

제 1 차 년 도  
연 차 보 고 서

DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성 (PSS) 돼지 검색  
기술 개발

Development of detection techniques for PSS pig by  
DNA marker

서울대학교 농업생명과학대학

농 립 수 산 부



# 제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성 (PSS) 돼지 검색기술 개발” 과제의 연차 보고서로 제출합니다.

1995년 12월 15일

주관연구기관명 : 서울대학교 농업생명과학  
대학

총괄연구책임자 : 박 영 일

연 구 원 : 한 재 용

연 구 원 : 이 학 교

연 구 원 : 배 규 한

협동연구기관명 : 서울대 농업생명과학대학

협동연구책임자 : 한 재 용

협동연구기관명 : 축산기술연구소 종축개량부

협동연구책임자 : 이 학 교

협동연구기관명 : 덴브레드 코리아

협동연구책임자 : 배 규 한

# 요 약 문

## I. 제 목

DNA 표지인자에 의한 스트레스 감수성 (PSS) 돼지 검색 기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

돼지는 품종 또는 개체에 따라 스트레스에 영향을 받는 스트레스 감수성에 차이가 있으며 특히 스트레스에 민감한 돼지를 스트레스 증후군 (porcine stress syndrome, PSS)돼지라고 한다. 스트레스 감수성 돼지는 암돼지의 경우 산자수가 정상 개체보다 떨어지고(10-20% 감소) 비육돈의 경우 발육이 저하되며 약간의 스트레스(온도 및 밀사 등)요인이 제공될 경우 폐사하게 된다. 즉 이러한 PSS는 주로 열성유전인자에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있는데 이러한 유전인자를 보유한 개체중 12%이상이 육성중 폐사를 일으키며 생존한 개체중 50%이상이 PSE(Pale, Soft and Exudative) 돈육을 생산하게 되며 육질 저하로 인한 가공성 및 식육상의 결함등으로 국내에서 막대한 경제적 손실이 추정되고 있어, 이들 불량 유전형질을 집단내에서 제거시켜야 할 당위성이 존재하고 있다.

한편 이들 PSS 유전인자가 육량증진과 연관이 되어있다고 보고되었으며, 실제로 유럽에서는 이들 유전자가 고정된 부계와 이 유전자가 전혀 없는 모계통을 교배시켜 실용돈에서는 잠재성 유전자를 가지는 개체를 생산해서 이 유전자의 유리한 작용을 육종계획에 이용하고 있다. 따라서 국내 양돈산업의 UR에 대응한 경쟁력 제고 차원에서 양돈산업의 오랜 숙원인 불량 유전형질의 제거를 위한 신속 정확한 유전자 검색 기법을 개발함과

동시에 이 유전자와 연관된 유리한 경제형질을 이용할 수 있는 방향으로 하루 빨리 연구가 이루어져야 하겠다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 시험 축군의 확보

시험용 축군으로 경북에 Y 종돈장과 경기도의 D 종돈장 등 상업용 종돈회사와 축산기술 연구소에서 보유하고 있는 랜드레이스, 요크셔, 듀록, 피에트레인, 삼원교잡종(YLD)의 혈액이나 정액 또는 조직을 확보하였다.

#### 2. 탐색 키트 개발(primer 개발)

GenBank에 제시된 염기 서열을 바탕으로 PSS 인자 탐색을 할 수 있는 primer를 제작하여 분석에 이용하였다.

#### 3. Genomic DNA 추출

가. 혈액으로부터의 DNA 분리

나. 정액으로부터 DNA 분리

다. 조직으로부터 DNA 분리

#### 4. PCR 조건 확립

##### (1) Primer 양과 DNA 양의 변화에 의한 PCR 양상

DNA 양을 100 ng, 200 ng, 400ng으로 하고 각 DNA 양에 따라 primer의 양을 10 pmole, 12.5 pmole, 20 pmole로 변화를 주어 PCR 증폭을 실시하였다.

##### (2) PCR 증폭 회수와 Taq DNA 중합효소에 변화에 의한 PCR 조건 확립

##### (3) 최적 PCR 증폭회수와 Taq DNA 중합효소 양 결정

#### 5. 제한 효소 처리 및 전기 영동 조건 확립

가. 제한효소 처리 조건 확립

나. 전기영동 조건 확립

다. 시험 축군의 유전자형 판별

## IV. 연구개발 결과 및 활용성

### 1. 시험 축군의 확보

시험용 축군으로 경북에 Y 종돈장과 경기도의 D 종돈장 등 상업용 종돈회사와 축산기술 연구소에서 보유하고 있는 랜드레이스, 요크셔, 듀록, 피에트레인, 삼원교잡종(YLD)의 혈액이나 정액 또는 조직을 확보하였다.

### 2. 탐색키트 개발(primer 개발)

GenBank에 제시된 염기 서열을 바탕으로 PSS 인자 탐색을 할 수 있는 primer를 제작하여 분석에 이용하였다.

### 3. Genomic DNA 추출

돼지의 혈액, 정액 그리고 조직으로부터 DNA를 추출하였다.

### 4. PCR 조건 확립

탐색키트를 작성하여 PCR의 정확도, 분석의 편이성, 키트제작시 용이성 등을 고려하여 선발하였고 Primer양은 10pmole, DNA의 양은 100-200ng에서 최적의 조건을 확립하였다.

### 5. 제한효소 처리조건 및 전기영동 조건확립

#### 가. 제한효소 처리 조건 확립

본 연구팀이 증폭한 부위내에는 Hha I이라는 제한효소 인지 부위가 존재하는데, PSS 감수성 개체는 제한 효소에 의해 잘리지 않으며 저항성 개체는 잘리어 두 개로 분리된다. 헤테로인 개체는 세 개로 분리된다(그림1).

#### 나. 전기영동 조건 확립

최적의 분리조건을 결정하기 위하여 아가로즈 젤과 폴리아크릴 아마이드 젤 전기영동을 이용하였다.

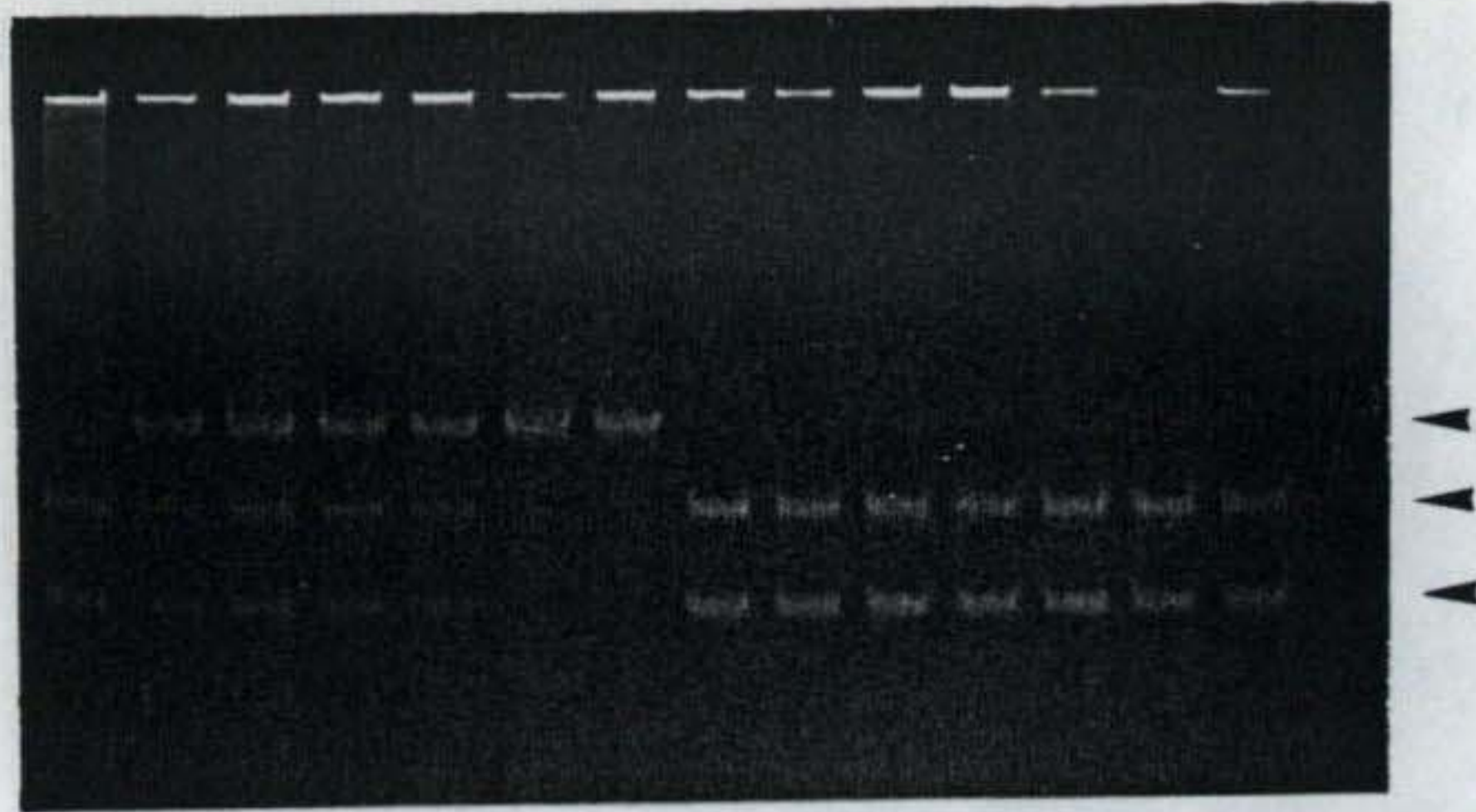


그림 1. PSS 유전자형 판별

## 6. 시험축군의 유전자형 판별

총 88 개체에 대한 PSS 인자 검색을 실시하여 실제적으로 개발된 탐색 키트의 이용성을 검증하였다. 피에트레인에서 높은 빈도의 PSS인자가 출현하였으며, 이는 기존의 보고와 일치하였다.

## 7. 연구개발 결과의 활용성

가. 양돈 능력 검정소에서 검정하는 종축에 대해 일차적으로 PSS 인자 보유 여부를 검색하여 열성 호모를 가진 PSS돼지가 농가에 보급되는 경로를 차단한다.

나. 국내 종돈장과 연계하여 PSS 인자 보유 종돈을 검색하고 육종 프로그램에 이용하여 농가에 PSS 인자 보유 돼지가 더 이상 보급되지 않도록 체계화한다.

다. 개발 후에는 국내 축산 관련 연구 기관과 연계하여 본 기술의 간편화 및 실용화를 확립한다.

## SUMMARY

To increase the productivity of swine and the income of swine farmers in Korea, it is important to remove the PSS (Porcine Stress Syndrome) gene from Korea Pig Population.

Therefore, this research was conducted to develop the screening methods for PSS and the breeding system which will adopt the PSS screening method

Experimental animals were secured from the pig farms located in Kyung-Buk Province and Institute of Animal Technology. Genomic DNA was extracted from blood, semen and tissues of pig. The primers used for PSS screening were synthesized using DNA sequence deposited in GenBank. One of them was optimal to screen the PSS gene and used for the population screening. The optimal condition for restriction digestion and electrophoresis was established. The optimal condition of primer for amplification are as follows ; The optimum amount of primer was 10pmole and genomic DNA for PCR amplification was from 100ng to 200ng. The gel electrophoresis in Nusieve agarose gel or 15% polyacrylamide gel were suitable for the genotyping of PSS. Based on the above screening condition, the genotype of 88 individuals were determined. The frequency of recessive homozygote was higher in Pietrain than in other breeds. This result agrees with the previous reports. In commercial herds, the animals carrying the recessive allele of PSS may indicate the possibility that the sire might have the PSS gene.



The results of this study can be utilized for the removal of the recessive homozygote for PSS gene or the carrier of the gene in the purebred herds and in the test station. After the development of the detection technique can be transferred to purebred breeding farms, breeding companies and research institutes for the practical application of the research results.

# CONTENTS

## I . Introduction

1. Objectives and scope of research -----	12
2. Goals of research -----	14
(1) Final goals of research -----	14
(2) Goals of reseach for this year -----	15

## II. Materials and Methods

1. Sample preparation -----	16
2. Development of screening kit -----	16
3. DNA extraction and amplification of gene -----	16
4. Determination of optimal condition for restriction digestion and electrophoresis -----	19
5. Genotyping of experimental animals -----	19

## III. Intermediate Results of Research

1. Experimental animal -----	20
2. Developmemt of screening kit -----	20
3. Genomic DNA extraction -----	21
4. Optimal condition for PCR -----	23
5. Optimal condition for restriction digestion and electrophoresis -----	25
6. Genotyping of experimental animals -----	28

#### **IV. Expected Accomplishment and its application**

1. Expected accomplishment ----- 31
2. Application of the expected accomplishment ----- 32

# 목 차

## 제 1장 서 론

제 1절 연구개발의 목적과 범위 -----	12
제 2절 연구개발사업 목표 -----	14
1. 최종연구 사업개발 목표 -----	14
2. 당해연도 연구개발 사업목표 -----	15

## 제 2 장 실험 내용 및 방법

1. 시험축 선정, 구입 및 시료 채취 -----	16
2. 탐색키트 개발 -----	16
3. DNA 추출 및 유전자 증폭 -----	16
4. 제한효소 처리 및 최적 전기영동 조건 설정 -----	19
5. 시험축의 유전자형 판별 -----	19

## 제 3 장 연구개발 중간 결과

1. 시험축군의 확보 -----	20
2. 탐색키트 개발 -----	20
3. Genomic DNA 추출 -----	21
4. PCR 조건 확립 -----	23
5. 제한효소 처리 및 전기영동 조건 확립 -----	25
6. 시험축군의 유전자형 판별 -----	28

**제 4 장 기대되는 성과 및 활용성**

제 1 절 기대되는 성과 -----	31
제 2 절 연구개발 성과에 대한 활용(실용성)방안 ---	32

# 제 1 장 서 론

## 제 1절 연구개발의 목적과 범위

돼지는 품종간뿐만 아니라, 품종내에서도 개체에 따라 스트레스에 영향을 받는 스트레스 감수성에 차이가 있으며 특히 스트레스에 민감한 돼지를 스트레스 증후군(porcine stress syndrome, PSS)돼지라고 한다. 스트레스 감수성 돼지는 암태지의 경우 산자수가 정상 개체보다 떨어지고 (10-20% 감소) 비육돈의 경우 발육이 저하되며 약간의 스트레스(온도 및 밀사 등)요인이 제공될 경우 폐사하게 된다. 즉 이러한 PSS는 주로 열성 유전인자에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있는데 이러한 유전인자를 보유한 개체중 12%이상이 육성중 폐사를 일으키며 생존한 개체중 50%이상이 PSE(Pale, Soft and Exudative) 돈육을 생산하게 되며 육질 저하로 인한 가공성 및 식육상의 결함등으로 국내에서 막대한 경제적 손실이 추정되고 있어, 이들 불량 유전형질을 집단내에서 제거시켜야 할 당위성이 존재하고 있다.

특히 우리나라의 경우 1980년 PSE돈육 발생 조사보고서에서 27.3%가 PSE돈육이라고 보고되었고 1988년 축산시험장보고서에서도 20%가 PSE 돈육으로 판명되었으며 이러한 PSE돈육 발생으로 인한 대일 수출 돈육의 반송비율이 상당히 높은 것으로 알려져 있다.

외국의 경우 전체 집단중 약 18%이상(미국 15.5%, 캐나다 18.8%, 영국 29.4%)의 개체들이 잠재성 유전자를 가지고 있기 때문에 이들의 정확한 유전자형을 검색하는 것은 고급육생산을 통한 수출형 종돈산업 구상이라는 국가적 축산시책에 중요한 기여를 할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 PSS 유전 인자가 미치는 이러한 국내외적 심각성에 비해 이들 유전 인자 (PSS)를 가진 돼지의 제거노력 및 연구는 상당히 미흡하여 그 결과를 찾기 어렵다. 현재 PSS 인자 검색 방법으로는 할로탄 가스로 마취하여 근육

의 강직 여부로써 판정하고 있으나 여러 마리의 종돈 각각을 대상으로 할로탄 가스를 주입해야하는 기술운용상의 불편성, 잠재성 개체를 파악하지 못하는 부정확성 및 돼지에 미치는 부작용 등으로 인하여 실제 민간 농장(종돈장 포함)에서는 거의 사용되고 있지 않기 때문에 이들 불량 유전자 검색과 이를 응용한 육종계획은 전무한 실정이다. 그러나 외국의 경우 1992년부터 돼지의 혈액으로부터 DNA를 검사하여 정확히 PSS감수성 유전인자 보유여부를 판정하는 기술을 개발하여 불량 유전인자를 제거시켜 스트레스에 의한 돼지 폐사율을 급감시키고 또한 도체후 발생하는 열등육(PSE)생산을 억제하는 등 자국의 양돈산업의 경쟁력을 극대화시키는 획기적인 기술진보가 이루어지고 있다.

한편 이들 PSS 유전인자가 육량증진과 연관이 되어있다고 보고되었으며, 실제로 유럽에서는 이들 유전자가 고정된 부계와 이 유전자가 전혀 없는 모계통을 교배시켜 실용돈에서는 잠재성 유전자를 가지는 개체를 생산해서 이 유전자의 유리한 작용을 육종계획에 이용하고 있다. 따라서 국내 양돈산업의 UR에 대응한 경쟁력 제고 차원에서 양돈산업의 오랜 숙원인 불량 유전형질의 제거를 위한 신속 정확한 유전자 검색 기법을 개발함과 동시에 이 유전자와 연관된 유리한 경제형질을 이용할 수 있는 방향으로 하루 빨리 연구가 이루어져야 하겠다.

94년 여름 무더위에 의한 고온 스트레스에 의해 전국적으로 전체모돈 50만두 중 4천두이상의 모돈이 폐사됨에 따라 엄청난 피해가 속출되었으며 이러한 시점에서 신속 정확한 분자 생물학적 첨단 기법을 이용한 스트레스 감수성 돼지의 조기 검색으로 육종계획을 수립하고 이 기술의 실용화를 확립하여 농가의 소유축군에 대해 이들 PSS 유전자 보유여부를 검사할 수 있는 기술 지원체계를 정착시키는 것이 매우 절박하며, UR 타결 후 양돈산업의 국제경쟁력을 갖추기 위한 방안으로 매우 절실한 육종기술

이라 하겠다.

## 제2절 연구개발사업목표

### 1. 최종연구 사업개발 목표

#### 가. 스트레스 감수성(PSS) 돼지 검색 기술 개발

돼지 개체별 혈액, 정액, 조직으로부터 손쉽게 DNA를 추출하여 DNA에 존재하는 스트레스 감수성 유전자형(저항성, 잠재성, 감수성)을 확인함으로써 100% 정확도를 가질수 있는 기술체계 확립

#### 나. 국내 종돈의 PSS 인자의 검색 및 영향 규명

전통적인 검색방법과 DNA감식기법에 의한 결과 및 정확도를 비교하고 우리나라 종돈장에서 사육중인 종돈의 개체별 스트레스 감수성 유전인자 보유여부를 대규모로 검색하며, 일부 종돈장에서 사육된 감수성이 확인된 돼지와 저항성 돼지를 교배하여 생산된 자손을 검정하여 실제 이들 유전인자의 영향을 규명한다 ( 생존율, 성장율, 도축시 육질, 육량 )

#### 다. PSS인자에 의한 육종 응용기술 개발

실제 농가에서 사육중인 모돈 및 비육돈의 스트레스 감수성 유전인자 보유 여부의 확인과 PSS 유전인자를 가진 개체들이 정육율이 높아 실제 비육돈 생산에 유리한 효과를 보임에 따라 PSS 유전인자를 일부 가지면서 이 유전인자의 나쁜 영향을 극소화시키고, 비육돈의 정육율을 높여 경제성을 향상시키는 교배시험을 통해 PSS 유전인자의 육종 응용기술을 개발한다.



## 2. 당해년도 연구개발 사업 목표

가. 시험축 선정, 구입 및 시료 채취(혈액, 정액, 모근, 조직(꼬리,귀))

나. 탐색키트제작(primer 개발)

다. DNA추출 및 유전자 증폭

- DNA 추출(혈액, 정액, 모근, 조직(꼬리,귀))

- PCR 최적 증폭조건 설정

라. 제한 효소 처리 및 최적 전기 영동조건설정

마. 시험축 유전자형 판별

## 제 2 장 실험내용 및 방법

### 1. 시험축 선정, 구입 및 시료 채취 (혈액, 정액, 조직)

국내 돼지(종돈포함) 사육 농장에서 5품종(랜드레이스, 요오크샤, 듀록, 피에트레인, 교잡종) 각각 10두씩 50마리를 설정하고 이들의 혈통을 동시에 기록했으며, 시료는 4개월 이상의 돼지에서 혈액(10ml), 정액, 조직(꼬리,귀)을 채취했다. 이외에 축산기술 연구소, 서울대 부속 목장에서 보유중인 돈군에서 38마리를 추가로 공시하였다.

### 2. 탐색키트 개발 (primer 개발)

탐색 키트를 제작하기 위해 PSS 인자와 관련있는 칼슘통로 단백질( $Ca^{2+}$  channel)을 만드는 유전자의 1843번째 DNA 염기서열이 돌연변이를 증폭하여 확인하기 위해 적절한 다수의 primer를 제작하였고, 이들 중 한조가 축군의 유전자형 판별에 적합하여 이후 분석에 이용하였다.

### 3. DNA 추출 및 유전자 증폭

#### 가. 혈액으로부터 DNA 추출

- (1) 채취한 혈액을 3,000rpm으로 8분간 원심분리하였다.
- (2) 원심분리후 혈장과 적혈구사이의 백혈구(buffy coat)를 모아 1.5ml 튜브로 옮겼다.
- (3) 모은 백혈구를 다시 14,000rpm으로 3분간 원심분리를 한후 상등액을 제거한다
- (4) 백혈구가 담긴 1.5ml 튜브에 2차 증류수 1ml를 첨가한 후, 즉시 50  $\mu$ l 5 $\times$ SSC를 넣어 잘 섞어준다
- (5) 14,000rpm에서 3분간 원심분리를 한 후 상층액을 제거하였다.

- (6) 1ml 1×SSC를 넣어 잘 섞어준 후 2분간 14,000rpm에서 원심분리를 한다
- (7) 상등액은 제거한 후 500 $\mu$ l TE와 35 $\mu$ l 20% SDS를 잘 섞어준 후 5분간 방치한다
- (8) 12 $\mu$ l의 proteinase K (20mg/ml)를 첨가한 후 65 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 incubation을 한다
- (9) 동량의 페놀을 처리하여 14,000rpm으로 7분간 원심분리한 후 상등액을 조심스럽게 다른 튜브에 옮겨 놓는다
- (10) 상등액에 페놀:클로로포름(1:1)으로 처리하여 추출한 다음 14,000rpm에서 7분간 원심분리를 하고 상등액을 다른 튜브에 옮겼다.
- (11) 페놀:클로로포름 추출을 3차례 반복한다
- (12) 클로로포름을 처리한 후 상등액을 새로운 튜브로 옮긴다.
- (13) 100% 에탄올을 가하여 DNA를 침전시키고 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA를 모았다.
- (14) 에탄올을 제거하고 70% 에탄올로 염을 제거한 다음 건조시켰다. 건조가 끝난 다음 TE (pH 8.0) 또는 증류수에 DNA를 녹이고 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

#### 나. 조직(꼬리, 귀)으로부터 DNA 추출

- (1) 조직(꼬리, 귀)을 0.5g을 생체로부터 취하였다.
- (2) 조직을 가위로 잘게 썰어서 분쇄(homogenization)를 하였다.
- (3) 분쇄된 조직을 1.5ml 튜브로 옮기고 700 $\mu$ l의 용해 용액(50mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM EDTA, 100mM NaCl 1% SDS)에 부유시켰다.

- (4) Proteinase K (20mg/ml)를 35 $\mu$ l 첨가하고 50 $^{\circ}$ C 항온수조에서 12시간 동안 배양하였다.
- (5) 시료에 20 $\mu$ l RNase(13 $\mu$ g/ml)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 배양하였다.
- (6) 배양이 끝난 다음 페놀로 추출하고 원심분리하였다.
- (7) 원심분리한 다음 상층액을 떠서 새로운 튜브로 옮기고 다시 페놀 추출을 실시하였다.
- (8) 과정 6, 7을 6회 반복하였다.
- (9) 남아 있는 phenol을 제거하기 위해 클로로포름을 1회 처리하였다.
- (10) 1 리터의 0.5mM EDTA에서 DNA 용액을 투석하였다. 투석은 2~3 일동안 실시하고 하루에 한번씩 용액을 바꾸었다.
- (11) DNA 용액에 1/10 vol.의 3M sodium acetate(pH5)을 가하여 잘 섞은 다음 0.6 vol.의 isopropanol을 가한 다음 잘 섞는다. 그리고 10분간 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 원심분리 (10,000 rpm/20min)하여 DNA를 침전시킨다. 건조시킨 다음 TE(pH 8.0)에 녹인다.

위와 같은 방법으로 하여 회수된 백혈구, 정액과 조직으로부터 고농도의 genomic DNA를 추출하고 전기영동을 실시하여 DNA의 질을 평가하였다.

#### 다. PCR 증폭 조건

조 건	온도( $^{\circ}$ C)	시간(min)
Denaturation	94	1
Annealing	55	1
Extension	72	2
Cycle number	40 회	

#### 4. 제한효소처리 및 최적 전기 영동조건 설정

돌연변이 부위를 인지할 수 있는 제한 효소인 Hha I 으로 증폭산물을 절단하였고 아가로즈와 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 실시하여 최적의 전기 영동 조건을 설정하였다.

#### 5. 시험축의 유전자형 판별

확립된 조건을 바탕으로 확보한 시험축을 대상으로 PSS 인자 탐색을 실시하였다.

## 제 3 장 연구개발 중간 결과

### 1. 시험 축군의 확보

PSS 인자 검색 키트를 제작하기 위한 시험용 축군으로 경북에 Y 종돈장과 경기도의 D 종돈장 등 상업용 종돈회사와 축산기술 연구소에서 보유하고 있는 란드레이스, 요크셔, 듀록, 피에트레인, 삼원교잡종(YLD)의 혈액이나 정액 또는 조직을 확보하였다. 확보된 시험 축군의 경제형질 능력은 표1과 같다.

표 1. 본 연구에 사용된 축군의 종류와 일반 경제형질 능력

Breed	Country of origin	ADG(g)	FE	BF(cm)
Landrace	Denmark,UK	920	2.50	1.3
Yorkshire	Denmark	970	2.40	1.5
Duroc	Denmark	890	2.25	1.4
Pietrain	Ireland	740	-	1.1
Cross(YLD)	-	840	2.80	1.8

\* ADG : Average daily gain(일당증체량), FE : Feed conversion(사료 요구율), BF : Back fat (등지방 두께)

### 2. 탐색 키트 개발(primer 개발)

GenBank에 제시된 염기 서열을 바탕으로 PSS 인자 탐색을 할 수 있는 primer를 제작하여 분석에 이용하였으며, 한조가 축군의 유전자형 판별에 아주 적합하였다. 따라서 이를 기초로 보다 간편하고 효율적인 primer를 제작중에 있다.

### 3. Genomic DNA 추출

#### 가. 혈액으로부터의 DNA 분리

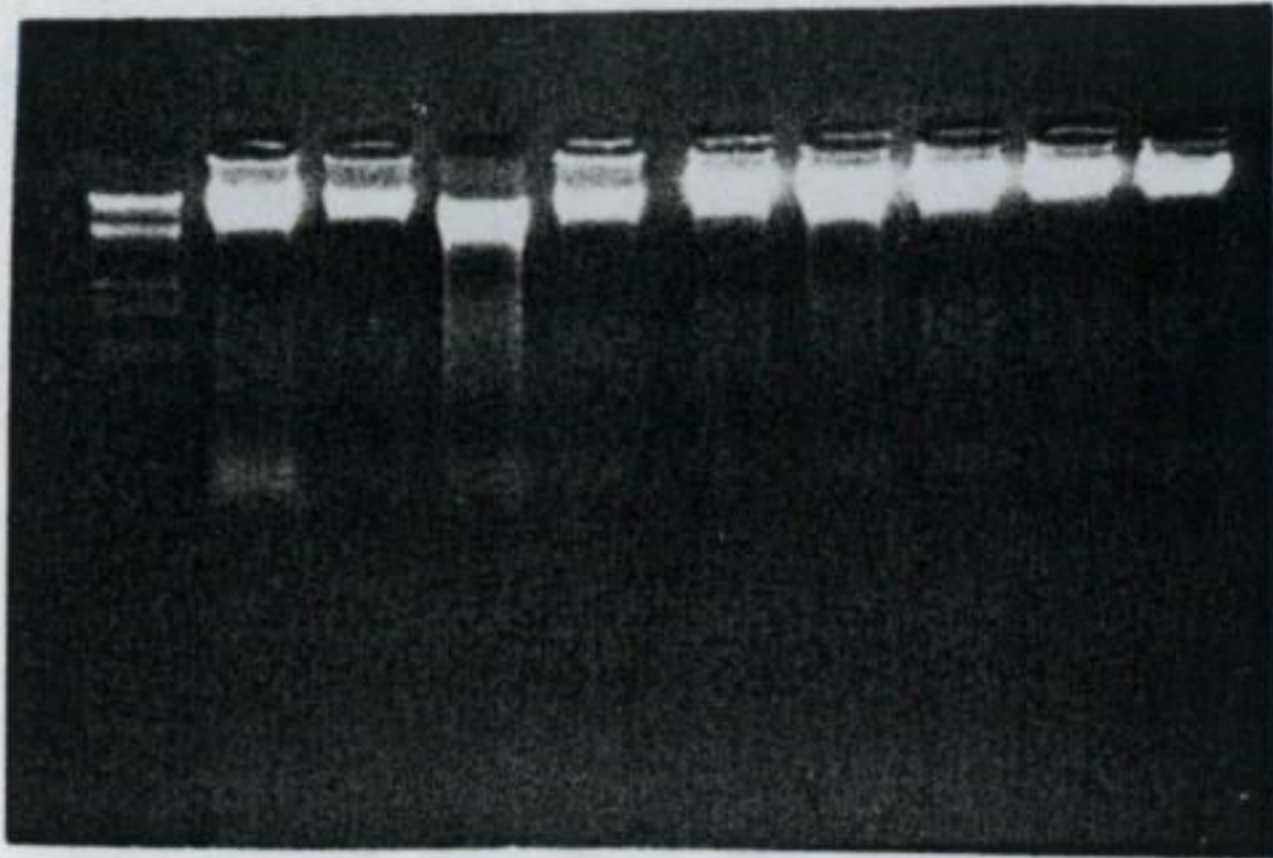


그림 1. 돼지의 혈액으로부터 DNA추출

돼지의 PSS 인자의 검색을 위해 돼지의 귀에 있는 정맥으로부터 혈액을 뽑아서 DNA를 추출하였다. 돼지의 혈액 중 DNA를 가지는 세포는 백혈구 세포이고 적혈구는 PCR 반응을 저해하기 때문에 원심분리를 통해 백혈구만을 분리하였다. Proteinase K를 처리하여 백혈구 세포에 존재하는 단백질을 하였으며, 페놀용매에 의한 추출법을 이용하여 순수한 genomic DNA를 추출하였다(그림1). DNA 양은  $200\text{ng}/\mu\text{l} \sim 300\text{ng}/\mu\text{l}$ 로 PSS 인자 검색에 충분하였다.

#### 나. 정액으로부터 DNA 분리

돼지는 한 마리의 웅돈을 이용하여 15두 내외의 암돼지와 자연 종부시켜 번식하고 있으므로 웅돈이 PSS 인자를 호모 또는 헤테로 상태로 가질 경우, 초래되는 PSS 인자의 전파에 의한 경제적 피해는 크다. 따라서, 종부에 이용될 웅돈의 정액에 PSS 인자가 존재하는 하지 않는지 검색하는 것은 중요하다.

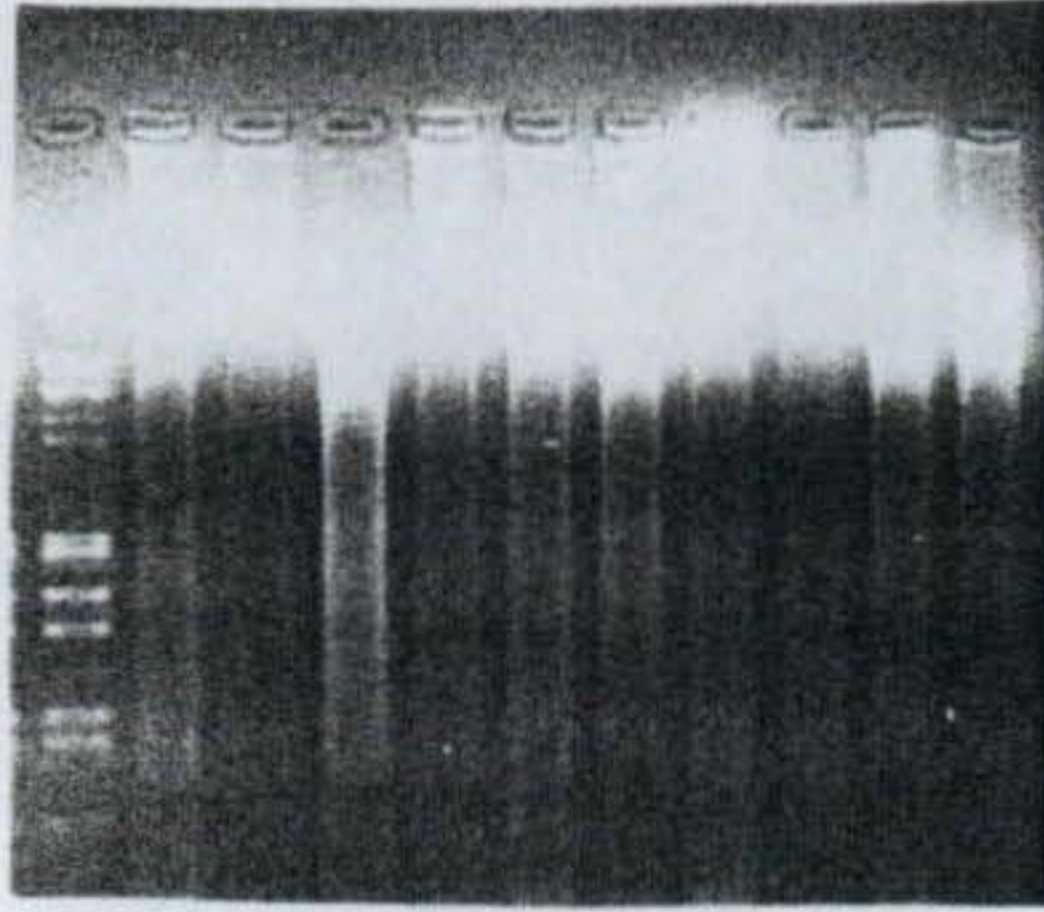


그림 2. 돼지의 정액으로부터 DNA 추출

따라서 본 연구에서는 웅돈의 정액으로부터 PSS 인자를 탐색하기 위한 기초 작업으로 돼지 정액으로부터 DNA를 분리하였다 (그림 2). 정액은 DNA가 농축되어 있는 정자가 많이 있어 DNA를 추출하기가 용이하였다.

#### 다. 조직으로부터 DNA 분리

성장한 돼지의 귀로부터 혈액을 분리하는 방법은 많은 시간과 노력이 필요하고, PSS 인자를 가지는 개체는 채혈하는 동안에 혼절하여 폐사하는 어려움이 있다. 따라서, PSS 인자 탐색키트를 개발하여 산업화하려면 양돈농가에 경제적 손해를 끼치지 않고 탐색하는 것이 중요하기 때문에 혈액 이외에 다른 부위를 이용하여 검색하는 것이 필요하다. 따라서, 본 연구팀은 돼지의 꼬리와 귀를 떼어내어 DNA를 추출하는 방법을 통해 탐색키트 제작에 도입하고자 조직으로부터 DNA를 분리하였다(그림 3).

분리된 DNA는 PCR하기에 충분하며 양도  $200-250\text{ng}/\mu\text{l}$ 로 PSS 인자 검색에 충분하였다. 혈액에서 추출한 DNA와 비교하여 양과 질에서 차이가 없음을 알 수 있다(그림3).



(1)



(2)

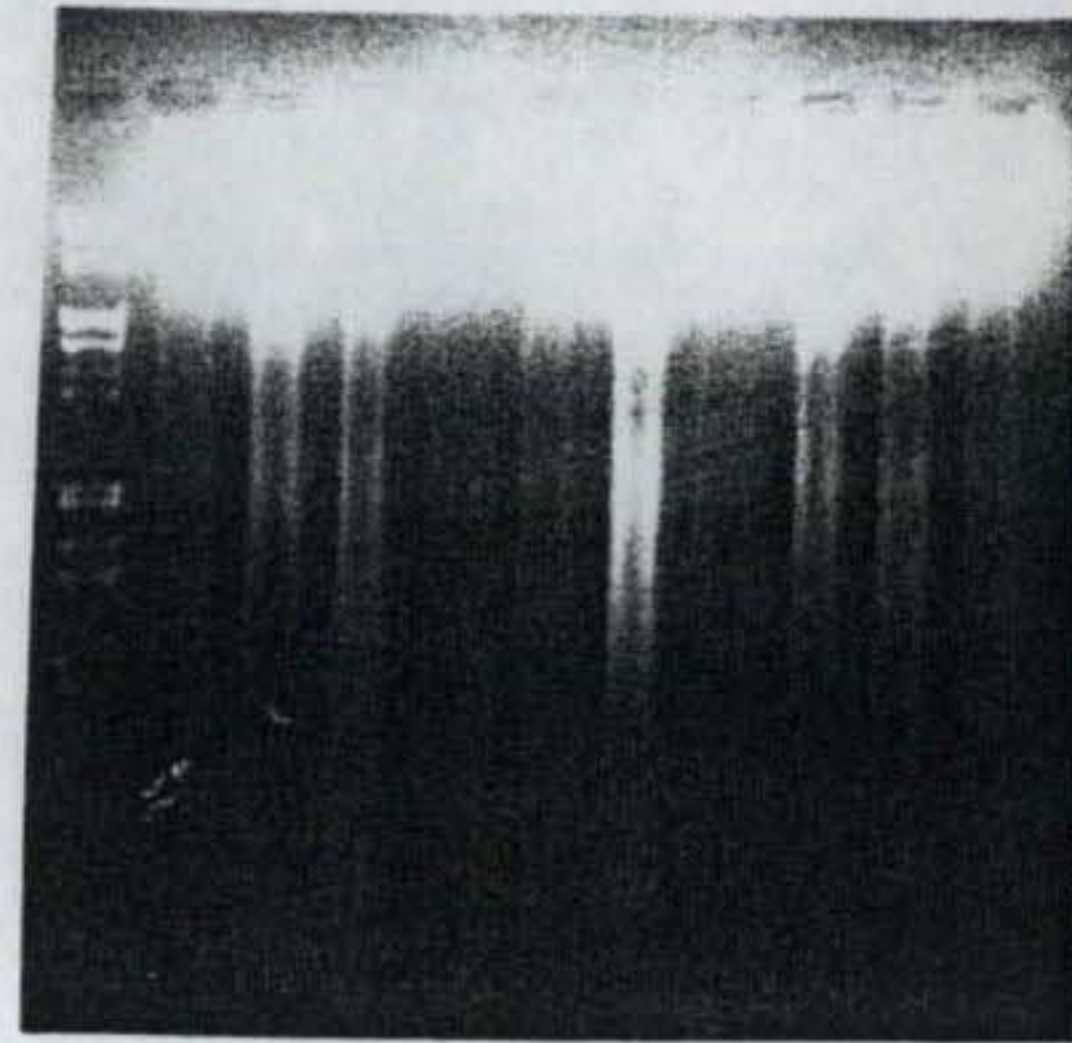


그림 3. 돼지의 꼬리(1)와 귀(2)로부터 genomic DNA 추출

#### 4. PCR 조건 확립

탐색키트는 PCR의 정확도, 분석의 편이성, 키트 제작시 용이성 여부 등을 고려하여 선발하였다. 결과 81개의 염기를 증폭하는 탐색키트를 선발하여 축군의 분석에 이용하였다. 3년차 실험에 이용될 더 많은 수의 키트를 개발하기 위해 PSS 인자의 변이를 보이는 부분의 염기서열을 분석하여 제작 중이다. 선택된 키트 쌍에 대해 primer의 양, DNA의 양, PCR 증폭 회수의 조건에 변이를 두어 최적의 PSS 인자 탐색 조건을 결정하였다.

##### 가. Primer 양과 DNA 양의 변화에 의한 PCR 양상

그림 4 (1)은 DNA 양을 100 ng, 200 ng, 400ng으로 하고 각 DNA 양에 따라 primer의 양을 10 pmole, 12.5 pmole, 20 pmole로 변화를 주어 PCR 증폭을 실시하였다.

그림 4(1)에서 보듯이, primer 양의 경우에는 10 pmole일 때 그리고 DNA양이 200 ng 백그라운드가 가장 적게 나타났다. 따라서, 이후 분석에

서는 DNA 양은 100-200ng, primer양은 10 pmole을 이용하였다.

나. PCR 증폭 회수와 Taq DNA 중합효소에 변화에 의한 PCR 조건  
확립

그림 4 (2)는 DNA양과 primer양을 200ng, 10 pmole로 고정하고 Taq DNA 중합효소의 양을 2.0U, 1.5U, 1.0U 으로 증폭회수를 40, 50으로 했을 때의 PCR 증폭 결과를 보여 준다. Taq DNA 중합효소는 첨가량간에 차이가 없어 사용량을 1.0U으로 하고, 증폭회수도 회수간에 차이가 없으므로 분석의 신속성을 위해 40 회로 결정하였다.

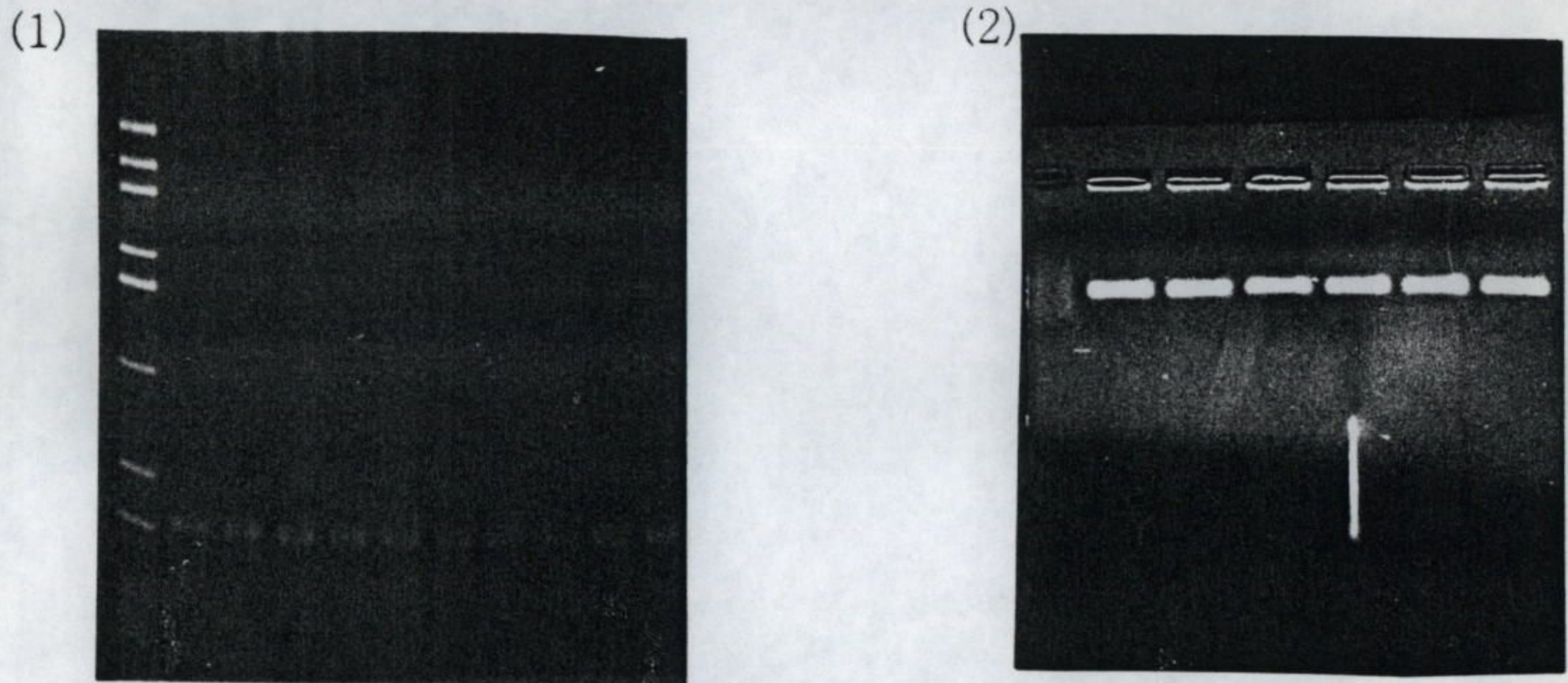


그림 4. PSS 인자 탐색을 위한 PCR 조건 확립

(1) 최적 DNA 양과 primer양 결정(그림 4(1))

	DNA 양(ng)	Primer 양(pmole)
Lane 1	size marker	pUC18/Hae III
Lane 2 - 4	400	20, 12.5, 10
Lane 5 - 7	200	20, 12.5, 10
Lane 8 -10	100	20, 12.5, 10

(2) 최적 PCR 증폭회수와 Taq DNA 중합효소양 결정(그림 4(2))

	증폭회수	Taq DNA 중합효소(U)
Lane 1	size marker	pUC18/HaeIII
Lane 2 - 4	40	2.0, 1.5, 1.0
Lane 5 - 7	50	2.0, 1.5, 1.0

## 5. 제한 효소 처리 및 전기 영동 조건 확립

### 가. 제한효소 처리 조건 확립

증폭된 산물을 분석하기 위해, 산물내에 존재하는 제한 효소 인지 부위의 변이를 이용하였다. 본 연구팀이 증폭한 부위내에는 Hha I이라는 제한 효소 인지 부위가 존재하는데, PSS 감수성 개체는 제한 효소에 의해 잘리지 않으며 저항성 개체는 잘리어 두 개로 분리된다. 헤테로인 개체는 세 개로 분리된다. (그림 6)



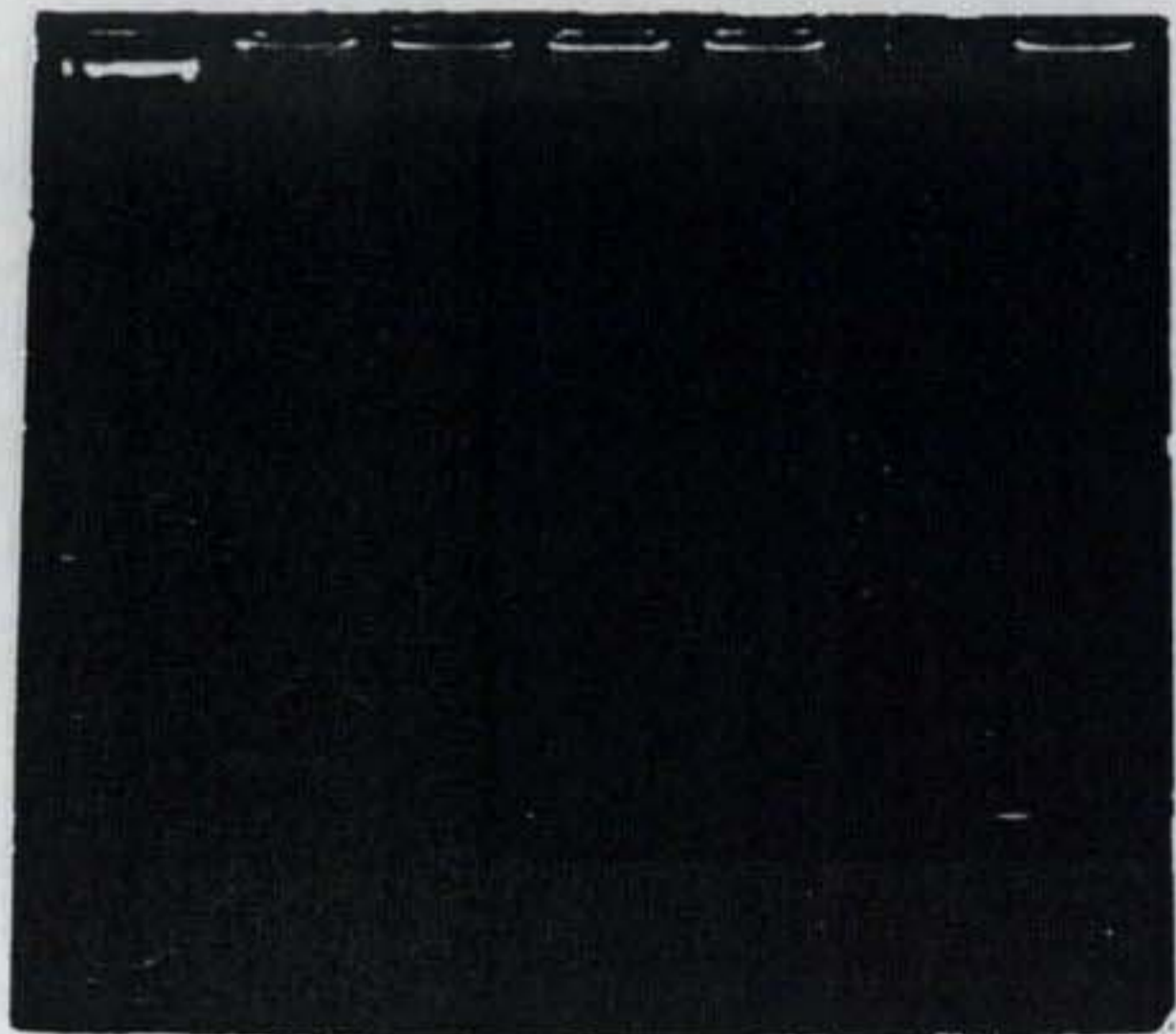
그림 5. PSS 유전자형 판별

#### 나. 전기영동 조건 확립

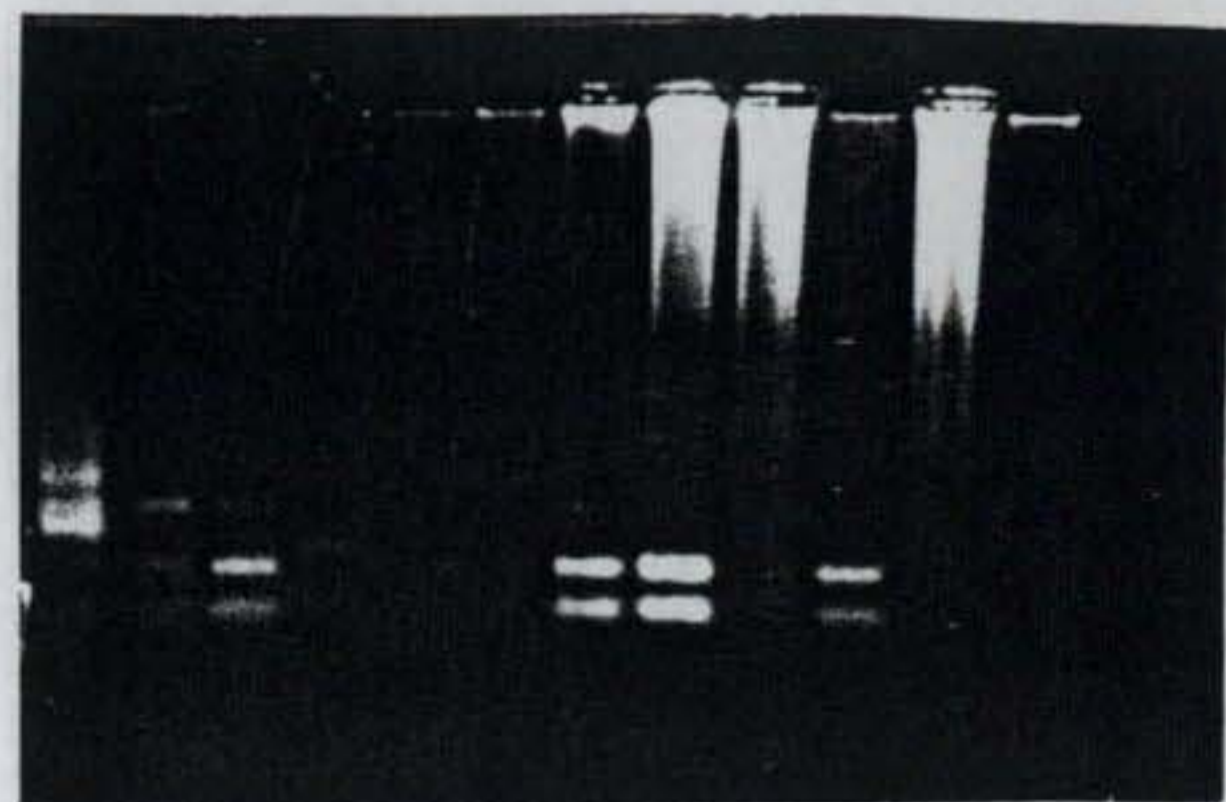
제한효소에 잘린 산물은 크기가 작기 때문에, 관찰하기가 쉽지 않다. 따라서 밴드를 관찰하기 위해서는 전기영동 조건이 최적화될 필요가 있다. 따라서, 최적의 분리조건을 결정하기 위하여 아가로스 젤과 폴리아크릴 아마이드 젤 전기영동을 이용하였다.

그림 5는 전기 영동 조건을 최적화하기 위한 실험의 결과를 보여 준다. 그림 5(1)은 2% 아가로스 젤 전기영동의 결과이고 (2)는 2% Nusieve 아가로스 젤 전기영동의 결과이다. 그림 (3)은 15% 폴리아크릴 아마이드 젤 전기영동의 결과이다. 아가로스 젤 전기 영동의 경우에서 작은 크기의 밴드를 구분하는 데 적합하지 않고, Nusieve나 15% 폴리아크릴 아마이드 젤 전기 영동이 적합함을 알 수 있다. 폴리아크릴아마이드 젤보다는 Nusieve 아가로스젤이 해상도는 뛰어나지만 가격이 아가로스보다 가격이 5배, 폴리아크릴 아마이드보다는 8배가 비싸 산업화하는 데는 적합하지 않다고 판단되어 본 1차년도 실험에서는 사용하지 않고 폴리아크릴 아마이드 젤을 사용하였다. 그러나 탐색키트의 성격에 따라 아가로스 젤도 이용될 수 있으리라 판단된다.

(1)



(2)



(3)

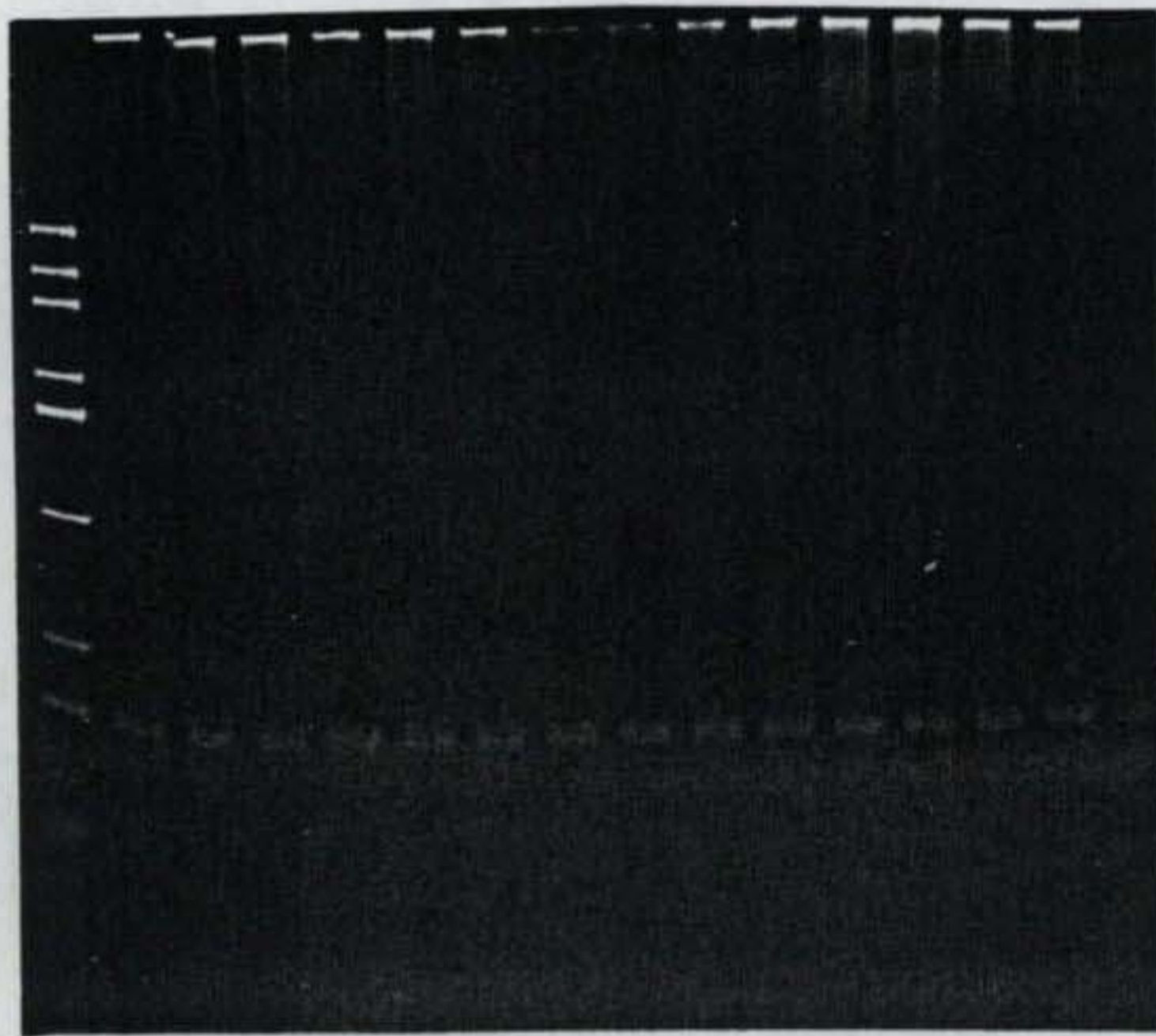


그림 6. 전기영동 조건 설정 (1) 2% 아가로스 젤, (2) 2% Nusieve 아가로스 젤, (3) 15% 폴리아크릴 아마이드 젤

## 6. 시험 축군의 유전자형 판별

확립된 탐색조건을 바탕으로 보유하고 있는 축군의 DNA를 이용하여 탐색을 실시하였다. 88개체에 대한 PSS 인자 검색을 실시하였다. 그림 7(1)은 PCR 증폭 결과를 보여 주며 그림 8은 Hha I 제한 효소로 PCR 산물을 절단하였을 때 나타나는 유전자형을 보여 준다.

(1)



(2)

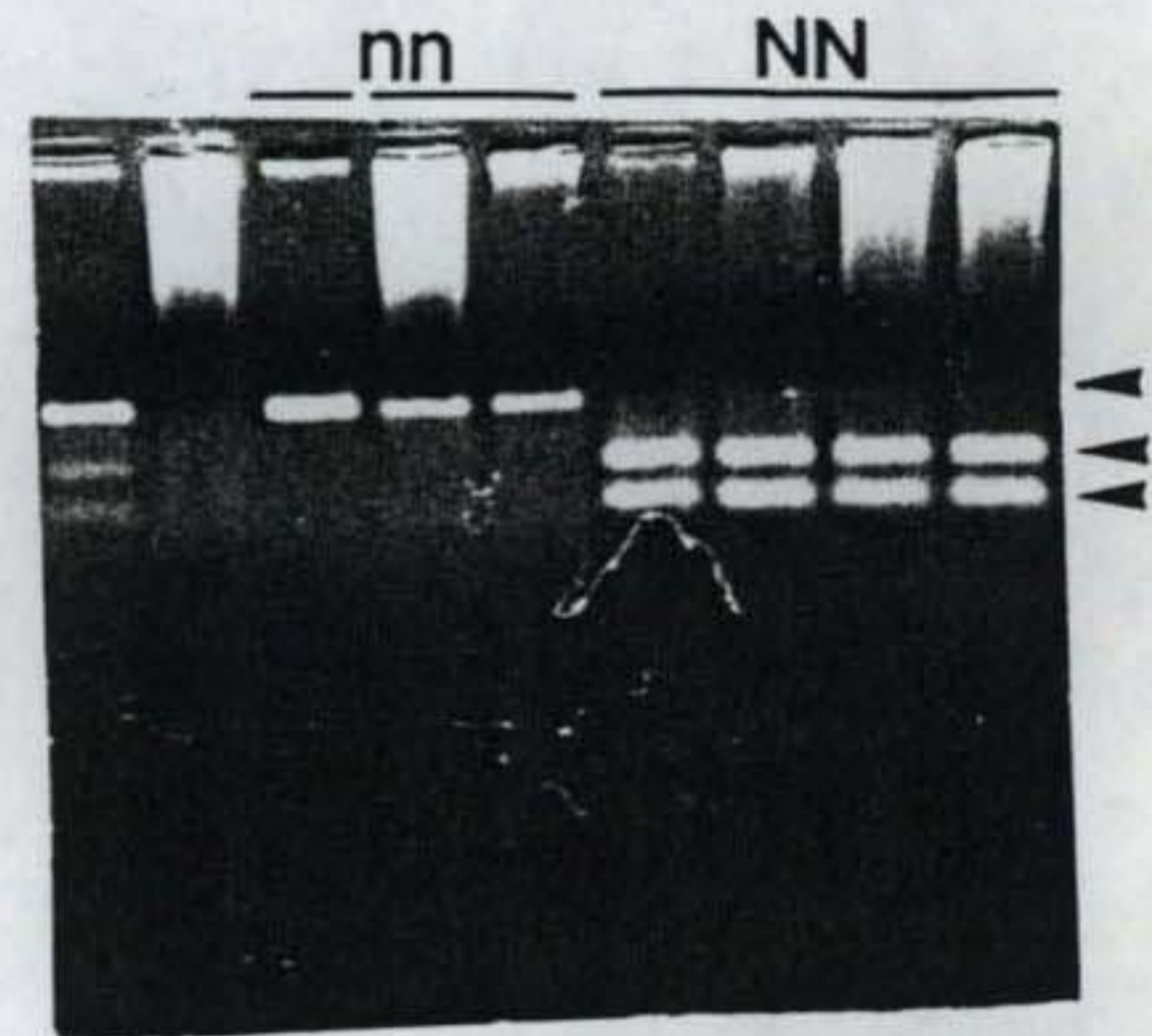


그림 7. 시험 축군의 PSS 유전자 증폭 결과(1) 및 유전자형 판별(2)

PCR 조건 : 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 2분을 한 회로 총 40회 증폭

전기영동조건 : 15% 폴리아크릴 아마이드젤

제한 효소 처리 : Hha I으로 한시간 동안 절단

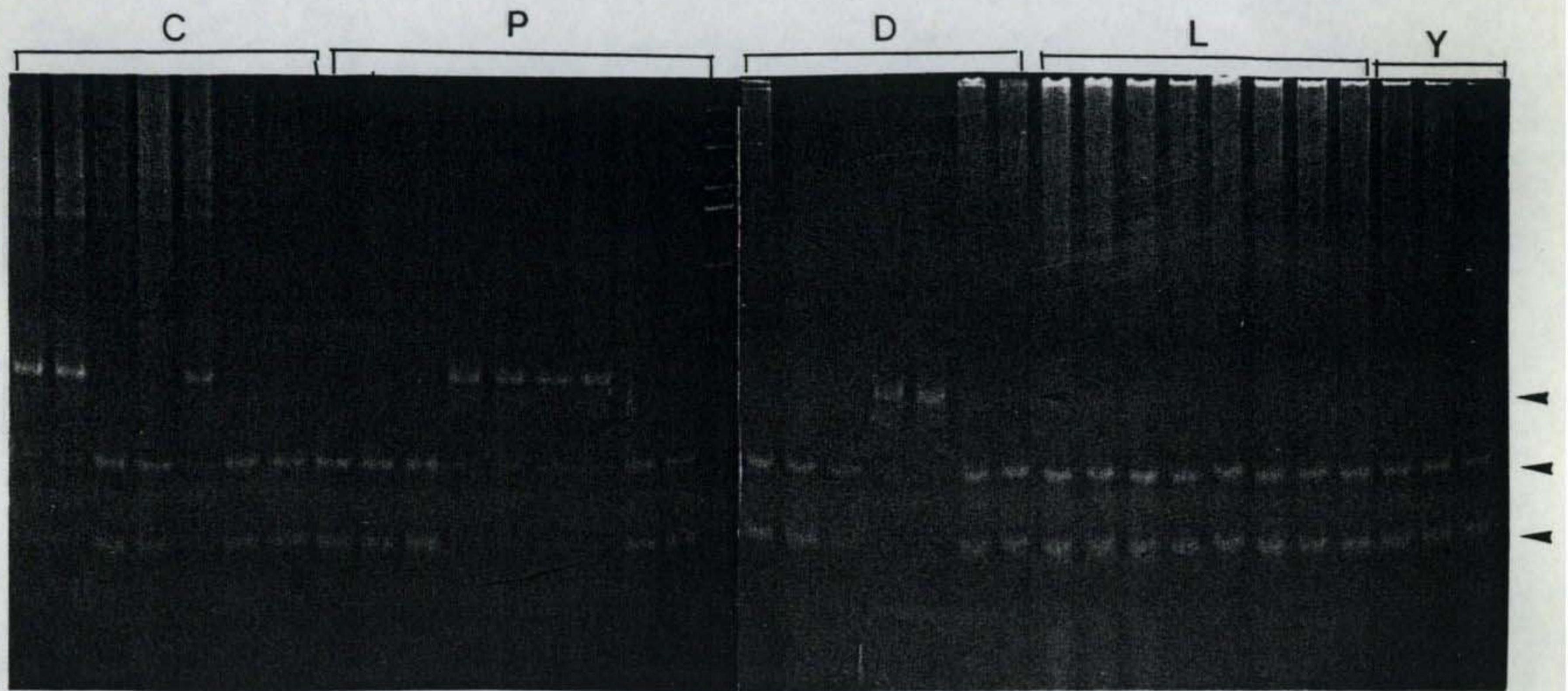


그림 8. 시험 축군의 PSS 유전자형 판별 결과

제한효소 처리 : Hha I 효소로 한시간 동안 절단

전기영동 : 15% 폴리아크릴 아마이드 젤.

L : 랜드레이스, Y : 요오크셔, D : 듀록, P : 피에트레인,

C : 삼원 교잡종

표 3. 시험 축군의 유전자형 분석 결과 분석

품 종	유 전 자 형			합 계
	NN	Nn	nn	
L	17(77.3)	5(22.7)	-	22
Y	7(100)	-	-	7
D	24(82.8)	3(10.3)	2(6.9)	29
P	4(36.4)	4(36.4)	3(27.2)	11
C(YLD)	15(78.9)	4(21.1)	-	19
합 계	67(76.1)	16(18.2)	5(5.7)	88

\* L : 랜드레이스, Y : 요오크셔, D : 듀록,  
P : 피에트레인, C : 삼원 교잡종

표 3은 본 연구 결과에서 얻어진 유전자형을 기초로 작성된 표로 분석된 품종들에서 출현하는 각각 유전자형의 수와 빈도를 계산한 것이다. 표에서 보듯이 피에트레인에서 높은 빈도로 출현하였으며, 이는 기존의 보고와 일치하는 것이다.



## 제 4 장 기대되는 성과 및 활용성

### 제1절 기대되는 성과

1. 스트레스 감수성 돼지를 조기에 신속 정확하게 확인하여 검색함으로(100% 정확도) 열성 유전자를 갖지 않는 종돈 생산 기술을 확립하고 이미 이 열성유전자를 가진 종돈과 유전인자를 가지지 않는 개체와 교배시켜 비육돈 생산시 스트레스 감수성에 의한 피해를 극소화 시킬수 있는 교배 기술을 확립하며 또한 유전자 검색 기술 개발에 의한 우수한 능력을 가진 가축(돼지)을 조기에 판별할 수 있는 관련 연구 기반을 구축할 수 있다.

2. 자돈 생산비 감소, 비육돈 폐사율 감소, 열등육 생산을 감소등의 효과로 양돈농가에서 PSS인자에 의한 경제손실 극소화와 고품질의 돈육생산에 따른 경쟁력 확보를 꾀할 수 있다. 또한 종돈장에서 이들 불량 유전자를 제거하므로써 농가에서는 유전적으로 안정된 비육돈을 생산하여 일본 시장에 지속적인 돼지고기의 수출(불량육 반품을 극소화 시킴 → 신뢰성있는 교역조건 구축)을 꾀할 수 있다.

3. 전 세계적으로 고급육 생산을 위한 돼지 육종기술 개발과 생산성 손실을 주는 유전적 요인을 제거시키는 첨단기술을 국내에서 개발 보급하게 됨에따라 국내 돼지 개량기술을 고도화시키고 가축 사육농가에서 본 연구개발기술의 실용화로 생산성을 높일 수 있는 중요한 전기가 될 것이며 돼지의 육량,육질에 관여하는 유전자와 이 유전자를 표지하는 표지인자를 탐색하는 연구기술기반 및 이들 관련기술을 실용화시키는 촉매역할을 할 것이다.

## 제2절 연구개발 사업 성과에 대한 활용(실용화) 방안

1. 양돈 능력 검정소에서 검정하는 종축에 대해 일차적으로 PSS 인자 보유 여부를 검색하여 열성 호모를 가진 PSS돼지가 농가에 보급되는 경로를 차단한다.
2. 국내 종돈장과 연계하여 PSS 인자 보유 종돈을 검색하고 육종 프로그램에 이용하여 농가에 PSS 인자 보유 돼지가 더 이상 보급되지 않도록 체계화한다.
3. 개발 후에는 국내 축산 관련 연구 기관과 연계하여 본 기술의 간편화 및 실용화를 확립한다.