최 종
연구보고서

돼지의 품종식별 및 경제형질 연관 유전자 표식인자 규명을 위한 기술개발

Identification of Breed- and Economic Trait-specific Genomic DNA-Polymorphic Markers in the Pig

진주산업대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “돼지의 품종식별 및 경제형질 연관 유전자 표식인자 규명을 위한 기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 12. 22.

주관연구기관명 : 진주산업대학교

총괄연구책임자 : 김 철 욱

연 구 원 : 황 인 환

연 구 원 : 이 장 형

연 구 원 : 정 일 병

연 구 원 : 박 영 일

연 구 원 : 최 광 수

연 구 원 : 백 동 훈

연 구 원 : 최 진 성

연 구 원 : 주 영 국

연 구 원 : 여 정 수

요 약 문

I. 제 목

돼지의 품종식별 및 경제형질 연관 유전자 표식인자 규명을 위한 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 목적은 genome의 DNA polymorphism 검출에 단순하고 신속한 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법으로 random DNA sequence를 갖는 단일 primer를 이용하여 Landrace, Yorkshire, 그리고 Duroc 종의 DNA를 분석하여 품종식별용 RAPD marker 확립 및 도체등급 A급 출현율이 높은 돼지 식별용 RAPD marker를 개발하는데 있다. 그리고 품종별 특이 marker의 경제형질에 따른 연관성을 통계분석하여 일당증체량, 등지방두께, 사료효율에 관련이 있는 DNA marker를 정립하여 경제형질이 우수한 종돈을 조기에 선발하기 위한 경제형질 연관 DNA marker를 개발하고자 한다.

국내 양돈산업은 국내산 종돈이 없음으로 해서 종돈의 보급을 전량 수입에만 의존하고 있고, WTO 체제하에서 수입개방에 따라 국내에 이미 많은 종돈계열회사가 배치되어 있으며 앞으로도 계속 전문 육종회사가 진입할 전망으로 보여 국제경쟁력의 강화를 위한 노력이 절실히 필요하다고 생각된다. 1996년도에는 종돈이 2,479두가 수입되어 약 31억원의 외화를 지출하게 되었고, 농가에 보급하는 종돈의 평균경매가격이 약 62만원정도(대한양돈협회 제 2종돈 능력검정소, 1997년)로 생산비를 가중시키고 있다. 도체등급판정결과에서도 A와 B등급의 출현율은 41.9%밖에 되지 않는 현실이므로 비육돈을 생산하는 종돈의 유전능력이 매우 불량하여 농가의 생산성을

떨어뜨리고 있다(한국육류수출협회, 1997). 그리고 대한 양돈협회 제 2 종 돈 능력검정소에 1990년 6월까지 검정 총 7,709두중에서 외모심사 불합격이 1,780두로 23%나 차지하고 있는 것으로 미루어 보아도 순수혈통을 소유한 종돈이 유통되고 있지 않다는 사실이 나타나고 있다. 그래서 본 연구에서는 국내 양돈산업의 생산비 절감과 생산성 향상에 기여할 수 있는 품종별 정확한 유전정보의 탐색기술과 우수한 경제형질을 소유한 종돈을 선발할 기술을 개발하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

가. 품종별 혈통 유지

나. 품종간 교배에 의한 F1 및 F2 관리 및 확보

다. DNA의 분리 및 분석

라. DNA marker 개발조건 확립

마. 품종식별용 RAPD marker 확립

사. Polymorphic band의 elution

자. Polymorphic band의 cloning

차. DNA sequencing

카. Primer 합성과 SCAR PCR

타. F2 비육돈의 경제형질 조사

파. 도체 등급 A급 출현율이 높은 돼지를 식별할 RAPD marker 개발

하. 경제형질 연관 RAPD marker 확립

갸. PSS 유전자를 식별할 DTAS-PCR 기술 개발

2. 연구개발 범위

3년동안 Landrace, Yorkshire 그리고 Duroc종을 축산진흥연구소에 배치하여 이들의 DNA로부터 PCR-RAPD 분석방법으로 품종별 특이 유전자 marker를 개발하였다. 1차년도의 10 base primer 800개와 2차년도부터 추가된 69개 single primer를 병합한 2,224개 primer pairs를 이용하여 품종별 RAPD marker를 개발하고, DNA cloning과 sequencing과정을 거쳐 새로운 SCAR primer를 합성하여 재현성이 뛰어나고 신뢰성 있는 marker를 개발하고자 하였다.

도체등급별 RAPD marker의 개발을 위해서 90개의 primer pairs를 이용하여 A급 혹은 우수등급에 특이한 marker를 찾아 일부를 sequencing하였다. 그리고 PSS 유전자를 식별하는 기존의 여러 연구방법을 도입하여 간단하고 손쉽게 PSS 유전자를 가진 돼지를 식별할 수 있는 방법을 개발하였다.

그리고 경제형질 연관 marker의 개발을 위해 순종을 교배하여 F2 LYD 삼원교잡종을 80두 생산하여 경제형질을 조사하고 54두의 DNA를 분석하여 확보된 RAPD marker출현에 따른 통계분석하여 경제형질 연관 marker를 개발하도록 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 품종식별 DNA marker 개발

1차년도에 10 base primer 800개를 이용하여 19개 primer에서 25개 polymorphic band를 확보하였고, 2차년도에 2,224개 primer pairs를

이용하여 38개 primer pairs에서 67개 polymorphic band를 확보하였다. 이중 30개 polymorphic band를 sequencing하여 4개의 새로운 primer를 합성하여 SCAR PCR을 수행하였다.

나. 경제형질 연관 DNA marker 개발

품종간 교배로 생산된 F2의 경제형질을 조사하고 RAPD 분석한 결과를 SAS GLM으로 통계분석하였는데 유의성 있게 나타난 경제형질 연관 marker는 아래와 같다.

- 13+15D5의 band는 FAT값이 낮은 개체에 출현
  : 등지방두께가 얇은 것과 연관
- 34+46D2Y2의 band는 ADG값이 낮은 개체에 출현
  : 일당증체량이 낮은 것과 연관
- 13+34L2의 band는 D90값이 높은 개체에 출현
  : 90Kg 도달일령이 높은 것과 연관
- 13+39Y2의 band는 W56값이 낮은 개체에 출현
  : 56일령까지의 증체량이 낮은 것과 연관

다. 도체등급 A급 선발용 DNA marker 개발

총 90개 primer pairs를 도체등급별로 4두씩 총 16두에서 PCR하여 13개 primer pairs에서 16개 polymorphic band를 확보하였다. 이중 A등급에 특이한 10개 polymorphic band를 sequencing하였다.

라. PSS **유전자를 식별할** DTAS-PCR **기술 개발**

기존의 STAS(Single Tube Allele Specific-PCR) **방법을 변형하여 더욱 정확하게** PSS **유전자를 식별할** DTAS(Double Tube Allele Specific-PCR) **방법을 개발하여 현재 특허 신청중에 있다**.

2. 활용에 대한 건의

본 연구는 Landrace, Yorkshire **그리고** Duroc**종의 품종식별용** RAPD marker, **경제형질과 연관** marker, **그리고 도체등급** A**급 선발용** RAPD marker**를 개발하여 수입개방에 직면하여 어려운 상황에 놓인 국내 양돈 산업의 발전에 도움이 되고자 하는 목적에서 수행되어졌다**.

Landrace, Yorkshire **그리고** Duroc**의 세 품종별** RAPD marker**의 활용은 종돈의 유전정보를 보다 더 정확하게 분석하여 국내에 유통되는 품종들을 유전적 순수성을 식별하는데 도움이 될 것이다. 도체등급** A**급 선발용** RAPD marker**는 현재 전국적으로 실시되고 있는 도체등급제도에 관련하여 각 등급별 특이** marker**로 인해 우수한 종돈을 조기에 선발하고자 하는데 쓰일 수 있을 것이다. 또한 일당증체량, 등지방두께, 사료효율에 연관된** RAPD marker**는 경제형질이 우수한 종돈을 조기에 선발하는데 도움이 될 것이다**.

그리고 본 연구에서 개발한 PSS **유전자 진단용** DNA marker**는 국내 양돈장 및 종돈장에 보급하여 간편하게** PSS **유전자를 식별하는데 활용할 수 있을 것이다. 이 방법은** PSS**를 일으키는 동형접합성 유전자** nn**뿐만 아니라**, Nn **유전자형을 가진 돼지도 식별할 수 있어** Nn**유전자를 가진 종돈을 계획교배에 의해** PSE **돈육 발생을 사전에 막을 수 있으므로서 양돈산업의 생산성 향상에 기여할 수 있을 것이다**.

Summary

I. Title

Identification of Breed- and Economic Trait-Specific Genomic DNA-Polymorphic Markers in the Pigs

II. Research Objectives and Significance

The present research was purposed to find PCR-RAPD markers that can be used for the identification of major pig breeds, Landrace, Yorkshire and Duroc, using random DNA sequences as primers and genomic DNA as templates. Also intended in this research was to find DNA markers within each breed that are significantly related to economic traits including average daily gain, back fat thickness and feed efficiency, thereby enabling the utilization of them as selection markers for breeding herd at an early stage of development.

Domestic swine operations entirely depend on the import for the breeding herd for the lack of domestic breeding units. Since opening the domestic market following the WTO Agreement, a number of foreign breeding companies have already opened their branches in this country; the number of these are expected to increase in the future, and hence it's becoming imperative to improve our international competitiveness in swine production in the domestic market. We paid 3.1 billion won by foreign currency to import 2,479 heads of breeding pigs during 1996. They were distributed to swine farmers at 620,000

won of auction price per head on an average (The Second Swine Testing Station, 1997), which obviously resulted in raising the already high production cost. However, the low genetic ability of imported breeding pigs for pork production, which was reflected by only 49% of A- and B-grade carcass ratio, further worsened the production efficiency of domestic swine farms (Korea Meat Trade Association, 1997). Furthermore, 1,780 heads or 23% of 7,709 imported breeding pigs failed the appearance test administered by The Korea Swine Association Second Testing Station until June, 1990, which supports a current contention that there are no imported pure lines. As such, as a means to contribute to decreasing domestic swine production cost while increasing production efficiency, the present research was designed to identify genetic probes for the identification of the major swine breed and also for selection markers for excellent economic traits.

III. Research Contents and Scope

1. Contents

- establishment of pure lines by breed
- generation of F1 and F2 by cross-breeding
- DNA preparation and analysis
- establishment of experimental conditions for the identification RAPD markers
- identification of RAPD markers for the identification of each breed
- elution of polymorphic bands from the agarose gel

- Cloning of polymorphic bands
- DNA sequencing
- Primer synthesis and SCAR PCR
- examination of economic traits of the F2 pigs
- identification of high-frequency RAPD markers associated with A-grade carcass
- identification of RAPD markers associated with economic traits
- development of DTAS-PCR for the identification of the PSS gene

2. Scope

For three years we have searched for species-specific DNA markers for Landrace, Yorkshire and Duroc by the PCR-PAPD method. DNA samples were taken from pigs that were kept by Animal Promotion Institution. RAPD markers for each breed were identified after examination of 800 10-base primers and additional 2,224 primer pairs out of 69 single primers during the first and second years, respectively. Some polymorphic DNA bands were cloned and sequenced to find repeatable and reliable DNA markers.

A- or high-grade carcass-specific polymorphic bands were identified from 90 primer pairs that had been examined, and some of them have been sequenced. Additionally, we have developed a simple and easy method for the detection of the PSS gene by modifying previously reported procedures for this purpose.

Finally, we have produced 54 F2 LYD cross-bred pigs, examined their economic traits and performed RAPD for them. DNA markers out

of this experiment that were related to economic traits have been analyzed statistically.

IV. Results and Suggestions on Utilization of Results

1. Results

● identification of breed-specific DNA markers

During the first year, 25 polymorphic bands were obtained from 19 primers out of 800 10-base random primers that were tested; additional 66 polymorphic bands were obtained from 38 primer pairs out of 2,224 tested during the second year. We sequenced 30 polymorphic bands, synthesized 4 new primers and performed SCAR PCR.

● identification of DNA markers associated with economic traits

Economic traits of the cross-bred F2 pigs were examined and the pigs' RAPD data were analyzed using the GLM of SAS. DNA markers that were significantly related to the economic trait are as below.

- 13+15D5 was associated with low fat
  : related to low back fat thickness
- 34+46D2Y2 band was associated with low ADG
  : related to low average daily gain
- 13+34L2 band was associated with high D90 value
  : related to more days until reaching 90 kg of body weight
- 13+39Y2 band was associated with low W56 value
  : related to low weight gain until 56 days of age.

● identification of A-grade carcass-related DNA markers

A total of 16 pigs, 4 pigs per each grade, were examined using 90 primer pairs. Sixteen polymorphic bands were obtained from 13 pairs and 10 A-grade-specific bands were sequenced.

● development of a DTAS-PCR method for the detection of the PSS gene

A DTAS(Double Tube Allele Specific-PCR) have been developed for an accurate detection of the PSS gene by modifying pre-existing STAS(Single Tube Allele Specific-PCR) methods. A patent application for this development has been submitted.

2. Suggestions on utilization of results

The present research was performed to find RAPD markers that are related to economic traits or can be used for breed identification for Landrace, Yorkshire and Duroc and for selecting A-grade carcass, with a purpose of helping overcome the difficulty of the domestic swine industry imminently confronted with the unrestricted import.

The breed-specific DNA markers that were found in this study chould be useful for the identification and the purity of the major breed, Landrace, Yorkshire and Duroc, of domestically available pigs. The A-grade carcass-specific markers and the markers related to ADG, back fat thickness(FAT), or feed efficiency(FE) will be useful in early selection of the breeding herd.

The PSS marker that has been found in this research cqan be practically used in production and breeding units for the detection of

the PSS gene. This marker can distinguish Nn-type pigs from the nn so that one can eliminate the occurrence of the PSE pork by pre-planed breeding of the Nn pig.

Contents

목 차

제 1 장 서 론

우리나라 양돈산업은 수입개방으로 인해 값싼 수입돼지고기와 직접 경쟁해야 하는 어려운 환경에 처해 있다. 국내적으로는 우리 국민의 소비성향이 양적인 면에서 질적인 면으로 전환되어 신선하고 맛이 좋으면서 지방이 적은 고품질 돼지고기를 선호하고 있으므로 값싼 수입돼지고기와 비교하여 소비자로 하여금 국내산 돼지고기를 구매할 수 있는 욕구를 가질 수 있도록 하기 위한 여러 가지 방안이 묘색되어지고 있다.

또한 세계적으로는 WTO 체제하에서 국내 돈육시장에 냉장 돼지고기가 완전개방화되어 있고, 최소시장 접근물량으로 냉동돈육이 1997년에 23,392톤이 돈육시장에 개방되어 값싸고 품질이 우수한 돼지고기가 국내 돈육시장에 자연스럽게 유통되고 있는 실정이다. 그러므로 국내 양돈산업의 육성을 위해서는 수입개방화에서도 국내 양돈업이 살아남을 수 있는 방안이 산·학·관·연이 혼연일체가 되어 다방면에서 마련되어져야 할 것이다.

국내외적으로 우리 양돈산업의 어려운 상황을 극복할 전략으로는 여러 가지 요인들이 많이 있지만 우선적으로 해결해야 할 과제는 우리 국민들이 선호하는 위생적이고 품질이 우수한 돼지고기를 생산하는 길이라고 생각한다. 또한 무엇보다도 수입 돼지고기와 차별화할 수 있는 브랜드 돈육을 생산할 수 있는 품종별 유전정보를 분석하여 정확한 계통조성을 수립하여야 할 필요성도 대두되고 있다. 그러므로 해서 올들어 축협, 농협, 생산자 단체는 물론 지방자치단체 및 대기업에 이르기까지 경쟁력 강화를 위한 브랜드육을 잇따라 내놓아 현재 돼지고기에서만 40여개의 브랜드육이 생산되고 있다고 한다.

그러나 지난 7월 개방이후 돼지고기 수입이 크게 늘어나면서 돼지고기 값이 계속 수직하락하고 있다. 11월 14일 농림부에 따르면 올들어 지난 10

월말까지 돼지고기 수입물량은 모두 4만 9천톤으로 이중 수급조절용 2만톤과 농산물교역협상 결과에 따른 최소시장접근(MMA)물량 1만 4천톤을 제외한 1만 5천톤이 시장개방 이후 국내에 들어왔다고 한다. 이같은 수입규모는 지난 한해동안 수급조절 및 MMA로 국내에 들어온 전체물량 3만 8천톤을 크게 상회하는 규모다. 이에따라 7월이전 1백kg짜리 돼지 1마리당 18만원 19만원을 호가하던 산지가격이 지난 11월 12일에는 14만 5천원대로 떨어지고, 도축장에서 경락하는 1kg당 지육가격도 2,700 2,800원에서 1,960원으로 추락하고 있고 설상가상으로 환율이 $당 1,700원대로 떨어지면서 사료 부족현상등으로 사료곡물 가격이 폭등할 것으로 예상되어 생산비가 더욱 더 가중되어 사육농가가 어려움을 겪고 있다. 그러므로 우리나라 농축산물이 수입개방에서 살아남기 위한 확실한 대책마련이 절실하고 특히 의·식·주에 해당하는 분야에서는 자급자족할 수 있도록 범국민적으로 노력해야 할 것이라 본다.

1970년부터 유전자 재조합 기술은 유전공학이라는 학문을 창출하여 1980년대에는 형질전환동물을 생산할 수 있는 기술을 개발하게 되어 이제 인간에 이르기까지 형질전환이 가능하게 될 정도로 유전공학분야는 발달하게 되었다. 국내에서도 산양의 성장호르몬 유전자를 삽입하여 형질전환 돼지 즉 수퍼돼지를 생산하는데 성공하게 되었는데 이와 같은 유전학적 기술의 개발은 품종개량 및 생산성 향상으로 양돈산업에 근본적인 해결방법이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 양돈산업의 육성화를 이룩하기 위한 방안으로서 이미 선진국가에서 많은 발전을 이루고 있는 품종별 유전정보를 정확하게 분석할 기술과 경제형질 연관 유전자를 식별할 기술을 개발하여 생산비 절감과 생산성 향상에 기여하고자 한다.

제 2 장. 품종식별용 RAPD marker 개발

제 1 절. 서설

분자생물학 기술의 출현으로 DNA에 기초를 둔 유전적 분석에 대한 접근들이 다양한 유기체의 유전적 marker를 생산하기 위해 제안되어졌다. RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)는 genome의 polymorphism들을 찾기 위해 사용되어지고 있고, DNA fingerprinting(DFP)는 다중 일렬 반복서열(multiple tandom repetitive sequence)이나 혹은 복잡한 형태들을 생산하는 hypervariable minisatellites(Jeffreys et al. 1985)와 혼성화되어진 polymorphic fragment의 결과들로서, 유전적 특징과 근원을 분석하기 위해 제공되어진다. RFLP와 DFP로부터 생산된 polymorphic band들이 비록 현존하는 DNA sequence 다양성에 매우 큰 비율을 찾아낼 수 있고 유전적 marker로서 광범위하게 사용되어지고 있다하더라도, 분석적인 과정은 시간의 소모가 클 뿐만아니라 sample DNA의 비교적 많은 양이 요구되어지고 radioisotope를 다룰 수 있는 특이한 시설이 요구되므로 분석하기에 상당히 까다롭다.

1990년대 들어서면서부터 genome의 DNA polymorphism들의 검출에 대하여 Williams 등(1990)은 polymerase chain reaction(PCR)와 임의의 서열들로 된 단일 primer들을 사용한 random DNA sequence 증폭에 기초를 둔 새로운 DNA 분석기술을 보고하였다. 임의적으로 증폭된 polymorphic DNAs에 의해 얻어진 DNA 다형성은 최근에 부계의 결정을 포함한 광범위한 영역의 문제점을 해결하는 데에서는 유용하였다(Michell et al. 1992). 이것은 유전자 지도, tag 중요 유전자들, 그리고 집단 유전학 연구에 대한 세부적인 구조작성을 위해 다양한 유기체에서 사용되어 진다(Waugh and Powell, 1992). RFLP나 DFP에 비해 RAPD의 이점은 단순성과 신속성을 들

수 있다. 이것은 radioisotope의 사용도 genomic library의 구조도 요구되어지지 않고, 단지 매우 작은 량의 genomic DNA만이 필요할 뿐이다. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs) 대립유전자들은 멘델의 유전법칙에 따라 유전되어지고 유전적 특성들의 분석에 정보를 줄 수 있는 유전적 marker가 될 수 있다(Quiros et al. 1991). 이러한 RAPD 분석의 장점들을 근거로 하여, 본 실험에서는 돼지의 유전적 특성을 RAPD 기법으로 규명하고자 하였다. 다량의 primer를 이용한 RAPD 방법은 PCR을 통해 DNA와 primer의 특이적인 결합으로 3품종(Landrace, Yorkshrie, 그리고 Duroc)에서 전체 genomic DNA의 일부분을 증폭시킨다. 돼지의 DNA는 blood에서 DNA 분리작업을 거쳐서 PCR에 적당한 농도로 조정이 되어 얻어진 것이다. 사람이나 유성번식을 하는 모든 동식물들은 각기 독특한 유전정보를 지니고 있기 때문에 생김새를 비롯한 표현형이 다르게 나타난다. 이러한 동식물의 경우 동일한 개체의 DNA는 어떤 조직에서 유래되었던지 간에 모두 동일하며 이 개체의 특이성이 유전자 지문의 기초가 된다. 고등동물의 경우 단백질은 genomic DNA로부터 정보를 얻어 만들어 지는데, 실제 단백질 합성을 위해 사용되어지는 DNA는 전체 DNA의 일부이며, 나머지 대부분의 genomic DNA는 기능이 없는 비유전자로 구성되어져 있다. 동일한 개체인 돼지들 사이에서는 품종별로 또다른 DNA sequence를 가지고 품종별로 특이성을 가지게 된다. 이 품종별 차이를 분석 가능하게 하는 방법이 RAPD 분석법이라 하겠다.

3품종(Landrace, Yorkshrie, 그리고 Duroc)의 genomic DNA는 sequence가 서로 다르기 때문에 PCR 증폭 수행 후 나타나는 결과들도 또한 다르다. 그러므로 품종별로 다르게 나타난 band는 품종 식별을 위한 marker가 되어지고 품종 특이 marker는 그 품종이 순수 혈통을 유지하고 있는지를 검사하는데 활용할 것이다. 또한 이들 marker와 F2에서 조사할

경제형질과의 연관성있는 marker를 통계분석하여 경제형질이 우수한 종돈을 조기에 선발하는 이용이 가능하도록 한다.

제 2 절. 공시동물

세계적으로 비육돈 생산용으로 가장 많이 이용하고 있는 Landrace, Yorkshire와 Duroc종에 대한 유전적 특성을 식별할 기술을 개발하여 국내에 유입되는 종돈의 순수성을 판별하고 종의 우수한 경제형질을 이용한 고품질 돈육을 생산하고자 이들 품종에 대한 품종식별용 RAPD marker를 개발하고, 이들과 경제형질간의 연관성을 탐색하였다.

우리나라 공인 종돈 능력검정소에서 능력검정된 종돈에 대한 자료를 통계 분석하여 얻은 table 1의 품종별 평균 성적을 보면 검정기간중의 일당증체량과 90kg 도달일령은 Duroc에서 가장 우수하고, 사료요구율은 Yorkshire종에서 가장 우수하였으며 등지방두께는 Duroc종에서 두껍게 나타났다고 한다.

Table 1. 우리나라 종돈의 검정소 검정 성적

품 종	일당증체량(g)	등지방두께(cm)	사료요구율	90kg도달일령
Yorkshire	917	1.44	2.30	140
Landrace	925	1.38	2.35	138
Duroc	955	1.68	2.34	137
Hampshire	890	1.52	2.41	145

* 월간양돈, 1997, 12월호

그리고 Duroc, Landrace, Yorkshire종은 종모돈 및 종빈돈으로서의 이용가치가 가장 높고 삼원교잡종의 경우에는 복당이유두수를 비롯하여 우수한 비육돈을 생산할 수 있으므로 본 연구에서는 Duroc, Landrace, Yorkshire 각 품종의 특이성을 RAPD 분석법으로 확인하고자 세 품종을 공시하여 이용하였다.

1차년도(1995)에 품종식별, F1 및 F2 생산에 이용하기 위해 한국종축개량협회에 혈통 등록된 Landrace(♀) 2두, Duroc(♂) 1두, Yorkshire(♂) 1두를 축산진흥연구소에 배치하여 동일한 조건으로 사양관리하였다. 그리고 재현성 검증을 위해 추가계획에 의해 대한양돈협회 종돈 제 2 능력검정소의 Landrace, Yorkshire 그리고 Duroc종을 2차년도에 15두씩, 3차년도에 5두씩 활용하였다.

제 3 절. 품종간 교배에 의한 F1 및 F2 확보

품종별 고유의 특이 RAPD marker가 돼지의 경제형질과 어떠한 연관성이 존재하는지를 확인하여 경제형질 연관 RAPD marker를 개발하기 위해 1차년도에 우선 Lanrace(♀) x Yorkshire(♂)를 교배하여 F1 hybrid(♀) 9두를 생산하여 1두가 폐사되고 8두를 확보하였다. 확보된 F1 hybrid(♀)는 Duroc(♂)과 교배하여 F2 80두를 생산하였다. F1에서는 homozygote인 Dam과 Sire의 형질을 모두 가져 heterozygote로 존재하게 되고 감수분열에 의해 F2에서 모든 형질이 나누어진다. 그러므로 경제형질의 조사를 위해서는 많은 F2가 필요하게 되므로 총 100두 정도의 F2를 생산할 계획이었으나 80두를 생산하여 이중 54두만을 본 연구에 이용할 수 있었다(table 2). 생산된 F2는 유전적 요인에 의한 형질의 차이를 연구하기 위해 동일조건에서 사양관리 되어졌다.

Table 2. F1의 교배 및 F2 생산

명호(호)	생년월일	교배일자	분만일자	자돈수		총계(두)	
				암	수	폐사	생존
40	95. 7. 14	96. 1. 15	96. 5. 10	2	5	5	2
		96. 12. 8	97. 4. 4	1	9	2	8
41	95. 7. 14	96. 11. 16	97. 3. 13	3	3	4	2
42	96. 3. 24	96. 12. 3	97. 3. 30	4	6	0	10
43	〃	96. 11. 15	97. 3. 10	6	5	2	9
44	〃	97. 1. 17	97. 5. 12.	3	7	3	10
45	〃	96. 12. 10	97. 4. 4	3	7	4	7
46	〃	96. 12. 20	-	0	0	0	0
47	〃	97. 1. 10	97. 5. 6	1	3	0	4
48	〃	96. 12. 16	97. 4. 11	5	7	0	12
계	9두			28	52	20	60

제 4 절. 품종별 DNA 분리

1. 서언

축산진흥연구소에서 혈통관리 되고 있는 Landrace(♀), Yorkshire(♂)와 Duroc(♂)종에서 EDTA coated tube에 각 품종별로 매번 10㎖ 정도의 혈액을 채취하여 RAPD 분석을 위해 DNA를 분리하였다.

혈액으로부터 DNA를 분리하는 방법에는 여러 가지가 있으나 본 연구에서는 Sambrook등(1989)이 고안한 방법을 이용하여 더욱 적합한 형태로 변형하여 이용하였다. 그리고 genomic DNA를 순수분리하는 kits를 이용하여 DNA를 분리하였는데 kits의 경우에는 적은 blood에서 높은 농도로 DNA를 얻을 수 있어서 상당히 효과적이었다. 채혈한 혈액은 응고방지를

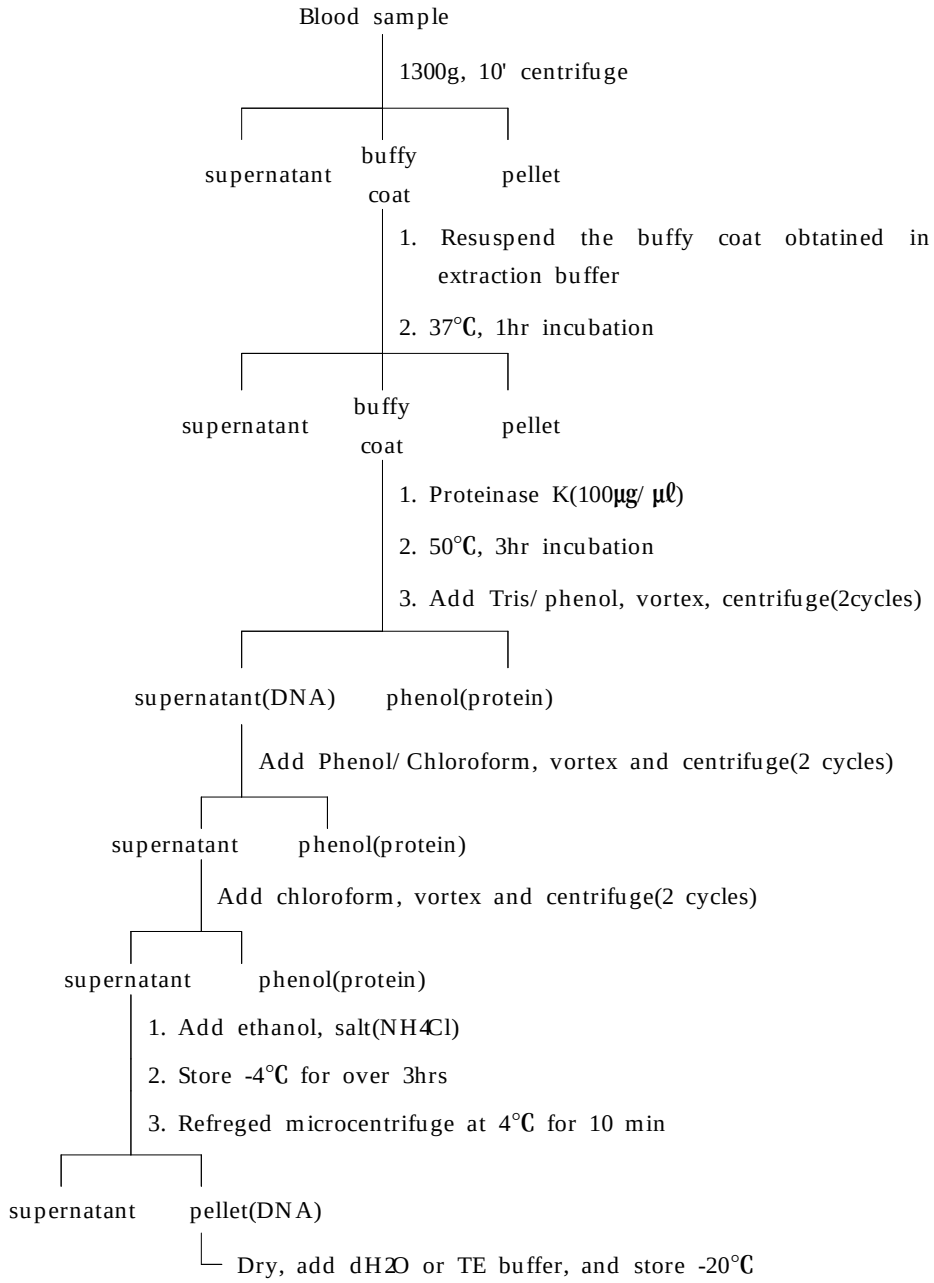
위해 heparin이나 EDTA를 첨가하여 냉장보관하여 이용하기도 하였다. 1차년도에는 품종별 RAPD marker의 개발을 위해 각 품종별로 10㎖씩의 혈액으로부터 여러번에 걸쳐 DNA를 분리하여 일정농도로 맞추어서 이용하였고, 2차년도에는 재현성 검증을 위해 능력검정소의 품종별 15두씩에서부터 혈액을 채취하여 DNA를 분리하였으며, 3차년도에는 품종별로 5두씩에서 동일한 방법에 의해 DNA를 분리하여 본 연구에 이용하였다. 또한 3차년도에는 경제형질 연관 DNA marker를 개발하기 위해 교배에 의해 생산된 F2 삼원교잡종 54두의 혈액을 채취하여 순수 DNA를 분리하여 이용하였다.

2. 재료 및 방법

가. Phenol extraction에 의한 방법

실험에 공시된 돼지의 혈액을 EDTA-coated tube에 10㎖ 정도 채취하였다. 혈액을 다시 15㎖ falcon tube (centrifuge tube)에 옮긴 후 일차적으로 1300g에서 15분동안 centrifuge하여 solution을 분리하였다. 아래쪽에 가라앉은 RBC층과 상등액인 혈청사이에 존재하는 얇은 흰색층이 WBC(buffy coat)층으로서 이 부분을 pipette으로 조심스럽게 수거하여 extraction buffer와 proteinase K를 처리하여 65℃에서 3시간 이상 incubation 시켜 protein을 변성시켰다. 갈변한 sample을 13,000rpm에서 centrifuge하여 protein과 기타 세포 aggregate를 침전시키고 상등액을 취한 후 tris saturated phenol(pH 8.0), phenol/ chloroform/ isoamylalcohol(25:24:1), chloroform를 2번정도씩 각각 처리한다. 각 solution은 처리후 vortex하고 centrifuge하여 상등액만을 취하는 과정을 반복하고 거의 protein의 제거가 이루어져 투명하게 된 solution에 ethanol과 salt를 첨가하여 DNA를 침전시키는 기본방법을 이용하였다. 본 연구에서 수행한 phenol에 의해 DNA를 분리한 절차는 table 3과 같았다.

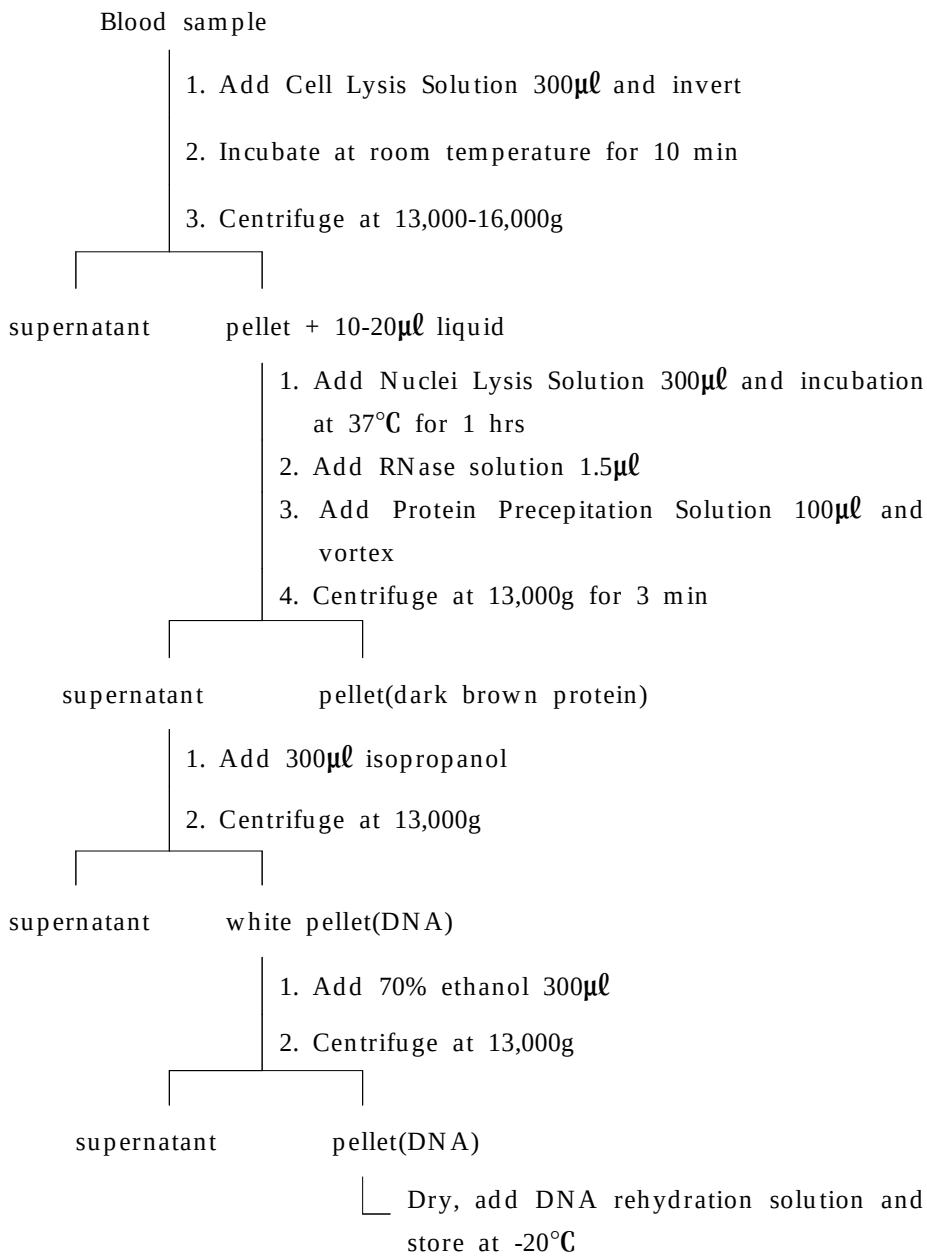
Table 3. DNA extraction method by phenol solution


Blood sample
1300g, 10' centrifuge
supernatant
buffy coat
pellet
1. Resuspend the buffy coat obtatined in extraction buffer
2. 37℃, 1hr incubation
supernatant
buffy coat
pellet
1. Proteinase K(100㎍/㎕)
2. 50℃, 3hr incubation
3. Add Tris/ phenol, vortex, centrifuge(2cycles)
supernatant(DNA)
phenol(protein)
Add Phenol/ Chloroform, vortex and centrifuge(2 cycles)
supernatant
phenol(protein)
Add chloroform, vortex and centrifuge(2 cycles)
supernatant
phenol(protein)
1. Add ethanol, salt(NH4Cl)
2. Store -4℃ for over 3hrs
3. Refreged microcentrifuge at 4℃ for 10 min
supernatant
pellet(DNA)
Dry, add dH2O or TE buffer, and store -20℃

나. Wizard genomic DNA purification kits(Promega)에 의한 방법

준비된 품종별 돼지의 혈액 300㎕에 cell lysis solution 300㎕을 첨가하고 5 6번 invert한 후, room temperature에서 10분동안 incubation시켜 두었다가 13,000 16,000 rpm에서 20초동안 centrifuge하였다. centrifuge에 의해 solution의 분리가 일어나면 supernatant부분을 10 20㎕ 정도만 남겨두고 pipette으로 제거하였다. 남아 있는 liquid부분과 pellet층에 nuclei lysis solution 300㎕을 첨가하고 37℃에서 1시간동안 incubation시켜두었다. 이때 RNAase(2㎎/㎖)를 1.5㎕ 첨가해서 15분정도 incubation하였다. Cell lysis가 일어났을 때쯤(약 1시간), protein precipitation solution 100㎕을 첨가하고 vortex한 후 3분동안 13,000 16,000rpm으로 centrifuge해서 supernatant층을 수거하였다. 얻어진 supernatant부분에 isopropanol 300㎕을 첨가해서 13,000 16,000rpm에서 1분동안 centrifuge하여 DNA pellet을 얻었다. Ethanol층 부분은 완전히 제거하고 침전된 pellet에는 70% ethanol 300㎕을 첨가해서 washing한 후 ethanol을 완전히 제거한 후 DNA rehydration solution으로 DNA를 녹여서 -20℃에서 보관하였다. 그 분석절차는 table 4와 같았다.

Table 4. DNA extraction method by Wizard genomic DNA purification kits(Promega)



3. 결과 및 고찰

품종별 돼지의 혈액에서 DNA를 분리하는 방법은 phenol extraction에 의한 방법보다는 kits를 이용하는 것이 보다 효과적이었다. kits에 의해 DNA 분리는 한번에 많은 량의 DNA를 분리해 낼 수 있고 시간의 소모도 훨씬 적어서 이 방법이 유용하였으나, 반면에 비용이 많이 들고 phenol에 의한 방법보다는 순도가 떨어지는 단점이 있었다. 분리된 DNA의 농도는 품종별로 차이가 나타나기 때문에 spectrophotometer나 agarose gel 전기영동으로 DNA의 농도를 확인하여 PCR에 적합한 농도로 조절하여 이용하였다.

혈액 300㎕으로 kits에 의해 DNA를 분리하여 1% agarose gel에 loading한 결과를 figure 1에 나타내었다. 분리된 모든 DNA의 농도가 이와 같지는 않았으나 대체적으로 kits에 의해 분리시마다 거의 비슷한 농도 수준을 나타내었다. phenol에 의한 방법에서는 DNA의 농도와 거의 비슷한 수준으로 DNA를 분리하기 위해서는 1㎖정도의 혈액이 소모되고 분리 절차 및 시간소모가 크다는 단점을 지녔으나 더욱 순도가 높게 분리가 가능하다는 장점도 있었다.

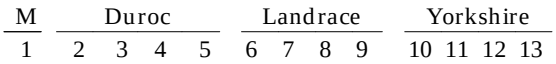


Figure 1. Acquired genomic DNA in 1% agarose gel electrophoresis
Lane 1; ¥ DNA/ Hind III + EcoR I size marker, lane 2-5; Duroc, lane 6-9; Landrace, and lane 10-13; Yorkshire breed.

제 5 절. RAPD marker 개발조건 확립

1. 서언

실험에 있어서 분석과정도 중요하겠으나 그에 못지않게 아주 중요한 단계가 실험을 위한 준비단계라 하겠다. 그러므로 3년동안의 실험을 위한 marker의 개발조건은 1차년도에는 PCR protocol 참조로 여러번의 PCR test를 반복수행하여 가장 적합한 조건을 확립하고자 심혈을 기울였다. 특히 본 연구에서는 10 base primer 800개와 primer pairs 2,224개를 이용하였으므로 primer에 따른 조건확립은 상당히 어렵고도 중요하였다. PCR의 annealing temperature의 경우에 primer의 base 길이와 GC 함량의 영향을 많이 받으므로 이부분에 대한 조건을 정확하게 확립하고자 노력하였으나 모든 primer에 대한 정확한 조건을 규명할 수는 없었고, base의 길이에 따라서 PCR condition을 정하여 모든 primer를 검색하도록 하였다.

그리고 PCR에 있어서 주요 factor는 enzyme의 농도와 DNA의 농도였다. DNA는 매번 분리시마다 농도에서 약간씩 차이를 보일 수 있어서 처음 조건을 정하는 단계가 상당히 중요하게 작용하였다. 그래서 오차가 생길 수 있는 부분을 고려하여 spectrophotometer와 agarose gel 전기영동으로서 정확한 농도를 확인하고자 하였고 다시 PCR test로 더욱 정확한 농도를 정하고자 하였다. enzyme은 activity를 매번 측정할 수 없어서 조건을 확립하는데 어려웠으나 여러번의 test로 적합한 농도를 정하여 RAPD marker를 개발하기 위한 조건을 확립하여 본 연구에 이용하였다.

2. 재료 및 방법

1차년도에 수행한 10 base primer의 PCR condition을 확립하기 위해 우선 PCR protocol을 참조하여 각 PCR reagent의 농도비율을 달리하면서

PCR test하였다. DNA와 primer가 specific한 reaction을 나타내는 것과 나머지 solution을 혼합하여 solution의 조건을 정하고 DNA의 농도와 primer의 농도를 각각 변형하면서 적정한 농도 수준을 정하였다. 그리고 정해진 농도에서 PCR solution을 혼합하여 annealing temperature 및 시간별로 thermal cycle을 10 base primer에 적합한 조건을 정하였다.

2차년도에는 추가된 내용으로 primer pairs를 이용한 PCR반응으로 10 base primer의 조건에서 각 primer의 농도 및 annaeling temperature의 변화로 thermal cycle 정하였다. 그러나 primer paris의 경우에는 10 base primer에 비해 낮은 농도의 enzyme을 필요로 함을 여러번의 test로 확인하고 enzyme의 농도도 또한 조절해 주었다.

3. 결과 및 고찰

1차년도에는 전혀 정해진 조건없이 모든 solution의 농도와 thermal cycle을 확립하여야 했으므로 PCR condition 확립에 상당히 많은 시간을 소모하였다. PCR protocol을 참조하기는 하였으나 DNA의 농도, primer의 농도, enzyme의 농도 및 annealing temperature등 여러개의 변수를 맞추는 데에는 어려운 점이 많았다. 그러나 2차년도에는 1차년도에 확립된 조건을 변경, 수정하였으므로 많은 시간의 소모없이 primer pairs에 적합한 조건을 찾을 수가 있었다. 따라서 각 primer에 따라 가장 적합한 조건을 확립할 수는 없었으나, 대부분의 primer에서 좋은 결과를 얻을 수 있는 조건을 정하여 전체적으로 PCR 분석을 수행하도록 하였다.

이렇게 해서 확립된 PCR condition은 table 5, 6과 같고 이 조건에 맞추어서 10 base primer 800개와 pimer pairs 2224개로 Landrace, Yorkshire 그리고 Duroc종의 genomic DNA를 주형으로 PCR하여 세품종에 따른 RAPD marker를 확인하였다.

Table 5. PCR condtion of 10 base primer

PCR mixture		PCR cycle		
10X buffer	2.5㎕	1st cycle		50 cycles
25mM MgCl2	2 ㎕	94℃ 2분		94℃ 30초
2.5mM dNTPs	2 ㎕	35℃ 1분	⟶	35℃ 1분
16ng/㎕ primer	4 ㎕	72℃ 2분		72℃ 1분
5-10ng/㎕ DNA	5 ㎕		⟶	72℃ 10분
5U/㎕ Taq polymerase	0.2 ㎕		⟶	4℃ 저장

Table 6. PCR condition of primer pairs

PCR mixture		PCR cycle		
10X buffer	2.5㎕	1st cycle		50 cycles
25mM MgCl2	2 ㎕	94℃ 2분		94℃ 1분
2.5mM dNTPs	2 ㎕	45℃ 1분	⟶	45℃ 1분
16ng/㎕ primer	2 ㎕	72℃ 2분		72℃ 1분
5-10ng/㎕ DNA	5 ㎕		⟶	72℃ 10분
5U/㎕ Taq polymerase	0.1㎕		⟶	4℃ 저장

제 6 절. RAPD marker 개발

1. 서언

PCR protocol을 참조로 하여 여러번의 반복실험에 의해 확립된 RAPD marker 개발 조건으로 PCR을 수행하였다. RAPD 분석법의 장점은 전체 genomic DNA의 sequence를 알지 못하는 상황에서 적은 DNA량으로 간편하게 실험할 수 있다는 것이다. 이러한 장점 때문에 본 연구에서는 품종식별용 marker 개발을 위한 DNA 분석방법을 RFLP나 DFP 방법이 아닌 RAPD 분석법을 선택하였다.

품종식별용 특이 RAPD marker를 확보하고자 1차년도에 UBC(The University of British Columbia)에서 제조 판매되는 800개 10 base random primer를 이용하고 2차년도부터 69개 single primer를 2개씩 병합한 2,224개 primer paris를 이용하여 PCR을 수행하였다. Landrace, Yorkshire 그리고 Duroc 각각의 품종에 특이한 marker를 개발하고자 우선 정립된 조건에 맞추어서 모든 primer로 PCR을 수행하였다. 1차년도의 10 base primer 800개와 2차년도부터 추가로 수행된 primer pairs 2,224개는 전체적으로 screen하여 polymorphism이 나타나는 primer는 선별하여 다시 여러번의 PCR로 재현성있는 결과가 나타나는지 확인하였다. 앞에서 설명한 바와 같이 RAPD-PCR방법은 isotope 사용의 필요성도 없고 적은 농도의 DNA로 간편하게 genome의 polymorphism 분석이 가능하였으나 또한 무작위적인 primer 제조에 의한 결과의 정확성이 다소 떨어져 재현이 잘 되지 않는다는 단점이 존재하여 품종별 RAPD marker를 확보하는데 많은 어려움이 뒤따랐다. 또한 공시된 품종내에서도 계통별로 유전적으로 많은 차이점이 발생되고 있어 국내에 유통되고 있는 종돈의 유전정보를 정확하게 분석하기 위해서는 일차적으로 종돈수입시 수입할 종돈과 국내에서 생

산보급하는 종돈에 대한 유전정보의 정확성에 대한 검증을 해야만이 국내 양돈산업을 안정적으로 발전시킬 수 있을 것으로 본다.

2. 재료 및 방법

확립된 PCR condition으로 1차년도에는 10 base primer(table 7) 800개와 polymorphic band의 발생 및 재현성을 높이기 위해 2차년도에 추가계획된 69개 single primer(table 8)를 2개씩 병합한 primer pairs 2224개를 순서대로 확인하였다. 모든 primer를 일차적으로 확인하고 나서, polymorphic band가 잘 나타난 primer는 선택하여 2번 이상 PCR을 반복 수행하여 재현율이 높은 ploymorphic band를 확보하고자 하였다.

2차년도에는 재현성 검증을 위해 품종별 15두씩의 DNA sample로서 polymorphism이 나타난 primer를 선별하여 확인작업을 수행하였고, 3차년도에는 품종별 5두씩의 DNA로서 polymorphism을 다시한번 확인하였다.

Table 7. Sequence of 10 base primer

Number	Sequence	Number	Sequence
101	GCGGCTGGAG	140	GTCGCATTTC
102	GGTGGGGACT	141	ATCCTGTTCG
103	GTGACGCCGC	142	ATCTGTTCGG
104	GGGCAATGAT	143	TCGCAGAACG
105	CTCGGGTGGG	144	AGAGGGTTCT
106	CGTCTGCCCG	145	TGTCGGTTGC
107	CTGTCCCTTT	146	ATGTGTTGCG
108	GTATTGCCCT	147	GTGCGTCCTC
109	TGTACGTGAC	148	TGTCCACCAG
110	TAGCCCGCTT	149	AGCAGCGTGG
111	AGTAGACGGG	150	GAAGGCTCTG
112	GCTTGTGAAC	151	GCTGTAGTGT
113	ATCCCAAGAG	152	CGCACCGCAC
114	TGACCGAGAC	153	GAGTCACGAG
115	TTCCGCGGGC	154	TCCATGCCGT
116	TACGATGACG	155	CTGGCGGCTG
117	TTAGCGGTCT	156	GCCTGGTTGC
118	CCCGTTTTGT	157	CGTGGGCAGG
119	ATTGGGCGAT	158	TAGCCGTGGC
120	GAATTTCCCC	159	GAGCCCGTAG
121	ATACAGGGAG	160	CGATTCAGAG
122	GTAGACGAGC	161	CGTTATCTCG
123	GTCTTTCAGG	162	AACTTACCGC
124	ACTCGAAGTC	163	CCCCCCAGAT
125	GCGGTTGAGG	164	CCAAGATGCT
126	CTTTCGTGCT	165	GAAGGCACTG
127	ATCTGGCAGC	166	ACTGCTACAG
128	GCATATTCCG	167	CCAATTCACG
129	GCGGTATAGT	168	CTAGATGTGC
130	GGTTATCCTC	169	ACGACGTAGG
131	GAAACAGCGT	170	ATCTCTCCTG
132	AGGGATCTCC	171	AGACCCCTCC
133	GGAAACCTCT	172	ACCGTCGTAG
134	AACACACGAG	173	CAGGCGGCGT
135	AAGCTGCGAG	174	AACGGGCAGC
136	TACGTCTTGC	175	TGGTGCTGAT
137	GGTCTCTCCC	176	CAAGGGAGGT
138	GCTTCCCCTT	177	TCAGGCAGTC
139	CCCAATCTTC	178	CCGTCATTGG

Number	Sequence	Number	Sequence
179	TCACTGTACG	218	CTCAGCCCAG
180	GGGCCACGCT	219	GTGACCTCAG
181	ATGACGACGG	220	GTCGATGTCG
182	GTTCTCGTGT	221	CCCGTCAATA
183	CGTGATTGCT	222	AAGCCTCCCC
184	CAAACGGCAC	223	GATCCATTGC
185	GTGTCTTCAC	224	TCTCCGGTAT
186	GTGCGTCGCT	225	CGACTCACAG
187	AACGGGGGAG	226	GGGCCTCTAT
188	GCTGGACATC	227	CTAGAGGTCC
189	TGCTAGCCTC	228	GCTGGGCCGA
190	AGAATCCGCC	229	CCACCCAGAG
191	CGATGGCTTT	230	CGTCGCCCAT
192	GCAAGTCACT	231	AGGGAGTTCC
193	TGCTGGCTTT	232	CGGTGACATC
194	AGGACGTGCC	233	CTATGCGCGC
195	GATCTCAGCG	234	TCCACGGACG
196	CTCCTCCCCC	235	CTGAGGCAAA
197	TCCCCGTTCC	236	ATCGTACGTG
198	GCAGGACTGC	237	CGACCAGAGC
199	GCTCCCCCAC	238	CTGTCCAGCA
200	TCGGGATATG	239	CTGAAGCGGA
201	CTGGGGATTT	240	ATGTTCCAGG
202	GAGCACTTAC	241	GCCCGACGCG
203	CACGGCGAGT	242	CACTCTTTGC
204	TTCGGGCCGT	243	GGGTGAACCG
205	CGGTTTGGAA	244	CAGCCAACCG
206	GAGGACGTCC	245	CGCCTGCCAG
207	CATATCAGGG	246	TATGGTCCGG
208	ACGGCCGACC	247	TACCGACGGA
209	TGCACTGGAG	248	GAGTAAGCGG
210	GCACCGAGAG	249	GCATCTACCG
211	GAAGCGCGAT	250	CGACAGTCCC
212	GCTGCGTGAC	251	CTTGACGGGG
213	CAGCGAACTA	252	CTGGTGATGT
214	CATGTGCTTG	253	CCGTGCAGTA
215	TCACACGTGC	254	CGCCCCCATT
216	CATAGACTCC	255	TTCCTCCGGA
217	ACAGGTAGAC	256	TGCAGTCGAA

Number	Sequence	Number	Sequence
257	CGTCACCGTT	296	CCGCTGGGAG
258	CAGGATACCA	297	GCGCATTAGA
259	GGTACGTACT	298	CCGTACGGAC
260	TCTCAGCTAC	299	TGTCAGCGGT
261	CTGGCGTGAC	300	GGCTAGGGCG
262	CGCCCCCAGT	301	CGGTGGCGAA
263	TTAGAGACGG	302	CGGCCCACGT
264	TCCACCGAGC	303	GCGGGAGACC
265	CAGCTGTTCA	304	AGTCCTCGCC
266	CCACTCACCG	305	GCTGGTACCC
267	CCATCTTGTC	306	GTCCTCGTAG
268	AGGCCGCTTA	307	CGCATTTGCA
269	CCAGTTCGCC	308	AGCGGCTAGG
270	TGCGCGCGGG	309	ACATCCTGCG
271	GCCATCAAGA	310	ACATCCTGCG
272	AGCGGGCCAA	311	GAGCCAGAAG
273	AATGTCGCCA	312	GGTAACCGTA
274	GTTCCCGAGT	313	ACGGCGTCAC
275	CCGGGCAAGC	134	ACTTCCTCCA
276	AGGATCAAGC	315	GGTCTCCTAG
277	AGGAAGGTGC	316	CCTCACCTGT
278	GGTTCCAGCT	317	CTAGGGGCTG
279	AGACATTAGA	318	CGGAGAGCGA
280	CTGGGAGTGG	319	GTGGCCGCGC
281	GAGAGTGGAA	320	CCGGCATAGA
282	GGGAAAGCAG	321	ATCTAGGGAC
283	CGGCCACCGT	322	GCCGCTACTA
284	CAGGCGCACA	323	GACATCTCGC
285	GGGCGCCTAG	324	ACAGGGAACG
286	CGGAGCCGGC	325	TCTAAGCTCG
287	CGAACGGCGG	326	CGGATCTCTA
288	CCTCCT6TGAC	327	ATACGGCGTC
289	ATCAAGCTGC	328	ATGGCCTTAC
290	CCGCGAGCAC	329	GCGAACCTCC
291	AGCTGAAGAG	330	GGTGGTTTCC
292	AAACAGCCCG	331	GCCTAGTCAC
293	TCGTGTTGCT	332	AACGCGTAGA
294	TGATTGGCCA	333	GAATGCGACG
295	CGCGTTCCTG	334	ATGGCAAAGC

Number	Sequence	Number	Sequence
335	TGGACCACCC	374	GGTCAACCCT
336	GCCACGGAGA	375	CCGGACACGA
337	TCCCGAACCG	376	CAGGACATCG
338	CTGTGGCGGT	377	GACGGAAGAG
339	CTCACTTGGG	378	GACAACAGGA
340	GAGAGGCACC	379	GGGCTAGGGT
341	CTGGGGCCGT	380	AGGAGTGAGA
342	GAGATCCCTC	381	ATGAGTCCTG
343	TGTTAGGCTC	382	ATACACCAGC
344	TGTTAGGCAC	383	GAGGCGCTGC
345	GCGTGACCCG	384	TGCGCCGCTA
346	TAGGCGAACG	385	ACCGGGAACG
347	TTGCTTGGCG	386	TGTAAGCTCG
348	CACGGCTGCG	387	CGCTGTCGCC
349	GGAGCCCCCT	388	CGGTCGCGTC
350	TGACGCGCTC	389	CGCCCGCAGT
351	CTCCCGGTGG	390	TCACTCAGAG
352	CACAACGGGT	391	GCGAACCTCG
353	TGGGCTCGCT	392	CCTGGTGGTT
354	CTAGAGGCCG	393	TTCCATGCCT
355	GTATGGGGCT	394	TCACGCAGTT
356	AGGCCAAATG	395	TCACTTGAGA
357	GGTCAGGCCC	396	GAATGCGAGG
358	AGGCAGACCT	397	GGGCTGTGCC
559	AGGCAGACCT	398	CAGTGCTCTT
360	CTCTCCAGGC	399	TTGCTGGGCG
361	GCGAGGTGCT	400	GCCCTGATAT
362	CCGCCTTACA	401	TAGGACAGTC
363	ATGACGTTGA	402	CCCGCCGTTG
364	GGCTCTCGCG	403	GGAAGGCTGT
365	TAGACAGAGG	404	TCTCTACGAC
366	CCTGATTGCC	405	CTCTCGTGCG
367	ACCTTTGGCT	406	GCCACCTCCT
368	ACTTGTGCGG	407	TGGTCCTGGC
369	GCGCATAGCA	408	CCGTCTCTTTT
370	TCAGCCAGCG	409	TAGGCGGCGG
371	TCTCGATTGC	410	CGTCACAGAG
372	CCCACTGACG	411	GAGGCCCGTT
373	CTGAGGAGTG	412	TGCGCCGGTG

Number	Sequence	Number	Sequence
413	GAGGCGGCGA	452	CTAATCACGG
414	AAGGCACCAG	453	AGTAGAAGGG
415	GTTCCAGCAG	454	GCTTACGGCA
416	GTGTTTCCGG	455	AGCAAGCCGG
417	GACAGGCCAA	456	GCGGAGGTCC
418	GAGGAAGCTT	457	CGACGCCCTG
419	TACGTGCCCG	458	CTCACATGCC
420	GCAGGGTTCG	459	GCGTCGAGGG
421	ACGGCCCACC	460	ACTGACCGGC
422	CACCTGCGGG	461	CCCGTATGTC
423	GGGTCTCGAA	462	CATAGCGGCA
424	ACGGAGGTTC	463	AGGCGGAAGC
425	CGTCGGGCCT	464	CACAAGCCTG
426	TCTCCCGGTG	465	GGTCAGGGCT
427	GTAATCGACG	466	TTCTTAGCGG
428	GGCTGCGGTA	467	AGCACGGGCA
429	AAACCTGGAC	468	ACGGAAGCGC
430	AGTCGGCACC	469	CTCCAGCAAA
431	CTGCGGGTCA	470	AGGAGCTGGG
432	AGCGTCGACT	471	CCGACCGGAA
433	TCACGTGCCT	472	AGGCGTGCAA
434	TCGCTAGTCC	473	ATCCCCAAGA
435	CTAGTAGGGG	474	AGGCGGGAAC
436	GAGGGGGCCA	475	CCAGCGTATT
437	AGTCCGCTGC	476	TTGAGGCCCT
438	AGACGGCCGG	477	TGTTGTGCCC
439	GCCCCTTGAC	478	CGAGCTGGTC
440	CTGTCGAACC	479	CTCATACGCG
441	CTGCGTTCTT	480	GGAGGGGGGA
442	CTACTCGGTT	481	GTAATTGCGC
443	TGATTGCTCG	482	CTATAGGCCG
444	GCAGCCCCAT	483	GCACTAAGAC
445	TAGCAGCTTG	484	CTGGCAAGGA
446	GCCAGCGTTC	485	AGAATAGGGC
447	CAGGCTCTAG	486	CCAGCATCAG
448	GTTGTGCCTG	487	GTGGCTAGGT
449	GAGGTTCAAC	488	TTCGCTTCTC
450	CGGAGAGCCC	489	CGCACGCACA
451	CTAATCTCGC	490	AGTCGACCTT

Number	Sequence	Number	Sequence
491	TCCTGTCAAG	530	AATAACCGCC
492	GTGACTGCTC	531	GCTCACTGTT
493	CCGAATCACT	532	TTGAGACAGG
494	TGATGCTGTC	533	GCATCTACGC
495	CTTTCCTTCC	534	CACCCCCTGC
496	CCTTTCAAGG	535	CCACCAACAG
497	GCATAGTGCG	536	GCCCCTCGTC
498	GACAGTCCTG	537	CGAAAGGACT
499	GGCCGATGAT	538	TGACCTCTCC
500	TTGCGTCATG	539	CTTACGTCAC
501	CGGATATACC	540	CGGACCGCGT
502	GCATGGTAGC	541	GCCCCTTTAC
503	ATCGTCCAAC	542	CCCATGGCCC
504	ACCGTGCGTC	543	CGCTTCGGGT
505	CCCTTTACAC	544	TAGAGACTCC
506	CCTTTCCCGA	545	ACGTTGAGAC
507	AGACGTACTC	546	CCCGCAGAGT
508	CGGGGCGGAA	547	TATGACCTGG
509	ACAGAGACTG	548	GTACATGGGC
510	CGCATCTCTT	549	CCGGCTTATG
511	GAATGGTGAG	550	GTCGCCTGAG
512	GGGTGGACAT	551	GGAAGTCCAC
513	TATACGACCC	552	CTAAATGGCG
514	CGGTTAGACG	553	TTCGAGATCG
515	GGGGGCCTCA	554	TCATCCAGGG
516	AGCGCCGACG	555	GTGAACAGCA
517	GGTCGCAGCT	556	ATGGATGACG
518	TGCTGGTCCA	557	GTGTAGAGCC
519	ACCGGACACT	558	CGATATCCGG
520	TGCGCAGCCC	559	GAGAACTGGC
521	CCGCCCCACT	560	CACTGCTGTC
522	TCGTCTAGCA	561	CATAACGACC
523	ACAGGCAGAC	562	CAAAGTAGCC
524	CGGTTACTAG	563	CGCCGCTCCT
525	GCTGGTTGGA	564	CGGCGTTAGC
526	AACGGGCACC	565	GGTCGATTTC
527	CTTCAACGTG	566	CCACATGCGA
528	GGATCTATGC	567	AGACACCTGA
529	CACTCCTACA	568	ACCTGTTCTC

Number	Sequence	Number	Sequence
569	CGAATTGCTG	607	AGTGTCGTCG
570	GGCCGCTAAT	608	GAGCCCGAAA
571	GCGCGGCACT	609	AGAGCACCAT
572	TTCGACCATC	610	TTTGCCGCCC
573	CCCTAATCAG	611	CCATCGTACC
574	GCCAGACAAG	612	CCGTGAGTAT
575	GGAGATGTAC	613	TGCACCCACG
576	CACCTAATGG	614	GTAGTCTCGC
577	GTCTGATGTG	615	CGTCGAGCGG
578	GGTGTCCACT	616	CGGAAGAAAC
579	TGGAATCGTG	617	CGGACTATGT
580	GCGATAGTCC	618	CGGACTATGT
581	CCCGTTAAGG	619	TTCCCTAGCG
582	GGTATAGACG	620	TTGCGCCCGG
583	GTATTTGCGC	621	GTCTGCGCTA
584	GCGGGCAGGA	622	ACAGGTGGTT
585	CCCGCGAGTC	623	TGCGGGACTG
586	CCGGTTCCAG	624	GTGATAAGCC
587	GCTACTAACC	625	CCGCTGGAGC
588	CAGAGGTTGG	626	CCAAGCCCGG
589	GACGGAGGTC	627	GGATTCACAG
590	CCGGCATGTT	628	GTCTGGTTAG
591	TCCCTCGTGG	629	GCAAGTATGC
592	GGGCGAGTGC	630	CACTCTCTGG
593	CGAGCTTTGA	631	GGCTTAACCG
594	AGGAGCTGGC	632	GAGTTTACCC
595	GTCACCGCGC	633	CGTTGTATCC
596	CCCCTCGAAT	634	CCGTACACGC
597	TGGTTCCCGA	635	CTCAGCTCAG
598	ACGGGCGCTC	636	GGGATATCGC
599	CAAGAACCGC	637	CCCTAAAGCG
600	GAAGAACCGC	638	GCGGTGACTA
601	CCGCCCACTG	639	ATCGAGCACC
602	GCGAAGACTA	640	CCTGGGGCCT
603	ACCCACCGCG	641	TGGAACCATG
604	GGCCCATTGC	642	GTGGTCTCGA
605	CCGATCATTC	643	ATAAGCGGTG
605	CGGTCGGCCA	644	TCGTATTGGG
606	CGGTCGGCCA	645	TACAGCGTTG

Number	Sequence	Number	Sequence
646	GTCCACTTCC	685	GATCGCAGGC
647	CCTGTGGGGG	686	CGTGACAGGA
648	GCACGCGAGA	687	ATACAAGGGG
649	AATGCTGGAC	688	GCAGGAGCGT
650	AGTATGCAGC	689	TGTCCGGAAG
651	TCATTTCGCC	690	TAATCCGGTC
652	CCCAACACAC	691	AAACCAGGCG
653	CATGCAAGAC	692	ACATTGGGGG
654	CCCTGGTCTG	693	GACGAGACGG
655	GCATTTCCCG	694	GGTTTGGAGG
656	CGTAACCTTG	695	GCTAATCAGC
657	GTCCTTTAGC	696	CGGACATGGC
658	CCTATGTACC	697	CGCAGGTCAC
659	CGGTTTCGTA	698	CTAGACGTTG
660	AGACGCCGAC	699	GTTACTGCCC
661	CCTGCTTACG	700	GGACTAAGGT
662	GGCTACGTCT	701	CCCACAACCC
663	CGTATAGCCG	702	GGGAGAAGGG
664	GCCTGAAAAC	703	CCAACCACCC
665	GACGCTTTTC	704	GGAAGGAGGG
666	CTTAACACGC	705	GGAGGAAGGG
667	CGCAGAAATC	706	GGTGGTTGGG
668	CCCGATTGAG	707	CCCAACACCC
669	GTTAGACCAC	708	GGGTTGTGGG
670	CCCTTGAGAC	709	CCTCCTCCCT
671	CATTAAGGCG	710	GGTGGTGGGT
672	TACCGTGGCG	711	CCCTCTCCCT
673	TTCATACGCG	712	GGGTGTGGGT
674	ATCGATCCGG	713	CCCTCCCTCT
675	ACCGGTGGAG	714	GGGTGGGTGT
676	GCTAACGTCC	715	CCACCACCCA
677	TCTCAGGACA	716	GGAGGAGGGA
678	AGCGGAGCTG	717	CCCACACCCA
679	GATGGGGTGG	718	GGGAGAGGGA
680	AATGAGAGCC	719	CCCACCCACA
681	CCCCCGGACT	720	GGGAGGGAGA
682	CTGCGACGGT	721	CCCTTCCCTC
683	TATTACCGCC	722	CCTCTCCCTC
684	CCACACGTAG	723	CCCTCTCCTC

Number	Sequence	Number	Sequence
724	CTCCCTCCTC	763	CACACCACCC
725	GGGTTGGGTG	764	CTCTCCTCCC
726	GGTGTGGGTG	765	AGGGAGGAGG
727	GGGTGTGGTG	766	TGGGTGGTGG
728	GTGGGTGGTC	767	ACCCACCACC
729	CCCAACCCAC	768	TCCCTCCTCC
730	CCACACCCAC	769	GGGTGGTGGG
731	CCCACACCAC	770	GGGAGGAGGG
732	CACCCACCAC	771	CCCTCCTCCC
733	GGGAAGGGAG	772	CCCACCACCC
734	GGAGAGGGAG	773	GGGTTGTTGG
735	GGGAGAGGAG	774	GGTGTGTGGT
736	GAGGGAGGAG	775	GGTTTGGTGG
737	GGTGGGTGTG	776	CTTCCCTCCT
738	GGTGGGTGGT	777	GGAGAGGAGA
739	GGAGGGAGAG	778	CCACACCACA
740	GGAGGGAGGA	779	CCTTTCTCCC
741	CCTCCCTCTC	780	CCTCTTCCTC
742	CCTCCCTCCT	781	GGGAAGAAGG
743	CCACCCACAC	782	GGGAAGAGAG
744	CCACCCACCA	783	GGGAAGAGAG
745	GGGAAGAGGG	784	GGTGGGTTGT
746	GGGTGTTGGG	785	GTGGGTGTTG
747	CCACCAACCC	786	TCCCTTCCTC
748	CCCTTCTCCC	787	CCCTTCTTCC
749	GGGAGGAGAG	788	CCTTCCCTCT
750	GGGTGGTGTG	789	GGAAGGGAGA
751	CCCACCACAC	790	GGGTGTGGTT
752	CCCTCCTCTC	791	GTGGGTTGTG
753	GGGAGGAGGA	792	CAACCCACAC
754	GGGTGGTGGT	793	CTCCTCTCTC
755	CCCACCACCA	794	GAGGGGAAAG
756	CCCTCCTCCT	795	TGGTGTGGGT
757	GGAAGGAGAA	796	AGAGGGAGGA
758	GGTTGGGTGG	797	CCACCAACAC
759	CCAACCCACC	798	GAGAGGAAGG
760	CCTTCCCTCC	799	TGTGGTGGTG
761	GAGAGGAGGG	800	TCTCCCTCCT
762	GTGTGGTGGG		

Table 8. Sequence of primers

#	Sequence	#	Seqence
1	AACAAGACACCAAACCT	38	CATCTCCTTGTAACATG
2	GGCTTACATCTAATGCG	39	GTTTGACTTAGACTTCA
3	TTGCAACTGTAAGACAG	40	CTTCTGCTAGTGGAGGA
4	GATGAACAGGCAATATG	41	AACTCGAATCCCTAGGA
5	AGGTAGTCTAGTTAACC	42	CAAGAGCCTTTACAGCAA
6	GGTAAGACTTTTGAAA(G)	43	CATTGGAGTTAGACTAG
7	CCTAACTTGCTAAAAGT	44	ATCGATAAAAACACAAC
8	GCGCTTATCTACAGCGG	45	TTTGCTTGGATTTCTT(C)
9	GCGTGCAATTTATGATG	46	TGTAACAAAATGGATAC(G)
10	GAACCAAAGCTAAGTGG	47	GAATATCCTGAATTAG(C)
11	CTCTGTCGCTGAGGATC	48	CCCAAAACTCGAATCCC
12	AACAACTAGAGGCCACA	49	GCAATCTCACCTGCAAA
13	CTACCTACTCGAAGAAG	50	GAGAGGATAATTGACCC
14	GGCGTTGTTTTGAGTTT	51	CAACCAAAGTAACCAT(C)
15	GTCAGACTCCGTGAGTT	52	GTGCTTCTATTCAGAGA
16	TTGCTAATGGGTGTGAT	53	TTGGGCTCTAAGGTCTC
17	AGAAAGCAAGTGAACCA	54	AAGACCGTCTCGATTAT
18	GTGCGTAGGTTTAGAAA	55	CTTTTGTAGAGTGCGTAGG
19	AATTCCCGGG	56	TAGTGAGTCAACAGAG(A)
20	TTGGTACATACCTGTCT	57	GGATCCATGGAAGATAACAA
21	TCCTTTGCCGCAGCTGA	58	GGTTACCAGCTCCACTT
22	AGGCTTACAAAAGTTGCT	59	AGGTAGTCTAGTTAACC
23	GTATTACTGAACAAACC	60	AAGACCGTCTCGATTAT
24	CCCTTAGTGACTTAAATTCA	61	TTGGGTGCTTATCATGT
25	CCGAATTCTTACTCTGCAGTAG AAGT	62	GCTTACAAAGCCTTCGT
26	ATAAAATCAAAAAATGGATA	63	AAGACCGTCTCGATTAT
27	CGCAGATGATTCTGTCC	64	GACTAAGGACATGTGCT
28	TAGGATAAGAAGGTCGT	65	CCTCAATAATCCTGGGT
29	CCAAGAACAGAGATGTCAATG	66	TCTCTGAATGAGGCCTA
30	CAACCAAGTGTACATC(T)	67	GCGTTGAAGACCTCTAA
31	AACAACTAGAGGCCACA	68	TGTGAACCAGATCCTTT
32	GATACCCTTATTCTAGAATT	69	AAGAGCTAAGTGTTAA(G)
33	TCAGGATGAGCGAATC(A)	70	ATTGCATCTGAGGTAGC
34	TTCTACTCTCTCTATAA	71	AGCGAACTGTTGAGAGT
35	AATCTGAAGCCTCTCTT		
36	TCTCAGGAATCTTACA(T)		
37	GTTAGGAAAGAGATCCG		

- 60 17-mer, 1 10-mer, 3 18-mer, 1 19-mer, 4 20-mer

3. 결과 및 고찰

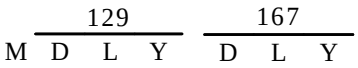
가. 10 base primer

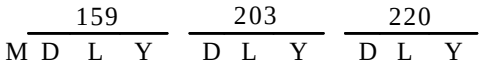
1차년도에 Landrace, Yorkshire 그리고 Duroc종의 각 품종식별용 RAPD marker를 확보하고자 UBC의 10 base primer 800개로서 확립된 조건에 맞추어 PCR을 수행하였다. 10 base는 primer의 size가 짧아 재현성이 다소 떨어지는 문제점이 있어 2차년도에는 다시 69개의 primer를 pairs로 2224개 추가하여 더욱 polymorphic band의 발생과 재현성이 높은 marker를 확보하고자 하였다. 여러번의 반복적인 PCR 분석에 의해 800개 10 base primer중에서 재현성이 높은 19개의 primer를 확보할 수 있었다.

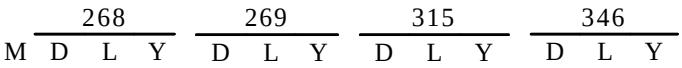
PCR 결과는 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인되어졌고, polymorphic band가 출현한 19개 primer에서 나타난 25개 polymorphic band의 결과는 figure 2와 같았으며, 전체 polymorphic band를 세 품종중 두 품종간의 차이로 비교한 것은 table 9와 같았다.

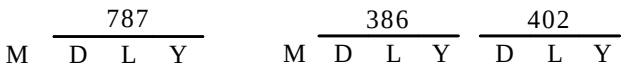
각 품종별 polymorphic band의 갯수는 Duroc에 13개, Landrace에 13개, Yorkshire에 12개로 나타났다. 각 품종별로 출현 band는 loading된 gel 상의 윗쪽에서부터 순서대로 번호를 매겨 각 band를 식별할 수 있도록 하였으며, 출현된 band중 polymorphic band는 품종간의 비교를 통해 쉽게 marker를 구별할 수 있도록 나타내었다.

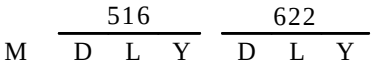
이들 품종별 polymorphic band는 품종을 식별하는데 이용하여 품종간 유전자 교류를 검색하므로서 품종의 순수성을 판별하는데 도움이 될 것이다.


129
167
M D L Y
D L Y


159
203
220
M D L Y
D L Y
D L Y


268
269
315
346
M D L Y
D L Y
D L Y
D L Y





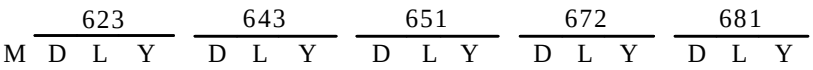


Figure 2. Example of PCR products by 10 base primer ; 10㎕ out of 25㎕ PCR products was proceeded 1.2% agarose gel electrophoresis. M is ㅈDNA/HindIII size marker, D is Duroc, L is Landrace, and Y is Yorkshire.

Table 9. Polymorphic band of 10 base primer

#	Size (kb)	D/ L	L/ Y	Y/ D	#	Size (kb)	D/ L	L/ Y	Y/ D
129	2.0	-	L1	D1	386	1.2	-	Y3	Y3
159	2.5	L1	-	Y1	402	0.5	L2	L2	-
	0.4	-	Y7	Y7	516	2.0	-	L2	D2
167	2.3	-	L1	D1	622	1.0	L1	-	Y1
203	0.3	D4	Y4	-		0.8	D1	-	D1
220	2.3	L1	-	Y1		0.5	L4	-	Y4
	0.3	D3	-	D3	623	0.1	L6	L6	-
268	0.15	D2	Y2	-	643	2.0	D2	Y2	-
269	1.8	-	L2	D2	651	0.9	L4	L4	-
315	0.7	D2	-	D2	672	1.0	D1	-	D1
	0.6	L2	-	Y2		0.7	L1	-	Y1
					681	0.4	D1	-	D1
346	2.0	D1	-	D1	787	0.5	-	Y1	Y1
Duroc : 13 Landrace : 13 Yorkshire : 12 (총 25개)									

D/ L(D/ Y, L/ Y) is polymorphic band between Duroc(Landrace, Yorkshire) and Landrace(Yorkshire, Duroc).

The polymorphic band's indication is generated as breed initial name and band's number from upper band.

나. primer pairs

더욱 안정적인 결과 확보를 위해 2**차년도에** 69**개** single primer**를** 2**개 씩 병합하여** primer pairs 2,224**개를 추가하여 품종식별** marker**를 개발하기 위해** PCR**을 수행하였다**. **대부분의** primer pairs**에서는** polymorphism **이 나타나지 않고 모두 동일한** band pattern**을 보였고**, 2**차년도에** 2,224**개** primer pairs**를 전체적으로 확인하여** polymorphism**을 나타내는** 80**개**

primer pairs를 선별하였는데, 이와같이 선별된 80개 primer pairs의 재현성 검증을 위해 품종별로 15두씩을 이용하여 PCR test를 수행하였다. 3차년도에는 다시 품종별 5두씩의 종돈을 공시하여 재현성을 검증하여 이중 재현성이 뛰어난 38개 primer pairs에서 67개 polymorphic band는 figure 3에 나타내었고 polymorphic band의 표시는 10 base primer의 경우와 동일한 방법으로 요약하여 table 10에 나타내었다. 더욱 안정적이고 신뢰성 있는 결과를 얻기 위해 primer pairs를 이용한 polymorphic band는 DNA cloning 및 DNA sequencing을 수행하였다.

따라서 38개의 primer pairs에서 나타난 67개의 specific band을 품종식별에 이용하여 각 종돈의 유전적 순수성을 검색하는데 이용할 가치가 있다.

		9+24					9+37			9+38				9+46	
M	D	L	Y		M	D	L	Y		D	L	Y	M	D	L	Y

		9+54				13+15				13+34				13+39	
M	D	L	Y	M	D	L	Y	M	D	L	Y	M	D	L	Y

		13+46				13+49				18+28				18+32	
S	D	L	Y	M	D	L	Y	M	D	L	Y	M	D	L	Y

M D L Y 18+46 M D L Y 18+54 M D L Y 18+62 D L Y 18+65

S D L Y 32+43 D L Y 32+48 M D L Y 34+9 M D L Y 34+18

S D L Y 32+55 D L Y 32+56 D L Y 32+57

	32+59			32+61			32+65		
M	D	L	Y	D	L	Y	D	L	Y

	34+39			34+46			34+47				34+51		
M	D	L	Y	D	L	Y	D	L	Y	M	D	L	Y

	34+54				49+9			49+18				54+46		
M	D	L	Y	M	D	L	Y	D	L	Y	M	D	L	Y

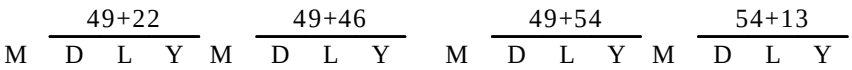


Figure 3. Example of PCR products by primer pairs ; 10㎕ out of 25㎕ PCR products was proceeded 1.2% agarose gel electrophoresis. M is ɣDNA/HindIII+EcoRI size marker, D is Duroc, L is Landrace, and Y is Yorkshire. Numer is generated primer pairs.

Table 10. Polymorphic band of pimer pairs

#	Size (kb)	D/ L	L/ Y	Y/ D	#	Size (kb)	D/ L	L/ Y	Y/ D
9+24	1.1	-	Y1	Y1	32+59	1.35	-	Y1	Y1
9+37	2.0	D1	Y1	-		0.85	D2	-	D2
9+38	0.85	L1	L1	-	32+61	0.5	D3	-	D3
9+46	0.5	-	Y5	Y5		0.3	D4	-	D4
9+54	1.1	-	Y1	Y1	32+65	1.5	L1	L1	-
13+15	1.5	L1	L1	-		0.95	L2	-	Y1
	1.3	D1	-	D1		0.45	L4	-	Y3
	0.55	D5	-	D5	34+9	1.5	L1	L1	-
13+34	1.3	L1	L1	-	34+18	1.9	-	L1	D1
	0.85	D1	-	D1	34+39	1.55	L1	-	Y1
	0.75	L2	L2	-	34+46	1.1	D2	Y2	-
	0.5	-	Y2	Y2		0.98	-	Y3	Y3
13+39	1.2	-	Y2	Y2		0.94	L2	L2	-
13+46	1.3	D1	-	D1		0.6	D3	-	D3
	0.7	L2	-	L2	34+47	1.2	D2	Y2	-
13+49	1.15	-	Y2	Y2	34+51	1.6	D2	-	D2
18+28	1.1	L2	-	Y1	34+54	0.95	-	Y2	Y2
	0.8	D2	Y3	-		0.85	-	Y3	Y3
18+32	0.8	D2	Y2	-		0.5	D3	-	D3
	0.35	D4	Y4	-		0.9	-	Y3	Y3
	0.3	L3	L3	-	49+9	1.6	-	L1	D1
18+46	1.2	L1	-	Y1		1.3	-	Y1	Y1
18+54	0.7	L4	-	Y4		0.4	L5	L5	-
	0.5	-	L5	D5	49+18	1.45	L1	L1	-
18+62	1.2	D1	Y1	-		1.25	D1	-	D1
18+65	0.56	D3	Y3	-	49+22	2.15	L1	L1	-
32+43	0.7	-	L3	D3	49+46	0.5	L3	L3	-
32+48	0.8	-	Y3	Y3	49+54	1.58	L1	L1	-
	0.6	L4	L4	-		1.1	L2	L2	-
32+55	1.0	D3	Y3	-		0.95	D1	-	D1
32+56	0.35	L3	L3	-	54+13	1.1	L1	L1	-
32+57	1.4	-	D3	D3	54+46	0.5	D2	Y2	-
	1.0	-	T4	Y4		0.3	D3	-	D3
	0.5	L3	L3	-					
Duroc : 28 Landrace : 29 Yorkshire : 30 (총 67개)									

D/ L(D/ Y, L/ Y) is polymorphic band between Duroc(Landrace, Yorkshire) and Landrace(Yorkshire, Duroc).

The polymorphic band's indication is generated as breed initial name and band's number from upper band.

제 7 절. DNA cloning과 DNA sequencing

1. 서언

RAPD 분석법의 재현성이 부족하다는 단점을 극복하고자 3차년도에 연구계획에 없었던 것을 추가로 계획하여 polymorphic band의 cloning 및 sequencing을 수행하고, polymorphic band의 sequence에 근거하여 새로운 primer를 합성하여 더욱 안정적인 결과로 품종식별을 위한 marker를 개발하고자 하였다. 이러한 PCR 방법을 SCAR PCR이라 하는데 RAPD 분석에 보다 정확한 결과를 얻기 위해 이용되어지고 있다. Primer에 의해서 다형화로 나타난 RAPD-PCR fragment를 gel로부터 정제하여 cloning과 sequencing을 실시한 후 최초 사용한 RAPD primer 보다 긴(20 30 mer) c-terminal과 n-terminal strand-specific oligonucleotide primer pairs를 만들어 특정 품종의 specific band 하나만을 증폭시키는 새로운 SCAR-PCR(sequence characterized amplified region-PCR) 방법(Paran과 Michelmooe, 1993)을 적용시켰다.

Sequencing을 위한 polymorphic band의 DNA 농도가 적어서 우선적으로 polymorphic band를 gel cutting으로 분리하여 2차 PCR로 DNA를 증폭시켜 cloning하는 과정을 수행하였다. cloning에 이용된 vector는 pBluescript vector로서 PCR products의 ligation을 위해 digestion과 PCR로 T - overhang end로 제조하여 이용하였다. PCR products의 cloning을 위해 이 방법은 다른 여러 가지 방법보다 efficiency가 뛰어나서 대부분 PCR products의 ligation에 이용되어지고 있다. 그리고 kits(pGEM Easy T vector)를 이용하여 ligation하므로서 더욱 효과적인 cloning을 시도하기도 하였다. DNA sequencing은 373ABI automatic DNA sequencer(PerKin Elmer)에 의해서 분석이 가능하였고 reaction은 dye terminator cycle sequencing ready reaction kits(Perkin Elmer)를 이용하였다.

2. 재료 및 방법

가. Polymorphic band의 증폭 및 분리

일차적으로 PCR하여 나타난 polymorphic band는 sequencing을 하기 위해 DNA의 농도를 증폭시켰다. 25㎕ PCR reaction volume중 10㎕로 PCR 결과를 확인하고 남은 15㎕을 lowmeltingpoint(LMP) agarose gel에 전기영동하여 band 부분만을 cutting하였다. band의 DNA를 증폭시키기 위한 2차 PCR은 우선 65℃에서 5분동안 heating하여 gel을 녹인 후 일정량을 취하여 PCR reaction solution과 함께 PCR하여 정확한 polymorphic band 부분만을 증폭시키기 위해 수행되어졌다. 이때 3개의 tube에 각각 100 ㎕ reaction volume으로 만들어 sequencing을 위해 많은 농도로 증폭시켰다.

2차 PCR에서도 원하는 polymorphic band 부분외에 다른 extra fragment가 증폭되어지므로 1% agarose gel 전기영동으로 확인하고 나서 다시 다른 fragment의 contamination을 없애고 polymorphic band부분만을 얻기 위해 대략 70 100㎕을 1% agarose gel에 loading하여 UV light long wave에서 band부분만을 elution하였다. Elution된 gel은 dialysis방법 및 ethanol을 이용한 pellet DNA를 수거하여 TE buffer에 녹였다.

나. Polymorphic band의 cloning

1) T-overhang vector 제조

분리된 PCR products를 cloning하기 위해 우선 vector를 준비하였다. PCR products는 Taq polymerase에 의해 3‘-A overhang end 구조를 가지므로 본 연구에서는 vector를 3'-T overhang end로 만들어서 ligation이 가능하도록 하였다.

pBluescript DNA를 얻기 위해 아래와 같이 largeprep.과 EtBr-CsCl gradient방법으로 plasmid 형태인 DNA를 준비하였다.

pBluescript DNA ---> 500㎖ ampicllin LB medium ---> pellet --->
centrifuge sol I, II, III
centrifuge

supernatant ---> EtBr-CsCl gradient ---> acuqired pure plasmid DNA

분리된 plasmid DNA중 20㎎/㎕을 취하여 T-overhang end 구조를 만들기 위해 우선 EcoR V restriction enzyme으로 digestion하였다. EcoR V-digested vector에 PCR buffer, 2mM dTTP, 5U Taq polymerase를 첨가하고 72℃에서 2시간동안 PCR하여 vector의 end 부위에 T base를 1개씩 붙여 주었다. 그러나 이때 vector의 ligation efficiency는 5%밖에 되지 않고, efficiency를 높여주기 위해서는 다시 phenol extraction, ethanol washing단계를 거쳐 T-overhang vector DNA만을 다시 추출하였다. 이 경우 80%이상의 efficiency로 PCR products의 ligation 효율이 높았다.

2) Vector와 DNA의 ligation

준비된 T-overhang vector와 PCR products는 cloning을 위해 8℃에서 12시간 이상동안 ligation하였다. 미리 PCR products의 농도와 size를 vector의 농도에 맞게 조절하여 농도비율을 서로 동일하게 맞추어서 reaction하였다. 보통 vector와 insert의 농도는 100ng으로 맞추어서 T4 DNA ligase, ligation buffer(0.1M DTT, 10mM ATP)와 함께 reaction volume을 20㎕로 하였다.

3) Electroporation

JM 109 competent cell을 이용하여 ligation된 DNA를 transformation시켰다. JM 109 competent cell은 항생제 저항성이 없으므로 prep.중에 쉽게 오염이 될 수 있어 항상 신선하게 교체시켰다.

우선 cell은 LB 고체 배치에 8~10시간 배양시킨 후 각 colony당 8㎖ LB 액체 배지에서 하루동안 키운 후 500 1000㎖ LB 액체 배지에 모두 붓고 37℃에서 2 3시간동안 배양시켜 OD600nm에서 0.3정도일 때 cell을 harvest하였다. LB 배지는 오염을 막기 위해 autoclave후 냉장보관하였고 cell의 오염을 막기 위해 ddH2O로 여러번 washing한 후 15% glycerol을 첨가하여 200㎕씩 E-tube에 분주하여 -70℃에서 보관하였다.

Electroporation은 transfection 방법중 가장 높은 효율을 가지므로 본 연구에서도 electroporation방법을 수행하였다. 앞에서 ligation한 solution을 65℃에서 5분동안 heating하고 이중 1.5㎕을 취하여 준비된 200㎕ competent cell에 넣고 electroporation하였다. 그런다음 이 solution을 1㎖ SOC(0.5M Bacto yeast extract, 2% tryptone, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 20mM glucose, 10mM MgCl2, 10mM MgSO4)배지와 잘 혼합하여 1시간동안 shaking incubation시키고 다시 200㎕을 취하여 x-gal, IPTG와 함께 LB(+Ampcilline) 고체배지에서 spreading하여 하루동안 배양하였다.

다. DNA sequencing

DNA의 digestion으로 확인된 insert(PCR products)가 존재하는 DNA는 automatic DNA sequencing을 수행하였다. 우선 sequencing을 위해 ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(with AmpliTaqⓡDNA polymerase, FS, PERKIN ELMER)를 이용하여 reagents를 table 11과 같이 혼합하여 PCR 하였다.

Table 11. Mixing the reagents

Reagent	Quantity	
Terminator ready reaceion mix	8μℓ	4μℓ
Temperate	2μℓ	1μℓ
Primer(T3/ T7)	4μℓ	2μℓ
dH2O	6μℓ	3μℓ
Final reaction volume	20μℓ	10μℓ

혼합된 sample은 GeneAmp PCR system 96oo(Perkin Elmer)에서 96℃에서 10초, 10℃에서 5초, 60℃에서 4분동안 25 cycles를 반복 수행하였다. pBluescript의 insertion site의 양쪽에 T3와 T7 primer site가 존재하므로 T3, T7 primer로서 PCR을 수행하고, DNA ligation을 Kits나 다른 vector로 하였을 경우에는 사용된 vector의 sequence에 존재하는 primer를 이용하여 PCR을 수행하도록 하였다.

DNA sequencing은 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 방법으로 automatic sequence system에서 수행하였다. Urea 25g, 10x TBE buffer 5㎖, 40% acrylamide 7.5㎖, 3% ammonium persulfate 30mg, 그리고 TEMED 25μℓ을 혼합하여 50㎖ volume을 만들어 plate에 부어 굳혔다. 이때 plate는 미리 깨끗하게 washing하여 machine이 정확한 sequence를 읽을 수 있도록 준비하였다. 약 2시간 정도 gel을 굳힌 후 ABI 373 automatic sequencing system에서 1X TBE buffer(0.09M Tris-borate, 0.001M EDTA)를 붓고 loading dye 역할의 foramide:EDTA (5:1) 4μℓ는 녹여진 DNA sample과 섞어 loading하였다.

3. 결과 및 고찰

3차년도에 더욱 신뢰성 있는 marker로의 개발을 위해 추가 수행된

DNA cloning 및 DNA sequencing 과정은 polymorphic band의 elution이 우선적으로 이루어지는 다단계에 걸쳐 이루어졌다. 38개 primer pairs에서 품종별로 나타난 67개 polymoprhic band는 cutting하여 2차 PCR이후 polymorphic band를 elution하였다. 이중 cloning하는 단계별 실험적인 오차로 인해 32개 polymorphic band를 cloning 하여 30개를 sequencing 할 수 있었다. 따라서 seqencing된 결과를 바탕으로 SCAR PCR 분석을 위한 primer pairs는 새로이 합성되어 본 연구에 이용되어졌다.

Cloning을 위한 첫번째 단계로서 polymorphic band가 나타난 low-meltingpoint(LMP) agarose gel에 loading하여 polymorphic band 부분만을 cutting하여 2차 PCR로 동일한 size의 band를 증폭시킨 결과는 figure 4와 같다. PCR 증폭은 원하는 band 의 주위에 관찰되는 원하지 않는 다른 fragment의 산재로 최대한 원하는 band를 cutting하였다. 그러나 polymorphic band이외의 다른 band가 2차 PCR로 증폭되어 여러개의 band를 형성하였다. 그러므로 2차 PCR 결과를 1차 PCR의 polymorphic band와 비교하여 동일한 size만 elution하여 phenol extraction방법과 ethanol을 처리하여 단일 fragment를 분리해 냈다. 어떤 경우에는 원래의 band size와 동일한 band의 증폭이 일어나지 않아서 LMP agarose gel cutting에서 오류가 있었음을 확인할 수 있었다.

	9+37(D)			9+38(L)			9+46(Y)		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9

	13+15(D)		
M	1	2	3

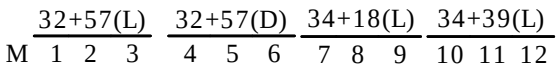
	13+34(D)			13+34(L)			32+59(D)		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9

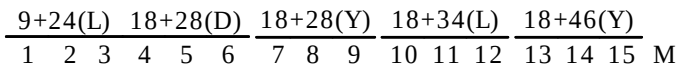
	34+46(D)			34+46(L)			34+46(Y)		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9

	34+54(Y2)			34+9(L)			34+54(Y1)		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9

	49+54(D)			49+54(L1)			49+54(L2)		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9

	34+54(Y2)			34+9(L)			34+54(Y1)		
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9





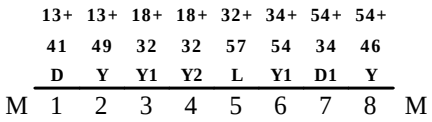
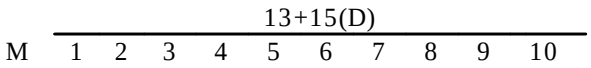
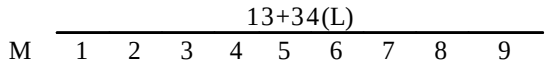


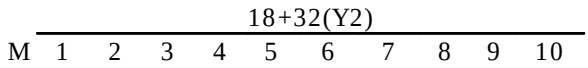
Figure 4. Polymorphic band's second PCR products. 1.0% agarose gel electrophoresis. M is ɣ/HindIII or ɣ/HindIII+EcoRI size marker.

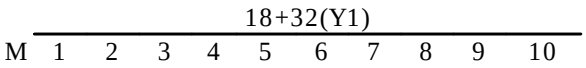
이와같이 elution된 polymorphic band는 T-overhang vector와 ligation 하여 cloning하는 과정을 수행하였다. PCR products의 경우 A-overhang end 구조를 가지므로 vector를 T-overhang end로 만들어 주어야만 ligation이 가능하게 되었다. T-overhang vector의 경우 최근에 cloning efficiency를 높이기 위해 개발된 방법으로 본 연구에서도 이용되어졌으나 어떠한 경우에 있어서는 cloning이 잘 되어지지 않아 kits(Promega)를 이용하기도 하였다.

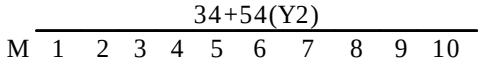
Miniprep.으로 얻어진 DNA는 다시 ligation의 여부를 확인하기 위해 vector와 insert를 restriction enzyme으로 digestion하였는데 그 결과는 figure 5와 같았다. White colony만을 miniprep.하였는데 어떤 경우에는 ligation의 발생율이 높았으나 어떤 경우에는 10개 colony중 1 2개 정도 만이 ligation되어 나타나기도 하였다. 이렇게 cloning되어진 DNA는 sequencing작업을 수행하였다.

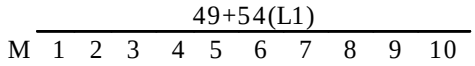

13+15(D)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

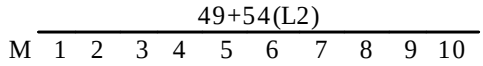

13+34(L)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

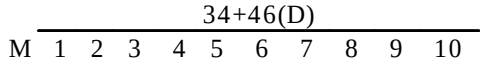

18+32(Y2)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

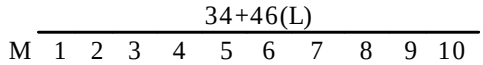

18+32(Y1)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

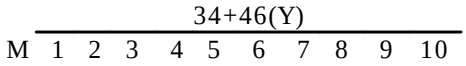

34+54(Y2)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

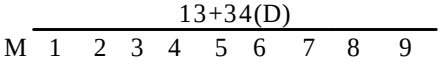

49+54(L1)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

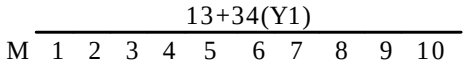

49+54(L2)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

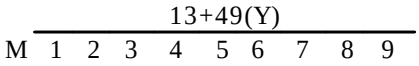

34+46(D)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

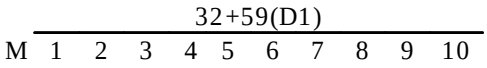

34+46(L)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

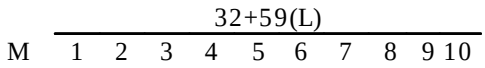

34+46(Y)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

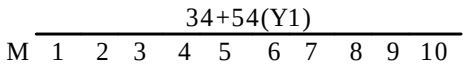

13+34(D)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

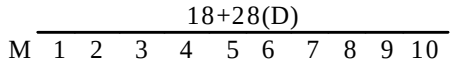

13+34(Y1)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

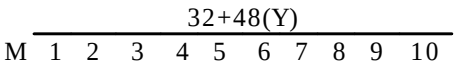

13+49(Y)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

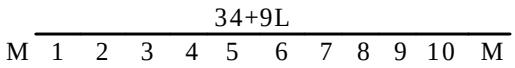

32+59(D1)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

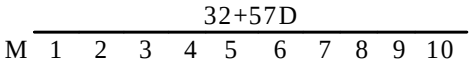

32+59(L)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

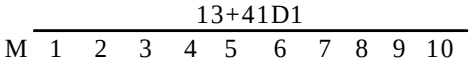

34+54(Y1)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


18+28(D)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


32+48(Y)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


34+9L
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M


32+57D
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


13+41D1
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

18+34Y

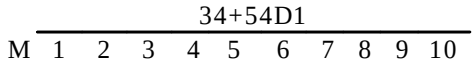
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

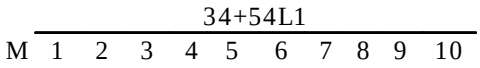
34+13Y

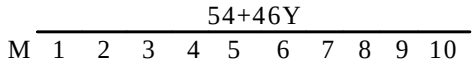
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

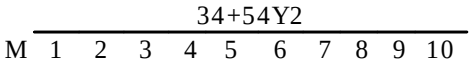
32+59D2

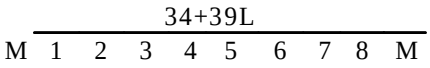
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10


34+54D1
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


34+54L1
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


54+46Y
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10





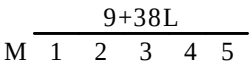


Figure 5. Digestion results of cloned polymorphic band

M is У/HindIII or У/HindIII+EcoRI size marker

DNA sequencing은 isotope의 이용없이 비교적 간편하게 분석이 가능한 automatic DNA sequencing system에 의해서 dye terminator reaction kits로서 분석되어졌다. 그러나 PCR reaction에서의 실수, gel plate 제조 및 loading에서의 실수등으로 30개 polymorphic band를 sequencing할 수 있었다.

Kits를 이용하여 cloning하였을 경우에는 T7/ SP6 primer를 이용하였고, 실제로 만든 T-overhang vector로 cloning하였을 경우에는 T3/ T7 primer를 이용하여 PCR하였다. sequencing된 결과에서 vector의 EcoR V site에 T가 하나더 붙어있는 sequence(5'-GATT-3')를 확인할 수 있었고, 그 뒤에 바로 원래 PCR하였던 primer pairs의 sequence를 확인할 수 있었다. 그러나 primer의 sequence를 찾을 수 없는 경우도 있었는데 그런 경우에는 다시 sequencing하여 정확한 sequence를 확인할 수 있도록 하였다. Table 12에는 예로서, 13+15번 primer pairs에서 Duroc의 polymorphic band를 sequencing한 결과의 일부를 나타내고 있는데, 보는 바와 같이 vector의 sequence부분, 이전에 사용한 primer sequence부분, 그리고 fragment sequence부분을 확인할 수 있다. Polymorphic band를 이용한 SCAR primer의 제작은 전체 sequence를 확인할 필요성이 없으므로 band의 양쪽 끝부분(T3와 T7)만을 sequencing하였고 그 양쪽 끝부분의 일부 sequence를 새로운 primer로 합성하여 SCAR PCR을 수행하고자 하였다.

Table 12. Sequencing result of 13+15D5 polymorphic band

5'- AGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATT CTACCTACTGCAAG vector sequence old primer sequence T3 AAG AAAAATAGGAGCATTCATTCTGATTTTCAGGT - 3' fragment sequence
5'- CCCGGGCTGCAGGAATTCGATT CTACCTACTGCAAGAAG T vector sequence old primer sequence T7 TCGTTAATTCAACCTGGAGAAAGTTCTCGT - 3' fragment sequence

제 3 장 경제형질 연관 marker 개발

제 1 절 서설

양돈시장의 완전개방화로 국내 돈육생산은 외국의 품종과 사료자원에 의존하고 있기 때문에 가격경쟁이 어려운 실정에서 산·학·관·연이 혼연일체가 되어 국내양돈산업의 경쟁력 제고를 위해 생산비 절감, 생산성 향상 및 차별화정책으로 고품질 돈육 생산을 위한 기술의 개발이 절실히 필요하다. 농림부에서는 돈육의 경쟁력 향상을 위해 산육 및 번식 능력에 중점을 둔 종돈과 비육돈의 개량목표를 위해 능력검정의 활성화, 인공수정 기술 보급 및 조기이유 기술을 개발 보급하는 정책을 수립하여 실행하고 있는데 이 목표가 조기에 정확하게 도달하기 위해서는 이보다 더 능력이 우수한 종돈을 선발할 기술에 의해 한국형 종돈을 육종하여 양돈산업현장에 보급하는 것이 매우 필요하다. 양돈산업의 생산성을 향상시켜 양돈산업의 수익을 증대시키기 위해서 우선적으로 해결해야 할 과제는 일당증체량, 등심단면적, 등지방두께, 사료효율등과 같은 경제형질을 개량하는 기술을 개발하는 것이 중요한 과제인 것 같다.

경제적으로 중요한 형질들은 주로 많은 유전자들과 주위환경요소들에 의해 조절이 되어진다. 동물 육종의 한 가설에서는 양적형질의 유전적 다양성은 각각의 작은 영향력을 가진 많은 유전자들의 segregation에 의해 발생된다고 하였다(Geldmann, 1975). 또한 돼지 도체형질의 유전력은 50% 내외의 고도의 유전력을 가지고 있어 어미돼지가 갖고 있는 살코기와 지방의 생산능력이 자손에게 유전될 수 있는 확률이 상당히 높다고 한다. 따라서 경제형질과 연관된 marker를 기술을 개발하게 된다면 우수한 종돈의 조기 선발은 물론 육종에 있어서도 큰 경제적 이익을 가져올 수 있게 되리라 본다.

제 2 절 F2 삼원교잡종의 경제형질 조사

경제형질 연관 RAPD marker를 개발하기 위해 Landrace(♀) × Yorkshire(♂)종의 교배로 F1 hybrid(♀) 9두를 생산하였고 이들은 다시 Duroc(♂)과 교배하여 F2 삼원교잡종(LYD) 80두를 생산하였다. Duroc, Landrace, Yorkshire는 경제형질이 우수하여 세계적으로 비육돈 생산용으로 가장 많이 이용되어지고 있는 품종이다. 그래서 품종의 특이 marker를 개발하고자 순종의 RAPD 분석을 수행하였고 또한 특이 marker가 F2에 유전되었을 때 실제적으로 형질에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 F2의 RAPD 분석을 수행하였다.

F2의 경제형질과 RAPD marker가 어떠한 연관성이 존재하는지 분석하고자 F2가 생산되었을 때부터 축산진흥연구소에서 경제형질을 조사하였다. F2의 경제형질 조사결과는 table 13과 같았고 이러한 data는 RAPD marker와의 연관성을 분석하는 자료로 이용하였다.

Table 13. F2 **삼원교잡종의 경제형질 현황**

명 호	성별	생년월일	체 중(kg)				일 당 증체량	등지방 두 께	사 료 요구율	비고
			생시	21 일령	56 일령	90kg 도달일령				
40 -1*	암	96. 9. 15	1.8	4.4	18	191	0.47	1.77	3.35	
40 -2*	〃	〃	1.8	4.4	23	195	0.46	1.77	2.95	
40 -8*	〃	97. 4. 4	1.7	6.5	18	165	0.55	1.95	1.81	
-9*	수	〃	1.8	6.5	21	148	0.61	1.87	2.20	
-10	〃	〃	1.7	6.0	15	174	0.52	2.10	2.61	
-11	〃	〃	1.6	6.0	5	-	-	-	-	폐사
-12*	〃	〃	1.7	5.5	16	146	0.62	1.62	2.32	
-13*	〃	〃	1.9	7.0	18	146	0.62	1.70	2.46	
-14	〃	〃	1.5	5.0	-	-	-	-	-	폐사
-15*	〃	〃	1.3	4.5	16	147	0.61	1.90	2.48	
-16	〃	〃	1.3	5.0	20	176	0.51	1.93	2.63	
-17	〃	〃	1.5	6.0	-	-	-	-	-	폐사
41 - 1	암	97. 3. 13	1.5	7.0	-	-	-	-	-	폐사
- 2	〃	〃	1.2	5.0	-	-	-	-	-	폐사
- 3*	〃	〃	1.7	7.0	17	143	0.63	2.01	2.23	
- 4*	수	〃	1.8	7.5	18	145	0.62	1.85	2.54	
- 5	〃	〃	1.3	5.5	-	-	-	-	-	폐사
- 6	〃	〃	1.6	7.0	-	-	-	-	-	폐사
42 - 1*	암	97. 3. 30	1.7	6.0	14	155	0.58	1.87	2.42	
- 2*	〃	〃	1.6	5.5	6	160	0.56	1.92	2.52	
- 3*	〃	〃	1.6	6.0	15	151	0.60	1.74	2.48	
- 4	〃	〃	1.7	6.5	11	-	-	-	-	폐사
- 5*	수	〃	1.7	6.5	16	149	0.60	1.64	2.37	
- 6*	〃	〃	1.5	4.5	10	175	0.51	1.82	2.72	
- 7*	〃	〃	1.7	6.0	8	158	0.57	1.90	2.76	
- 8*	〃	〃	1.5	5.0	7	225	0.40	1.82	2.75	
- 9*	〃	〃	1.8	6.5	15	169	0.53	1.75	2.51	
-10*	〃	〃	2.0	7.0	15	148	0.61	1.68	2.23	

명 호	성별	생년월일	체중(kg)				일당증체량	등지방두께	사료요구율	비고
			생시	21일령	56일령	90kg 도달일령				
43 -1	암	97. 3. 10	1.3	4.5	-	-	-	-	-	폐사
- 2*	〃	〃	1.1	4.0	14	159	0.57	2.11	2.63	
- 3*	〃	〃	1.4	5.0	19	159	0.57	1.98	2.51	
- 4*	〃	〃	1.3	4.5	15	153	0.59	1.96	2.73	
- 5	〃	〃	1.1	4.5	-	-	-	-	-	폐사
- 6*	〃	〃	1.2	5.0	11	169	0.53	1.87	2.84	
- 7*	수	〃	1.4	4.0	13	155	0.58	2.11	2.70	
- 8*	〃	〃	1.5	4.5	15	152	0.59	2.00	2.65	
- 9*	〃	〃	1.6	5.5	17	144	0.63	1.94	2.36	
-10*	〃	〃	1.3	4.5	15	144	0.63	1.76	2.42	
-11*	〃	〃	1.5	5.0	14	149	0.60	1.04	2.43	
44 -1*	암	97. 5. 12	1.2	6.0	14	158	0.57	1.86	2.48	
- 2*	〃	〃	1.7	7.0	17	142	0.63	1.75	2.10	
- 3*	〃	〃	1.8	7.5	18	160	0.56	1.50	2.57	
- 4*	수	〃	1.3	5.5	14.0	131	0.69	2.06	2.24	
- 5*	〃	〃	1.6	7.0	14.0	132	0.68	1.69	2.36	
- 6*	〃	〃	1.7	6.0	14	132	0.68	1.57	2.21	
- 7	〃	〃	1.6	5.5	6	170	0.53	1.80	2.74	
- 8*	〃	〃	1.6	6.0	15	129	0.70	1.50	2.18	
- 9*	〃	〃	1.7	6.5	11	125	0.72	1.48	1.98	
-10	〃	〃	1.7	6.5	16	156	0.58	1.61	2.54	
45 -1*	암	97. 4. 4	1.5	6.5	9	179	0.50	1.95	2.86	
- 2	〃	〃	.2	3.5		-	-	-	-	폐사
- 3*	〃	〃	1.6	5.5	12	163	0.55	2.24	2.88	
- 4	수	〃	5.5	-	-	-	-	-	-	폐사
- 5	〃	〃	6.0	-	-	-	-	-	-	폐사

명 호	성별	생년월일	체 중 (kg)				일 당 증체량	등지방 두께	사 료 요구율	비고
			생시	21 일령	56 일령	90kg 도달일령				
45-6	수	97. 4. 4	1.9	6.0	-	-	-	-	-	폐사
-7*	〃	〃	1.9	6.5	23	127	0.71	1.58	2.04	
-8*	〃	〃	1.5	5.0	13	164	0.55	1.89	2.55	
-9*	〃	〃	1.5	5.5	14	145	0.62	1.75	2.29	
-10	〃	〃	1.1	3.5	5	-	-	-	-	폐사
47-1*	암	97. 5. 6	1.4	8	18.5	146	0.62	1.96	2.45	
-2*	수	〃	1.6	8	20.5	127	0.71	1.44	2.10	
-3	〃	〃	1.8	7.5	19.5	137	0.66	1.58	2.18	
-4*	〃	〃	1.8	8	18.5	137	0.66	1.62	2.25	
48-1*	암	97. 4. 11	1.3	3.5	9	164	0.55	1.53	2.54	
-2*	〃	〃	1.2	3.0	10.5	145	0.62	1.77	2.69	
-3*	〃	〃	1.2	3.0	12.5	141	0.64	1.74	2.49	
-4*	〃	〃	1.2	3.0	12.5	141	0.64	1.72	2.54	
-5*	〃	〃	1.2	3.5	11.5	167	0.54	1.68	2.77	
-6*	수	〃	1.6	5.0	10	167	0.54	1.53	2.80	
-7	〃	〃	1.2	4.0	9.5	156	0.58	1.50	2.93	
-8*	〃	〃	1.1	3.0	11	146	0.62	1.45	2.28	
-9*	〃	〃	1.1	3.0	10	135	0.67	2.14	2.26	
-10*	〃	〃	1.2	3.5	8.5	167	0.54	1.41	2.75	
-11*	〃	〃	0.9	3.0	7.0	175	0.51	1.96	2.89	
-12*	〃	〃	0.9	3.0	10	209	0.43	2.00	2.75	

총 생산 두수 : 80두 **폐 사** : 20두
생존두수 : 60두 → **이중** 54두(* **표시)를 분석중**

제 3 절 F2의 RAPD 분석

1. 서언

Landrace, Yorkshire 그리고, Duroc종에서 나타난 polymorphic band가 F2에 유전되어 나타나는 경향을 분석하고자 생산된 F2의 PCR을 수행하였다. 총 100두정도의 F2로서 PCR 분석을 수행하여 경제형질과의 연관성을 분석하고자 하였으나 F2 80두를 생산하여 그중 54두만을 확보하여 본 연구에 활용하였다.

F2의 조부모로 이용하였던 Landrace, Yorkshrie 그리고 Duroc종의 polymorphic band 자체가 gene인지 아닌지 알 수 없고, 또한 형질과 연관이 된다라고 확신할 수는 없으나 품종별 특이성이 F2에 유전되었을 때 polymorphic band 부분도 F2에 유전이 되어지리라 생각한다. F2는 polymorphic band를 가지는 개체와 그렇지 않은 개체로 나누어지게 될 것이고 그 band가 형질과 연관이 있는지는 자료분석을 통해서 가능하게 될 것이다. 이렇게 해서 본 연구는 각 품종의 우수성이 F2에 유전되었을 때 특이하게 나타난 marker가 어떻게 연관되어지는지 RAPD 분석을 통해 확인하고 경제형질 연관 marker로 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

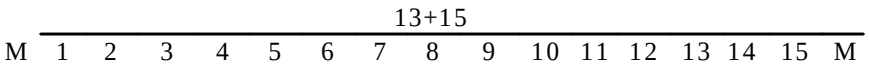
확보된 F2 54두의 혈액으로부터 DNA를 분리하여 종돈에서 이용하였던 DNA의 농도와 동일하게 맞추어 주고, 나머지 PCR solution이나 PCR thermal cycles도 품종별 RAPD marker의 개발에서 이용하였던 조건과 동일하게 맞추어 주었다.

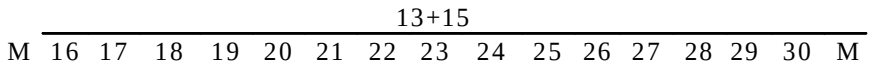
F2 54두를 PCR하였으므로 많은 primer의 screen은 불가능하였고 품종별 특이성이 나타났던 38개 primer pairs를 PCR하였다. PCR 결과는 1.2%

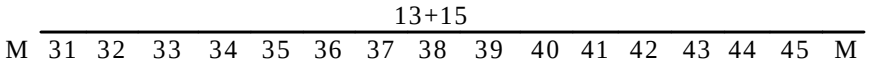
agarose gel 전기영동으로 확인하여 품종별로 나타난 PCR 결과와 비교 분석하고 F2에서도 나타난 특이 polymorphic band는 통계분석을 하여 경제형질과의 연관성을 조사하였다.

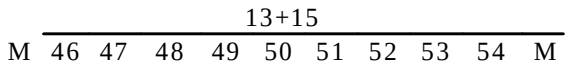
3. 결과 및 고찰

품종별 RAPD marker의 개발을 위해 수행한 PCR 분석에서 polymorphic band가 나타난 총 38개 primer pairs로 F2 54두의 PCR 분석을 수행하였다. 38개 primer pairs의 모든 polymorphic band가 F2에서 polymorphism을 보이지는 않았다. 대체적으로 F2에서는 동일한 PCR pattern을 보였고 그중 9개 primer pairs에서 11개의 polymorphic band를 보였는데 1.6kb의 9+38L1 band는 품종식별에서 찾을 수 없었던 polymorphic band로서 F2에서 새로이 출현되었고 그 나머지 10개의 polymorphic band는 품종식별에서 출현한 polymorphic band가 나타난 것이다. 그것의 1.2% agarose gel 전기영동한 결과는 figure 6과 같았다. 그리고 polymorphic band가 F2 54두의 polymorphic band의 출현 양상은 table 14에 나타내었다.


13+15
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M


13+15
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M


13+15
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M

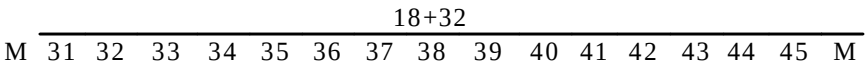

13+15
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M

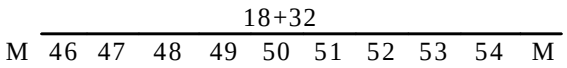
18+32

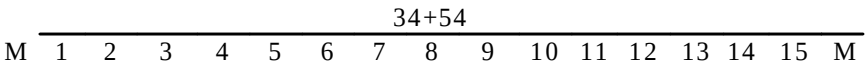
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

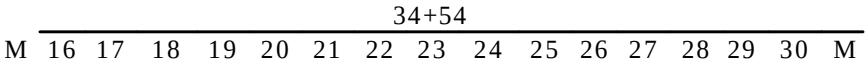
18+32

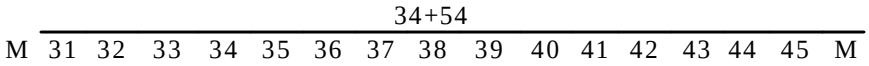
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M

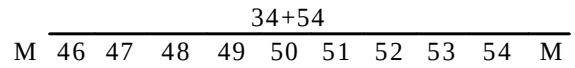

18+32
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M

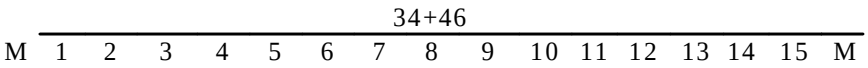

18+32
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M

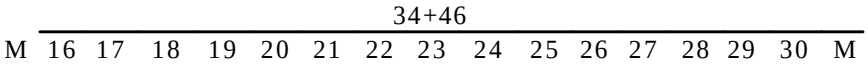

34+54
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

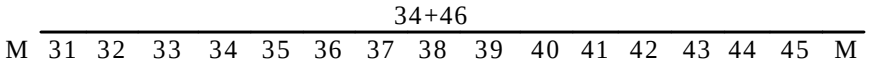

34+54
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M

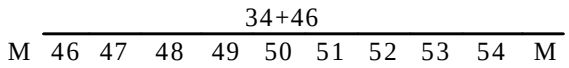

34+54
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M

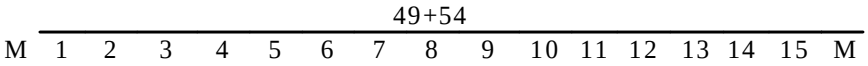

34+54
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M

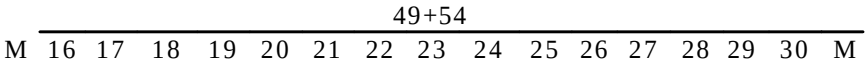

34+46
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

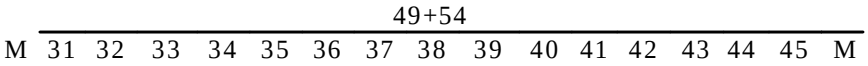

34+46
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M

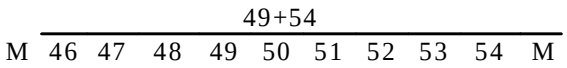

34+46
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M


34+46
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M


49+54
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M


49+54
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M


49+54
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M

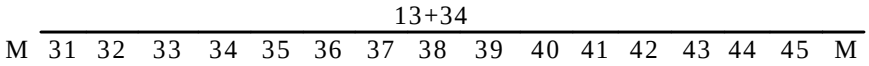

49+54
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M

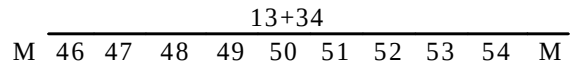
13+34

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

13+34

M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M


13+34
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M

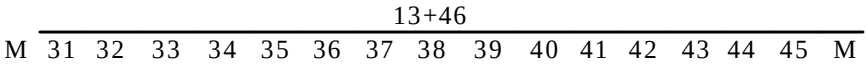

13+34
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M

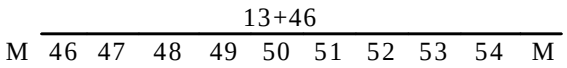
13+46

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

13+46

M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M


13+46
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M

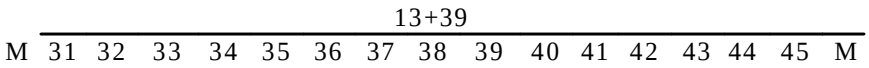

13+46
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M

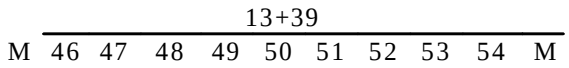
13+39

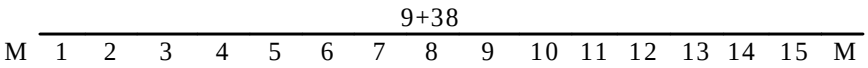
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

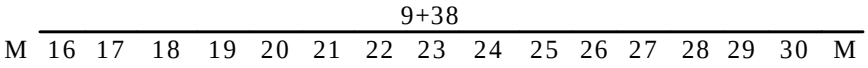
13+39

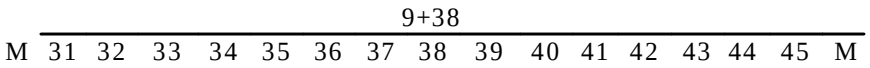
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M


13+39
M 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 M


13+39
M 46 47 48 49 50 51 52 53 54 M


9+38
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M


9+38
M 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 M



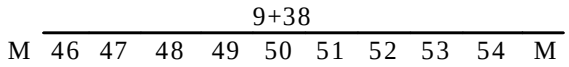


Figure 6. PCR results of 54 F2 on 1.2% agarose gel electrophoresis. M is ý DNA/ HindIII+EcoRI size marker, upper number is primer number, and number of 1 54 is number of F2 pigs

Table 14. F2의 polymorphic band 출현 양상

PB / 명호	13+15		18+33	34+54	34+46	49+54	13+34	13+46		13+39	9+38
	1.3D1	0.55D5	0.8DY	0.85Y3	1.1D2Y2	1.1L2	0.75L2	0.7L2	1.3D1	1.2Y2	1.6L1
40 - 1	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
- 2	○	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-
- 8	○	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
- 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-12	-	-	-	-	-	-	-	○	○-	-	-
-13	○	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○
41 - 3	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-
- 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
42 - 1	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○
- 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- 3	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- 5	-	-	-	-	○	-	-	○	-	-	-
- 6	-	-	○	-	-	-	○	○	-	○	-
- 7	-	-	-	○	-	-	-	-	○	-	-
- 8	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-
- 9	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○
-10	-	-	○	-	-	-	-	○	○	○	-
43 - 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○
- 3	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
- 4	-	-	-	○	-	-	-	○	-	○	-
- 6	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	○
- 7	-	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-
- 8	-	○	-	-	-	-	-	○	-	-	-
- 9	-	○	○	-	-	-	-	○	-	-	○
-10	-	○	-	-	-	-	-	○	-	-	○
-11	-	○	-	-	-	-	-	○	-	○	○
44 - 1	-	-	-	○	○	-	-	○	-	-	-
- 2	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
- 3	-	-	-	○	○	-	-	○	-	-	-
- 4	-	-	-	○	-	--	-	○	-	-	-
- 5	-	-	-	○	-	-	-	-	○	○	-
- 6	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	-
- 8	-	-	-	○	-	-	-	-	-	○	-
- 9	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	-
45 - 1	-	-	-	-	○	-	-	○	○	○	-
- 3	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	-
-7	-	-	-	○	-	-	-	-	○	-	-
-8	○	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-
-9	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	-
47-1	-	-	-	○	-	○	-	-	○	○	-
-2	-	-	○	-	-	-	-	○	-	○	-
-4	-	-	-	○	-	○	-	○	-	○	-
48-1	-	○	-	○	-	○	-	○	○	-	-
-2	-	-	-	○	-	-	-	○	-	○	-
-3	○	-	-	○	○	-	-	○	-	-	-
-4	-	-	-	○	○	○	-	○	-	○	-
-5	○	-	-	-	-	○	-	○	-	○	-
-6	○	-	-	○	-	-	-	○	-	○	-
-8	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	-
-9	○	-	-	○	-	-	-	○	-	○	-
-10	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	-
-11	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	-
-12	○	-	-	○	○	-	-	○	-	○	-

제 4 절 통계분석

1. 통계분석 방법

경제형질 연관 marker 개발을 위해 F2의 경제형질별 marker 출현형태를 통계 분석 프로그램 SAS GLM에 의해 분석하였다. 경제형질과의 연관성을 확인하기 위해서는 축산진흥연구소에서 조사된 형질별 data와 RAPD 분석 결과를 통계분석 처리하여야만 가능하다. 본 연구에서는 table 15에서 나타난 것처럼 3가지의 model로 통계분석을 수행하였다.

Table 15. **통계분석** model

1. **모돈별·성별** marker **출현율 분석** model

Model : Yijk = Di + Sj + Eijk

Yijk ; i**번째 모돈**, j**번째 성별**, k**번째 개체의** band **출현여부**(1, 0)

Di ; i**번째 모돈의 효과**

Si ; j**번째 성별의 효과**

Eijk ; **개체에 특이한 효과**

2. **조사형질의** class**별** marker **출현율 분석** model

Model : Yij = Ci + Eij

Yij ; **조사형질의** i**번째** class**에 속하는** j**번째 개체의** band **출현여부**(1, 0)

Di ; **조사형질의** i**번째** class **효과**(-1SD, Mean, +1SD)

Eij ; **개체에 특이한 효과**

3. Marker **출현여부에 따른 조사형질의 성적 분석** model

Model : Yijkl = Di + Sj + Bk + Eijkl

Yijkl ; i**번째 모돈**, j**번째 성별**, k**번째** band**를 가진 개체의 조사형질 성적**

Di ; i**번째 모돈의 효과**

Si ; j**번째 성별의 효과**

Bk ; k**번째 밴드의 효과**

Eijkl ; **개체에 특이한 효과**

2. 결과 및 고찰

SAS GLM 통계분석 프로그램에 의해 table 15와 같은 방법으로 경제형질과의 연관성을 분석하였다. F2의 RAPD 분석 결과 총 37개 primer pairs에서 11개의 polymorphic band가 나타났으므로 이들의 분석을 수행하였다. 11개 polymorphic band들은 모두 각 조사형질과 어느 정도의 연관을 보였으나 유의적으로 나타난 band는 5개였다.

F2 54두의 band 출현 형태별로 marker를 분석하고, 성별, 모돈별로 어떠한 차이가 존재하는지를 분석하기 위해 data를 정리하였다. Table 16은 F2 의 조사형질을 +1SD, Mean, 및 -1SD집단으로 분류하여 나타내고 있다.

Table 16. F2의 집단별 조사형질 분포도

No	WB	WB (SD)	W21	W21 (SD)	W56	W56 (SD)	D90	D90 (SD)	ADG	ADG (SD)	FAT	FAT (SD)	FE	FE (SD)
1	1.8	+1SD	4.4	M	18.3	+1SD	171	+1SD	0.46	- 1SD	1.77	M	3.35	+1SD
2	1.8	+1SD	4.4	M	23.4	+1SD	171	+1SD	0.47	- 1SD	1.77	M	2.95	+1SD
3	1.7	M	6.5	M	18.0	M	165	M	0.55	M	1.95	M	1.81	- 1SD
4	1.8	+1SD	6.5	M	21.0	+1SD	148	M	0.61	M	1.87	M	2.20	- 1SD
5	1.7	M	5.5	M	16.0	M	146	M	0.62	M	1.62	M	2.32	M
6	1.9	+1SD	7.0	+1SD	18.0	M	146	M	0.62	M	1.70	M	2.46	M
7	1.3	M	4.5	M	16.0	M	147	M	0.61	M	1.90	M	2.48	M
8	1.7	M	7.0	+1SD	17.0	M	143	M	0.63	M	2.01	+1SD	2.23	M
9	1.8	+1SD	7.5	+1SD	18.0	M	145	M	0.62	M	1.85	M	2.54	M
10	1.7	M	6.0	M	14.0	M	155	M	0.58	M	1.87	M	2.42	M
11	1.6	M	5.5	M	6.0	- 1SD	160	M	0.56	M	1.92	M	2.52	M
12	1.6	M	6.0	M	15.0	M	151	M	0.60	M	1.74	M	2.48	M
13	1.7	M	6.5	M	16.0	M	149	M	0.60	M	1.64	M	2.37	M
14	1.5	M	4.5	M	10.0	- 1SD	175	+1SD	0.51	- 1SD	1.82	M	2.72	M
15	1.7	M	6.0	M	8.0	- 1SD	158	M	0.57	M	1.90	M	2.76	M
16	1.5	M	5.0	M	7.0	- 1SD	152	M	0.40	- 1SD	1.82	M	2.75	M
17	1.8	+1SD	6.5	M	15.0	M	169	+1SD	0.53	M	1.75	M	2.51	M
18	2.0	+1SD	7.0	+1SD	15.0	M	148	M	0.61	M	1.68	M	2.23	M
19	1.1	- 1SD	4.0	M	14.0	M	159	M	0.57	M	2.11	+1SD	2.63	M
20	1.4	M	5.0	M	19.0	+1SD	159	M	0.57	M	1.98	M	2.51	M
21	1.3	M	4.5	M	15.0	M	153	M	0.59	M	1.96	M	2.73	M
22	1.2	- 1SD	5.0	M	11.0	M	169	+1SD	0.53	M	1.87	M	2.84	+1SD
23	1.4	M	4.0	M	13.0	M	155	M	0.58	M	2.11	+1SD	2.70	M
24	1.5	M	4.5	M	15.0	M	152	M	0.59	M	2.00	M	2.65	M
25	1.6	M	5.5	M	17.0	M	144	M	0.63	M	1.94	M	2.36	M
26	1.3	M	4.5	M	15.0	M	144	M	0.63	M	1.76	M	2.42	M
27	1.5	M	5.0	M	14.0	M	149	M	0.60	M	1.04	- 1SD	2.43	M
28	1.2	- 1SD	6.0	M	14.0	M	158	M	0.57	M	1.86	M	2.48	M
29	1.7	M	7.0	+1SD	17.0	M	142	M	0.63	M	1.75	M	2.10	- 1SD
30	1.8	+1SD	7.5	+1SD	18.0	M	160	M	0.56	M	1.50	- 1SD	2.57	M
31	1.3	M	5.5	M	14.0	M	131	- 1SD	0.69	+1SD	2.06	+1SD	2.24	M
32	1.6	M	7.0	+1SD	14.0	M	132	- 1SD	0.68	+1SD	1.69	M	2.36	M
33	1.7	M	6.0	M	14.0	M	132	- 1SD	0.68	+1SD	1.57	M	2.21	
34	1.6	M	6.0	M	15.0	M	129	- 1SD	0.70	+1SD	1.50	- 1SD	2.18	- 1SD
35	1.7	M	6.5	M	11.0	M	125	- 1SD	0.72	+1SD	1.48	- 1SD	1.98	- 1SD
36	1.5	M	6.5	M	9.0	- 1SD	179	+1SD	0.50	- 1SD	1.95	M	2.86	+1SD
37	1.6	M	5.5	M	12.0	M	163	M	0.55	M	2.24	+1SD	2.88	+1SD
38	1.9	+1SD	6.5	M	23.0	+1SD	127	- 1SD	0.71	+1SD	1.58	M	2.04	- 1SD
39	1.5	M	5.0	M	13.0	M	164	M	0.55	M	1.89	M	2.55	M
40	1.5	M	5.5	M	14.0	M	145	M	0.62	M	1.75	M	2.29	M
41	1.4	M	8.0	+1SD	18.5	+1SD	146	M	0.62	M	1.96	M	2.45	M
42	1.6	M	8.0	+1SD	20.5	+1SD	127	- 1SD	0.71	+1SD	1.44	- 1SD	2.10	- 1SD
43	1.8	+1SD	8.0	+1SD	18.5	+1SD	137	- 1SD	0.66	+1SD	1.62	M	2.25	M
44	1.3	M	3.5	- 1SD	9.0	- 1SD	M	164	M	0.55	M	1.53	- 1SD	2.54	M
45	1.2	- 1SD	3.0	- 1SD	10.5			145	M	0.62	M	1.77	M	2.69	M
46	1.2	- 1SD	3.0	- 1SD	12.5	M		141	M	0.64	M	1.74	M	2.49	M
47	1.2	- 1SD	3.0	- 1SD	12.5	M		141	M	0.64	M	1.72	M	2.54	M
48	1.2	- 1SD	3.5	- 1SD	11.5	M		167	+1SD	0.54	M	1.68	M	2.77	M
49	1.6	M	5.0	M	10.0	- 1SD		167	+1SD	0.54	M	1.53	- 1SD	2.80	+1SD
50	1.1	- 1SD	3.0	- 1SD	11.0	M		146	M	0.62	M	1.45	- 1SD	2.28	M
51	1.1	- 1SD	3.0	- 1SD	10.0	- 1SD		135	- 1SD	0.67	+1SD	2.14	+1SD	2.26	M
52	1.2	- 1SD	3.5	- 1SD	8.5	- 1SD		167	+1SD	0.54	M	1.41	- 1SD	2.75	M
53	0.9	- 1SD	3.0	- 1SD	7.0	- 1SD		175	+1SD	0.51	- 1SD	1.96	M	2.89	+1SD
54	0.9	- 1SD	3.0	- 1SD	10.0	- 1SD		152	M	0.43	- 1SD	2.00	M	2.75	M

Table 17. 형질별 통계량

형질 / 통계값	WB	W21	W56	D90	ADG	FAT	FE
Mean	1.51	5.40	14.15	151.67	0.58	1.78	2.49
SD	0.26	1.44	4.04	13.66	0.06	0.22	0.28

W B: 생시체중 W21: 21일령 체중 W56: 56일령 체중 D90: 90kg 도달일령
ADG: 일당증체량 FAT: 등지방두께 F E: 사료효율

Table 18. Marker별 출현빈도(%)

Marker	13+15 D1	13+15 D5	18+32 DY	34+54 Y3	34+46 D2Y2	49+54 L2	13+34 L2	13+46 L2	13+46 D1	13+39 Y2	9+38 L1
Mean	16.98	11.32	7.54	32.07	13.20	7.54	1.88	69.81	35.84	45.28	15.09

* 13+15D1 : 13+15 primer pairs가 Duroc의 DNA에서 PCR하였을 경우 첫 번째에 나타나는 specific band를 말함

Table 17은 table 16에 나타난 전체 통계량을 형질별로 나누어서 Mean 값과 SD값을 정리한 자료이다. Table 18은 F2의 RAPD 분석결과, F2 54두에서 marker가 나타난 출현빈도의 평균값을 나타낸 것인데 13+46 L2의 band는 70%로 상당히 높은 비율로 나타났다. Table 19은 F1(LY) 8두에 대하여 모돈별로 나누어서 11개 polymorphic band의 출현양상을 분석한 것인데, 13+15D1의 polymorphic band는 F1 40과 F1 48 모돈에서 약 40%정도로서 유의성있게 출현되었고, 13+15D3의 polymorphic band는 F1 43에서 약 44%정도로 유의적으로 출현되었다. 그리고 18+32DY와 13+34L2의 band는 F1 모돈에서는 전혀 출현되지 않고 순종에서만 나타나는 것으로 유전물질의 유전양식을 규명하는데 좋은 자료가 될 것 같다. 34+54Y3의 band는 F1 44, F1 47와 F1 48 모돈에서 64%, 68%, 71%로 높게 출현되었으

며, 49+54L2의 band는 F1 47 모돈에서 약 67%정도가 유의적으로 높게 출현되었다. 13+46L2, 13+39Y2의 band는 F1 전체모돈에서 44%~99%까지 다양하게 출현되었다. 특히 13+46D1의 band가 F1 45모돈에서 100%로 출현되어 앞으로 유전양식을 규명하여 산업적으로 이용할 가치가 높을 것으로 본다.

Table 20은 성별로 band의 출현양상을 통계 분석한 자료이다. 그러나 이 자료에서는 특이한 결과는 없었다.

Table 21은 조사된 형질을 +1SD, -1SD, Mean의 세 집단으로 나누어서 각 집단별로 band의 출현양상이 어떻게 차이가 나타나는지 분석해 본 것이다. 분석된 결과에서 특이하게 이용할 가치가 있는 것이 발견된 것이 34+54 Y3의 band는 21일령 체중과 일당증체량값에 유의적인 연관을 보이고 있다는 것을 알 수 있고, 49+54 L2의 band는 56일령 체중, 90kg 도달일령, 그리고 일당증체량과 연관이 있는 것으로 나타나 이 두 band 모두 증체량과 깊은 연관이 있으리라고 생각된다. 13+46 L2의 경우에는 21일령 체중, 13+46 D1은 등지방두께와 연관이 있고, 13+39 Y2는 대부분의 조사된 형질과 연관이 있었음을 알 수 있었는데 사료효율과 연관성 있는 band는 확보되지 못하였다. 이와같이 유의성있게 나타난 band는 경제형질 연관 marker로 이용하여 경제형질이 우수한 종돈을 선발하는데 이용할 가치가 있을 것으로 본다.

Table 22는 table 21과 달리 band의 출현여부에 따라 조사형질값이 어떻게 차이가 나타나는지 분석한 것이다. 13+15D5의 band는 등지방두께가 낮은 1.6cm집단에서 유의적으로 나타나 13+15D5의 band는 등지방두께가 낮은 유전자와 연관이 있는 band로 생각할 수 있고, 34+46Y, 13+34L2와 13+39Y2의 band는 일당증체량값이 낮은 유전자와 연관이 있는 band로 발견되어 앞으로 발견된 이들 marker을 이용하여 등지방두께와 일당증체량이 우수한 종돈을 조기에 선발하는데 기여할 수 있을 것 같다.

Table 19. **모돈별** marker **출현율**

(**단위** : %)

M / F1	13+15 D1	13+15 D5	18+32 DY	34+54 Y3	34+46 D2Y2	49+54 L2	13+34 L2	13+46 L2	13+46 D1	13+39 Y2	9+38 7L1
40	43.08a ±13.73	0.00b ±11.39	0.00 ±9.78	0.87c ±15.14	13.85b ±12.38	0.31b ±8.55	0.00 ±5.35	56.37ab ±17.30	29.16b ±17.25	0.00b ±16.90	14.09b ±12.27
41	1.58b ±26.18	0.00b ±21.73	0.00 ±18.65	6.13c ±28.86	9.69ab ±23.60	2.20b ±16.29	0.00 ±10.20	44.62ab ±32.98	54.11ab ±32.88	41.95ab ±32.20	0.00b ±23.39
42	11.63b ±12.22	10.40b ±10.14	20.23 ±8.70	13.15c ±13.47	14.34ab ±11.01	0.73b ±7.60	10.65 ±4.76	42.65b ±15.39	45.81b ±15.34	19.53b ±15.03	21.78b ±10.92
43	0.17b ±12.11	44.21a ±10.05	10.45 ±8.62	11.79c ±13.35	1.08b ±10.92	0.24b ±7.53	0.00 ±4.72	77.78ab ±15.25	33.79b ±15.21	43.55ab ±14.90	55.40a ±10.82
44	0.39b ±12.90	0.00b ±10.70	0.00 ±9.18	64.03ab ±14.21	39.92a ±11.63	0.55b ±8.02	0.00 ±5.02	61.15ab ±16.24	26.03b ±16.19	47.98ab ±15.86	0.00b ±11.52
45	20.31ab ±16.26	0.00b ±13.50	0.00 ±11.58	21.22b ±17.92	21.94ab ±14.66	0.44b ±10.11	0.00 ±6.33	78.92ab ±20.48	100a ±20.42	38.40ab ±20.00	0.00b ±13.53
47	0.52ab ±21.02	0.00b ±17.44	31.34 ±14.97	68.71a ±23.17	3.23ab ±18.95	67.40a ±13.08	0.00 ±8.19	64.87ab ±26.48	34.70b ±26.40	97.32a ±25.86	0.00b ±18.79
48	40.31a ±11.52	9.60b ±9.60	0.00 ±8.20	71.22a ±12.70	21.94ab ±10.39	20.44b ±7.17	0.00 ±4.48	98.92a ±14.51	10.82b ±14.47	78.39a ±14.17	0.00b ±10.29

- Different characters represent difference by $p<0.05$

Table 20. **성별** marker **출현율**

(**단위** : %)

Marker / **성별**	13+15 D1	13+15 D5	18+32 DY	34+54 Y3	34+46 D2Y2	49+54 L2	13+34 L2	13+46 L2	13+46 D1	13+39 Y2	9+38 L1
1	16.33 ±8.99	5.40 ±7.47	0.43 ±6.41	38.27 ±9.92	23.88 ±8.11	13.75 ±5.59	0.00 ±3.50	60.20 ±11.34	46.01 ±11.30	37.69 ±11.07	9.77 ±8.04
2	13.17 ±6.78	9.63 ±5.62	12.39 ±4.83	26.01 ±7.47	4.49 ±6.11	9.33 ±4.22	2.32 ±2.64	70.97 ±8.54	37.79 ±8.51	53.79 ±8.34	12.40 ±6.06

Table 21. **조사형질의** class**별** Marker **출현율**

(**단위** : %)

형질 \ Marker		13+15 D1	13+15 D5	18+32 DY	34+54 Y3	34+46 D2Y2	49+54 L2
WB	+1SD	20.00±12.06	0.00±9.87	10.00±8.51	30.00±14.71	10.00±10.77	10.00±8.51
	-1SD	27.27±11.51	0.00±9.41	0.00±8.11	54.54±14.03	27.22±10.27	0.00±8.11
	M	12.50±6.34	18.75±5.51	9.37±4.76	25.00±8.23	9.37±6.02	9.37±4.76
W21	+1SD	10.00±11.97	0.00±10.15	20.00±8.35	40.00±14.11ab	20.00±10.85	20.00±8.32
	-1SD	33.33±12.61	11.11±10.70	0.00±8.80	66.66±14.88a	22.22±11.44	11.11±8.77
	M	14.70±6.49	14.70±5.50	5.88±4.53	20.58±7.65b	8.82±5.89	29.41±4.51
W56	+1SD	12.50±13.53	0.00±11.37	12.50±9.57	37.50±16.75	0.00±12.15	25.00±8.85a
	-1SD	27.27±11.54	9.09±9.70	9.09±8.16	45.45±14.28	18.18±10.36	18.18±7.55b
	M	14.70±6.56	14.70±5.52	5.88±4.64	26.47±8.12	14.70±5.89	0.00±4.29c
D90	+1SD	20.00±12.19	0.00±9.94	10.00±8.57	20.00±14.36	20.00±10.83	10.00±8.57b
	-1SD	11.11±12.85	0.00±10.48	11.11±9.03	66.66±15.07	0.00±11.42	11.11±9.03ab
	M	17.64±6.61	17.64±5.39	5.88±4.65	24.47±7.75	14.70±5.87	5.88±4.65a
ADG	+1SD	11.11±12.97	0.00±10.73	11.11±9.17	66.66±15.21a	0.00±11.50	11.11±9.17a
	-1SD	28.57±14.73	0.00±12.16	14.28±10.40	14.28±17.25b	28.57±13.04	0.00±10.0b
	M	17.14±6.59	17.14±5.44	5.71±4.65	28.57±7.72b	14.28±5.83	8.57±4.65b
FAT	+1SD	16.66±15.74	0.00±13.08	0.00±11.03	33.33±19.47	0.00±14.07	0.00±10.72
	-1SD	11.11±12.85	22.22±10.68	11.11±9.01	44.44±15.96	11.11±11.49	22.22±8.76
	M	18.42±6.25	10.52±5.20	7.89±4.38	28.95±7.74	15.79±5.59	5.26±4.26
FE	+1SD	28.57±14.63	0.00±12.13	0.00±10.27	14.28±18.01	14.28±13.29	14.28±10.27
	-1SD	14.28±14.63	0.00±12.13	14.28±10.27	28.57±18.01	14.28±13.29	0.00±10.27
	M	15.78±6.28	15.79±5.21	7.89±4.41	36.84±7.73	13.15±5.70	7.89±4.41

형질 \ Marker		13+34 L2	13+46 L2	13+46 D1	13+39 Y2	9+38 L1
WB	+1SD	0.00±4.40	50.00±14.34	40.00±15.33	30.00±15.49b	10.00±11.62
	-1SD	0.00±4.20	90.90±13.67	18.18±14.62	72.72±14.77a	18.18±11.08
	M	3.12±2.46	68.75±8.02	40.62±8.57	40.62±8.66ab	15.62±6.50
W21	+1SD	0.00±4.41	60.0±014.26ab	50.00±15.11	60.00±15.10ab	0.00±11.06
	-1SD	0.00±4.64	100±15.03a	11.11±15.93	77.77±15.91a	0.00±11.66
	M	2.94±2.39	64.70±7.73b	38.23±8.20	32.35±8.18b	23.52±6.00
W56	+1SD	0.00±4.77	50.00±16.35	37.50±17.45	37.50±17.79	0.00±12.37
	-1SD	9.09±4.07	81.81±13.94	36.36±14.88	63.63±15.17	0.00±10.55
	M	0.00±2.31	70.58±7.93	35.29±8.47	41.17±8.63	23.53±6.00
D90	+1SD	10.00±4.24	80.00±14.86	40.00±15.48	70.00±14.64a	20.00±11.44
	-1SD	0.00±4.47	66.66±15.66	22.22±16.32	77.77±15.43a	0.00±12.06
	M	0.00±2.30	67.64±8.06	38.23±8.40	29.41±7.94b	17.64±6.20
ADG	+1SD	0.00±4.45	66.66±15.52	22.22±16.07	77.77±16.07a	0.00±10.73
	-1SD	14.28±5.05	85.71±17.59	42.85±18.22	57.14±8.23ab	0.00±12.17
	M	0.00±2.26	68.57±7.87	34.28±8.15	34.28±8.15b	17.14±5.44
FAT	+1SD	0.00±5.70	66.66±18.95	66.66±19.20a	50.00±19.91ab	16.66±15.03
	-1SD	0.00±4.65	88.88±15.47	11.11±15.68b	77.77±16.26a	11.11±12.27
	M	2.63±2.26	65.79±7.53	36.84±7.63ab	36.84±7.91b	15.79±5.97
FE	+1SD	0.00±5.33	85.71±17.40	57.14±18.47	71.42±18.88	14.28±13.84
	-1SD	0.00±5.33	42.85±17.40	28.57±18.47	42.85±18.88	0.00±13.84
	M	2.63±2.29	71.05±7.47	34.21±7.93	39.47±8.10	18.42±5.94

- Different characters represent difference by $p<0.05$

Table 22. Marker **출현여부에 따른 조사형질의 성적**

Marker \ 형질		WB	W21	W56	D90	ADG	FAT	FE
13+15 D1	0	1.54±0.03	5.83±0.12	14.96±0.52	151.92±1.96	0.59±0.01	1.79±0.03	2.50±0.04
	1	1.59±0.07	6.04±0.28	16.14±1.14	149.55±4.33	0.59±0.02	1.89±0.08	2.39±010
13+15 D5	0	1.54±0.03	5.84±0.12	15.06±0.50	151.93±1.87	0.59±0.01	1.83±0.03a	2.49±0.04
	1	1.65±0.09	6.11±0.36	16.13±1.45	147.22±5.42	0.62±0.02	1.60±0.10b	2.36±0.12
18+32 DY	0	1.54±0.03	5.85±0.12	15.02±0.49	151.47±1.89	0.59±0.01	1.81±0.03	2.49±0.04
	1	1.64±0.10	6.02±0.42	16.88±1.67	153.08±6.34	0.60±0.03	1.78±0.12	2.41±0.45
34+54 Y3	0	1.53±0.03	5.81±0.15	14.74±0.60	153.36±2.23	0.58±0.01	1.78±0.04	2.47±0.05
	1	1.57±0.05	5.96±0.22	15.99±0.89	147.80±3.32	0.60±0.01	1.86±0.06	2.51±0.08
34+46 D2Y2	0	1.55±0.03	5.79±0.12	14.99±0.52	150.36±1.91	0.60±0.00a	1.81±0.03	2.47±0.04
	1	1.50±0.07	6.29±0.30	16.03±1.26	158.90±4.61	0.53±0.02b	1.80±0.09	2.56±0.11
49+54 L2	0	1.52±0.03 b	5.76±0.12	15.27±0.54	150.39±1.98	0.59±0.01	1.82±0.04	2.48±0.04
	1	1.78±0.10 a	6.57±0.43	14.15±1.81	160.61±6.66	0.56±0.03	1.72±0.13	2.55±0.16
13+34 L2	0	1.55±0.03	5.87±0.11a	15.15±0.49	151.34±1.75 b	0.59±0.00	1.80±0.03	2.48±0.04
	1	1.33±0.19	4.28±0.74b	13.25±3.15	175.51±11.3 a	0.53±0.06	1.88±0.23	2.76±0.27
13+46 L2	0	1.54±0.05	5.83±0.20	15.94±0.79	148.98±2.98	0.60±0.01	1.84±0.06	2.47±0.07
	1	1.55±0.03	5.87±0.14	14.71±0.58	152.93±2.20	0.58±0.01	1.78±0.04	2.49±0.05
13+46 D1	0	1.54±0.04	5.86±0.15	15.46±0.63	150.40±2.38	0.60±0.01	1.79±0.04	2.46±0.05
	1	1.55±0.04	5.84±0.18	14.68±0.74	153.19±2.80	0.57±0.01	1.83±0.05	2.52±0.06
13+39 Y2	0	1.54±0.04	5.85±0.16	16.02±0.64 a	149.34±2.47	0.59±0.01	1.82±0.05	2.42±0.05
	1	1.55±0.04	5.86±0.18	14.09±0.70 b	154.22±2.69	0.58±0.01	1.79±0.05	2.56±0.56
9+38 L1	0	1.55±0.03	5.85±0.12	15.14±0.51	151.58±1.93	0.59±0.01	1.81±0.03	2.49±0.04
	1	1.47±0.08	5.92±0.32	15.13±1.32	151.47±4.95	0.60±0.02	1.72±0.09	2.42±0.11

- Different characters represent difference by $p<0.05$

이와같이 table 19 22의 data 분석에 의해 유의적으로 나타난 경제형질 연관 polymorphic band를 요약하면 아래와 같다. 대부분이 일당증체량과 연관성이 높았고, 13+15D5는 등지방두께와 연관이 있는 것으로 밝혀졌지만 사료요구율과 연관이 있는 marker는 본 연구에서는 밝혀지지 않았다.

- 13+15D5의 band는 FAT값이 낮은 개체에 출현 : 등지방두께가 얇은 것과 연관
- 34+46D2Y2의 band는 ADG값이 낮은 개체에 출현 : 일당증체량이 낮은 것과 연관
- 13+34L2의 band는 D90값이 높은 개체에 출현 : 90kg 도달일령이 높은 것과 연관
- 13+39Y2의 band는 W56값이 낮은 개체에 출현 : 56일령까지의 증체량이 낮은 것과 연관

제 4 장 도체등급 A급 출현율이 높은 DNA marker 개발

제 1절 서설

본 연구는 국내 양돈산업의 경쟁력 제고를 뒷받침하는 도체 등급제 실시의 효율을 높이고자 종래의 표현형에 의한 선발육종방법이 아닌 분자생물학적 접근방법으로 등급판정이 가능한 DNA marker를 개발하여 A등급을 생산할 수 있는 종돈을 조기에 선발할 수 있는 기술을 개발하고자 하는 목적으로 2차년도부터 추가하여 수행되어졌다.

1992년 7월부터 시범적으로 실시되어 왔던 돼지 도체등급제도가 지난 1994년 11월 30일에 축산물 등급화 거래 규정이 고시됨에 따라 1995년 2월 6일부터 서울, 제주, 부산지역에서 처음으로 도체등급이 시작되어 1995년 6월부터는 대구, 인천, 광주, 대전에서 도축돼지 모두가 도체 등급 판정을 받아야만 거래가 가능하도록 되어 1997년 현재에는 도체등급제도가 규정시되었다. 품질의 고급화, 등급화로 국제시장개방에 의한 경쟁력을 강화시키고자 하였으나, 종돈의 유전정보가 불확실하기 때문에 A와 B등급의 출현율은 41.9%밖에 되지 않아 양돈산업의 생산비가중과 생산성을 떨어뜨리고 있다. 또한 육량과 육질을 함께 고려하도록 되어있는 돼지 도체의 등급 판정이 시설과 인력부족등으로 육량 중심으로만 이루어 지고 있어 육질 고급화 추세에 역행하고 있다는 지적 또한 있다.

그래서 본 연구에서는 등급판정에 유전적 요인을 확인할 방안을 마련하고자 하였고, 우수 비육돈을 생산할 수 있는 종돈을 조기에 선발할 수 있는 기술을 개발하기 위해 도체등급결과를 이용하여 도체등급별 RAPD marker에 의해 A급 출현을 위한 specific marker를 개발하여 우수한 종돈을 조기에 선발하는 기술로 이용하고자 2차년도에 추가된 내용이다.

제 2절 공시동물

관리체계와 유전적인 변이에 의한 실험오차를 최소화 하고자 동일한 환경조건에서 사양관리된 한주농장의 LYD 비육돈을 이용하였다. 이러한 공시동물은 등급판정결과에 따라 A, B, C, D등급으로 구분하여 74두의 공시동물중 등급별로 4두씩 16두를 실험에 이용하였다.

부산경남 양돈조합의 도축장에서 도축되기 직전에 간 조직이나 출하직전에 혈액을 채취하여 보관한 후 본 연구에 이용되어졌다. 공시되었던 총 74두의 등급판정 결과는 table 23과 같이 A등급 9두, B등급 22두, C등급 29두, D등급 14두였고, 이중 A급 선발용 RAPD marker를 개발하고자 등급별 4두씩을 선발이용하였다.

Table 23. Contents of pig carcass grade using in the experimernt

일련번호	성 별	도체중량 (kg)	등 급	등지방 (mm)	일련번호	성 별	도체중량 (kg)	등 급	등지방 (mm)
1	1	78.2	D	34	26	3	86.6	C	24
2	1	93.0	D	30	*27	3	93.0	D	33
3	2	63.8	D	10	28	3	92.1	D	34
4	3	85.9	A	20	29	3	76.7	D	20
5	3	91.1	C	26	*30	3	91.3	D	30
6	3	81.9	B	15	31	3	86.4	D	30
7	3	72.0	B	17	32	3	90.3	B	17
8	3	76.4	C	26	33	3	91.6	B	22
9	3	68.2	B	18	34	3	81.9	B	24
10	3	96.2	C	28	35	3	81.5	C	25
11	3	80.0	B	17	36	3	86.8	B	21
12	3	89.3	C	24	37	3	89.7	C	23
13	3	65.6	B	20	38	3	89.6	B	24
14	3	72.1	B	14	39	3	96.6	C	27
15	1	83.8	B	21	40	3	107.5	D	28
16	1	67.9	B	13	41	3	78.8	B	20
17	3	72.6	B	18	42	3	78.5	C	26
18	3	64.4	B	16	*43	3	85.3	D	31
19	3	83.9	C	25	44	3	85.3	C	25
20	3	69.9	C	12	45	3	85.0	D	34
21	3	68.7	B	14	46	3	93.4	D	31
22	3	76.8	B	22	47	3	90.2	B	24
23	3	72.2	B	17	48	3	91.5	B	24
24	1	71.1	B	21	49	3	88.1	D	29
25	1	56.5	D	5	50	3	86.1	C	26

일련번호	성 별	도체중량 (kg)	등 급	등지방 (mm)	일련번호	성 별	도체중량 (kg)	등 급	등지방 (mm)
*51	1	71	B		63	1	78	B	
*52	1	78	A		64	1	82	B	
*53	1	76	A		65	2	75	A	
*54	1	68	C		66	2	83	B	
*55	1	91	D		*67	2	77	C	
*56	1	68	C		68	2	77	C	
*57	1	75	B		69	2	65	B	
*58	1	69	A		70	1	79	A	
*59	1	67	B		71	1	72	C	
*60	1	70	A		72	1	78	A	
*61	1	68	C		73	1	67	A	
*62	1	81	B		74	1	78	B	

- 성 별 : 1(암), 2(수), 3(거세),

- * 표시 : 등급 분석용 marker 개발을 위해 이용된 공시돈

제 3절 DNA 분리

1. 서언

공시된 74두의 LYD 비육돈은 출하전에 채취한 혈액이나 도축될 때 분리한 간조직으로서 genomic DNA를 분리하였다. 혈액에서 DNA의 분리는 품종별 marker 개발에서와 동일하게 wizard genomic DNA purification kits(promega)와 phenol extraction solution에 의한 방법을 병행하여 수행하였으나 간에서 DNA의 분리는 조직에서 DNA를 분리하는 protocol을 참조하여 수행되어졌다. 그래서 간으로부터 DNA의 분리작업은 여러 가지 방법을 이용하기도 하였고, solution의 첨가 순서에 따라

DNase의 활성화로 DNA가 모두 깨어져서 분리후 smear되어 나타나는 경우도 있어서 우선적으로 proteinase K를 grinding한 후 바로 첨가해 주었다. 그래서 간에서 DNA를 분리할 때에는 phenol에 의한 방법을 주로 이용하였으나 grinding후 kits를 이용하기도 하였다.

2. 혈액으로부터 DNA 분리

본 연구에서는 혈액에서 genomic DNA를 분리하는 방법으로 phenol에 의한 방법과 kits(promega)를 이용하는 두가지 방법을 이용하였다. 도체등급의 경우에는 많은 blood sample로 genomic DNA를 분리하여야 하므로 간편하고 신속하게 DNA를 분리할 수 있는 Kits를 주로 이용하여 품종별 marker 개발에서 사용하였던 방법과 같이(table 4 참조), cell lysis, nuclei lysis, protein precipitation solution를 차례대로 처리하여 pellet 형태인 DNA를 확보하였다. 그리고 분리된 DNA는 agarose gel loading으로 DNA의 절편화가 일어났는지 확인하고 흡광도를 측정하여 적정 농도로 조절하여 이용되어졌다.

3. 간으로부터 DNA 분리

간에서 DNA를 분리하기 위해서 우선 간조직중 1g정도를 떼어서 잘게 grinding하여 약 10배의 extraction buffer(10mM Tris · Cl(pH 8.0), 20㎕/㎖ RNase, 100mM NaCl, 0.5% SDS, 25mM EDTA)와 DNase를 제거하기 위한 proteinase K 500㎍/ml를 처리하여 54℃에서 3시간 동안 incubation 시켰다. 그런 다음 혈액에서의 DNA 분리과정과 동일한 방법으로 phenol를 첨가하여 protein을 제거하였다. Tris saturated phenol, phenol/ chloroform/ isoamylalcohol, 그리고 chloroform을 순서대로 첨가하고 분리시키는 과정을 각각 2번정도 수행하여 protein을 제거하였다.

여기에 ethanol과 salt를 첨가하고 DNA pellet를 얻어 ddH2O나 TE buffer에 녹여서 -20℃에 보관하여 이용하였다.

4. 결과 및 고찰

74두 비육돈의 혈액 및 간으로부터 DNA를 분리하였는데 본 연구에서는 그 중 등급별로 각각 4두씩 16두의 DNA sample을 이용하였다. 혈액으로부터 DNA 분리과정은 kits를 이용하여 쉽게 분리할 수 있었고 간으로부터의 DNA 분리는 1g의 간조직을 grinding시킨 후 phenol solution을 처리하였으므로 kits를 이용하는 것보다 시간의 소모가 더욱 컸다. 그러나 간의 경우에는 많은 genomic DNA가 존재하여 고농도의 DNA를 분리할 수 있었다. 본 연구에서 이용한 16두의 DNA sample은 agarose gel전기영동으로 약 24kb의 genomic DNA를 확인하였고 spectrophotometer에서의 OD1€0/2€0nm에서 흡광도 측정을 통해서 그 값이 1.8이상인지를 확인하였다. 1% Agarose gel 전기영동으로 확인한 DNA 분리 결과는 figure 7과 같았다.

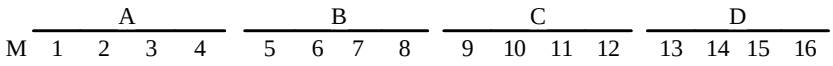


Figure 7. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA.
M ; λ / Hind III size marker. A grade ; lanes 1 - 4, B grade : lanes 5 - 8, grade : lanes 9 - 12, D grade : lanes 13 - 16

제 4 절 RAPD marker 개발조건 확립

도체등급별 RAPD marker를 개발하기 위한 PCR 조건은 품종별 marker 개발의 조건과 동일하게 이용하였고 DNA의 농도만을 적정 수준으로 조절하여 주었다. 공시된 74두의 비육돈의 등급판정은 A등급 9두, B등급 32두, C등급 19두, D등급 14두였고, 그중에서 각 등급별로 4두씩을 선별하여 16두(A등급 : 52, 53, 58, 60 ; B등급 : 51, 57, 59, 62 ; C등급 : 54, 56, 61, 67 ; D등급 : 27, 30, 43, 55)를 이용하였다. A, B, C, D 등급별로 4두씩 16두의 DNA sample은 모두 DNA 농도가 서로 달라서 우선 DNA의 농도 수준을 동일하게 맞추어 주었다. figure 8의 loading 결과와 흡광도값에 의하여 DNA의 농도를 정하고, 품종별 marker 개발에서 수행한 PCR condition에 따라 PCR test하여 도체등급 marker 개발에 적합한지를 확인해 보았다. primer pairs를 이용하여 PCR하였으므로 그에 적합한 solution의 농도와 thermal cycle을 고정시켜 수행하였다.

제 5 절 RAPD marker 개발

1. 서언

A, B, C, D등급에 따라 각 4두씩 공시하여 RAPD marker를 screen한 결과 총 13개의 primer pairs에서 등급을 구분짓는 16개의 polymorphic band를 확보할 수 있었다. 총 90개 primer pairs로 일차적으로 PCR한 후 두 번 이상의 검증 작업을 거쳐서 polymorphic band가 출현한 13개의 primer pairs를 확보할 수 있었다. 대부분의 primer pairs를 이용한 반응결과는 16두의 모든 sample에서 동일한 band pattern을 보임으로써 polymorphism을 확보할 수 없었다. 도체판정체제가 미흡한 상황에서

도체판정 결과에 따라 등급별 marker를 확인하였으므로 약간의 오차는 존재하리라 보고, 또한 실험에 이용한 sample의 수가 적어서 등급의 특이 marker로 확립하는 데에는 부족한 점이 많으리라 본다. 그러나 90개 primer pairs중 13개만은 등급에 연관되어 특이한 출현 양상을 보였으므로 본 연구에서는 이 marker들을 등급과 약간 연관성이 존재한다고 판단하였다. 또한 이들은 대부분 A등급이나 A와 B, A, B 그리고 C등급에 band가 출현하여 우수한 등급의 특이성을 확인할 수 있었고 D등급과는 출현양상에 상당한 차이가 나타나서 우수 등급 marker로 개발하고자 sequencing을 수행하기도 하였다. 13개 primer pairs의 16개 polymorphic band는 더 많은 sample의 확인작업으로 도체등급 A급 출현율이 높은 우수한 종돈을 조기에 선발하는데 도움이 될 수 있도록 해야 할 것이다.

2. 결과 및 고찰

총 90개의 primer pairs들을 검색한 결과 50% 이상의 재현성을 가지는 13개 primer pairs에서 16개의 polyorphic band를 확보하였다. primer pairs별로 얻어진 결과는 아래 figure 8과 같고, 결과를 각 등급별 이용두수 4두에 대한 band 출현두수의 비율로서 table 24에 나타내었다.

결국 A등급에서만 특이하게 band가 나타난 primer pairs는 7+29 병합에서 나타난 1.5kb와 0.8kb의 polymorphic band였다. 대체로 이러한 marker들은 등급에 따라 4두에서 band의 출현정도에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다. 또한 A등급에서 100%의 출현율을 보이는 band중 B, C, D등급에서는 출현율이 다소 떨어지게 나타나는 경우도 있었고, A, B, C등급과 D등급의 출현비육에 큰 차이를 보이는 것이 많아 이들은 모두 우수한 종돈을 조기 선발에 이용할 가치가 있을 것이라 본다.

도체등급에서 나타난 polymorphic band를 산업적으로 이용하기

위해서는 좀더 많은 연구를 수행할 수 있는 투자가 필요하다. 본 연구에서 추가계획으로 실시하여 확립한 연구결과는 등급선발에 좋은 marker를 더욱 많이 개발할 수 있으리라는 가능성을 확인할 수 있었다. 그리므로 연구비가 추가 지원되어 등급별 재현성 검증이 끝난 RAPD marker는 더욱 신뢰성있는 검증작업을 거쳐 등급판정에 활용하고 우수한 종돈을 조기에 선발하는데 이용할 수 있을 것 같다.

7+29

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

7+40

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

7+31

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

7+30

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

8+9

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

8+15

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

9+10

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

9+15

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

9+32

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

7+8

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

7+11

	A			B				C				D			
M	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

7+35

	A				B				C				D			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

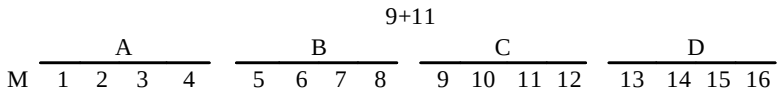


Figure 8. PCR products of carcass generated by primer pairs.
(M; λ/Hind III size marker. A grade ; lanes 1 - 4, B grade : lanes 5 - 8, C grade : lanes 9 - 12, D grade : lanes 13 - 16)

Table 24. RAPD marker for the carcass grade

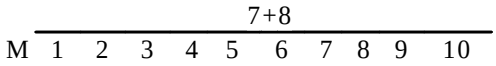
#	Size(Kb)	A class(/ 4)*	B class(/ 4)	C class(/ 4)	D class(/ 4)
7 +29	1.5	3	0	0	0
	0.8	3	0	0	0
7 + 40	1.5	3	0	0	1
7 + 31	0.3	3	0	0	2
7 + 30	1.5	3	0	0	0
	0.6	3	0	0	1
8 + 9	1.7	4	4	4	1
8 + 15	1.7	4	4	4	1
	0.9	4	4	4	1
9 + 10	1.7	2	1	1	4
9 + 15	1.7	1	2	1	3
9 + 32	1.7	1	2	1	3
7 + 35	1.2	4	4	3	1
7 + 8	1.8	3	4	2	0
7 + 11	1.8	3	4	2	0
9 + 11	1.5	2	4	4	0

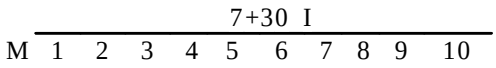
* A(B, C, D) class : **총 4두의** A(B, C, D) **도체등급중에서** polymorphic band**가 나타난 개체의 수**

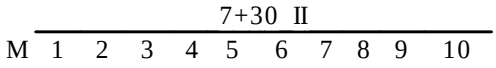
제 6절 DNA cloning과 DNA sequencing

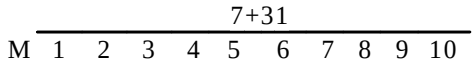
확보된 16개의 polyorphic band는 두 번이상의 PCR반응으로 재현성 검증한 것이다. 등급별로 확보된 sample 수가 적어 등급의 특이 marker로 생각되기는 어려우므로 등급별로 더 많은 공시돈을 구축하여 검증작업이 수행되어야 할 것이라 생각된다.

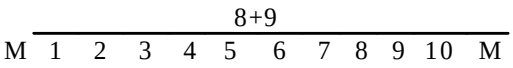
따라서 그 중 재현성이 높고 A등급에 특이하게 나타난 polymorphic band는 figure 9에 나타낸 것 처럼, cloning작업을 거쳤다. 그리고 cloning된 10개의 polymorphic band들은 sequencing을 수행하여 새로운 primer pairs로 합성하여 더욱 재현성이 높은 polymorphic band로 개발고자 하였다. Table 25는 10개의 polymorphic band를 sequencing하여 sequence의 n-terminal, c-terminal쪽 DNA sequence를 추가로 나타낸 것이다. 이 부분은 다음에 primer로 합성하고 재검증하여 도체등급 연관 marker로 개발하여 우수한 종돈을 조기 선발하는데 이용할 수 있는 자료가 될 것이다.

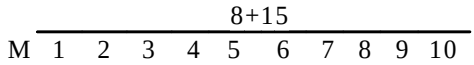

7+8
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


7+30 I
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


7+30 II
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


7+31
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10


8+9
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M


8+15
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

9+10A4

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

9+11

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

9+15A4

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

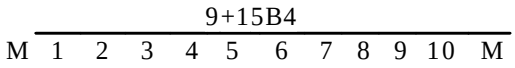


Figure 9. Digestion results of cloned carcass polymorphic band, M is У /HindIII or У/HindIII+EcoRI size marker. A and B is carcass grade, polymorphic band are generated primer pairs, grade, plus appeared order of band.

Table 25. New primer pairs sequence of carcass polymorphic band

Polymorphic banda		Sequence
7+8 A	T7b	AAACCAAAGCTAATTGGGGTTGAAG
	SP6c	GAACCAAAGCTAAGTGGTTCTATGA
7+30 A1	T7	CACCCAAGTGTACATCTTAAGGTAG
	SP6	CAACCAAGTGTACATCTCTGATCAT
7+30 A2	T7	CACCCAATTGTACATCTTGTACTAC
	SP6	CAACCAAGTGTACATCTGGAGCTGG
7+31 A	T7	GTAAACTTCAAAAAGCTTCATCATC
	SP6	GTGAACTTCAAAGAGCTAGGTTGTA
8+9 A	T7	CAACCAAACCTAATTGGCTGCACAA
	SP6	GCGTGCAATTTATGATGTACCACGG
8+15 A	T7	AAACCAAAGCTAATTGGGCTGGCGG
	SP6	GACCAAACTAACTGGTTGGGGAATC
9+10 A	T7	GCCTGCAATTTATCATGTACATGTA
	SP6	GCGTGCAATTTATGATGGTATGGGT
9+11 A	T7	GCCTGCAATTTATCATGTACACAAA
	SP6	GCGTGCAATTTATGATGGTCAGAAG
9+15 A	T7	GCCTGCAATTTATCATCCTAATTGG
	SP6	GTGCAATTTATGATGCCATCCGTTA
9+15 B	T7	GCTTGCAATTTATAATGCCATGCAC
	SP6	GCGTGCAATTTATGATGGTATATGC

a. Sequencing된 polymorphic band로 병합된 primer pairs의 number와 도체등급, band 갯수를 나타낸다.

b. pBluescript vector의 T7 primer(5'-AATACGACTCACTATAG-3')에 의한 sequence

c. pGEM®-T easy vector의 SP6 primer(5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3')에 의한 sequence

제 7 절 PSS유전자 연관 DNA marker 진단기술 개발

1. 서언

PSS(Porcine Stress Syndrome)는 열성의 스트레스 감수성 유전자를 homozygous 상태로 가진 돼지다(Fujii et al., 1991). PSS 유전자는 1953년 J. Ludvigsen에 의해 처음으로 밝혀진 이후 이를 제거하려는 노력이 많이 시도되었다. 그러나 한편으로 PSS 유전자를 가진 개체가 정상인 개체보다 육량 증진 효과를 보이기 때문에 이를 이용하려는 노력도 역시 많이 시도되어 왔다.

국내산 돼지고기의 대일수출을 촉진시키기 위해선 우선적으로 PSE(물돼지고기) 예방에 총력을 기우려야 하며 예방책 마련을 서둘러야 할 것으로 지적됐다. 현재 국내산 돼지고기의 일본수출돈육에서 PSE 발생률은 30~50%로 대만의 3~5%에 비해 월등히 높아 한국산 돼지고기의 대외 이미지를 크게 손상시키고 있는 것으로 밝혀졌다.(축산신문 10월)

PSS 유전자를 가진 돼지는 여러 가지 스트레스(고온, 밀사, 부주의한 취급) 요인으로 근육 강직, hypermetabolism, 고온, 세포내 이온의 불균형 등의 증상을 나타내어 폐사하거나 도축시 육질이 나쁜 PSE(Pale, Soft, Exudative)을 생산하는 돼지를 말한다. 따라서 이러한 육질이 나쁜 PSE 돈육의 생산은 양돈 농가에 막대한 경제적 손실을 초래하게 되므로 PSS 유전 인자를 제거하기 위한 목적으로 PSS 유전 인자 검색 방법을 개발하기 위해 많은 연구자들이 노력하였다. Halothane 방법은(Webb, A. J. 1978) 처음으로 PSS 유전자를 보유한 돼지를 검색하는데 사용되기 시작하여 현재도 이용하고 있으나 부정확성과 돼지에 해를 가할 수 있다는 단점이 있다. 그밖에 PSS 유전자와 연관된 Phi, Pgd를 이용한 방법이 개발되었으나 근래 결과에 의하면 PSS와는 전혀 연관이 없음이 밝혀져 그

유용성은 없어졌으며, H system를 이용한 진단법, creatine phosphokinase(CPK)의 활성 조사법, 세포내 ATP와 inosine monophosphate의 함량 측정법이 있다. 그러나 근본적인 원인을 진단하는 분자 생물학적 방법이 개발되어 유전자가 6번 chromosome에 위치하며 근육의 수축 및 이완을 조절하는 ryanodine receptor의 돌연 변이 유무를 판별함으로써 정상인 개체와 PSS돼지를 구분하게 하는 방법이다.

즉 단일 염기 서열이 돌연변이 유무에 따라 정상인 개체, 잠재성 유전자 보유 개체, PSS 개체를 구분할 수 있게 되었다. 이러한 PSS 유전자를 가진 돼지는 PSE 돈육생산과 가장 밀접한 관계가 있어 이를 제거하려는 노력이 되어 왔다. 돼지에 있어 이러한 PSS의 빈도는 품종에 따라, 혹은 국가에 따라 큰 차이를 보이고 있는데 현재 보고된 자료에 의하면 상업화된 돼지중 약 10%정도가 잠재성 유전자 보유 돼지로 추측되며, 약 1.5%정도가 homozygous한 PSS 돼지라 추정되고 있다. 그리고 이러한 1.5%의 PSS 돼지중 12%이상이 사육 중에 폐사하며 약 50%이상이 도축시 나쁜 육질의 PSE 돈으로 판정된다.

본 연구는 돼지의 근육내 sarcoplasmic reticulum에서 Ca^{2+}의 방출을 조절하는 ryanodine receptor에 돌연 변이가 생겨 발생하게 되는 ryanodine receptor가 근육에서 세포내 Ca^{2+}의 농도를 조절하여 근육의 수축과 물질 대사를 조절하는게 됨을 이용하였다(MacLennan and Phillips, 1992). 정상인 돼지에 대한 PSS 돼지의 돌연 변이를 밝혀 내기 위해 ryanodine receptor의 cDNA를 정상의 돼지와 PSS 돼지로부터 추출하여 염기서열을 비교 분석하였다. 이로써 PSS돼지의 ryanodine receptor 염기 서열중 1843번째의 염기가 정상인 돼지의 C에서 T로 바뀌면서 돌연 변이가 발생하여 스트레스에 대하여 민감한 반응을 보이게 됨을 밝혀 냈다(Ferrie et al., 1992; Lo et al. 1991).

등급별 RAPD marker개발 중 D등급에서 많이 출현되는 PSE돈육을 식별할 기술을 개발하고자 하였다. 이미 개발되어진 RAPD marker가 등급에 막대한 영향을 끼치는 PSS gene과의 연관이 있을 것으로 추정하였으며, 따라서 이미 진단기법으로 이용되는 방법을 응용한 새로운 기법을 찾고자 하였다.

기존 PSE 돈육을 생산하는 PSS 유전자를 진단하는 방법으로 halothane gas 주입방법, PCR-RFLP방법을(Prosser, 1993; Saperstein and Nickerson, 1991) 응용한 STAS-PCR 방법이 있다. 이러한 대립유전자 특이 PCR(amplification refractory mutation system, ARMS; Newton et al. 1989; Wu et al. 1989) 방법으로 이미 호주의 IFA lab.의 N. Zinovieva가 HAL gene의 exon 1843번째가 C에서 T로 point mutation된 site를 기준으로 STAS(N. Zinovieva, 1996) 기법으로 PSS 유전자를 진단하는 최근 방법을 제시하였으나 본 연구는 이를 응용한 DTAS-PCR기법으로 간편하면서도 재현성이 99%이상의 결과를 가지는 방법을 개발하게 되었다.

2. 재료 및 방법

Ryanodine receptor의 exon DNA site 1843번째의 C에서 T로의 point mutation site(HAL gene)를 기준으로 4개의 primer(Hp, hp, Lp lp)를 인위적으로 제작합성하여 PCR 반응에 이용하였다.

annealing Temperature에 있어 차이가 없도록 하고 증폭이후 primer dimer의 형성이 적도록 디자인된 primer는 그 증폭 band의 size가 agarose gel에서 관찰하기 용이하였다. DTAS-PCR 조건은 다음과 같이 이루어 졌다.

100ng/㎕의 genomic DNA를 주형으로 한 튜브에 원액 300ng/㎕의

0.3μℓ primer 2개(Hp, LP)씩과 또 다른 한 튜브에 primer 2개(hp, lp)씩을 넣고, 그외 PCR reagent들은 이미 RAPD marker 확립의 PCR 조건과 thermal cycle를 변형하여 아래 table 26과 같이 이루어 졌다.

Table 26. Primer pairs의 PCR condition

PCR mixture		PCR cycle		
10X buffer	2.5μℓ	1st_cycle		50_cycles
25mM MgCl2	2 μℓ	94℃ 2분		94℃ 1 분
2.5mM dNTPs	2 μℓ	68℃ 1분	——>	68℃ 1분
16ng/μℓ primer	2 μℓ	72℃ 2분		72℃ 1분
5-10ng/μℓ DNA	5 μℓ		——>	72℃ 10분
5U/μl Taq polymerase	0.1μℓ		——>	4℃ 저장

3. 결과 및 고찰

기존의 PCR-RFLP 방법에 의한 PSS 진단법은 분석절차가 까다롭고 시간의 소모가 많아 이를 응용한 STAS 방법이 새롭게 개발되어졌다. STAS 방법은 1개의 tube에 4개의 primer를 한꺼번에 첨가해서 PCR한 후 그 결과를 agarose gel 상에 확인할 수 있는 간편한 분석방법이다. 본 연구에서는 PSS 유전자 보유 돼지를 선별하는 기술에 깊은 관심을 가지게 되어 이 분석법을 적용하여 PSS를 진단해 보았다. 그런 과정에서 이 방법에서도 몇 가지의 문제점을 찾게 되었고 이를 극복할 방안을 묘색하게 되었다. 그리하여 본 연구에서는 DTAS 방법을 개발하게 되었는데 이 방법은 STAS-PCR에서 발생하는 여러 가지 문제점을 극복할 수 있고 더욱

정확하게 분석이 가능하다는 여러 가지 장점을 가졌다. 두 방법의 차이점은 table 27과 같고, 본 연구에서 밝힌 DTAS에 의한 PCR 결과는 figure 10과 같았다. 본 연구에서는 이 기술을 보급하여 양돈장 및 종돈장의 PSS 돈육 검색에 이용하여 경제적 손실을 막고자 한다.

Table 24. PSS 유전자 진단방법 비교

항 목	PSS 유전자 진단 방법 비교	
	기존 방법(STAS)	개발 방법(DTAS)
primer sequence	4개(INT 1, INT 2, EXT 1, EXT 2) primer를 single-tube -PCR(STAS)	4개(H1, H2, L1, L2) primer를 double-tube-PCR (DTAS)
Primer	annealing temperature 10℃ 차이 non-specific band 출현 primer dimer 높은 발생율	annealing temperature 차이 없음 specific band 출현 primer dimer 낮은 발생율
Band size	증폭된 band size가 작아서 agarose gel로 확인이 어려움	agarose gel에서 확인이 쉬운 band size로 증폭
재현율	50% 이상	99% 이상

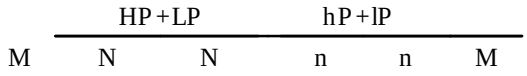


Figure 10. Identified results of PSS gene by DTAS-PCR method. HP+LP is primer to identify normal gene and hP+lP is primer to identify recessive gene. Large N is results of normal gene and small n is results of recessive gene.

제 5 장 SCAR PCR 분석

제 1 절 서설

RAPD-PCR 분석법은 genome의 sequence에 대한 사전 지식이 없이 간편하게 유전자를 검색할 수 있다는 장점을 가지는 반면 결과에 대한 신뢰성이 많이 부족하다는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다. 임의의 sequence를 가지는 primer로 PCR하여 나타나는 DNA fragment의 pattern으로서 품종이나 개체의 특성을 확인하고자 하나 사실 PCR만으로는 polymorphic band를 품종의 특성으로 규정하기에는 부족한 점이 많았다.

그래서 본 연구에서는 RAPD-PCR 방법에 SCAR(Sequence Characterised Amplified Regions)-PCR 방법을 도입하였다. SCAR는 sequence에 의해 하나의 RAPD fragment를 만들 수 있는 locus가 되어 이 locus에 특이한 부분을 고안하여 그 부분만을 PCR로 증폭시켜 단일 fragment로 만들 수 있게 된다. 이 방법은 random한 반응에 의한 PCR 결과가 아니라 밝혀진 sequence에 의한 specific 반응을 관찰하므로서 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있게 되므로 RAPD의 단점을 극복할 좋은 방법이 될 수 있다. 아직까지 이 방법은 많이 보편화되어 있지 않아 다른 연구에서는 이용이 되어지지 않고 있어 많은 자료 분석에 의해 수행되어지지 않았지만 cloning 및 sequencing 과정을 통해 genomic DNA상의 sequence를 primer로 제조하여 PCR하였으므로 specific한 결과를 얻기에는 충분하였다.

제 2 절 SCAR PCR

1. 서언

SCAR PCR은 sequence에 의해서 genome의 특정부위를 specific하게 증폭시켜야하므로 polymorphic band부분만의 정확한 sequence를 알기 위해 DNA cloning 및 sequencing 과정을 거쳐서 새로운 primer를 제조하였다. 이 방법은 cloning, sequencing 과정을 추가하고 또한 새로 합성된 primer의 반복적인 PCR test와 PCR condition을 조절해야 하므로 시간의 소모 및 실험절차의 번거로움 같은 많은 어려움이 뒤따랐다. 그러나 본 연구에서는 더욱 정확한 결과를 얻고자 SCAR PCR 과정을 도입하여 일부의 polymorphic band를 sequencing하고 sequencing된 polymorphic band의 17 25bp 정도를 새로운 primer로 제조하여 다시 PCR하는 과정을 수행하였다.

처음에는 sequence중 vector 바로 뒤에 존재하는 primer pairs의 sequence 뒷부분부터 17 base primer를 합성하여 SCAR PCR을 수행하였는데, 좋은 결과를 얻을 수 없었다. 그래서 더욱 정확한 결과를 얻기 위해 vector의 바로 뒤인 primer pairs의 sequence 부분부터 25-base를 새로운 primer로 합성하여 PCR 확인하였다. 본 연구에서 primer를 합성한 두 가지의 방법을 table28에 나타내었는데, 이와같이 primer의 합성방법에 따라서 결과에 많은 영향을 미치고, 또한 아직까지 확립되어진 정확한 방법이 없어서 SCAR-PCR을 수행하는데 많은 어려움이 뒤따랐다. 그래서 SCAR PCR 수행은 시간의 부족으로 현재까지는 4개를 확인하여 결과를 얻을 수 있었다.

Table 28. SCAR primer 합성의 두가지 방법

이전에 합성한 방법	새로 합성한 방법
T vector + old primer +_fragment new primer로 합성 ◂┐	T vector + old_primer_+_fragment new primer로 합성 ◂┐

2. 재료 및 방법

sequencing으로 밝혀진 polymorphic band의 sequence 일부를 새로운 primer로 제조·합성하여 PCR을 수행하였다. PCR condition은 primer의 길이와 GC content에 따라 여러 조건으로 변경해서 specific한 결과가 나타나도록 PCR하였다. 새로 합성된 primer의 GC content에 따라 계산된 PCR thermal cycle와 annealing temperature는 table 29에 primer sequence와 함께 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

Sequencing된 24개 polymorphic band의 sequence에 의해 RAPD primer sequence 부분과 함께 25 base를 SCAR PCR을 위한 새로운 primer로 합성하였다. 이 과정은 앞에서 설명한 바와같이 새롭게 추가되어진 부분이고 수행절차가 복잡하고 시간의 소모가 상당히 커서 3차년도에 모두 수행할 수가 없었다. 또한 30개의 SCAR primer의 경우 primer의 size가 다르고 GC 함량이 모두 달라서 모두 새로운 조건을 맞추어 주어야만 하였다. specific한 primer이므로 RAPD primer에서 보다 enzyme과 primer에서 적은 농도로 reaction이 이루어져야 하였고, annealing temperature에서는 size가 길어짐에 따라 RAPD보다 높은 온도로 PCR이 수행되어야하는 의 여러 가지 어려운 점이 많았다. 어떤 경우에는 SCAR primer로 PCR하였을

때, figure 11에서 보는 바와 같이 모든 품종에서 동일하게 band가 출현하는 경우도 있었는데 이것은 primer의 합성이나 annealing temperature의 condition이 맞지 않아서 인 것 같다. 그래서 현재까지 30개중 4개의 SCAR primer에서 좋은 결과를 얻을 수 있었는데 30개의 primer sequence는 table 29와 같다. Table 29와 같이 합성한 primer를 모두 검증작업할 수는 없었고 이중 4개를 확인작업하였는데 그 결과는 figure 12와 같았다. Table 28에서 처럼 primer의 제조방법에는 2가지가 있었는데 이전의 primer pairs sequence 부분을 새로운 primer 부분에 첨가한 것과 그렇지 않은 경우가 있었다. 처음에는 이전의 primer pairs부분의 sequence를 첨가하지 않고 primer를 제조하였는데 그 결과가 좋지 않아서 다시 새로운 primer를 제조하였다. 시행착오를 거듭하면서 시간과 시약의 소모는 많았으나 더욱 정확한 결과를 얻어서 실제적으로 양돈농가에 보급하고 현장에 활용할 수 있는 자료를 마련하고자 노력하였다.

Table 29. 새로 합성된 SCAR primer의 sequence

Polymorphic band		Sequence	Annealing Temp.(℃)
13+15 D	T3	CTACCTACTCGAAGAAGAAAAATAG	66
	T7	CTACCTACTCGAAGAAGTTCGTTAA	
13+34 Y	T3	CTACCTACTCTAATAAGTCTGAGAG	65
	T7	CTACCTACTCTCTAATAAGATAGAA	
32+59 D2	T3	AGGTAGTCTAGTTAACCACTGAGCC	68
	T7	GATACCCTTATTCTAGAATTTTGGG	
34+54 Y2	T3	AAGACCGTCTCGATTATTGTGTCTC	67
	T7	AAGACCGTCTCGATTATACCATGAT	
34+46 L	T3	TGTAACAAAATGATACGGCATGCAA	68
	T7	TGTAACAAAATGATACGTGGGGAAC	
13+34 L	T3	CTACCTACTCGAAGAAGTCTGAGAG	65
	T7	CTACCTACTCGAAGAAGAGAGAATA	
34+39 L1	T3	GTTTGACTTAGACTTCATTTCAACG	66
	T7	GTTTGACTTAGACTTCAGGCTGGTG	
34+39 L2	T3	GTTTGACTTAGACTTCATTTCAACG	64
	T7	GTTTGACTTATACTTCAAGTTTAGA	
34+46 Y	T3	TGTAACAAAATGATACGAATGGGAG	68
	T7	GCGTGCAATTTATGATGCCACGGCT	
34+54 L1	T3	AAGACCGTGTCTCGATTATTGTGTC	65
	T7	AAGACCGTCTCGATTATACCATGAT	
32+59 L	T3	AGCCACGGCCGTGAAGCCACCTAGC	72
	T7	GATACCCTTATTCTAGATTTTATTG	
13+41 D1	T3	CTACCTACTCTAAGAAGAAAACAGA	67
	T7	CTACCTACTCTAAGAAGTAGTTAAG	
13+49 Y	T3	CTACCTACTCGAAGAAGAAAATAAG	67
	T7	CTACCTACTCGAAGAAGTTCGTTAA	
49+54 L1	T3	AAGACCGTCTCGATTATTTTAACTT	64
	T7	AAGACCGTTCTCGATTATACCAAAA	
34+54 Y1	T3	AAGACCGTCTCGATTATTCAACTAT	62
	T7	AATACCGTCTCCGATTATAGGACTT	

Polymorphic banda		Sequence	Annealing temp.(℃)
9+38 L	T7	GCGTGCAATTTATGATGTTAAAGAC	65
	SP6	CATCTCCTTGTAACATGGCCTATAG	
34+9 L	T7	TTCTACTCTCTCTATAATATTCAAA	67
	SP6	TTCTACTCTCTCTATAATAAATGGT	
32+8 Y	T3	CCCAAAACTCGAATCCCATAGCTAT	68
	T7	GATACCCTTATTCTAGAATTGTGCAC	
32+57 D	T3	GATACCCTAATTCTAGAATAAGCCTT	69
	T7	GATACCGTTAATCTAGAATCCGCTTA	
13+41 D1	T7	GTACCTACTCGAAGAAGATTATGAC	65
	SP6	AACTCGAATCCCTAGGAGCCTTATG	
18+34 Y	T7	TTCTACTCTCTCTATAACGAATACA	70
	SP6	GTGCGTAGGTTTAGAAACAAGTGCT	
34+46 D	T3	TGTAACAAAATGATACGCATTCAGT	66
	T7	TGTAACAAAATGATACGTTAGATCA	
13+34 D	T3b	CTACCTACTCGAAGAAGTCAACTAT	70
	T7c	AATACCGTCTCGATTATAGGACTTC	
49+54 L2	T3	AAGACCGTCTCGATTATGACATGAA	68
	T7	AAGACCGTCTCGATTATGTTGTATC	
54+34 D1	T3	AAGACCGTCTCGATTATTGTGTCTC	65
	T7	AAGACCGTCTCGATTATACCATGAT	
18+28 D	T3	GTGCGTACGTTTAGAACAAGGATGT	66
	T7	GTGCGTAGGTTTAGAAATTAAGACA	
13+34 Y1	T3	GATACCCTTATTCTAGAATTAGTTT	64
	T7	GTGCGTAGGTTTAGAAATAAAATTA	

Polymorphic banda	Sequence		Annealing temp.(℃)
32+59 D1	T3	GATACCCTTATTCTACAGATTACTTT	65
	T7	CAAGCTTATCTATACCGTCGACCTC	
54+46 Y	T7	AAGACCGTCTCGATTATCCGTATGT	66
	SP6d	GTAACAAAATGATACGCACAACAGA	
18+34 L	T7	GTGCGTACGTTTACAAAACACAAAC	70
	SP6	GTGCGTAGGTTTACAAATCACACGT	

a. Sequencing된 polymorphic band로 병합된 primer pairs의 number와 품종, band 갯수를 나타낸다.

b. pBluescript vector의 T3 primer(5'-ATTAACCCTCACAAAG-3')에 의한 sequence

c. pBluescript vector와 kit의 T7 primer(5'-AATACGACTCACTATAG-3')에 의한 sequence

d. pGEM®-T easy vector의 SP6 primer(5'-TGAGTATTCTATAGTGT-3')에 의한 sequence

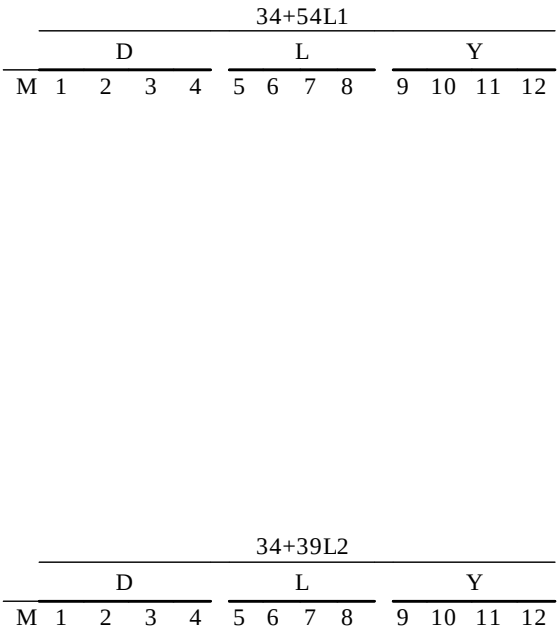


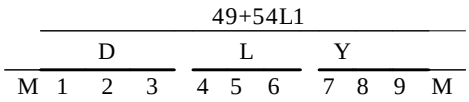
Figure 11. Example of SCAR-PCR results by old synthesised SACR primer. Those were shown PCR results by incorrected condition and primer sequence. M is ɣ DNA/HindIII+ EcoRI and upper numer is primer number

9+38L

D				L				Y			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

13+34L

D				L			Y			
M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	M



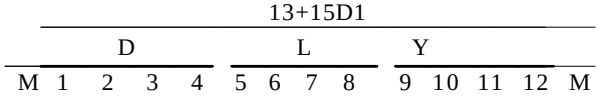


Figure 12. SCAR-PCR results by new synthesised 4 SACR primer. Those were appeared difference among three breeds. M is y DNA/HindIII+ EcoRI and upper nubmer is primer number

제 6 장 연구결과의 활용

3년이란 연구기간동안 품종식별 및 도체등급 선발용 RAPD marker의 개발을 위해 1990년대부터 개발된 PCR-RAPD 분석법을 수행하였다. 양돈산업의 어려운 실정을 극복하고자 이 연구를 개발하여 양돈농가에 보급하고자 하였으나, 당초 계획되었던 3년이란 연구기간은 너무 부족하였고, 국내에 이러한 연구의 미흡으로 연구하는데에도 많은 시행착오를 겪어야만 하였다.

지금까지의 연구결과는 완전하게 현장에 활용되어지기에는 부족한 점이 많지만, 우선 품종식별용 RAPD marker는 총 19개 10 base primer에서 25개 polymorphic band와 총 38개 primer paris에서 재현율이 높은 67개 polymorphic band를 확보하였다. 이 marker들은 국내에 유입되고 있는 품종의 순수성을 판별하는데 이용할 수 있을 것이다.

도체등급을 식별할 수 있는 marker는 13개 primer pairs에서 16개 polymorphic band를 확보하였는데, 이들은 대부분이 A등급이나 A, B, C 등급에서 특이적으로 나타나므로서 우수한 등급을 선별하는데 좋은 marker가 될 것 같다. 이중 A등급과 특이하게 연관이 있는 10개의 polymorphic band는 DNA cloning 및 sequencing을 수행하여 더욱 정확한 marker로 개발하고자 하였다. 이것은 도체등급제도에서 A등급의 출현율을 높일 수 있는 우수 종돈의 조기 선발을 가능하게 하여 경제적 손실을 막을 수 있을 것이다.

경제형질 연관 marker의 경우에는 F2 54두로 경제형질과의 연관성을 확인해 보았는데 품종별로 나타난 11개의 polymorphic band가 F2에서도 특이하게 나타났다. 그래서 이들의 경제형질과의 연관성을 SAS GLM 프로그램에 의해 분석해 본 결과 일당증체량과 등지방두께와 연과있는 marker를

확보하였는데 이것은 산업현장에 보급하여 일당증체량과 등지방두께와 연관이 있는 marker를 이용하여 경제형질이 우수한 종돈을 조기에 선발하는데 기여할 수 있을 것 같다.

그리고 본 연구에서는 더욱 정확하고 간편한 PSS 유전자 진단 기술을 개발하였는데 이것은 곧바로 PSS를 진단하는데 활용하여 양돈농가의 경제적 손실을 막도록 할 것이다.

이상과 같이 개발된 기술을 이용하여 품종별 순수혈통을 검정하고 경제형질이 우수한 종돈을 조기에 선발할 수 있도록 이 기술을 보급하여 양돈산업의 생산비 절감과 생산성 향상에 기여하도록 해야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Ferrie, R.M., M.J. Schwartz, N.H. Robertson, S. Vaudin, M. Super, G. Malone and S. Little. 1992. Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. Am. j. Hum. Genet. 51 : 251-262.

2. Fujii, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. D. Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'brien and D. H. Maclennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science 253 : 448-451.

3. Geldmann H.(1975) Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. Theoretical and Applied Genetics. I. Methods. Theoretical and Applied Gentics 46, 319-30

4. Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S. L. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. Nature 316 : 76.

5. Lo, Y. M., P. Patel, C. R. Newton, A. F. Markhan, K. A. Fleming and J. S. Wainscoat. 1991. Direct haplotype determination by double ARMS : specificity, sensitivity and genetic applications. Nucleic Acids Res. 19 : 3561-3567.

6. Maclennan, D.H. and M.S. Phillips. 1992. Malignant hyperthermia. Science 256 : 789-794.

7. N. Zinovieva. Dept. of Biotechnology in Animal Production, Interuniversitares Forschungsinstitut fur Agrarbiotechnologie(IFA), Konrad Lorenz Str. 20, A-3430 Tulln, Austria

8. Newton, C.R., A. Graham, L.E. Heptinstall, S.J. Powell, C. Summers, N Kalsheker, J.C. Smih and A.F. Markham. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nuclic Acids Res. 17 : 2503-2516.

9. Paran, I. and R. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy midew resistance genes in lettuce. Theior. Appl. Genet. 85 : 985-993.

10. Prosser, J. 1993. Detecting single-base mutation. TIBTECH 11 : 238-246.

11. Quiros, C. F., Hu, J. and Delseny, M. 1991. Development and chromosomal location of genome-specific markers by polymerase chain reaction in Brassica. Theor. Appl. Genet. 82 : 627.

12. Sambrook, J., W. F. Fritscfh and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. Cold-spring Harbor. New York.

13. Saperstein, D. A. and J. M. Nickerson. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using PCR coupled to restriction digests. BioTechniques 10 : 488-489.

14. Waugh, R. and Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. TIBTECH. 10 : 186.

15. Webb, A. J. and C. H. C. Jordan. 1987. Halothane sensitivity as a field test for stress susceptibility in the pig. Anim. Prod. 26 : 157-163.

16. Willams, J. K. G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitary primers are useful as genefic marker. Nucleic Acids Res. 18 : 6531.

17. **월간양돈**. 1997. 12**월호**.

18. **축산신문**. 1997. 10**월**

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산부 특정 연구사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산부 특정 연구사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.