리하여 확인하였고, agarose gel 전기영동을 통해 유전자형을 확인하였음. 유전자형 분석은 Table 11에 표기된 유전자형 정보를 기반으로 분석하였음.

**Table 11. The genotype information of SNPs**

No.	Gene	PCR 산물 크기(bp)	유전자형 크기(bp)
1	NAT9	431	GG: 431 AG: 431+295+136 AA: 295+136
2	IGFBP2	361	AA: 252+176 AT: 428+252+176 TT: 428
3	IGFBP3	438	GG: 345+110 GA: 455+345+110 AA: 455
4	MAP3K3	700	AA: 700 AB: 700+510+190 BB: 510+190
5	DACT3	388	GG: 226+162 GA: 388+226+162 AA: 388

당해연구에서 3차로 모든 30두에서 NAT9, IGFBP2, IGFBP3, MAP3K3, DACT3 유전자에 대해 재현성 검증을 수행한 결과, GG 유전자형만 나타난 DACT3 유전자를 제외한 4개 유전자에 대해 통계적 유의성을 확인하였음. 그 결과 NAT9, IGFBP2, IGFBP3, MAP3K3 유전자와 상관관계를 확인하여 산자수 증대 유전체 마커로 확립함. 또한, DACT3 유전자는 Dishevelled binding antagonist of beta catenin 3로 wnt signalling에서  $\beta$ -catenin에 antagonism하는 것으로 알려짐. 이전 1차, 2차 검증 결과에서 평균 총산자, 평균 실산자, 총산자수에 대한 육종가 및 실산자수에 대한 육종가와 상관관계가 검증되어 산자수 증대 유전체 마커로 확립함.

**Table 12. 3<sup>rd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits**

		NAT9	<i>P</i> value
형질		평균 총산자수	0.6858
		육종가 (총산자)	0.1794

**Table 13. 3<sup>rd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype**

SNP		NAT9		
Model		Codominant		
Genotype		AA (22)	AG (5)	GG (2)
traits	평균총산자	8.600±2.951	7.806±2.135	9.795±0.120
	육종가 (총산자)	0.056±0.923	-0.540±0.675	0.795±0.106

NAT9 유전자는 N-acetyltransferase 9로 번식 관련 유전자로 알려짐. 1차, 2차 검증에서 총산자수에 대한 육종가, 실산자수에 대한 육종가에서 상관관계가 높은 것으로 확인하였고, 당해연구의 3차 검증에서 평균 총산자수, 평균 실산자수와 GG 유전자형간에 높은 상관관계를 확인함. 따라서 NAT9 유전자를 유전체 마커로 활용 할 경우 GG 유전자형이 나타나면 다산성을 가진 개체로 유추 할 수 있을 것으로 사료되어 산자수 증대 유전체 마커로 확립함 (Table 12-13).

**Table 14. 3<sup>rd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits**

		IGFBP2	<i>P</i> value
형질		평균 총산자수	0.0118
		육종가 (총산자)	0.0246

**Table 15. 3<sup>rd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype**

SNP		IGFBP2	
Model		Codominant	
Genotype		AA (21)	AT (6)
traits	평균총산자	7.848±2.306	10.556±1.386
	육종가 (총산자)	-0.230±0.611	0.637±0.611

IGFBP2와 IGFBP3 유전자는 Insulin-like growth factor binding protein 2와 3으로 성장인자인 IGF1, IGF2와 결합한 복합체로써 신호전달에 활성화 시켜 태아의 성장에 영향을 미치는 것으로 알려짐. IGFBP2 유전자는 1차, 2차 검증에서 평균 총산자, 평균 실산자, 총산자수에 대한 육종가와 상관관계가 높은 것으로 확인하였고, 당해연구 3차 검증에서 평균 총산자, 총산자수에 대한 육종가에서도 상관관계가 높은 것으로 확인함 (Table 16-17).

**Table 16. 3<sup>rd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits**

IGFBP3		<i>P</i> value
형질	평균 총산자수	0.0906
	육종가 (총산자)	0.0826

**Table 17. 3<sup>rd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype**

SNP		IGFBP3		
Model		Codominant		
Genotype		AA (12)	AG (8)	GG (4)
traits	평균총산자	8.028±2.099	10.400±2.642	9.250±1.700
	육종가 (총산자)	-0.403±0.808	0.332±0.885	0.388±0.774

IGFBP3 유전자는 1차 검증에서 평균 총산자, 평균 실산자, 총산자수에 대한 육종가, 실산자수에 대한 육종가와 상관관계가 높았고, 2차 검증에서 총산자수에 대한 육종가, 실산자수에 대한 육종가와 상관관계가 높은 것으로 확인하였음. 하지만 당해연구 3차 검증에서는 상관관계를 확인 할 수 없었음. 그러나 IGFBP2의 AT 유전자형을, IGFBP3의 GG 유전자형을 나타내는 경우 다산성을 가진 개체로 유추 할 수 있을 것으로 사료되어 산자수 증대 유전체 마커로 확립함 (Table 16-17).

**Table 18. 3<sup>rd</sup> statistical significant result of the association between genotype and reproductive traits**

MAP3K3		<i>P</i> value
형질	평균 총산자수	0.1139
	육종가 (총산자)	0.2691

**Table 19. 3<sup>rd</sup> result of mean and std of reproductive traits according to genotype**

SNP		MAP3K3	
Model		Codominant	
Genotype		CC (23)	CT (6)
traits	평균총산자	7.761±2.528	9.635±2.388
	육종가 (총산자)	-0.140±0.907	0.325±0.869

MAP3K3 유전자는 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3로 세포 분열에 관여하는 유전자로 알려져 있으며, 1차 검증에서 평균 총산자, 평균 실산자, 총산자수에 대한 육종가와 상관관계가 높은 것으로 확인함. 하지만 2차, 3차 검증에서는 통계적인 유의성을 확인 할 수 없었지만, 유전자형에 따른 평균 총산수, 평균 실산자수를 비교해 보면 CT 유전자형의 빈도가 높게 나타남으로써 MAP3K3 유전자를 유전체 마커로 활용 할 경우 CT 유전자형이 나타나면 다산성을 가진 개체로 유추 할 수 있을 것으로 사료되어 산자수 증대 유전체 마커로 확립함 (Table 18-19).

**Table 20. The result of genotype in boars**

No.	Sample ID	NAT9	IGFBP2	IGFBP3	MAP3K3	DACT3
1	BQ7083	AA	AA	AG	CC	GG
2	BQ8393	AA	AT	AG	CC	GG
3	121-10	GA	AT	AA	CT	GG
4	BQ9185	AA	AT	AG	CC	GG
5	128-10	AA	TT	AG	CT	GG
6	BQ6675	AA	AA	AA	CT	GG
7	BQ7430	AA	AA	AG	CC	GG
8	BR737	AA	AA	AA	CC	GG
9	BQ8162	GA	TT	AG	CT	GG
10	129-2	GA	TT	AA	CC	GG
11	BQ8788	GA	AT	AA	CC	GG
12	BQ8262	AA	TT	AA	CC	GG
13	BQ8693	AA	TT	GG	CC	GG
14	118-6	GA	AT	AG	CC	GG

모든에서 재현성 검증된 NAT9, IGFBP2, IGFBP3, MAP3K3, DACT3 유전자를 산자수 증대 유전체 마커로 활용하여 산자수가 증대된 버크셔종을 생산하기 위한 교배조건을 계획하기

위해 버크셔종의 중빈돈 14두의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 유전자형 분석을 수행함. 그 결과 Table 20과 같은 유전자형을 확보하였음. 이 결과를 토대로 하여 중빈돈 1두를 선발하였고, 모돈은 현재 생존하고 있는 1두를 선발하여 교배조건을 계획하였음.

5개 유전자의 유전자형 중 이형형질 유전자형이 확인된 IGFBP2와 MAP3K3를 제외하고 동형형질 유전자형이 확인된 NAT9, IGFBP3, DACT3를 이용하여 교배조건을 계획하였음 (Table 21).

**Table 21. The scheme of Berkshire pig breeding**

Boar	118-6		
	NAT9 (AG)	IGFBP3 (AG)	DACT3 (GG)
Sow	BP8921 (average total born : 7.60)		
	NAT9 (AG)	IGFBP3 (GG)	DACT3 (GG)

결과적으로 산자수 증대 유전체 마커를 활용하는 방법은 본 연구팀이 가장 이상적으로 생각하는 교배조건인 3개 유전자 모두 GG 유전자형인 돼지를 생산했을 때 산자수가 평균 1.2두 정도 증대될 것으로 예상함. 하지만 중빈돈(118-6)과 모돈(BP8921)에서 3개 유전자의 유전자형이 모두 GG 타입이 확인되지 않았지만, F1에서 F2까지 생산되는 자돈에 대해 계속적으로 산자수 추적을 수행하여 3개 유전자 모두 GG 유전자형을 가진 버크셔종을 생산 할 수 있을 것으로 사료됨.

**(3) 항병성 증대 DEG 설발 및 전사체 마커의 확립**

당해연구에서는 항병성 연관 DEG 선발 및 재현성 검증을 통해 질병에 강한 버크셔 품종을 조기 선발하기 위한 항병성 증대 전사체 마커를 확립함. 전체적인 연구 개요는 다음과 같음 (Fig. 4).



**Figure 4. Chart flow of analysis DEGs in immunity associated gene**

자궁 조직 유래 항병성 연관 DEG의 선발을 위해 전체 전사체의 발현 프로파일에서 gene card 프로그램을 이용하여 면역 관련 term 으로 질병 저항성 유전자를 찾기 위한 DEG를 면역 카테고리별로 정렬하고 그들 중 우선적으로 전사체 발현량이 상향(up-regulation) 또는 하향(down-regulation)으로 확연히 차이가 나는 유전자들을 상향 유전자 18개, 하향 유전자 10개로 총 28개를 선발하였고 그에 대한 raw data는 다음과 같음 (Table 22-23).

**Table 22. The information of up-regulation in DEGs**

No.	Gene	Log2	<i>P</i> value
1	Prostaglandin E2 receptor EP2 subtype (PTGER2)	3.1627	0.0001
2	Retinol-binding protein 4 (RBP4)	6.8929	5.00E-05
3	Early activation antigen CD69 (CD69)	3.9759	5.00E-05
4	Interferon epsilon (IFNE)	2.2178	0.0075
5	Connective tissue growth factor (CTGF)	2.9952	0.0007
6	Interleukin-18 receptor 1 (IL18R1)	2.0122	0.0169
7	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3 (ERBB3)	2.8891	0.0001
8	Alpha-2-macroglobulin (A2M)	2.1365	0.0018
9	Insulin-like growth factor I (IGF1)	2.0048	0.0133
10	Vascular endothelial growth factor D (FIGF)	2.3867	0.0002
11	olute carrier family 28 member 3 (SLC28A3)	3.4761	0.0001
12	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD)	3.4057	0.0163
13	Nitric oxide synthase, brain (NOS1)	3.5875	5.00E-05
14	Solute carrier family 12 member 2 (SLC12A2)	3.6712	5.00E-05
15	High affinity copper uptake protein 1 (SLC31A1)	2.0154	0.00095
16	ATP-binding cassette sub-family A member 1 (ABCA1)	2.1545	5.00E-05
17	Neuronal pentraxin-1 (NPTX1)	2.1584	5.00E-05
18	Interleukin-13 receptor subunit alpha-2 (IL13RA2)	2.1754	0.0163

**Table 23. The information of down-regulation in DEGs**

No.	Gene	Log2	<i>P</i> value
1	C-C motif chemokine 4 (CCL4)	-2.9873	0.025
2	Antigen KI-67 (MKI67)	-1.5338	0.0004
3	Prolactin receptor (PRLR)	-1.7370	0.0014
4	Glutaredoxin-1 (GLRX)	-2.0772	0.0003
5	F-box only protein 32 (FBXO32)	-2.1635	0.0001
6	E-selectin (SELE)	-2.9928	0.0389
7	C-X-C motif chemokine 9 (CXCL9)	-2.4009	0.0006
8	C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10)	-1.5090	0.0372
9	Transmembrane glycoprotein NMB (GPNMB)	-1.8009	0.0140
10	Myeloid differentiation primary response protein (MyD88)	-2.3896	5.00E-05



선발한 항병성 연관 DEG 28개에 대한 재현성 검증을 위해 RT-PCR을 이용하여 mRNA의 발현양상 분석에 앞서, NCBI에서 각 유전자별 mRNA 서열을 확보 및 primer를 제작하였음. 그에 따른 primer 정보는 아래 표와 같음 (Table 24).

**Table 24. Primer sequence used RT-PC**

No.	Gene	Primer sequence	Size (bp)
1	PTGER2	F: GCACTTACCTGCGGCTTTAT R: CATCTCCTCCGCCACTGATA	200
2	RBP4	F: TGAGCAGCTTCCGAGTCAA R: GGGTCCTCGGTGTCTGAAA	232
3	CD69	F: GTGCTGTGGTGAATGTGGTC R: GTGGTGTTTGGAGCAGAAGC	233
4	IFNE	F: TTTCTCTGGATGGTTGGGAG R: CGGTTGATTTCTACTCGGACA	235
5	CTG	F: ACAGCCAAAGATGGTGCC R: CGTCACACACCCACTCCTC	170
6	IL18R1	F: AGAATGTCCGCCAGAGAATG R: TGAAGTCACCCACAGGTGTA	299
7	ERBB3	F: ATGCTCAGAACGAATGTCCG R: TCCAAGTAGCGCCTCATAGC	232
8	A2M	F: CCTCAGTCTCTGGAAAACCG R: CTGTGGTCCGCTTCTGAAT	291
9	IGF1	F: TGCCCAAGGCTCAGAAGTAT R: TTGCCTGCGTTCAGTTCTA	189
10	VEGFD	F: TGGTGCAGGGCTTCAGTTAT R: CATAGAAAGTGCCGCAA	231
11	SLC28A3	F: CAAGTCACCATTGAGGAGGATT R: AGGAAGGGCTCTGTGGAAGT	219
12	HPGD	F: CGGACCAGGCACAACCTAGA R: GCCTCCTTCACCTCCATTTT	197
13	NOS1	F: CCTCAAGGTCAAGAACTGGG R: GAACTCTTTGGCGAGAGGAA	184
14	SLC12A2	F: AAGTACACCAACCCGAGAGG R: CCTATTCTGCTTGACCCAC	162
15	CTR1	F: CCACCTTCTCATCATCACCC R: AGGCATGGAATTGTACCGAA	246
16	ABCA1	F: CCCACCCTATGAACAACATGA R: AGGCGAGACACAATGGACTT	177
17	NPTX1	F: CTTATCGAGTGGGGCAACA R: GTGGCTTGATGGGGTGATAG	199
18	IL13RA2	F: TTGCACAGCATTGCTCTA R: GCTTCACTATCAATGTTTCGG	193
19	CCL4	F: CTGCTGCTTACATACACCG R: TCAGTTCAGGTCATCCATGT	176
20	MKI67	F: ACCCAAGTGAATGGATCTGC R: TTCCTGTTCCCGTCTCTGTC	153

21	PRLR	F: CTGCCTGTGGAAAGAGAAGG R: ACCAGCAGGTGAATGTTTCC	170
22	GLRX	F: AGAACGGTACCTCGGGTCTT R: CAAGGGAGCTATCAGCTTGG	153
23	FBXO32	F: TCCTCCAGACCCTCTACACG R: CGGCCATCACTTAGCCTTT	226
24	SELE	F: CATCTGGTCGCAATTCAAAA R: GTAGCACAAGGCGAGCTTCT	282
25	CXCL9	F: TGAAGAAAAGCAGTGTGCGC R: TTCTCACAAGAAGGGCTTGG	178
26	CXCL10	F: ATGGTTCATCATCCCGAGC R: GGAAAGCAGTAGAAGCCAC	275
27	GPNMB	F: CTACAAGTGGAAATTTGGGGA R: GTTTTTGGAGGTCTGGGTGA	159
28	MyD88	F: CGTCGGATGGTAGTGGTTGT R: AGGATGCTGGGGAACCTTT	155

RT-PCR을 통해 수행한 항병성 연관 DEG의 재현성 검증은 버크셔종의 차등 산자수 두 그룹의 자궁 조직 6개에서 total RNA를 분리하여 수행하였고, 그 결과 MKI67, SLC28A3, HPGD, CTGF 및 PTGER2를 확보함 (Fig. 5-9).

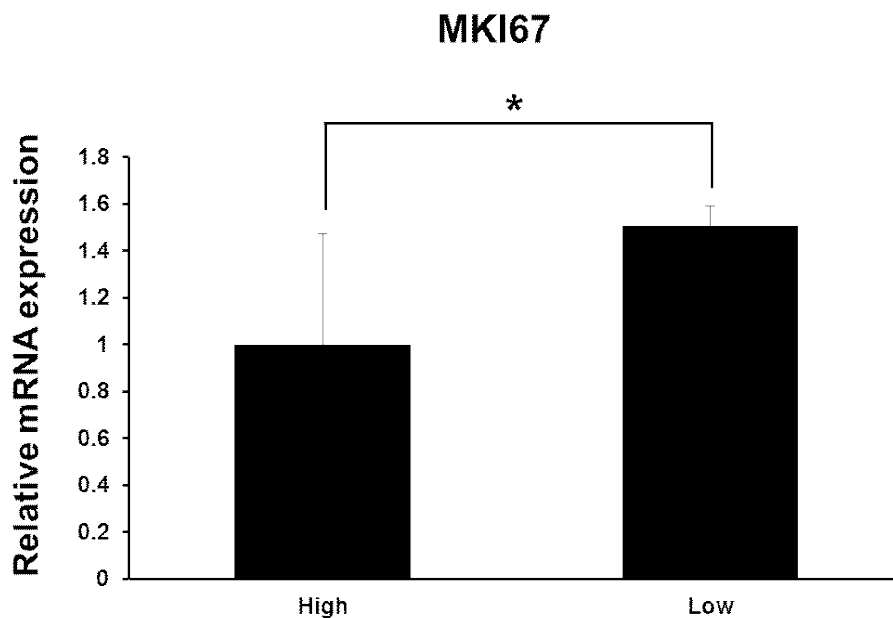


Figure 5 The validation of MKI67 by RT-PCR.

(가) *MKI67*은 세포 주기 및 세포 증식과 관련된 핵 단백질임. *MKI67*은 rRNA 전사와 관련되어 있으며, 일반적으로 세포 분열의 마커로 사용되며 세포주기 (G1, S, G2, M)의 모든 단계에서 발현 되지만 휴식 (G0) 세포에는 존재하지 않음. 생식과 관련한 *MKI67*의 기능은

cold-inducible RNA binding protein (CIRP) 형질 전환 쥐 실험을 통해 밝혀졌는데 임신기간에서 수유기로 전환에서 유선세포의 증식을 억제함 (Lujan 등, 2016). 또한, *MKI67*의 발현은 자간전증과 관련이 있는 것으로 밝혀졌는데 자간전증은 산모의 사망 위험이 높은 임신 관련 질환으로, 태반의 혈관 기능 장애가 병리적 특징임. 자간전증의 환자에서 태반의 영양막 세포에서 *MKI67*의 발현이 증가하는 것을 확인함 (Kaya 등, 2015).

(나) 언급한 것과 같이 *MKI67*은 번식과 연관된 기능을 가지며 본 연구에서 산자수 상/하위 그룹의 돼지 자궁조직에서 *MKI67*의 전사체 발현양상을 확인한 결과, 산자수 하위 그룹에서 발현이 높게 나타남. 번식과 관련된 질병에서 병리학적 심각성에 기인하는 해당 유전자의 발현이 산자수 상위 그룹에서 감소하는 것으로 확인되어 산자수 증가에 긍정적으로 작용 할 것으로 사료됨. 또한, *MKI67*의 발현은 세포 증식과 강하게 연관되어 있어 종양 세포의 성장 분화를 측정하는 마커로 사용됨 (Li 등, 2015)에 따라 *MKI67*은 세포 증식 역할로 인해 악성 세포 또한 증식시킴으로 *MKI67*의 과발현은 돼지의 질병에 영향을 미칠 것으로 사료됨. 본 연구에서는, *MKI67*의 발현이 산자수 하위 그룹에서 높게 발현되는 것으로 산자수 상위 그룹에 비해 질병을 유도하는 악성 세포의 증식에 더 높은 연관성을 가질 것으로 사료됨. 따라서, *MKI67*의 발현이 낮게 되면 산자수 및 항병성이 증대된 돼지를 조기에 선발하여 육종 할 수 있을 것으로 사료됨.

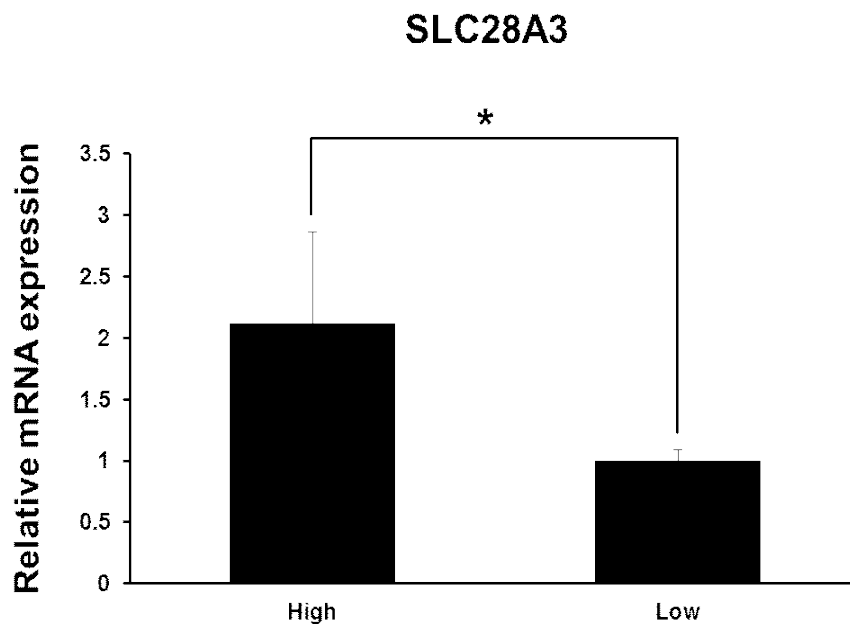


Figure 6 The validation of SLC28A3 by RT-PCR.

(다) *SLC28A3*는 ER에 존재하는 nucleoside (adenosine) transporter 유전자이며 nucleoside transporter 유전자들은 사람의 B세포에서 사이토카인이나 phorbol ester등에 의해서 발현하여 세포의 활성이나 증식에 관여함 (Pastor AM. 등, 2001). 아데노신은 면역 조절 물질로 밝혀져 항염증성 영향에 대한 사람 및 동물 모델에서 그 역할이 연구됨. 높은 농도의 아데노신이 세포 밖에서 면역매개성 바울병을 억제하는 효과가 증명됨. nucleoside transporter로서 *SLC28A3*의 발현이 이러한 역할을 촉진 할 것으로 예상되어 질병 저항성을 가지는 유전

자로서 기능을 할 것으로 사료되고, 태반에서 *SLC28A3*의 발현은 nucleoside의 수송을 매개하는 것으로 밝혀짐.

(라) 본 연구에서 산자수 상/하위 그룹의 돼지 자궁조직에서 *SLC28A3*의 전사체 발현양상을 확인한 결과, 산자수 상위 그룹에서 발현이 증가 하는 것으로 확인되어 자궁 내에 nucleoside 수송이 산자수에 긍정적인 역할을 할 것으로 기대됨. 또한 염증성 질환에 대한 질병 저항성이 증가 할 것으로 예상되어 산자수 및 항병성이 증대된 돼지를 조기에 선발하여 육종 할 수 있을 것으로 사료됨.

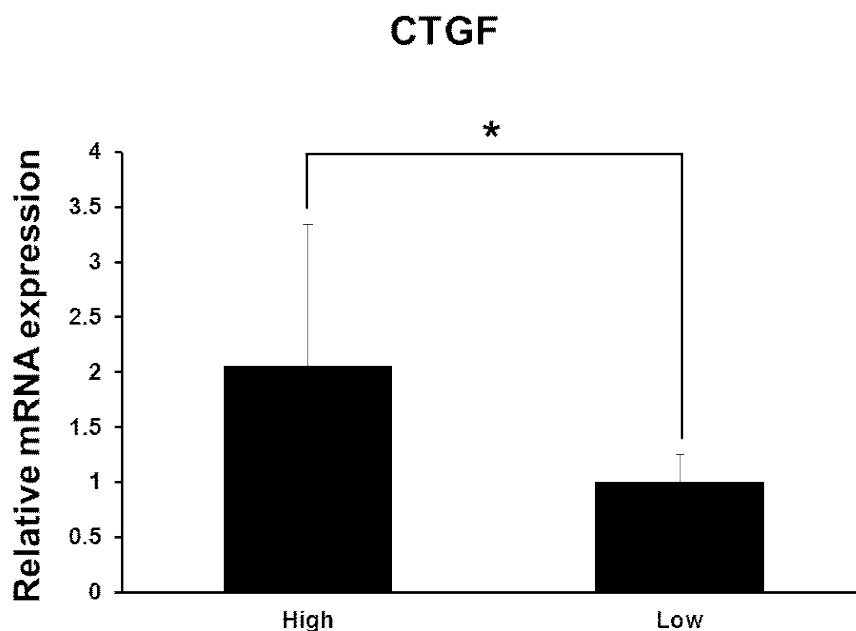


Figure 7 The validation of CTGF by RT-PCR.

(마) *CTGF*는 세포의 부착, 이동, 증식, 혈관 신생, 골격 형성 및 조직의 상처 복원 등 생물학적 과정에서 중요한 역할을 하는 유전자임. *CTGF*는 *CCN2*로 알려져 있으며 생식과 관련하여 extravillous trophoblast (EVT)의 trophoblast cell 부착과 네트워크 과정을 포함하여 임신 초기에 중요한 생리학적 현상을 조절함. 또한, *CTGF*의 발현이 임신 초기 자궁 내막의 탈락막에서 증가 하는 것으로 보고되어 (Waddel 등, 2011) 임신기간 내 중요한 역할을 할 것으로 사료됨. 돼지에서 *CTGF*의 발현은 *TGF-β1*에 의해 조절이 되며, *CTGF*가 발정 주기 및 임신기간 동안 생식기관에서 발현하는 것으로 확인됨 (Moussad 등, 2002). 선행 연구 결과에서 알 수 있듯 *CTGF*는 임신기간 동안 자궁에서 활발하게 작용하여 임신 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 사료됨.

(바) 본 연구에서 산자수 상/하위 그룹의 돼지 자궁조직에서 *CTGF*의 전사체 발현양상을 확인한 결과, 산자수 상위 그룹에서 *CTGF*의 발현이 높게 나타남. 또한, *CTGF*는 염증과 섬유증에 직접 영향을 미친다 (Derrick et al., 2016). *CTGF*는 *TGF-β1*에 의해 발현이 증가 하며 이렇게 증가된 *CTGF*를 통해 간질성 폐질환인 폐섬유증이 발생하는 것으로 알려짐 (Hothersall 등, 2006). 또한 *CTGF*는 *VEGF*의 기능 억제 역할을 담당하는데 *VEGF*는

결핵 등의 호흡기 질환에서 염증성 증상을 야기한다고 알려져 있음 (Bien My 등, 2015). 본 연구에서 산자수 상위 그룹에서 *CTGF*의 발현이 높은 것을 확인하였는데 *CTGF*의 발현 증가가 *VEGF*의 발현을 억제하여 상대적으로 결핵 등 호흡기 질환의 매개성 염증 증상을 감소시킬 것으로 예상됨. 따라서 돼지에서 *CTGF*의 발현이 증가하면 산자수 및 항병성이 증대된 돼지를 조기에 선별하여 육종 할 수 있을 것으로 사료됨.

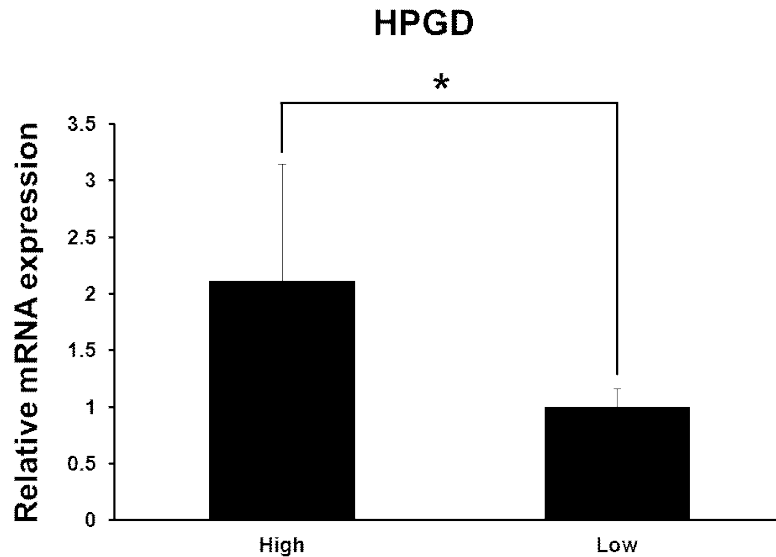


Figure 8 The validation of HPGD by RT-PCR.

(아) *HPGD*는 prostaglandin E<sub>2</sub> (*PGE*<sub>2</sub>)를 15-keto-*PGE*<sub>2</sub>로 전환시키는 효소이며 15-keto-*PGE*<sub>2</sub>는 *PGE*의 비활성화 형태로 *HPGD*는 세포 간 신호전달에서 *PGE*<sub>2</sub>의 repressor로 작용함. 최근 *HPGD*는 분만 기간 동안 Peroxisome proliferator-activated receptor isoform의 발현과 관련이 있고, 발정 주기에 따른 수축 관련 인자로 밝혀짐 (An 등, 2017; He 등, 2015). 따라서, *HPGD*는 번식 관련 유전자로써 산자수를 조절하는 단백질로 사료됨.

(자) 본 연구에서 산자수 상/하위 그룹의 돼지 자궁조직에서 *HPGD*의 전사체 발현양상을 확인한 결과 산자수 상위 그룹에서 *HPGD*의 발현이 높게 확인됨. 또한, *HPGD*는 lipopolysaccharide에 의한 염증 면역을 예방하는 것으로 알려져 있음 (Aisemberg 등, 2012). 따라서 돼지에서 *HPGD*의 발현이 증가하면 산자수 및 항병성이 증대된 돼지를 조기에 선별하여 육종 할 수 있을 것으로 사료됨.

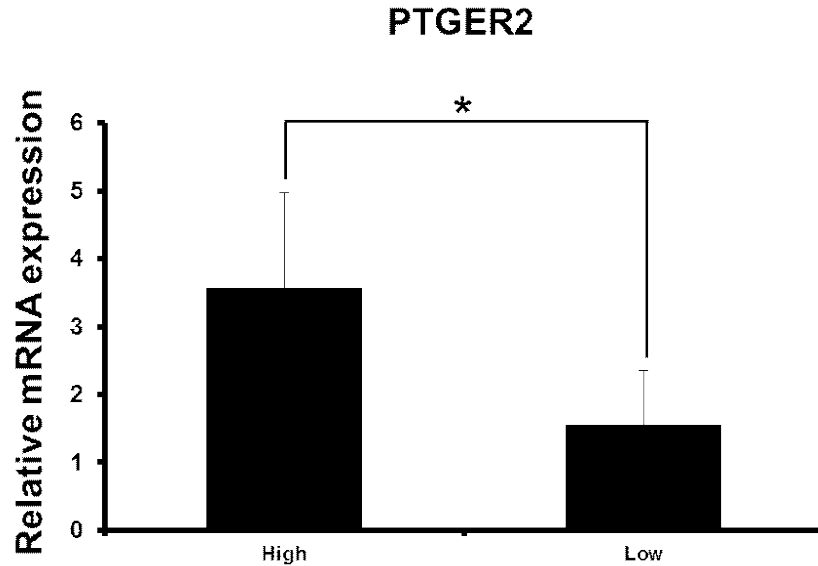


Figure 9 The validation of PTGER2 by RT-PCR.

(차) *PTGER2*는 아라키돈산 대사 물질인 prostaglandins E2 수용체를 암호화 한다. *PTGER2*는 *PGE<sub>2</sub>*에 의해 인코딩 되는 prostaglandins 수용체 *EP1*, *EP2*, *EP3*, *EP4*의 EP 수용체 중 하나임. *PTGER2*는 자궁경부 세포에서 기능이 잘 알려진 유전자로서 *PTGER2*의 DNA 메틸화가 유전자 발현을 억제하여 자궁경부가 prostaglandins에 덜 민감하게 만들기 때문에 임신 기간이 길어지는 것과 관련이 있어 조산을 예방하는데 효과적인 유전자로 알려져 있음 (Burriss 등, 2014). 또한, *PGE<sub>2</sub>*는 4개의 EP 수용체를 통한 신호 전달에 의해 염증신호에 깊은 연관성을 가지며 *EP2* 수용체는 *COX-2*와 병행하여 발현이 증가하고 *EP2* 수용체 자극은 *PGE<sub>2</sub>*의 섬유 아세포의 성장과 활성을 억제함 (Guerrero 등, 2015). 또한, *EP2*의 과발현은 lipopolysaccharide (*LPS*)에 의해 유도되는 chemokine (Cys-Cys motif) ligand 2 (*CCL2*)의 발현을 감소시켰고, *EP2* 수용체는 신장염에서 *CCL*과 같은 염증성 케모카인의 발현 대사 산물인 cyclo-oxygenase-2 (*COX-2*)을 하향 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음 (Zahner 등, 2009).

(카) 본 연구에서 산자수 상/하위 그룹의 돼지 자궁조직에서 *PTGER2* 발현을 확인한 결과 산자수 상위 그룹에서 *PTGER2* 발현이 높게 나타남. 이는 *PTGER2*가 산자수 상위 집단에서 염증 유발 가능성이 낮은 것으로 예상됨에 따라 질병 저항성을 가질 것으로 사료됨. 따라서 돼지에서 *PTGER2*이 발현이 증가하면 조산을 예방하여 산자수가 증가되고 면역에 대한 염증 유발 가능성이 낮아지는 것으로 예상되어 산자수 및 항병성이 증대된 돼지를 조기에 선발하여 육종 할 수 있을 것으로 사료됨.

#### (4) 산자수 연관 deletion mutant SNP에 대한 생화학적 기능 분석

산자수 연관 deletion mutant SNP 중에서 DACT3에 대한 molecular docking simulation program을 이용한 binding analysis를 수행함. DACT3는 dishevelled binding antagonist of beta catenin 3라고 하며, RNA-Seq 수행 결과 cDNA 서열의 96위치 G>A로 변이되어 아미노산 서열 32번째 Trp>Stop으로 끝나는 deletion mutant가 존재하게 됨. Benjamin N.R 등이 2002년에 in-situ hybridization analysis를 통하여 DACT가 dishevelled의 PDZ 도메인과의 상호작용을 매개하는 것을 확인(Fig. 10)함에 따라 dishevelled PDZ를 DACT3의 binding partner로 선택하여 구조분석을 수행함.

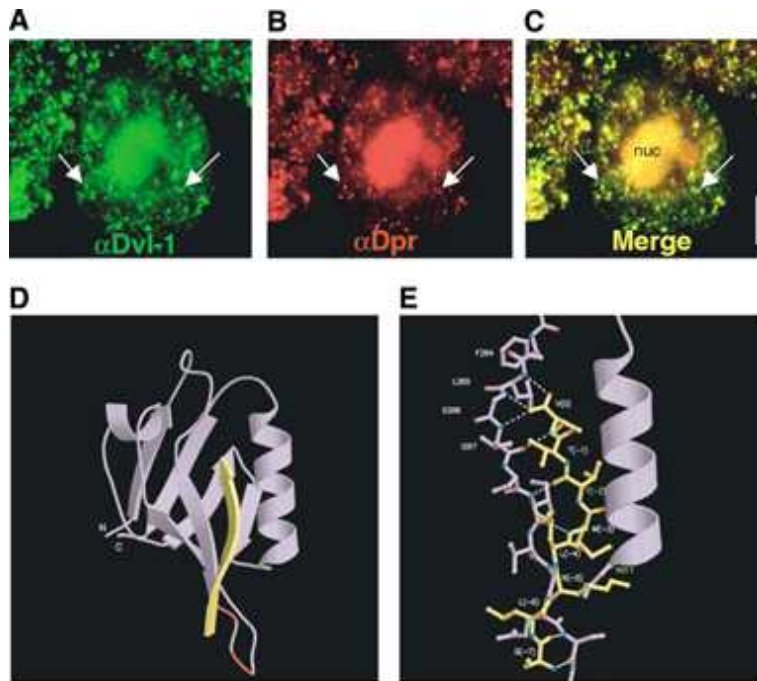


Figure 10 DACT Colocalize and Bind via XDsh PDZ Domain.

구조 분석을 위해 DACT3에서 구조 구성 및 결합 모델이 가능한 부분을 SLKVMTT (Magenta)로 표시함. 또한, 결합 구조를 보기 원하는 사이트인 N-term 부분 (32번 W를 포함)과는 차이가 있음 (Fig. 11).

```

MIRAFSFPVSPERGLRGWLEGLAGLCELHWLRERQEYRVQQALRLAQPGMGAAEAEDEEDEDADA
AAARRAAAALAEQLEALPGLIWDLGQQLGDLSESGGLEQESGRSSGFYEDPSSTGGPDSPPSTFCGDS
GFSGSGSYGRLGPPSEPRGIYASERPKSLGDASPSAPEAVGPRAAVPRSFSAFYPSAAGSAGPEACSSAE
RRARAGPFLTPSPLHAVALRSPRPGRPPDPDAAGAGRPLDGYISALLRRRRRRRGAGQPRTSPGGAD
GGPRRQNSVRQRPPDASPPPGGARPAPEPPVERAGGRPASPAPLGRAWASPWESEAPELAAPPVVPSP
PDSPAEGRLVKAQYIPGAQAATRGLPGRAARRKPPPLTRGRSVEQSPPRERPRRAAGRRGRMTESSGRRG
SPRARKASRSQSETSLGRATAVPPGPPKYPTAEREDPRPPRRRGPAPTLLAAQAAGSCRRWRSTAEID
AADGRRGRPRGPAARGPGPGSPSAPQRRLLYGCAGSDSECSAGRLGPLGRRGPTGGVGGGYGESESSA
SEGESPAFSSASSDSDGSGGLVWPQQLVAATAASGPVGGAGGGAPAGPAKVFKIKASHALKKKILFR
SGSLKVMTT
    
```

Figure 11 Sequence of DACT3.

Figure 12는 DACT3와 dishevelled의 PDZ 도메인이 결합하는 위치의 구조를 자세히 보여주고 있음. DACT3 (Magenta)와 dishevelled PDZ domain (Green)으로 표시된 부분이 서로 결합하는 것을 알 수 있음 (Fig. 12)

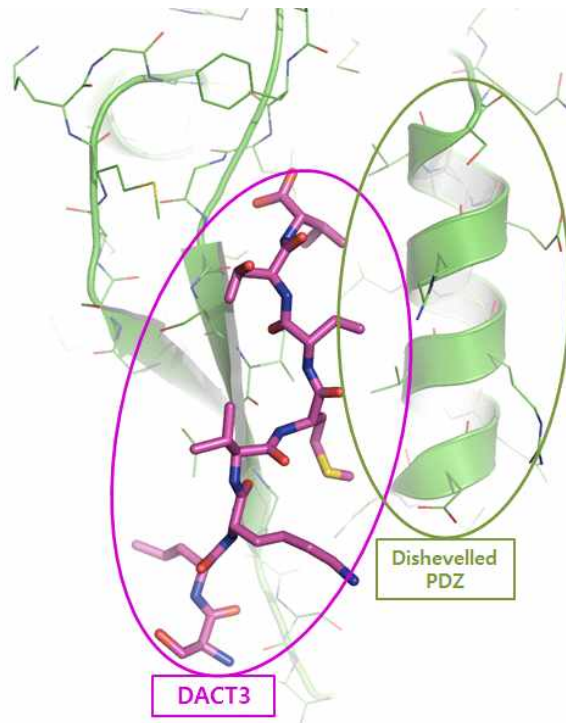


Figure 12 The 3D structure of DACT3 and dishevelled PDZ.

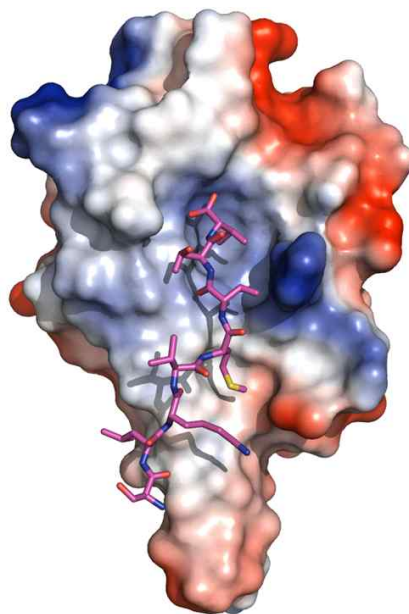


Figure 13 The 3D structure of DACT3 and dishevelled PDZ.



DACT3의 SLKVMTT 위치에 dishevelled PDZ domain이 결합하는 것을 simulation한 결과임 (Fig. 14) 해당 단백질끼리 결합하는 위치와 SNV발생 위치가 차이가 있기에 SNV 발생에 따른 결합력 차이를 규명하기는 어려울 것으로 분석.

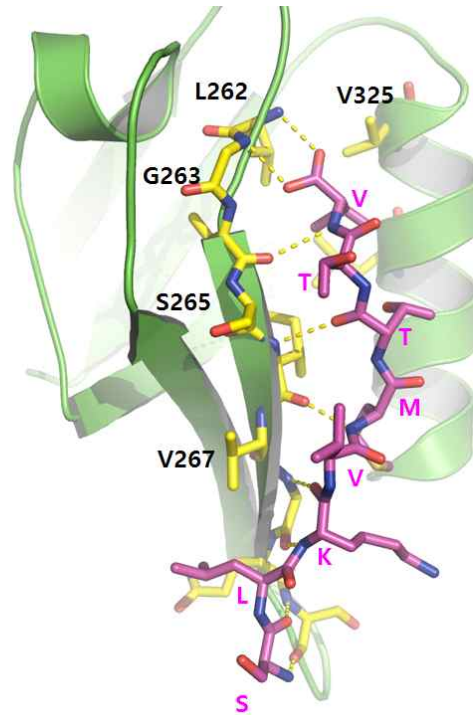


Figure 14 The 3D structure of DACT3 and dishevelled PDZ.

나. 병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발 및 버크셔 육종

(1) 총산자수에 대한 개량도 평가

(가) 분석자료

2007년부터 2017년 5월 31일 사이에 분만한 모돈 1,229두에 대한 번식기록 총 5,139개를 이용하여 분만연도별 총산자수에 대한 개량도를 추정하였으며 자료의 분포적 특성은 Table 1-2와 같다.

Table 1. 분만 년도별 총산자수에 대한 기초 통계치

분만년도	모든수	기록수	산차		총산자수	
			평균	최빈수	평균	표준편차
2007	2	2	1.0	1	8.00	1.41
2008	19	26	1.5	1	7.38	2.68
2009	83	159	2.0	1	8.69	2.14
2010	287	426	3.6	1	8.93	2.81
2011	319	558	3.9	1	8.52	2.84
2012	331	550	3.2	1	8.92	3.05
2013	437	793	3.0	1	8.45	3.08
2014	408	780	3.9	3	8.40	2.67
2015	408	809	4.6	1	8.47	2.65
2016	428	790	4.1	1	8.90	2.77
2017	246	246	3.9	2	8.67	2.44
전체	1,229	5,139	3.7	2	8.63	2.80

Table 2. 산차별 총산자수에 대한 기초 통계치

산차	기록수	평균	표준편차	최빈수	최소값	최대값
1	1,100	8.17	2.86	8	1	18
2	888	8.41	2.81	9	2	18
3	763	8.55	2.92	10	1	21
4	645	8.82	2.67	10	1	19
5	527	9.05	2.71	9	1	17
6	430	9.04	2.80	10	1	18
7	350	9.02	2.73	10	2	22
8	245	8.96	2.60	8	2	18
9	133	8.59	2.70	8	2	16
10	46	9.02	2.31	9	3	13
11	11	7.45	2.84	6	2	11
12	1	9.00	-	9	9	9
전체	5,139	8.63	2.80	10	1	22

(나) 총산자수의 개량도

- ① 총산자수는 산차에 의한 영향을 크게 받으며, 5~7산차 사이에서 높게 나타나며, 초산차는 평균 8.17두로 가장 낮다 (Table 3).
- ② 따라서 본 연구는 2013년 8월 시작하였기 때문에 개량도 평가는 2014년 (대조년)을 기준으로 하고 2014년부터 2017 (5월)사이의 1산차 자료를 이용하는 것이 합리적이다 (Fig. 1).
- ③ 1산차에 대한 총산수의 개량도는 2014년 대비 1.45두 증가한 것으로 나타났다 (Table 4).

Table 3. 분만년도별 1산차에 대한 총산자수의 기초 통계치

분만연도	기록수	평균	표준편차	최빈수	최소값	최대값
2007	2	8.00	1.41	-	7	9
2008	16	7.56	2.73	8	3	15
2009	65	8.48	2.24	9	1	13
2010	88	7.94	2.84	10	1	14
2011	111	7.48	2.90	8	1	14
2012	170	8.41	2.97	8	2	18
2013	222	8.30	3.13	8	1	15
<b>2014</b>	<b>114</b>	<b>7.53</b>	<b>2.52</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>13</b>
2015	121	7.83	2.80	9	1	14
2016	158	8.98	2.77	9	2	16
2017	33	8.21	2.04	8	4	12
전체	1,100	8.17	2.9	8	1	18

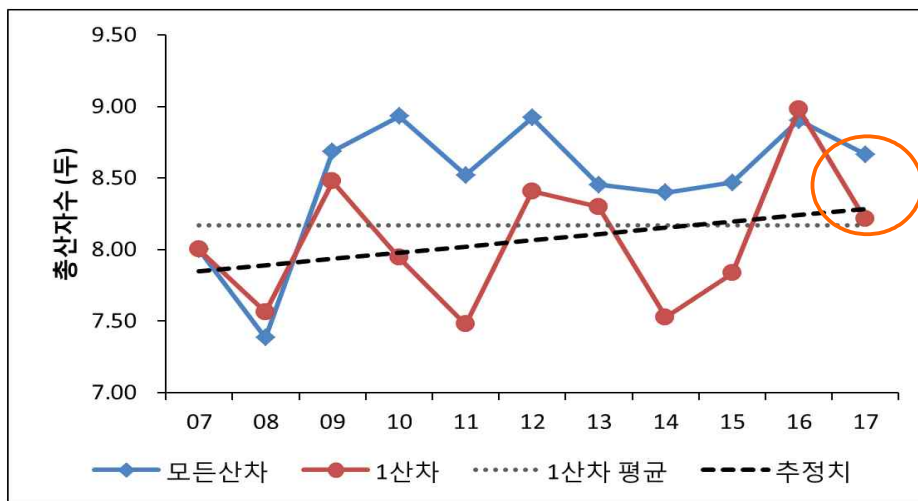


Figure 1 분만 년도별 총산자수에 대한 기초 통계치.

Table 2. 분만 년도별 총산자수에 대한 기초 통계치

분만년도	2014	2015 (‘14년대비)	2016 (‘15년대비)	총 증가도
평균총산자수	7.53	7.83 (▲0.31두)	8.98 (▲1.1두)	1.45두

(2) 병합육종 프로그램의 검정, 보완 및 정립

(가) 유전체 자료의 설명

- ① 2016년부터 2017년 5월 (현재)까지 후보돈을 포함한 중돈 1,888두에 대한 Porcine SNP 60k bead chip 정보를 수집하였다 (Figure 2.1.1).
- ② Berkshire SNP60k Final report (11개) & Map file (1개) 파일로 구성
- ③ PorcineSNP60\_DS\*\_FinalReport.txt (SNPs 자료 파일)

㉞ PorcineSNP60v2.map (SNPs 정보 설명 파일)

```
[Header]
GSST Version 1.9.4
Processing Date 12/15/2015 9:52 AM
Content porcinesnp60v2_15031945_c.bpm
Num SNPs 61565
Total SNPs 61565
Num Samples 72
Total Samples 72
[Data]
Sample ID Sample Name Sample Index Sample Group SNP Name SNP Index SNP SNP Aux Chr Position Allele1 - AB Allele2 - AB Allele1 - Forward Allele2 - Forward Allele1 - Top Allele2 - Top Allele1
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000009 1 [T/C] 0 1 538161 B B G G G G C C - - 0.044 1.085 1387 10923 1.129 0.974 0.5963 -0.0333 0.9960 0.6775 0.6684 BOT TOP
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000014 2 [T/C] 0 1 565627 B B C C G G C C - - 0.047 0.996 1420 10055 1.043 0.970 0.5167 0.1016 0.9993 0.6688 0.3845 BOT BOT
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000021 3 [A/C] 0 1 861439 A A A A A A A A - - 0.910 0.048 14327 939 0.957 0.033 0.6958 0.0207 0.0024 0.7300 0.6017 TOP TOP
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000022 4 [A/G] 0 1 863364 A A A A A A A A - - 1.165 0.112 18209 1539 1.278 0.061 0.6352 -0.0488 0.3186 0.6379 0.7398 TOP TOP
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000046 5 [T/C] 0 1 1314590 A B A G A G T C - - 0.758 0.242 12155 8632 1.600 0.533 0.7454 -0.0004 0.4897 0.7575 0.8026 BOT TOP
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000047 6 [T/C] 0 1 1300464 A B A G A G T C - - 0.331 0.286 5607 3194 0.617 0.454 0.6890 -0.2540 0.4335 0.7263 0.6371 BOT TOP
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000087 7 [A/G] 0 1 1901240 A A A A A A A A - - 0.768 0.094 12196 1372 0.862 0.077 0.4822 0.0474 0.0285 0.6490 0.2972 TOP TOP
101178140012_R01C01 BQ6641 1 ALGA0000112 8 [A/G] 0 1 3327918 B B C C G G G G - - 0.171 0.822 3274 8382 0.993 0.569 0.5569 0.1701 1.0000 0.6569 0.7124 TOP BOT
```

Figure 2 Final report 구조.

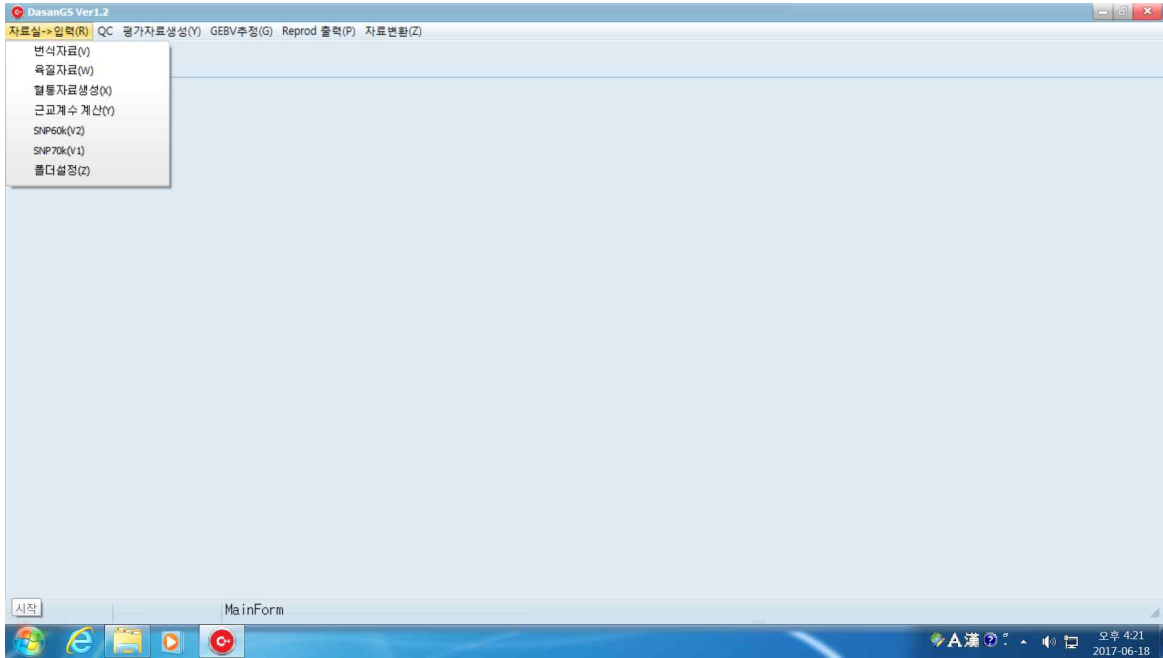
Table 5. 연도별 Porcine SNP 60k bead chip 샘플 수

연도	Upload_filename	SNP수	샘플수
2016	PorcineSNP60_DS_5th_72sp_FinalReport.txt	61,565	72
2016	PorcineSNP60_DS_6th_56sp_FinalReport.txt	61,565	56
2016	PorcineSNP60_DS_7th_144sp_FinalReport.txt	61,565	144
2016	PorcineSNP60_DS_8th_381sp_FinalReport.txt	61,565	381
2016	PorcineSNP60_DS_9th_10th_11th_336sp_FinalReport.txt	61,565	336
2016	PorcineSNP60_DS_4th_192sp_FinalReport.txt	61,565	192
2016	PorcineSNP60_DS_1st_2nd_3rd_347sp_FinalReport.txt	61,565	347
2016	PorcineSNP60_DS_12th_84sp_FinalReport.txt	61,565	84
2016	PorcineSNP60_DS_13th_132sp_FinalReport.txt	61,565	132
소 계			1,744
2017	PorcineSNP60_DS_14th_119sp_FinalReport.txt	61,565	119
2017	PorcineSNP60_DS_15th_25sp_FinalReport.txt	61,565	25
소 계			144
합 계			1,888

(나) 유전체 자료의 설명

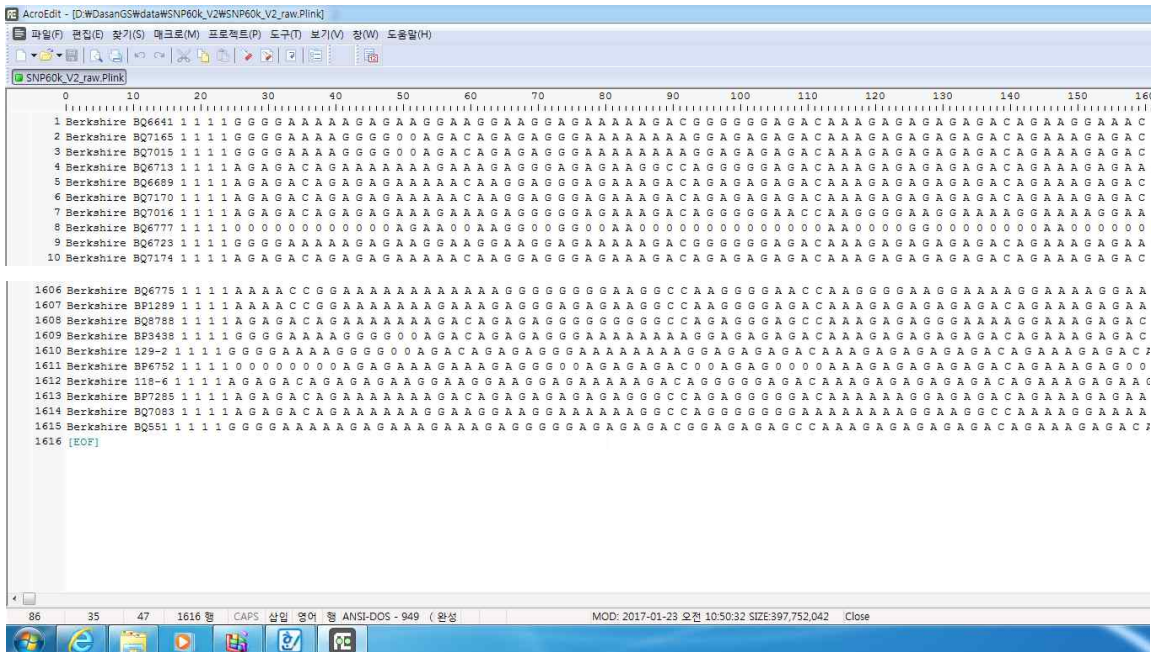
① 자료 입력

㉞ 번식자료, 육질 및 혈통자료의 입력은 3차년도 보고서의 입력형태와 같다.



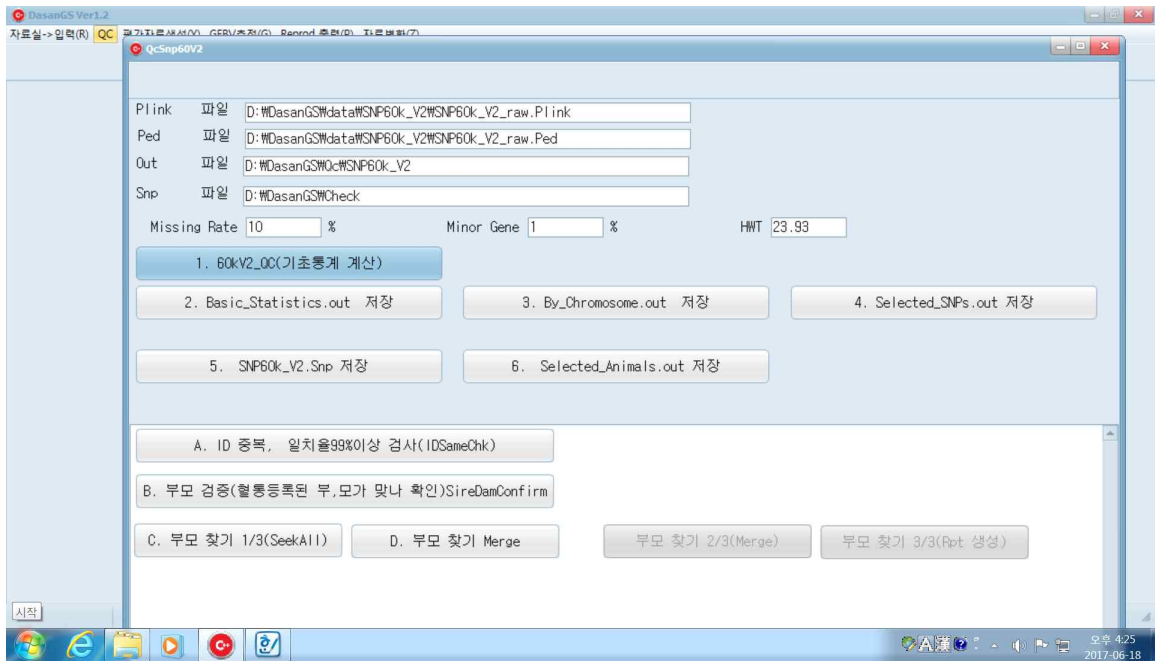
(다) 유전체자료 Plink Form으로 저장하기

- ① Final report에서 ID Allele1 - Top Allele2 - Top을 불러옴
- ② Family\_ID, ID, Paternal\_ID, Maternal\_ID, Sex, Phenotype, SNP1 ~ SNP61,565 순서임



※ Plink form에서는 개체 ID로 정렬이 안 되어 있음  
(Final report에서 정렬이 되어있지 않기 때문)

(라) Berkshire 60K SNP자료의 QC



① ①~ ③은 default (고정)

- ① Unknown Position(염색체가 0인 경우), ② X염색체(19), Y염색체(20) 삭제
- ② SNP가 모두 동형(Homo)인 경우 삭제
- ③ SNP가 모두 이형(Hetero)인 경우 삭제

② ④~⑤은 옵션(수치를 바꿔서 넣을 수 있도록 박스 표현)

- ④ SNP별 Missing rate가 0.1(10%) 이상인 경우 삭제
- ⑤ 소수대립유전자(minor gene)이 0.01(1%) 미만인 경우 삭제
- ⑥ HWT value가 23.93이상인 경우 삭제

③ 기초통계량 Whole\_results.out 파일 만들기

㉞ SNP 61,565개에 대한 통계치 작성

- SNP\_name(SNP이름) • Chr\_no(염색체) • Position(위치정보) • F\_GT(유전자형빈도)
- F\_MGT(유전자형결측빈도) • R\_MGT(유전자형결측율) • MAT(다수동형유전자형)
- HET(이형유전자형) • MIT(소수동형유전자형) • F\_MAT(다수동형유전자형빈도)
- F\_HET(이형유전자형빈도) • F\_MIT(소수동형유전자형빈도),
- R\_MAT(다수동형유전자형비율) • R\_HET(이형유전자형비율)
- R\_MIT(소수동형유전자형비율) 등



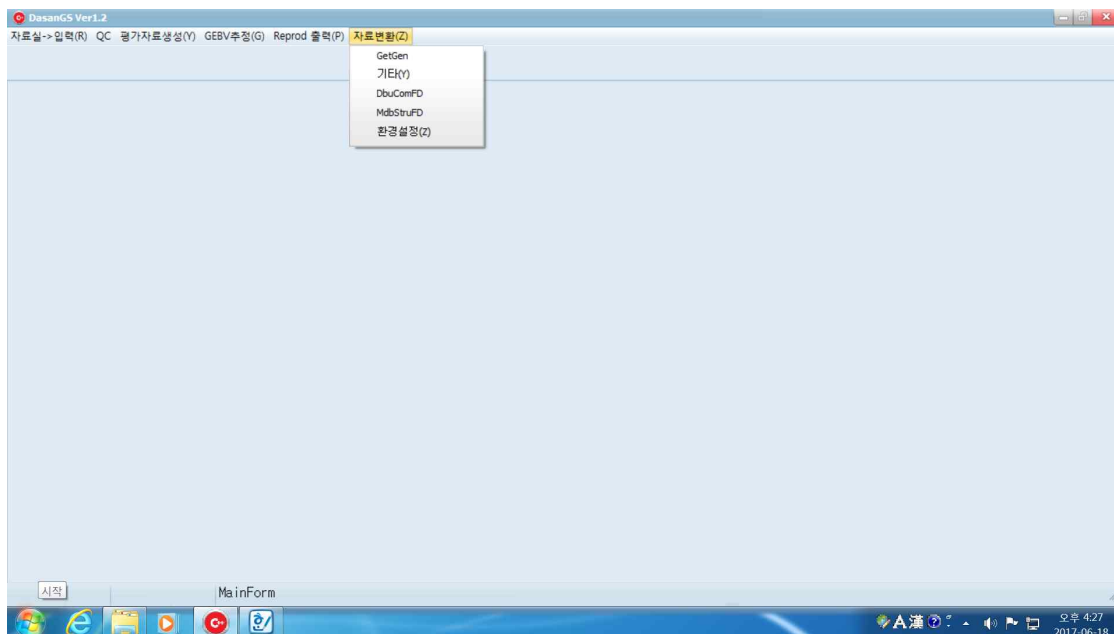
(사) 보고서 작성

① 용도별 주차별 보고서 출력



2.2.7. 자료 변환

① 모든 자료는 경영자나 관리자가 사용가능한 형태로 저장함



(3) 병합육종 프로그램을 활용한 유전능력 평가

(가) 공시 재료



① 버크셔 집단의 유전체 전당 60K SNP 자료

후보돈을 포함한 종축 1,615두에 대한 Illumina Porcine SNP 60K chip 분석 결과로 생성된 단일염기다형 표지인자의 유전자형 정보 중 염색체상의 위치정보가 확인되지 않은 SNP, 결측률이 10%이상, 다형성이 없는 경우, 모두 이형인 경우를 제외하고 분석에 이용된 SNP는 총 38,962개였다 (Table 6).

Table 6. 유전체 자료의 품질평가 (QC)

항 목	두 수 및 개
Total no. of animals	1,615
No. of animals with missing over 0.10%	30
No. of selected animal (useful)	1,585
No. of markers on autosome	52,258
No. of selected markers after QC	38,962

② 표현형 자료

버크셔 모든 1,202두의 총산자수 및 생존산자수에 대한 4,919개의 기록을 수집하였으며, 총산수와 생존산자수의 평균은 각각 8.61두와 7.56두로 나타났다 (Table 7).

Table 7. 번식형질의 평균 및 표준편차

총 개체수	기록수	총산자수	생존산자수
3,622 (1,202) <sup>1</sup>	4,919	8.61 ± 2.83	7.56 ± 2.58

(나) 통계적 방법

① SNP정보를 이용한 유전체 육종가(GEBV) 추정

㉞ ssBLUP(Single Step BLUP)에 의한 총산자수와 발정재귀일령의 유전체 육종가 추정

$$y_{ijkl} = \mu + f_{ti} + l_{tj} + a_{tk} + p_{tk} + e_{ijkl}$$

위에서,  $y_{ijkl}$  = t번째 번식형질에 대한 관측치,  $\mu$  = 전체평균,  $f_{ti}$  = i번째 분만주차의 고정효과,  $l_{tj}$  = j번째 산차의 고정효과,  $a_{tk}$  = k번째 개체의 상가적 유전효과,  $p_{tk}$  = k번째 개체의 영구 환경 효과,  $e_{ijkl}$  = 임의오차이며, 위의 선형모형은 다음과 같은 행렬식으로 나타낼 수 있다.

$$y = Xb + Za + Wp + e$$

위에서,  $y = n \times 1$  vector of observation,

$b = p \times 1$  vector of fixed effect

$a = q \times 1$  vector of additive genetic random effect

$p = q \times 1$  vector of permanent environmental random effect

$X(n \times p)$ ,  $Z(n \times q)$  and  $W(n \times q)$  known incidence matrix corresponding to  $b$ ,  $a$ , and  $p$ ,  
 $e = n \times 1$  vector of residual effect

$p = q \times 1$  vector of permanent environmental random effect

$X(n \times p)$ ,  $Z(n \times q)$  and  $W(n \times q)$  known incidence matrix corresponding to  $b$ ,  $a$ ,  
and  $p$ ,  $e = n \times 1$  vector of residual effect

② 혼합모형방정식(MME; mixed model equation)은 다음과 같다.

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + \alpha_1 H^{-1} & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + \alpha_2 I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \\ \hat{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}$$

위에서,  $\alpha_1 = \sigma_e^2 / \sigma_a^2$ ,  $\alpha_2 = \sigma_e^2 / \sigma_{pe}^2$  이며,  $H = A + A_\Delta$  일 때,

$$H = \begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & G \end{bmatrix} = A + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G - A_{22} \end{bmatrix} \text{이며,}$$

$A$  = 혈통정보에 의한 혈연계수행렬(Conventional numerator relationship matrix),  $A_\Delta$  = 유전체 정보의 관계를 나타내는 변형행렬(matrix modified to account for genomic relationship),  $G$  = 유전체 혈연관계행렬(genomic relationship matrix)이다.

$$H = A + \begin{bmatrix} A_{12}A_{22}^{-1} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I \\ I \end{bmatrix} (G - A_{22}) \begin{bmatrix} I & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{22}^{-1}A_{21} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \text{일 때,}$$

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix} \text{이다.}$$

위에서,  $I$  = 단위행렬(identity matrix).  $A_{22}^{-1}$  = 유전체정보를 가지고 있는 개체들의 혈연계수행렬의 역행렬이다.

③ 유전체 육종가의 신뢰도

육종가의 신뢰도( $r^2$ )는 예측분산오차(Prediction error variance; PEV)의 값을 이용하여 계산하였으며, 수식은 아래와 같다.

$$r^2 = 1 - \left( \frac{PEV}{\sigma_a^2} \right)$$

④ SNP 표지인자 효과 및 마커 분산 추정

각 SNP 표지인자별 효과는 아래와 같이 GEBV의 역 연산방식을 통하여 추정할 수 있다.

$$\hat{a}_g = Z\hat{u}$$

여기서,  $\hat{a}_g$  는 유전체 육종가(GEBV) 벡터, Z는 SNP의 계수행렬,  $\hat{u}$ 는 SNP 효과 벡터이다. 이를 분산의 식으로 변환하면 아래와 같다.

$$G^* = ZDZ'\lambda$$

여기서, D는 가중치 벡터이다. 위의 두 개 수식을 이용하여 아래와 같이 SNP효과에 대한 수식으로 변환할 수 있다.

$$\hat{u} = \lambda DZ'G^{*-1}\hat{a}_g = DZ'(ZDZ')^{-1}\hat{a}_g$$

또한 SNP표지인자 효과에 대한 분산을 추정하는 식은 아래와 같다

$$\hat{\sigma}_{u,i}^2 = \hat{u}_i^2 2p_i(1-p_i)$$

상기의 수식을 이용하여 SNP 표지인자별 가중치 벡터, 유전체 육종가, SNP 표지인자별 효과를 다음과 같은 과정을 통하여 추정할 수 있다.

- ①  $D(0)=I$
- ②  $\hat{a}_g$  계산
- ③  $\hat{u}_{(t)} = \lambda D_{(t)}Z'G_{(t)}^{-1}\hat{a}_g$
- ④  $d_{i(t+1)}^* = \hat{\sigma}_{u,i}^2$
- ⑤  $D_{(t+1)} = \frac{\text{tr}(D_{(0)})}{\text{tr}(D'_{(t+1)})}D'_{(t+1)}$  (표준화)
- ⑥  $G_{(t+1)} = ZD_{(t+1)}Z'\lambda$
- ⑦ 반복 시행 (2 또는 3회)

(다) 연구 내용

① 유전 모수

- ㉞ 총산자수와 생존산자수에 대한 유전력은 각각 0.081과 0.083으로 추정되었으며, 이들 간의 유전상관은 0.98로 매우 높게 나타났다.

㉔ 총산자수와 생존산자수에 대한 반복력은 각각 0.186와 0.181로 추정되었다 (Table 8).

Table 8. 번식형질들에 대한 분산성분 및 유전모수

산자수	$\sigma_a^2$	$\sigma_{pe}^2$	$\sigma_e^2$	$h^2 \pm SE$	r
총산자수 (두)	0.6358	0.8226	6.3923	0.081 $\pm$ 0.022	0.186
생존산자수 (두)	0.5322	0.6311	5.2745	0.083 $\pm$ 0.024	0.181

② SNP 효과

총산자수와 생존산자수에 대한 육종가의 분포는 각각 -1.34~1.47두와 -1.01~1.35로 나타났으며, 오른쪽으로 약간 치우친 정규분포의 형태를 띠고 있었다 (Fig. 3).

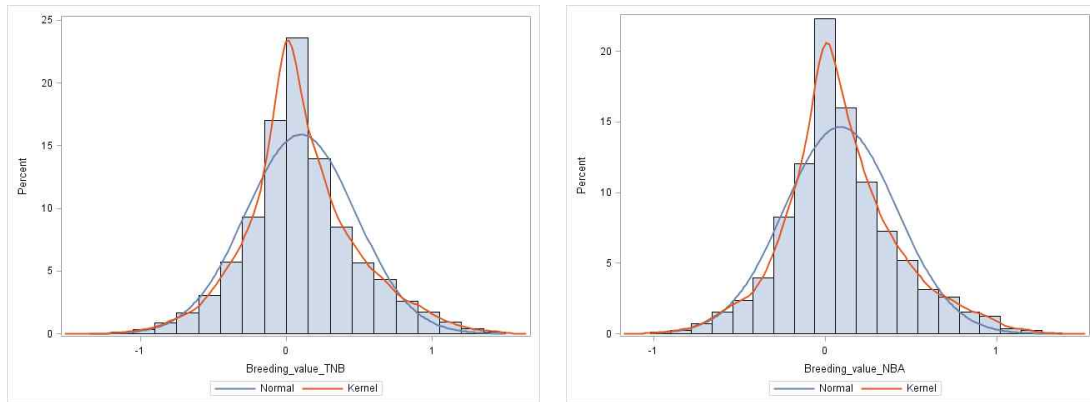


Figure 3 총산자수(좌)와 생존산자수(우)에 대한 육종가의 분포.

㉔ ssBLUP은 유전체 정보를 가진 개체의 표현형과 혈통정보만을 가지는 개체 모두의 표현형을 이용할 수 있다. 따라서 ssBLUP의 경우 모형에서 추정되는 효과가 각 개체별 혈통 및 유전체 육종가이기 때문에 한번의 분석을 통하여 기존 육종가와 유전체 육종가를 동시에 추정해 낼 수 있고 Back solution을 통하여 SNPs 효과를 역추정할 수 있다. 산자수에 대한 각각의 SNP 효과는 매우 미미하며 이들의 기초통계량은 (Table 9)에 제시하였다.

Table 9. 총산자수와 생존산자수에 대한 SNP의 추정 효과

산자수	SNPs 수	평균	표준편차	최소값	최대값
총산자수	38,962	-0.0000423	0.0003305	-0.0015433	0.0014594
생존산자수	38,962	-0.0000344	0.0002846	-0.0014079	0.0013344

㉔ Meuwissen 등(2001)은 가축의 양적형질에 영향을 주는 유전자효과에 대한 분포에 관한 연구를 실시하였는데, QTL의 분포가 감마(Gamma)분포를 따른다고 하였다. 따라서 본 연구에서 추정된 SNP 표지인자의 효과 값에 절대 값을 취한 후 추정된 감마분포의 모수 값을 이용하여 실제 추정 값에 적합한 히스토그램을 Figure 4에 나타내었다. 이는 총산자수와 생존 산자수에 대한 표지인자 효과의 크기별 분포를 나타낸 것이며, 효과가 0에 가까운 표지인자가 가장 많이 분포하고 효과가 큰 표지인자는 소수만 존재하는 것을 확인할 수 있다. 효과가 큰 표지인자만을 선택하는 기존의 MAS 보다 효과가 작은 다수의 유전변이를 모두 이용하는 것이 유전체 선발 기법이다.

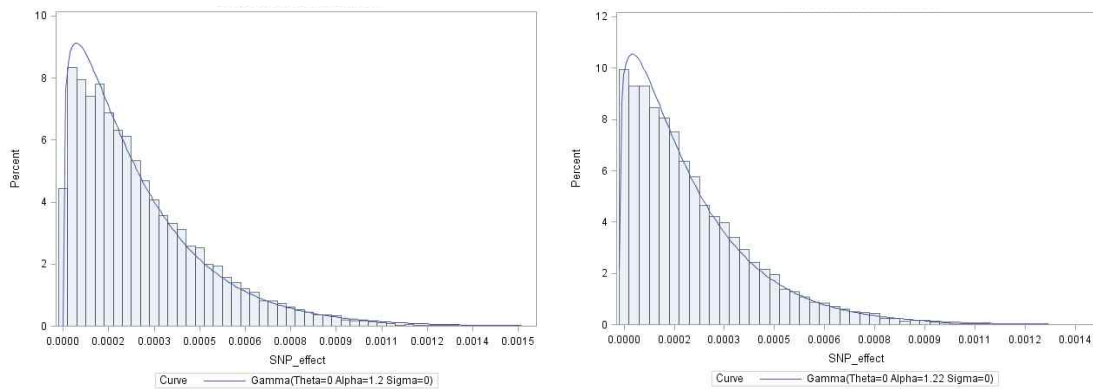


Figure 4 총산자수와 생존산자수에 대한 추정 SNP효과 분포도.

㉕ 또한 감마분포를 따르는지에 대한 적합도 검정을 실시하였으나 감마 분포에 대한 적합도 검정을 실시한 결과 총산자수와 생존산자수 모두 감마분포를 따르지 않는 것으로 나타났다 (Table 10).

Table 10. 총산자수와 생존산자수에 대한 SNP의 추정 효과

산자수	Test method (statistics)		
	Kolmogorov-Smirnov (D)	Cramer-von Mises (W-Sq)	Anderson-Darling (A-Sq)
총산자수	0.0241**	5.7569**	33.9518**
생존산자수	0.0203**	3.9455**	22.9434**

\*\*p < 0.01

㉖ 또 다른 방법으로 표지인자 효과에 대하여 정규성을 나타내는지 검정을 하고자 정규분포함수에 대한 모수를 추정된 히스토그램 및 QQ-PLOT을 Figure 13에 제시하였다. Kolmogorov smirnov, Cramer-von Mises와 Anderson-Darling검정 결과 총산자수와 생존 산자수에 대한 SNP 표지인자 효과는 정규분포를 따르지 않는 것으로

나타났다 (Table 11).

Table 11. 산자수에 대한 SNP효과 정규분포 Goodness-of-Fit Tests

산자수	Test method (statistics)		
	Kolmogorov-Smirnov (D)	Cramer-von Mises (W-Sq)	Anderson-Darling (A-Sq)
총산자수	0.0297**	10.6657**	61.8669**
생존산자수	0.0303**	11.4673**	67.8038**

\*\*p < 0.01

㉞ Figure 5의 QQ-PLOT을 보면, 총산자수에 대한 표지인자의 효과들이 0을 중심으로  $\pm 3$ 까지는 정규성을 보이다가 극값으로 갈수록 정규성에 벗어나는 것으로 보였으며, 이러한 결과는 생존 산자수에도 같은 양상을 나타내었다.

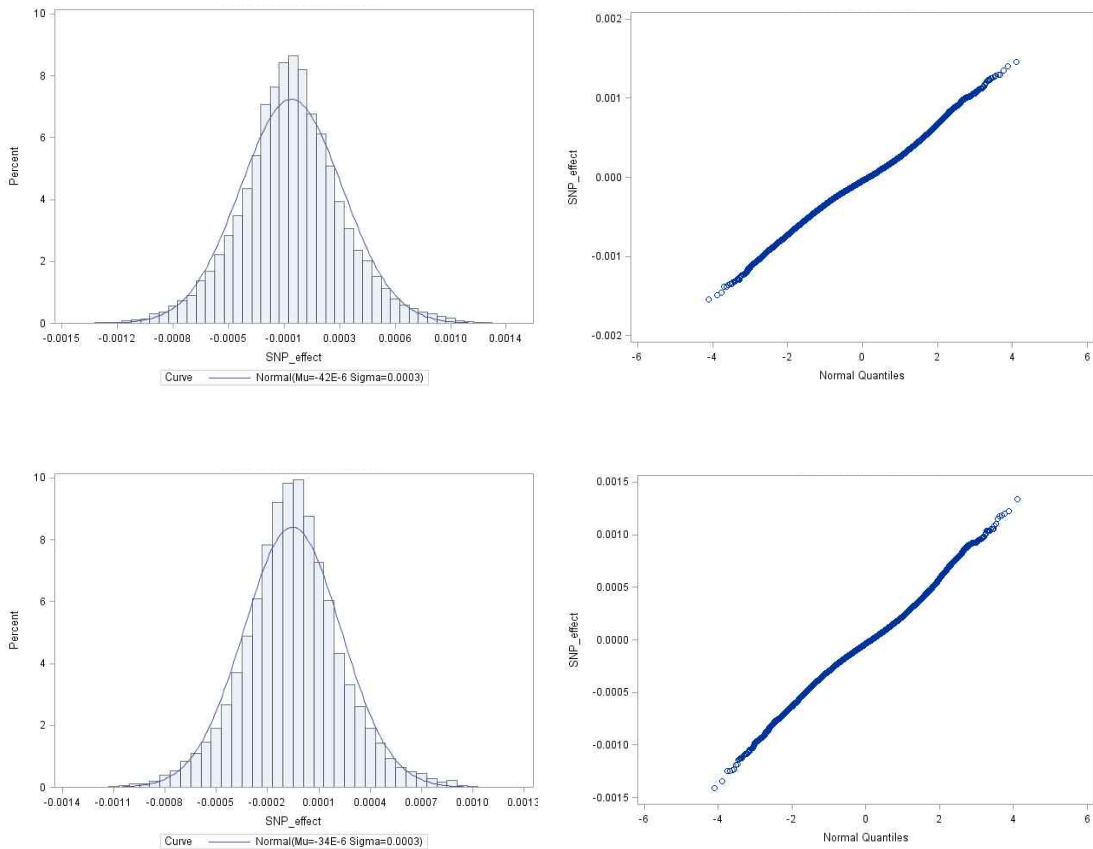


Figure 5 총산자수(좌)와 생존산자수(우)에 대한 SNP효과들의 QQ plot.

③ Genome-wide association study (GWAS)

㉞ 총산자수와 생존 산자수에 대한 SNP 효과의 크기별 분포에서 거의 0에 가까운 표

지인자가 가장 많이 분포하고(Figure 3.3.8-9), 효과가 큰 표지인자는 소수만 존재하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 추정된 SNP 효과 값을 표준화시킨 후 다시 절대값을 취한 후 상대적 크기를 비교하기 위한 Manhattan plot을 Figure 3.3.10-11에 나타내었다.

- ㉔ 정규분포에서 3×표준편차의 범위에서 추정치의 약 99.74%가 포함된다고 볼 때, Maker로서의 선별 기준점(threshold)은 4×표준편차 이상으로 하여 효과가 큰 SNP들을 Table 3.3.12에 제시하였다. 총산자수와 생존산자수의 경우 4×표준편차의 값을 지닌 SNP의 수는 각각 11개와 14개로 나타났다.
- ㉕ 총산자수의 경우, 2번 염색체(MARC0046316, ASGA0101159), 6번 염색체(ALGA0114670, H3GA0055046), 17번 염색체(ALGA0093629, ASGA0075678, ALGA0093681) SNP들이 연관 불평형 Block내 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 연관 불평형 Block내 표지인자들을 제거하고 다시 분석하면 그 효과가 더 명확하게 나타날 것으로 생각된다.

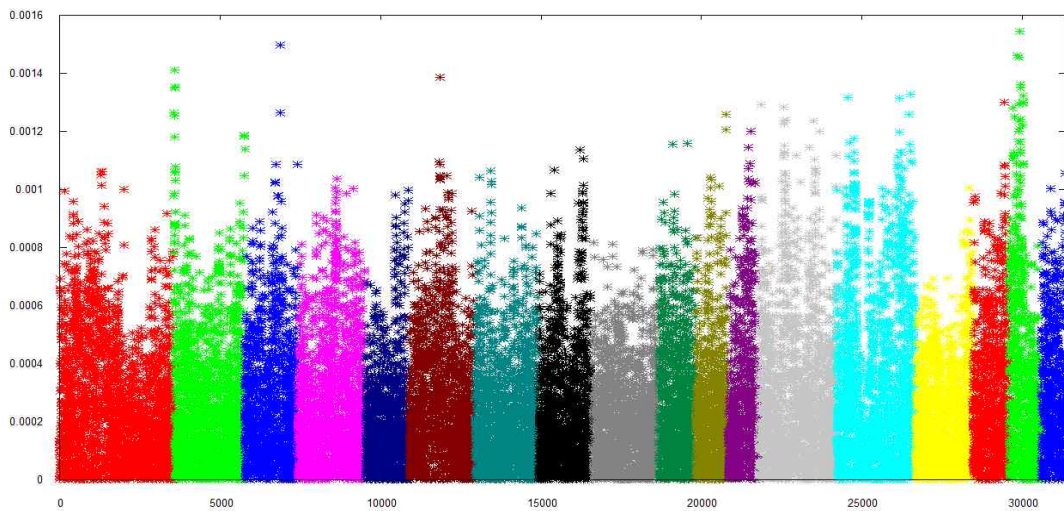


Figure 6 총산자수(상)와 생존산자수(하)에 대한 SNP효과들의 Manhattan plots.

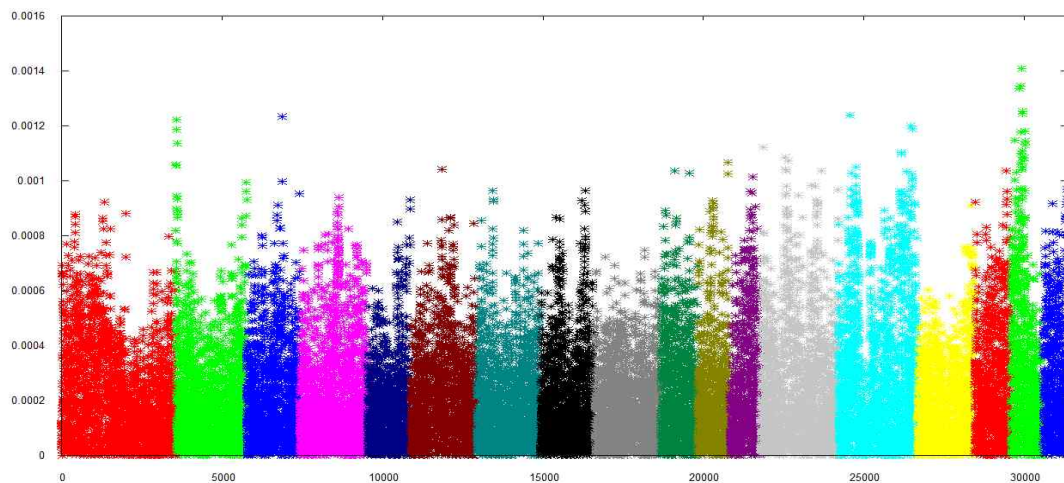


Figure 7 총산자수(상)와 생존산자수(하)에 대한 SNP효과들의 Manhattan plots.

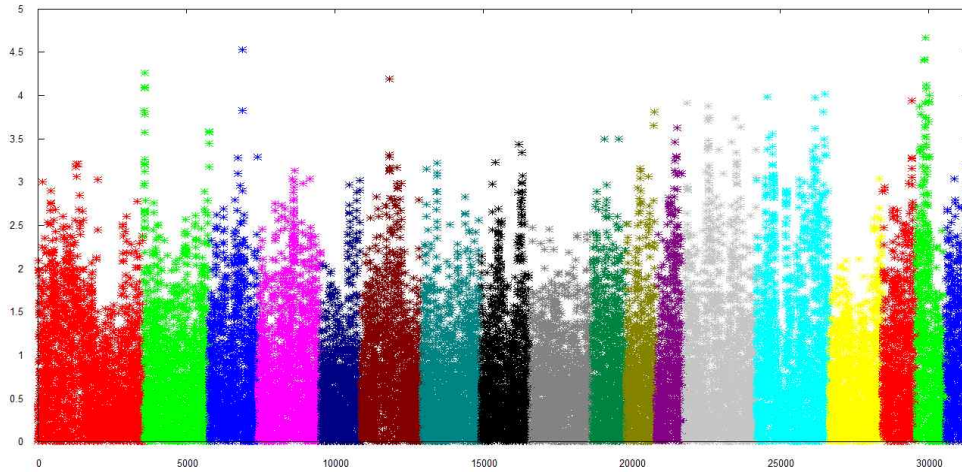


Figure 8 총산자수(상)와 생존산자수(하)에 대한 SNP효과들의 Manhattan plots.

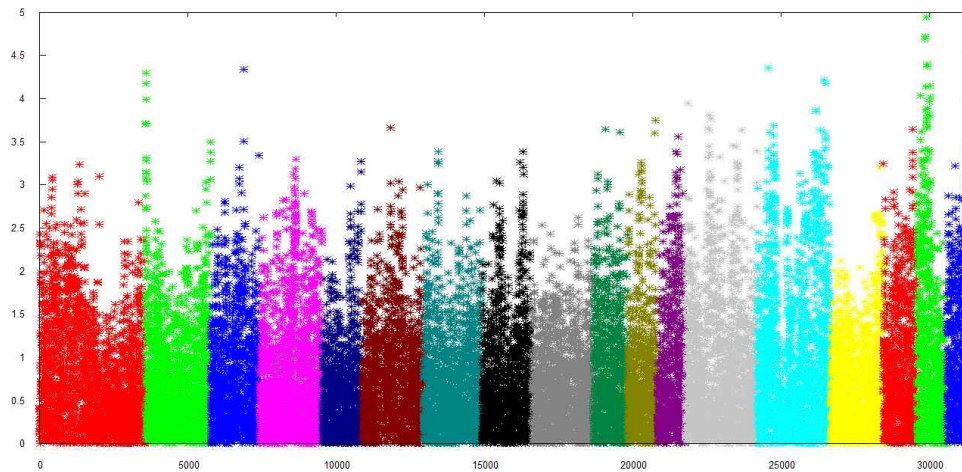


Figure 9 총산자수(상)와 생존산자수(하)에 대한 SNP효과들의 Manhattan plots.

Table 12. 표준화된 SNP 효과가 4.0이상

산자수	SNP 이름	염색체	위치정보	SNP effect	STD value	
총산자수	MARC0046316	2	2216738	0.00140875	4.39	
	ASGA0101159	2	2224107	0.00135236	4.22	
	H3GA0056247	3	101704758	-0.00149613	4.40	
	ALGA0114670	6	74627362	-0.00138505	4.06	
	H3GA0055046	6	74682817	-0.00138505	4.06	
	DRGA0012350	13	53111671	0.00128118	4.01	
	ASGA0096197	16	77537650	0.00130050	4.06	
	ALGA0105626	17	18894036	0.00145942	4.54	
	ALGA0093629	17	21259716	-0.00145520	4.28	
	ASGA0075678	17	21701959	0.00129377	4.04	
	ALGA0093681	17	22559386	-0.00154334	4.54	
	생존산자수	MARC0046316	2	2216738	0.00122182	4.41
		ASGA0101159	2	2224107	0.00118648	4.29
H3GA0056247		3	101704758	-0.00123363	4.21	
ALGA0075992		14	21902332	-0.00123817	4.23	
ALGA0082456		14	142055221	0.00120050	4.34	
MARC0004627		14	145551057	-0.00118725	4.05	
ALGA0092923		17	7047576	0.00114706	4.15	
ALGA0105626		17	18894036	0.00133445	4.81	
ALGA0093629		17	21259716	-0.00134239	4.60	
ASGA0075678		17	21701959	0.00117744	4.26	
ALGA0093681		17	22559386	-0.00140786	4.83	
MARC0024297		17	24650057	-0.00124375	4.25	
ALGA0093780		17	24678391	-0.00125100	4.27	
ASGA0093216	17	31163121	-0.00118041	4.03		



(4) 정액성상 검사 (2017.03.31)

(가) 샘플 채취 (9두)



(나) 정액의 삼투압 및 pH 분석

- ① pH 검사는 수소이온 농도를 측정하는 것으로 본 실험에선 Istek사의 pH meter로 측정하였다.
- ② 측정 전 pH 4, 7, 10의 표준용액을 활용하여 분석기기를 교정한 뒤 정액 5ml을 이용하여 측정하였다.


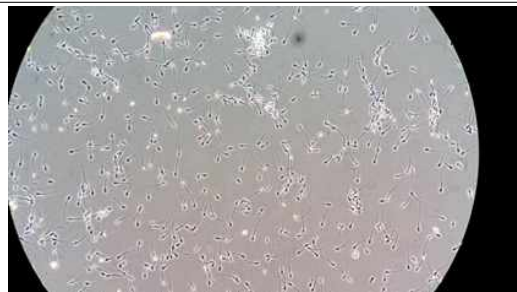



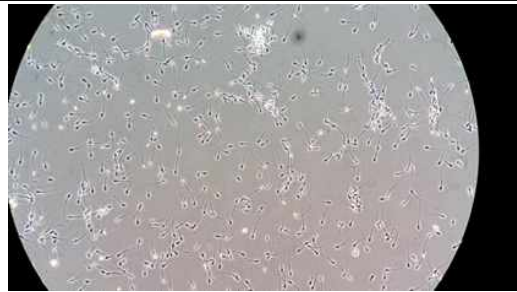


(다) 정액의 삼투압 측정

- ① 삼투압은 빙점강하도 측정 장치를 사용하며 본 실험에서 사용된 기기는 OSMOMAT 030D모델을 이용하였다.
- ② 분석 전 장비를 증류수와 조정용액으로 교정한 뒤 정액 50 $\mu$ l를 이용하여 측정하였다.

Table 13. 총산자수와 생존산자수에 대한 SNP의 추정 효과

순번	명호	채취날짜	17.03.31		17.04.03		17.04.05	
			삼투압	pH	삼투압	pH	삼투압	Ph
A	Y255-1	17.03.28	277	7.00	279	7.01	279	7.14
B	Y255-1	17.03.28	278	7.02	275	7.09	272	7.20
C	Y930-4	17.03.29A	318	6.98	317	6.99	314	7.08
D	Y930-4	17.03.29A	317	7.03	317	7.04	313	7.14
E	BQ7083	17.03.29P	278	6.95	274	7.02	275	7.12
F	BQ7083	17.03.29P	277	6.93	277	7.01	270	7.10
G	BQ7083	17.03.29P	276	6.85	276	6.98	275	7.08
H	BQ8788	17.03.28	276	6.91	277	7.04	282	7.00
I	BQ8788	17.03.28	275	6.78	275	6.79	271	6.82

(라) 정액의 활력도 검사

명호	7일차	9일차
Y255-1		
Y930-4		
명호	7일차	8일차
BQ7083		
BQ8788		

- ① 정액 채취 후 7일차까지는 모든 샘플의 활동성이 우수한 모습을 보였으며, 8, 9일차에도 활력을 유지하는 모습을 보인 반면, 직진성이 다소 떨어지는 모습을 보여 수정 능력을 고려하였을 때, 7일차까지는 무리 없을 것으로 판단된다.
- ② 대부분 정액 샘플의 경우에는 시간이 지남에 따라 보존성이 떨어지며, 이는 정액의 산도와 정의 상관관계에 있는 것으로 알려지는데 다산육종의 정액 샘플은 꾸준히 좋은 산도를 유지하고 있어 이것이 활력이 지속적으로 유지할 수 있게 된 것으로 판단된다.
- ③ 정액 샘플 내 세균 오염도 우려하지 않을 수준으로 매우 적고 정액 샘플이 매우 깨끗한 모습을 보여 주었으며, 이는 타 농장의 정액 샘플과는 확연히 비교되는 수준의 우수한 모습이다.

## 5. 5차 년도 연구 결과

### 가. 융합유전체 마커에 의한 한국 버크셔의 산자수 증대 기술개발

다산육종 전체 후보돈에서 검증된 후성 유전체 및 유전체의 유전자 검사를 통한 계획 교배 및 재교배를 실시하였다.

**Table 1. The analysis of epigenetic markers associated with litter size**

순서	주령	명호	후성유전체 유무	Parity	Av_TotalBorn	Av_Wean
1	7	BQ4535	1	5	11.00	8.40
2	8	BP3003	1	8	12.00	9.50
3	8	BR2291	1	1	11.00	10.00
4	8	BP3585	1	10	10.00	8.70
5	8	BP7474	1	9	9.56	8.78
6	9	BQ4948	1	5	6.00	8.40
7	9	BR1679	1	1	8.00	10.00
8	9	122-4	1	4	9.75	8.75
9	9	BR2399	1	1	11.00	10.00
10	9	BQ8342-1	1	3	7.33	8.33
11	9	BR2579	0	1	9.00	10.00
12	9	BQ9379	0	3	6.67	5.67
13	9	BQ4583	1	5	12.00	9.20
14	9	BP8921	1	8	8.63	9.50
15	9	BQ6969	1	4	7.50	11.25
16	9	BP7566	1	9	8.11	8.44
17	9	BQ7144	1	4	8.75	9.25
18	9	BR2085	1	1	8.00	9.00
19	9	BP7315	1	9	8.00	9.22
20	9	BQ4709	1	5	9.20	9.60
21	9	BR2109	1	1	9.00	10.00
22	10	BR2580	1	1	8.00	12.00
23	10	122-1	1	4	11.50	9.75
24	10	BQ9577	1	2	10.50	10.00
25	10	BR2410	1	1	12.00	11.00
26	10	BQ7216	1	4	6.00	9.00
27	10	BQ8670	1	2	9.50	9.00
28	10	BQ9089	1	3	8.33	9.00
29	10	107-5	1	4	7.50	9.50
30	10	BQ7104	1	4	9.25	10.00
31	10	BR173	1	2	12.00	8.50
32	10	BR2714	1	1	7.00	11.00

33	10	BQ8002	1	3	12.67	10.00
34	10	BQ2175	1	6	9.83	9.17
35	10	BQ6531	1	4	10.00	8.50
36	10	BQ2105	1	6	11.67	9.33
37	10	BR166	1	2	8.00	10.50
38	10	BQ5354	1	5	10.00	8.40
39	11	BQ4395	1	5	8.60	9.20
40	11	BQ2882	0	6	9.33	8.33
41	11	BQ4751	1	5	8.80	9.80
42	11	BQ3066	1	6	7.33	9.00
43	11	BQ3556	1	5	8.00	6.80
44	11	BQ9136	1	3	7.33	8.33
45	11	BQ6613	1	4	7.75	9.50
46	11	BQ5585	1	4	9.50	9.25
47	11	BP8420	1	8	5.71	9.00
48	11	BQ5726	1	5	10.20	8.60
49	11	BQ5454	1	5	9.80	9.80
50	11	123-4	1	4	10.00	8.75
51	12	BR1657	1	2	9.00	4.00
52	12	BQ7190	1	4	7.50	7.00
53	12	BR1444	1	2	8.00	4.00
54	12	BQ1106	1	7	8.86	7.86
55	12	127-2	1	4	8.75	5.75
56	12	BQ9663	1	1	5.00	0.00
57	12	BR1409	0	2	8.00	4.50
58	12	BQ2538	1	6	7.67	7.33
59	13	BQ3260	1	5	7.60	9.60
60	13	BR1938	0	2	4.50	9.50
61	13	BQ0-0	0	7	9.57	9.00
62	13	BP5730	0	9	8.11	8.44
63	13	BQ6635-1	1	3	6.33	9.33
64	13	BQ8869	0		0.00	0.00
65	13	BQ4128	1	5	6.00	6.60
66	13	BQ0-9	1	3	9.33	9.67
67	14	BR1219	1	2	6.50	4.00
68	14	BQ5456	1	5	9.40	6.80
69	14	BQ1360	1	7	8.50	9.00
70	14	BQ7139	1	4	10.67	9.33
71	14	BR2506	1	1	0.00	0.00
72	14	BQ9732	1	3	6.00	8.00
73	14	BQ5871	1	5	8.75	9.25
74	14	BQ7109	1	4	10.33	9.00

75	14	BQ7624	1	2	10.00	5.00
76	14	BR17	1	3	8.00	9.00
77	15	BP5775	1	10	7.44	9.33
78	15	BQ6605	1	3	8.33	5.00
79	15	BQ5859	0	4	8.75	6.50
80	15	BQ7012	1	4	10.50	6.50
81	15	BQ8802	1	3	8.00	5.00
82	15	BQ9356	1	3	10.67	6.67
83	15	BQ8207	1	3	11.67	5.67
84	15	BQ5015	1	5	8.60	6.60
85	16	BR2576	1	1	13.00	0.00
86	16	BQ6918	1	4	9.75	6.50
87	16	BQ1722	1	7	10.14	7.14
88	16	BQ9647	1	3	9.67	5.00
89	16	BQ6667	1	3	6.00	5.67
90	16	BQ6698	1	3	7.33	5.00
91	16	BQ8865	1	3	11.33	7.00
92	16	BQ9855	1	3	6.00	2.67
93	16	BQ9937	1	3	7.33	5.33
94	16	BP5778	1	10	9.00	8.50
95	16	BQ6596	1	4	11.25	6.50
96	16	BR1464	1	2	9.00	5.00
97	17	BQ9875	1	3	9.33	5.33
98	17	BR1008	0	2	9.50	4.00
99	17	BQ7358	1	4	8.00	5.50
100	17	BR2509	1	1	9.00	0.00
101	17	BR4319	1	1	9.00	0.00
102	17	BR4216	1	1	0.00	0.00
103	17	BR2398	1	1	0.00	0.00
104	17	BQ9184	1	3	10.33	6.67
105	17	BP5988	0	10	8.40	8.30
106	17	BQ9068	1	3	7.00	3.50
107	17	BQ3777	1	6	10.67	7.17
108	17	BR3421	1	1	16.00	0.00
109	17	BQ9149	1	3	8.00	5.33
110	18	BQ2082	0	7	8.50	9.33
111	18	BQ7176	1	4	9.67	8.33
112	18	BQ9376	1	3	9.00	7.50
113	18	BQ6606	1	3	9.50	8.50
114	18	BQ7606	1	3	9.50	7.50
115	18	BQ6037	0	5	10.50	7.50
116	18	BQ3641	1	6	8.00	9.40

117	18	BQ7352	1	3	9.50	8.50
118	18	BR3395	1	1	0.00	0.00
119	18	BQ6386	1	5	10.25	9.25
120	18	BR3603	1	1	0.00	0.00
121	18	BQ9514	1	3	11.50	9.00
122	18	BQ6179	0	5	9.25	9.00
123	18	BR3466	1	1	10.00	0.00
124	18	BR3840	1	1	0.00	0.00
125	18	BQ9680	1	2	8.00	8.00
126	18	BR3481	1	1	0.00	0.00
127	18	BR3473	0	1	0.00	0.00
128	18	BR4288	1	1	0.00	0.00
129	19	BR3193	0	1	0.00	0.00
130	19	BR118	0	3	10.50	9.00
131	19	BQ4342	0	6	9.00	9.60
132	19	BR1319	1	2	8.00	9.00
133	19	BR1400	1	2	6.00	8.00
134	19	BR3581	1	1	0.00	0.00
135	19	BQ6423	1	5	11.00	9.50
136	19	BQ6622	0	5	10.00	8.75
137	19	BQ1025	0	7	4.50	8.67
138	19	BQ1438	0	7	9.67	8.50
139	19	BQ7166	0	3	10.00	8.50
140	19	BR3587	0	1	0.00	0.00
141	19	BQ9640	1	3	6.00	8.50
142	20	BQ7148-1	1	4	9.00	9.33
143	20	127-3	1	4	10.33	8.67
144	20	BR3797	0	1	0.00	0.00
145	20	BP5865	0	10	8.67	7.89
146	20	BQ5387	1	5	8.75	8.75
147	20	BQ7968	1	3	7.00	8.00
148	20	BR1373	1	2	10.00	10.00
149	20	BQ8246	1	3	9.50	8.50
150	20	BQ8184	1	4	9.33	9.33
151	20	BQ9972	1	3	7.50	8.00
152	20	BQ7195	1	4	8.67	8.67
153	20	BQ6701	1	3	8.00	9.00
154	20	BP8250	1	9	8.63	7.50
155	20	BR281	1	3	7.00	7.00
156	20	BR3298	1	1	0.00	0.00
157	21	BQ7677	1	3	10.00	7.00
158	21	BR2858	1	2	9.00	9.00

159	21	BQ6389	0	5	8.75	10.00
160	21	BQ1958	1	7	7.17	10.17
161	21	BQ7695	1	3	9.00	8.00
162	21	BR172	1	3	6.00	8.00
163	21	BR1826	1	2	6.00	8.00
164	21	BR1699	1	1	0.00	0.00
165	21	BR4072	1	1	0.00	0.00
166	21	BQ8245	1	4	7.67	7.33
167	21	BR8350	1	1	0.00	0.00
168	21	BQ5420	1	5	9.00	8.50
169	21	BR3867	1	1	0.00	0.00
170	21	BR1355	1	2	4.00	8.00
171	21	BR4107	1	1	0.00	0.00
172	21	BR3726	1	1	0.00	0.00
173	22	BQ240	1	7	7.57	10.29
174	22	BR8333	0	1	0.00	0.00
175	22	BR1697	1	1	8.00	8.00
176	22	BR2487	1	1	0.00	0.00
177	22	BQ9854	0	3	11.00	8.50
178	22	BQ5785	1	4	8.50	8.00
179	22	BQ716	1	7	8.29	8.86
180	22	BQ5701	0	4	9.25	8.75
181	22	BR1509	1	1	8.00	8.00
182	22	129-1	1	3	13.00	8.67
183	22	BR106	1	2	8.00	7.50
184	22	BQ2194	1	6	10.17	7.83
185	22	BQ6338	1	4	9.00	8.50
186	23	BQ2962	1	6	8.83	8.83
187	23	BQ410	1	7	10.29	7.86
188	23	BQ7657	0	2	5.00	8.00
189	23	107-8	1	3	12.33	8.33
190	23	BQ4533-1	0	3	9.33	9.67
191	23	BQ1190	1	6	9.33	9.17
192	23	BP8377	0	8	8.13	9.50
193	23	BQ9977	0	2	8.50	9.50
194	23	BQ3263	0	5	8.00	9.20
195	23	BQ8156	0	3	11.00	9.33
196	23	BQ7361	0	3	4.00	8.00
197	23	BQ3879	1	4	8.75	9.50
198	23	BR26	0	2	6.50	9.50
199	24	BR1512	0	2	10.00	10.00
200	24	BQ9896	1	3	11.00	8.50

201	24	BQ6685	1	5	9.00	9.50
202	24	BQ3455	0	6	9.40	8.40
203	24	BQ9600	0	3	9.50	10.00
204	24	BR2045	1	2	11.00	11.00
205	24	BP4057	0	10	9.78	8.44
206	24	BR1145	0	2	7.00	9.00
207	24	BQ7132-1	0	4	8.67	8.00
208	24	BR363	1	2	10.00	8.00
209	24	BR289	0	3	9.00	9.00
210	24	BR2019	0	2	11.00	8.00
211	24	BQ7648	0	4	8.67	6.67
212	24	BQ6424	1	5	10.50	9.75
213	24	BQ6236	1	5	8.50	9.50
214	24	BP8841	1	9	10.88	9.25
215	24	BQ8718	0	3	9.00	8.50
216	25	BR1123	0	1	8.00	9.00
217	25	BQ8683	0	2	5.50	8.50
218	25	BQ3592	0	5	12.80	9.00
219	25	BQ8181	0	2	6.00	9.00
220	25	BR2188	1	2	8.00	5.00
221	25	BQ3276	1		0.00	0.00
222	25	BR4897	0	1	0.00	0.00
223	25	BR297	0	2	12.50	8.50
224	25	BQ4502	1	5	10.40	9.40
225	25	BQ1898	1	6	10.17	9.17
226	25	BQ5893	1	4	13.25	10.00
227	25	BQ5639	0	4	9.00	8.50
228	25	BQ6942	0	4	10.00	9.50
229	25	BQ8728	1	3	7.67	9.67
230	25	BQ6412	1	4	5.25	8.75
231	25	BQ5862	0	4	10.00	8.75
232	26	BQ2763	1	6	7.33	8.67
233	26	BR4468	0	1	0.00	0.00
234	26	BR4848	1	1	0.00	0.00
235	26	BQ9664	1	2	11.00	9.50
236	26	BR4987	1	1	0.00	0.00
237	26	BQ8660	1	4	9.00	8.33
238	26	BQ8080-1	1	3	10.33	8.67
239	26	BR4785	1	1	0.00	0.00
240	26	BQ7198	0	5	7.25	8.25
241	26	BR4366	0	1	0.00	0.00
242	26	BR4878	1		0.00	0.00



243	27	BQ8717	1	3	9.33	8.67
244	27	BR4942	1	1	0.00	0.00
245	27	BR4518	0	1	0.00	0.00
246	27	BQ8261	0	2	6.50	7.50
247	27	BQ6980	1	4	9.75	9.25
248	27	BR4562	1	1	0.00	0.00
249	27	BQ5572	0	4	6.25	9.25
250	27	BQ8800	0	3	7.00	8.00
251	27	BR2577	0	1	10.00	8.00
252	27	BR231	0	2	8.50	9.00
253	27	BQ8817	1	4	8.00	9.67
254	27	5-1	1	5	12.00	9.00
255	27	BQ2015	1	6	10.83	8.67
256	27	BR4589	0	1	0.00	0.00
257	27	BR2856	0	1	9.00	10.00
258	27	BQ8445	0	3	7.00	9.67
259	27	BQ5039	0	5	11.40	9.60
260	27	BQ5821	0	4	10.75	9.00
261	27	BR4493	0	1	0.00	0.00
262	27	BR4590	0	1	0.00	0.00
263	27	BQ4561	1	5	9.40	8.80
264	28	BQ9022	0	3	10.50	7.50
265	28	BQ4579	1	6	7.40	8.80
266	28	BR1203	0	2	12.00	6.00
267	28	BQ5556	0	6	7.20	9.00
268	28	BQ9544	0	2	9.00	7.00
269	28	BQ3959	0	6	7.20	8.40
270	28	BR6269	0		0.00	0.00
271	28	BQ8659	1	4	9.67	10.00
272	28	BQ4491	1	6	6.80	8.80
273	28	BR531	0	3	6.50	8.00
274	28	BQ6555	0	5	4.50	8.50
275	28	BQ3932	0	6	8.80	9.40
276	28	BQ6670	0	3	10.00	6.50
277	28	BQ9225	0	4	11.67	10.00
278	28	BQ4155	0	6	8.60	7.80
279	28	BR1366	1	2	12.00	8.00
280	28	BR2043	1	2	7.00	9.00
281	28	BR4305	0	1	0.00	0.00
282	28	BQ5891	0	5	12.50	8.25
283	28	BR5239	0	1	0.00	0.00
284	28	BQ8665	1	4	8.00	6.67

294	이유	BR1125	0	1	11.00	9.00
295	이유	BR2324	0	1	9.00	9.00
296	이유	BQ9894	0	1	10.00	8.00
297	이유	BQ4475	1	5	6.40	8.40
298	이유	BQ3033	0	6	6.00	9.17
299	이유	BQ9104	0	3	8.33	7.33
300	이유	BP7398	0	9	8.44	8.89
301	이유	BQ2068	0	6	9.17	8.50
302	이유	BP9571	0	7	7.43	9.14
303	이유	BR962	0	1	11.00	10.00
304	이유	BQ495	0	7	8.86	8.57
305	이유	BR1971	0	1	10.00	5.00
306	이유	BP8773	0	8	9.13	9.50
307	이유	BR2379	0	1	3.00	9.00
308	이유	BP5495	0	10	9.60	9.40
309	이유	BQ2782	0	6	8.50	9.33
310	이유	BQ4580	0	5	8.80	9.40
311	이유	BQ7024	0	4	12.50	8.75
312	이유	BQ8249	0	3	6.67	7.67
313	이유	BQ2123	0	6	10.83	10.50
314	후보	BR4455	0	1		0.00
315	후보	BR4272	0			0.00
316	후보	BR5222	0			0.00

300 두 이상의 후보돈에서 후성 유전체 마커를 분석하고 현재까지 산자 성적과의 연관성 분석을 실시 한 결과 특히 평균 산자수 10두 이상의 돼지에서 해당 유전자 마커의 메틸화가 증가하는 현상을 다시 한번 확인했으며 다산성 돼지의 판정에 유용한 마커임을 입증 하였다.

**Table 2. The statistically significant results of epigenetic marker in highper-prolific line sow**

산차별 평균두수 (10두 이상)		
메틸화	전체 산차	3-10산차/3-6산차
1 (유)	11.06±1.12	10.94±1.43
0 (무)	10.9±1.9	10.94±0.91

또한 다산육종의 300두 이상의 후보돈에서 확립된 산자수 연관 유전체 마커의 유전자형을 분석하여 계획 교배를 수립하였다.

**Table 3. The statistically significant results of litter size related genetic markers**

SowTag	BirthDay	DACT3	IGFBP3	NAT9	Parity	Av_TotalBorn
BQ4535	2014-08-21	GG	AA	AA	5	11.00
BP3003	2012-04-01	GG	AG	AA	8	12.00
BR2291	2016-03-25	GG	AA	GA	1	11.00
BP3585	2012-04-01	GG	GG	AA	10	10.00
BP7474	2013-03-14	GG	AG	AA	9	9.56
BQ4948	2014-09-15	GG	AA	AA	5	6.00
BR1679	2016-02-16	GG	GG	AA	1	8.00
122-4	2015-04-20	GG	AA	GA	4	9.75
BR2399	2016-03-28	GG	AA	GA	1	11.00
BQ8342-1	2015-06-04	GG	AG	GA	3	7.33
BR2579	2016-04-09	GG	AA	AA	1	9.00
BQ9379	2015-08-09	GG	AG	AA	3	6.67
BQ4583	2014-08-22	GG	AG	AA	5	12.00
BP8921	2013-06-29	GG	GG	GA	8	8.63
BQ6969	2015-02-13	GG	AA	GA	4	7.50
BP7566	2013-03-22	GG	AA	AA	9	8.11
BQ7144	2015-03-17	GG	AA	AA	4	8.75
BR2085	2016-03-04	GG	AA	AA	1	8.00
BP7315	2013-03-07	GG	AG	GA	9	8.00
BQ4709	2014-08-28	GG	AG	AA	5	9.20
BR2109	2016-03-12	GG	AG	GA	1	9.00
BR2580	2016-04-09	GG	AA	AA	1	8.00
122-1	2015-04-20	GG	AG	GA	4	11.50
BQ9577	2015-09-20	GG	GG	GG	2	10.50
BR2410	2016-03-30	GG	AG	AA	1	12.00
BQ7216	2015-03-27	GG	AA	GA	4	6.00
BQ8670	2015-06-18	GG	AG	GA	2	9.50
BQ9089	2015-07-17	GG	AA	GA	3	8.33
107-5	2015-04-12	GG	AA	GA	4	7.50
BQ7104	2015-03-16	GG	AA	AA	4	9.25
BR173	2015-11-02	GG	AA	AA	2	12.00
BR2714	2016-04-17	GG	AA	GA	1	7.00
BQ8002	2015-05-10	GG	AA	GA	3	12.67
BQ2175	2014-03-15	GG	AA	AA	6	9.83
BQ6531	2015-01-17	GG	GG	GA	4	10.00
BQ2105	2014-03-14	GG	AA	GA	6	11.67
BR166	2015-11-01	GG	GG	GA	2	8.00
BQ5354	2014-10-16	GG	AG	AA	5	10.00
BQ4395	2014-08-11	GG	AA	GA	5	8.60
BQ2882	2014-04-25	GG	AA	GA	6	9.33

BQ4751	2014-09-01	GG	AA	AA	5	8.80
BQ3066	2014-05-09	GG	AA	AA	6	7.33
BQ3556	2014-06-06	GG	AA	AA	5	8.00
BQ9136	2015-07-19	GG	AG	AA	3	7.33
BQ6613	2015-01-21	GG	GG	AA	4	7.75
BQ5585	2014-11-04	GG	AA	AA	4	9.50
BP8420	2013-06-02	GG	AG	AA	8	5.71
BQ5726	2014-11-16	GG	AG	AA	5	10.20
BQ5454	2014-10-23	GG	AA	GA	5	9.80
123-4	2015-04-20	GG	AG	GA	4	10.00
BR1657	2016-02-14	GG	AA	GA	2	9.00
BQ7190	2015-02-27	GG	AA	GA	4	7.50
BR1444	2016-01-30	GG	GG	AA	2	8.00
BQ1106	2013-12-18	GG	AA	GG	7	8.86
127-2	2015-04-21	GG	AA	GG	4	8.75
BQ9663	2015-09-26	GG	AA	AA	1	5.00
BR1409	2016-01-29	GG	AG	GA	2	8.00
BQ2538	2014-04-04	GG	AA	AA	6	7.67
BQ3260	2014-05-23	GG	AA	AA	5	7.60
BR1938	2016-02-27	GG	GG	AA	2	4.50
BQ0-0		GG	AG	AA	7	9.57
BP5730	2012-10-16	GG	AA	GA	9	8.11
BQ6635-1	2015-08-28	GG	AA	AA	3	6.33
BQ8869		GG				0.00
BQ4128	2014-07-26	GG	AA	AA	5	6.00
BQ0-9		GG	AG	GA	3	9.33
BR1219	2016-01-21	GG	AA	GG	2	6.50
BQ5456	2014-10-23	GG	AG	AA	5	9.40
BQ1360	2014-01-11	GG	AA	GA	7	8.50
BQ7139	2015-03-17	GG	AA	AA	4	10.67
BR2506	2016-04-08	GG	AA	GG	1	0.00
BQ9732	2015-10-02	GG	AG	GA	3	6.00
BQ5871	2014-12-07	GG	AA	AA	5	8.75
BQ7109	2015-03-17	GG	AA	GA	4	10.33
BQ7624	2015-04-23	GG	AA	GA	2	10.00
BR17	2015-10-15	GG	AA	AA	3	8.00
BP5775	2012-10-14	GG	AG	GA	10	7.44
BQ6605	2015-08-23	GG	AA	AA	3	8.33
BQ5859	2014-12-07	GG	AG	AA	4	8.75
BQ7012	2015-02-15	GG	AA	AA	4	10.50
BQ8802	2015-06-28	GG	AG	AA	3	8.00
BQ9356	2015-08-09	GG	AG	AA	3	10.67

BQ8207	2015-05-25	GG	AG	AA	3	11.67
BQ5015	2014-09-27	GG	AA	AA	5	8.60
BR2576	2016-04-09	GG	AG	AA	1	13.00
BQ6918	2015-02-09	GG	AG	GA	4	9.75
BQ1722	2014-02-22	GG	AG	AA	7	10.14
BQ9647	2015-09-05	GG	AA	AA	3	9.67
BQ6667	2015-08-29	GG	AA	AA	3	6.00
BQ6698	2015-08-30	GG	AG	AA	3	7.33
BQ8865	2015-07-03	GG	AG	AA	3	11.33
BQ9855	2015-10-05	GG	AG	GA	3	6.00
BQ9937	2015-10-10	GG	AG	AA	3	7.33
BP5778	2012-10-14	GG	AG	GA	10	9.00
BQ6596	2015-01-22	GG	AG	GA	4	11.25
BR1464	2016-02-03	GG	AA	GA	2	9.00
BQ9875	2015-10-07	GG	AA	GA	3	9.33
BR1008	2016-01-10	GG	GG	AA	2	9.50
BQ7358	2015-04-25	GG	AG	AA	4	8.00
BR2509	2016-04-08	GG	AG	AA	1	9.00
BR4319	2016-07-31	GG	AG	AA	1	9.00
BR4216	2016-07-24	GG	AA	GA	1	0.00
BR2398	2016-03-28	GG	AA	GA	1	0.00
BQ9184	2015-07-23	GG	GG	AA	3	10.33
BP5988	2012-11-03		AG	AA	10	8.40
BQ9068	2015-06-07	GG	AA	AA	3	7.00
BQ3777	2014-06-30	GG	AG	GG	6	10.67
BR3421	2016-06-14	GG	AG	AA	1	16.00
BQ9149	2015-07-14	GG	AG	GA	3	8.00
BQ2082	2014-03-06	GG	AG	AA	7	8.50
BQ7176	2015-03-19	GG	AG	AA	4	9.67
BQ9376	2015-08-09	GG	AG	GA	3	9.00
BQ6606	2015-06-25	GG	AG	AA	3	9.50
BQ7606	2015-04-09	GG	AG	GA	3	9.50
BQ6037	2014-12-13	GG	AA	AA	5	10.50
BQ3641	2014-06-13	GG	AG	GA	6	8.00
BQ7352	2015-04-04	GG	AA	GA	3	9.50
BR3395	2016-06-11	GG	AG	AA	1	0.00
BQ6386	2015-01-06	GG	AG	AA	5	10.25
BR3603	2016-06-26	GG	AG	AA	1	0.00
BQ9514	2015-09-19	GG	AG	AA	3	11.50
BQ6179	2014-12-22	GG	AG	AA	5	9.25
BR3466	2016-06-19	GG	AA	AA	1	10.00
BR3840	2016-07-08	GG	AG	AA	1	0.00

BQ9680	2015-08-30	GG	AA	AA	2	8.00
BR3481	2016-06-19	GG	AA	AA	1	0.00
BR3473	2016-06-19	GG	AG	AA	1	0.00
BR4288	2016-07-30	GG	AG	GA	1	0.00
BR3193	2016-05-29	GG	AA	AA	1	0.00
BR118	2015-10-20	GG	AG	AA	3	10.50
BQ4342	2014-08-09	GG	AA	GA	6	9.00
BR1319	2016-01-25	GG	AA	GA	2	8.00
BR1400	2016-01-29	GG	AG	AA	2	6.00
BR3581	2016-06-24	GG	AA	GA	1	0.00
BQ6423	2015-01-11	GG	AA	AA	5	11.00
BQ6622	2015-01-22	GG	AG	AA	5	10.00
BQ1025	2013-12-20		AG	GG	7	4.50
BQ1438	2014-01-17		AG	AA	7	9.67
BQ7166	2015-02-24		AA	AA	3	10.00
BR3587	2016-06-25	GG	AG	GA	1	0.00
BQ9640	2015-09-25	GG	AA	AA	3	6.00
BQ7148-1	2015-02-22	GG	AA	AA	4	9.00
127-3	2015-04-21	GG	AA	GG	4	10.33
BR3797	2016-07-06	GG	AA	AA	1	0.00
BP5865	2012-10-28		AA	GA	10	8.67
BQ5387	2014-10-18	GG	AG	AA	5	8.75
BQ7968	2015-05-09	GG	AG	AA	3	7.00
BR1373	2016-01-29	GG	AA	AA	2	10.00
BQ8246	2015-05-31	GG	GG	GA	3	9.50
BQ8184	2015-05-24	GG	AG	AA	4	9.33
BQ9972	2015-10-13	GG	AA	AA	3	7.50
BQ7195	2015-02-28	GG	AG	GA	4	8.67
BQ6701	2015-01-27	GG	AG	AA	3	8.00
BP8250	2013-05-25	GG	GG	AA	9	8.63
BR281	2015-11-06	GG	AG	GA	3	7.00
BR3298	2016-06-05	GG	AA	AA	1	0.00
BQ7677	2015-09-05	GG	AA	AA	3	10.00
BR2858	2016-02-06	GG	AG	GA	2	9.00
BQ6389	2015-01-06		AG	AA	5	8.75
BQ1958	2014-03-01	GG	AA	AA	7	7.17
BQ7695	2015-04-27	GG	AG	GA	3	9.00
BR172	2015-11-02	GG	AA	GA	3	6.00
BR1826	2016-02-21	GG	GG	AA	2	6.00
BR1699	2017-02-17	GG	AG	AA	1	0.00
BR4072	2016-07-20	GG	GG	GA	1	0.00
BQ8245	2015-05-31	GG	AG	GA	4	7.67

BR8350	2017-07-08	GG	AA	AA	1	0.00
BQ5420	2014-10-19	GG	AA	AA	5	9.00
BR3867	2016-07-10	GG	AG	AA	1	0.00
BR1355	2016-01-28	GG	AG	GA	2	4.00
BR4107	2016-07-22	GG	AA	AA	1	0.00
BR3726	2016-07-02	GG	AG	AA	1	0.00
BQ240	2013-10-19	GG	AA	AA	7	7.57
BR8333	2017-07-08	GG	AG	GA	1	0.00
BR1697	2016-02-17	GG	AG	AA	1	8.00
BR2487	2016-04-04	GG	AG	GA	1	0.00
BQ9854	2015-10-05	GG	AA	GA	3	11.00
BQ5785	2014-11-23	GG	AG	GA	4	8.50
BQ716	2013-11-23	GG	AG	AA	7	8.29
BQ5701	2014-01-14	GG	AG	GA	4	9.25
BR1509	2016-02-06	GG	AG	GA	1	8.00
129-1	2015-04-22	GG	AA	GG	3	13.00
BR106	2015-10-26	GG	AG	AA	2	8.00
BQ2194	2014-03-15	GG	AG	AA	6	10.17
BQ6338	2015-01-03	GG	GG	AA	4	9.00
BQ2962	2014-04-26	GG	AG	GA	6	8.83
BQ410	2013-11-01	GG	AG	AA	7	10.29
BQ7657	2015-04-25	GG	AA	AA	2	5.00
107-8	2015-04-11	GG	AA	GA	3	12.33
BQ4533-1		GG	AG	GA	3	9.33
BQ1190	2014-01-04	GG	AA	AA	6	9.33
BP8377	2013-06-01	GG	AA	GA	8	8.13
BQ9977	2015-10-17	GG	AA	AA	2	8.50
BQ3263	2014-05-23	GG	AG	AA	5	8.00
BQ8156	2015-07-06	GG	AG	AA	3	11.00
BQ7361		GG	GG	AA	3	4.00
BQ3879	2014-07-12	GG	AA	AA	4	8.75
BR26	2015-10-20	GG	AA	AA	2	6.50
BR1512	2016-02-06	GG	AA	AA	2	10.00
BQ9896	2015-10-10	GG	AG	AA	3	11.00
BQ6685	2015-01-27	GG	AG	GA	5	9.00
BQ3455	2014-06-01	GG	AA	GA	6	9.40
BQ9600	2015-09-23	GG	AA	AA	3	9.50
BR2045	2016-03-05	GG	AG	GG	2	11.00
BP4057	2012-05-13	GG	AG	GA	10	9.78
BR1145	2016-11-08	GG	AA	GA	2	7.00
BQ7132-1		GG	AA	AA	4	8.67
BR363	2015-11-14	GG	AG	AA	2	10.00

BR289	2015-11-04	GG	AA	AA	3	9.00
BR2019	2016-03-07	GG	AA	GA	2	11.00
BQ7648	2015-04-24	GG	AG	AA	4	8.67
BQ6424	2015-01-11	GG	AG	AA	5	10.50
BQ6236	2014-12-27	GG	AA	AA	5	8.50
BP8841	2013-06-28	GG	AG	AA	9	10.88
BQ8718	2015-06-21	GG	AG	AA	3	9.00
BR1123	2016-01-17	GG	AG	AA	1	8.00
BQ8683	2015-06-30	GG	GG	AA	2	5.50
BQ3592	2014-06-06	GG	AA	GG	5	12.80
BQ8181	2015-05-24	GG	AA	AA	2	6.00
BR2188	2016-03-18	GG	AA	AA	2	8.00
BQ3276		GG	AG	GG		0.00
BR4897	2016-09-09	GG	AA	GA	1	0.00
BR297	2015-11-07	GG	AA	AA	2	12.50
BQ4502	2014-08-18	GG	AG	AA	5	10.40
BQ1898	2014-03-01	GG	AA	AA	6	10.17
BQ5893	2014-12-01	GG	AG	AA	4	13.25
BQ5639	2014-11-08	GG	AG	AA	4	9.00
BQ6942	2015-02-09	GG	AG	GA	4	10.00
BQ8728	2015-06-23	GG	AA	GA	3	7.67
BQ6412	2015-01-10	GG	AG	GA	4	5.25
BQ5862	2014-12-07	GG	AA	AA	4	10.00
BQ2763	2014-04-18	GG	AG	AA	6	7.33
BR4468	2016-08-12		AA	AA	1	0.00
BR4848	2016-09-06	GG	AA	AA	1	0.00
BQ9664	2015-09-26	GG	GG	AA	2	11.00
BR4987	2016-09-12	GG	AA	AA	1	0.00
BQ8660	2015-06-19	GG	AG	AA	4	9.00
BQ8080-1		GG	GG	AA	3	10.33
BR4785	2016-09-03	GG	AG	AA	1	0.00
BQ7198	2015-03-20	GG	AG	AA	5	7.25
BR4366	2016-08-05		GG	AA	1	0.00
BR4878		GG	AA	AA		0.00
BQ8717	2015-06-21		AG	AA	3	9.33
BR4942	2016-09-11	GG	AG	AA	1	0.00
BR4518	2016-08-14	GG	AA	AA	1	0.00
BQ8261	2015-05-31	GG	AA	AA	2	6.50
BQ6980	2015-02-11	GG	GG	AA	4	9.75
BR4562	2016-08-18	GG	AA	GA	1	0.00
BQ5572	2014-11-01	GG	AG	AA	4	6.25
BQ8800	2015-06-28	GG	AA	GA	3	7.00



BR2577	2016-04-09	GG	AA	AA	1	10.00
BR231	2015-11-04	GG	AA	AA	2	8.50
BQ8817	2015-06-28	GG	AG	GA	4	8.00
5-1	2015-01-04	GG	AA	AA	5	12.00
BQ2015	2014-03-06	GG	AA	GA	6	10.83
BR4589	2016-08-21	GG	AA	AA	1	0.00
BR2856	2016-04-25	GG	GG	GA	1	9.00
BQ8445	2015-06-06	GG	AA	AA	3	7.00
BQ5039	2014-09-23	GG	GG	AA	5	11.40
BQ5821	2014-11-25	GG	AG	AA	4	10.75
BR4493	2016-08-13	GG	AG	GA	1	0.00
BR4590	2016-08-21	GG	AA	AA	1	0.00
BQ4561	2014-08-21	GG	AA	GA	5	9.40
BQ9022	2015-07-12	GG	AG	AA	3	10.50
BQ4579	2014-08-22	GG	AG	GA	6	7.40
BR1203	2016-01-19	GG	AG	AA	2	12.00
BQ5556	2014-10-31	GG	AA	AA	6	7.20
BQ9544	2015-09-20	GG	AG	GA	2	9.00
BQ3959	2014-07-15	GG	AA	GA	6	7.20
BR6269		GG	AA	AA		0.00
BQ8659	2015-06-19	GG	AA	AA	4	9.67
BQ4491	2014-08-18	GG	AG	GA	6	6.80
BR531	2015-11-28	GG	AG	AA	3	6.50
BQ6555	2015-01-18	GG	AG	GG	5	4.50
BQ3932	2014-07-13	GG	AG	AA	6	8.80
BQ6670	2015-08-29	GG	AG	GA	3	10.00
BQ9225	2015-07-26	GG	AA	AA	4	11.67
BQ4155	2014-07-27	GG	GG	AA	6	8.60
BR1366	2016-01-29	GG	AA	AA	2	12.00
BR2043	2016-03-05	GG	AA	GA	2	7.00
BR4305	2016-07-30	GG	AA	AA	1	0.00
BQ5891	2014-12-01	GG	AA	AA	5	12.50
BR5239	2016-09-25	GG	AA	AA	1	0.00
BQ8665	2015-06-19	GG	AA	AA	4	8.00
BR1569	2017-02-13	GG	GG	GA	0	0.00
BR4595	2016-08-18	GG	AG	AA	0	0.00
BR3869	2016-07-10	GG	AG	AA	0	0.00
BR4866		GA	AG	GA	0	0.00
BR3158	2016-05-28	GA	AA	GA	0	0.00
129-2	2015-04-22	GG	AA	GA	0	0.00
128-10	2015-04-21	GG	AG	AA	0	0.00
121-10	2015-04-17	GG	AA	GA	0	0.00

BR737	2015-12-20	GG	AA	AA	0	0.00
BR1125	2016-01-15	GG	AG	AA	1	11.00
BR2324	2017-03-27	GG	AA	AA	1	9.00
BQ9894	2015-10-10	GG	AG	GA	1	10.00
BQ4475	2014-08-16	GG	AG	AA	5	6.40
BQ3033	2014-05-07	GG	AG	AA	6	6.00
BQ9104	2015-07-18	GG	AG	AA	3	8.33
BP7398	2013-03-08	GG	AG	AA	9	8.44
BQ2068	2014-03-06	GG	AA	AA	6	9.17
BP9571	2013-08-23	GG	AG	GA	7	7.43
BR962	2016-01-24	GG	AG	AA	1	11.00
BQ495	2013-11-09	GG	AG	GA	7	8.86
BR1971	2016-03-01	GG	AG	GA	1	10.00
BP8773	2013-06-22	GG	AA	GA	8	9.13
BR2379	2016-03-28	GG	AG	AA	1	3.00
BP5495	2012-09-28	GG	AG	AA	10	9.60
BQ2782	2014-04-18	GG	AG	AA	6	8.50
BQ4580	2014-08-22	GG	AG	GG	5	8.80
BQ7024	2015-02-15	GG	AA	AA	4	12.50
BQ8249	2015-05-31	GG	AG	GA	3	6.67
BQ2123	2014-03-14	GG	AG	AA	6	10.83
BR4455	2016-08-12	GG	AG	AA	1	0.00
BR4272		GG	AA	AA		0.00
BR5222		GG	AG	GG		0.00

이 결과 NAT9는 GG 유전자형에서 10.12마리, IGFBP3는 GG타입에서 9.36 마리의 총산자수를 나타내어 재현성을 확인하였으며 이 두 개의 유전자처럼 homozygote로 이루어진 DNA 마커가 유전자의 고정 효과 및 품종 개량에도 효율적으로 적용 할 수가 있어 계획교배에는 NAT9 과 IGFBP3유전자에 초점을 맞추어 진행하기로 계획을 수립하였다.

**Table 4. The number of TNB according to genotype of NAT9 gene**

NAT9 (전체)		record
AA (150)	ave	9.34
	std	1.63
AG (81)	ave	8.96
	std	1.32
GG (10)	Ave	10.12
	std	1.97

**Table 5. The number of TNB according to genotype of IGFBP3 gene**

IGFBP3 (전체)		record
AA (106)	ave	9.19
	std	1.61
AG (116)	ave	9.28
	std	1.59
GG (19)	Ave	9.36
	std	1.08

Table 6과 같이 산자수 연관 유전자를 두 개가지는 돼지의 경우 9.9 마리, 10.23의 총산자수를 유전자를 세 개 가지는 경우 10.81 마리 및 11.08 마리의 총산자수를 유전자 네개를 가지는 돼지의 경우 총산자수가 12.04 마리로 산자수 연관 유전자의 우월한 형질의 조합이 많아질수록 산자수가 증가 하는 현상을 확인하였다.

이는 돼지 산자수를 결정하는데 있어서 polygene의 영향이 크다는 것을 알 수 있었다. 산자수 연관 유전자 중에서 단일 유전자의 효과로는 NAT9유전자의 산자수 증대 효과가 가장 크다고 결론을 내릴 수 있었다. 또한 다산육종의 경우 산자수 연관 유전체 마커 중에서 DACT3 유전자는 전체 돼지에서 GG 타입으로 고정이 되었다는 것을 확인하였다.

**Table 6. The number of TNB by genetic markers associated with litter size**

산자수 연관 유전자	총산자수
IGFBP3 (AG), DACT3 (GG)	9.9
NAT9 (GG), DACT3 (GG)	10.23
NAT9 (GG), IGFBP2 (AT), DACT3 (GG),	10.81
NAT9 (GG), MAP3K3 (CT), DACT3 (GG)	11.08
IGFBP3 (AG), IGFBP2 (AT), MAP3K3 (CT), DACT3 (GG)	12.04

다산 종돈의 SNP 마커를 기본으로 하는 육종 프로그램을 중심으로 각 돼지별 산자수 연관 최종 유전자 마커에 대하여 유전자형을 분석 하였으며, NAT9 유전자의 GG 타입 DACT3 유전자의 GG 타입의 모돈을 육종가가 높은 후보돈 중에서 다산성 계체로 선정하고 계획 교배를 실시하였다. 수컷 중에서 BR1569돼지가 NAT9 (GG), IGFBP3 (GG), DACT3 (GG) 타입유전자를 가지고 있어서 이를 활용하여 BR1569와 후보 암컷 12과 계획교배를 실시하였다.

**Table 7. The candidate sows with litter size related genetic markers**

NO	WeekStr	SowTag	Av_TotalBorn	Parity	DACT3	IGFBP3	NAT9
24	10	BQ9577	10.50	2	GG	GG	GG
54	12	BQ1106	8.86	7	GG	AA	GG
55	12	127-2	8.75	4	GG	AA	GG
69	14	BR1219	6.50	2	GG	AA	GG
109	17	BQ3777	10.67	6	GG	AG	GG
139	19	BQ1025	4.50	7		AG	GG
145	20	127-3	10.33	4	GG	AA	GG
184	22	129-1	13.00	3	GG	AA	GG
207	24	BR2045	11.00	2	GG	AG	GG
221	25	BQ3592	12.80	5	GG	AA	GG
277	28	BQ6555	4.50	5	GG	AG	GG
313	이유	BQ4580	8.80	5	GG	AG	GG

계획교배 결과 태어난 자돈에 대해서 마커의 유전자타입 분석 결과 세 개체에서 태어난 자돈 중에서 NAT9 (GG)와 DACT3 (GG)를 가지는 11마리를 확보하였음.

**Table 8. Genotyping analysis of piglets produced by mating programe**

모	sample	sex	IGFBP3	NAT9	DACT3	IGFBP2
127-2	2621	F	GA	GG		TT
	2622	F	GA	GG	GG	TT
	2623	F	GA	GA	GG	AT
	2624	F	GA	GA		AT
	2625	F	GA	GA		TT
	2626	F	GA	GG	GG	AT
	2627	F	GA	GA	GG	AT
	2628	M	GA	GG	GG	TT
BQ1106	2578	F	GA	GA	GG	AT
	2579	F	GA	GG	GG	AT
	2580	F	GA	GA	GG	AT
	2581	F	GA	GG	GG	AT
	2582	F	GA	GG	GG	AT
	2583	M	GA	GG	GG	AT
127-3	3336	M	GA	GA	GG	TT
	3330	F	GA	GG	GG	TT
	3329	F	GA	GA	GG	TT
	3335	M	GA	GG	GG	AT
	3332	M	GA	GG	GG	AT

	3328	F	GA	GG	GG	AT
	3334	M	GA	GA	GG	AT
	3331	F	GA	GA	GG	AT
	3333	M	GA	GA	GG	AT

산자수와 함께 유두숫자는 포유능력을 보여주는 형질로 태어난 새끼 돼지를 성장 시키는데 중요한 마커이다. 현재 돼지 육종 회사에서도 생식 능력이 증대된 다산성 개체를 개량하기 위해서 산자수와 더불어 유두의 개수를 늘리려는 노력이 이루어지고 있는데 본 연구에서 개발한 유전자 마커를 이용하여 계획교배 후 태어난 자돈 중에서 3332, 3335 명호의 새끼돼지는 체장이 길고 유두수가 16개 또는 15개가 확인되었다. 현재 다산 육종 옹돈의 유두 숫자는 표 9와 같다. 이는 버크셔 돼지의 평균 젖꼭지 숫자인 12-14개에 2-3개 많은 결과로 총 산자수가 증대되는 것과 같이 포유능력 또한 증가 할 것으로 기대된다.



Figure 1. teat number of piglet produced by mating program

Table 9. Teat number of boar in Dasan genetics

옹돈번호	부,모개체번호		생년월일	유두수	
BR1569	120724002AM		2017-02-23	8-8	16
	118-6	BP5179			
BR1569					
BS829	BQ6661		2017-08-15	7-7	14
	BR3158	BR3421			

	BS829					
BS1374	118-6	BR1569	BR106	2017-09-23	7-7	14
		BS1374				
BS1381	118-6	BR1569	BR1509	2017-09-24	8-7	15
		BS1381				
BS1496	119176007AM	129-2	107-8	2017-10-02	7-7	14
		BR1496				
BS141	120724002AM	118-6	122-4	2017-06-23	7-7	14
		BS141				
BR9422	BP7285	BR8788	BQ1190	2017-05-10	7-7	14
		BR9422				
BR3869	BP5085	BQ6661	BQ6338	2016-07-10	7-7	14
		BR3869				
BS1271	BQ6661	BR3158	BR1699	2017-09-17	9-8	17
		BS1271				
76-6	KURO5 BLACK DIAMOND	KURO4 747 COUNTESS		2017-04-04	8-7	15
		76-6				
137-6	WIPP4 NST	KURO4 747 COUNTESS		2017-06-01	8-7	15
		137-6				
BS2239	118-6			2017-11-13	8-8	16

BS1381	118-6 1569		2017-09-24	8-7	15
BS2549	118-6 BR1569		2017-12-06	8-8	16
BS1988	118-6 BR1569		2017-11-02	8-8	16
BS2079	BQ6661 BR3158		2017-11-05	8-8	16
BS00				8-9	17
BS2606	118-6 BR1569		2017-12-09	8-9	17
BS3603				8-9	17
BS3222				8-7	15
평균 유두수					15.35

(2) 세대 추적을 통한 marker의 확립

계획 교배와 더불어 기존의 확보한 산자수 증대 유전자 마커의 효과를 재검정 해보기 위하여 현재까지 확보한 개체별 산자수 증대 유전자 마커의 유전자형 데이터와 다산육종에서 완성한 친자 확인 시스템을 활용하여 세대 추적을 통한 검정을 실시하였다.

IGFBP3 유전자의 경우 GG type 유전자가 10.19마리 산자수를 가지는데 비해 AG타입 유전자형을 가지는 모돈은 산자수가 9.71마리로 확인되어 GG 유전자형이 산자수가 더 많은 것으로 확인되었다. 이 결과는 여러차례 재현성 검증을 통해 확보한 연구 결과와 동일한 결과로 IGFBP3 유전자를 산자수 증대 유전자 마커로서 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 9. litter size through generation

NO	SowTag	IGFBP3	Dam	IGFBP3	Parity	AV_Tota lborn	Bv_Rpt
2	BP3003	AG	BN4336	AG	9	12.00	1.667
4	BP3585	GG	BN4336	AG	11	10.00	1.400
5	BP7474	AG	BN4729	AG	10	9.56	0.516
6	BQ4948	AA	BP2261	AA	6	6.00	-0.117
12	BQ9379	AG	BP34	AG	3	6.67	0.115
13	BQ4583	AG	BP5866	AA	6	12.00	1.748
14	BP8921	GG	BN9035	AG	9	8.63	-0.645
16	BP7566	AA	BP641	AA	10	8.11	-0.051
17	BQ7144	AA	BP4930	AA	5	8.75	0.716
20	BQ4709	AG	BP3713	AG	6	9.20	-0.064
21	BR2109	AG	BP9190	AA	1	9.00	1.137
25	BR2410	AG	BP3585	GG	2	12.00	0.856
27	BQ8670	AG	BP5865	AA	3	9.50	1.233
28	BQ9089	AA	BP1279	AG	4	8.33	-0.360
33	BQ8002	AA	BP5671	AA	4	12.67	0.596
34	BQ2175	AA	BP4987		7	9.83	0.372
36	BQ2105	AA	BP3305	AA	7	11.67	0.996
37	BR166	GG	BQ495	AG	3	8.00	-0.196
41	BQ4751	AA	BP2109	AG	6	8.80	-0.187
44	BQ9136	AG	BP7755	AG	4	7.33	-0.644
46	BQ5585	AA	BP8250-1	AG	5	9.50	0.740
47	BP8420	AG	BP3960		8	5.25	-1.334
48	BQ5726	AG	BP5865	AA	6	10.20	1.268
51	BR1657	AA	BQ3617	AG	3	9.00	0.496
58	BQ2538	AA	BP2529	AA	7	7.67	-0.306
62	BP5730	AA	BN7965		9	8.11	-0.046
63	BQ6635-1	AA	BN8352	AA	4	6.33	-0.573
65	BQ4128	AA	BP5735	AA	6	6.00	-0.614



79	BP5775	AG	BP1273		11	7.40	-1.074
86	BQ5015	AA	BP6018	AG	6	8.60	0.483
89	BQ1722	AG	BP3585	GG	8	10.14	1.007
91	BQ6667	AA	BP6449	AG	4	6.00	-0.834
94	BQ9855	AG	BP5671	AA	4	6.00	-0.181
96	BP5778	AG	BP1273		10	9.00	-0.617
97	BQ6596	AG	BP8420	AG	5	11.25	-0.107
99	BQ9875	AA	BN9066	AG	4	9.33	1.594
103	BR4319	AG	BQ4502		2	9.00	1.467
106	BQ9184	GG	BP3403	AA	4	10.33	1.010
108	BQ9068	AA	BP7564	AA	4	4.67	-0.982
110	BR3421	AG	BP7450		2	16.00	1.029
111	BQ9149	AG	BP5775	AG	4	8.00	-0.867
113	BQ7176	AG	BP34	AG	5	10.00	1.010
116	BQ7606	AG	BQ2194	AG	4	9.33	1.502
118	BQ3641	AG	BP6449	AG	7	7.83	0.028
119	BQ7352	AA	BP6095	AG	4	11.00	0.860
120	BR3395	AG	BP4112	AA	2	6.00	0.319
121	BQ6386	AG	BP3585	GG	6	10.00	0.576
124	BQ6179	AG	BP3003	AG	5	9.60	0.590
126	BR3840	AG	BP6621		2	12.00	1.058
131	BR3193	AA	BP9622	AA	2	7.00	0.502
132	BR118	AG	BP933	AG	4	10.67	1.244
134	BR1319	AA	BP6449	AG	3	10.00	1.345
137	BQ6423	AA	BP933	AG	6	10.40	1.831
139	BQ1025	AG	BP1686		7	4.43	-1.033
144	BQ7148-1	AA	BP8841	AG	5	9.00	0.793
147	BP5865	AA	BP641	AA	10	8.80	1.112
150	BR1373	AA	BQ2194	AG	3	5.50	-0.540
154	BQ7195	AG	BN9636	AG	5	9.25	0.636
155	BQ6701	AG	BP3838	AA	4	8.00	1.023
156	BP8250	GG	BP1472		9	8.56	0.912
157	BR281	AG	BP3756	AA	4	6.33	0.380
161	BQ6389	AG	BP3585	GG	6	8.80	0.317
162	BQ1958	AA	BP7156	AG	7	6.86	-0.742
163	BQ7695	AG	BP8297	GG	4	8.33	0.925
165	BR1826	GG	BP8357	GG	3	7.00	0.317
170	BQ5420	AA	BN2270	AG	6	9.20	-0.674
172	BR1355	AG	BQ3617	AG	3	7.50	0.092
173	BR4107	AA	BQ3617	AG	1	6.00	0.560
179	BQ9854	AA	BP5671	AA	3	11.00	0.972
180	BQ5785	AG	BP5730	AA	5	8.60	-0.093

186	BQ2194	AG	BP1468	AG	8	10.14	0.828
193	BQ1190	AA	BP2501	AA	7	8.14	-0.203
197	BQ8156	AG	BP2612	AG	4	11.50	1.763
203	BQ6685	AG	BP2529	AA	5	9.00	0.194
204	BQ3455	AA	BP641	AA	6	9.17	1.135
215	BQ6424	AG	BP933	AG	5	9.20	1.063
217	BP8841	AG	BP1434		9	10.33	0.998
218	BQ8718	AG	BP3085	AG	3	8.67	-0.251
229	BQ5893	AG	BN8817	AA	5	13.25	1.933
230	BQ5639	AG	BP8297	GG	5	9.00	0.140
233	BQ6412	AG	BP6818	AG	5	5.25	0.684
239	BQ8660	AG	BP3713	AG	4	9.00	-0.108
243	BQ8665	GG	BP3713	AG	4	8.00	-0.495
245	BR4878	AG	BQ8001		1		0.618
246	BQ8717	AG	BP3085	AG	4	9.33	-0.083
247	BR4942	AA	107-5		1		0.891
250	BQ6980	AA	BP2612	AG	5	9.75	0.837
261	BQ8445	GG	BP5377	AA	4	7.00	0.768
263	BQ5821	AG	BP1449	AG	5	10.75	0.371
266	BQ4561	AG	BP5961	AG	6	9.40	0.307
268	BQ4579	AG	BP5866	AA	6	7.40	0.676
270	BQ5556	AG	BP4112	AA	6	7.20	-0.050
274	BQ8659	AG	BP3713	AG	4	9.67	-0.080
277	BQ6555	AG	BP5866	AA	5	4.50	0.208
280	BQ9225	GG	BP852	AA	4	11.67	1.393
285	BQ5891	AA	BN8817	AA	5	12.50	1.825
286	BR5239	AA	BQ4169		1		0.626
289	BR4595	AG	BQ2538				0.808
291	BR4866	AG	122-1				0.954
296	BR737	AA	BN9636	AG			-0.281
297	BR1125	AG	BP7128	AG	2	11.00	1.472
298	BR2324	AA	BQ2175	AA	2	9.00	1.381
307	BQ495	AG	BN9849		8	8.86	-0.482
309	BP8773	AA	BP2223	AA	9	9.13	0.030
313	BQ4580	AG	BP5866	AA	6	8.80	1.266
317	BR4455	AG	BP9190	AA	1		-0.009
318	BR4272	AA	BQ4687		1		1.433

NAT9 유전자의 경우 부모세대 추적 조사를 통해 얻은 결과 GG type는 산자수가 10.985마리에 비해 GA유전자형은 8.43마리로 GG 유전자형의 돼지가 새끼를 더 많이 낳는 것으로 확인하였다.

Table 10. litter size through generation

NO	SowTag	NAT9	Dam	NAT9	Parity	AV_Tota lborn	Bv_Rpt
2	BP3003	AA	BN4336	AA	9	12.00	1.667
4	BP3585	AA	BN4336	AA	11	10.00	1.400
5	BP7474	AA	BN4729	AG	10	9.56	0.516
6	BQ4948	AA	BP2261	AG	6	6.00	-0.117
12	BQ9379	AA	BP34	AA	3	6.67	0.115
13	BQ4583	AA	BP5866	AG	6	12.00	1.748
14	BP8921	GA	BN9035	AG	9	8.63	-0.645
16	BP7566	AA	BP641	AA	10	8.11	-0.051
17	BQ7144	AA	BP4930	AA	5	8.75	0.716
20	BQ4709	AA	BP3713	AA	6	9.20	-0.064
21	BR2109	GA	BP9190	AG	1	9.00	1.137
25	BR2410	AA	BP3585	AA	2	12.00	0.856
27	BQ8670	GA	BP5865	AG	3	9.50	1.233
28	BQ9089	GA	BP1279	AG	4	8.33	-0.360
33	BQ8002	GA	BP5671	GG	4	12.67	0.596
34	BQ2175	AA	BP4987		7	9.83	0.372
36	BQ2105	GA	BP3305	AG	7	11.67	0.996
37	BR166	GA	BQ495	AG	3	8.00	-0.196
41	BQ4751	AA	BP2109	AA	6	8.80	-0.187
44	BQ9136	AA	BP7755	AA	4	7.33	-0.644
46	BQ5585	AA	BP8250- 1	AG	5	9.50	0.740
47	BP8420	AA	BP3960		8	5.25	-1.334
48	BQ5726	AA	BP5865	AG	6	10.20	1.268
51	BR1657	GA	BQ3617	AG	3	9.00	0.496
58	BQ2538	AA	BP2529	AA	7	7.67	-0.306
62	BP5730	GA	BN7965		9	8.11	-0.046
63	BQ6635- 1	AA	BN8352	AG	4	6.33	-0.573
65	BQ4128	AA	BP5735	AA	6	6.00	-0.614
79	BP5775	GA	BP1273		11	7.40	-1.074
86	BQ5015	AA	BP6018	AA	6	8.60	0.483
89	BQ1722	AA	BP3585	AA	8	10.14	1.007
91	BQ6667	AA	BP6449	AG	4	6.00	-0.834
94	BQ9855	GA	BP5671	GG	4	6.00	-0.181
96	BP5778	GA	BP1273		10	9.00	-0.617

97	BQ6596	GA	BP8420	AA	5	11.25	-0.107
99	BQ9875	GA	BN9066	GG	4	9.33	1.594
103	BR4319	AA	BQ4502		2	9.00	1.467
106	BQ9184	AA	BP3403	AG	4	10.33	1.010
108	BQ9068	AA	BP7564	AA	4	4.67	-0.982
110	BR3421	AA	BP7450		2	16.00	1.029
111	BQ9149	GA	BP5775	AG	4	8.00	-0.867
113	BQ7176	AA	BP34	AA	5	10.00	1.010
116	BQ7606	GA	BQ2194	AA	4	9.33	1.502
118	BQ3641	GA	BP6449	AG	7	7.83	0.028
119	BQ7352	GA	BP6095	AG	4	11.00	0.860
120	BR3395	AA	BP4112	AA	2	6.00	0.319
121	BQ6386	AA	BP3585	AA	6	10.00	0.576
124	BQ6179	AA	BP3003	AA	5	9.60	0.590
126	BR3840	AA	BP6621		2	12.00	1.058
131	BR3193	AA	BP9622	AA	2	7.00	0.502
132	BR118	AA	BP933	AA	4	10.67	1.244
134	BR1319	GA	BP6449	AG	3	10.00	1.345
137	BQ6423	AA	BP933	AA	6	10.40	1.831
139	BQ1025	GG	BP1686		7	4.43	-1.033
144	BQ7148- 1	AA	BP8841	AA	5	9.00	0.793
147	BP5865	GA	BP641	AA	10	8.80	1.112
150	BR1373	AA	BQ2194	AA	3	5.50	-0.540
154	BQ7195	GA	BN9636	AA	5	9.25	0.636
155	BQ6701	AA	BP3838	AA	4	8.00	1.023
156	BP8250	AA	BP1472		9	8.56	0.912
157	BR281	GA	BP3756	GG	4	6.33	0.380
161	BQ6389	AA	BP3585	AA	6	8.80	0.317
162	BQ1958	AA	BP7156	AA	7	6.86	-0.742
163	BQ7695	GA	BP8297	AA	4	8.33	0.925
165	BR1826	AA	BP8357	AA	3	7.00	0.317
170	BQ5420	AA	BN2270	AG	6	9.20	-0.674
172	BR1355	GA	BQ3617	AG	3	7.50	0.092
173	BR4107	AA	BQ3617	AG	1	6.00	0.560
179	BQ9854	GA	BP5671	GG	3	11.00	0.972
180	BQ5785	GA	BP5730	AG	5	8.60	-0.093
186	BQ2194	AA	BP1468	AA	8	10.14	0.828
193	BQ1190	AA	BP2501	AG	7	8.14	-0.203

197	BQ8156	AA	BP2612	AA	4	11.50	1.763
203	BQ6685	GA	BP2529	AA	5	9.00	0.194
204	BQ3455	GA	BP641	AA	6	9.17	1.135
215	BQ6424	AA	BP933	AA	5	9.20	1.063
217	BP8841	AA	BP1434		9	10.33	0.998
218	BQ8718	AA	BP3085	AA	3	8.67	-0.251
229	BQ5893	AA	BN8817	AG	5	13.25	1.933
230	BQ5639	AA	BP8297	AA	5	9.00	0.140
233	BQ6412	GA	BP6818	GG	5	5.25	0.684
239	BQ8660	AA	BP3713	AA	4	9.00	-0.108
243	BQ8665	AA	BP3713	AA	4	8.00	-0.495
245	BR4878	AA	BQ8001		1		0.618
246	BQ8717	AA	BP3085	AA	4	9.33	-0.083
247	BR4942	AA	107-5		1		0.891
250	BQ6980	GA	BP2612	AA	5	9.75	0.837
261	BQ8445	AA	BP5377	AA	4	7.00	0.768
263	BQ5821	GA	BP1449	AA	5	10.75	0.371
266	BQ4561	AA	BP5961	AG	6	9.40	0.307
268	BQ4579	AA	BP5866	AG	6	7.40	0.676
270	BQ5556	GA	BP4112	AA	6	7.20	-0.050
274	BQ8659	GA	BP3713	AA	4	9.67	-0.080
277	BQ6555	AA	BP5866	AG	5	4.50	0.208
280	BQ9225	AA	BP852	AG	4	11.67	1.393
285	BQ5891	AA	BN8817	AG	5	12.50	1.825
286	BR5239	AA	BQ4169		1		0.626
289	BR4595	AA	BQ2538				0.808
291	BR4866	GA	122-1				0.954
296	BR737	AA	BN9636	AA			-0.281
297	BR1125	AA	BP7128	AA	2	11.00	1.472
298	BR2324	AA	BQ2175	AA	2	9.00	1.381
307	BQ495	GA	BN9849		8	8.86	-0.482
309	BP8773	GA	BP2223	AG	9	9.13	0.030
313	BQ4580	GG	BP5866	AG	6	8.80	1.266
317	BR4455	AA	BP9190	AG	1		-0.009
318	BR4272	AA	BQ4687		1		1.433

다산육종에서 새로 도입한 종돈에 대해서 산자수 증대 유전자 마커를 분석하여 새로운 교배 시스템에 활용하였음.

Table 11. Genotyping analysis of new arrival breeding pigs

sex	sample	NAT9	IGFBP3
Boar	76-6	GA	GG
	101-5	GA	AA
	137-6	GA	AG
Gilt	137-4	GA	AG
	123-2	AA	AA
	137-3	GA	AA
	132-3	GA	AA
	145-2	GG	AA
	137-1	GA	AA
	123-1	GG	AA
	148-1	GA	AG
	154-1	AA	AA
	1-2	GG	AA
	140-3	AA	GG
	118-3	GA	AA
	1-4	AA	AA
	140-2	AA	AA
	134-1	GA	AG
	141-1	GA	AA
	146-1	GG	AG

4차년도까지 연구 결과 유전체, 후성 유전체, 전사체를 포괄하는 통합 유전체 마커를 개발하고 생식 능력을 조절하는데 있어서 후보 유전자의 분자생물학적 메커니즘을 연구하고자 VTCN1, SYT13, CREG1, TFF2 등의 유전자의 기능을 탐색하였다.

그 결과 SYT13 유전자는 버크셔 돼지의 산자수 상/하 그룹에서 가장 많은 DNA 메틸화의 차이를 많이 내고 있을 뿐만 아니라 현재까지 SYT family member 중 연구가 거의 되지 않은 유전자이기도 하다.

생식 연관 유전자의 기능을 연구하기 위해서는 주로 형질 전환 마우스나 녹아웃 마우스를 활용하여 해당 유전자가 과발현 되거나 혹은 발현되지 않는 상황을 개체에 만들어 주어 생식 단계 중에서 어떤 과정에서 문제가 생기는 지를 연구하여 해당 유전자의 기능을 밝힌다.

본 연구에서는 녹아웃 마우스를 제작하는 연구기관의 연구 협력으로 SYT13 유전자의 녹아웃 마우스를 제작하여 산자에 대한 표현형을 관찰 하였으나 산자수에 대한 유의한 차이는 확

인하지 못하였다.

SYT 유전자는 돼지에서만 16개의 하위 집단 유전자들이 보고되어 있어 하나의 SYT13 유전자가 발현이 되지 않아도 다른 subfamily member 유전자들이 그 역할을 대신 수행 해 주는 것으로 판단이 된다..

이를 확인하기 위해 마우스 자궁 조직에서 SYT13 유전자의 유전 형질에 따른 (wild type, heterozygote, knockout) SYT subfamily member의 발현을 확인해 본 결과 대부분 SYT family 들이 유의적인 차이 없이 비슷하게 발현하고 있어 SYT13 knockout에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 확인이 된다.

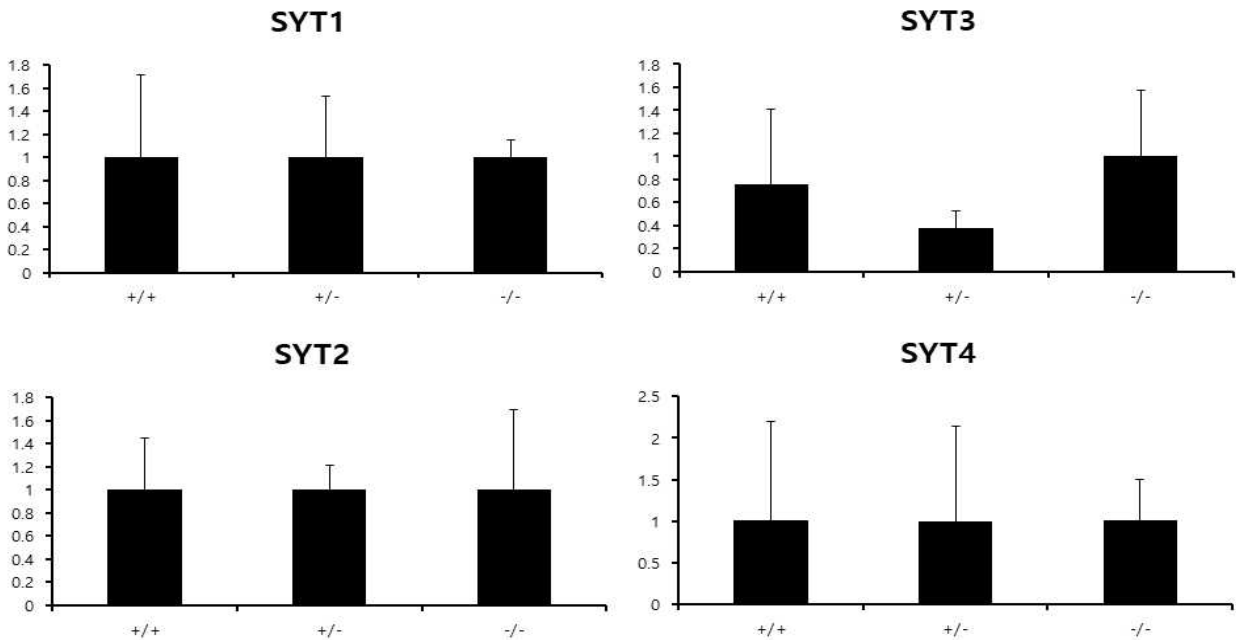


Figure 2 The mRNA expression of SYT family members according to SYT13 genotype

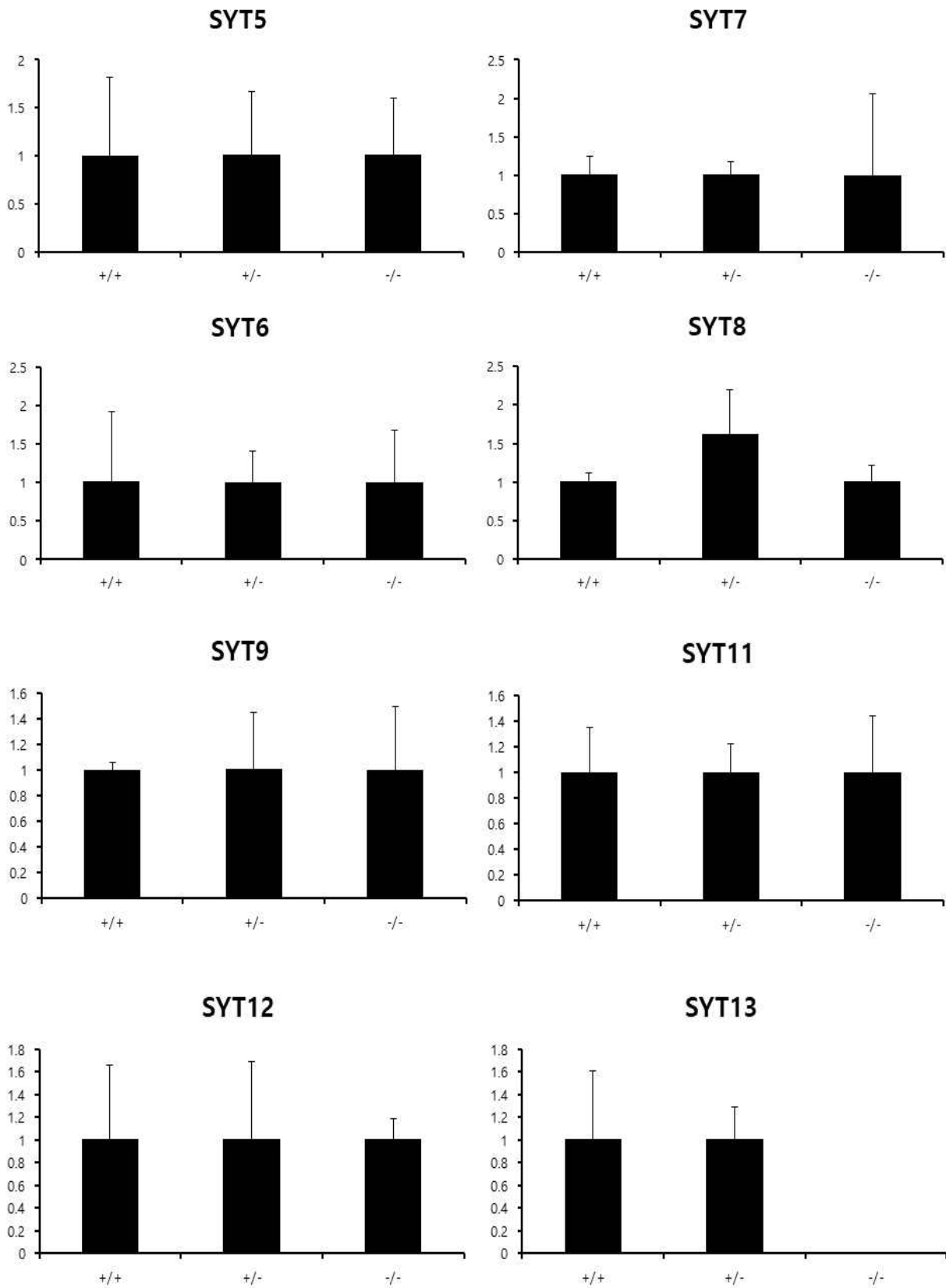


Figure 2 The mRNA expression of SYT family members according to SYT13 genotype



[협동과제] 병합육종프로그램을 활용한 한국 다산버크셔 산자수 개량시스템 개발  
 및 버크셔 육종

1. 총산자수에 대한 개량도 평가

가. 분석자료

○ 2007년부터 2018년 7월 15일 사이에 분만한 모든 1,364두에 대한 번식기록 총 5,926개를 이용하여 분만연도별 총산자수와 실산자수에 대한 개량도를 추정하였으며, 자료의 분포적 특성은 표 1, 2와 같다.

표 1. 분만연도별 총산자수와 실산자수에 대한 기초 통계치

분만연도	모든수	기록수	총산자수		실산자수	
			평균	표준편차	평균	표준편차
2007	2	2	8.00	1.41	8.00	1.41
2008	19	27	7.48	2.68	6.67	2.25
2009	82	157	8.67	2.14	7.89	2.05
2010	287	427	8.93	2.81	7.87	2.49
2011	318	556	8.53	2.84	7.59	2.53
2012	331	553	8.92	3.04	7.84	2.59
2013	436	793	8.45	3.08	7.46	2.62
2014	408	787	8.39	2.66	7.45	2.49
2015	406	796	8.49	2.65	7.37	2.48
2016	436	807	8.89	2.76	7.82	2.48
2017	366	693	8.84	2.60	7.77	2.46
2018	302	328	9.06	2.85	7.99	2.82
전체	1,364	5,926	8.68	2.80	7.65	2.53

표 2. 산차별 총산자수와 실산자수에 대한 기초 통계치

분만연도	기록수	총산자수		실산자수	
		평균	표준편차	평균	표준편차
1	1,233	8.24	2.83	7.11	2.56
2	1,002	8.48	2.80	7.71	2.54
3	880	8.55	2.90	7.71	2.58
4	760	8.92	2.69	7.99	2.44
5	640	9.09	2.77	7.99	2.48
6	514	9.11	2.72	7.91	2.46
7	396	8.96	2.73	7.73	2.38
8	274	8.93	2.68	7.68	2.51
9	152	8.61	2.71	7.11	2.53
10 <	75	8.59	2.53	7.31	2.47
전체	5,926	8.68	2.80	7.65	2.53

나. 총산자수의 개량도

○ 본 연구는 2013년 8월 시작하였기 때문에 개량도 평가는 2014년 (대조년)을 기준으로 하

고 2014년 부터 2018 (7월 현재)사이의 자료를 이용하는 것이 합리적임.

○ 총산수와 실산자수의 개량도는 2014년 대비 각각 0.7두와 0.5두 증가한 것으로 나타남.

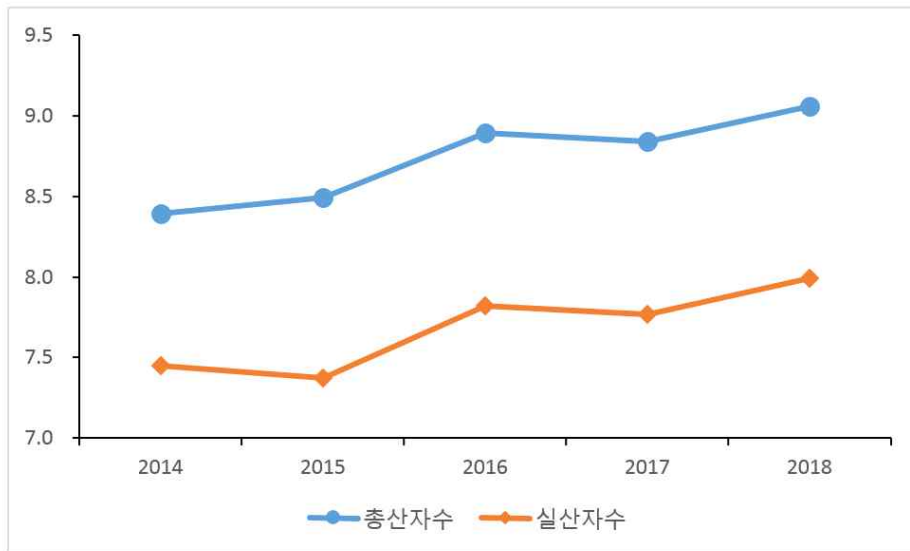
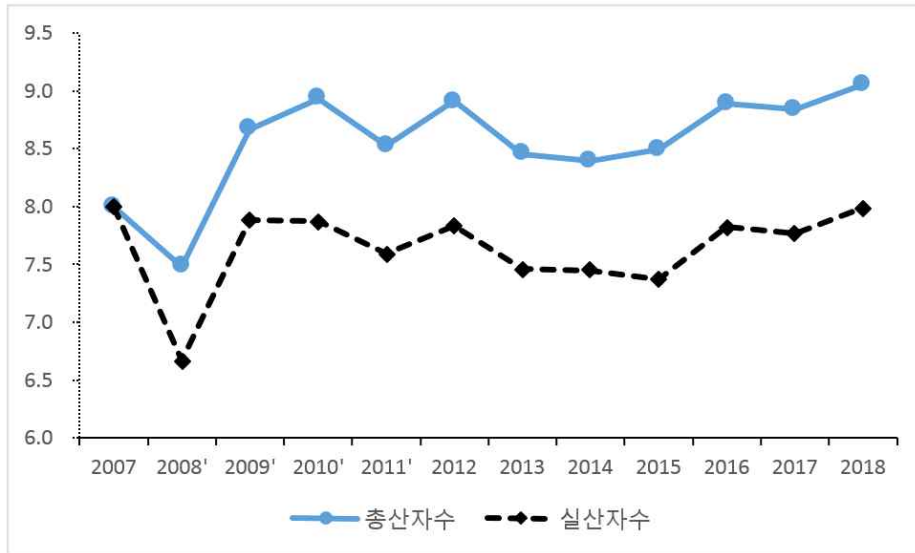


그림 1. 분만연도별 총산자수와 실산자수

표 3. 2014년 대비 산자수의 개량도


분만연도	2014	2018 ('14년대비)
평균 총산자수	8.4	9.1 (▲0.7두)
평균 실산자수	7.4	8.0 (▲0.5두)

## 2. 병합육종프로그램의 검정, 보완 및 확립

### 가. 다산버크셔 병합육종프로그램 저작권 등록

- 2017년 11월 09일 저작권등록 후 현재까지 수정 보완함

제 C-2017-027282 호

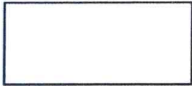



# 저작권 등록증

1. 저작물의 제호(명칭)	다산버크셔 병합육종 프로그램
2. 저작물의 종류	컴퓨터프로그램저작물>응용프로그램>과학기술
3. 저작자 성명(법인명)	다산육종 대표 박화춘 전라북도 남원시 승전로
4. 생년월일(법인등록번호)	1963년10월01일
5. 창작연월일	2017년11월03일
6. 공표연월일	2017년11월03일
7. 등록연월일	2017년11월09일
8. 등록사항	저작자 : 다산육종 대표 박화춘, 창작 : 2017.11.03, 공표 : 2017.11.03

『저작권법』 제53조에 따라 위와 같이 등록되었음을 증명합니다.

2017년 11월 10일

 한국저작권위원회 

### 나. 병합육종프로그램의 개요

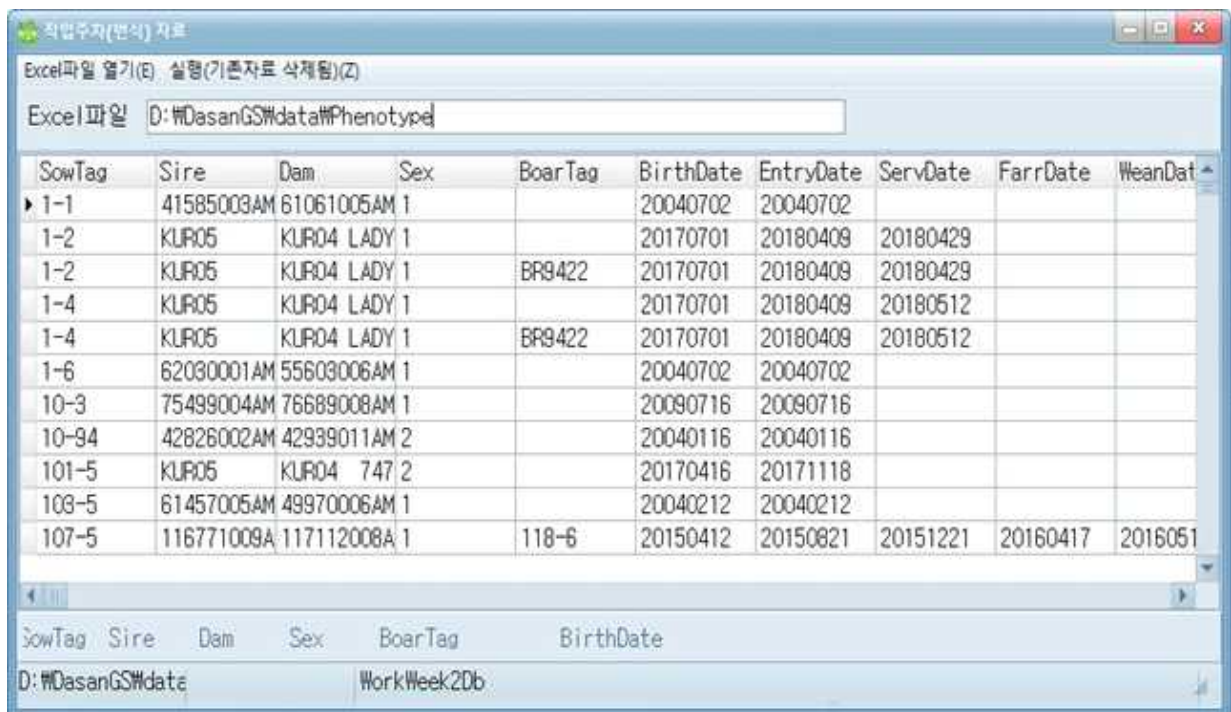
□ 메인 화면



1) 자료의 입력 (자료실 -> 입력)

① 표현형자료 (번식자료, 육질자료)

- Pigdesigner 에서 다운받은 번식주차.xls파일 (번식파일)을 DB에 입력한다.
- 파일열기로 xls파일 지정후 '실행'을 선택하면 기존의 번식자료가 삭제되고 새로 입력된다.



- 육질자료xls파일 (산육자료)을 DB에 입력한다

- 파일열기'로 xls파일 지정후 '실행'을 선택하면 기존의 육질자료가 삭제되고 새로 입력된다.

Excel파일 열기(E) 실행(기본자료 삭제됨)(Z)  
Excel파일 D:\#DasanGS\data#Phenotype

sowtag	sire	dam	Sex	Sex_1	BirthDate	Culldate	Age_day	CW	BF_0
5-1	120724002A	119254010A	1	암	20150104				
107-5	116771009A	117112008A	1	암	20150412				
107-8	116771009A	117112008A							
118-6	120724002A	119001007A	2	수	20141121				
121-10	120707002A	119001007A	2	수	20150417				
122-1	120707002A	119015008A	1	암	20150420				
122-4	120707002A	119015008A	1	암	20150420				
123-4	119176007A	119263004A	1	암	20150420				
127-2	116771009A	119001007A	1	암	20150421				
127-3	116771009A	119001007A							
128-10	2-2	40-3	2	수	20150421				

SowTag Sire Dam Sex Sex\_1 Birthdate  
D:\#DasanGS\data#phenotype#dasan\_ph\_raw.xls PerFor2Db

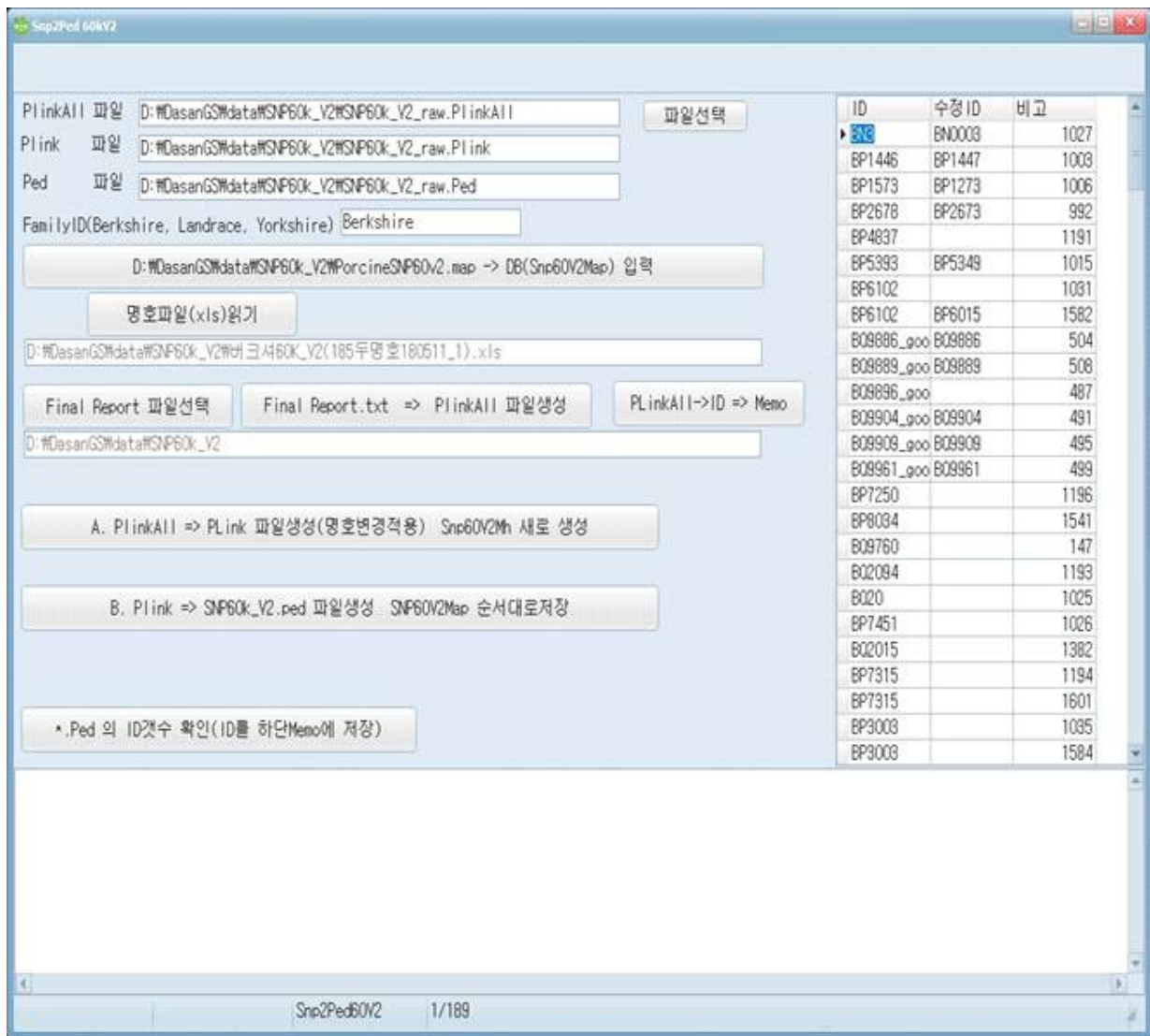
## ② 혈통자료 생성

- 작업주차파일이나 육질자료를 새로 입력했으면 '혈통자료생성'을 실행하여 혈통DB를 생성한다,
- 이후 '근교계수 계산'을 선택하여 근교계수를 계산해 놓는다.



### ③ 유전체자료 (SNP60K)

- PLinkAll, PLink, Ped 파일을 지정하여 놓는다.



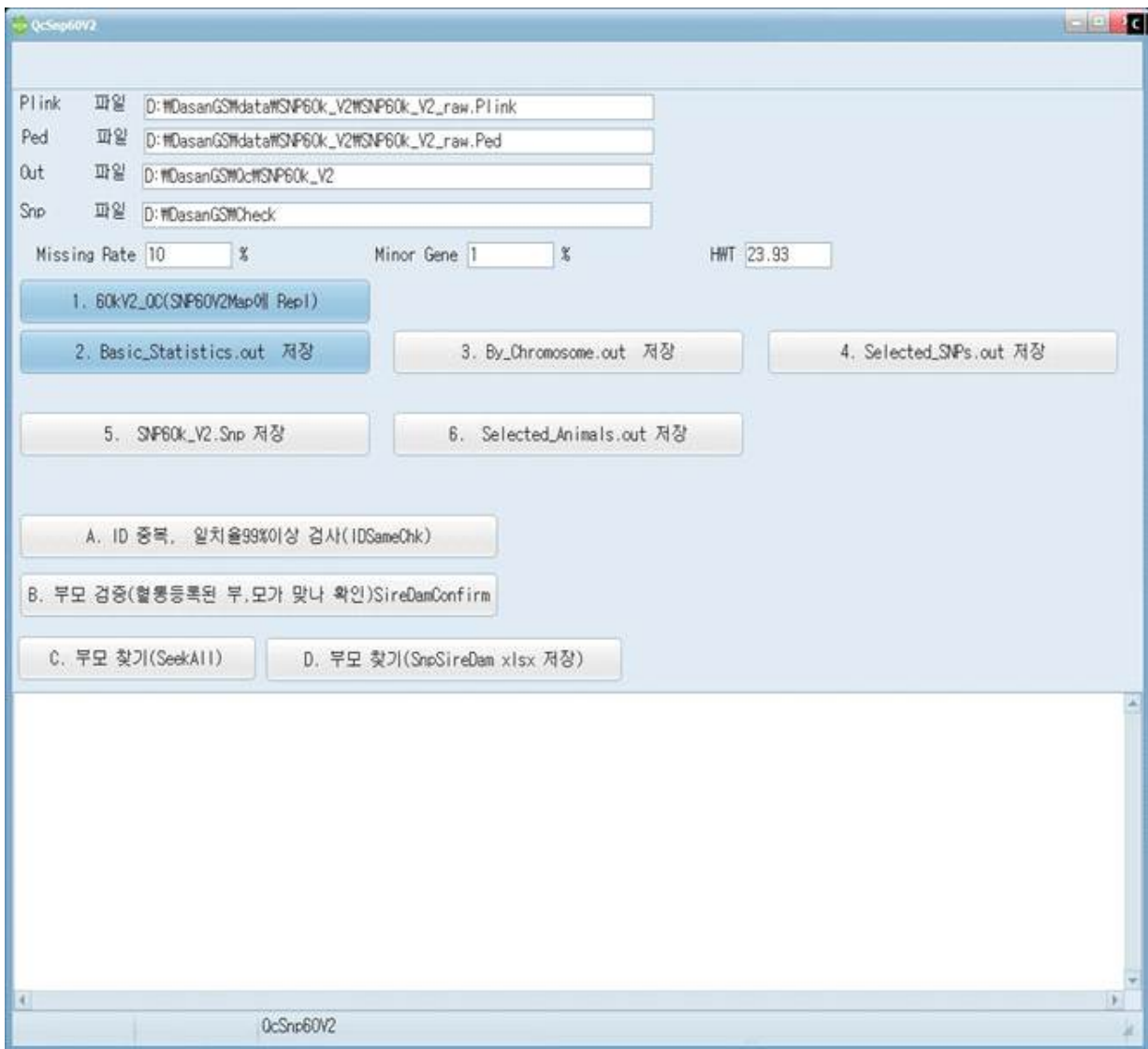
- 'Final Report파일선택'-> 'Final Report.txt=> PlinkAll 파일저장'을 선택하여 PLinkAll파일을 생성한다.
- FinalReport파일이 많을 경우 이 과정을 반복하여 PlinkAll파일에 여러개의 FinalReport파일을 추가한다.
- 명호파일 (엑셀파일) 에 ID 교체나 혹은 중복ID 삭제 등을 입력한후 '명호파일( Xls) 읽기'를 선택하여 놓는다.



- PlinkAll -> Plink파일생성'을 선택하여 Plink파일을 생성한다.
- Plink -> Snp60k\_v2.ped'를 선택하여 Ped파일을 생성한다.



## 2) 유전체자료의 품질평가 (QC)



- ①~ ③은 default (고정)
  - ① Unknown Position(염색체가 0인 경우), ② X염색체(19), Y염색체(20) 삭제
  - ② SNP가 모두 동형(Homo)인 경우 삭제
  - ③ SNP가 모두 이형(Hetero)인 경우 삭제

- ④~⑤은 옵션(수치를 바꿔서 넣을 수 있도록 박스 표현)
  - ④ SNP별 Missing rate가 0.1(10%) 이상인 경우 삭제
  - ⑤ 소수대립유전자(minor gene)이 0.01(1%) 미만인 경우 삭제
  - ⑥ HWT value가 23.93이상인 경우 삭제

○ 기초통계량 Whole\_results.out 파일 만들기

- SNP 61,565개에 대한 통계치 작성

• SNP\_name(SNP이름) • Chr\_no(염색체) • Position(위치정보) • F\_GT(유전자형빈도) • F\_MGT(유전자형결측빈도) • R\_MGT(유전자형결측율) • MAT(다수동형유전자형) • HET(이형유전자형) • MIT(소수동형유전자형) • F\_MAT(다수동형유전자형빈도) • F\_HET(이형유전자형빈도) • F\_MIT(소수동형유전자형빈도), R\_MAT(다수동형유전자형비율) • R\_HET(이형유전자형비율) • R\_MIT (소수동형유전자형비율) 등

Plink	파일	D:\#DasanGS\data#\SNP60k_V2#\SNP60k_V2_raw.Plink	
Ped	파일	D:\#DasanGS\data#\SNP60k_V2#\SNP60k_V2_raw.Ped	
Out	파일	D:\#DasanGS#0c#\SNP60k_V2	
Snp	파일	D:\#DasanGS#Check	
Missing Rate	10 %	Minor Gene 1 %	HWT 23.93

- 파일이름과 폴더, Missing Rate등 입력값을 확인한다.
- 1부터 6까지 차례대로 선택하여 QC과정을 진행한후 Snp파일 저장까지 한다.
- 'A. ID중복, 일치율..'을 선택하여 중복ID, 틀린ID이나 SNP같은 개체를 검사한다.
- 같은ID, SNP중복 ID가 검출되면 '명호파일'을 수정한 후 Plink파일 생성과정 부터

다시

반복한다.

1. 60kV2\_OC(SNP60V2Map에 Ref)

2. Basic\_Statistics.out 저장      3. By\_Chromosome.out 저장      4. Selected\_SnPs.out 저장

5. SNP60k\_V2.Snp 저장      6. Selected\_Animals.out 저장

A. ID 중복, 일치율99%이상 검사(IDSameChk)

- 친자감별 - 친자확인을 하고 부모가 틀린 개체들을 출력함
- 부모 찾기 - 친자오류 개체들에 한하여 부모를 찾아 혈통을 수정함
- 유전체자료 생성



B. 부모 검증(혈통등록된 부모가 맞나 확인)SireDamConfirm

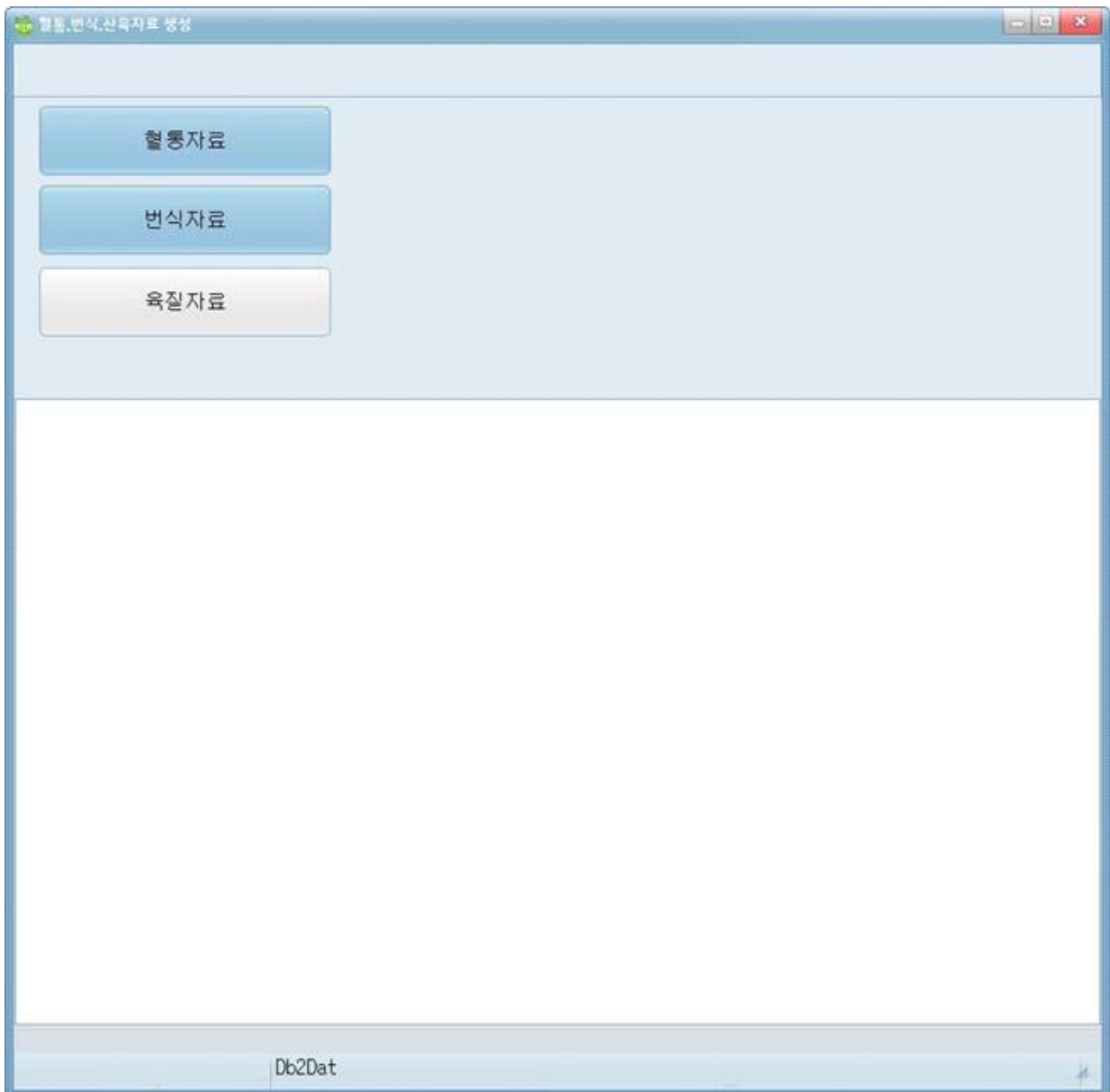
C. 부모 찾기(SeekAll)

D. 부모 찾기(SnpSireDam xlsx 저장)

- 중복ID, SNP같은ID가 없음이 확인된 상태에서 B C D 를 차례로 선택하여 최종 저장된 SnpSireDam.xls를 참조하여 잘못된 부모 정보를 수정한다.

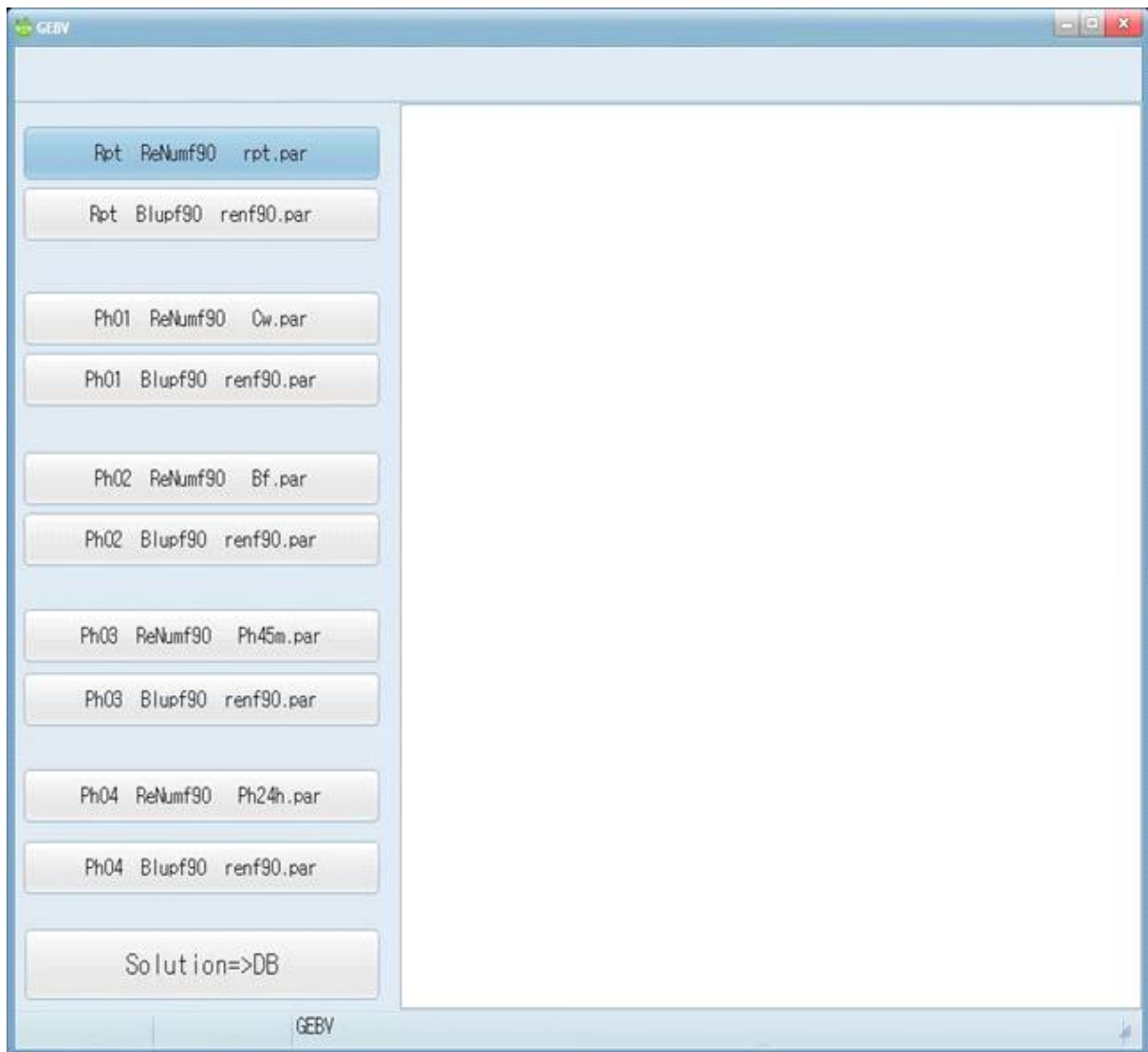
### 3) 평가자료 생성 (혈통, 번식 및 육질자료 생성)

- '혈통자료', '번식자료', '육질자료' 를 차례로 선택하여 육종가 계산을 위한 자료 파일을 저장한다.



### 4) 유전체육종가 (GEBV) 추정

- ssBLUP을 실행하여 혈통내 모든 개체들의 육종가와 SNP정보가 있는 개체들의 유전체 육종가를 추정하여 결과를 파일로 저장함
- RPT 부터 Ph04까지 차례대로 선택하여 육종가를 계산한다.
- Solution => DB를 선택하여 계산된 육종가파일을 DB에 입력한다.

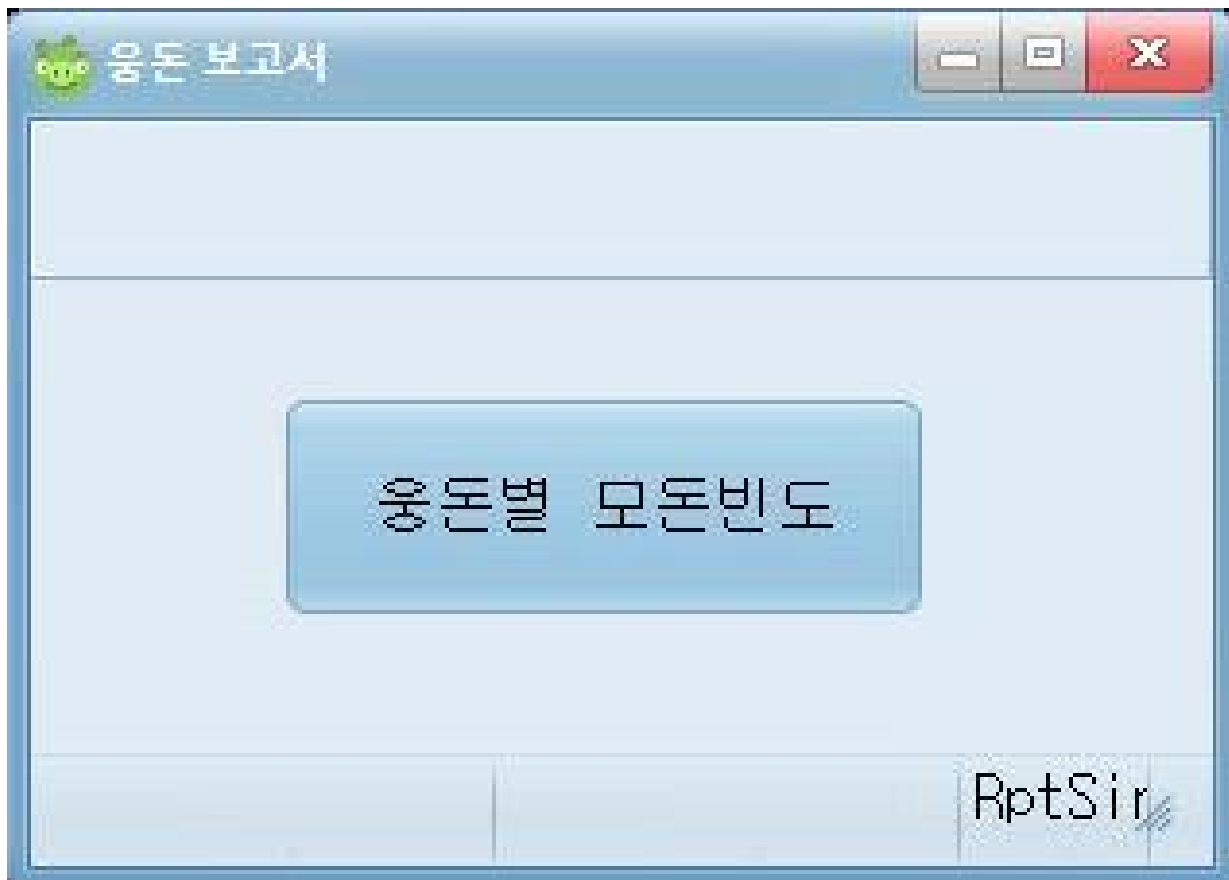


## 5) 보고서 출력

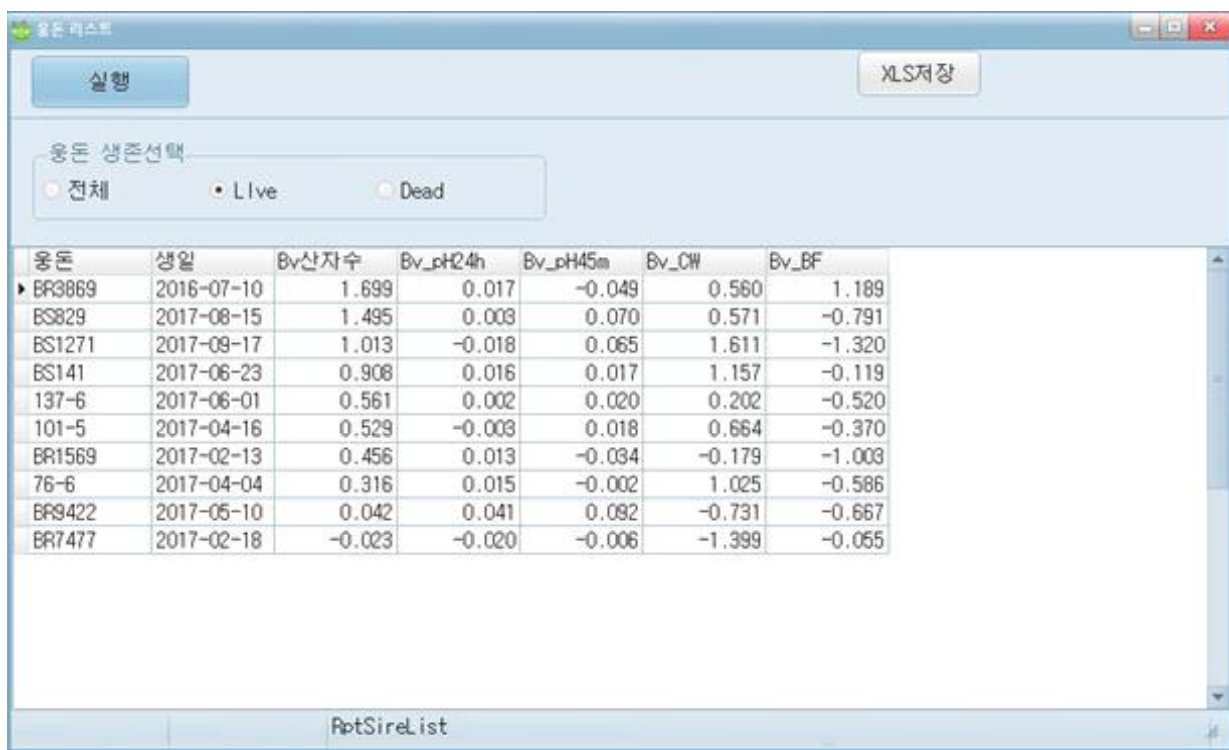
### ① 입력된 응돈과 모돈의 교배조합 출력

### ② 조건에 맞는 모돈 출력

### ③ 응돈별로 교배된 모돈 빈도 출력



④ 조건에 맞는 응돈 출력



⑤ 개량량 추정

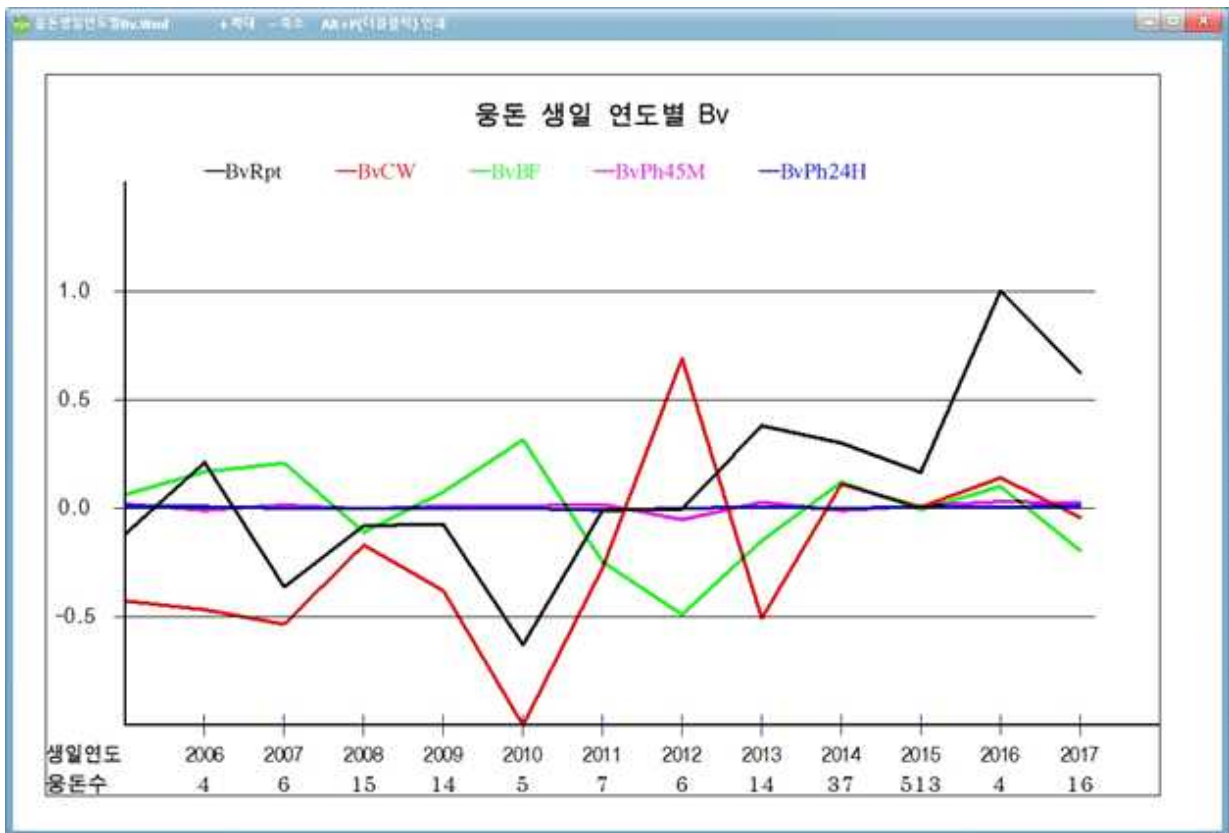
수세

모든 Av산자수      용돈 Av산자수      그래프보기

모든 생일 연도별 Bv      **용돈 생일 연도별 Bv**

생일연도	용돈수	BvRpt	BvCW	BvBF	Ph45M	Ph24H
2004	15	0.15	-0.243	0.068	0.014	0
2005	6	-0.122	-0.428	0.061	0.02	0.006
2006	4	0.21	-0.468	0.167	-0.01	0.007
2007	6	-0.363	-0.537	0.207	0.013	-0.001
2008	15	-0.081	-0.171	-0.11	-0.004	-0.001
2009	14	-0.077	-0.38	0.073	0.01	0
2010	5	-0.632	-1.414	0.315	0.009	-0.001
2011	7	-0.01	-0.277	-0.249	0.016	-0.01
2012	6	-0.005	0.689	-0.492	-0.054	-0.001
2013	14	0.38	-0.508	-0.15	0.026	0.003
2014	37	0.298	0.11	0.12	-0.01	0
2015	513	0.165	0.003	-0.009	0.008	0.004
2016	4	1.128	0.139	0.098	0.029	0.003
2017	16	0.624	-0.044	-0.197	0.024	0.009

Trend



### 3. 병합 육종 프로그램을 활용한 유전능력 평가

가. 공시 재료

1) 버크셔 집단의 유전체 전장 60k SNP 자료

후보돈을 포함한 종축 1,908두에 대한 Illumina PorcineSNP60k chip 분석 결과로 생성된 단일염기 다형 표지인자의 유전자형 정보 중 염색체상의 위치정보가 확인되지 않은 SNP, 결측률이 10%이상, 다형성이 없는 경우, 모두 이형인 경우를 제외하고 분석에 이용된 SNP는 총 39,278개였다 (표 1).

표 1. 유전체 자료의 품질평가 (QC)

항 목	두 수 및 개
Total No. of animals:	1,908
Total No. of SNPs:	61,565
No. of SNPs with unknown position (Chr. no=0):	7,849
No. of SNPs on chromosome X:	1,449
No. of SNPs on chromosome Y:	9
Total number of SNPs on autosome (Chr.1~18):	52,258
No. of all homo SNPs:	4,827
No. of all hetero SNPs:	4
No. of SNPs with missing > 10%	435
No. of SNPs with minor allele frequency < 1%	6,600
No. of SNPs with HWT > 23.93	1,114
Total numbrt of useful SNPs:	39,278

표 2. 염색체별 SNPs 및 특성

염색체	총 SNPs	선별된 SNPs	제거된 SNPs	제거 비율	다수동형 유전자빈도	이형 유전자빈도	소수동형 유전자빈도	하디와인버그 $\chi^2$
1	6512	4546	1966	30.19	0.60	0.33	0.07	3.08
2	3392	2723	669	19.72	0.61	0.32	0.07	2.81
3	2805	2034	771	27.49	0.61	0.32	0.07	2.74
4	3551	2627	924	26.02	0.58	0.33	0.08	2.59
5	2361	1739	622	26.34	0.62	0.31	0.07	2.70
6	3216	2580	636	19.78	0.57	0.35	0.08	3.77
7	3348	2529	819	24.46	0.58	0.34	0.08	2.87
8	2777	2142	635	22.87	0.55	0.36	0.09	3.44
9	3213	2568	645	20.07	0.61	0.32	0.07	3.03
10	1796	1410	386	21.49	0.62	0.31	0.07	3.94
11	1890	1244	646	34.18	0.62	0.32	0.07	3.40
12	1562	1160	402	25.74	0.58	0.34	0.08	3.41
13	4090	3121	969	23.69	0.58	0.34	0.08	2.71
14	3906	3075	831	21.27	0.60	0.33	0.07	4.19
15	2906	2183	723	24.88	0.66	0.28	0.06	3.44
16	1877	1362	515	27.44	0.60	0.33	0.07	3.76
17	1720	1300	420	24.42	0.61	0.32	0.07	1.88
18	1336	935	401	30.01	0.57	0.34	0.08	2.13
Total	52258	39278	12980	25.00	0.60	0.33	0.07	3.11

2) 표현형 자료

버크셔 모든 1,370두의 총산자수에 대한 5,958개의 기록을 수집하였으며, 총산수의 평균은 8.61두와 7.56두로 나타났다 (표 3). 육질자료는 도체중, 등지방두께, 도체후 45분후의 pH값과 24시간 이후 pH값, 총 879개를 수집하였다.

표 3. 총산자수에 대한 기초 통계치

형 질	총 개체수	기록수	평균	표준편차	최소치	최대치
총산자수 (두)	1370 (542) <sup>1</sup>	5,958 (2,363) <sup>1</sup>	8.66	2.81	1.00	22.00
도체중 (kg)	879 (877) <sup>2</sup>	879 (877) <sup>2</sup>	83.85	5.84	65.00	104.00
등지방 (mm)	879 (877) <sup>2</sup>	879 (877) <sup>2</sup>	16.18	2.79	9.00	26.00
pH45분	879 (877) <sup>2</sup>	879 (877) <sup>2</sup>	6.40	0.20	5.94	7.09
pH24시간	879 (877) <sup>2</sup>	879 (877) <sup>2</sup>	5.90	0.12	5.58	6.63

<sup>1</sup>SNP가 있고 분만기록이 있는 개체 및 기록수, <sup>2</sup>SNP가 있고 육질기록이 있는 개체 및 기록수

나. 통계적 방법

1) SNP정보를 이용한 유전체 육종가(GEBV) 추정

- ssBLUP(Single Step BLUP)에 의한 총산자수와 발정재귀일령의 유전체 육종가 추정

$$y_{tijk} = \mu + f_{ti} + l_{tj} + a_{tk} + p_{tk} + e_{tijk}$$

위에서,  $y_{tijk}$  = t번째 번식형질에 대한 관측치,  $\mu$  = 전체평균,  $f_{ti}$  = i번째 분만주차의 고정효과,  $l_{tj}$  = j번째 산차의 고정효과,  $a_{tk}$  = k번째 개체의 상가적 유전효과,  $p_{tk}$  = k번째 개체의 영구환경 효과,  $e_{tijk}$  = 임의오차이며, 위의 선형모형은 다음과 같은 행렬식으로 나타낼 수 있다.

$$y = Xb + Za + Wp + e$$

위에서,  $y = n \times 1$  vector of observation,

$b = p \times 1$  vector of fixed effect

$a = q \times 1$  vector of additive genetic random effect

$p = q \times 1$  vector of permanent environmental random effect

$X(n \times p)$ ,  $Z(n \times q)$  and  $W(n \times q)$  known incidence matrix corresponding to  $b$ ,  $a$ , and  $p$ ,  $e = n \times 1$  vector of residual effect

- 혼합모형방정식(MME; mixed model equation)은 다음과 같다.

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + \alpha_1 H^{-1} & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + \alpha_2 I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{a} \\ \hat{p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}$$

위에서,  $\alpha_1 = \sigma_e^2 / \sigma_a^2$ ,  $\alpha_2 = \sigma_e^2 / \sigma_{pe}^2$  이며,  $H = A + A_{\Delta}$  일 때,

$$H = \begin{bmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & G \end{bmatrix} = A + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G - A_{22} \end{bmatrix} \text{이며,}$$

$A$  = 혈통정보에 의한 혈연계수행렬(Conventional numerator relationship matrix),  $A_{\Delta}$  = 유전체 정보의 관계를 나타내는 변형행렬(matrix modified to account for genomic relationship),  $G$  = 유전체 혈연관계행렬(genomic relationship matrix)이다.

$$H = A + \begin{bmatrix} A_{12}A_{22}^{-1} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} I \\ I \end{bmatrix} (G - A_{22}) \begin{bmatrix} I & I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{22}^{-1}A_{21} & 0 \\ 0 & I \end{bmatrix} \text{일 때,}$$

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix} \text{이다.}$$

위에서,  $I$  = 단위행렬(identity matrix).  $A_{22}^{-1}$  = 유전체정보를 가지고 있는 개체들의 혈연계수행렬의 역행렬이다.

## 2) 유전체 육종가의 신뢰도

육종가의 신뢰도( $r^2$ )는 예측분산오차(Prediction error variance; PEV)의 값을 이용하여 계산하였으며, 수식은 아래와 같다.

$$r^2 = 1 - \left( \frac{PEV}{\sigma_a^2} \right)$$

## 다. 평가 결과

### 1) 유전모수

○ 총산자수와 생존산자수에 대한 유전력은 각각 0.081과 0.083으로 추정되었으며, 이들간의 유전상관은 0.98로 매우 높게 나타났다. 총산자수와 생존산자수에 대한 반복력은 각각 0.186와 0.181로 추정되었다.

○ 도체중 (kg), 등지방 (mm), pH45분과 pH24시간의 유전력은 각각 0.269, 0.236, 0.193과 0.200로 추정되었다.

표 4. 번식형질들에 대한 분산성분 및 유전모수



산자수	$\sigma_a^2$	$\sigma_{pe}^2$	$\sigma_e^2$	$h^2$	r
총산자수 (두)	0.6358	0.8226	6.3923	0.081	0.186
생존산자수 (두)	0.5322	0.6311	5.2745	0.083	0.181
도체중 (kg)	8.0409	-	21.859	0.269	-
등지방 (mm)	1.6980	-	5.5025	0.236	-
pH45분	0.0080	-	0.0335	0.193	-
pH24시간	0.0029	-	0.0116	0.200	-

## 2) 병합 육종 프로그램 보고서

### ① 2018년 07월 현재 살아있는 모돈 (326두) 전체 리스트 (산자수로 정렬)



- 총산자수 육종가로 정렬 1위부터 326위까지



Report

XLS저장

순위	SNP 명	신차 생일	Av산자수	Bv산자수	Bv_Ph24h	Bv_Ph45m	Bv_OW	Bv_BF	최종교배돈	응돈1	근교계수1	응돈2	근교계수2	등록일	교배일	분만일	이유일
1	BS1252	1	0.0	0.889	-0.008	0.069	1.046	-1.224	BR1569	B07083	0.000	B06788	1.764	2018-07-14	2018-07-16		
2	BS1252	1	2017-08-15	0.0	0.889	-0.008	0.069	1.046	-1.224	BR1569	B07083	0.000	B06788	1.764	2018-07-14	2018-07-16	
3	BS1104	0	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		B06393	0.000	B07083	0.000	2018-07-14	2018-07-15		
4	BS1104	1	0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	76-6	B06393	0.000	B07083	0.000	2018-07-14	2018-07-15		

1/4 RetDbu

오후 3:32 2017-09-01

### ③ 살아있는 응돈 (12두) 리스트

자표상->입력(이) QC 용가자표상생성(Y) G68V수정(G) 보고서 출력(P) 자표변환(F)

응돈 리스트

실행 XLS저장

응돈 생존선택

전체  Live  Dead

응돈	생일	Bv산자수	Bv_ph24h	Bv_ph45m	Bv_OW	Bv_BF
BS329	2017-08-15	2.028	0.011	0.040	0.068	-0.736
BR3869	2016-07-10	1.621	0.016	-0.030	0.067	1.030
BS1271	2017-09-17	1.372	0.014	-0.005	-0.671	-0.339
BS1495	2017-10-02	0.984	0.030	0.011	-1.159	-0.289
BS141	2017-08-23	0.906	0.014	0.017	1.174	-0.198
BS1496	2017-10-02	0.827	-0.001	0.008	-0.695	-0.092
BS1374	2017-09-23	0.772	0.010	-0.021	0.556	-0.312
137-6	2017-06-01	0.571	0.001	0.019	0.170	-0.553
BR1569	2017-02-13	0.419	0.012	-0.034	-0.158	-1.075
76-6	2017-04-04	0.269	0.013	-0.008	1.052	-0.586
BR9422	2017-05-10	0.104	0.040	0.092	-0.722	-0.697
BR7477	2017-02-18	-0.108	-0.022	-0.007	-1.395	-0.118

RetSireList

Me inForm

오후 3:33 2017-09-01

### ④ 교배조합

웅돈 보고서 총141두 Page:1 2017-09-01

웅돈	생일	Ph24h	Ph45m	CW	BF_D	교배돈(전체)	교배돈(생존)
BN9353	11-01-28	0.047	0.036	2.290	-0.176	68	
BN9439	11-11-26	-0.027	0.022	-0.174	-0.555		
BN9824	11-03-18	0.007	0.011	-3.792	0.465	4	
BP1211	11-07-29	-0.024	0.017	-1.174	0.000	8	
BP1289	11-08-05	-0.059	-0.028	-1.823	-0.138	27	
BP1354	11-08-20	-0.029	0.006	1.899	-1.767	25	
BP2111	11-11-05	0.015	0.047	0.697	0.462	6	
10-94	04-01-16	-0.003	0.021	0.090	-0.133		
101-5	17-04-16	-0.004	0.018	0.693	-0.389		
118-6	14-11-21	-0.004	0.002	0.409	-0.476	65	
121-10	15-04-17	0.008	-0.009	0.181	0.344	7	2
128-10	15-04-21	0.010	-0.019	0.888	0.569	18	
129-2	15-04-22	0.007	0.006	-0.960	-0.551	9	2
13-3	99-12-30	0.000	0.000	0.000	0.000		
137-6	17-06-01	0.001	0.019	0.170	-0.553	53	51
14-8	04-02-10	0.005	0.038	-0.944	-0.523		

#### 4. 정액성상 검사 (2018.05.02)

##### 가. 정액의 삼투압 및 pH 분석

○ pH 검사는 수소이온 농도를 측정하는 것으로 본 실험에선 Istek사의 pH meter로 측정하였다.

○ 측정 전 pH 4, 7, 10의 표준용액을 활용하여 분석기기를 교정한 뒤 정액 5ml을 이용하여 측정하였다.

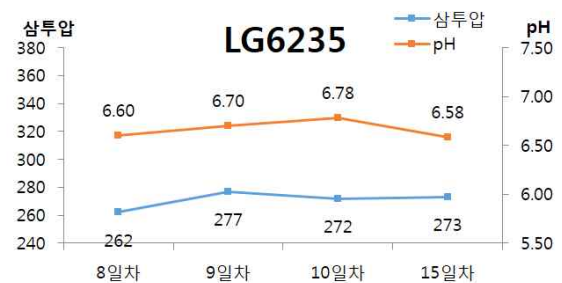
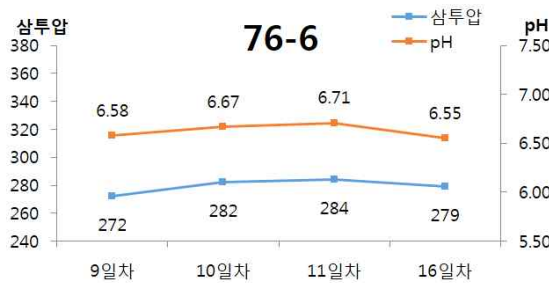
##### 나. 정액의 삼투압 측정

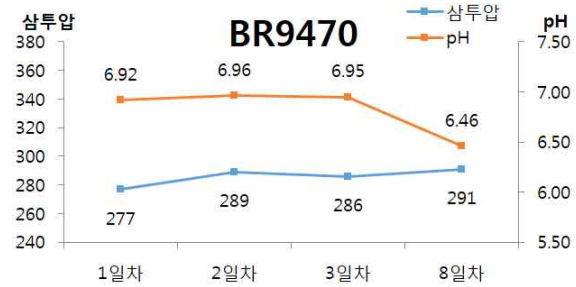
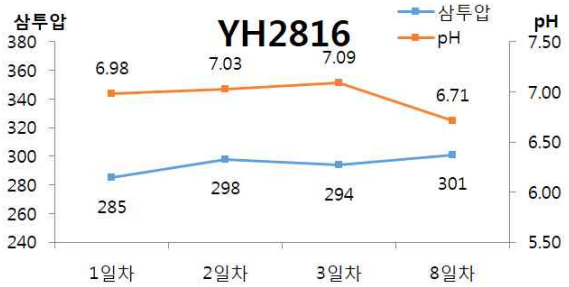
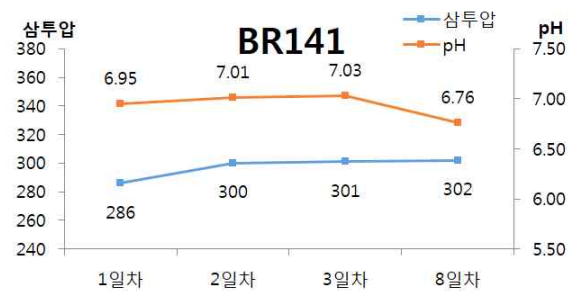
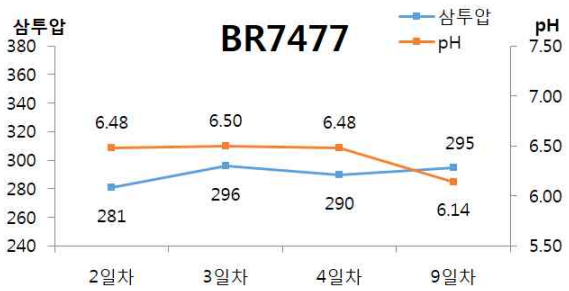
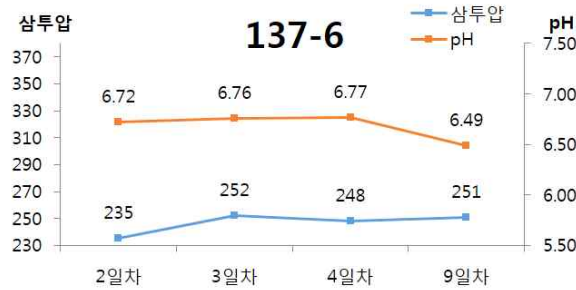
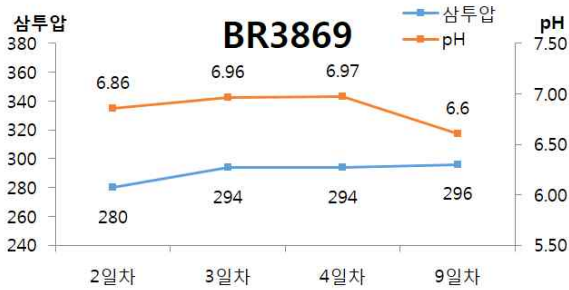
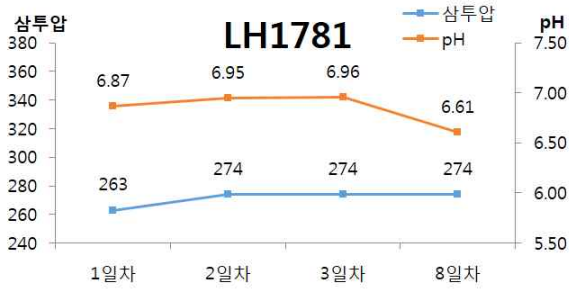
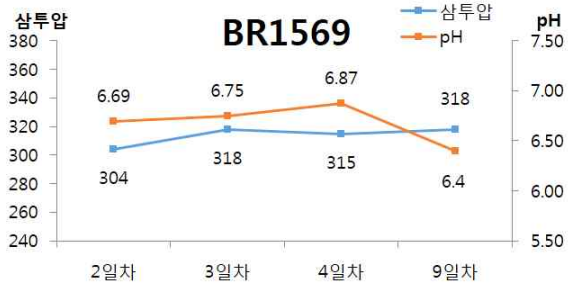
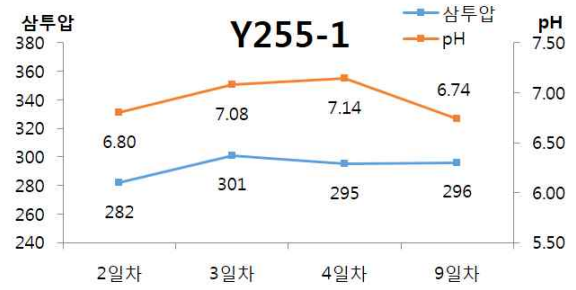
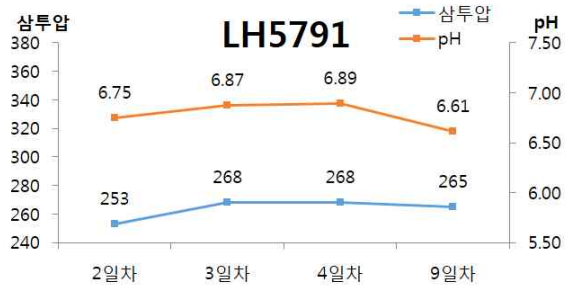
○ 삼투압은 빙점강하도 측정 장치를 사용하며 본 실험에서 사용된 기기는 OSMOMAT 030D모형을 이용하였다.

○ 분석 전 장비를 증류수와 조정용액으로 교정한 뒤 정액 50 $\mu$ l를 이용하여 측정하였다.

표 1. 개체별 삼투압 및 pH

순번	개체번호	채취날짜	1회차		2회차		3회차		4회차	
			2018,05,02		2018,05,03		2018,05,04		2018,05,09	
			삼투압	pH	삼투압	pH	삼투압	pH	삼투압	pH
1	76-6	04월 23일	272	6.58	282	6.67	284	6.71	279	6.55
2	LG6235	04월 24일	262	6.60	277	6.70	272	6.78	273	6.58
3	LH5791	04월 30일	253	6.75	268	6.87	268	6.89	265	6.61
4	Y255-1	04월 30일	282	6.80	301	7.08	295	7.14	296	6.74
5	BR1569	04월 30일	304	6.69	318	6.75	315	6.87	318	6.4
6	LH1781	05월 01일	263	6.87	274	6.95	274	6.96	274	6.61
7	BR3869	04월 30일	280	6.86	294	6.96	294	6.97	296	6.6
8	137-6	04월 30일	235	6.72	252	6.76	248	6.77	251	6.49
9	BR7477	04월 30일	281	6.48	296	6.50	290	6.48	295	6.14
10	YH2816	05월 01일	285	6.98	298	7.03	294	7.09	301	6.71
11	BR141	05월 01일	286	6.95	300	7.01	301	7.03	302	6.76
12	BR9470	05월 01일	277	6.92	289	6.96	286	6.95	291	6.46





#### 다. 정자의 활력 측정

- 수령한 정액 샘플을 2 $\mu$ l를 취하여 역상현미경(Olympus CKX41)을 이용하여 관찰 및 기

록하였다

순번	개체번호	순번	개체번호
1	76-6	7	BR3869
2	LG6235	8	137-6
3	LH5791	9	BR7477
4	Y255-1	10	YH2816
5	BR1569	11	BR141
6	LH1781	12	BR9470

○ 8일간 다양한 정액 샘플을 이용하여 관찰한 결과, 대부분의 모든 정액들의 활력이 우수한 것을 보여 주었음.

- 76-6, LG6235 정액은 채취 후 16일이 경과하였어도 활력이 매우 우수함
- 8일 경과 후에 그 중 활력이 낮다고 느껴지는 샘플은 Y255-1임.

○ 세균 증식에 따라 정액의 활력은 점차 낮아지며, 사정자를 중심으로 뭉침 현상이 발생하게 되는데 금회 정액 샘플들은 시간 경과에 따른 세균 증식이 크게 일어나지 않아 정자의 활력이 일정하게 유지가 됨

- 세균 증식 및 사정자의 발생은 정액의 산패도를 낮추게 하는데 10일 이상 경과하여도 급격한 pH 변화는 일어나지 않아 원정액의 품질이 우수한 것으로 사료됨

○ 생존율은 10일간 80% 이상으로 판단되는데, 이는 Eosin&Nigrosin 염색을 통하여 판단한 결과이며, 염색 과정에 따라 편차는 발생될 수 있으나 대부분 높은 생존율을 보여줌



## 제 6절. 경제적 성과

### 1. 사업화 성과

- 가. 산자수 증가 연관 유전자 진단 kit 개발
- 나. 산자수 개량용 병합육종프로그램의 개발과 실제 활용기반구축, 보급
- 다. 산자수 증가된 다산 버크셔종 품종 등록 (준비중)
- 라. 국제 경쟁력 있는 산자수 개량된 버크셔계통 개발 착수
- 마. 기술이전을 통한 기술료 발생 351,000원 (11,700,000 × 3%)
- 바. 국내 최초의 모범적 현장적용

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	21.5억원/년
			향후 3년간 매출	96.4억원
		관련제품	개발후 현재까지	2억원
			향후 3년간 매출	15억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 2.3 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 4.2 % 국외 : 5.0 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		3위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		1-2위

### 2. 매출실적

- 가. 0.7두/년 증대는 FTA현실에서 흑돈산업의 산업지속여부의 분수령으로 중요함
- 나. 현실적인 매출증대는 사업성이 있는 2019년부터 규모증대로 가속화 추진
- 다. 흑돈의 정체성 정립으로 산업경제적 가치증대 기대
- 라. 현재까지 모돈280두 × 480,000원/두 × 16두/모돈 = 21.5억원
- 마. 향후 3년간은 평균 모돈60두 × 540,000원/두 × 20두/모돈 × 3년 = 194.4억원

### 3. 사업화계획

가. 개발된 산자수 증대 유전자 진단 키트의 수출

나. 산자수 개량용 병합육종프로그램의 개발과 실제 활용기반구축, 보급 및 수출 계획

다. 점유율 흑돈 280두/12,000두 = 2.3%, 향후 3년 후 600두/12,000두 = 5%

라. 가공육과 발효육제품개발 추진

4. 예상매출은 3년후에는 생산 32억, 유통 30억, 가공에서 5억원으로 예상됨

5. 수입대체 년간 현재 300두, 3년부터는 500두(수입 2백만원/모돈)

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5년			
	소요예산(백만원)	15억원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		21.5	67	75	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	2.3	5.0	8.0
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	하몬 등 발효육제품 등을 집중적으로 개발계획임			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	6억원	10억원	10억원	
	수 출				

## 제 7절. 연구개발 성과

### 1. 논문게재

게재연월	논문제목	총저자명	학술지명	권(호)	학술지 구분	sci여 부	등록번 호
2015.01	Structural importance of the C-terminal region in pig ald-keto reductase family 1 member C1 and their effects on enzymatic activity	손민경, 박찬인, 권슬기, 방우영, 김삼웅, 김철욱, 이건우	BMC Structural Biology	15 (1)	국외	SCI(E)	1471-2237
2015.01	Molecular characterization of porcine PGM1 gene associated with meat quality traits	황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 하정임, 김삼웅, 김철욱	Canadian J. of Animal Science	95(1): 31-36	국외	SCI	0008-3984

2015.03	Selection of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis in Berkshire, Duroc, Landrace, and Yorkshire pigs	박상제, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 김철욱	Gene	558(1):152~158	국외	SCI(E)	0378-1119
2015.04	Single-nucleotide polymorphisms in pig EPHX1 gene are associated with pork quality traits	조확래, 하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 이학교, 송기덕, 김삼웅, 김철욱	Animal Biotechnology	26(2):237-242	국외	SCI	1049-5398
2015.04	Proteomic analysis of reproduction proteins involved in litter size from porcine placenta	이동기, 남주현, 김삼웅, 강영문, 안주현, 김철욱, 최종순	Biosci. Biotechnol. Biochem	79(9):1414-1421	국외	SCI	0916-8451
2015.07	Effects of LEP, GYS1, MYOD1, and MYF5 polymorphisms on pig economic traits	박상제, 하정임, 조확래, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 김태완, 김삼웅, 김철욱	Annals of Animal Science	15(3):1-12	국외	SCI(E)	1642-3402
2015.06	MSK1 regulates RANKL-induced NFATc1 expression through CREB and c-Fos	하정임, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 강경희, 김일석, 김철욱	Journal of Biomedical Research	16(2):035-039	국내	비SCI	1976-7447
2016.03	Effects of a non-synonymous CBG gene single nucleotide polymorphism (SNP) on meat-quality traits in Berkshire pigs	권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 강경희, 김일석, 하정임, 김철욱	Canadian J. of Animal Science	96(1):45-51	국외	SCI	0008-3984
2016.04	Identification of differentially expressed genes associated with litter size in Berkshire pig placenta	권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 강경희, 김일석, 박화춘, 나충삼, 하정임, 김철욱	Plos one	11(4):e0153311, 1-12	국외	SCI	1932-6203
2016.07	pH as Analytical Indicator for Managing Pork Meat Quality	김태완, 김철욱, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 하정임, 양미라, 김삼웅, 김일석	Sains Malaysia a	45(7):1097-1103	국외	SCI	0126-6039
2016.11	Association between a non-synonymous HSD17B4 Single nucleotide	조정래, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경,	Genetics and molecular	15(4):gmr1	국외	SCI(E)	1676-5680

	polymorphisms and meat-quality traits in Berkshire pigs	유고은, 김일석, 하정임, 김철욱	research	50489 70			
2017.01	Ribosomal protein S3 (RPS3) 유전자 SNP의 버크셔 돼지 육질 형질과의 연관성 분석	황정혜, 하정임, 권슬기, 안상미, 유고은, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 김일석, 김철욱	농업생명과학연구	51(1) pp.15 1-161	국내	비SCI	1598- 5504
2017.10	Associations of the polymorphisms in DHRS4, SERPING1, and APOR genes with postmortem pH of Berkshire pigs	황정혜, 안상미, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 김일석, 박화춘, 하정임, 김철욱	Animal Biotechnology	28(4) 288-2 93	국외	SCI	1049- 5398
2017.05	Effects of cell death-inducing DFF45-like effector B on meat quality traits in Berkshire pigs	유고은, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 김태완, 김일석, 박화춘, 안상미, 하정임, 김철욱	Genetics and molecular research	16(2) : 1-11 gmr1 60294 08	국외	SCI(E )	1676- 5680
2017.06	Identification a synonymous SNP in FTL gene and its association with meat quality traits in Berkshire pigs	권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 안상미, 김일석, 박화춘, 하정임, 김철욱	International journal of development research	07(06) , pp.13 101~1 3106	국외	비SCI	2230- 9926
2017.06	Dual effect of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase on reproduction and immunity in Berkshire pigs	하정임, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 김일석, 박화춘, 안상미, 김철욱	International journal of development research	07(06) , pp.13 327~1 3329	국외	비SCI	2230- 9926
2017.07	A non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the paraoxonase 3 gene regulates meat quality in Berkshire pig	허정완, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 안상미, 김일석, 박화춘, 하정임, 김철욱	Animal production science		국외	SCI	1836- 0939
2017.08	Prediction of relationships between pork color and muscular texture traits for entrepreneurial decisions	김태완, 김일석, 하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김삼웅, 김철욱	Indian J. Anim. Res		국외	SCI(E )	0367- 6722

2017.09	DNA methylation patterns and gene expression associated with litter size in Berkshire pig placenta	황정혜, 안상미, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 김일석, 박화춘, 하정임, 김철욱	Plos one	12(9) e0184 539, 1-16	국외	SCI	1932- 6203
2017.12	Squalene epoxidase plays a critical role in determining pig meat quality by regulating adipogenesis, myogenesis, and ROS scavengers	하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 박화춘, 안상미, 김철욱	Scientific reports	7 : 16740	국외	SCI	2045- 2322
2017.12	Effect of single nucleotide polymorphisms in IGFBP2 and IGFBP3 genes on litter size traits in Berkshire pigs	안상미, 황정혜, 권슬기, 유고은, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 하정임, 김철욱	Animal Biotechnology	1-8	국외	SCI	1049- 5398
2018.05	Association between an electron transfer flavoprotein alpha subunit polymorphism (rs321948383) and the meat quality of Berkshire pigs	양승창, 유고은, 하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 안상미, 김철욱	Journal of Applied Animal Research	43(1) : 1169- 1173	국외	SCI	0971- 2119
2018.09	Identification of a BRD2 gene polymorphic variant and its effects on pork quality traits in Berkshire pigs	이동주, 황정혜, 하정임, 유고은, 권슬기, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 안상미, 김철욱	Korean journal for Food Science of Animal Resources	38(4): 703-7 10	국외	SCI	1225- 8563
2018.10	Association of single-nucleotide polymorphisms in NAT9 and MAP3K3 genes with litter size traits in Berkshire pigs	황정혜, 안상미, 유고은, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 하정임, 김철욱	Archives Animal Breeding	61,379 -386	국외	SCI	0003- 9438

## 2. 국내 및 국제 학술회의 발표

국내 및 국제 학술회의 발표					
번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국동물자원학회	김철욱, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 이주영, 김삼웅	2014.6.27	강원도 홍천	한국

2	한국동물자원학회	김철욱, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 이주영, 김삼웅	2014.6.27	강원도 홍천	한국
3	IICBE	황정혜, 하정임, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 김삼웅, 김철욱	2015.02.10~11	Penang	Malaysia
4	IICBE	권슬기, 하정임, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 김삼웅, 김철욱	2015.02.10~11	Penang	Malaysia
5	ICCBES	권슬기, 하정임, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 김삼웅, 김철욱	2015.05.07~09	교토	일본
6	생화학분자생물학회	권슬기, 하정임, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 전종현, 강경희, 김철욱	2015.05.12~14	서울	한국
7	생화학분자생물학회	조정래, 권슬기, 하정임, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 전종현, 강경희, 김철욱	2015.05.12~14	서울	한국
8	7th asia pacific biotech congress	권슬기, 하정임, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 강경희, 김철욱	2015.07.13~15	베이징	중국
9	한국동물자원학회	권슬기, 하정임, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 강경희,	2015.08.25~26	서울	한국

		김철욱			
10	한국동물자원학회	황정혜, 하정임, 권슬기, 박다혜, 강덕경, 강경희, 김철욱	2015.08.25~26	서울	한국
11	한국동물자원학회	하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 강경희, 김철욱	2015.08.25~26	서울	한국
12	International congress on chemical biological and environmental sciences (ICCBES)	김철욱, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 김일석, 김재영, 김삼웅, 최정석, 이은미, 하정임, 박화춘	2016.05.10~12	오사카	일본
13	International congress on chemical biological and environmental sciences (ICCBES)	김태완, 이은미, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 강덕경, 김일석, 김재영, 김삼웅, 최정석, 하정임, 김철욱	2016.05.10~12	오사카	일본
14	International congress on chemical biological and environmental sciences (ICCBES)	하정임, 이은미, 황정혜, 김은정, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 김재영, 김삼웅, 최정석, 김일석, 김철욱	2016.05.10~12	오사카	일본
15	(사) 한국동물자원과학회	권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 김일석, 하정임, 김철욱	2016.06.23~24	서울대학교	한국
16	(사) 한국동물자원과학회	황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 김일석, 하정임, 김철욱	2016.06.23~24	서울대학교	한국
17	(사) 한국동물자원과학회	황정혜, 유고은, 권슬기, 박다혜,	2016.06.23~24	서울대학교	한국

		김태완, 강덕경, 김일석, 하정임, 김철욱			
18	한국생화학분자생물학회	안상미, 하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 김일석, 박화춘, 김철욱	2017.05.17.~19.	부산	한국
19	한국생화학분자생물학회	권슬기, 안상미, 황정혜, 유고은, 박다혜, 강덕경, 김일석, 박화춘, 하정임, 김철욱	2017.05.17.~19.	부산	한국
20	한국생화학분자생물학회	황정혜, 안상미, 권슬기, 유고은, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 김일석, 하정임, 김철욱	2017.05.17.~19.	부산	한국
21	한국생화학분자생물학회	유고은, 이동주, 황정혜, 안상미, 권슬기, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 김일석, 하정임, 김철욱	2017.05.17.~19.	부산	한국
22	International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences (IICBE)	권슬기, 유고은, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 김태완, 김재영, 김삼웅, 최정석, 김일석, 안상미, 하정임, 김철욱	2017.01.18.~19.	푸켓	태국
23	International Conference on Biological, Chemical and Environmental Sciences (IICBE)	안상미, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 강덕경, 유고은, 박화춘, 김태완, 김재영, 김삼웅, 최정석, 하정임, 김철욱	2017.01.18.~19.	푸켓	태국
24	네덜란드 조인트 세미나	권슬기, 안상미, 유고은, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 김삼웅, 최정석, 하정임, 김철욱	2017.09.20	마슈트리트	네덜란드
25	네덜란드 조인트 세미나	안상미, 황정혜,	2017.09.20	마슈트리트	네덜란드



		권슬기, 박다혜, 강덕경, 유고은, 김태완, 박화춘, 김삼웅, 최정석, 하정임, 김철욱			
26	네덜란드 조인트 세미나	하정임, 권슬기, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 박화춘, 안상미, 김삼웅, 최정석, 김철욱	2017.09.20	마슈트리트	네덜란드
27	태국 조인트 세미나 in 방콕	유고은, 권슬기, 안상미, 황정혜, 박다혜, 강덕경, 김태완, 김삼웅, 최정석, 하정임, 김철욱	2018.01.25	방콕	태국
28	태국 조인트 세미나 in 방콕	하정임, 황정혜, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 안상미, 김삼웅, 최정석, 김철욱	2018.01.25	방콕	태국
29	태국 조인트 세미나 in 방콕	황정혜, 하정임, 권슬기, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 안상미, 김삼웅, 최정석, 김철욱	2018.01.25	방콕	태국
30	태국 조인트 세미나 (Animal Science and Biotechnology) in 한국	안상미, 황정혜, 유고은, 박다혜, 강덕경, 김태완, 박화춘, 하정임, 김철욱	2018.05.29.	진주	한국
31	태국 조인트 세미나 (Animal Science and Biotechnology) in 한국	하정임, 황정혜, 박다혜, 김태완, 강덕경, 유고은, 안상미, 김삼웅, 최정석, 김철욱	2018.05.29	진주	한국
32	KSABC	황정혜, 하정임, 박다혜, 유고은, 강덕경, 안상미, 김철욱	2018.06.18.~20	제주도	한국

33	KSABC	유고은, 강덕경, 하정임, 황정혜, 박다혜, 김태완, 박화춘, 안상미, 김철욱	2018.06.18.~20	제주도	한국
----	-------	---	----------------	-----	----

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	유전자의 발현프로필을 이용한 돼지의 산자수 예측방법	한국	경남과학기술대학교 산학협력단	2014.10.24	10-2014-0145448	경남과학기술대학교 산학협력단	2017.05.08.	10-1735762	100%
2	유전자의 발현량 및 메틸화 프로필을 활용한 돼지의 산자수 예측방법	한국	경남과학기술대학교 산학협력단	2014.10.27	10-2014-0146147	경남과학기술대학교 산학협력단	2016.11.30	10-1683086	100%
3	DMR을 이용한 돼지의 산자수 예측용 조성물 및 예측방법	한국	경남과학기술대학교 산학협력단	2015.10.02	10-2015-0139091	경남과학기술대학교 산학협력단	2017.05.04.	10-1735075	90%
4	차등 발현 유전자를 이용한 돼지의 산자수 예측용 조성물 및 예측방법	한국	경남과학기술대학교 산학협력단	2015.10.12	10-2015-0142422	경남과학기술대학교 산학협력단	2017.08.07	10-1767644	90%
5	돼지의 산자수 예측용 MAP3K3 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법	한국	경남과학기술대학교 산학협력단	2016-08-19	10-2016-0105714	경남과학기술대학교 산학협력단	2017-11-03	10-1796167	90%
6	돼지의 산자수	한국	경남과학기술대학교 산학협력단	2016-08-19	10-2016-0105714	경남과학기술대학교 산학협력단	2017-11-03	10-1796170	90%

	예측용 IGFBP 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법		기술대학교 산학 협력단	8-19	0105718	기술대학교 산학 협력단	1-03		
7	돼지의 산자수 예측용 NAT9 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법	한국	경남과학기술대학교 산학 협력단	2016-08-19	10-2016-0105734	경남과학기술대학교 산학 협력단	2017-11-03	10-1796158	90%
8	돼지의 산자수 예측용 DACT3 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법	한국	경남과학기술대학교 산학 협력단	2016-08-19	10-2016-0105741	경남과학기술대학교 산학 협력단	2017-11-03	10-1796160	90%
9	돼지의 육질 예측용 SNP 마커 및 이의 용도	한국	경남과학기술대학교 산학 협력단	2017-07-04	10-2017-0085083	경남과학기술대학교 산학 협력단	2018-08-14	10-1890350	10%
10	IGFBP4 유전자의 메틸화를 이용한 돼지의 산자수 예측용 조성물 및 이를 이용한 산자수 예측방법	한국	경남과학기술대학교 산학 협력단	2018-07-03	10-2018-0077144				90%
11	ZBPB 유전자의 메틸화를 이용한 돼지의 산자수 예측용 조성물 및 이를 이용한 산자수 예측방법	한국	경남과학기술대학교 산학 협력단	2018-07-03	10-2018-0077154				90%
12	다산버크셔 병합육종 프로그램	한국	다산육종 대표 박화춘	2017-11-03	C-2017-02782	다산육종 대표 박화춘	2017-11-09	C-2017-02782	100%

4. 교육 및 지도활동 내역

교육 및 지도활동 내역				
번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	농장 컨설팅	컨설팅 자료	현재 제 1농장, 2농장으로 확장하여 운영하고 있으며 젊은 경영주를 양성하기 위해 아들을 생산파트에 투입하여 육성하고 있음. 그러므로 젊은 신진 경영주가 되기 위해서는 양돈장에 ICT를 접목하여 SMART FARM을 실현할 수 있도록 신진 양돈장 견학과 산학협력단과의 협력의 중요성을 지도 하였음.	2016
2	농장 컨설팅	컨설팅 자료	현재 운영하는 농장의 위치가 주민들이 거주하는 마을 가까이에 자리 하고 있어 농장의 분뇨및 악취로 인해 분쟁이 발생할 수 있어 체계적인 분뇨처리 및 관리 방법에 대하여 지도 하였음.	2016
3	농장 컨설팅	컨설팅 자료	육성사와 비육사를 확장하여 시설 개발을 지도 하며 톱밥 돈사를 슬리지 돈사로 개조하여 분뇨처리의 일반화를 지도 또한 경영의 효율성 제고를 위해 ICT기술을 지도 하였음.	2016
4	농장 컨설팅	컨설팅 자료	농장에서 발생하는 분뇨를 고액 분리와 액비로 처리해서 원예,과수 농장에 제공 하고 있는 실상인데 이 처리 과정에서 악취로 인해 민원이 발생하였으며 또한 액비 차량의 이동을 미행하여 업무에 차질을 주고 있어 악취 없는 액비 생산 및 살포에 대한 방법을 지도 하였음.	2016
5	농장 컨설팅	컨설팅 자료	농장에서 생산하고 있는 가고시마와타나베 흑돼지의 우수 품질의 돼지 고기를 사용하여 전문 판매장 개설 및 프랜차이즈(흑돈공방) 사업에 대한 역할과 방향을 지도 하였음.	2016

6	농장 컨설팅	컨설팅 자료	6차산업화의 효율적 추진과 대의 이미지 제고를 위해 농림 축산 식품부에서 시행 하고 있는 "2016 현장실습 교육장" 지정사업을 위한 신청서 작성 요령 및 항목별 세부평가 항목의 작성 방법 지도	2016
7	농장 컨설팅	컨설팅 자료	본 농장의 경우 부종병, 흉막 폐렴, 마이코플라스마 등의 복합 세균성 질병이 만연되어 있어 평상시 자돈의 20%가 폐사되는 양상이며, 조건이 악화 될 경우 50%까지 폐사율이 상승되는 경향이 있어 질병의 발생을 줄이기위한 방법 지도 하였음.	2016
8	농장 컨설팅	컨설팅 자료	복 있는 농장에서 생산하고 있는 함양 흑돼지의 홍보 및 판매 방안에 대해 지도 하였음.	2016
9	농장 컨설팅	컨설팅 자료	거제 지역의 조선산업의 위축으로 인해 전반적으로 시장 경제가 위축 되어 판매장에서 소비자들의 신뢰 확보를 위한 방안을 지도 하였음.	2016
10	농장 컨설팅	컨설팅 자료	제 2농장의 경우 돈사의 안정화가 되어 있지 못한 상황으로 자돈이 질병에 노출 될 가능성이 있어 시설의 보완점을 지도 하였음.	2016
11	농장 컨설팅	컨설팅 자료	날씨가 추워짐에 따라 돈사내부의 온도 관리방법을 지도 하였음.	2016
12	농장 컨설팅	컨설팅 자료	돈사 내 청결관리와 미생물의 관리,	2016

			악취 제거를 할 수 있는 방법 지도.	
14	농장 컨설팅	컨설팅 자료	소지시, 돈가스등을 제조하는 기술과 포장지에 기재 해야 하는 배합비를 산출 하는 방법 지도.	2016
15	농장 컨설팅	컨설팅 자료	돈사 배출구에 설치된 알칼리수 분무화 차단막 아래 알칼리수를 회수 할 수 있는 장치 결여가 문제의 소지가 보여 보완 방법을 지도.	2016
16	농장 컨설팅	컨설팅 자료	다양한 종류의 상품을 판매 하고 있으나 우수성을 부각시키지 못하고 있어 상품의 우수성을 부각 시키기 의해 판매장의 위치를 보완할 수 있는 방법 지도	2016
17	농장 컨설팅	컨설팅 자료	11월9일에 진주 종합경기장에서 실시하는 2016농식품박람회에 참여하여 소비자들에게 다가가 인지도를 높일 수 있게 참여 방법을 지도.	2016
18	농장 컨설팅	컨설팅 자료	농장에서 생산되는 돼지의 유통을 위해 유통 관계자와의 대면을 통해 출하가격을 지정하고 품질 좋은 돼지고기를 생산하기 위해 부산물을 이용한 발효 사료를 제조하여 급여 할 수 있도록 지도.	2016
19	농장 컨설팅	컨설팅 자료	소규모 소매점에서 친환경 농산물 및 무 항생제 축산물의 인증 마크를 부착 하기 위해서 농산물 품질관리원으로 부터 인증을 받아야 함으로 인증 절차에 필요한 구비 서류에 대한 내용을 지도.	2016
20	농장 컨설팅	컨설팅 자료	6월30일에 동물 복지농장 마크를 부여 받았으나 도축후 고기의 운송 차량에 동물 복지 인증 마크를 부착 할 수	2016

			없어 출하가격을 제대로 받을 수 없어 부경양돈의 포크 벨리 이동 차량에 복지 마크를 부착 할 수 있게 건의 할 수 있는 자료를 지도함	
21	농장 컨설팅	컨설팅 자료	사업단에서 시행 계획인 돼지고기 요리 전문점 창업교육 프로그램의 산업체장 개설에 관한 내용을 지도.	2017
22	농장 컨설팅	컨설팅 자료	식육판매장의 경우 주위 환경이 엄격하게 관리 되지 못하면 쉽게 오염에 노출 되는 경향이 있어 주위환경의 청결 관리에 철저히 대비 할 수 있도록 지도.	2017
23	농장 컨설팅	컨설팅 자료	종돈(중빈돈, 중모돈)의 유전자 분석하여 우수유전자를 찾아 이 유전자를 보유하고 있는 종돈을 중심으로 생산에 활용하는 방법을 지도.	2017
24	농장 컨설팅	컨설팅 자료	양돈장의 분뇨처리 방안 및 액비 처리 문제에 대한 지도 및 질병에 대한 예방법 지도.	2017
25	농장 컨설팅	컨설팅 자료	농장에서 번식용으로 사용되는 종돈(중빈돈, 중모돈)의 유전자 검사를 통한 활용방법 지도. 총 65두의 모근을 이용해 유전자 검사(육질 : 선호부위 증대, 설사병 저항성, 산자수) 진행.	2017
26	농장 컨설팅	컨설팅 자료	최근 국내 양돈장에는 구제역이 발생되고 있다. 그러므로 구제역을 방지 하기 위해 철저한 소독과 출입 하는 차량의 관리가 필요한 시기로써 관리 방법 및 효과적인 소독 방법에 대해 지도.	2017
27	농장 컨설팅	컨설팅 자료	이 농장의 경우 1만두의 규모인 농장으로써 근무하는 근로자의 수 역시 많다. 하지만 최근 돌고 있음 질병으로 인해 폐사가 발생하는 상황에 질병에 대한 차단 방법 등을	2017

			지도.	
28	농장 컨설팅	컨설팅 자료	부경양돈농협의 경우 국내 대표적인 양돈 조합의로써 우리 사업단과의 협력을 통해 질병 차단에 협극 요청을 하였으며 또한 회원농가 들이 HACCP를 인증 받을 수 있는 방법을 지도.	2017
29	농장 컨설팅	컨설팅 자료	6차 산업화 인증을 받는 과정에서 미달된 사항을 발견 하였으며 이 미달되는 사항을 찾아서 재 인증을 받을 수 있도록 지도.	2017
30	농장 컨설팅	컨설팅 자료	이 농장의 경우 품질에 인증을 받은 농가 이나 지육율이 약간 떨어지는 상황임으로 지육률을 향상 시킬 수 있는 방법을 지도.	2017
31	농장 컨설팅	컨설팅 자료	분뇨처리 방법과 종돈의 우수 유전자 고정을 위해 교배법을 지도	2017
32	농장 컨설팅	컨설팅 자료	폭염에 대비하여 관리 방법 및 질병에 대한 예방 방법을 지도.	2017
33	농장 컨설팅	컨설팅 자료	유전자 검사를 실시한 결과를 바탕으로 설사병저항성, 선호부위 증대, 산자수에 적용되는 우수한 유전자를 보유하고 있는 돼지를 이용해 교배 방법의 확립을 위한 지도.	2017
34	농장 컨설팅	컨설팅 자료	폭염속에서 돼지온도 관리, 질병예방 및 돈사내 가스예방 등 고온속에 성장지연에 대비한 사료공급 및 음수관리 철저지도	2017
35	농장 컨설팅	컨설팅 자료	여름 장마철에 무더위와 높은 습도로 인한 질병발생 및 체력저하가 발생하지 않도록 세심한 관찰과 관리의 중요성 지도 특히 최근 몇년간 상시적으로 발생하여 과거 겨울철에만 발생하던 구제역이 늦봄까지도 발생하고 있기	2017



			때문에 연중 지속적으로 관찰하고 구제역 의심 가축이 발생하면 지체없이 관련 기관에 신고하여 질병의 전파를 막고, 상시적으로 외부차량 및 사람들에 대한 출입관리 지도	
36	농장 컨설팅	컨설팅 자료	돈사의 시설물은 분뇨의 독성에 기인하여 빠르게 부식되는 경향성이 있음 특히 돈사의 전기시설은 이와같은 부식성에 대해 열악한 환경에 있음 돈사내에 전기시설물은 가능하면 외부로 이동할 것을 지도함. 돈사내부에 필수적으로 설치해야 한다면 시설물에 대해 주기적으로 관리 및 교체를 통해 누전 또는 감전이 발생되지 않도록 지도함.	2017
37	농장 컨설팅	컨설팅 자료	발생된 돈분 슬러리는 고액분리 후 액상은 강제공기투입 발효를 통해 발효하여 저장소로 이송한 후 액비 제조 연간 생균제 구입가가 7천만원으로써 효율적인 액비 처리 지원 또는 체계가 필요함. 함초가루는 악취제거 능력이 탁월함으로 돈사 악취 제거에 활용하도록 함.	2017
38	농장 컨설팅	컨설팅 자료	2010년 밀폐형 발효조를 설치하여 현재까지 가동해 오면서 다양한 생균제를 구입하여 돈분발효 시도 --> 자가 발효를 통한 발효조 안정화가 유도되도록 지도함.	2017
39	농장 컨설팅	컨설팅 자료	본 농장은 2016년도에 동물복지인증돼지고기로 출시되는 농장으로써 기존 농장에 비교하여 돈방당 1.6배 낮은 밀도로 돼지를 사육하도록 지도함.	2017

			톱밥 돈사 운영을 통해 악취문제 해결 및 분뇨의 처리를 자연 발효를 통해 퇴비화 하도록 지도함.	
40	농장 컨설팅	컨설팅 자료	관리자에 의한 수태 및 사양관리의 부실에 기인하여 PSY 급감 인력관리가 양돈산업의 성패를 좌우할 수 있기 때문에 인력관리를 철저히 하도록 지도함	2017
41	농장 컨설팅	컨설팅 자료	유산균 중에는 기능성이 높은 균주가 존재하기 때문에 프로바이오틱스를 선정시 주의깊게 관찰해야 함을 지도함.	2017
42	농장 컨설팅	컨설팅 자료	모든 1,500두 규모의 현대식 2층 돈사를 현재 신축하고 있으며, 연말경 준공할 예정으로 진행중 이에 따라 분뇨처리장도 신축할 계획임에 따라 사업단에서 개발하여 특허등록한 가축분뇨처리 고속액비제조기를 사용하여 돼지 분뇨의 완전 발효처리가 이루어질수 있도록 지도하고, 현재 설계에 따라 진행되고 있는 공사에 차질이 생기지 않도록 공사책임자와 최종 협의를 통해 확정하도록 지도함.	2017
43	농장 컨설팅	컨설팅 자료	성축농장보유 종돈 89두를 대상으로 실시한 돼지설사병저항성유전자 진단결과에 따른 교배체계 및 양산방안지도	2017
44	농장 컨설팅	컨설팅 자료	분뇨저장소 철소 및 관리시 유해가스 증독 및 사고예방지도 일반마스크와 봉독마스크의 성능을 농장주가 직접체험하도록 하여 예방의 중요성을 지도	2018
45	농장 컨설팅	컨설팅 자료	최근래 ICT 발달로 인해 돈사내 각종 제어시스템을 활용하여 쾌적한 돈사시설을 관리할 수 있는 시스템을 소개함.	2018

46	농장 컨설팅	컨설팅 자료	돈육을 고급화하여 시장에 출시하는 것은 수입돈육에 대한 자생력을 확보하기 위해 필수적임.	2018
47	농장 컨설팅	컨설팅 자료	본 농장의 냄새가 최소화되도록 발표를 빠르게 진행할 수 있는 미생물의 급이와 분뇨에 생균에 살포를 통해 상시적으로 분뇨에 생균제를 상존시킴으로써 냄새를 저감하도록 지도함.	2018
48	농장 컨설팅	컨설팅 자료	동애등애 유충은 단백질의 50%, 지방 30%, 탄수화물 10%로 유지하는 생물체로써 사료원으로 활용 가능성이 높음을 지도함. 본 유충으로 급이시 육성돈의 비육정도를 알아보기 위해 37일간 5% 동애등애 유충 분말의 급이를 실시하도록 지도함.	2018
49	농장 컨설팅	컨설팅 자료	모든 300두 규모의 농장으로 분뇨처리 방법과 돼지건강관리에 대한 지도 돈사건축에 재투자없이 경영방법에 대한 지도 생산비를 절감하면서 생산성을 향상시키는 방법에 대한 토의 및 지도	2018
50	농장 컨설팅	컨설팅 자료	함양 천령포크 농장에서 생산한 흑돼지고기를 유통 판매하는 식매장으로 택배를 이용하여 전국의 식당또는 소비자에게 공급하고 있음. 오랜 기간동안 장기간 거래관계를 유지함으로써 외부 경제환경변화에 크게 좌우되지 않음.	2018
51	농장 컨설팅	컨설팅 자료	흑돼지 사육의 단점을 보완하는 지도 산청흑돼지 프렌차이즈 방법과 계획에 대한 토의 및 지도 환절기 질병예방과 사료절감 방법 지도	2018
52	농장 컨설팅	컨설팅 자료	환절기 활력증진을 위해 유충의	2018

			급이로 육성돈의 성장력 개선 및 사료효율 증진을 유도할 수 있음을 지도함.	
53	농장 컨설팅	컨설팅 자료	축산농가의 분뇨 냄새는 환경문제와 민원을 유발하는 심각한 문제임을 인식시키고, 날씨가 흐리거나 비오는 날 등은 민가가 인접한 축산농가로부터 냄새로 인해 항상 주위 주민에게 피해를 유발할 수 있음을 인지시킴.	2018
54	농장 컨설팅	컨설팅 자료	컨설팅 받은 후 소득증대에 대한 분석법 지도 분뇨처리를 이젝트로 활용하여 미생물을 배양된 액비를 사용하는 방법을 지도	2018
55	농장 컨설팅	컨설팅 자료	컨설팅 후 소득증대에 관한 분석법 지도 분뇨의 냄새 및 가스방지를 위해 이젝트를 사용에 대한 토의 및 지도	2018
56	농장 컨설팅	컨설팅 자료	컨설팅 후 소득증대 관한 분석 및 지도 분뇨의 효율적인 처리를 위해 이젝트를 사용하는 방법과 지도 질병예방, 전기누전사고 예방	2018
57	농장 컨설팅	컨설팅 자료	환절기 질병예방 및 방역지도 분뇨처리 지도 번식효율 증대를 위한 지도 산자수 증가를 위한 지도	2018
58	농장 컨설팅	컨설팅 자료	부경양돈농협의 브랜드 포크밸리에 출하하기 위해 품종, 사료, 사양 통일 정책을 성실히 수행하도록 지도 자돈, 육성돈 구조에 곤충애벌레 등 천연조단백질 공급원을 첨가하여 증체량 및 면역력 강화를 통해 생산성 향상과 품질고급화 달성 지도	2018
59	농장 컨설팅	컨설팅 자료	환절기 돼지 호흡기 질병발생 예방방안 및 대처요령 지도 유해가스 및 악취발생 억제를 위한	2018

			농가의 효율적 분뇨처리 방안 지도	
60	농장 컨설팅	컨설팅 자료	분뇨처리의 효율적인 방안 지도 산자수를 증대시키는 방안지도 육질을 개선시키는 방안에 대해 집합지도	2018
61	농장 컨설팅	컨설팅 자료	불완전하게 발효된 액비를 농지에 살포시 냄새에 기인하여 민원의 소지가 되므로 주의하도록 지도함 불완전한 액비를 농지에 살포시 작물의 과도한 성장을 유도하지만 결실을 맺지 못하거나 작물을 고사시킬 수 있다는 것을 주지시켜 주의하도록 지도함.	2018
62	농장 컨설팅	컨설팅 자료	고액분리 후 발효조내에 액을 정치시키면 많은 고형분의 침착이 발생하고 발효과정에 방해가 될뿐만 아니라 발효조의 바닥에 딱딱한 침착물을 형성하여 제거에 어려움을 겪을 수 있음을 지도함.	2018
63	농장 컨설팅	컨설팅 자료	축산불법건축물 양성화 사업에 따라 불법건축물 철거 및 정리 중 불법 건축물 뿐만 아니라 용적률에 맞춰서 부지매입등을 통해 불법사항 해소지도 돼지의 사육환경 개선과 질병저항성이 강한 돼지 도입을 통한 질병발생 예방 지도	2018
64	농장 컨설팅	컨설팅 자료	성축농장에서 생산한 흑돼지의 지속적인 유통과 관련하여 (주)부농산업과 협력방안협의 성축농장에서 생산한 돼지고기의 품종에서부터 사료, 사양관리 및 품질에 이르기까지 특징과 우수성에 대해 설명하고, (주)부농산업에서 도축 및 가공하여 초록마을에서 유통, 판매 방안 협의 지도	2018

5. 기술거래(이전) 등

No	유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	코드번호	누적 징수현황
					C-06-08	
1	기술이전	특허 통상실시권 허여 계약(10-2016-01057 14호)	(주)알지	2016.09	기술료 (당해연도 발생액)	0
2	기술이전	특허 통상실시권 허여 계약(10-2016-01057 34호)	(주)알지	2016.09	기술료 (당해연도 발생액)	0
3	기술이전	특허 통상실시권 허여 계약(10-2016-01057 41호)	(주)알지	2016.09	기술료 (당해연도 발생액)	0
4	기술이전	특허 통상실시권 허여 계약(10-2016-01057 18호)	(주)알지	2016.09	기술료 (당해연도 발생액)	351,000원 (11,700,000 × 3%)

6. 홍보/전시

(1) 홍보실적

홍보실적(신문, 방송, 저널 등)				
번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	신문	전북일보	"다산육종 '흑돈' 브랜드화 필요"	2013-09-03
2	신문	전라매일	"차별화시켜 경쟁력 키운다"	2013-09-03
3	신문	남원순창인터넷 뉴스	흑돈 육종 전략수립 및 산업화 방안 워크숍 개최	2013-09-03
4	신문	대학저널	"경남과기대, 맛있는 돼지고기 연구 성공"	2015-01-14
5	신문	경남인뉴스	경남과기대 김철욱 교수, 돼지 유전자 기능 규명	2015-01-14
6	신문	경남일보	맛과 육질에 연관된 돼지 유전자 기능 규명	2015-01-14
7	신문	국제뉴스	김철욱 교수, 맛과 육질에 연관된 돼지 유전자 기능 규명	2015-01-14
8	신문	연합뉴스	돼기 고기 맛·육질 조절하는 유전자 규명	2015-01-14
9	신문	창원일보	국립경남과학기술대학교 김철욱 교수 맛과 육질 연관된 돼지 유전자 기능 규명	2015-01-14
10	신문	국제신문	경남과기대 김철욱 교수, 맛과 육질 높이는 돼지 유전자 기능 규명	2015-01-14
11	신문	경남울산	한국인 입맛 맞춤 '돼지고기 유전자' 발견	2015-01-14
12	신문	부산일보	한국인 입맛 맞춤 '돼지고기 유전자' 발견	2015-01-14
13	신문	뉴시스	경남과기대 김철욱 교수, 맛-육질 연관된	2015-01-15

돼지 유전자 기능 규명				
14	신문	에너지경제	돼지고기 맛·육질 조절하는 유전자 규명	2015-01-15
15	신문	경남매일	돼지고기 맛·육질 조절 유전자 규명	2015-01-15
16	신문	경남신문	돼지고기 맛·육질 결정하는 유전자 찾았다	2015-01-15
17	신문	뉴시스	돼지고기 맛과 육질 유전자 진단키트 산업화 성공	2016-04-11
18	신문	포커스뉴스	경남과기대 하정임연구교수, 돼지고기 유전자 진단키트 산업화	2016-04-11
19	신문	경남일보	하정임 교수팀, 돼지 유전자 키트 산업화	2016-04-11
20	신문	아시아뉴스통신	경남과기대 하정임 교수, 돼지고기 맛과 육질 유전자 진단키트 산업화	2016-04-11
21	신문	뉴스1	돼지고기 맛·육질 유전자 진단키트' 상용화 성공	2016-04-11
22	신문	경남신문	돼지고기 맛과 육질 '유전자 진단키트' 산업화	2016-04-12
23	신문	경남매일	돼지고기 맛·육질 '진단키트' 산업화	2016-04-12
24	신문	포커스뉴스	하정임 경남과기대 교수, 버크셔 돼지새끼 마릿수 결정 유전자 발견	2016-04-20
25	신문	연합뉴스	제주 흑돼지 개량종 '버크셔' 새끼 마릿수 결정하는 유전자 발견	2016-04-20
26	신문	경남매일	버크셔' 마릿수에 얽힌 비밀	2016-04-21
27	방송	KNN	맛 좋은 돼지고기' 진단키트 상용화	2016-04-23
28	신문	한국농어민신문	경남 양돈산학협력단/양돈 '생산-가공-유통-판매 시스템' 구축 소득 제고	2016-08-26
29	신문	아시아뉴스통신	경남과기대, 세계 최초 버크셔돼지 새끼 마릿수 예측 진단기법 개발	2016-08-27
30	신문	대학저널	경남과기대, 세계 최초 버크셔 돼지 새끼 마릿수 예측 진단 기법 개발	2016-08-28
31	신문	뉴시스	경남과기대 '돼지 새끼 마릿수 예측 진단기법' 개발	2016-08-28
32	신문	경남일보	경남과기대, 돼지 새끼 수 예측 기법 개발	2016-08-29
33	신문	경남신문	경남과기대, 버크셔 돼지 새끼 마릿수 예측 기법 세계 첫 개발 특허 출원	2016-08-30
34	신문	아시아뉴스통신	경남과기대, 양돈 6차산업화 기술 활용 심포지엄	2017-06-08
35	신문	한국대학신문	경남과기대, 양돈 6차산업화 기술 활용 심포지엄 개최	2017-06-09
36	신문	아시아뉴스통신	경남과기대, 네덜란드 대학과 4차 산업혁명기술교류 협약체결	2017-09-27
37	신문	베리스타 알파	경남과기대, 네덜란드 대학과 4차 산업혁명기술교류 협약체결	2017-09-27

38	신문	연합뉴스	【진주소식】 경남과기대, 네덜란드서 미래식량기술 확보	2017-09-27
39	신문	일요신문	경남과기대, 네덜란드 대학과 4차 산업혁명기술교류 협약체결	2017-09-28
40	신문	쿠키뉴스	경남과학기술대, 네덜란드 대학과 '양돈기술'교류 협약	2017-09-28
41	신문	경남일보	경남과기대, 네덜란드 대학과 협약체결	2017-09-27
42	신문	베리타스 알파	경남과기대, '흑돼지 새끼 수 결정 유전자' 발견	2017-10-11
43	신문	뉴스프리존	경남과기대 양돈과학기술센터 흑돼지 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-11
44	신문	연합뉴스	흑돼지 새끼 마릿수 증가시키는 유전자 3종 발견	2017-10-11
45	신문	신아일보	경남과기대 양돈과학기술센터, 흑돼지 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-11
46	신문	머니투데이	경남과기대, 흑돼지 산자수 결정 유전자 발견	2017-10-11
47	신문	국제신문	경남과기대 양돈과학기술센터 흑돼지 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-11
48	방송	KNN	흑돼지 새끼 마릿수 증가시키는 유전자 3종 발견	2017-10-11
49	신문	경남도민신문	흑돼지 '버크셔'종 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-11
50	신문	경남매일	흑돼지 새끼 마릿수 증가 유전자 3종 발견	2017-10-12
51	신문	일요신문	경남과기대, 양돈과학기술센터 흑돼지 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-12
52	신문	쿠키뉴스	경남과기대 양돈과학기술센터, '흑돼지 새끼 수 결정' 유전자발견	2017-10-12
53	신문	일요서울	경남과기대 흑돼지 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-12
54	신문	경남신문	'흑돼지 새끼 수; 결정하는 유전자 3종 발견	2017-10-12
55	신문	경남일보	흑돼지 새끼 수 결정 유전자 발견	2017-10-11
56	신문	아시아뉴스통신	경남과기대-태국 잔칸센 대학 공동세미나 개최	2018-05-31
57	신문	뉴스프리존	경남과기대, 태국 잔칸센 대학 공동세미나 개최	2018-05-31
58	신문	신아일보	경남과기대-태국 잔칸센 대학, 공동세미나 개최	2018-05-31
59	신문	일요서울	경남과기대-태국 잔칸센 대학 공동세미나	2018-05-31
60	신문	베리스타알파	경남과기대, 태국 잔칸센대와 공동세미나	2018-05-31
61	신문	대학저널	경남과기대, 태국 잔칸센대와 공동세미나 개최	2018-05-31
62	신문	경남일보	경남과기대-태국 잔칸센 대학 공동세미나	2018-05-31
63	신문	경남도민신문	경남과기대-태국 잔칸센 대학 공동세미나	2018-05-31
64	신문	머니투데이	경남과기대-태국 잔칸센 대학, 공동세미나	2018-06-01



### 제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 제 1절. 연구 목표 및 수행 결과

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	수행 결과
1차년도 산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현 유전자(DEG) 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- G0종돈의 태반으로부터 확보된 mRNA의 pooling</li> <li>- mRNA의 전처리 및 RNA-seq</li> <li>- 확보된 후보유전자의 다양한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 대한 각종 변이(SNV, Indel)의 탐색</li> <li>- 산자수 증대 후보유전체마커 확보</li> <li>- 산자수 우열집단 간의 DEG 정보 확보</li> </ul>
1차년도 산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- G0종돈의 태반조직에서 확보된 gDNA의 pooling</li> <li>- Bisulfite 처리 및 nucleotide seq</li> <li>- 게놈 수준에서 DNA 메틸화 분석</li> <li>- 확보된 후보유전자의 다양한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 따른 DNA메틸화 부위의 프로파일링</li> <li>- 후보후성유전체마커 확보</li> </ul>
1차년도 산업용 병합 육종프로그램 개발	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존에 수행된 연구자료의 데이터베이스 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 한국 버크셔 모돈집단(600두 규모)에서 산자수 조사 및 혈통정보 확보</li> <li>• 혈통정보에 따른 산자수 DB 구축</li> <li>• 구축된 DB를 바탕으로 산자수 우열집단 조성</li> </ul> </li> <li>- 산자수 증대 산업용 육종프로그램 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 기초돈군조성(G0): 상하 각 200두 돈군 조성</li> </ul> </li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 증대 통합 육종 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 통합 DB 구축: 기수행된 연구자료 + 검정자료</li> <li>• 조사된 raw data를 활용한 실용적 DB 구축</li> </ul> </li> <li>- 유전능력평가 프로그램 개발</li> <li>- 시뮬레이션 분석 및 계획교배 프로그램 개발</li> <li>- 육종프로그램 정확도 분석</li> <li>- 육종가 경제선발지수 개발</li> <li>- 계획교배, 사양관리 및 자돈생산 (G1)</li> </ul>
2차년도 산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현유전자 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA-seq을 통하여 산자수에 따른 차등 발현 유전자 789개 DEG를 확보</li> </ul>
2차년도 산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수에 따른 DMR분석을 통하여 hypermethylation DMR을 2,230개, hypomethylation DMR 2,160개 확보</li> <li>- DMR이 존재하는 유전자를 탐색해 본 결과 130여개의 후보 유전자를 동정</li> <li>- methylation과 expression의 연관성을 분석하여 산자수 연관 통합 유전체 마커를 선발</li> <li>- DMR에 의해 발현량이 조절되는 총 78개 유전자를 확보</li> </ul>
2차년도 산자수 증대 후보 단백질체 분석	1	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 태반 조직으로부터 차등 발현하는 단백질을 LC-MS/MS 분석을 통하여 확보</li> <li>- PSA와 RBP4를 포함한 19개 차등 발현 단백체를 확보</li> </ul>
2차년도 산자수 관련 유전자의 SNP 탐색	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 관련 유전자의 SNP를 탐색하여 10개 SNP 확보</li> <li>- 단백질체에 대한 SNP는 17개 확보</li> <li>- 전사체에 대한 SNP는 8개 확보</li> </ul>
2차년도 G1 후보모돈 선발	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1차년도에 개발된 경제선발지수로 후보모돈 선발</li> </ul>
2차년도	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경남과학기술대학교 융합</li> </ul>

<p>산자수 증대 연관 유전자군에 대한 조절네트워크분석</p>			<p>유전체 팀에서 제공한 유전체로 연관 불평형 패턴 분석 및 유효집단 크기의 추정을 통한 집단 모수 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 집단모수의 추정 및 유전체단위의 병합시뮬레이션 구축</li> <li>- 인접 SNPs간 평균 <math>r^2</math>값은 0.28, 유효집단크기는 1~5세대에 31두로 추정됨</li> <li>- 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.074와 0.071로 추정, 이유두수와 포유기간과 발정재귀일령에 대한 유전력은 0.01~0.04로 낮게 추정됨.</li> </ul>
<p>2차년도 경제선발지수의 검정 및 보완</p>	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경제 선발 지수의 검정 및 보완</li> </ul>
<p>2차년도 산자수 증대 병합육종프로그램개발</p>	3	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경남과학기술대 융합유전체팀에서 제공한 융합유전체를 이용하여 개체별 융합 유전체 추정육종가의 산출</li> <li>- 융합유전체 추정 육종가의 정확도 분석</li> <li>- 추정육종가와의 비교를 통한 정확도 분석</li> </ul>
<p>2차년도 품종 육종 및 정액검사</p>	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 총산자수에 대한 이유두수, 포유기간 및 발정재귀일령의 표현형 상관계수는 거의 0에 가까우며, 유전상관의 경우 발정재귀일령은 부(-)로 나타남</li> <li>- 총산자수에 대한 출생년도별 유전적 개량량의 추세는 유의적인 수준(<math>p &lt; 0.05</math>)에서 나타나지 않았음</li> <li>- 계획 교배, 사양관리 및 자돈생산 (G2)</li> <li>- 정액 정상검사: 년 2회 실시</li> </ul>
<p>3차년도 산자수 증대 차등발현 유전자 재현성 검증</p>	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 태반 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 10개 중 2개에 대하여 RT-qPCR로 발현 검</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- 자궁 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 8개 중 5개 검정</li> </ul>
3차년도 산자수 증대 통합유전체마커 재현성 검증	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9개의 deletion mutant SNP에 대하여 PCR-RFLP수행 및 1개 SNP에 대해서 통계적 유의성 확인</li> <li>- 8개 산자수 연관 유전자의 SNP에 대해서 PCR-RFLP수행 4개 SNP에 대해서 유의성 확인</li> </ul>
3차년도 산자수 증대 후성유전체마커 재현성 검증	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 증대 후성 유전체 마커에 대하여 Bisulfite-PCR sequencing으로 재현성을 검정하고 MSRE-PCR방법으로 진단 마커로서의 메틸화를 분석함</li> </ul>
3차년도 SNVs의 생화학적 기능 분석	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 우선 선발 하여 molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명</li> </ul>
3차년도 산업용 병합 육종프로그램 검증 및 산업화	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량시스템을 구축하는데 있어서 pocine 60k &amp; 70k chip 자료를 1,922두 생성하였으며, 이를 기반으로 친자감별 및 부모 찾기 프로그램으로 혈통파일의 안정을 꾀한 후 ssBLUP 방법을 이용하여 유전체 육종가 및 Maker effect를 추정하여 기록이 없는 후보돈 60두에 대한 선발이 이루어졌음, 향후 추가적인 연구로 정확도가 증가하고 선발기술이 보완된다면 개량의 효율성을 상당히 높일 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 이를 위한 기반 구축은 원활히 진행되고 있는 것으로 평가됨</li> </ul>

4차년도 산자수 증대 후성유전체 마커 재현성 검증	5	100	- 자궁 조직 유래 산자수 연관 DMR 13개 유전자 선발 - MSRE-PCR로 4개의 유전자에 대한 재현성 검증
4차년도 산자수 증대 유전체 마커 재현성 검증	5	100	- 산자수 연관 유전자 5개에 대한 PCR-RFLP를 통해 재현성 검증 - 산자수 형질과 유전자형간의 상 관관계를 확인함으로써 산자수 증 대를 위한 유전체 마커 5개를 확립
4차년도 항병성 증대 전사체 마커 재현성 검증	2	100	- 자궁 조직 유래 항병성 연관 DEG 28개 유전자 선발 - RT-PCR로 5개 유전자에 대한 재현성 검증
4차년도 SNVs의 생화학적 기능 분석	2	100	- Molecular docking simulation 을 통한 in silico분석으로 산자수 연관 SNVs의 결합모델링
4차년도 병합 육종프로그램 정립	5	100	- 버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개 량시스템을 구축하는데 있어서 pocine 60k bead chip 자료를 1,888 두를 생성하였으며, Final report에 서 Plink form으로 변환하고 평 가자료 형태로 출력하고 총산자수 등 표현형 및 유전체 자료 병합 입 출력 폼을 완성하였고 유전체자료 의 QC 기준, 친자감별 및 부모찾기 프로그램을 이용하여 혈통파일의 안정을 꾀한 후 ssBLUP방법을 이 용하여 유전체육종가 및 Maker effect를 추정하여 기록이 없는 후 보돈에 대한 선발이 이루어졌음, 향 후 유전체정보를 이용한 교배프로 그램을 보완한다면 개량의 효율성 을 상당히 높일 수 있을 것으로 판 단되며, 본 연구를 통하여 이를 위 한 기반 구축은 원활히 진행되고 있는 것으로 평가됨
5차년도 산자수 증대 융합유전체 마커의 확립	10	100	- 다산육종의 교배체계를 중심으로 세대 추적 조사를 한 결과 산자 수 증대 유전체의 재현성을 확인

			하여 산자수 증대 유전자의 연관성을 확립하였음.
5차년도 산자수·항병성 증대 조기선발기술의 확립	10	100	- 융합유전체 마커와 병합 육종 프로그램을 활용한 육종가에 의한 계획교배로 생산한 돼지에서 산자수 증대 유전자의 우성형질을 확인하였으며 산자수 증대 뿐만 아니라 젓꼭지 개수가 증가하여 포유력 향상 또한 기대할 수 있음.
5차년도 산자수·항병성 증대 경제선발지수, 유전능력 평가 모형의 확립 및 추정 육종가의 산출과 정확도 비교	5	100	- 융합 유전체 마커와 1,888 두에 대한 porcine SNP 60k 정보를 통해 조사한 전체 SNP 마커를 육종가 산출에 적용한 GEBV를 추정하고 ssBLUP을 실행하여 혈통 내 모든 개체들의 육종가와 SNP 정보가 있는 개체들의 유전체 육종가를 추정하여 교배  -병합육종 프로그램을 개발하여 저작권을 등록함.
5차년도 산자수·항병성 증대기술의 확립 및 버크셔 육종	10	100	- 융합 유전체 마커를 활용한 병합 육종 프로그램으로 생산한 버크셔 종에 대해서는 현재 5차년도 기준 0.7두 증가 한 것으로 나타났음.
합계	100점	100	최종 연구 목표인 산자수 증대를 0.7두 이루었으며 정량적, 정성적 연구 결과를 초과 달성. 개발후 현재까지 연간 20억원 이상의 산업화 실적

## 제 4장. 연구결과의 활용 계획

### 제 1절. 연구 성과의 활용 분야 및 활용 방안

#### 1. 연구 설계의 배경 및 수준

가. 본 연구 과제를 통하여 주관기관인 경남과학기술대학교에서는 돼지 산자수 연관 유전체, 전사체, 후성 유전체를 탐색하고 산자수를 증대 시킬 수 있는 통합 유전체 마커를 발굴하였음.

나. 본 연구에서는 산자수 연관 유전체 마커를 자궁 및 태반 같은 산자수를 조절 할 수 있는 생식 관련 조직에서 차등 발현 유전자, 차등 메틸화 유전자를 차세대염기서열분석 방법을 사용하여 탐색하였음. 본 연구방법은 기존의 형질 연관한 유전체 마커 탐색과는 달리 유전자의 기능성 연구에 근거 하고 있어 발굴한 통합 유전체 마커들의 산자수 조절에서 분자세포생물학적 역할을 규명할 수 있어 메커니즘에 대한 이해를 기반으로 형질의 개량이 가능 함.

다. 본 연구 그룹이 사용한 차세대 염기서열 분석 방법은 네덜란드 미국 등의 동물 분자 육종 연구 분야의 선진국들이 많이 사용하는 연구 방법으로 현재까지는 동물 전체 게놈의 분석에 주로 이용되었으며 본 연구의 최종 목표처럼 형질 연관한 통합 유전체 마커를 발굴 하는 목적으로는 연구 개시 단계임.

라. 산자수 연관한 차등 발현 전사체 및 후성 유전체에 대한 연구는 모두 세계최초로 이루어졌으며 특히 국내 소비자들이 선호하는 버크셔 품종으로 연구한 내용은 전혀 보고된 바가 전무하여 학문적 산업적으로도 괄목상대할만한 연구 결과임.

마. (주)다산육종에서는 산자수 증대 병합 육종 프로그램을 개발하고 유전자 능력을 도입한 GE BV를 기본으로하는 ssBLUP을 이용하여 계획 교배를 실시하였으며 우수한 육질을 가지는 버크셔 돼지를 생산 하는데 산자수가 적은 단점을 보완하여 연구 개시 시점과 비교했을 때 0.7두 증가 하는 결과를 얻었음.

바. 다산성 다산버크셔종의 품종을 개발하였고 품종 등록을 준비중에 있음.

사. 기존 연구분야에서는 단일염기다형성과 같은 유전체 마커를 형질 연관성 분석을 통해 적용 하는 사례가 보고되고 있으나 본 연구 그룹과 같이 주관 연구 기관에서 개발한 융합 유전체 마커를 산업현장에서 직접 적용하여 산자수가 증대된 돼지를 생산해 내는 현장 적용의 국내 첫 모범 사례라고 할 수 있음.

#### 2. 연구 성과의 활용 분야

가. 경남과학기술대학교에서 개발한 다산성 돼지 진단용 유전자 키트의 보급 및 수출을 계획중

나. 산자수 개량용 병합육종 프로그램 기술의 보급 및 수출 계획

다. 산자수 증가된 다산 버크셔종 품종 등록 준비중 및 수출 계획 (질병 free 국가 선정 시)

라. (주) 다산육종에서 실시하고 있는 융합 유전체 마커를 활용한 병합 육종 프로그램을 이용한 선발 및 계획 교배가 성공적인 현장 적용 모델로 확인되어 양돈장, 종돈장에 융합 유전체 마커를 이용하여 다산성 돼지를 분석하는 기술을 보급하여 교배체계를 지도하여 산자수를 증대 시켜 양돈산업의 수익성을 증대 시키고 종돈의 수입 대체를 통해 국내 양돈의 경쟁력 확보에 기여.

마. 다산성 유전자를 탐색하면서 발굴한 유전자들은 자궁 내막의 세포분열을 조절하거나 태반에서 혈관을 통한 영양소 공급을 조절 하는 임신 기간 동안 중요한 역할을 하는 것으로 조사되었음. 최근 국내의 가장 큰 문제로 지적 되고 있는 저출산, 불임, 난임 등의 원인을 규명하고 해결하기 위한 기초 자료로 활용이 가능함.

## 제 2절. 추가 연구의 필요성

### 1. 연구 분야

가. 본 연구 과제를 수행하면서 산자수 연관 유전체 마커 중 IGFBP2, IGFBP3의 단일 염기 다형성이 산자수를 조절하는 것으로 조사되었으며 후성 유전체 중에서도 IGF 신호에 관여하는 유전자들이 발굴 되었다. 이에 본 연구자들은 IGF 신호가 기존에 보고된 내용과는 다른 생식 및 산자수를 조절하는 메커니즘이 있을 것이라고 가정 할 수 있음. ‘자궁에서 IGF signal의 역할을 규명하고 난임 및 불임 환자의 진단 및 치료방법’ 이라는 과제명으로 후속 과제를 진행하고 있음.

나. 이외에도 본 연구 기간 동안 발굴된 차등발현 전사체, 후성 유전체 및 통합 유전체 마커들 중에서는 돼지에서 역할이 전혀 보고되지 않은 신규한 유전자들이 다수 포함되어 있고 본 연구 그룹이 보유하고 있는 연구 인프라를 활용한다면 모두 세계 최초의 연구 보고가 될 수 있을 것으로 사료됨.

다. 버크셔 종에 대한 산자수 연관 통합 유전체 마커를 발굴 하고 그 기능을 탐색하는 과정에서 SYT13 유전자를 선택하여 분자세포생물학 수준에서 연구를 진행하였으며 넉아웃 마우스를 연구 협력 기관의 도움으로 연구 조사 할 수 있었음. 분자 수준뿐만 아니라 동물 모델을 활용한 유전자의 연구는 연구 확장에 반드시 필요한 부분이기 때문에 활용가치가 크다고 봄. SYT 유전자는 뇌신경 등의 분야에서 연구가 많이 이루어진 유전자 이지만 그 중에서도 SYT13 유전자에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았음. 해당 동물 모델로 연구를 수행하면 모두 세계 최초의 연구 결과임.

### 2. 산업화 분야

가. 본 연구 기간동안 경남과학기술대학교에서 개발한 산자수 연관 통합 유전체 마커를 활용한 다산성 돼지의 선발 방법 등에 관한 특허를 바탕으로 (주) 다산육종에 기술 이전을 통한 산업화를 하고 있어서 이를 통한 산자수 증대 및 연매출 증가를 기대할 수 있음.



나. 또한 양돈장 및 종돈장에 해당 연구진들의 다산성 돼지 생산을 위한 컨설팅으로 국내 양돈 산업의 경쟁력 제고에 기여 할 수 있음.

다. 유전자 검사를 통한 돼지 농장의 교배 체계 지도, 종돈장의 다산성 종돈의 유전적 우월성 분석이 가능하여 양돈 산업의 경쟁력 제고에 크게 기여하고 있음.

라. 유전자검사 벤처기업을 창업하여 산업화를 촉진시키고 고용창출에 도움이 될 것임.

### 제 3절. 기술이전 및 기술 확산

#### 1. 기술이전

가. 현재까지 경남과학기술대학교에서 개발한 특허 기술을 (주) 다산육종에 3건의 기술이전을 무상으로 실시 하였으며 연구기간동안 (주) 알지에 4건을 기술이전하여 양돈장의 돼지유전자 검사를 실시하여 이를 통해 발생한 기술이전료 약1,170만원이 발생하였음.

산자수 연관 유전자 및 후성 유전체 마커를 활용한 다산성 돼지 선발 기법에 관한 개발된 연구 기술은 (주)다산육종에서만 활용되고 있지만 앞으로 기술이전을 통해 버크셔종의 경제적 가치를 높일 것으로 확신됨.

#### 2. 기술 확산

가. 본 연구 그룹은 경남과학기술대학교에서 개발한 다산성 돼지를 선발 하는 방법에 관한 기술을 경상남도 농업 기술원을 통한 시군 농업 기술센터를 통한 시군 양돈 농가에 보급하고 농업 기술 실용화 재단을 통해 기술이전 및 기술 사업화를 통해 산자수가 많은 버크셔종을 전국적으로 빠르게 확산시킬 계획 임.

나. 이러한 방법을 이용하여 종돈장 및 양돈 농가를 대상으로 유전자 선별에 의한 우수한 종돈 선발에 대한 기술을 교육 및 컨설팅하여 유전자 검사를 통한 교배 체계 구축에 기여하고자 함.

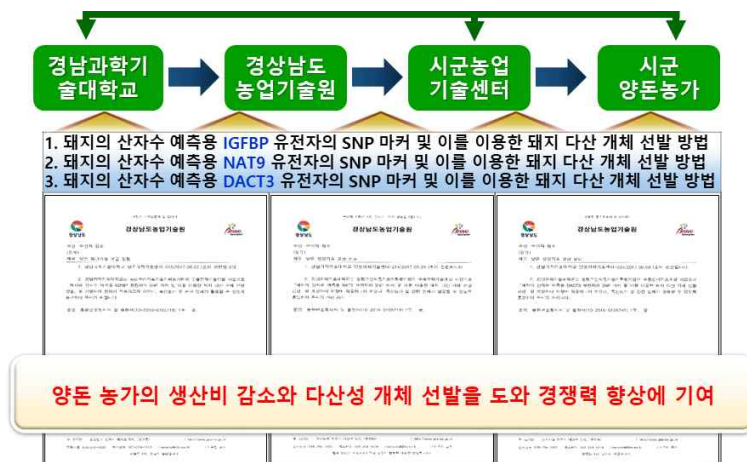


그림. 기술확산 모식도

## 붙임. 참고문헌

1. RNA-Seq approach for genetic improvement of meat quality in pig and evolutionary insight into the substrate specificity of animal carbonyl reductases.  
Jung WY, Kwon SG, Son M, Cho ES, Lee Y, Kim JH, Kim BW, Park DH, Hwang JH, Kim TW, Park HC, Park BY, Choi JS, Cho KK, Chung KH, Song YM, Kim IS, Jin SK, Kim DH, Lee SW, Lee KW, Bang WY, Kim CW., PLoS One. 2012;7(9):e42198.
2. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation.  
Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L., Nat Biotechnol. 2010 May;28(5):511-5.
3. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data.  
Anders S, Pyl PT, Huber W., Bioinformatics. 2015 Jan 15;31(2):166-9.
4. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies.  
Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K., BMC Bioinformatics. 2013 Jul 9;14:219.
5. On the interpretation of "chi" from contingency tables, and the calculation of p. Fisher, R. A., *Journal of the Royal Statistical Society 1922* 85(1): 87 - 94.
6. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>th</sup> edn.  
AOAC., Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD. 2000.
7. A simple method for the extraction and purification of total lipids from animal tissues.  
Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. H., J. Biol. Chem. 1957 226:497 - 509.
8. Effect of polymorphisms in four candidate genes for fertility on litter size in a German pig line.  
Spötter A, Hamann H, Müller S, Distl O., Reprod Domest Anim. 2010 Aug;45(4):579-84.
9. Mapping of the porcine oestrogen receptor 2 gene and association study with litter

size in Iberian pigs.

Muñoz G, Ovilo C, Amills M, Rodríguez C., *Anim Genet.* 2004 Jun;35(3):242-4.

10. Characterization, expression profile, polymorphism and association of porcine NAT9 gene.

Jiugang Z, Jing L, Yonggang L., *Mol Biol Rep.* 2012 Mar;39(3):3137-42.

11. Molecular cloning, sequence characterization, polymorphism and association analysis of porcine ROPN1 gene.

Lan J, Zhao J, Liu Y., *Mol Biol Rep.* 2012 Mar;39(3):2739-43.

12. Molecular cloning, tissue expression and association of porcine NR4A1 gene with reproductive traits.

Liu LQ, Li FE, Deng CY, Xiong YZ., *Mol Biol Rep.* 2011 Jan;38(1):103-14.

13. Effect of polymorphisms in candidate genes on reproduction traits in Finnish pig populations.

Sironen AI, Uimari P, Serenius T, Mote B, Rothschild M, Vilkki J., *J Anim Sci.* 2010 Mar;88(3):821-7.

14. Cold-inducible RNA binding protein in mouse mammary gland development.

Lujan DA, Garcia S, Vanderhoof J, Sifuentes J, Brandt Y, Wu Y, Guo X, Mitchell T, Howard T, Hathaway HJ, Hartley RS., *Tissue Cell.* 2016 Dec;48(6):577-587.

15. Proliferation of trophoblasts and Ki67 expression in preeclampsia.

Kaya B, Nayki U, Nayki C, Ulug P, Oner G, Gultekin E, Yildirim Y., *Arch Gynecol Obstet.* 2015 May;291(5):1041-6.

16. Ki67 as a predictor of poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer.

Li H, Han X, Liu Y, Liu G, Dong G., *Oncol Lett.* 2015 Jan;9(1):149-152.

17. Reversible deafferentation of abducens motoneurons and internuclear neurons with tetanus neurotoxin.

González-Forero D, De La Cruz RR, Delgado-García JM, Pastor AM., *Neuroreport.* 2001 Mar 26;12(4):753-6.

18. CTGF expression is up-regulated by PROK1 in early pregnancy and influences

HTR-8/Svneo cell adhesion and network formation.

Waddell JM, Evans J, Jabbour HN, Denison FC., *Hum Reprod.* 2011 Jan;26(1):67-75.

19. Temporal and spatial expression of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) and transforming growth factor beta type 1 (TGF-beta1) at the utero-placental interface during early pregnancy in the pig.

Moussad EE, Rageh MA, Wilson AK, Geisert RD, Brigstock DR., *Mol Pathol.* 2002 Jun;55(3):186-92.

20. Increased Epithelial Expression of CTGF and S100A7 with Elevated Subepithelial Expression of IL-1 $\beta$  in Trachomatous Trichiasis.

Derrick T, Luthert PJ, Jama H, Hu VH, Massae P, Essex D, Holland MJ, Burton MJ., *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jun 1;10(6):e0004752.

21. Potential therapeutic role for statins in respiratory disease.

Hothersall E, McSharry C, Thomson NC., *Thorax.* 2006 Aug;61(8):729-34.

22. VEGF correlates with inflammation and fibrosis in tuberculous pleural effusion.

Bien MY, Wu MP, Chen WL, Chung CL., *Scientific World Journal.* 2015;2015:417124.

23. Expression of 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase in Human Chorion Is Associated with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Isoform Expression in Term Labor.

He P, Li Y, Ding X, Sun Q, Huang Y, Gu H, Ni X., *Am J Pathol.* 2015 Jul;185(7):1981-90.

24. Lipopolysaccharide-induced murine embryonic resorption involves nitric oxide-mediated inhibition of the NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase.

Aisemberg J, Bariani MV, Vercelli CA, Wolfson ML, Franchi AM., *Reproduction.* 2012 Oct;144(4):447-54.

25. Association between length of gestation and cervical DNA methylation of PTGER2 and LINE 1-HS.

Burris HH, Baccarelli AA, Motta V, Byun HM, Just AC, Mercado-Garcia A, Schwartz J, Svensson K, Téllez-Rojo MM, Wright RO., *Epigenetics.* 2014 Aug;9(8):1083-91.

26. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E2 Signaling through Prostaglandin Receptor EP-2 Favor the Development of Myocarditis during Acute *Trypanosoma cruzi* Infection.

Guerrero NA, Camacho M, Vila L, Íñiguez MA, Chillón-Marinas C, Cuervo H, Poveda C, Fresno M, Gironès N., *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Aug 25;9(8):e0004025.

27. Prostaglandin EP2 and EP4 receptors modulate expression of the chemokine CCL2 (MCP-1) in response to LPS-induced renal glomerular inflammation.

Zahner G, Schaper M, Panzer U, Kluger M, Stahl RA, Thaiss F, Schneider A., *Biochem J.* 2009 Aug 27;422(3):563-70.

28. Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation.

Cheyette BN, Waxman JS, Miller JR, Takemaru K, Sheldahl LC, Khlebtsova N, Fox EP, Earnest T, Moon RT., *Dev Cell.* 2002 Apr;2(4):449-61.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 수출 전략형 흑돼지의 산자수 증대 기술 개발						
	(영문) Development of Berkshire breed maintaining prolificacy for export strategy						
주관연구기관	경남과학기술대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 동물소재공학과			
참 여 기 업	다산육종			(성명) 김 철 욱			
총연구개발비 (1,335,000천원)	계	1,335,000	총 연 구 기 간	2013. 08.26 ~ 2018. 08. 25 (60개월)			
	정부출연 연구개발비	1,000,000		총 인 원	17		
	기업부담 금	335,000		총 참 여 연 구 원 수	내부인원		7
	연구기관부 담금	0			외부인원		10

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구의 목적은 본 연구 그룹에 의해 한국 최초로 개발된 “육질이 우수한 한국 다산 버크셔 계통”을 활용하여 다른 품종에 비해 육질이 우수하지만 산자수가 적은 버크셔 돼지의 단점을 분자육종 기술을 통해 개량하고 산자수-항병성이 우수한 한국 버크셔 품종을 개발하는 것임.

본 연구를 통해 산자수 연관 유전체, 전사체, 단백질체, 후성 유전체를 발굴하고, 네트워크 분석을 통하여 통합 유전체 마커를 정립하였음.

재현성 검증을 통해 산자수 연관 통합 유전체 마커를 확립하였음.

이들 마커를 이용하여 경제 선발 지수에 대한 검정 및 보완하여 병합 육종 프로그램을 개발하고 추정 육종가의 비교분석을 통해 자돈을 생산하였음.

발굴한 통합 유전체 마커를 활용한 산자수 조기 진단 유전자 키트를 개발하고 기술이전을 통한 산업화를 이루었음.

연구 개시 전과 비교시 두당 산자수가 0.7두 증가하는 결과를 확보하였음. 또한 계획교배를 통해 생산한 다산성 돼지에서 젓꼭지 개수가 15-16개로 증가하여 산자수가 증대되며 포유능력도 향상될 것으로 기대됨.

○ 연구내용 및 결과

다산성 돼지 생산을 위한 유전체 마커의 발굴을 통해 산자수 연관 유전체 48개, 차등 발현 전사체 789개, 단백질체 19개, 후성 유전체 130개를 동정하여 통합 유전체 마커 78개를 확보하였고 재현성 실험을 통해 산자수 연관 유전체 5개, 전사체/후성 유전체 마커 4개, 항병성 마커 5개를 최종 확보함.

이를 활용하여 협동과제에서 경제 선발 지수를 통한 후보모돈을 선발하고 경제 선발 지수에 대한 검정 및 보완을 하여 병합 육종 프로그램을 개발하고 추정 육종가의 비교 분석을 통한 정확도 분석을 수행하여 계획교배를 통한 자돈을 생산하였음.

그 결과 산자수가 증대된 다산 버크셔 품종을 개발하여 산자수가 0.7두 증가 하는 결과를 얻어 다산성 다산버크셔종의 품종 등록을 준비중에 있음.

정량적인 연구 성과를 모두 초과 달성 하였으며 정성적인 연구 결과 또한 세계최초의 연구 결과로 매우 우수함.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 연구 결과 활용 실적

- 산자수 증가 연관 유전자 진단 kit 개발
- 산자수 개량용 병합육종프로그램의 개발과 실제 활용기반구축, 보급
- 산자수 증가된 다산 버크셔종 품종 등록 (준비중)
- 국제 경쟁력 있는 산자수 개량된 버크셔계통 개발 착수
- 다산성 돼지를 선발하는 방법에 관한 기술을 경상남도 농업기술원을 통한 시군 농업 기술 센터를 통한 시군 양돈 농가에 보급하여 총 58의 기술 확산을 실시
- 산자수 연관 유전자 및 후성 유전체 마커를 활용한 다산성 돼지 선발 기법에 관한 개발된 연구 기술은 (주)다산육종에서만 활용되고 있지만 농업 기술 실용화 재단을 통해 기술 이전시켜 사업화를 확산시킬 계획임
- 기술이전을 통한 기술료 발생 351,000원 (11,700,000 × 3%)

2. 매출실적

- 0.7두/년 증대는 FTA현실에서 흑돈산업의 산업지속여부의 분수령으로 중요함
- 현실적인 매출증대는 사업성이 있는 2019년부터 규모증대로 가속화 추진
- 현재까지 모돈280두 × 480,000원/두 × 16두/모돈 = 21.5억원

- 향후 3년간은 평균 모돈600두 × 540,000원/두 × 20두/모돈 × 3년 = 194.4억원

### 3. 사업화계획

- 개발된 산자수 증대 유전자 진단 키트의 수출

- 산자수 개량용 병합육종프로그램의 개발과 실제 활용기반구축, 보급 및 수출 계획

- 점유율 흑돈 280두/12,000두 = 2.3%, 향후 3년 후 600두/12,000두 = 5%

- 가공육과 발효육제품개발 추진

- 예상매출은 3년후에는 생산 32억, 유통 30억, 가공에서 5억원으로 예상됨

- 수입대체 연간 현재 300두, 3년부터는 500두(수입 2백만원/모돈)



## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		313012-5	
사업구분	수출전략기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	수출전략기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	수출 전략형 후폐지의 산자수 증대 기술 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	경남과학기술대학교		연구책임자	김 철 욱	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2013. 08. 26. ~ 2014. 08. 25	200,000	67,000	267,000
	2차연도	2014. 08. 26. ~ 2015. 08.2 5	200,000	67,000	267,000
	3차연도	2015. 08. 26. ~ 2016. 08. 25	200,000	67,000	267,000
	4차연도	2016. 08. 26. ~ 2017. 08. 25	200,000	67,000	267,000
	5차연도	2017. 08. 26. ~ 2018. 08. 25	200,000	67,000	267,000
	계		1,000,000	335,000	1,335,000
참여기업	다산육종				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

### 2. 평가일 :

### 3. 평가자(연구책임자) : 김 철 욱

소속	직위	성명
경남과학기술대학교	교수	김 철 욱

### 4. 평가자(연구책임자) 확인 : 김 철 욱

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

<b>확약</b>	
-----------	--

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주 우수

본 연구의 목적은 본 연구 그룹에 의해 한국 최초로 개발된 “육질이 우수한 한국 다산 버크셔 계통”을 활용하여 다른 품종에 비해 육질이 우수하지만 산자수가 적은 버크셔 돼지의 단점을 분자유종 기술을 통해 개선하고 산자수-항병성이 우수한 한국 버크셔 품종을 개발하는 것임.

산자수 연관 유전체, 전사체, 단백질체, 후성 유전체를 발굴하기 위해 돼지의 태반과 자궁 조직을 이용하여 차세대 염기 서열 분석을 수행함. 연구 결과 세계최초로 돼지 전체 게놈에서 다량의 산자수 연관 마커를 발굴 하여 재현성 검증을 통한 마커 확립을 하였음.

이에 산자수 연관 유전체 48개, 차등 발현 전사체 789개, 단백질체 19개, 후성 유전체 130개를 동정하여 통합 유전체 마커 78개를 확보하였고 재현성 실험을 통해 산자수 연관 유전체 5개, 전사체/후성 유전체 마커 4개, 항병성 마커 5개를 최종 확보하여 산자수, 항병성 연관 유전자 선발 kit를 세계 최초 개발했음.

이를 활용하여 협동과제에서 경제 선발 지수를 통한 후보모돈을 선발하고 경제 선발 지수에 대한 검정 및 보완을 하여 육종 프로그램을 개발하고 추정 육종가의 비교 분석을 통한 정확도 분석을 수행하여 세계 최초로 병합 계획교배를 통한 자돈을 생산하였음.

그 결과 산자수가 1.45두 증가 하는 결과를 얻음.

정량적인 연구 성과를 모두 초과 달성 하였으며 정성적인 연구 결과 또한 매우 우수함.

태반에서 차등 발현하는 전사체를 발굴하고 이의 분자세포생물학적 기능에 대한 연구를 수행하여 분자수준에서 Wnt signal과 IL-6가 LIPG 발현을 증가 시켜 태반에서 태아의 영양공급이 촉진되어 산자수가 증가 될 것이라는 연구 결과를 얻었으며 또한 자궁에서 통합 유전체 중 하나로 발굴한 Synaptotagmin13 유전자는 연구 협력으로 유전자 녹아웃 마우스를 제작하여 해당 유전자가 산자수에 어떤 영향을 가지는지 동물 모델을 통해 연구하였음.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

아주 우수

본 연구를 통해 산자수 연관 통합 유전체 마커를 개발하고 경제 선발 지수에 의한 후보 모돈을 선발하고 산자수 증대 육종 프로그램을 개발하여 연구 수행 기간 동안 두당 산자수가 1.45두 증가하는 우수한 결과를 확보하였음.

산자수 연관 통합 유전체 마커 및 선발 기술을 경상남도 농업 기술원을 통하여 시, 군 농업 기술원 18곳으로 정책 건의 및 정책 활용하여 기술 확산 (총 54건) 하였음. 해당 연구 개발 기술을 양돈 농가에 교육지도 (71건) 하여 양돈장에서 계획교배, 종돈 도입시 유전자의 우월성 검증 등의 필요성에 대한 인식 재고.

개발된 연구 결과 중 총 4건의 산자수 연관 유전체 마커를 활용한 진단 기술을 (주) 알지에 기술이전 하였으며 양돈장으로부터 총 320두의 돼지에서 유전자 검사를 통하여 계획 교배를 지도 하였으며 유전자 검사를 실시한 벤처기업에 약 1170만원의 수익이 발생 기술이전료 35만원을 경남과학기술대학교 산학협력단에 지급하여 개발된 기술의 산업화 함.

또한 산자수 연관 유전자 진단 기술개발 및 보급으로 320 두의 종빈돈에서 평균 2두의 산자수가 증대되어 연간 1600두를 추가 출하하여 768,000 천원의 소득이 증대됨. 우수한 품질로 인해 일반 버크셔종에 비해 70.5천원의 추가 소득을 얻어 연간 8000두 출하로 인해 농가는 연간 564,000천원의 소득이 증대하는 효과를 도출함. 향후 전국적으로 개발된 우수종돈이 보급되어 비육돈의 연간 출하량 1,500천두에 적용될 경우 흑돼지 사육농가의 총 소득은 1,057.5억원이 증대될 것으로 예측됨.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

#### 아주우수

본 연구를 통해 연구진들은 산자수 연관 통합 유전체 마커를 발굴하고 병합 육종 프로그램의 개발을 통하여 산자수 증대 버크셔종을 개발하여 실제 활용 할 수 있는 연구 성과를 확보하여 기반을 구축한 국내 최초의 모범적 현장적용 연구 결과임.

해당 연구 결과를 국내 종돈장, 양돈장에 보급 및 기술 적용을 통하여 종돈의 하이퍼프로리픽라인을 구성 할 수 있음. 전체 양돈 산업의 생산성의 향상이 기대 됨.

종돈장, 양돈장의 종돈을 대상으로 산자수 증대 유전체 검사를 실시하여 유전자 검사를 수행 하는 벤처기업의 수익성 향상을 통하여 개발된 기술의 산업화.

유전자 검사를 통하여 돈육의 부가가치를 높이고 해당 품종의 브랜드 가치를 올림.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

#### 아주우수

총괄과제 계획서에 계획되었던 당초 연구 목표대비 모든 연구 성과에서 초과 달성하였음.

돼지 생식 연관 조직 (태반 및 자궁)에서 DNA 및 RNA를 추출하여 유전체, 전사체, 단백질,

후성 유전체를 발굴하고 네트워크 분석을 통해 통합 유전체 마커를 확보함. 재현성 검증을 반복적으로 수행하고 세대 검증을 통하여 해당 마커의 확립을 하였고 산자수 연관 유전자 마커를 활용하여 우수한 다산성 개체를 개량 할 수 있는 진단 기술을 개발하고 병합 육종 프로그램 개발에 성공하였음. 종돈의 조기 선발을 통한 계획 교배로 태어난 자돈의 경우 해당 유전자 마커의 고정을 확인하였으며 산자수가 증대 되는 결과와 함께 젖꼭지가 평균에 비해 2-3개 증가하여 포유능력 또한 향상되는 연구 결과를 얻음.

정량적 수준에서 연구 목표에 해당하는 수치를 초과 달성하였으며 정성적인 측면에서도 세계최초로 버크셔 돼지의 산자수 연관 통합 유전체 마커를 대량 발굴하는 연구 결과를 확보하였음.

#### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

##### 아주우수

돼지 태반 및 자궁 조직에서 확보한 산자수 연관 유전체, 전사체, 단백질체, 후성 유전체에 관한 연구 논문 24건을 발표하였음. 학술대회에서 33건의 발표 실적 지적 재산권 (특허 출원 9건 등록 9건)의 연구 결과를 확보하였음.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1차년도 산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현 유전자(DEG) 정보 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- G0종돈의 태반으로부터 확보된 mRNA의 pooling</li> <li>- mRNA의 전처리 및 RNA-seq</li> <li>- 확보된 후보유전자의 다양한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 대한 각종 변이(SNV, Indel)의 탐색</li> <li>- 산자수 증대 후보유전체마커 확보</li> <li>- 산자수 우열집단 간의 DEG 정보 확보</li> </ul>
1차년도 산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- G0종돈의 태반조직에서 확보된 gDNA의 pooling</li> <li>- Bisulfite 처리 및 nucleotide seq</li> <li>- 게놈 수준에서 DNA 메틸화 분석</li> <li>- 확보된 후보유전자의 다양한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 따른 DNA메틸화 부위의 프로파일링</li> <li>- 후보후성유전체마커 확보</li> </ul>
1차년도 산업용 병합 육종프로그램 개발	5	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존에 수행된 연구자료의 데이터베이스 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 한국 버크셔 모돈집단(600두 규모)에서 산자수 조사 및 혈통정보 확보</li> <li>• 혈통정보에 따른 산자수 DB 구축</li> <li>• 구축된 DB를 바탕으로 산자수 우열집단 조성</li> </ul> </li> <li>- 산자수 증대 산업용 육종프로그램 개발               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 기초돈군조성(G0): 상하 각 200두 돈군 조성</li> </ul> </li> <li>- 산자수 증대 통합 육종 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 통합 DB 구축: 기수행된 연구</li> </ul> </li> </ul>

			자료 + 검정자료 • 조사된 raw data를 활용한 실용적 DB 구축 - 유전능력평가 프로그램 개발 - 시뮬레이션 분석 및 계획교배 프로그램 개발 - 육종프로그램 정확도 분석 - 육종가 경제선발지수 개발 - 계획교배, 사양관리 및 자돈생산 (G1)
2차년도 산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현유전자 확보	2	100	- RNA-seq을 통하여 산자수에 따른 차등 발현 유전자 789개 DEG를 확보
2차년도 산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보	2	100	- 산자수에 따른 DMR분석을 통하여 hypermethylation DMR을 2,230개, hypomethylation DMR 2,160개 확보 - DMR이 존재하는 유전자를 탐색해 본 결과 130여개의 후보 유전자를 동정 - methylation과 expression의 연관성을 분석하여 산자수 연관 통합 유전체 마커를 선발 - DMR에 의해 발현량이 조절되는 총 78개 유전자를 확보
2차년도 산자수 증대 후보 단백질체 분석	1	100	- 태반 조직으로부터 차등 발현하는 단백질을 LC-MS/MS 분석을 통하여 확보 - PSA와 RBP4를 포함한 19개 차등 발현 단백체를 확보
2차년도 산자수 관련 유전자의 SNP 탐색	2	100	- 산자수 관련 유전자의 SNP를 탐색하여 10개 SNP 확보 - 단백질체에 대한 SNP는 17개 확보 - 전사체에 대한 SNP는 8개 확보
2차년도 G1 후보모돈 선발	2	100	- 1차년도에 개발된 경제선발지수로 후보모돈 선발
2차년도 산자수 증대 연관 유전자군에 대한 조절네트워크분석	2	100	- 경남과학기술대학교 융합 유전체 팀에서 제공한 유전체로 연관 불평형 패턴 분석 및 유효집단 크기의 추정을 통한

			<p>집단 모수 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 집단모수의 추정 및 유전체단위의 병합시뮬레이션 구축</li> <li>- 인접 SNPs간 평균 <math>r^2</math>값은 0.28, 유효집단크기는 1~5세대에 31두로 추정됨</li> <li>- 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.074와 0.071로 추정, 이유두수와 포유기간과 발정재귀일령에 대한 유전력은 0.01~0.04로 낮게 추정됨.</li> </ul>
2차년도 경제선발지수의 검정 및 보완	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경제 선발 지수의 검정 및 보완</li> </ul>
2차년도 산자수 증대 병합육종프로그램개발	3	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경남과학기술대 융합유전체팀에서 제공한 융합유전체를 이용하여 개체별 융합 유전체 추정육종가의 산출</li> <li>- 융합유전체 추정 육종가의 정확도 분석</li> <li>- 추정육종가와 비교를 통한 정확도 분석</li> </ul>
2차년도 품종 육종 및 정액검사	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 총산자수에 대한 이유두수, 포유기간 및 발정재귀일령의 표현형 상관계수는 거의 0에 가까우며, 유전상관의 경우 발정재귀일령은 부(-)로 나타남</li> <li>- 총산자수에 대한 출생년도별 유전적 개량량의 추세는 유의적인 수준(<math>p &lt; 0.05</math>)에서 나타나지 않았음</li> <li>- 계획 교배, 사양관리 및 자돈생산 (G2)</li> <li>- 정액 정상검사: 년 2회 실시</li> </ul>
3차년도 산자수 증대 차등발현 유전자 재현성 검증	2	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 태반 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 10개 중 2개에 대하여 RT-qPCR로 발현 검정</li> <li>- 자궁 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 8개 중 5개</li> </ul>

			검정
3차년도 산자수 증대 통합유전체마커 재현성 검증	5	100	- 9개의 deletion mutant SNP에 대하여 PCR-RFLP수행 및 1개 SNP에 대해서 통계적 유의성 확인 - 8개 산자수 연관 유전자의 SNP에 대해서 PCR-RFLP수행 4개 SNP에 대해서 유의성 확인
3차년도 산자수 증대 후성유전체마커 재현성 검증	5	100	- 산자수 증대 후성 유전체 마커에 대하여 Bisulfite-PCR sequencing으로 재현성을 검정하고 MSRE-PCR방법으로 진단 마커로서의 메틸화를 분석함
3차년도 SNVs의 생화학적 기능 분석	2	100	- 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 우선 선발 하여 molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명
3차년도 산업용 병합 육종프로그램 검증 및 산업화	5	100	- 버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량시스템을 구축하는데 있어서 pocine 60k & 70k chip 자료를 1,922두 생성하였으며, 이를 기반으로 친자감별 및 부모 찾기 프로그램으로 혈통파일의 안정을 꾀한 후 ssBLUP 방법을 이용하여 유전체 육종가 및 Maker effect를 추정하여 기록이 없는 후보돈 60두에 대한 선발이 이루어졌음, 향후 추가적인 연구로 정확도이 증가하고 선발기술이 보완된다면 개량의 효율성을 상당히 높일 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 이를 위한 기반 구축은 원활히 진행되고 있는 것으로 평가됨
4차년도 산자수 증대 후성유전체 마커 재현성 검증	5	100	- 자궁 조직 유래 산자수 연관 DMR 13개 유전자 선발 - MSRE-PCR로 4개의 유전자에



			대한 재현성 검증
4차년도 산자수 증대 유전체 마커 재현성 검증	5	100	- 산자수 연관 유전자 5개에 대한 PCR-RFLP를 통해 재현성 검증 - 산자수 형질과 유전자형간의 상관관계를 확인함으로써 산자수 증대를 위한 유전체 마커 5개를 확립
4차년도 항병성 증대 전사체 마커 재현성 검증	2	100	- 자궁 조직 유래 항병성 연관 DEG 28개 유전자 선별 - RT-PCR로 5개 유전자에 대한 재현성 검증
4차년도 SNVs의 생화학적 기능 분석	2	100	- Molecular docking simulation 을 통한 in silico분석으로 산자수 연관 SNVs의 결합모델링
4차년도 병합 육종프로그램 정립	5	100	- 버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량시스템을 구축하는데 있어서 pocine 60k bead chip 자료를 1,888 두를 생성하였으며, Final report에서 Plink form으로 변환하고 평가자료 형태로 출력하고 총산자수 등 표현형 및 유전체 자료 병합 입출력 폼을 완성하였고 유전체자료의 QC 기준, 친자감별 및 부모찾기 프로그램을 이용하여 혈통파일의 안정을 꾀한 후 ssBLUP방법을 이용하여 유전체육종가 및 Maker effect를 추정하여 기록이 없는 후보돈에 대한 선발이 이루어졌음, 향후 유전체정보를 이용한 교배프로그램을 보완한다면 개량의 효율성을 상당히 높일 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 이를 위한 기반 구축은 원활히 진행되고 있는 것으로 평가됨
5차년도 산자수 증대 융합유전체 마커의 확립	10	100	- 다산육종의 교배체계를 중심으로 세대 추적 조사를 한 결과 산자수 증대 유전체의 재현성을 확인하여 산자수 증대 유전자의 연관성을 확립하였음.

			-산자수 진단용 유전자 키트 개발
5차년도 산자수-항병성 증대 조기선발기술의 확립	10	100	- 융합유전체 마커와 병합 육종 프로그램을 활용한 육종가에 의한 계획교배로 생산한 돼지에서 산자수 증대 유전자의 우성형질을 확인하였으며 산자수 증대 뿐만 아니라 젓꼭지 개수가 증가하여 포유력 향상 또한 기대할 수 있음.
5차년도 산자수·항병성 증대 경제선발지수, 유전능력 평가 모형의 확립 및 추정 육종가의 산출과 정확도 비교	5	100	- 융합 유전체 마커와 1,888 두에 대한 porcine SNP 60k 정보를 통해 조사한 전체 SNP 마커를 육종가 산출에 적용한 GEBV를 추정하고 ssBLUP을 실행하여 혈통 내 모든 개체들의 육종가와 SNP 정보가 있는 개체들의 유전체 육종가를 추정하여 교배  -병합육종 프로그램을 개발하여 저작권을 등록함.
5차년도 산자수·항병성 증대기술의 확립 및 버크셔 육종	10	100	- 융합 유전체 마커를 활용한 병합 육종 프로그램으로 생산한 버크셔 종에 대해서는 현재 5차년도 기준 1.45두 증가 한 것으로 나타났음.
합계	100점	100	최종 연구 목표인 산자수 증대를 1.45두 이루었으며 정량적, 정성적 연구 결과를 초과 달성. 개발후 현재까지 연간 20억원 이상의 산업화 실적

### III. 종합의견

#### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구의 목적은 본 연구 그룹에 의해 한국 최초로 개발된 “육질이 우수한 한국 다산 버크셔 계통”을 활용하여 다른 품종에 비해 육질이 우수하지만 산자수가 적은 버크셔 돼지의 단점을 분자육종 기술을 통해 개선하고 산자수-항병성이 우수한 한국 버크셔 품종을 개발하는 것임.

산자수 연관 유전체, 전사체, 단백질체, 후성 유전체를 발굴하고 네트워크 분석을 통하여 통합

유전체 마커를 정립하고 재현성 검증을 통해 산자수 연관 통합 유전체 마커를 확립하였음. 이들 마커를 이용하여 경제 선발 지수에 대한 검정 및 보완하여 병합 육종 프로그램을 개발하고 추정 육종가의 비교 분석을 통해 자돈을 생산하였음.

연구 개시 전과 비교시 두당 산자수가 1.45두 증가 하는 결과를 얻었음. 연구 성과 항목별 초과달성을 이루었으며 정성적으로도 세계최초로 버크셔 돼지의 산자수 연관 통합 유전체 마커를 개발하는 성과를 얻음.

해당 연구 결과를 기술이전 및 정책 건의, 정책 활용을 통하여 개발된 기술의 기술 확산에 노력하였으며 양돈장의 컨설팅 등의 기술 지도를 통하여 해당 연구 기술 보급에 힘써 양돈장 및 종돈장의 경제적 생산성 향상을 이끌었음.

산자수 연관 통합 유전체 마커를 발굴하고 병합 육종 프로그램의 개발하여 실제 활용할 수 있는 연구 성과를 확보하여 기반을 구축한 국내 최초의 모범적인 현장적용 연구 결과임.

본 연구 결과를 활용하여 종돈장, 양돈장의 종돈을 대상으로 유전자 검사를 실시하여 계획 교배에 활용한다면 돈육 생산의 부가가치를 높이고 해당 품종의 브랜드 가치를 올릴 수 있으며 생산비 절감을 통한 수익성 향상 또한 기대됨.

해당 병합 육종 프로그램으로 계획 교배된 자돈의 경우 해당 산자수 연관 통합 유전체 마커의 유전적 고정을 확인하였으며 산자수가 증대 되는 결과 이외에 젓꼭지 개수가 15-16개로 평균보다 2-3개 증가하여 포유 능력 또한 향상되는 결과를 얻었음.

본 연구 결과는 기초 연구 개발의 현장 적용 및 산업화의 우수 사례로 볼 수 있음.

## 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

## 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

경남과학기술대학교에서 개발한 다산성 돼지 진단용 유전자 키트의 보급 및 수출을 계획중에 있으며 기술이전을 통하여 유전자 진단용 벤처 기업 창업 및 고용창출 기대, 산자수 개량용 병합 육종 프로그램 기술의 보급 및 수출 계획, 산자수 증가된 다산버크셔 품종에 대해서 품종 등록을 준비중에 있으며 질병 free 국가 선정 시 수출이 가능 함.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	수출 전략형 흑돼지의 산자수 증대 기술 개발			
주관연구기관	경남과학기술대학교		주관연구책임자	김 철 욱
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,000,000천원	335,000천원		1,335,000천원
연구개발기간	2013. 08. 26 ~ 2018. 08. 25 (60개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(             ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:             )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1차년도: 산자수 증대 선 발기술개발의 기반 구축	1-1. 산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현 유전자(DEG) 정보 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- G0종돈의 태반으로부터 확보된 mRNA의 pooling</li> <li>- mRNA의 전처리 및 RNA-seq</li> <li>- 확보된 후보유전자의 다양한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 대한 각종 변이(SNV, Indel)의 탐색</li> <li>- 산자수 증대 후보유전체마커 확보</li> <li>- 산자수 우열집단 간의 DEG 정보 확보</li> </ul> 1-2. 산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- G0종돈의 태반조직에서 확보된 gDNA의 pooling</li> <li>- Bisulfite 처리 및 nucleotide seq</li> <li>- 게놈 수준에서 DNA 메틸화 분석</li> <li>- 확보된 후보유전자의 다양한 유전체 부위(promoter, UTR, intron, exon)에 따른 DNA메틸화 부위의 프로파일링</li> <li>- 후보후성유전체마커 확보</li> </ul> 1-3 산업용 병합 육종프로그램 개발기준에 수행된 연구자료의 데이터베이스 구축

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 한국 버크셔 모돈집단(600두 규모)에서 산자수 조사 및 혈통정보 확보</li> <li>- 혈통정보에 따른 산자수 DB 구축</li> <li>- 구축된 DB를 바탕으로 산자수 우열집단 조성</li> <li>1-4 산자수 증대 산업용 육종프로그램 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기초돈군조성(G0): 상하 각 200두 돈군 조성</li> </ul> </li> <li>1-5 산자수 증대 통합 육종 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 통합 DB 구축: 기수행된 연구자료 + 검정자료</li> <li>- 조사된 raw data를 활용한 실용적 DB 구축</li> </ul> </li> <li>1-6 유전능력평가 프로그램 개발</li> <li>1-7 육종프로그램 정확도 분석</li> </ul>
<p>2차년도: 산자수 증대 조기선발기술 및 병합육종 프로그램 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2-1. 산자수 증대 후보유전체마커 확보와 차등발현유전자 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- RNA-seq을 통하여 산자수에 따른 차등 발현 유전자 789개 DEG를 확보</li> </ul> </li> <li>2-2. 산자수 증대 후보후성유전체 마커 탐색 및 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수에 따른 DMR분석을 통하여 hypermethylation DMR을 2,230개, hypomethylation DMR 2,160개 확보</li> <li>- DMR이 존재하는 유전자를 탐색해 본 결과 130여개의 후보 유전자를 동정</li> <li>- methylation과 expression의 연관성을 분석하여 산자수 연관 통합 유전체 마커를 선발</li> <li>- DMR에 의해 발현량이 조절되는 총 78개 유전자를 확보</li> </ul> </li> <li>2-3. 산자수 증대 후보 단백질체 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 태반 조직으로부터 차등 발현하는 단백질을 LC-MS/MS 분석을 통하여 확보</li> <li>- PSA와 RBP4를 포함한 19개 차등 발현 단백체를 확보</li> </ul> </li> <li>2-4. 산자수 관련 유전자의 SNP탐색 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 관련 유전자의 SNP를 탐색하여 10개 SNP 확보</li> <li>- 단백질체에 대한 SNP는 17개 확보</li> <li>- 전사체에 대한 SNP는 8개 확보</li> </ul> </li> <li>2-5 G1 후보모돈선발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1차년도에 개발된 경제선발지수로 후보모돈 선발</li> </ul> </li> <li>2-6 산자수 증대 연관 유전자군에 대한 조절네트워크분석 <p>경남과학기술대학교 융합 유전체 팀에서 제공한 유전체로 연관 불평형 패턴 분석 및 유효집단 크기의 추정을 통한 집단 모수 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 집단모수의 추정 및 유전체단위의 병합시뮬레이션 구축</li> <li>- 인접 SNPs간 평균 <math>r^2</math>값은 0.28, 유효집단크기는 1~5세대에 31두로 추정됨</li> </ul> </li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 총산자수와 실산자수에 대한 유전력은 각각 0.074와 0.071로 추정, 이유두수와 포유기간과 발정재귀일령에 대한 유전력은 0.01~0.04로 낮게 추정됨.</li> <li>2-7 경제선발지수의 검정 및 보완</li> <li>- 경제 선발 지수의 검정 및 보완</li> <li>2-8 산자수 증대 병합육종프로그램개발</li> <li>- 경남과학기술대 융합유전체팀에서 제공한 융합유전체를 이용하여 개체별 융합 유전체 추정육종가의 산출</li> <li>- 융합유전체 추정 육종가의 정확도 분석</li> <li>- 추정육종가와 비교를 통한 정확도 분석</li> <li>2-9 품종 육종 및 정액검사</li> <li>- 총산자수에 대한 이유두수, 포유기간 및 발정재귀일령의 표현형 상관계수는 거의 0에 가까우며, 유전상관의 경우 발정재귀일령은 부(-)로 나타남</li> <li>- 총산자수에 대한 출생년도별 유전적 개량량의 추세는 유의적인 수준(<math>p &lt; 0.05</math>) 에서 나타나지 않았음</li> </ul>
<p>3차년도: 산자수 증대 선발 기술 및 병합육종프로그램 재현성 검정</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>3-1. 산자수 증대 차등발현 유전자 재현성 검정</li> <li>- 태반 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 10개 중 2개에 대하여 RT-qPCR로 발현 검정</li> <li>- 자궁 조직의 DMR/DEG correlation 유전자 8개 중 5개 검정</li> <li>3-2. 산자수 증대 통합유전체마커 재현성 검정</li> <li>- 9개의 deletion mutant SNP에 대하여 PCR-RFLP수행 및 1개 SNP에 대해서 통계적 유의성 확인</li> <li>- 8개 산자수 연관 유전자의 SNP에 대해서 PCR-RFLP수행 4개 SNP에 대해서 유의성 확인</li> <li>3-3. 산자수 증대 후성유전체마커 재현성 검정</li> <li>- 산자수 증대 후성 유전체 마커에 대하여 Bisulfite-PCR sequencing으로 재현성을 검정 하고 MSRE-PCR방법으로 진단 마커로서의 메틸화를 분석함</li> <li>3-4. SNVs의 생화학적 기능 분석</li> <li>- 산자수 연관 유전자의 deletion mutant SNP를 우선 선발 하여 molecular dynamics simulation 방법을 이용하여 분자 구조 및 binding partner와의 상호작용의 차이를 규명</li> </ul>

	<p>3-5. 산업용 병합 육종프로그램 검증 및 산업화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량시스템을 구축하는데 있어서 pocine 60k &amp; 70k chip 자료를 1,922두 생성하였으며, 이를 기반으로 친자감별 및 부모 찾기 프로그램으로 혈통파일의 안정을 꾀한 후 ssBLUP 방법을 이용하여 유전체 육종가 및 Maker effect를 추정하여 기록이 없는 후보돈 60두에 대한 선발이 이루어졌음, 향후 추가적인 연구로 정확도이 증가하고 선발기술이 보완된다면 개량의 효율성을 상당히 높일 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 이를 위한 기반 구축은 원활히 진행되고 있는 것으로 평가됨</li> </ul>
<p>4차년도: 산자수-항병성 증대 선발기술 및 병합육종프로그램 정립</p>	<p>4-1. 산자수 증대 후성유전체 마커 재현성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자궁 조직 유래 산자수 연관 DMR 13개 유전자 선발</li> <li>- MSRE-PCR로 4개의 유전자에 대한 재현성 검증</li> </ul> <p>4-2. 산자수 증대 유전체 마커 재현성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산자수 연관 유전자 5개에 대한 PCR-RFLP를 통해 재현성 검증</li> <li>- 산자수 형질과 유전자형간의 상관관계를 확인함으로써 산자수 증대를 위한 유전체 마커 5개를 확립</li> </ul> <p>4-3. 항병성 증대 전사체 마커 재현성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 자궁 조직 유래 항병성 연관 DEG 28개 유전자 선발</li> <li>- RT-PCR로 5개 유전자에 대한 재현성 검증</li> </ul> <p>4-4. SNVs의 생화학적 기능 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Molecular docking simulation 을 통한 in silico분석으로 산자수 연관 SNVs의 결합모델링</li> </ul> <p>4-5 병합 육종프로그램 정립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-버크셔의 유전체정보를 이용하여 산자수를 개량하고 이를 위한 개량시스템을 구축하는데 있어서 pocine 60k bead chip 자료를 1,888두를 생성하였으며, Final report에서 Plink form으로 변환하고 평가자료 형태로 출력하고 총산자수 등 표현형 및 유전체 자료 병합 입출력 폼을 완성하였고 유전체자료의 QC 기준, 친자감별 및 부모찾기 프로그램을 이용하여 혈통파일의 안정을 꾀한 후 ssBLUP방법을 이용하여 유전체육종가 및 Maker effect를 추정하여 기록이 없는 후보돈에 대한 선발이 이루어졌음, 향후 유전체정보를 이용한 교배프로그램을 보완한다면 개량의 효</li> </ul>



	<p>올성을 상당히 높일 수 있을 것으로 판단되며, 본 연구를 통하여 이를 위한 기반 구축은 원활히 진행되고 있는 것으로 평가됨</p>
<p>5차년도: 산자수-항병성 증대 선발술의 확립 및 버크셔 육종</p>	<p>5-1. 융합유전체마커에 의한 G4 종돈 조기선발, 경제선발지수에 의한 G4후보모돈 재선발 및 계획교배</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 융합유전체 마커와 병합 육종 프로그램을 활용한 육종가에 의한 계획교배로 생산한 돼지에서 산자수 증대 유전자의 우성형질을 확인하였으며 산자수 증대 뿐만아니라 젓꼭지 개수가 증가하여 포유력 향상 또한 기대할 수 있음.</li> </ul> <p>5-2. 산자수·항병성 증대 유전체, 후성유전체, 융합 유전체의 검정기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다산육종의 교배체계를 중심으로 세대 추적 조사를 한 결과 산자수 증대 유전체의 재현성을 확인하여 산자수 증대 유전자의 연관성을 확립하였음.</li> </ul> <p>5-3. 산자수·항병성 증대 경제선발지수, 유전능력 평가 모형의 확립 및 추정 육종가의 산출과 정확도 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 융합 유전체 마커와 1,888 두에 대한 porcine SNP 60k 정보를 통해 조사한 전체 SNP 마커를 육종가 산출에 적용한 GEBV를 추정하고 ssBLUP을 실행하여 혈통 내 모든 개체들의 육종가와 SNP 정보가 있는 개체들의 유전체 육종가를 추정하여 교배</li> <li>- 병합육종 프로그램을 개발하여 저작권을 등록함.</li> </ul> <p>5-4. 산자수·항병성 증대기술의 확립 및 버크셔 육종</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 융합 유전체 마커를 활용한 병합 육종 프로그램으로 생산한 버크셔 종에 대해서는 현재 5차년도 기준 0.7두 증가 한 것으로 나타났음.</li> </ul>

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	5	2		3	0	1					16	5		10	50	9	3	50		
연구기간내 달성실적	12	10		4	0.3 5	1					19	5		33	64	9	7	64		
달성율(%)	24 0	50 0		13 3		10 0					11 8.8	10 0		33 0	12 8	10 0	23 3.3	12 8		

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	유전자의 발현프로필을 이용한 돼지의 산자수 예측방법
②	DMR을 이용한 돼지의 산자수 예측용 조성물 및 예측방법
③	유전자의 발현량 및 메틸화 프로필을 활용한 돼지의 산자수 예측방법
④	돼지의 육질 예측용 SNP 마커 및 이의 용도
⑤	돼지의 산자수 예측용 DACT3 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법
⑥	돼지의 산자수 예측용 NAT9 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법
⑦	차등 발현 유전자를 이용한 돼지의 산자수 예측용 조성물 및 예측방법
⑧	돼지의 산자수 예측용 IGFBP 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법
⑨	돼지의 산자수 예측용 MAP3K3 유전자의 SNP 마커 및 이를 이용한 돼지 다산 개체 선발 방법
⑩	돼지의 품종별 정량적 역전사 증합요소 연쇄반응 분석용 조성물 및 이를 이용한 목표 유전자의 발현정량 방법

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v						v	v	v	
②의 기술	v						v	v	v	
③의 기술	v						v	v	v	
④의 기술	v						v	v	v	
⑤의 기술	v						v	v	v	
⑥의 기술	v						v	v	v	
⑦의 기술	v						v	v	v	
⑧의 기술	v						v	v	v	
⑨의 기술	v						v	v	v	
⑩의 기술	v						v	v	v	

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	차등 발현 후보유전자를 통하여 돼지 전사체의 분석으로 다산성 개체의 조기 선발 가능
②의 기술	차등 메틸화 영역을 활용하여 돼지 후성 유전체 분석을 통하여 다산성 개체의 조기 선발 및 산자수 예측 기법으로 활용
③의 기술	차등 전사체 및 차등 후성 유전체의 상호관계 분석에 따라 발굴된 통합 유전체 마커를 활용하여 다산성 개체의 조기 선발 및 산자수 예측 기법에 활용
④의 기술	돼지 경제 형질에 연관한 유전체의 돌연변이를 활용하여 종돈의 조기 진단과 계획 교배에 활용
⑤의 기술	다산성 개체에서 나타나는 유전자 마커를 활용하여 유전자 검사를 통한 선발 기법에 활용하고 종돈의 다산성 개체 판별에 이용
⑥의 기술	다산성 개체에서 나타나는 유전자 마커를 활용하여 유전자 검사를 통한 선발 기법에 활용하고 종돈의 다산성 개체 판별에 이용
⑦의 기술	차등 발현 후보유전자를 통하여 돼지 전사체의 분석으로 다산성 개체의 조기 선발 가능
⑧의 기술	다산성 개체에서 나타나는 유전자 마커를 활용하여 유전자 검사를 통한 선발 기법에 활용하고 종돈의 다산성 개체 판별에 이용
⑨의 기술	다산성 개체에서 나타나는 유전자 마커를 활용하여 유전자 검사를 통한 선발 기법에 활용하고 종돈의 다산성 개체 판별에 이용
⑩의 기술	돼지 전사체 마커를 활용하기 위한 목표 유전자의 발현 정량을 위한 분석기법에 활용

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
연구기간내 달성실적	12	10		4	0.35	1					19	5		33	64	16	58	64	
연구종료후 성과창출 계획		2									4								

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전시 선행조건 <sup>4)</sup>			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)