

GOVP1199904360

최 종
연구보고서

분자세포유전학적 기법을 이용한 닭의
유용유전자 개발

Identification of useful genes of chicken by
molecular-cytogenetic techniques

진 주 산 업 대 학 교

농 립 부

598.617
2293B

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “분자세포유전학적 기법을 이용한 닭의 유용유전자 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 12 . 26 .



주관연구기관명 : 진주산업대학교
총괄연구책임자 : 손 시 환
연구 원 : 문 여 황
연구 원 : 이 철 영
연구 원 : 이 학 교
연구 원 : 최 연 호
연구 원 : 한 재 용
연구 원 : 신 영 수
연구 원 : 전 의 수
연구 원 : 정 동 기
연구 원 : 송 기 덕
연구 원 : 황 규 춘

요 약 문

I. 제 목

분자세포유전학적 기법을 이용한 닭의 유용유전자 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

기존의 가금개량 체계는 축군의 경제형질을 조사하고 이를 통계적으로 처리하여 분석하고 유전적 요인과 환경요인으로 분리하여 유전적 요인에 의한 개량 효과를 추정하여 선발에 이용하였다. 이러한 전통적인 기법이 그 동안 많은 개량 효과를 가져 왔음에도 불구하고 많은 시간과 비용이 요구되고 질병에 대한 내성과 같이 수치화하기 어려운 형질에 대해서는 접근방법이 어렵고 유전자 자체가 아닌 환경에 의해 영향을 받는 유전자의 발현 산물을 분석대상으로 삼기 때문에 그 정확도에 대한 신뢰도가 높지 않다는 단점이 있다. 그러나 최근 분자유전학적 기술을 이용함으로써 이러한 단점을 보다 용이하게 극복하고자 하는 시도들이 수행되고 있다. 즉, 유전현상의 기본물질로써 DNA가 발견된 이후 가축의 생산형질과 관련된 유전자 부위를 분자유전학적 기술을 이용하여 찾아냄으로써 보다 효율적으로 축산물의 생산에 이용할 수 있게 된다는 것으로 아직 가금에 있어서는 직접 종축 생산에 이용되어 실용화되고 있는 예는 흔하지는 않으나 경제형질 또는 질병과 관련된 유용유전자의 개발 및 표지 유전자의 개발에 관한 연구와 더불어 최근에는 보다 근본적으로 이러한 유전자원 이용 연구의 도구가 될 수 있는 가금의 유전자 지도 작성을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 460여개의 표지인들이 밝혀진 바 있는 가금의 유전자 지도 작성은 모든 분자유전학

적 연구를 위한 필수적 기본 사항으로 세포 및 분자유전학적 연구의 근간이라 할 수 있겠다.

따라서 본 과제에서는 닭의 유전자 지도 작성의 일환으로 염색체 분석에 의한 닭의 유전물질 탐색과 더불어 표지 유전자들을 개발하고, 이들 유전자들의 연관유전자 지도 작성 및 물리적 유전자 지도를 작성하여 유용유전인자 개발을 위한 닭의 실용적인 유전자 지도의 기초 자료를 제공하고 자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 분자세포유전학적 기법을 이용한 유용유전자의 개발에 관한 연구로서 염색체 분석에 의한 닭의 유전물질 탐색과 닭의 연관유전자 지도 작성을 위한 연구로 구분하여 궁극적으로 닭의 표지 인자의 개발과 이들의 유전자 지도를 작성하고 자 하였다.

우선 염색체 분석에 의한 닭의 유전물질 탐색의 연구를 위하여 재래 오골계, 백색레그혼, 로드중, 코니시중 등 4계통의 품종을 공시하였다. 닭의 염색체 분리방법 및 분염 분석법을 개발을 위하여 초기 배자로부터 염색체 분리 방법의 확립과 혈구배양법의 개발 및 이로부터 염색체 분리 방법을 시도하고, 각 종 banding방법의 개발로서 G-banding, C-banding 및 HR-banding의 양상을 구명하고 자 한다. 한편 계군의 염색체 변이 조사를 위하여 각 품종별 염색체 변이 양상과 형태적 특징 양상을 비교 분석하고, 염색체 변이와 형질간의 연관성을 구명하기 위하여 품종 별 염색체 이상 빈도 분석, 초기 배자의 사망률 비교 분석 및 품종간 수정시 성비의 분석을 수행하고자 하며, 궁극적으로 분자유전학적 기법과 세포유전학적 기법의 접

목을 위한 유전자의 물리적 지도작성을 위한 조건을 확립하고자 한다. 따라서 정밀 유전자 지도 작성을 위한 염색체 분리기법 및 닭에 있어 유용 유전자의 염색체 좌위(locus) 결정을 위한 FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization)기법의 조건 확립과 더불어 이를 이용한 닭의 유용유전자의 좌위를 파악함으로써 닭의 물리적 지도 작성을 위한 기초 기술을 제시하고자 한다.

닭의 연관유전자 지도 작성을 위한 연구로서는 우선 축군의 유전 구조 파악을 위한 실용적인 기술 개발로서 오골계, 백색레그혼, 로드종, 코니시종에 대한 유전자지문 분석을 실시하고, 이를 바탕으로 유전적 근연 관계를 추정한 후 후보 축으로 재래종 오골계와 백색 레그혼종 간의 교배를 통한 퇴교배 집단을 조성한다. 한편으로 DNA 다형 표지인자 개발 방법의 확립을 위해 AP-PCR기법의 확립과 microsatellite의 관찰방법을 확립하고 집단내 유전자 부위 검색과 더불어 조성된 퇴교배 집단에서의 표지인자의 유전자형 전이양상을 파악(AP-PCR)하고자 한다. DNA 표지인자 개발 방법에 의하여 재래계에서만 나타나는 잠정적인 특이 표지인자를 검색하고 확립된 연관 지도 작성방법 등을 이용하여 재래계 특이적인 유전자의 염색체상의 위치를 파악하고자 한다. 궁극적으로 개발된 유용 유전자의 유전자형 분석 및 유전자 지도 작성을 위해 가장 유용한 표지인자인 microsatellite분석법과 RAPD표지인자를 이용하여 조성된 퇴교배 집단에 대한 자세한 유전자형을 파악하고, 파악된 표지인자나 유전자의 유전자형을 이용하여 퇴교배 집단내의 재조합율을 산출하여 적절한 mapping 모형을 설정하므로서 예비적인 연관 유전자 지도를 작성하고자 한다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

분자세포유전학적 기법을 이용한 닭의 유용유전자 개발에 관한 연구로부터 개발된 결과와 이의 활용 방안 및 연구 성과를 제시하면 다음과 같다.

1. 닭의 유전적 특성 규명 기술 확립으로 가축 전반에 걸친 유전학적 개량의 기술적 기초자료의 제공

가. 닭 염색체 분석기법으로 새로운 염색체 분리기법의 개발과 확립

1) 닭의 초기 배자로부터 효율적인 염색체 분리 기술 개발

2) 닭 혈액배양으로부터 백혈구의 분리 기술 및 고해상 염색체의 분리 기법 개발

나. 닭 염색체의 분염 분석기술의 확립과 banding 양상의 구명

1) 닭의 G-banding 기법 확립과 G-band 양상의 구명

2) 닭의 C-banding 기법 확립 및 heterochromatin 양상의 구명

3) 닭의 Q-banding 기법 확립과 Q-band 양상의 구명

4) 닭의 HR-banding 기법 확립과 prophase chromosome의 band 양상 구명

다. 닭 염색체의 표준 핵형 및 염색체 분염 표지 제시

라. 닭에 있어 AP-PCR법에 의한 DNA 다형 관찰 방법의 확립과 제시

마. 닭에 있어 microsatellite typing 등에 의한 DNA 다형현상 관찰 방법 확립과 제시

바. FISH 기법의 확립과 제시

2. 염색체 변이와 형질간의 연관 구명으로 닭의 부화율에 미치는 원인 구명 및 품종간 발생학적 유전양상의 기초 자료 제공

가. 닭 품종별 염색체 이상 빈도 및 이상 양상의 분석

나. 품종별 초기 배자의 사망률과 염색체 이상간의 연관 구명

다. 품종간 수정시 성비의 비교 분석

3. 재래계 특이 표지인자의 개발

가. AP-PCR 법 및 microsatellite typing기법에 의한 재래계 특이 표지인자의 개발

나. 발굴 확인된 유전적 표지인자의 유전적 신뢰성을 평가하여 지적 소유권화도 가능하리라 사료됨.

4. 닭에 있어 연관 유전자지도 및 물리적 유전자 지도 작성을 위한 제반 기술 확립과 특정 유전자의 지도 작성

가. 물리적 유전자 지도 작성을 위한 기초기술로써 FISH기법의 확립

나. FISH기법에 의한 Chick W-specific gene의 좌위 설정 및 본 probe를 이용한 학술 및 산업적 활용가능성 제시

다. 재래계 특이 유전자의 연관지도 작성

라. 퇴교배 집단에 의해 작성된 연관지도상의 대표적인 표지인자 (microsatellite등)를 선정하여 이의 염색체상 위치 결정

마. 유전자지도 작성으로 유용유전자 개발의 기반 기술 확보가 가능

바. 확립된 유전자지도 작성을 위한 기반은 지속적인 개발로 상업적으로 유용한 유전자지도로 발전시킴

SUMMARY

I. Title

Identification of useful genes of chicken by molecular
-cytogenetic techniques

II. Objectives and Significances of the Research and Development

There has been increasing application of quantitative genetic theory in poultry breeding programs. Estimation of phenotypic and genetic parameters and estimation of breeding values were mainly field of quantitative genetics. Given the relatively short time-span, the contributions of quantitative genetics to improvement in poultry production have been substantial. However it is apparent that the accuracy of genetic improvement by statistical method is limited. The new techniques of molecular and cytogenetics could be overcome the demerit of conventional animal breeding procedures. This techniques make possible to detect and isolate genes in the genome of an animal. Recently, some of marker genes for economic traits and simple disease were identified. In addition to the study of marker genes, animal genome mapping has been vigorously studied. In chicken, the work of gene mapping are to construct an integrated genetic and physical map

of the chicken genome and to provide a public genome database. The ultimate goal is to develop the tools and resources to map and identify genes that control traits of agricultural and biological interest.

The aims of this research are to develop molecular and cytogenetic techniques for identification of useful genes and to construct physical and linkage map of marker genes.

III. Contents and Scope of the Research and Development

This study was to identify the useful gene of chicken by molecular-cytogenetic techniques. To construct genetic and physical mapping, chromosome preparation and chromosomal studies were achieved and DNA purification and molecular studies were also performed.

1. Identification of genetic marker by cytogenetic analysis.

1) Present animals

- Korean Native chick, Rhode Island Red, Leghorn and Cornish

2) Develop the new techniques of chromosomal preparation from chick blood cells and early embryonic cells

3) Identification of chromosomal banding patterns

- G-banding, C-banding, Q-banding and HR-banding

- 4) Investigation of chromosomal variants in chick
 - Identification of standard karyotype in chick
 - Investigate the frequencies and types of chromosomal aberration in chick
 - Investigation of the relationship of chromosomal aberration and early embryonic death
 - Investigation of embryonic sex ratio in chick
- 5) Establishment of FISH(Fluorescenc in situ hybridization) techniques
- 6) Assignment of chick specific gene by FISH

2. Development of marker genes and construction of genetic map of chick genome

- 1) Animals
 - Korean Native chick, Rhode Island Red, Leghorn and Cornish
- 2) Establishment of experimental population by back cross with Korean Native chic and Leghorn
 - Analyze DNA fingerprint
 - Analysis of transmission of genotype
- 3) Identification of DNA polymorphic band
 - Analysis of DNA polymorphism by AP-PCR method
 - Analyze microsatellite typing for identification of DNA polymorphism
- 4) Detection of the specific markers of Korean Native chick by AP-PCR technique

5) Construct genetic mapping in chick genome

- Analysis of genotype by microsatellite typing and RAPD techniques.
- Construct linkage map of specific genes by calculating recombination rate

IV. Results and Their Utilization Plans

1. Developed new molecular and cytogenetic techniques for identification of genetic markers of chicken

1) Introduced the method of chromosomal preparation from early embryonic cells

2) Developed the new leukocyte culture technique for the study of chromosomes in the chick

3) Identified G-, C-, and Q-banding patterns in chick chromosomes

4) Developed the techniques of high resolution banding and identify the band patterns of chick prophase chromosomes

5) Presented standard karyotype of chick

6) Established the techniques of AP-PCR and identify DNA polymorphism

7) Identified DNA polymorphism by microsatellite typing in chick

8) Established FISH techniques in chick

2. Studied chromosomal variants in chick

- 1) Investigated frequencies and types of chromosomal aberrations in chick
- 2) Studied the relationship of chromosomal aberration and early embryonic death
- 3) Studied sex ratio in embryonic stage

3. Identified genetic marker in Korean Native chick

- 1) Identified genetic marker of Korean Native chick by AP-PCR and microsatellite typing techniques
- 2) Evaluated genetic confidence to the specific marker

4. Constructed the linkage and physical map of identified genes

- 1) Developed and established the techniques of FISH for physical mapping of chicken
- 2) Assigned chick W-specific gene to chromosomes by FISH technique
- 3) Constructed the linkage map of the marker gene of Korean Native chick

5. Utilization plans

We suggest that the marker gene of Korean Native chick are very useful tool for identification of breed differentiation. In addition, established FISH techniques in chick also should be widely used in detection of useful gene. The successful result of

FISH of chick W-specific gene should be facilitated sex determination. The main utilization plan of this research is to develop the tools and resources to map and identify genes that control traits of animal and biological interest

CONTENTS

CH 1. Indroduction	-----15
1. Objectives and significances	-----15
2. Contents and scope	-----22
CH 2. Identification of genetic marker by cytogenetic analysis	-26
1. Introduction	-----26
2. Development of new techniques of chromosomal preparation	-----27
3. Identification of chromosomal banding patterns	-----34
4. Investigation of chromosomal variants in chick	-----55
5. Construction of physical map by FISH techniques	-----61
CH 3. Construction of genetic map of chick genome	-----71
1. Introduction	-----71
2. Experimental chicks and their genotypes	-----72
3. Establishment of experimental population by back cross	--74
4. Development of AP-PCR techniques	-----76
5. Detection of the specific markers of Korean Native chick	-79
6. Microsatellite typing of experimental population	-----97
7. Construction of genetic map	-----107
CH 4. Results and suggestion	-----117
1. Results	-----117
2. Publications	-----119
References	-----121

목 차

제 1 장	서론	15
제 1 절	연구개발의 목적 및 중요성	15
제 2 절	연구개발 내용 및 범위	22
제 2 장	염색체 분석에 의한 닭의 유전물질 탐색	26
제 1 절	서설	26
제 2 절	닭 염색체 분리 방법 개발	27
제 3 절	닭 염색체의 분염분석	34
제 4 절	계군의 염색체 변이 조사 및 유전양식 규명	55
제 5 절	유전자의 물리적 지도 작성을 위한 조건 확립과 FISH기 법에 의한 물리적 지도 작성	61
제 3 장	닭의 연관 유전자 지도 작성을 위한 연구	71
제 1 절	서설	71
제 2 절	계군의 설정 및 유전분석	72
제 3 절	계통간 또는 종간 교잡을 통한 퇴교배 집단 조성	74
제 4 절	AP-PCR 기법 확립	76
제 5 절	재래닭 특이 유전인자의 개발	79
제 6 절	퇴교배 집단에 대한 microsatellite typing	97
제 7 절	개발된 유전인자의 연관분석	107
제 4 장	연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	117
제 1 절	연구 개발 결과	117
제 2 절	연구 성과	119
참 고 문 헌		121

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 배경 및 목적

최근의 모든 생물학적 연구의 기반은 유전자의 발견에 따른 DNA 수준의 여러 연구방법에 의해 괄목할만한 성장을 하였으며 그 적용범위 또한 광범위해지고 있다. 의학과 약학, 식량생산, 유용 신농산물의 생산, 병충해와 극한 상황에서 재배될 수 있는 농작물의 개발 등 그 발전속도는 예측하기 어려울 지경이다. 이러한 상황에서 새로운 자원, 즉 기존의 자연자원 중 지하자원이 중요한 국부의 원천으로 여겨져 왔던 점과 마찬가지로 미래 유전자를 이용한 산업에 필요한 기초 재료로써 유전자원은 그 이용성 때문에 이를 위한 기초적인 기술 개발과 더불어 이용 가능한 유전자원의 체계적 유지·보전 여부에 많은 관심을 가지고 있으며 지속적인 노력들이 진행중이다. 이러한 노력의 일환으로 지난 1993년에는 멸종 위기의 생물 종의 교역금지 협약(ITES)이 결성되었으며, 94년에는 생물 다양성 보존 국제협약이 탄생하여 세계적으로 자국의 생물 종 다양성 보존에 많은 노력을 기울이고 있다. 다시 말해 이러한 노력들은 유전자원을 미래의 생물산업 무기로서 활용하고자 하는 광범위한 노력의 일부로 진행되고 있는 것이다. 반면에 국내의 가축과 동물에 대한 보존 노력은 아직 체계화되어 있지 않으며 농진청의 축산기술연구소에 의해 재래 가축에 대한 보존 노력이 시작되고 있을 뿐이다.

미래의 생물산업에 대비한 다양한 유용 유전자의 개발은 계능

분석 및 유전자 지도작성에 의해 가속화 될 수 있으며, 여러 국가들에 의해 추진되고 있는 상황이나 규모에 비해서는 아직 미미한 수준이기 때문에 지금이라도 관심을 가지고 지속적인 노력을 한다면 앞으로의 유전자를 이용한 생물산업에서 뒤지지 않을 것이다.

이러한 상황에서 가금의 국내 생물산업, 즉, 축산업에 있어서의 역할은 안정된 식량자원으로써 존재해 왔으며 미래에는 유전자 이용기술 실용화의 대상으로써 가장 이상적인 동물이 될 것이다. 그러나 기존 가금산업의 중요한 국가적 위치에도 불구하고 가장 중요한 부분의 하나인 국내기술에 의한 종축 개발이 실현되지 못해왔다. 여러 어려움들 중에서도 가장 큰 부분은 가금육종에 소요되는 축군 유지와 적절한 기술개발에 필요한 기업과 대학, 정부 연구기관 간의 유기적 역할 분담이 미진했다는 것이다. 현재 수입개방에 따라 외국 축산물의 위협은 점점 심화되고 있고 가금산업을 포함한 국내 축산업은 이의 전망이 매우 불확실한 상태이다. 이러한 어려운 상황에서 유력한 돌파구로써 최근의 분자유전학적 기법 즉, 유전공학적 기법을 이용하여 기존의 종축에 비해 질적으로 훨씬 뛰어난 새로운 동물을 창출하고자 하는 노력이 시도되고 있다. 물론 이러한 노력은 많은 선진외국에서도 진행되고 있지만 기술의 특성상 아직은 실용화에 의한 산업발전의 결정적 영향을 미치는 단계가 아니기 때문에 국내의 종축산업의 활로를 찾기 위한 장기적이고 바람직한 투자방향으로써 분자유전학적 기법을 이용한 연구에 매진해야할 필요성이 증대되고 있다. 즉, 우리 나라 종축 산업에서의 기존 분야의 열세를 극복하고 미래 생물산업의 주도권을 얻기 위한 방법으로써 분자유전학적 기법의 이용이 절실하다는 것이다.

이러한 방향의 연구로써는 종축 집단의 유전적 특성분석을 통

한 선발·교배계획에의 적용과 질병이나 경제성이 있는 생산형질과 관련된 표지인자의 개발, 미래의 유전자원 이용산업의 기반으로써 우수한 우량 유전자나 유전병이나 질병관련 유전자 등을 분리 개발하는 것이 포함될 수 있으며, 보다 근본적으로 이러한 유전자원 이용연구의 도구가 될 수 있는 유전자지도의 작성이 요구되고 있다. 이러한 전제하에 미국과 유럽 이스라엘 등에서는 이미 많은 연구가 진행 중에 있으며 국제적인 공동연구로 닭의 유전자지도 작성을 위한 연구가 진행되고 있다. 유전자 지도작성에 있어서 닭은 많은 장점을 가지고 있으며 사람과 생쥐의 개발된 유전자지도 모델에 의한 접근방식의 용이성과 경제적인 중요성에 힘입어 유전자지도의 개발이 가속화되고 있다.

2. 연구개발의 중요성

가. 기술적 측면

기존의 가금개량 체계는 축군의 경제형질을 조사하고 이를 통계적으로 처리하여 분석하고 유전적 요인과 환경요인으로 분리하여 유전적 요인에 의한 개량 효과를 추정하여 선발에 이용하였다. 그러나 이러한 전통적인 기법이 그 동안 많은 개량 효과를 가져 왔음에도 불구하고 많은 시간과 비용이 요구되고 질병에 대한 내성과 같이 수치화하기 어려운 형질에 대해서는 접근방법이 어렵고 유전자 자체가 아닌 환경에 의해 영향을 받는 유전자의 발현 산물을 분석대상으로 삼기 때문에 그 정확도에 대한 신뢰도가 높지 않다는 단점이 있다. 그러나 이러한 어려움은 최근의 분자유전학적 기술을 이용하여 보다 용이하게 극복할 수 있다. 즉, 유전현상의 기본물질로써 DNA

가 발견된 이후 가금의 생산형질과 관련된 유전자 부위를 분자유전학적 기술을 이용하여 찾아냄으로써 보다 효율적으로 축산물의 생산에 이용할 수 있게 된다는 것이다. 그러나 아직 가금에 있어서는 직접 종축 생산에 이용되어 실용화되고 있는 예는 흔치 않으며 가금의 체중과 관련된 유전자지문 표지인자와 Tibial Dyschondroplasia(경추 연골이형성)에 대한 내성과 관련된 RAPD표지인자를 찾으려는 연구가 진행되었으며(Plotsky 등, 1993; Dunnington 등, 1993; Zhang 등, 1995), 마력병에 대한 감수성에 관련된 MHC 유전자형이 보고되고(Hepkema 등, 1993) 항체 유전자, T림파구의 수용체 등 가금의 면역반응에 관여하는 유전자와 면역반응을 조절하는 세포면역활성물질(cytokine)에 대한 면역학적 연구 또한 진행중이다. 이와 더불어 가금의 근육성장에 관여하는 유전자인 c-ski 유전자는 형질전환 생쥐와 돼지의 생산에 성공적으로 이용되어 육 생산에 유용하게 이용될 수 있는 유전자원 개발의 예로써 제시되었다. 또한 최근에는 가금의 유전자 지도 작성을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며(Bumstead와 Palyga, 1992; Levin 등, 1993, 1994; Khatib 등, 1993; Crooijman 등, 1993; Bumstead 등, 1994; Croijmans 등, 1995) 1995년 5월 현재 460여개의 표지인자들이 가금의 유전자지도상에 위치 지워졌다. 그러나 국내에서의 가금에 대한 분자유전학적 접근에 의한 연구결과는 미진한 편이며 여(1985), 손(1987) 등에 의해 산란계 및 오골계, 재래계 그리고 일본산 메추리에 대한 염색체 분석에 의한 연구가 보고되었고, 이등(1995)은 오골계의 유전분석을 위해 DNA fingerprinting 기법을 적용하였고 여 등(1994)은 재래닭의 유전특성을 DNA fingerprinting 기법에 의해 규명하였다. 황 등(1994, 1995)은 닭의 유전자 지도 작성을 위한 재래 오골계, 백색 레그혼 퇴교배 집단을 조

성하여 집단의 유전특성을 분석하였으며, 성 결정에 관여하는 성 특 이인자의 규명 등에 대한 연구가 진행된 바 있다(송 등, 1994).

이러한 연구 진행 속도로 보아 빠른 시일 내에 가금류에 대한 많은 표지인자나 유용유전자가 개발될 것이며 유용유전인자 개발을 위한 실용적인 유전자지도 작성이 가능하여 기하급수적으로 유용유 전자의 개발이 이루어질 것으로 사료된다. 따라서 이러한 기술적 진 보의 대열속에서 국내 동물산업의 동등한 발전을 모색하기 위해서는 빠른 시일 내에 유용유전자 개발 기술과 경제형질 관련 표지인자의 개발이 필요하며 보다 기본적인 측면에서 기본도구로 이 용될 가금의 유전자지도 작성연구의 시작이 필요한 시점이다.

나. 경제·산업적 측면

현재 국내에서 생산되는 가금육과 한우, 젓소, 돼지를 생산하는 데 드는 비용은 선진 외국에 비해 가금육은 1.5~2배, 한우와 젓소의 경우 약 4~5배가 높으며, 돼지의 경우 약 1.5배 정도가 높아 UR 타 결과 WTO 체제 출범에 따른 시장개방으로 국내 축산업은 경쟁력 면에서 큰 도전을 받고 있다. 따라서 농업 총 생산 중 차지하는 비 중이 30%에 육박하는 축산업의 위치에서 향후 지속적인 산업의 안정성을 확보하기 위해서는 종축의 개량을 통한 생산성 향상 및 고품 질 유전적 자질 개발이 절대적으로 중요함에도 이러한 부분의 연구 개발 투자가 거의 미미한 실정이며 축산업 생산액 총 4조 6천억원 중 20%이상을 차지하고 있는 양계산업에 있어서는 종계 대부분 (99%이상)을 외국으로부터 수입에 의존하고 있음으로 인해 이러한 연구투자 방향이 전환되지 않고는 향후 양계산업의 기반 자체가 와 해 될 수 있다는 점에서 양계산업에 있어서의 종축 개량이 절실한

과제이다. 특히 생산비의 대부분을 차지하는 원료사료를 수입에 의존하는 현 상태에서는 가축개량을 통한 생산비 절감과 유통구조 개선에 의한 방법 등이 유일한 해결방안으로 제시되고 있다. 예를 들어 가금산업의 큰 문제로 제기되고 있는 질병으로 추백리의 경우, 그 경제적 손실은 치명적이며 이를 극복하기 위하여 추백리에 저항성이 강한 계통을 조성하거나 추백리에 대한 저항성을 획득하기 위해서 백신을 개발하고자 하는 연구가 미국을 중심으로 진행되고 있다. 성장속도가 빠른 계통을 조성하여 출하일을 일주일 정도만 줄인다고 하면 연간 300억원의 경제적 이득을 얻을 수 있게 된다. 게다가 닭의 유용한 유전자를 개발하여 형질전환 체계에 사용할 유전자원으로 이용한다면 미래 유전자원산업에서 절대적인 산업경쟁력을 확보할 수 있을 것이다.

따라서 가금 산업은 앞으로 효율적인 육종 체계의 확립과 개량 속도를 조기에 가속화할 수 있는 전략으로써, 닭의 계능 분석을 통한 유용 표지인자의 개발과 경제형질이나 질병 등에 관련된 유전자나 중간 또는 계통간 유전적 표지인자의 개발은 고품질의 양계산물의 생산으로 이어져 고부가가치의 상품을 생산하고 농가에 막대한 경제적 이익을 줄 수 있으며, 성공적으로 작성된 유전자 지도를 바탕으로 개발된 유용유전자는 지적 재산권 확보를 통한 경제적 이득을 얻을 수 있고, 국내 유전자원 보존과 개발기술을 향상시켜 가금 산업 외의 국내 생물산업의 경쟁력 또한 제고할 수 있다 하겠다.

다. 사회·문화적 측면

기존의 사회적 산업구조에서 가금산업을 비롯한 축산업은 실질적인 산업발전을 위한 기술개발에 많은 노력이 기울여지지 않았으며

따라서 외국의 지속적인 연구개발에 의한 종축 개량 기술과 합리적인 사양기술 확립, 정책적 지원 등에 의한 국제적인 격차를 벌이는 결과를 가져왔으며 산업의 많은 부분은 외국의 기술과 체계에 의존하는 상황에 처해있다. 그러나 최근 다행스럽게도 정부에서는 수입 개방 시점에 보다 근본적이고 적극적인 개발정책을 제시하고 있으며 여러 연구자들의 활동도 활발해 지고 있는 추세이다. 즉, 기존의 기술위주의 개발정책의 부재에서 첨단기술이 접목되는 발달된 국가산업으로써 자리잡고 많은 잠재력을 실현하기 위한 노력들이 더욱 가시화 되고 있는 것이다. 이러한 시점에서 종축 산업, 즉 유전자원의 개발산업이 외국에 의해 완전히 종속되고서는 절대적으로 산업적 자립 내지는 지속적 유지 발전이 불가능하게 되며 특히 이러한 취약한 부분에 대한 많은 노력들이 필요한 시점에서 가장 근본적이고 구조적인 부분이라 언급할 수 있는 국내 가금산업의 종축 개발은 최근의 분자생물학적 첨단기술이 직접 접목되어 새로운 가능성 있는 산업으로 자리잡게 될 것이며 미래의 생물산업에서 유용한 유전자원 개발의 모태가 될 수 있을 것이다. 따라서 현재의 여러 여건을 고려하여 가금산업의 종축 개량에 필요한 분자유전학적 기술이 빠른 시일 내에 확보되어야 하며 이를 위해서는 여러 연구자간의 공감대의 형성과 유기적 연계가 이뤄져야 할 것이다. 이러한 토대를 조성하기 위해서는 우선 학계의 공동연구가 진행되어야 하며 가장 우선적으로 경제형질이나 질병에 관련된 유전인자의 개발이 중점적으로 이루어진 후 유전자개발의 기본도구로써 유전자 지도작성을 위한 노력이 시작되어야 하며, 미래의 '유전자 전쟁'의 유력한 무기로써 여러 유전자가 빠른 시일 내에 개발되어야 할 것이다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 연차별 연구 개발 목표 및 내용

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차 년도 (1996년)	<ul style="list-style-type: none"> ● 계군 확보 ● 닭의 염색체 분리방법 확립 ● 염색체 분염 방법 확립 ● 계군 설정 ● 계통간 또는 중간 퇴교배 집단 확립 ● DNA 다형 관찰방법 확립 ● 재래닭 특이 표지인자 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 품종별 대상 계군 확보 - 염색체 핵형분석을 위한 염색체 분리방법 확립 - 염색체 분염 염색법 : G-, C-, Q-, HR-banding - 계군 설정 - 계통간 또는 중간 교잡을 통한 퇴교배 집단 확립 - DNA다형 관찰방법 확립 (AP-PCR법) - 재래닭에서 특이적으로 나타나는 유전인자의 개발
2차 년도 (1997년)	<ul style="list-style-type: none"> ● 계군의 염색체 변이 조사 및 유전양식 규명 ● 염색체 변이와 경제형질간의 연관 규명 ● 유전자의 물리적 지도작성을 위한 조건 확립 ● DNA 다형 관찰방법 확립 ● 재래 닭 특이 표지인자의 특성 파악 ● microsatellite 분석을 위한 조건 확립 ● 조성된 축군에 대한 유전자형 파악 	<ul style="list-style-type: none"> - 계군의 염색체형 분석 및 변이 및 유전양식 검색 - 염색체 변이와 경제 형질간의 연관 분석 - FISH기법 확립 - microsatellite typing등의 DNA 다형 관찰방법 확립 - 재래 닭 특이적인 유전인자의 특성파악 - Microsatellite typing을 위한 최적 조건 확립 - 조성된 퇴교배 집단에 대한 유전자형 파악
3차 년도 (1998년)	<ul style="list-style-type: none"> ● 유용 유전자의 염색체 위치 결정 ● FISH기법에 의한 특정 유전자의 좌위 파악 ● 재래닭 특이 표지인자의 유전자 지도상의 위치 결정 ● 축군에 대해 개발된 유용 유전자의 유전자형 분석 ● 유전인자에 의한 닭의 유전자 지도 작성 ● 물리적 지도와의 통합 	<ul style="list-style-type: none"> - 조밀 염색체 지도작성을 위한 염색체 분염법 확립 - FISH기법에 의한 chick w-specific gene의 좌위 파악 - 개발된 재래닭 특이 유전자의 위치 파악 - 퇴교배 집단에 대한 microsatellite typing - 개발된 유전인자의 연관분석 - 퇴교배 집단에 의해 작성된 연관지도상의 대표적인 표지인자 선정과 이의 염색체상 위치 결정

2. 연구내용 및 범위

가. 염색체분석에 의한 닭의 유전물질 탐색

1) 선정 계군의 확보

재래 오골계, 백색레그혼, 로드종, 코니시종 4계통의 품종을 확보하고 이에 대한 시험 공시

2) 닭의 염색체 분리방법 및 분염 분석법의 개발

가) 닭의 초기 배자로서 염색체 분리 방법의 확립.

나) 조류의 혈구배양법의 개발과 이로부터 염색체 분리 방법의 확립

다) G-banding 방법의 확립

라) C-banding 방법의 확립

마) HR-banding 방법의 개발

3) 계군의 염색체 변이 조사

가) 백색 코니쉬종(White Cornish), 로드 아일랜드 레드종(Rhode Island Red), 재래계 및 오골계에 대한 품종별 염색체 변이 양상과 형태적 특징 양상의 비교 분석

나) 각 품종에 대한 대형염색체들에 대한 상대적 길이 및 동원체 지수의 비교 분석

4) 염색체 변이와 경제형질간의 연관 규명

가) 품종 별 염색체 이상 빈도 분석

나) 품종간 초기 배자의 사망률 비교 분석

다) 품종간 수정시 성비의 분석

5) 유전자의 물리적 지도작성을 위한 조건 확립

정밀 유전자 지도 작성을 위한 염색체 분리기법 및 FISH의 조건 확립

6) 유용 유전자의 염색체 위치결정

FISH기법을 이용한 chick W-specific gene의 좌위 파악 및 물리적 지도를 작성을 위한 기초 확립

나. 닭의 연관 유전자 지도 작성을 위한 연구

1) 축군의 유전 구조 파악을 위한 실용적인 기술 개발

가) 오골계, 백색레그혼, 로드종, 코니시종을 포함하는 4계통의 품종에 대한 유전자지문 분석을 실시하고 이를 바탕으로 유전적 근연관계를 추정

나) 후보 축으로는 재래종 오골계와 백색 레그혼종 간의 교배를 통한 집단조성

2) DNA 다형 표지인자 개발 방법의 확립

가) 오골계와 백색레그혼종에서 AP-PCR기법의 확립으로 유전자 부위 검색

나) microsatellite의 관찰방법을 확립하고자 방사능 동위원소를 이용한 관찰법을 시도하고 특정 좌위에 대해 PCR 증폭 조건과 전기영동 조건을 확립

3) 연관지도 작성을 위한 퇴교배 집단 조성

가) 오골계와 백색레그혼종 암수 각 2쌍을 이용하여 이들간의 잡종교배를 실시하여 퇴교배 기초 집단의 조성

나) 조성된 퇴교배 집단에서의 표지인자의 유전자형 전이양상 파악(AP-PCR)

4) DNA 표지인자 개발 방법에 의한 재래닭 특이 표지인자 개발

가) AP-PCR기법을 적용하여 재래계에서만 나타나는 잠정적인 특이 표지인자 검색

나) 확립된 연관 지도 작성방법 등을 이용하여 재래계 특이적인 유전자의 염색체상의 위치를 파악

5) 개발된 유용 유전자의 유전자형 분석 및 유전자 지도 작성

가) 유전자 지도 작성에 가장 유용한 표지인자인 microsatellite 분석법과 RAPD표지인자를 이용하여 조성된 퇴교배 집단에 대한 유전자형 파악

나) 파악된 표지인자나 유전자의 유전자형을 이용하여 퇴교배 집단내의 재조합율을 파악하고 적절한 mapping 모형을 설정하여 MAPMAKER, LINKAGE, GENE-LINK등의 프로그램을 이용하여 재조합율 여부를 파악하여 예비적인 연관 지도를 작성

제 2 장 염색체 분석에 의한 닭의 유전 물질 탐색

제 1 절 서 설

본 장에서는 분자세포유전학적 기법을 이용한 유용유전자의 개발에 관한 연구 중 염색체 분석에 의한 닭의 유전물질 탐색으로 재래 오골계, 백색레그혼, 로드중, 코니시종 등 4계통의 품종을 선정 확보하고 이에 대한 세포유전학적 구명(究明)을 시도하였다.

본 연구에서 수행된 내용으로 우선 닭의 염색체 분리방법 및 분염 분석법의 개발로서 닭의 초기 배자로부터 염색체 분리 방법의 확립과 혈구배양법의 개발 및 이로부터 염색체 분리 방법의 확립을 시도하고, 각 종 banding방법의 개발로서 G-banding, C-banding 및 HR-banding의 양상을 분석하였다. 한편 계군의 염색체 변이 조사로서 백색 코니쉬종(White Cornish), 로드 아일랜드 레드종(Rhode Island Red), 재래계 및 오골계에 대한 품종별 염색체 변이 양상과 형태적 특징 양상을 비교 분석하고, 염색체 변이와 경제형질간의 연관 규명의 일환으로 품종 별 염색체 이상 빈도 분석, 초기 배자의 사망률 비교 분석 및 품종간 수정시 성비의 분석도 수행하였으며 궁극적으로 분자유전학적 기법과 세포유전학적 기법의 접목을 위한 유전자의 물리적 지도작성을 위한 조건을 확립하고자 하였다. 따라서 정밀 유전자 지도 작성을 위한 염색체 분리기법 및 닭에 있어 유용 유전자의 염색체 좌위(locus) 결정을 위한 FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)기법의 조건 확립과 더불어 이를 이용한 chick

W-specific gene의 좌위를 파악함으로써 닭의 물리적 지도 작성을 위한 기초를 확립 제시하고자 하였다.

제 2 절 닭 염색체 분리 방법 개발

1. 가금류의 백혈구 배양법에 의한 염색체 분리

가금류는 포유류와 달리 혈액의 적혈구내 핵이 존재하므로 포유류에서 수행 중인 통상적인 혈액배양 방법으로서의 염색체의 분리에 많은 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 Ficoll을 이용한 순수 백혈구의 분리법을 개발하고 이를 이용한 염색체의 분리를 수행함으로써 성공적인 결과를 도출하였다. 본 실험에서 개발된 닭의 백혈구 분리를 이용한 염색체의 분리 방법은 다음과 같다.

가. 혈액의 준비

각 개체의 익정맥(翅靜脈)으로 부터 heparin처리된 주사기를 이용하여 약 5ml의 혈액을 채취하고 이들 혈액과 배양액(RPMI 1640)을 1:1의 비율로 가볍게 섞는다.

나. Ficoll 처리 및 lymphocyte의 분리

원심분리관에 3ml의 Ficoll을 주입 후 준비된 혈액 4ml을 가볍게 ficoll층 위에 첨가하고 혈액과 ficoll이 섞이지 않도록 하여 1550rpm으로 35분간 원심분리를 한 후 pasteur pipet을 이용하여 plasma층을 제거하고 lymphocyte 층만을 조심스럽게 채취한다. 이

후 다시 RPMI 1640을 이용하여 채취한 lymphocyte를 섞고 재차 원심분리하여 ficoll을 rinsing하고 동일 방법을 한 번 더 수행한다. 부유액을 제거하고 남은 순수 백혈구의 세포들을 RPMI 1640과 pen. & streptomycin, pokeweed 및 FBS를 첨가한 완전 배양액에 혼합 후 배양 준비를 완료한다.

다. 배양

배양은 37.0℃ 배양기에서 5% CO₂ 조건으로 72시간 배양한다.

라. 증기상의 유도

배양 종료 1시간 전 0.2ml의 colcemid(10µg/ml)를 각 배양 용기에 첨가하여 증기상을 유도한다.

마. 저장처리

배양 종료된 세포들을 0.075M KCl을 이용하여 약 20분간 37℃ 항온 수조하에서 저장처리한다.

바. 고정처리

고정액으로 1:3 acetic acid 와 methanol 혼합액으로 고정처리하고 약 2-3회 정도 반복하여 세포 부유물을 제거한다.

사. 슬라이드 제작

최종 고정 후 남은 세포들만을 잘 섞은 후 pippet을 이용하여 슬라이드 상에 도말 건조 시킨다.

아. 염색

염색은 4% Giemsa staining solution으로 약 6분간 염색하고 수세 건조 후 검경하였다.

이상의 방법은 Sohn 등(1990)이 제시한 일본산 메추리를 이용

한 혈액배양으로부터의 염색체 분리방법보다 상당히 개선된 방법으로서 ficoll의 처리로서 보다 많은 lymphocyte를 얻으므로 증기상의 획득이 획기적으로 개선되었다. Fig. 1은 본 실험에서 개발된 닭의 백혈구 분리법을 이용한 세포들의 분포 양상으로서 관행적 염색체의 분리 방법의 경우 상대적으로 매우 많은 적혈구의 과다 선점 (over-dominated)으로 증기상의 획득율이 상대적으로 낮다. 반면 ficoll을 이용한 백혈구만의 분리로서 배양한 결과 거의 백혈구 세포들만 잔존하므로 적혈구 세포들에 의한 방해가 거의 없는 것으로 나타났다. Table 1에서는 ficoll 처리법과 관행적 배양법 간의 증기상 유도율을 제시한 것으로 ficoll 처리의 경우 관행법에 비해 유의적으로 높은 유도율을 보이고 있다.

Table 1. Comparison of ficoll treatment and routine culture in mitotic index

Treatment	Ficoll treatment	Routine culture
Samples	59	20
Mitotic index(%)	0.52±0.06 ^a	0.09±0.01 ^b

There is significant difference between means with the different superscripts in a row ($p < 0.001$). Values are mean ± standard error

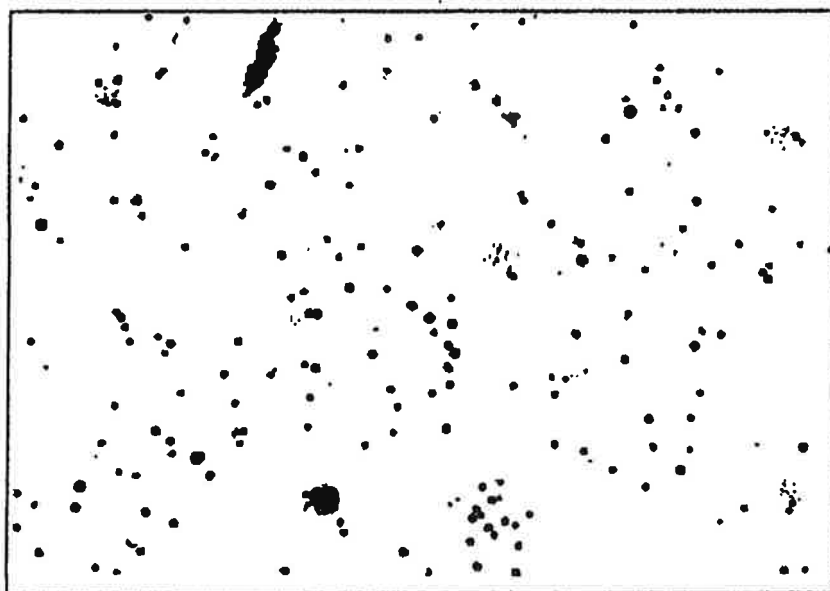
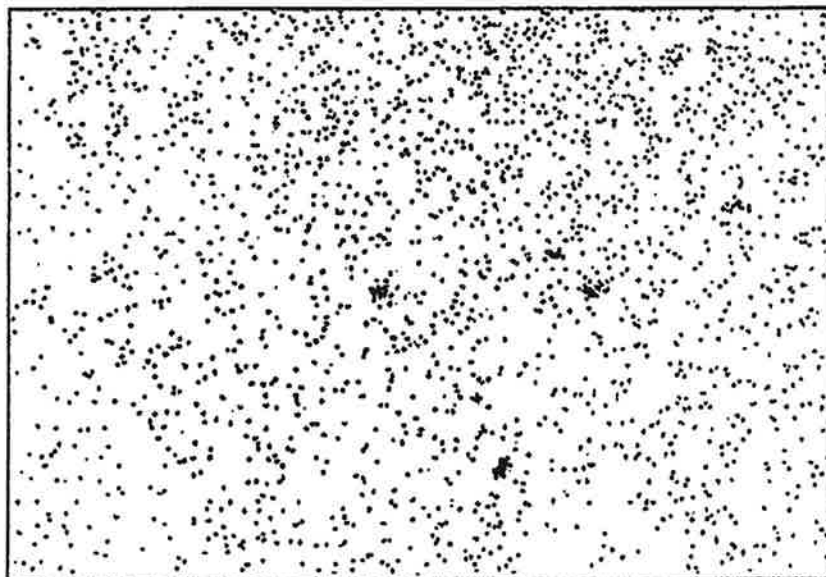


Fig. 1. Cell distributions from chick blood culture with ficoll treatment(low) and buffy coat treatment(upper) (objective x10)

2. 닭의 초기 배자를 이용한 염색체의 분리

초기 배자를 이용한 염색체의 분리를 위하여 수정란을 약 18시간 배양 후 다음과 같은 방법을 이용함으로써 염색체 분리에 성공적인 결과를 얻을 수 있었다.

가. 중기상의 유도

수정란의 기공내 colcemid($10\mu\text{g}$ colcemid/ml) 0.2ml씩을 주입 후 1시간 20분 재 배양한다.

나. 배자 채취

파각 후 배자만을 scalpel을 이용하여 떼어 내고 이를 RPMI medium이 함유된 원심분리관으로 옮기고 1000rpm으로 10분간 원심 분리하여 세포만을 분리한다.

다. 저장처리

저장처리는 3:1(0.3% sodium citrate와 Fetal bovine serum) 저장액으로 약 20분간 37°C 항온 수조하에서 저장 처리한다.

라. 고정처리

고정액으로 1:3 acetic acid 와 methanol 혼합액으로 고정처리 하고 2회 반복하여 처리하여 난황 물질을 제거한다.

마. 슬라이드 제작

최종 고정 후 남은 배자 세포들만을 잘 섞은 후 pippet을 이용하여 슬라이드 상에 도말 건조 시킨다.

바. 염색

염색은 4% Giemsa staining solution으로 약 8분간 염색하고 수세 건조 후 검경한다.

이상의 방법으로 얻어진 닭 염색체는 약 8쌍 정도의 macrochromosomes과 31쌍 정도의 microchromosomes으로 구성되어 총 78개의 염색체로 구성되고, 성 염색체는 수컷이 ZZ, 암컷이 ZW형태로서 암컷 hetero형을 나타내고 있다(Fig. 2). 또한 이들 염색체들의 형태적 특징으로서 Table 2에 제시된 바와 같이 1번 염색체가 가장 긴 metacentric chromosome이고, 2번은 다음 크기인 submetacentric, 3번, 5번 및 7번은 거의 p-arm이 없는 acrocentric이며, 4번 및 6번은 다소 p-arm이 있는 acrocentric chromosome이다. 한편 성 염색체인 Z, W와 8번 염색체는 거의 장완과 단완의 길이가 비슷한 metacentric chromosome이었다.

Table 2. The centromeric index and relative length of macrochromosomes of chick and their nomenclature

Chromosome number	Relative length ¹	Centromeric index ²	Chromosome nomenclature ³
n=50			
1	23.51 ± 1.29	39.06 ± 2.19	metacentric
2	17.82 ± 1.09	35.71 ± 2.37	submetacentric
3	12.85 ± 0.72	0	acrocentric
4	10.92 ± 0.86	24.54 ± 3.27	acrocentric
5	7.02 ± 0.65	0	acrocentric
6	4.72 ± 0.62	22.10 ± 4.06	acrocentric
7	4.37 ± 0.45	0	acrocentric
8	4.07 ± 0.70	40.96 ± 4.11	metacentric
Z	10.50 ± 0.69	46.80 ± 4.86	metacentric
W	4.49 ± 0.76	46.42 ± 3.12	metacentric

¹Relative length: (the length of each chromosome / total length of macrochromosomes) x 100

²Centromeric index: (the length of p-arm / the length of p+q arm) x 100

³Chromosome nomenclature: C.I. 50.0-37.5%: metacentric chromosome, 37.5-25.0%: submetacentric chromosome, 25.0-0%: acrocentric chromosome (Levan et al., 1964)

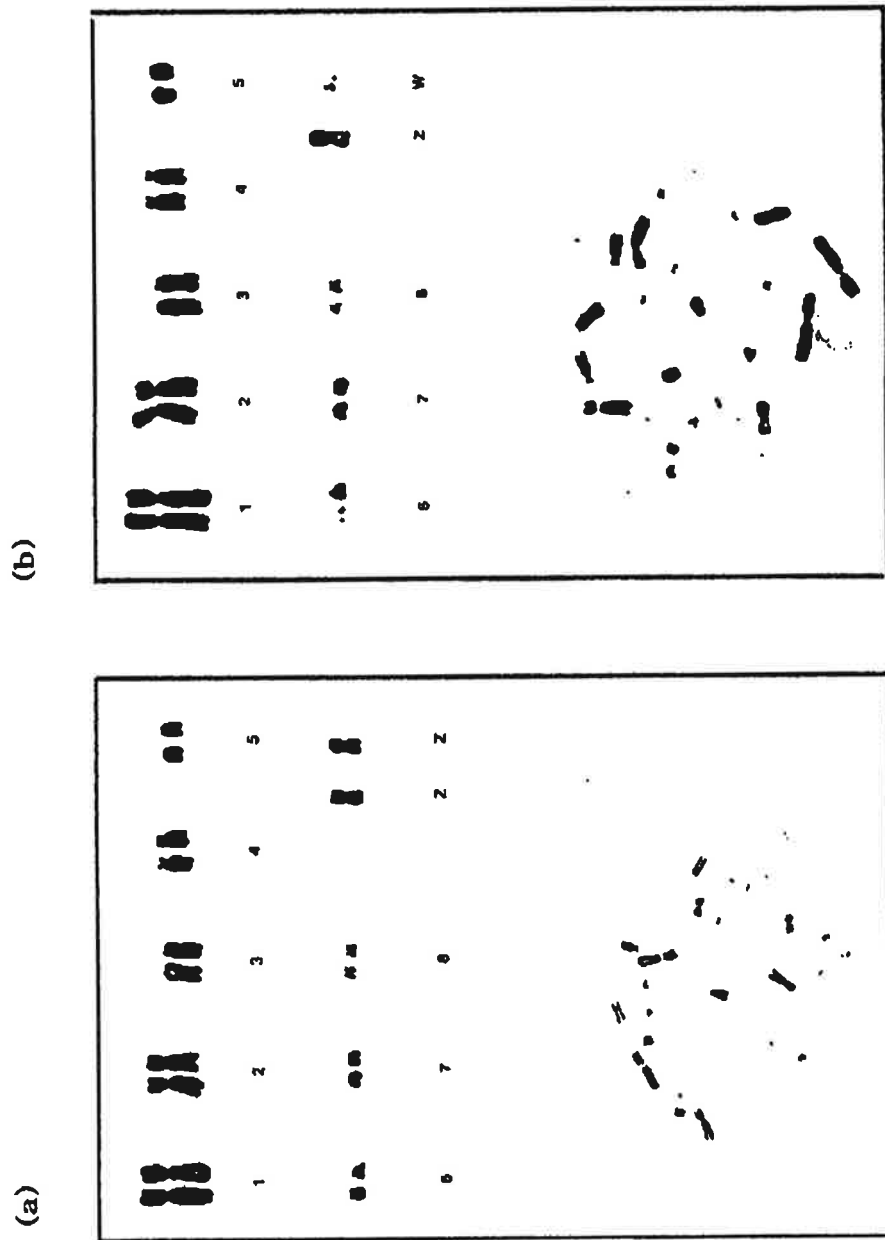


Fig. 2. Partial karyotypes and metaphase spreads of chick; male(a) and female(b)

제 3 절 닭 염색체의 분염분석

1. G-banding 분석

유전적 표지인자의 발굴을 위하여 G-banding을 이용한 염색체의 표지인자를 구명하고 자 먼저 이에 대한 기술 확립에 역점을 두고 다음과 같은 방법을 개발하여 시도한 바 Fig. 3과 같은 각 염색체 별 일관성이 있는 명확하고 특징적 band양상을 성공적으로 얻을 수 있었다.

① 표본준비

보다 명확한 G-band양상을 얻기 위해서는 백혈구 배양 또는 초기 배아로 부터의 염색체 도말 표본을 최소 12시간 정도 완전 건조 시켜 이용한다.

② Trypsin 처리

도말된 슬라이드를 0.1% trypsin solution에 30~50초 처리하고 PBS solution에 2회정도 rinsing한다.

③ 염색 및 검경

처리 후 건조시킨 슬라이드를 10% Giemsa staining solution에 3분간 염색하고 distilled water로 rinsing 후 검경한다.

염색체의 표지인자를 나타내는 여러 banding방법 중 G-banding은 분리된 염색체에 trypsin이나 urea같은 단백질 분해효소를 처리한 후 Giemsa염색을 하므로서 생성되는 band양상으로서 이는 각 염색체를 구성하고 있는 특징적인 DNA와 histone 및 non-histone protein의 특성에 따라 분해 양상이 달리 발현되는 결과이다(Comings, 1978; Harrison 등, 1981; Burkholder와 Duczek,

1980). 따라서 각 염색체는 각기 고유한 band양상을 지니게 되고 이를 이용한 상동 염색체의 인지라든가 또는 염색체의 결실(deletion), 전좌(translocation), 역위(inversion)와 같은 구조적 이상 양상을 파악하는데 좋은 기법으로 활용되고 또한 각 품종 또는 개체간의 유전적 특성이 다소 다름에 따라 이를 이용한 유전적 표지(genetic marker)의 탐색에도 많은 적용을 하고 있다.

본 연구에서는 가금류의 백혈구 배양법으로 부터 분리된 염색체에 대하여 GTG-banding법을 시도하므로써 Fig. 3과 같은 각 염색체별 일관성이 있는 명확하고 특징적 band양상을 성공적으로 얻을 수 있었다. 닭 염색체의 G-band양상은 8개의 대형염색체에서 쉽게 인지되어지고 각 상동염색체간에 뚜렷하고 일정한 band양상을 나타내므로 개개 염색체의 식별을 보다 용이하게 하였다. 또한 p-arm과 q-arm의 구분도 명확하게 인지할 수 있는 바 Z염색체의 경우 5번째의 크기로서 장완(q-arm)과 단완(p-arm)의 길이가 거의 유사하지만 p-arm의 말단부위는 넓게 형성된 뚜렷한 light-band가 있는 반면 q-arm의 말단부에는 짧고 짙은 dark-band가 형성된다.

Fig. 3에 제시한 대형염색체들의 G-band양상은 손과 오(1987)가 제시한 각 품종별 대형염색체의 G-band 표준모식도나 Fechheimer(1990)가 제시한 닭의 G-band양상과 거의 일치되는 land marker를 나타내고 있다. 그러나 각 보고들간의 염색체상에 유도되는 band수는 다소의 차이를 보이고 있는 바 이는 기존 GTG-banding으로서는 유도되는 중기상의 분열시기적 차이에 따른 다양한 응축양상의 염색체가 나타나기 때문이다. 따라서 본 연구에서도 GTG-banding에 의한 Z, W를 포함한 8쌍의 대형염색체에서 출현된 band수를 분석한 결과 최소 61개에서 최대 124개까지 매우



Fig. 3. Partial G-banded karyotype and metaphase spread of chick

큰 변이를 나타내었다. 그러므로 보다 정밀한 유전적 표지 구명을 위한 염색체의 분리방법은 염색체를 보다 길게하여 더 많은 band층을 유도하고, 또한 유도된 염색체들은 응축정도가 거의 균일한 동기화가 되어야 될 것으로 사료된다.

2. C-banding 분석

염색체상 heterochromatin site의 인지를 위한 C-banding은 acid, alkali, hot salt의 처리로서 염색체를 구성하는 euchromatin을 선택적으로 녹이고 상대적으로 heterochromatin site를 염색하는 기술이다. 닭에 있어서 C-banding의 양상은 오 등(1990)이 이의 다형 현상을 보고한 바 있고, Sohn(1990)이 일본산 메추리에 있어서도 이와 같은 양상을 제시한 바 있다. 따라서 본 시험에서도 차후 품종간 다형성의 표지로서 이용하기 위한 최적의 C-banding방법을 도출하기 위하여 다음과 같은 변형된 방법을 시도하였든 바 Fig. 4에서와 같은 보다 개선된 결과를 얻을 수 있었다.

① HCl 처리

0.2N HCl로서 30분~50분간 표본을 처리

② Ba(OH)₂의 처리

5% barium hydroxide로 실온하에서 10분~20분간 처리 후 deionized distilled water로 철저히 수세

③ 2XSSC의 처리

2XSSC용액으로 60℃에서 약 1시간 처리 후 수세

④ 염색

2% Giemsa solution으로 20분간 염색

닭에 있어 constitutive heterochromatin의 양상은 Stefos와 Arrighi(1971)가 처음으로 제시한 바 C-banding의 분석으로서 W염색체의 전체와 많은 소형염색체의 동원체 부위에 존재하나, 대부분의 포유동물과는 달리 대형염색체에는 없는 것으로 나타났다(Stock 등, 1974; Wang과 Shoffner, 1974). 반면 이들의 보고와는 달리 Wooster 등(1977)은 대형염색체에도 C-band 부위가 나타난다고 하였고, Pollock과 Fechheimer(1981)도 대형염색체를 포함하는 모든 염색체에 있어서 동원체와 말단부에 heterochromatin이 존재한다고 하였고 더불어 그 출현빈도에 상당한 차이가 있다고 보고하였다. 한편 각 염색체내 heterochromatin의 양은 특징적 양상을 띄고 있지만 종에 따라 이의 다형현상이 많이 발견되고 있다.

본 연구에서 나타난 C-band의 양상은 대부분의 대형염색체 동원체 부위와 말단부에서 발현되고, 품종간에 혹은 개체간에, 나아가 배자내 세포간에, 심지어 상동염색체간에도 아주 다른 banding양상을 나타내는 다형현상을 보이고 있다. 이는 heterochromatin을 나타낼수 있는 부위내 DNA의 denaturation과 추출되는 양이 각기 다르기 때문인 것으로 생각되나 Z 염색체의 말단부와 W 염색체 전체는 품종에 관계없이 100%의 C-band를 나타내고, 1, 2, 3, 4번 및 5번 염색체의 동원체부위와 말단부에서도 출현빈도의 차이는 있으나 대부분 공통적인 band양상을 보였다. 한편 대형염색체에 있어 heterochromatin의 상대적 양은 각 염색체의 12~19%정도 차지하였고, 이와같은 결과는 닭의 genome상 highly repetitive DNA 함량과 거의 같은 결과를 나타내었다.



Fig. 4. Partial C-banded karyotype and metaphase spread of chick

3. Q-banding 분석

Caspersson등(1968)이 처음으로 quinacrine mustard를 이용한 Q-banding방법을 소개한 바 이는 형광 현미경 하에서 fluorescence brightness의 intensity의 차이에 의해 생성되는 band양상이다. 이러한 분염처리 방법은 처리의 간편성 등으로 쉽게 이용할 수 있는 장점은 있으나 형광염료(quinacrin)들은 영구적 염색이 아니므로 일정 시간 후에는 형광성이 없어져버리는 문제점이 있다. Q-banding의 기작 역시 분명치는 않으나 나타난 결과에 있어 bright band부위가 AT-rich site 이고, 반면 dark부위는 GC-rich site임을 보고하고 있으며 나타나는 결과는 거의 G-banding양상과 동일하다.

닭의 초기배자 및 혈액배양으로부터 얻어진 염색체 표본에서 Q-banding은 먼저 50ml의 0.5% quinacrine dihydrochloride solution으로 암소에서 5~10분간 염색시키고, saline으로 수세시킨 후 coverslip으로 mounting시킨다. 형광현미경하에서의 검경은 400-440nm 파장대의 filter를 이용하고 나타난 상은 곧 바로 사진 촬영한 후 분석하였다. 본 결과에서 얻어진 닭 염색체의 Q-banding양상은 Fig. 5와 같다. Fig 5에서와 같이 닭 염색체의 Q-band 양상은 거의 대부분의 대형염색체에서 일련의 bright와 dark band가 나타나고 있으며 Y염색체의 경우 전체가 bright 양상을 나타낸다. 이러한 band 양상은 기존 GTG-band 양상과 거의 일치되고 있으므로 상동 염색체의 인지나 각 염색체의 구조적 이상 유무를 파악하는데 쉽게 적용할 수 있는 기법으로 생각된다. 그러나 Q-banding의 경우 형광 물질의 발현이 일시적임에 따라 영구 보존이 불가능하고 단 시간내 관찰을 마쳐야하는 단점이 있다.



Fig. 5. Q-banded metaphase spreads of chick

4. High Resolution Banding 분석

가. High Resolution Banding

세포분열 전기 또는 초기중기 상태의 염색체를 인위적으로 유도함으로써 보다 많은 band양상과 정밀한 핵형 분석이 가능할 것 이란 가정하에 Yunis(1976)가 이에 대한 방법을 처음으로 개발하여 고분염분석법(high-resolution banding)이라 소개하였다. 고분염분석 방법은 세포 배양시 모든 세포들을 synchronize시켜 mitotic index의 효율을 증가시키고, 또한 염색체의 상을 인위적으로 보다 길게 유지시키는 것으로서 모든 세포의 분열 상태를 간기 중 S phase로 억제시킨 후 thymidine-rich medium을 첨가하여 이 상태를 풀어준 후 colcemid 등 방추사 억제물질을 단 시간 투여하여 염색체들이 동일하게 prophase 혹은 prometaphase가 되도록 유도하는 것이다. 이러한 방법을 이용함으로써 기존 GTG-banding과는 비교할 수 없을 정도로 정밀한 핵형 분석이 가능하여졌는데 특히 사람의 염색체 연구에 있어서는 매우 광범위하고 적극적으로 활용되고 있는 기술이다. 최근 닭 염색체에 대한 연구들로서는 in situ hybridization을 이용한 염색체 상의 유전자의 위치 구명을 위한 연구들이 많이 시도되고 있는 바(Shaw et al., 1990), 기존 염색체의 분리 방법으로는 이에 대한 명확한 위치 설정에 어려움이 많다. 따라서 가금류에 있어서도 보다 명확하고 많은 band를 얻을 수 있는 high-resolution banding 방법의 개발이 당연한 과제로서 본 연구에서는 이에 대한 기술적 개발을 시도한 바 Fig. 6과 같은 성공적 결과를 도출할 수 있었다.

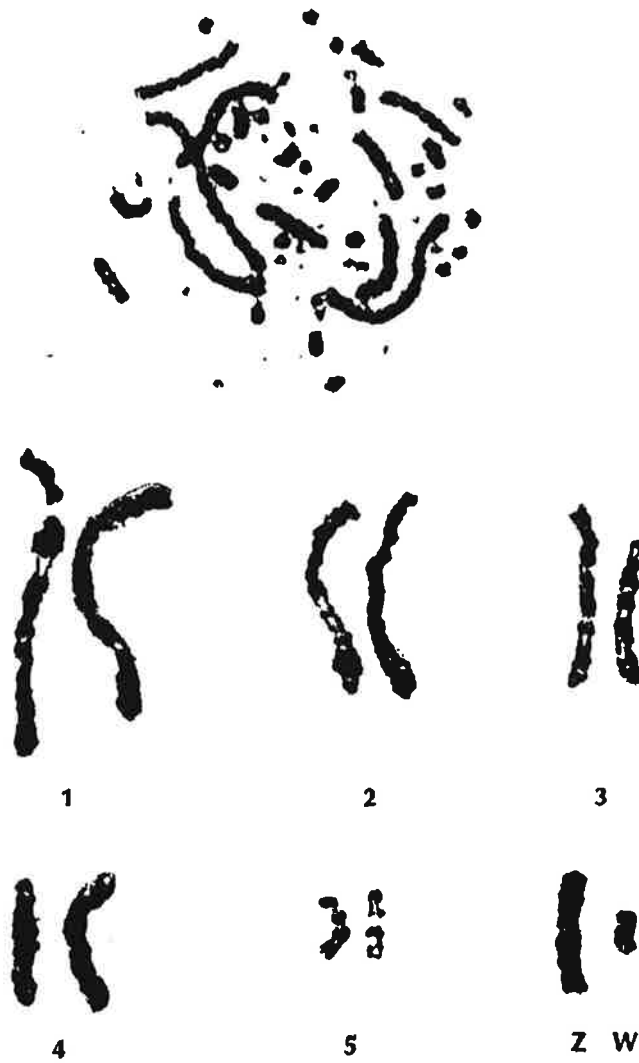


Fig. 6. Partial HR-banded karyotype and metaphase spread from chick blood culture

나. 정밀 염색체 표본제작을 위한 HR-banding기법의 확립

최근 분자유전학적 기술의 급속한 발달에 힘입어 세포적 차원에서 특정 분자의 위치 구명이나 연관 지도와 물리적 염색체 지도의 조밀 작성을 위해 기존 염색체 분리 방법보다는 월등히 개선된 정밀한 세포유전학적 기술을 요구하고 있다. 기존 염색체의 분리에 따른 band양상은 증기 상태의 염색체를 유도하여 분석함에 따라 염색체의 응축으로 인하여 상대적으로 짧기 때문에 그리 많지 않은 band가 출현한다. 따라서 긴 염색체를 인위적으로 유도할 수 있다면 보다 많은 band의 발현을 기대할 수 있고, 보다 정밀한 염색체의 분석을 수행할 수 있을 것이다.

가금류의 염색체는 포유류와 달리 많은 소형염색체(microchromosome)들로 구성되어 있고, 상대적으로 증기상의 염색체들이 짧기 때문에 핵형 분석에 어려움이 많다. 특히 본 과제와 같은 물리적 염색체지도의 조밀 작성 등을 위하여서는 기존 염색체 분리 방법으로 제작된 증기상 보다는 더욱 길고 정밀한 염색체의 표본이 요구되어진다. 닭에 있어 염색체의 분리방법으로는 개체의 백혈구세포나 섬유아세포 또는 수정란의 배아조직을 배양하여 증기상을 억제한 후 염색체의 표본을 얻고 있다. 따라서 세포주기별 특정시기의 유도와 적절한 증기상의 억제가 염색체의 형태를 결정하는 것으로 본 연구에서는 세포분열을 저지하고 염색체의 응축을 방지하는 etidium bromide를 이용하여 닭의 백혈구 배양 및 초기배자로부터 새로운 염색체의 분리기법을 개발하여 이의 결과를 제시하고 자 한다.

1) 혈액세포를 이용한 HR-banding 기법

유전자의 물리적 지도 작성을 위하여 우선 보다 명확한 중기상의 획득이 선행되어야 한다. 닭에 있어서 혈액으로부터 염색체분리는 포유류와 달리 혈액의 적혈구내 핵이 존재하므로 통상적인 혈액 배양 방법으로는 많은 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 ficoll을 이용한 순수 백혈구의 분리법을 개발하여 이를 이용한 염색체 분리를 수행함으로써 성공적인 결과를 도출한 바 있다. 한편 세포적 차원에서 특정 분자의 위치 구명이나 연관 지도와 물리적 염색체 지도의 조밀 작성을 위해 기존 염색체 분리 방법보다는 월등히 개선된 정밀한 세포유전학적 기술을 요구하고 있는 바 본 연구에서는 보다 긴 염색체들을 인위적으로 유도할 수 있는 High-Resolution banding 방법을 적용하여 성공적 결과를 도출하였다. 닭의 혈액배양을 이용한 HR-banding의 개괄적 처리방법은 다음과 같다.

- ① Blood의 배양: 5% CO₂, 37℃에 72시간 배양
- ② Cell synchronize: MTX 처리, 17시간 재 배양
- ③ Rinsing : medium으로 3회 이상 rinsing
- ④ 재 배 양 : thymidine함유 배양액으로 6시간 재배양
- ⑤ 중기상 억제: harvest 하기 10~15분 전 colcemid 첨가
- ⑥ 저장처리, 고정처리
- ⑦ 표본제작 : 고정 세포액을 slide상에 5~6방울 적하
- ⑧ Air drying
- ⑨ G-banding

High-Resolution banding이란 세포분열 시기 중 전기 (prophase) 혹은 초기중기(prometaphase)상태의 분열상을 인위적으

로 유도하여 이들 염색체로부터 나타나는 band양상을 분석하는 것으로 일반 증기상에 비해 월등히 많은 band수와 개개 염색체의 미세한 구조적 양상까지 분석 가능하게 한다. 따라서 ficoll 처리 후 백혈구 배양법을 이용한 최적의 HR-banding조건을 얻기 위하여 Table 3과 같이 MTX 및 EtBr을 처리한 결과 세포들의 동기화와 분열 초기상태 염색체의 유도율을 현저히 높일 수 있었으며 이들 중 MTX처리 후 thymidine과 colcemid의 처리 방법이 가장 양호한 결과를 나타내었다. Fig. 7에서는 본 분석법에 의해 나타난 핵형 양상과 일반 GTG-banding에 의해 나타나는 핵형 양상을 비교 제시하였다. 또한 Table 4에서는 일반 GTG-band에서 분석하는 증기상 대비 HR-banding 방법으로 부터 유도된 전기 또는 전중기상의 상대적 길이비를 나타낸 것으로 5쌍의 대형염색체들에 있어 전기 또는 전중기상이 일반 증기상의 길이에 비해 평균 2.5배정도 긴 양상을 보였다. Table 5에서는 High-Resolution banding에 의한 닭의 Z 성 염색체를 포함한 5쌍의 대형염색체들에 대한 band 출현양상을 제시한 것이다. High-Resolution banding에 의한 염색체상의 출현band수는 총 150여개로서 관행적인 GTG -banding에 의한 80여개의 band보다 무려 70여개나 많은 band 양상을 보였고, 또한 각 염색체별에 있어 전기 또는 전중기상이 일반 증기상에 비해 상대적 길이가 긴 염색체일 수록 보다 많은 band수의 차이를 보이며, 평균 2배정도 band수의 차이를 나타내었다.

Table 3. Effect of high resolution culture treatments on the number of chick lymphocyte cells progressed into prophase and metaphase

Treatments	Samples	Prophase	Metaphase	Total
MTX-Thymidine -Colcemid	58	5.43 ± 0.59(22.0%) ^a	19.24 ± 1.56(78.0%) ^b	24.67 ± 1.72(100%)
EtBR-Colcemid	48	2.50 ± 0.47(19.6%) ^b	10.25 ± 0.66(80.4%) ^b	12.75 ± 0.79(100%)
Colcemid	59	1.27 ± 0.23(1.5%) ^b	85.98 ± 7.85(98.4%) ^a	87.41 ± 7.80(100%)

There are significant differences among the means with the different superscripts in a column(p<0.001). Values are mean ± standard error

Table 4. Comparison of the length of macrochromosomes on metaphase and prophase

Chromosome number	Metaphase	Prophase
Samples	20	20
1	100	285.8
2	100	272.7
3	100	252.3
4	100	243.3
5	100	260.4
Z	100	220.8
Mean	100	255.9

Values are expressed as 100% in each metaphase chromosomes

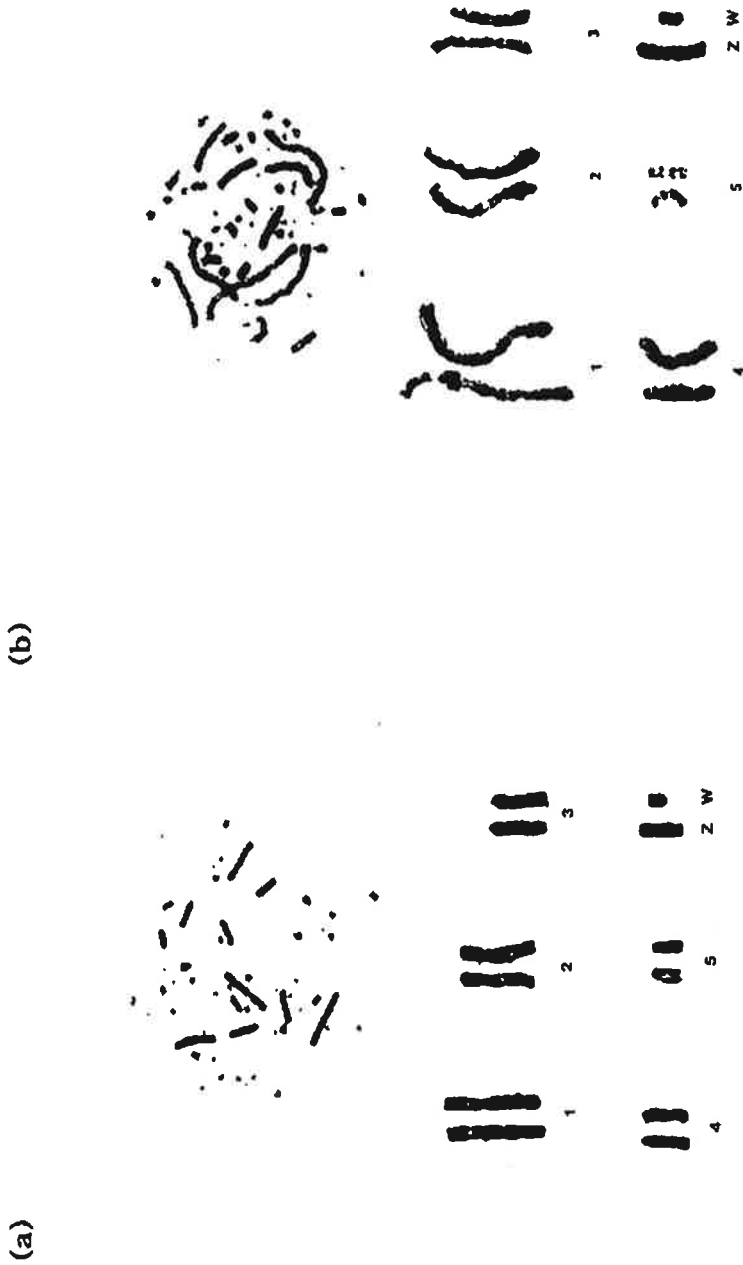


Fig. 7. Partial G-banded karyotypes from metaphase(a) and prophase(b)

Table 5. Comparison of the number of bands at metaphase and prophase

Chromosome number	Metaphase	Prophase
Samples	20	10
1	21.40 ± 0.79 ^a	43.90 ± 2.82 ^b
2	16.70 ± 0.90 ^a	33.40 ± 2.68 ^b
3	13.40 ± 0.68 ^a	22.40 ± 1.34 ^b
4	10.10 ± 0.49 ^a	18.70 ± 1.19 ^b
5	7.40 ± 0.32 ^a	13.50 ± 1.04 ^b
Z	10.00 ± 0.54 ^a	17.00 ± 1.03 ^b
Mean	79.00 ± 4.57 ^a	148.9 ± 10.10 ^b

There is significant difference between means with the different superscripts in a row ($p < 0.001$). Values are mean ± standard error

2) 수정란을 이용한 HR-banding 기법

수정란의 초기배자를 이용한 염색체의 분리방법은 수집된 종란을 37.5°C의 부화기에서 44시간 배양한 후 기공으로 0.1ml ethidium bromide(10µg/ml)를 일정 시간 처리하고 다시 0.1ml colchicine(0.1%)을 처리한다. 세포의 수확은 배양종료 후 배자만을 가위로 잘라내어 RPMI medium으로 rinsing하고 newborn calf serum과 0.3% sodium citrate를 1:3으로 희석한 저장액에 저장처리 한다.

저장된 세포들은 ice cold fixative solution(3:1=methanol:acetic acid)으로 고정시키고 2회 정도 반복 처리한다. 고정 처리한 세포액들로 slide를 제작한 후 GTG-banding을 위하여 0.1% trypsin 용액에 처리하고 4% Giemsa 용액으로 염색한다.

Table 6에서는 이를 이용한 최적의 분리 조건을 얻기 위하여 ethidium bromide와 colchicine의 처리시간에 따라 6 처리구로 비교 실험하여 처리에 따른 각 slide당 전기상 및 중기상의 획득수율을 제시하였다. 분석 결과 ethidium bromide의 처리가 판행적인 colchicine만의 처리에 비해 월등히 많은 전기상을 유도하였고 ($P < 0.001$), ethidium bromide의 처리 내에서도 ethidium bromide만 처리한 실험군보다는 ethidium bromide와 colchicine을 함께 처리한 것이 전기 및 중기상 염색체의 출현빈도가 더욱 높았고, 염색체의 형태와 분포상태도 보다 양호하게 나타났다. 일반적으로 세포분열 전기나 전중기의 길고 가는 염색체의 출현빈도가 높아지면 염색체의 모양과 분포양상이 나빠지지만, 수정란을 이용한 2시간 정도의 ethidium bromide처리와 이후 1시간 정도의 colchicine을 처리함으로써 고해상 염색체의 높은 출현빈도와 보다 양호한 형태의 염색체를 획득할 수 있다. 이러한 고해상 염색체는 세포분열 중기상의 염색체에 비해 염색체의 길이는 각 염색체에서 1.7배에서 2.0배정도 더 길었으며, 전체 대형염색체의 band수는 Table 7에서와 같이 2배정도 더 많이 관찰되었다. 세포분열의 G₂단계에서 염색체의 수축을 억제시키는 ethidium bromide를 닭의 초기배자에 이용함으로써 기존 수정란을 이용한 염색체 분리기법에 비하여 보다 많은 고해상의 염색체상을 획득할 수 있었고, 실험적 어려움도 없으므로 정밀 염색체 표본을 위한 개선된 분리기법으로 사료된다.

한편 전기 및 중기 상태의 각 대형염색체간의 상대적 길이를 비교 분석한 바 Table 8과 같이 3번 및 Z 염색체에서 다소간의 차이를 보이고 있으나, 동원체 지수에서는 이들간의 차이가 없으므로 나타났다. 닭의 대형염색체에 대한 전기 및 중기상의 상대적 길

이와 동원체 지수를 분석하여 이를 도식화하여 Fig. 8에 비교 제시하였다.

이상의 결과들을 종합하여 HR-banding기법에 의해 유도된 닭의 전기 및 중기상태의 대형염색체들에 대한 표준 G-band 모식도는 Fig. 9와 같다.

Table 6. Effect of the treatments of ethidium bromide and colchicine on the number of chick embryonic cells progressed into prophase and metaphase in a slide

Duration of exposure		Prophase	Metaphase	Total
EtBr	Colchicine			
2 hours	30min	5.24 ± 0.35 ^a (3.2)	156.63 ± 16.90 ^c (96.8)	161.87 ± 17.04 ^c (100)
2.5 hours	30min	5.36 ± 0.52 ^a (2.1)	244.60 ± 29.37 ^{ab} (97.9)	249.97 ± 29.52 ^{ab} (100)
2 hours	60min	5.33 ± 0.64 ^a (1.8)	297.72 ± 32.24 ^a (98.2)	303.05 ± 32.24 ^a (100)
2.5 hours	60min	6.92 ± 0.86 ^a (4.3)	155.57 ± 13.93 ^c (95.7)	162.49 ± 14.03 ^c (100)
2 hours	-	5.62 ± 1.00 ^a (3.6)	152.54 ± 15.28 ^c (96.4)	158.16 ± 15.52 ^c (100)
-	2hours	2.53 ± 0.33 ^b (1.8)	204.79 ± 20.70 ^{bc} (98.8)	207.32 ± 20.85 ^{bc} (100)

There are significant differences among the means with the different superscripts in a column ($P < 0.001$). Values are mean ± standard error. Brackets are the induction rates of cells to total number(%). Treatments were 0.1ml of 0.1% colchicine injection after 0.1ml of ethidium bromide(10µg/ml) administration.

Table 7. Comparison of the number of GTG-bands on prophase and metaphase macrochromosomes which harvested from chick embryonic culture

Chromosome number	Prophase	Metaphase
n	21	31
1	42.76 ^a ± 1.45	22.36 ^b ± 0.72
2	31.48 ^a ± 1.14	18.23 ^b ± 0.59
3	23.14 ^a ± 0.87	13.68 ^b ± 0.56
4	18.00 ^a ± 0.74	11.10 ^b ± 0.43
5	13.48 ^a ± 0.57	7.68 ^b ± 0.29
Z	16.90 ^a ± 0.61	10.42 ^b ± 0.33

There are significant differences among the means with the different superscripts in a row (P<0.002). Values are mean±standard error

Table 8. Comparison of prophase and metaphase chick macrochromosomes on relative length and centromeric index

Chromosome number	Relative length		Centromeric index	
	Prophase	Metaphase	Prophase	Metaphase
n	34	30	34	30
1	28.7±0.2	28.2±0.3	34.9±0.5	40.1±0.6
2	21.5±0.3	21.2±0.3	32.3±0.6	35.6±0.5
3	16.9±0.2 ^a	16.2±0.2 ^b	0	0
4	13.5±0.2	13.2±0.3	23.4±0.6	22.8±0.7
5	8.5±0.2	9.0±0.2	0	0
Z	11.0±0.3 ^b	12.4±0.4 ^a	46.2±0.4	47.1±0.5

There are significant differences among the means with the different superscripts in a row (P<0.03). Values are mean±standard error

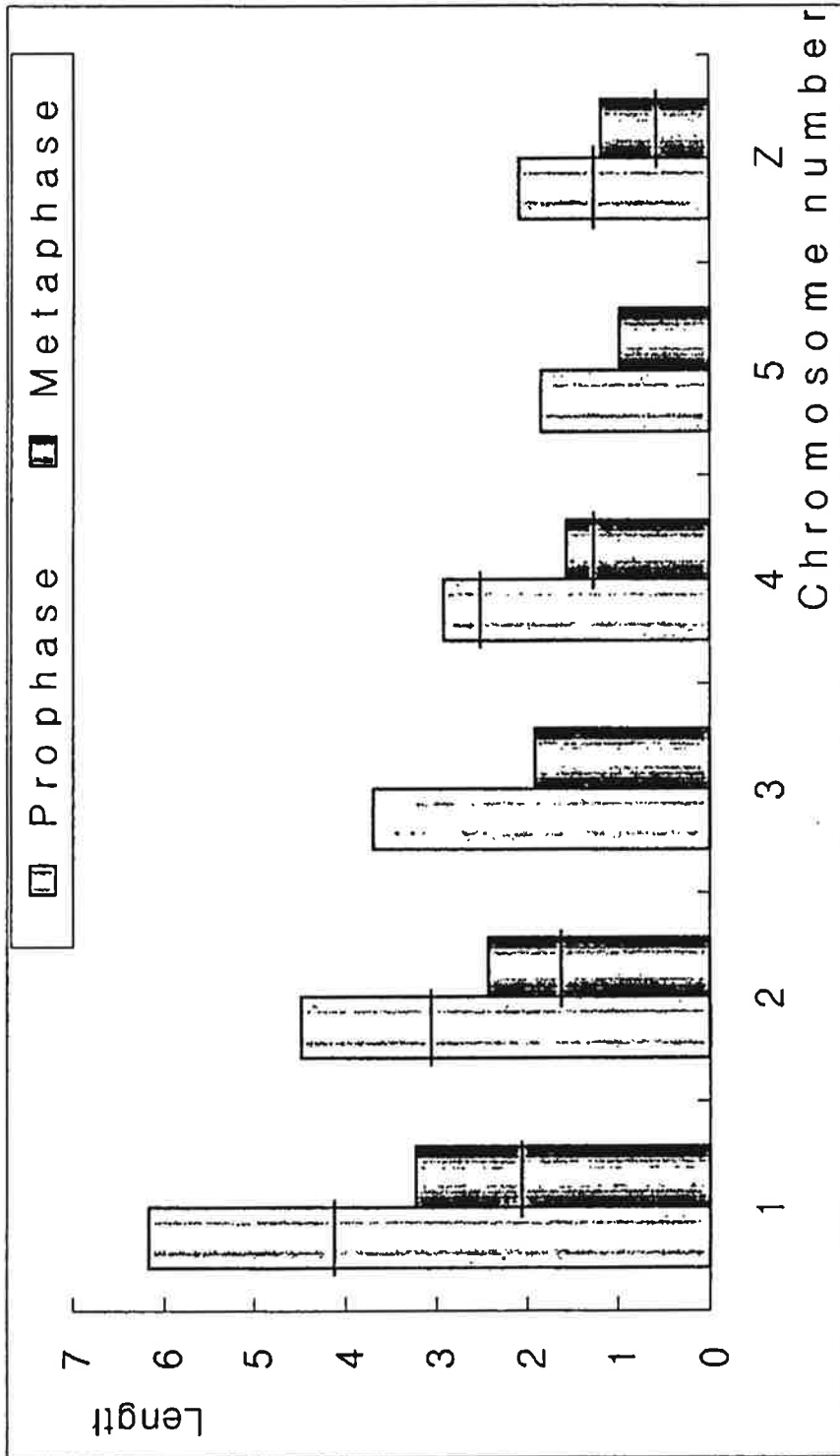


Fig. 8. Idiogrammatic representation of the relative length of prophase and metaphase macrochromosomes in chick

제 4 절 계군의 염색체 변이 조사 및 유전양식 규명

1. 품종간 염색체의 형태적 양상 비교 고찰

본 연구를 위하여 1차년도에 확보된 백색 코니쉬종(White Cornish), 로드 아일랜드 레드종(Rhode Island Red), 재래계 및 오골계에 대한 품종별 염색체 변이 양상과 형태적 특징 양상들을 비교 분석하기 위하여 이들 각 품종에 대한 대형염색체(macrochromosomes)들에 대한 상대적 길이(relative length)와 동원체 지수(centromeric index)들을 분석하였다. 상대적 길이라 함은 닭에 있어 Z, W 성 염색체를 포함한 7개의 대형염색체에 있어 각 염색체들이 차지하는 상대적인 길이의 비를 나타내는 것으로 품종별 개개 염색체의 형태적 양상을 간접적으로 비교 분석할 수 있다. Table 9에 제시된 바와 같이 코니쉬종, 로드종, 재래계 및 오골계간에 대형염색체의 상대적 길이는 1번 염색체의 경우 로드종이 다소 긴 경향을 보였고, 3번 염색체의 경우 로드종과 코니쉬, 재래계와 오골계간에 매우 유사한 경향을 나타내었다. 한편 성 염색체 중 Z 염색체는 재래계가 특이적으로 작은 양상을 보이고, W의 경우 로드종이 상대적으로 타 품종에 비해 작은 경향을 보였다. 그러나 본 분석 결과 품종간 염색체의 상대적 길이에 대하여 통계적 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 10에서는 각 품종별 대형염색체의 동원체 지수를 나타낸 것으로 각 염색체의 동원체 위치에 따른 형태적 특징을 제시하는 것이다. 품종간에 있어 동원체 지수에 의한 형태적 차이는 없는 것으로

로 나타나고, 본 분석치에 따라 1번 염색체는 가장 긴 metacentric chromosome이고, 2번은 그 다음 크기인 submetacentric, 3번 및 5번은 거의 p-arm이 없는 acrocentric chromosome이며, 4번은 다소 p-arm이 있는 acrocentric chromosome이었다. 한편 성 염색체인 Z, W는 거의 장완과 단완의 길이가 비슷한 metacentric chromosome으로 나타났다.

이상의 결과들을 종합하여 Fig. 10에서는 품종간 대형 염색체의 상대적 크기를 도식화하여 비교 제시하였다.

Table 9]. The relative lengths of macrochromosomes in several chick breeds

Chromosomes number	W. Cornish	R. I. Red	Korean Native Chick	Kor. Native Ogol Chick
1	26.69 ± 2.87	28.06 ± 1.88	27.77 ± 2.45	26.42 ± 1.22
2	20.34 ± 2.16	20.75 ± 1.11	21.10 ± 1.44	19.94 ± 0.96
3	14.61 ± 1.13	14.90 ± 0.75	15.28 ± 1.54	15.23 ± 0.65
4	12.00 ± 1.16	12.64 ± 1.67	12.36 ± 0.78	12.11 ± 0.62
5	8.46 ± 0.87	7.77 ± 0.64	7.76 ± 0.75	8.01 ± 1.24
Z	13.10 ± 3.62	12.00 ± 0.92	11.74 ± 1.19	13.23 ± 1.26
W	5.16 ± 1.07	4.76 ± 0.97	5.07 ± 0.99	5.25 ± 0.72

There are no significant differences among breeds in each chromosome (p>0.05)

Table 10]. The centromeric index of macrochromosomes in several chick breeds

Chromosomes number	W. Cornish	R. I. Red	Korean Native Chick	Kor. Native Ogol Chick	Nomenclature
1	38.68±1.66	37.76±1.85	38.62±1.92	39.49±2.07	metacentric
2	34.51±2.31	34.23±2.01	34.44±2.32	34.12±2.01	submetacentric
3	0	0	0	0	acrocentric
4	23.10±2.41	21.52±2.76	21.26±2.11	21.49±2.88	acrocentric
5	0	0	0	0	acrocentric
Z	46.71±2.22	46.90±2.37	47.77±1.75	47.45±1.91	metacentric
W	47.28±2.31	47.98±2.78	47.12±2.92	47.33±2.77	metacentric

There are no significant differences among breeds in each chromosome (p>0.05)

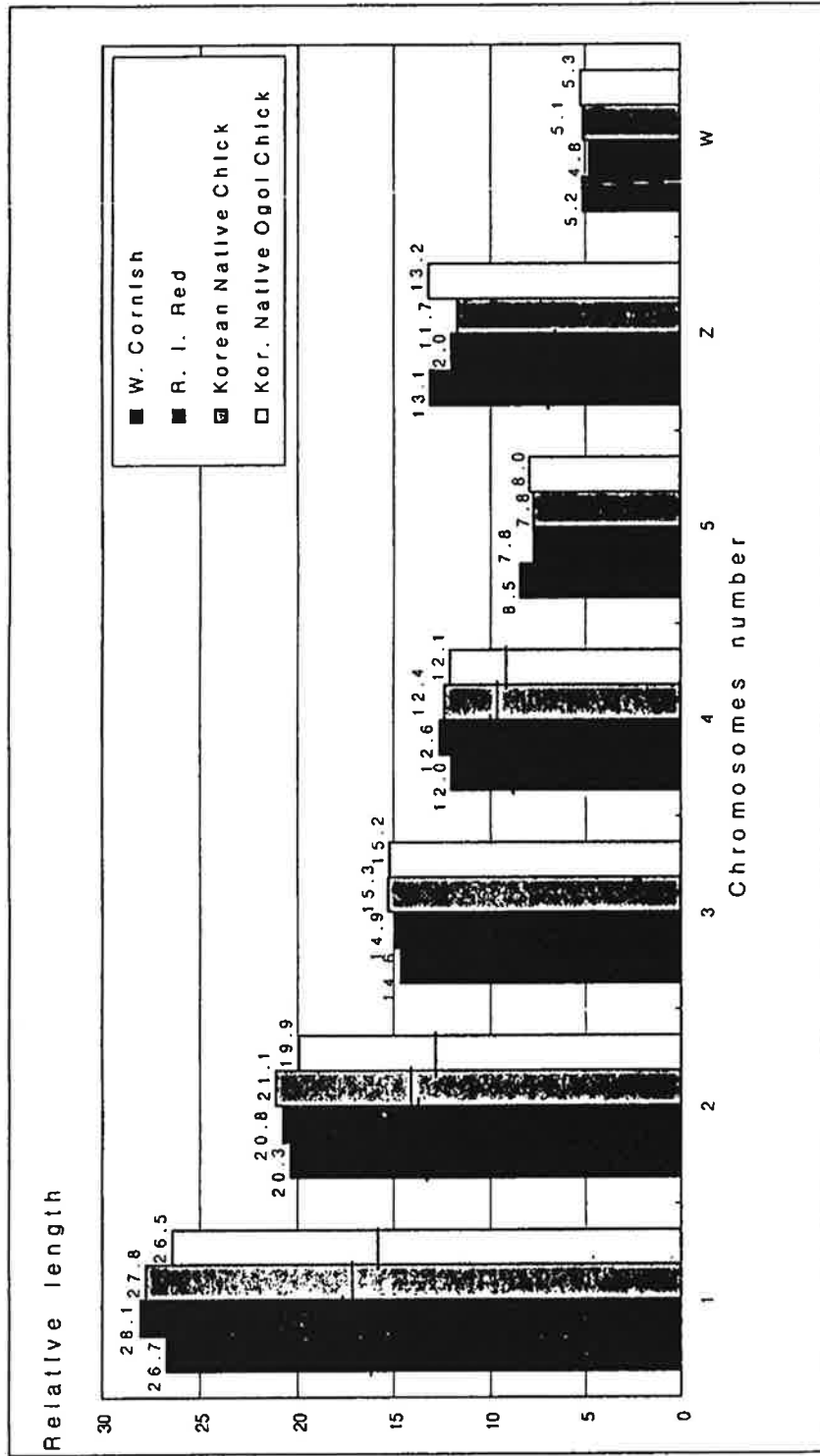


Fig.10. Idiogrammatic representations of the relative lengths of macrochromosomes in several chick breeds

2. 품종간 염색체 이상양상과 변식형질간의 연관구명

닭 염색체의 변이 양상을 고찰하고 자 각 품종별 자연발생적인 염색체의 이상 빈도를 분석하였다. 염색체 이상 양상의 분석은 각 품종별 수정란의 초기배자를 이용하여 5쌍의 대형염색체와 성 염색체에 국한하였고, 관찰 결과 세포가 나타나지 않는 상은 무정란으로 분류하였으며, 세포는 있지만 증기상이 없는 것은 초기배자의 사망으로 분류하였다. 이상에 대한 품종별 분석 결과는 Table 11과 같다.

본 분석에 공시된 수정란은 총 539개로서 이중 초기배자의 사망이 총 공시란 중 10.9%를 차지하고, 품종간에 있어 Cornish, 재래계, 오골계, R. I. Red의 순으로 초기 배자의 사망률이 높았다. 성비는 분석 가능한 총 480개의 수정란 중 수컷이 242개, 암컷이 238개로 거의 1:1의 성비를 나타내었으나 계종간에 다소의 차이를 보이고 있다. 각 종별 초기배자에서의 염색체 이상빈도는 전체 분석란 중 5.6%의 출현 빈도를 보이고 이들 중 육용계가 7.1%로 가장 높게 나타났으며 산란계가 3.7%로 가장 낮게 나타났다.

이들 각 종별 염색체이상의 형태 및 빈도는 Table 12와 같다. 이상의 분석결과에서 각 종별로 가장 많은 발생 빈도를 보이는 heteroploidy의 종류는 haploid(n)와 haploid-diploid mosaic(n/2n)으로서 이는 총 480개의 분석란 중 2.9%의 출현을 나타내고, 27개의 염색체이상 중 52%나 차지하였다. 한편 aneuploid mosaic의 8개의 발생은 이들 모두가 monosomy-diploid mosaic (2n-1/2n)으로서 이의 출현 빈도 역시 각 품종별로 매우 높게 나타났다.

Table 11. Chromosome analysis from early chick embryos

Analyze	W. Cornish	R. I. Red	Kor. Native Chick	Kor. Native Ogol Chick	Total
Total number of eggs	130	173	101	135	539
Early death	18(13.8%)	12(6.9%)	13(12.9%)	16(11.9%)	59(10.9%)
Eggs analyzed	112	161	88	119	480
Sex ratio	1.24	1.15	0.73	0.92	1.02
Male	62	86	37	57	242
Female	50	75	51	62	238
Number of chromosomal aberration	8(7.1%)	6(3.7%)	6(6.8%)	7(5.9%)	27(5.6%)

Table 12. The frequencies and types of chromosomal aberration in several chick breeds

Karyotypes	W. Cornish	R. I. Red	Kor. Native Chick	Kor. Native Ogol Chick	Total
Total number of embryos	112	161	88	119	480
Haploid(n)	0	0	1	1	2
n/2n mosaic	6	3	1	2	12
3n	0	1(ZZW)	0	0	1
2n±1	0	1	1	1	3
2n±1/2n mosaic	1	1	3	3	8
3n+1	1	0	0	0	1
Total abnormals	8	6	6	7	27

제 5 절 유전자의 물리적 지도 작성을 위한 조건 확립과 FISH기법에 의한 물리적 지도 작성

1.. FISH(Fluorescence *in situ* hybridization) 조건 확립

FISH기법을 이용한 염색체상 유전자의 물리적 지도 작성을 하고 자 이에 대한 조건 확립을 human specific probe #13/21을 이용하여 연구수행에서 상술된 방법으로 수행하였으며, 또한 닭에 있어서는 특정 probe없이 counter staining만을 이용하여 조건 확립을 시도하였다.

특정 gene의 염색체상 발현을 위한 바람직한 FISH의 기술적 조건으로서 여러 요인들이 작용하는 것으로 나타났다. 우선 특정 유전자의 labeling이 완벽하게 이루어져야만 할 것이고, 표본으로 사용할 염색체의 증기상들의 양상이 매우 양호하여야만 한다. 기타 denaturation의 과정과 형광현미경의 사용방법들에 많은 영향을 받는 것으로 나타났다.

본 실험의 조건확립을 위해 human의 13번과 21번 특정 probe를 이용하여 얻어진 결과는 Fig.11과 같다. 본 Fig. 11에서 나타난 바와 같이 13번 상동염색체와 21번 상동염색체의 satellite부위에 fluorescene의 발현 양상을 인지할 수 있다. 한편 닭의 경우는 특정 probe의 처리없이 counter stain으로 PI와 DAPI를 이용하여 결과를 도출한 바 Fig. 12과 같은 양상을 얻을 수 있었다.

2. FISH기법에 의한 물리적 지도 작성

이전까지의 *in situ* hybridization technique은 주로 radioisotopes를 이용하여 label을 시키고, autoradiography를 통해 검색하였다. 그러나 최근 nonradioactive label방법을 개발하여 *in situ* hybridization에 응용하게 되어 이들 중 형광물질을 붙여 이의 발현을 인지하는 방법으로 FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization)이란 방법이 소개되고 있다. 이러한 방법 중 크게 직접법(direct method)와 간접법(indirect method)이 있는데 직접법은 detectable molecule(reporter)을 nucleic acid probe에 직접 붙여 hybrid시키므로 target nucleic acid와 hybridization하여 현미경으로 곧 바로 인지할 수 있는 방법으로 간편하기는 하나 probe-reporter bond가 쉽게 떨어질 가능성의 단점이 있다. 반면 간접법은 reporter molecule을 함유한 probe가 화학적으로 또는 효소적으로 세포화학적 친화성에 의해 발현하도록 한 방법으로 hybridization 과정 중 간섭 현상이 없을 뿐만 아니라 hybrid의 안정성을 가져올 수 있는 장점이 있으나 시간적 및 기술적 번거로움이 있다. 이들 중 hapten modification이 널리 소개되고 있는바 biotin-streptavidin system과 digoxigenin-system이 가장 보편적이다.

본 연구는 닭에 있는 유용유전자의 물리적 지도 작성을 위하여 FISH 기법을 이용하여 특정 유전자의 염색체상 발현 양상을 살펴보고자 닭의 W-specific probe를 공시하여 이의 형광발현 양상을 고찰하였다.

가. 닭의 W-specific repetitive sequeunce의 특성과 증폭

닭의 W-specific repetitive sequeunce는 Xho I family의 발견을

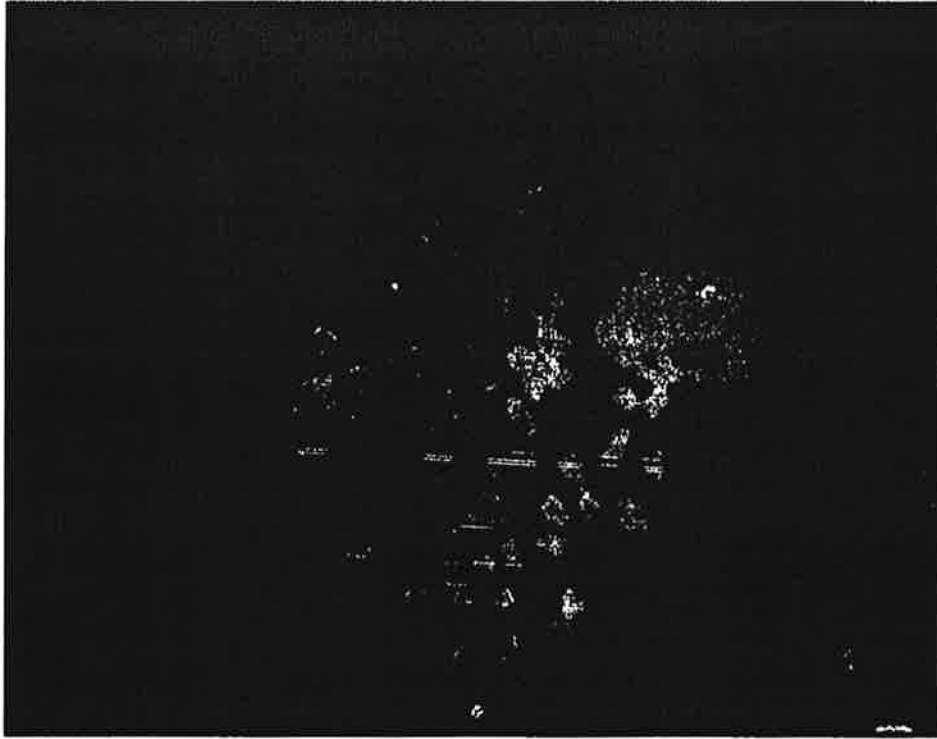


Fig. 11. Metaphase spreads of human by use of FISH techniques with 13 & 21 specific probe

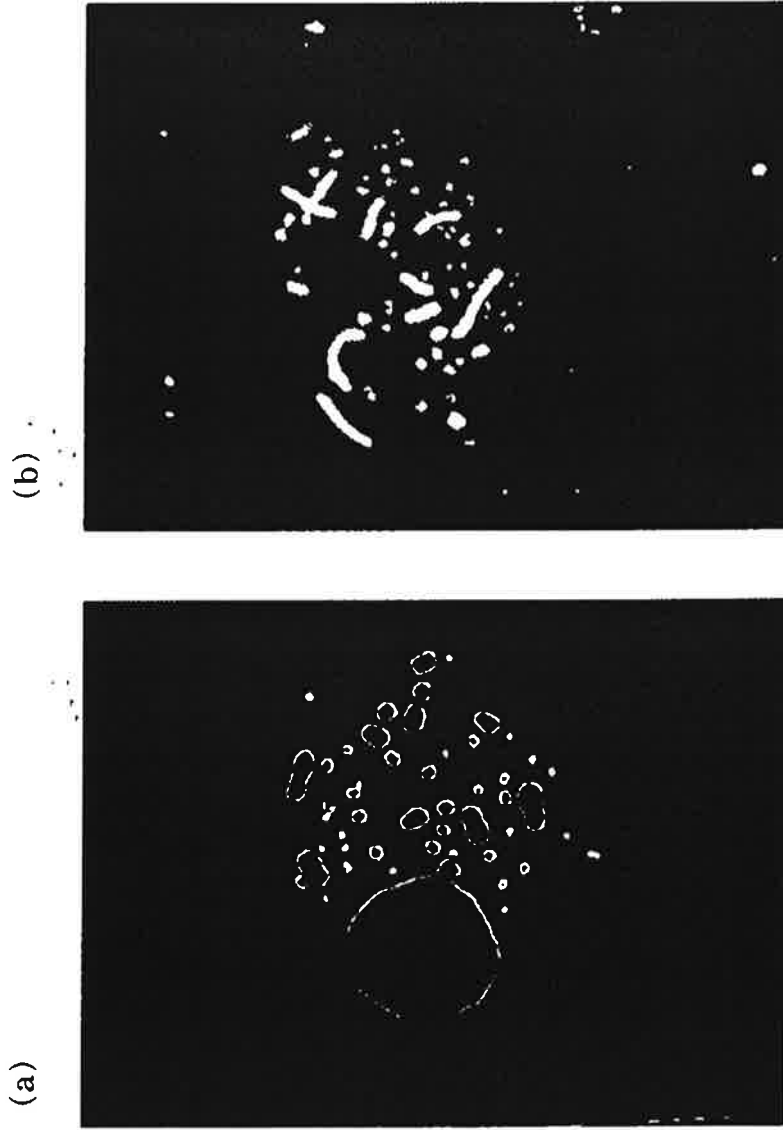


Fig. 12. Metaphase spreads of chick by FISH techniques using PI(a) and DAPI(b) counter staining without specific probes

통해 DNA수준에서의 닭의 성 감별을 가능하게 할수 있는 sequence 이다(Tone 등, 1982). Xho I family는 닭의 DNA를 제한효소 Xho I 으로 절단하였을 때 암컷의 경우 특이적으로 0.6kb와 1.1kb 크기의 단편이 나타나는 것이 관찰되어 그 염기서열을 결정 한 결과 21개의 염기서열이 43번 반복되어 나타나는 717bp의 단편이었는데 이는 W 염색체 상에 14,000번 반복되어 존재하는 것으로 나타났다(Kodama 등, 1987). 따라서 본 연구에서는 닭의 W 반복 염기서열을 이용하여 FISH 기법의 민감도를 측정하기 위한 것으로 PCR primer를 작성하여 닭의 Xho I family 0.7kb부위를 증폭하여 이를 형광 검출하는 과정을 시도하였다.

PCR primer는 상위의 5'-acc tgt ctc cca aaa att ctg c-3' 와 하위의 5'-tgg ggt gaa atg ggg ttg-3' 의 염기서열을 가지며 348bp 크기의 단편을 증폭할 수 있게 고안되었다. 증폭된 단편은 2%의 agarose gel전기영동을 통해 분리한 후, 단편을 포함하는 gel 부위를 절단하고 GeneClean kit(Bio101, Co., Ltd)을 통해 정제한 후 Nick translation 방법에 의한 DIG-labelling을 실시하였다.

나. DIG-labelling

labelling방법으로서 크게 random primed labelling과 nick translation방법이 있는데 random labelling의 경우 template DNA가 linearized & denatured 되어야 하고, annealed primer의 3'-OH 말단 으로부터 개시한다. Probe의 size가 100-800bp, input DNA가 10ng-3 μ g일 때 nonradioactively labelled DNA는 350-600ng이다. 따라서 nucleotide의 incorporation율이 높고, labelled probe의 양이 많기 때문에 blot application을 위해 적합하다. 반면 nick translation

의 경우 DNA template가 supercoiled 또는 linear 모두 유효한 것으로 일단 DNase I으로 DNA를 nicking한 후 DNA polymerase I이 5'→3'으로 extend하여 nick을 메우며 끊어진 nucleotide에 labelled된 DNA로 대체하는 방법으로 reaction의 kinetics는 30-60분 후에 최적 도달하고, reaction후 probe의 size가 200-500bp이고, input DNA가 100ng-3 μ g일 때 nonradioactively labelled DNA는 약 200ng이다. 두 방법 모두 labelled fragment의 길이에 따라 매우 flexible하다. Nick translation의 경우 fragment length의 조절은 DNase 농도의 조절로서 가능하고, labelling 반응이 마친 경우 이의 조절은 sonication 또는 DNase 처리로서 가능하다. 본 DNA는 nick translation에 의한 방법으로 labelling 한 것으로 1 μ g(150ng/ μ l) template DNA를 16 μ l 초자수에 희석하고, 4 μ l DIG-Nick Translation Mix.(BM)와 혼합한 후 15 $^{\circ}$ C로 90분간 배양한 다음 1 μ l 0.5M EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C로 10분간 가열하여 반응 중지시켰다.

다. FISH(Fluorescence *in situ* Hybridization)

① 표본의 준비

닭의 초기배자로부터 분리한 증기상의 염색체 표본 슬라이드를 50 μ l RNase A(100mg/ml)가 함유된 50ml 2 \times SSC용액에 침지하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하고 수세하였다. 이후 ethanol 80%, 90%, 100%순으로 dehydration하였다

② Hybridization

13 μ l formamide(65% final conc.), 5 μ l 4 \times hybridization solution(4 \times hybridization solu : 8 \times SSC; dextran sulphate 40%(W/V); DNA, MBB grade, 4mg/ml) 및 probe 2 μ l를 함유한

hybridization solution($20\mu\text{l}$)을 slide상에 첨가한 후 coverslip으로 덮고 72°C 로 10분간 denaturation시킨다. 이후 slide를 moist chamber로 옮기고, 37°C 로 15시간 hybridization시킨다.

③ Post-hybridization washes

non-specifically hybridization sequence를 제거하기 위하여 slide를 50% formamide가 함유된 $1\times\text{SSC}$ 용액에서 43°C 로 15분간 수세하고 다시 60°C 에서 $0.1\times\text{SSC}$ 용액으로 5분간 3회 재 수세시킨다.

④ Immunocytochemistry

Blocking을 위하여 slide를 30분간 37°C 에서 1% blocking reagent가 함유된 50ml PBS에 담군다. 이후 detection과정으로 이들을 30분간 37°C 에서 $50\mu\text{l}$ anti-digoxigenin-fluorophore conjugate($200\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함유한 상기 PBS용액에 담구고 과정을 마친 slide를 0.2% Tween 20을 함유한 $2\times\text{SSC}$ 용액으로 10분씩 3회 수세한다.

⑤ Count-staining

배경염색을 위하여 처리된 slides를 암소에서 $5\mu\text{l}$ propidium iodide solution ($1\text{mg}/\text{ml}$)을 포함한 PBS용액으로 5분간 염색한다. 이후 2-3회 초자수로 수세하고 암소에서 air dry시킨다.

⑥ Mounting and observation

coverslip($24\times 24\text{mm}$)당 $20\mu\text{l}$ anti-fading solution (DABCO; triethylenediamine), 2%(W/V) in 50% glycerol/PBS)를 떨어뜨리고 nail polish로 밀봉한다. 형광양상의 관찰은 523nm for fluorescein (WIB, Olympus AX-70) filter로서 검경하였다.

라. Chick W-specific probe의 발현양상과 좌위 설정

Fig. 13은 초기배자로부터 분리된 닭의 증기상에 대한 FISH의 결과를 제시하였고, Fig. 14는 배아세포의 간기상에 대한 W-specific probe의 FISH양상을 나타낸 것이다. 본 과정으로부터 chick W-specific probe는 W 염색체의 p1-q1 site에 발현 양상을 나타내었고, 거의 암컷 개체 대부분의 특정 세포의 간기상에서도 본 probe의 발광 양상을 보였다. 이러한 양상은 W-specific repetitive sequence의 신뢰성을 입증하였고, 또한 본 probe의 무한한 활용 가능성을 시사한다 하겠다.

닭은 암컷 hetero형 성 염색체를 지닌 것으로 암컷의 경우 ZW, 수컷은 ZZ로 구성되어있다. 닭의 경우 초생추시 성의 감별은 육안으로 거의 불가능하여 전문 감별사에 의한 생식돌기 발달유무에 의한 감별이 보편화되어 있다. 그러나 최근 유전학의 발달과 더불어 반성유전 현상을 이용한 깃털색이나 조·만우성 등의 형질을 이용한 감별이 가능하고 이의 활용도 확산되고 있다. 그러나 특정 개체의 명확한 성의 감별은 염색체의 분석으로서만 가능하며, 특히 수정란 단계에서의 성감별이나 초기배자의 발생시 성의 확인은 세포유전학적 방법 이외에는 적용방법이 존재하지 않았다. 따라서 본 FISH의 기법을 이용한 W-specific probe의 성공적 발현양상은 특히 간기상에서의 발현은 닭의 여러 조직에서 염색체의 분리 없이도 성의 식별을 가능하게 하는 것이다. 한편 W-specific repetitive DNA의 W 염색체의 분포양상은 centromere를 중심으로 Wp1 또는 p2 site로부터 Wq1 site에 존재하는 것으로 W 성 염색체의 물리적 지도 작성을 위한 기초 자료로 제공하고 자 한다.

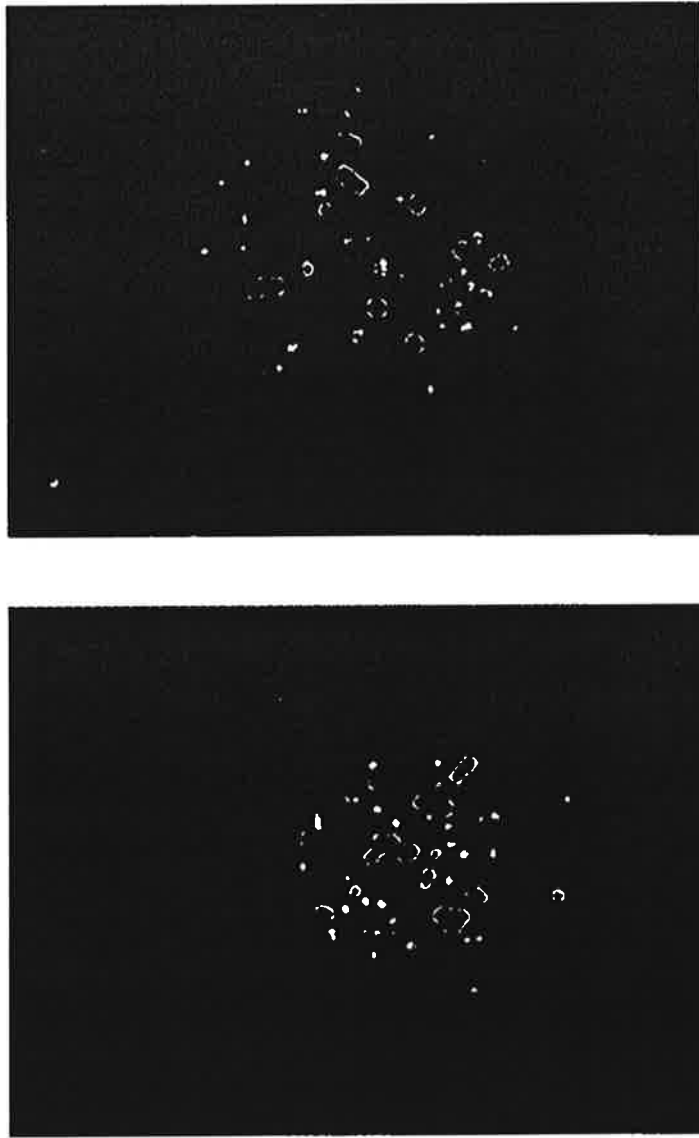


Fig. 13. FISH of a digoxigenin-labelled chick W specific repetitive DNA(yellow) to a chick metaphase chromosome spread counterstained with propidium iodide(red)

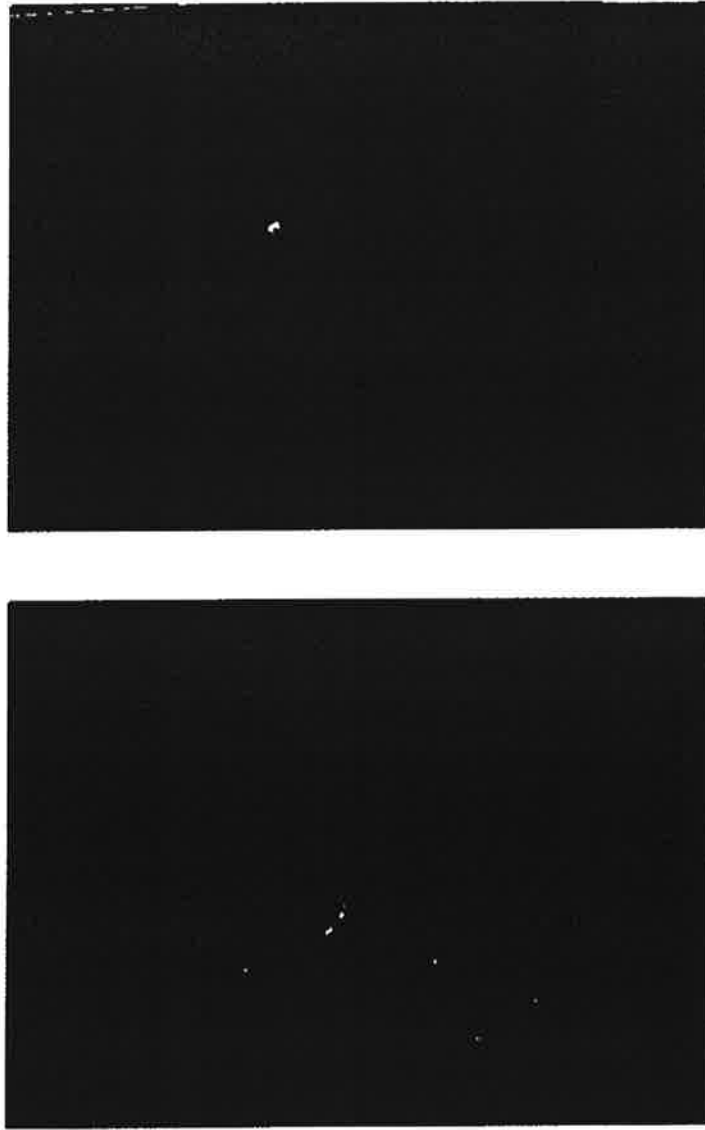


Fig. 14. FISH using the chick W specific repetitive DNA as a probe was performed on chick embryonic cell(interphase)

제 3 장 닭의 연관 유전자 지도 작성을 위한 연구

제 1 절 서 설

본 장에서는 분자세포유전학적 기법을 이용한 유용유전자의 개발에 관한 연구 중 닭의 연관유전자 지도 작성을 위한 연구로서 우선 축군의 유전 구조 파악을 위한 실용적인 기술 개발로서 오골계, 백색레그혼, 로드중, 코니시종에 대한 유전자지문 분석을 실시하고, 이를 바탕으로 유전적 근연 관계를 추정한 후 후보 축으로 재래종 오골계와 백색 레그혼종 간의 교배를 통한 퇴 교배 집단을 조성하고자 하였다. 또한 DNA 다형 표지인자 개발 방법의 확립을 위해 AP-PCR기법의 확립과 microsatellite의 관찰방법을 확립하고 집단내 유전자 부위 검색과 더불어 조성된 퇴교배 집단에서의 표지인자의 유전자형 전이양상을 파악(AP-PCR) 한다. DNA 표지인자 개발 방법에 의하여 재래계에서만 나타나는 잠정적인 특이 표지인자를 검색하고 확립된 연관 지도 작성방법 등을 이용하여 재래계 특이적인 유전자의 염색체상의 위치를 파악한다. 궁극적으로 개발된 유용 유전자의 유전자형 분석 및 유전자 지도 작성을 위해 가장 유용한 표지인자인 microsatellite분석법과 RAPD표지인자를 이용하여 조성된 퇴교배 집단에 대한 자세한 유전자형을 파악하고, 파악된 표지인자나 유전자의 유전자형을 이용하여 퇴교배 집단내의 재조합율을 산출하여 적절한 mapping 모형을 설정함으로써 예비적인 연관 유전자 지도를 작성하고자 하였다.

제 2 절 계군의 설정 및 유전분석

국내 재래 유전자원으로서 연산 오골계(KNOC)를 대상으로 백색레그혼(WL), 로드종(RIR), 코니시(CN)를 포함하는 3계통의 외래 품종에 대한 유전자지문 분석을 실시하였고 이를 바탕으로 유전적 근연관계를 추정하고자 하였다. Fig. 15는 오골계와 백색레그혼, 로드아일랜드레드, 코니시의 4품종의 닭에 대한 유전자 지문을 나타낸다. 각 품종에 대해 2개체의 DNA를 이용하였고 이들간의 공통밴드 수준을 이용하여 품종 내 유전적 유사도를 추정하였다. 또한 품종간의 유전적 유사도 추정을 위해 이용된 모든 유전자 지문을 조합 비교하였다. 공통밴드수준은 Table 13에 제시하였으며 전체 band를 크기에 따라 분획하여 비교하였다. 품종내 유전적 유사도의 수치에 있어서는 로드아일랜드레드 종이 가장 높은 값을 보였고(0.763), 코니시(0.732), 백색레그혼(0.631), 오골계(0.563)순으로 낮게 나타났다. 이는 각 품종에 대한 조성 사실에 부합되는 것으로 로드아일랜드 레드 종과 코니시종은 10여 년간 적은 규모의 집단으로 사육되어 그 근친도가 증가된 것으로 보이며 백색레그혼종은 문헌상의 값보다 높게 나타났다(Hillel등, 1989; Kuhnlein등, 1989, 1990). 또한 오골계의 품종 내 유전적 유사도에 있어서도 예상보다 높은 값을 나타냈는데 이는 오골계가 오랜 세월 동안 단일 지역에서 육성되며 품종으로 확립되어 왔기 때문으로 추정된다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 오골계의 유전적 특성을 파악하였고 오골계와 가장 먼 유연 관계를 보이는 백색 레그혼을 이용하여 오골계와의 퇴교배 조성사업을 시작하였다.

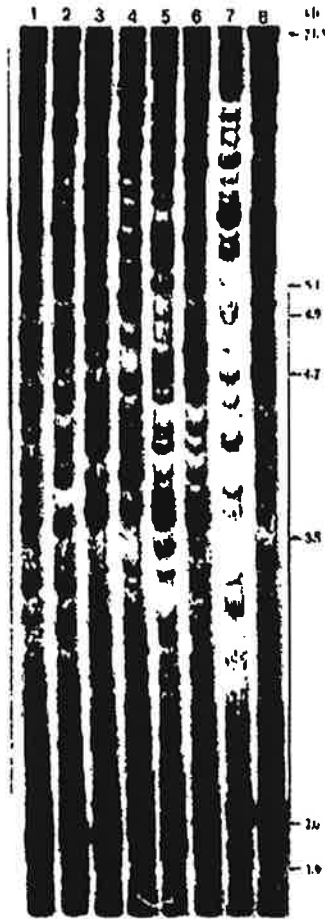


Fig. 15. DNA fingerprints of four chicken breeds generated by Hae III and Jeffreys' 33.6 probe. 1-2: Cornish, 3-4: WL, 5-6: RIR, 7-8: KNOC

Table 13. Pairwise comparison of DNA fingerprints of Fig. 5 using band sharing coefficient within and between chicken breeds

	KNOC	RIR	WL	CN
KNOC	0.563	0.394	0.374	0.398
RIR		0.763	0.464	0.416
WL			0.631	0.395
CN				0.732

제 3 절 계통간 또는 종간 교잡을 통한 퇴교배 집단 조성

Fig. 16은 오골계와 백색 레그혼간의 퇴교배집단 조성을 위한 개략도를 나타낸 것이며, 이러한 방법을 통해 2차년까지 200여마리의 퇴교배 집단을 작성하고자 한다. 1차년도에 교배는 백색 레그혼 암수 각 2수와 오골계 암수 각 2수의 8수의 모집단을 이용하여 품종간의 교잡을 2반복 4회 실시하였다. 이러한 결과로 80여마리의 1세대 잡종을 생산하였고 이들 모든 개체에 대해 인공수정을 통한 퇴교배를 실시하였다. 1차년도에 생산된 1대 교잡종의 암컷과 백색산란계 수컷을 교배하여 F1 교잡종내에 존재하는 오골계의 특이 유전자 구조가 퇴교배 자손에서 1:1의 분리비율하에서 분리될 것으로 예상할 수 있었다. 또한 1대 교잡종 수컷은 각각 모계통으로 이용된 오골계와 백색산란계의 암컷과 교배하여 백색산란계와 오골계 특이 유

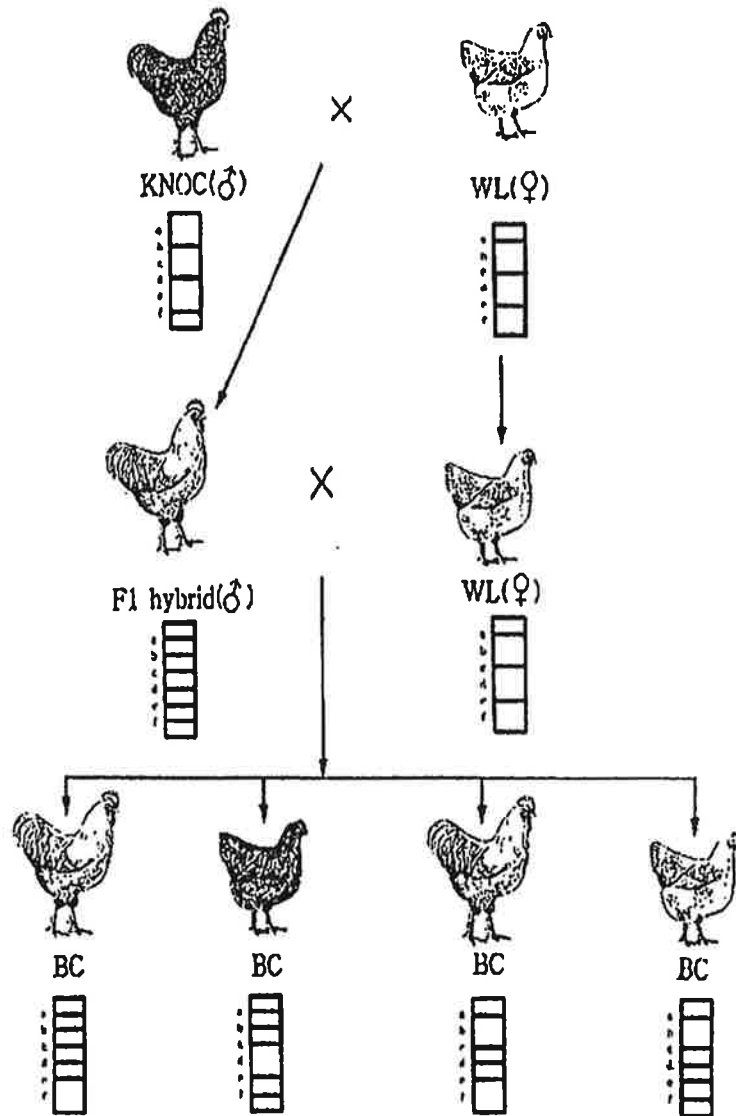


Fig. 16. Mating plan to produce a KNOG X WL backcross population for molecular genetic linkage mapping of the KNOG genome.

전자구조의 분리양상을 관찰하고자 하였다. 현재까지 초생추 408수를 생산하여 20-28주령의 280마리를 보유하고 있으며 이들중의 일부 개체에 대해 채혈하여 분석에 이용하였다. 그러나 오골계 특이 유전자구조의 분리양상 파악을 위한 가계는 10가계 80두 이상 확보되었으나 백색산란계 특이 유전자구조의 분리양상 파악을 위한 집단은 가계당 5수 이하의 자손을 얻게되어 분석에 다소의 어려움이 있다. 그러나 F1 모개체당 얻을 수 있는 자손이 10수 내외로 6가계가 확보되어 적절한 유전자 분석을 통해 연관 유전자지도 작성을 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 절 AP-PCR 기법 확립

퇴교배 집단을 이용하여 유전자 지도를 작성하기 위해 오골계와 백색 레그혼간의 차이를 나타내는 게놈부위를 파악하여 이를 표지인자로 이용하기 위해 short oligonucleotide를 PCR(Polymerase Chain Reaction) primer로 사용하는 AP-PCR(arbitrary primed-PCR) 또는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)기법을 적용하고자 하였다. 사용된 oligo primer들은 캐나다의 British Columbia 대학의 Biotech Institute에서 구입하였으며 Williams등(1990)이 제시한 PCR조건과 전기영동조건에 의해 증폭 산물을 관찰하였다. 우선 100여 개의 random primer를 대상으로 오골계와 백색 레그혼의 유전적 차이를 검색하였으며 12개의 유용한 품종 특이 증폭산물을 확인할 수 있었다. 이러한 밴드들은 추후 유전자 지도 작성을 위해 이용될 것이며 여러 육종 집단의 특성 파악에 이용될 수

있을 것이다. Fig. 17은 6개의 random primer를 이용하여 확인된 5가지 닭의 품종의 유전적 변이를 나타낸다. 각각의 primer별로 다른 차별적인 증폭 양상을 보이며 각 품종별로 다른 양상을 보인다. Primer #037, 038의 경우는 매우 높은 다형성을 나타내며 #041의 경우는 5개의 품종에서 동일한 증폭 양상을 보이고 있다. 또한 #042의 경우에는 품종간의 차이를 나타내는 밴드를 찾아볼 수 있다(화살표로 표시). 이러한 방식으로 100개의 random primer에 대한 각 품종별 증폭 양상을 관찰하였고 이들 중 증폭 양상이 재현성이 높고 품종간의 차이를 보이는 13개의 primer를 선별하여 재래닭 특이 표지인자 개발과 유전자 지도 작성을 위한 표지인자 개발에 이용하고자 하였다.

또한 PCR에 의해 증폭 확인된 각 개체별, 품종별 특이 표지인자가 유전적으로 안정되게 분리, 전달되는지 확인하기 위해 Fig. 18에서와 같이 닭의 가계를 이용하여 부모의 증폭 산물이 자손에 안정되게 전이되는지 확인하였다. 밴드 a 와 b는 각각 부개체와 모개체에 특이적인 증폭 산물로서 2개체와 4개체의 자손에 전달되어 나타나는 것을 확인할 수 있다. 따라서 이들 밴드는 부개체와 모개체에 각각 이형 접합자 형태로 존재하는 것으로 판단되었으며 RAPD 기술이 성공적으로 확립되었음을 증명하였다.

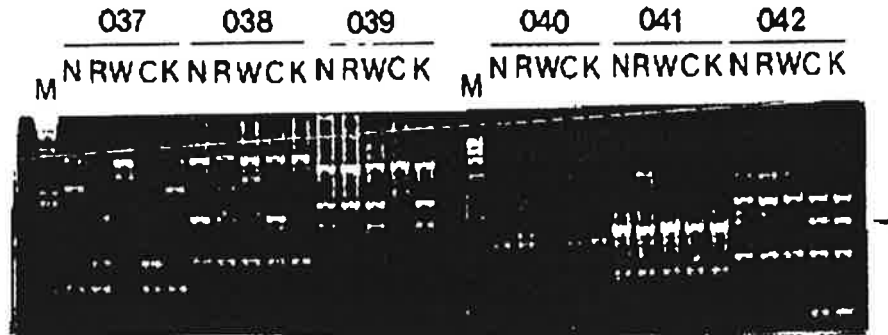


Fig. 17. DNA amplification profiles generated with random primers #037, 038, 039, 040, 041, 042 on five breeds of chickens(N: Korean Native Chicken, R: Rhode Island Red, W: White Leghorn, C: Cornish, K: Korean Native Ogol Chicken, M: lambda DNA digested with Hind III)

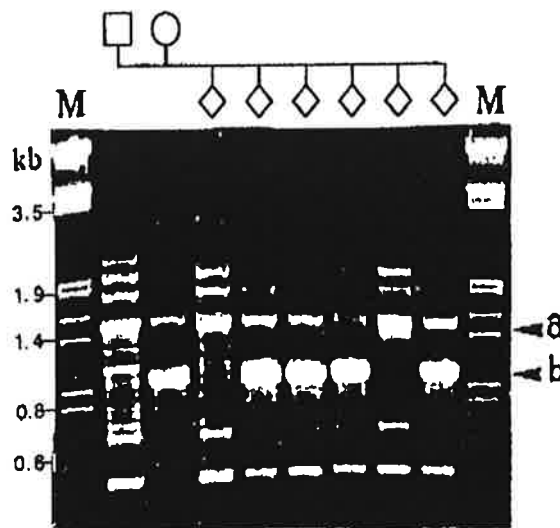


Fig. 18. Segregation of polymorphic RAPD markers in a chicken family with arbitrary primer #384.(◇: offsprings of unidentified sex, M: lambda DNA digested with EcoR I and Hind III)

제 5 절 재래닭 특이 유전인자의 개발

유전다형 관찰방법으로 확립된 AP-PCR기법을 이용하여 재래닭에 특이적인 계놈특성을 파악하고자 품종별 다형을 보이는 13개의 random primer를 이용하여 재래닭에 특이적인 밴드를 관찰하였다. 선택된 다형 primer들 중 2개의 경우 재래닭에 특이적인 밴드의 증폭이 가능하였다. 그러나 이들은 적은 수의 개체를 이용하여 수행된 결과로써 추가적인 연구결과가 보강되어야 할 것으로 사료된다. Fig. 19는 백색레그혼과 로드아일랜드레드, 코니시에서는 나타나지 않고 있으며 6개 계통의 재래닭에 특이적인 증폭산물을 보여주고 있다(화살표로 표시). 이러한 형태의 재래닭 특이 표지인자들은 보다 정확하게 그 특성을 파악하여 재래닭의 특이성을 DNA 수준에서 규명하고자 한다.

1. microsatellite typing 관찰방법 확립

Microsatellite는 포유류를 비롯한 진핵생물의 계놈에 1-6bp의 반복되어 존재하는 염기서열 형태로 계놈의 각 부위에 고르게 산재하는 특성을 가진다(Rassman 등, 1991). 반복 단위의 반복 수의 차이에 따라 대립형질(allele)이 결정되며 반복 수가 많을 수록 확률상 그 반복 수 차이에 의한 대립형질의 수도 많이 된다. 사람을 비롯한 대부분의 microsatellite는 CA/TG 서열의 반복이긴 하나 GA/TC, CAC/GTG, GGAT/ATCC 등의 반복에 의한 경우도 존재한다. 대부분의 척추동물은 10,000-100,000 개 정도의 microsatellite가 존재할 것으로 예상되고 있으며(Litt와 Luty, 1989), 소의 경우는 15,000개 내외(Steffen 등, 1993), 돼지는 65,000-100,000개(Wintero 등, 1992),

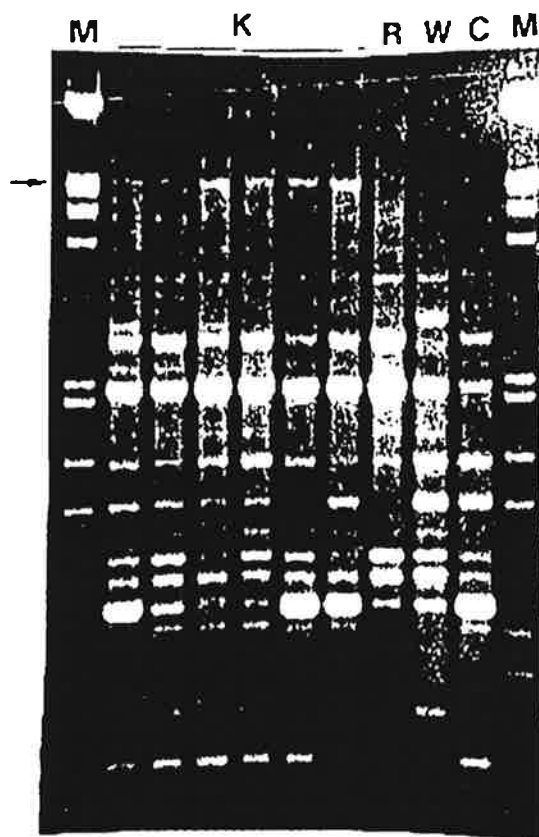


Fig. 19. Amplification profiles specific to Korean Native Chicken generated with arbitrary primer 327. (M: Lambda DNA digested with EcoR I and Hind III, K: Korea Native Chicken, R: Rhode Island Red, W: White Leghorn, C: Cornish)

닭의 경우는 7,500개(Croijmans 등, 1993)내외로 존재하는 것으로 알려져 있다. 닭의 경우 최근의 국제 공동 연구에 의해 660여개의 microsatellite가 개발되어 있는 상태이며 계속하여 그 수가 증가하고 있는 실정이다(Cheng, 1997). 따라서 이러한 개발된 표지 인자를 이용하여 각 집단 유전적 변이 정도를 관찰하면 유전적 구조를 파악할 수 있을 것으로 사료된다. 소의 경우는 친자 감별이나 집단 분석에 직접 이용하고 있으며(Ciampolini 등, 1995), 닭의 상업용 집단에 대해서도 최근 연구 사례가 보고되었다(Croijmans 등, 1996).

본 연구는 이러한 높은 다형성을 가지는 microsatellite를 닭의 연관유전자 지도 작성에 이용하고자 적절한 관찰조건을 확립하기 위해, 우선 공시축의 혈액으로부터 DNA를 추출하고 전기영동과 UV spectrophotometer로 DNA 양을 측정하였다. Microsatellite primer는 닭의 유전자지도 작성을 위해 국제 공동연구에 의해 개발된 microsatellite좌위를 대상으로 10쌍의 primer를 작성하여 이용하였고(Crittenden 등, 1995) 이를 PCR로 증폭하였다.

Fig. 20은 mcw 6에 대해 얻어진 PCR증폭산물을 9% acrylamide gel을 이용하여 증폭양상을 관찰한 것으로 (A)의 경우는 증폭산물을 Ethidium Bromide에 의해 염색된 후 관찰한 것이며, (B)의 경우는 방사선 동위원소를 이용하여 X-ray film을 감광하여 얻어진 결과이다. (A)의 경우 각 품종별 1개체를 사용하였으나 증폭산물 간의 크기 차이를 정확하게 관찰하기에는 어려움이 있다. 또한 (B)의 경우에는 WL DNA에 대해 PCR에 이용되는 양에 변화를 주어 증폭에 미치는 영향을 나타낸 것으로 10ng 정도를 이용하는 것이 적당한 것으로 나타났다. Fig. 20에서 얻어진 형태의 증폭양상은 sequencing gel에서 보다 정확하게 그 크기를 측정할 수 있는데

Fig. 21은 ADL 111에 대해 WL과 오골계, RIR 에 대해 증폭산물의 크기를 결정할 수 있는 증폭양상을 보여주고 있다. 각 증폭산물의 크기는 M13 DNA의 염기서열과 비교하여 결정하였으며 WL의 첫 번째 개체는 132bp와 125bp 크기의 증폭산물을 보이고 있는데 이는 두 allele의 크기가 각각 다르므로 이형 접합자형태이고 OG의 첫 번째 개체는 125bp크기의 band만을 보이므로 동형접합자 형태로 파악된다.

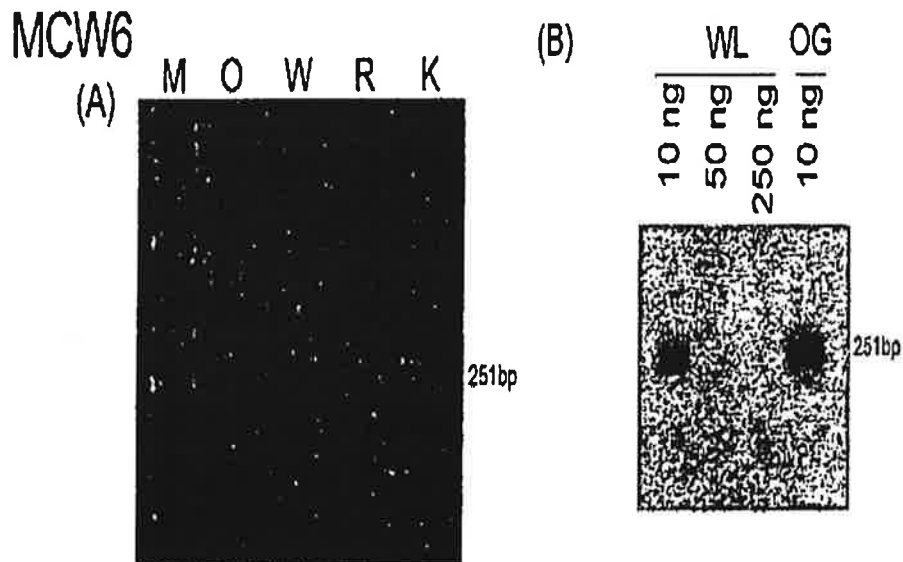


Fig. 20. Amplification of Microsatellite MCW 6 locus on chicken DNA. PCR products were analyzed on 9% acrylamide gel and visualized by Ethidium Bromide staining(A) and detected by incorporated $d\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$ (B). M: pUC 19 Hae III, O(OG): Korean Native ogol chicken, W(WL): White Leghorn, R: Rhode Island Red, K: Korean native chicken

ADL 111



Fig. 21. Determination of allelic state of each individuals using high resolution sequencing gel electrophoresis and autoradiography. PCR amplification were carried out using radioactive dATP and PCR products were analyzed using denaturing 6% acrylamide gel. Size determination of amplified products were performed by comparing with M13 standard sequence. WL: White Leghorn, OG: Korean Native ogol chicken, RIR: Rhode Island Red.

Fig. 22에서는 1차년에 조성된 교배 집단중 하나의 가계를 대상으로 ADL 019로 명명된 좌위를 대상으로 유전자형을 결정한 결과이다. 모 개체는 이형접합자 형태이며 부 개체는 동형접합자로 모 개체의 유전자형중의 한가지만을 보이고 있다. 따라서 이들의 자손에서는 모개체에서만 존재하는 유전자형 a 만 분리되는 것을 볼 수 있다. 이러한 분리양상은 Fig. 23에서 나타난 바와 같이 퇴교배 자손을 이용하여 직접 분리양상을 관찰할 수 있는데 ADL 102의 경우는 WL 부개체와 F1 모개체가 각각 a/b와 a/c의 유전자형을 갖게되므로 자손에서 나타나는 유전자형은 a/a(2/12), a/c(3/12), a/b(5/12),

b//c(2/12) 의 네가지 형태로 나타나고 있다(Fig. 23A). ADL 019의 경우는 WL 부개체가 B//B의 유전자형을, F1 모개체가 A//B의 유전자형을 가지므로 자손은 A//B와 B//B의 형태만을 가지며 각각 8개체와 7개체로 1:1의 분리비와 유사한 비율을 보이고 있다(Fig. 23B).

본 연구의 결과 microsatellite 를 이용하여 연관 유전자지도를 작성하기 위해 PCR증폭조건과 전기영동 조건을 확립하였으며 퇴고배 집단을 통하여 microsatellite좌위가 전이되는 양상을 파악할 수 있었다. 따라서 microsatellite를 이용한 닭의 연관 유전자지도 작성은 가능한 것으로 판단되며 이를 위한 기반기술은 확립되었다고 판단된다.

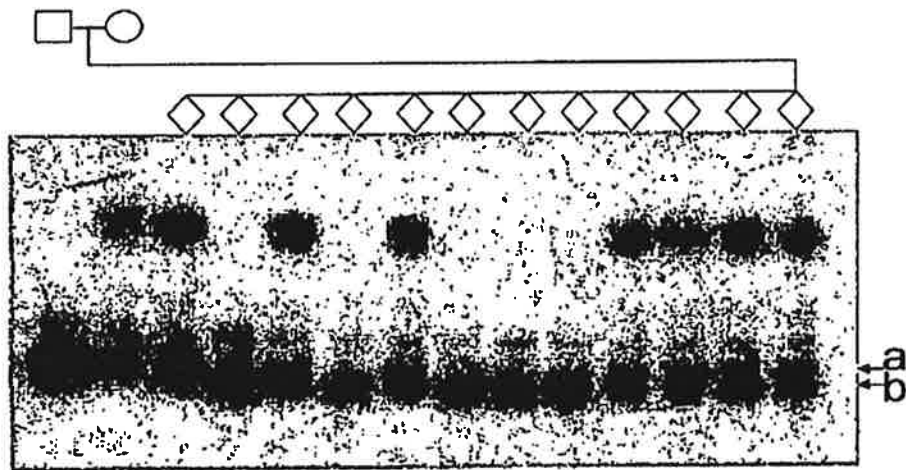
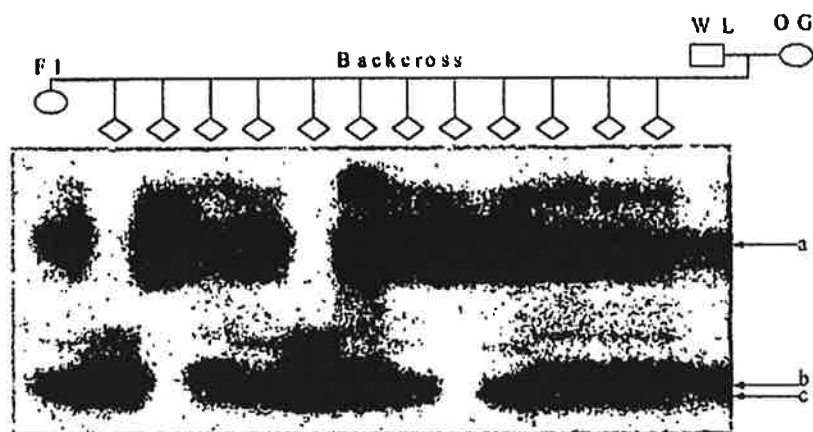


Fig. 22. Segregation pattern of a microsatellite ADL 019 in a crossed family between ogol chicken and white leghorn chicken. W: white leghorn male, K: ogol female, P1-P12: F1 progenies.

(A) ADL 102



(B) ADL 019

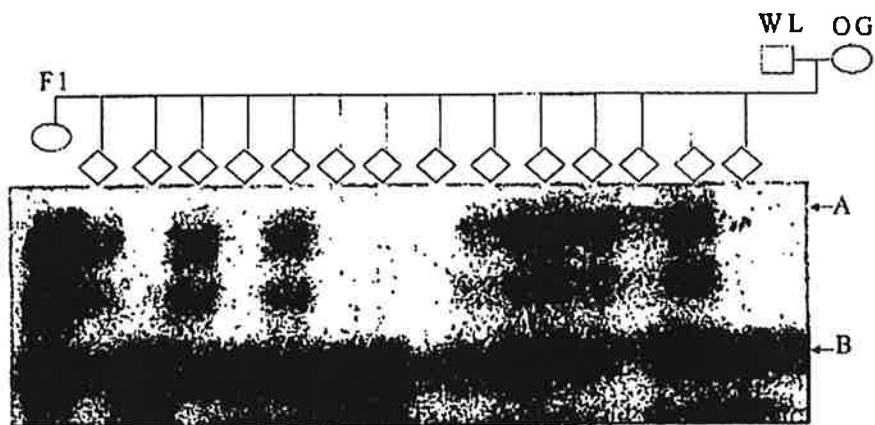


Fig. 23. Segregation pattern of microsatellites ADL 102(A) and ADL 019(B) in backcross families.

2. 조성된 축군에 대한 유전자형 파악

교배를 통해 얻어진 집단에 대해 오골계 특이 표지인자의 전이양상을 확인하고자 개체별 유전자형 파악을 실시하였다. 각 개체별 혈액으로부터 DNA를 추출하고 전기영동과 UV spectrophotometer로 DNA 양을 측정하였다. 백색산란계와 오골계간 증폭양상에 있어서 차이를 보이는 primer들을 대상으로 AP-PCR을 실시하였다.

조성된 퇴교배 집단에 대한 오골계 특이 표지인자의 유전 분리양상 파악을 위해 1차년도에 확보된 1대 교잡종 가계에 대한 전이양상을 파악하였다. Fig. 24는 #392에 의한 오골계 특이 표지인자의 전이양상을 보이는 것으로 백색산란계(W)에서만 나타나지 않고 있으며 오골계에서 나타나는 밴드 a가 자손 전체에서 나타나 동형접합자형태의 유전자형에서 유래되었음을 암시하고 있다. 이러한 형태로 2차년도에서 교배 조성된 퇴교배 집단에 대해 오골계 특이 표지인자의 유전 분리양상을 파악하고자 3개의 표지인자에 대해 퇴교배 집단 내에서의 유전분리양상을 확인하였다. Fig. 25는 WL 부개체와 F1 암컷을 이용한 교잡에 의해 생성된 3개의 가계를 이용하여 오골계 특이 표지인자의 전이양상을 보이고 있다. #115에 의해 나타나는 오골계 특이 밴드는 F1 암컷에만 존재하며 퇴교배 자손들에서 1:1의 분리비에 의해 전이되고 있다(20/40). 따라서 오골계 특이 유전자구조로 파악된 #115에 의해 증폭된 밴드는 오골계의 연관유전자지도 작성에 유용할 것으로 판단된다. 이러한 방식으로 #124와 #392에 대해 분석을 실시하였으며 이후 보다 많은 수의 오골계 특이 표지인자를 이용하여 표지인자간의 연관여부를 결정할 수 있을 것이다.

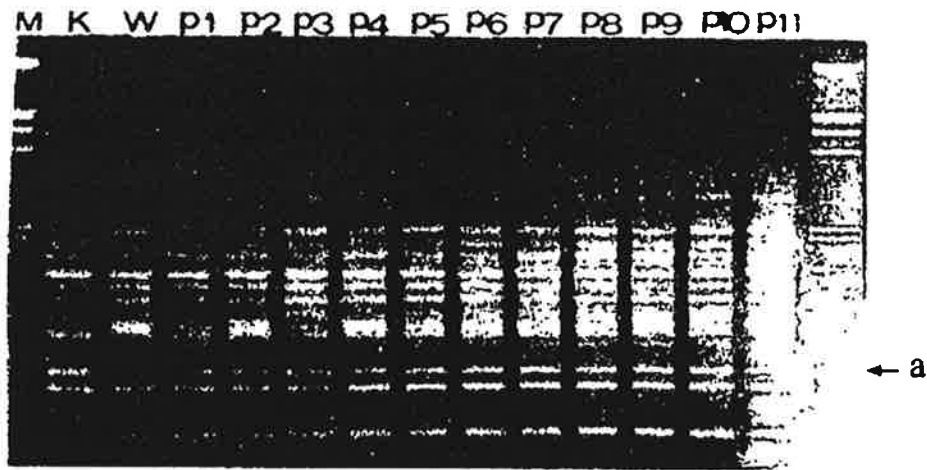


Fig. 24. Segregation pattern of a ogol-specific RAPD marker from #392 in a family consisted with ogol male(K), white leghorn female(W) and their 11 progenies(P1-P11).

#115

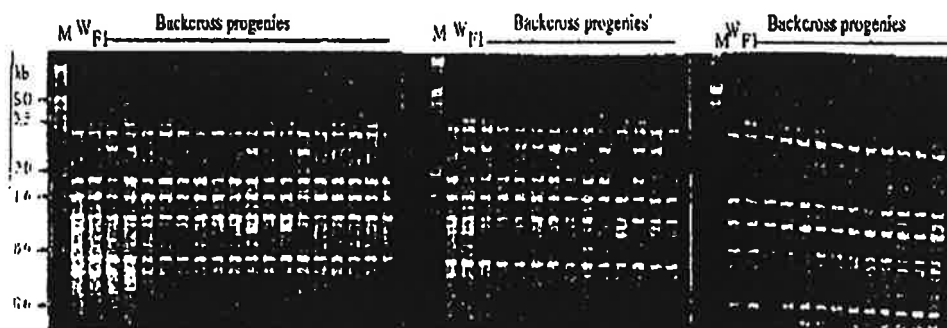


Fig. 25. Segregation of the polymorphic RAPD markers in the KNOC backcross population with primer #115. M:lambda DNA Hind III/Eco RI, W: WL male, F1: female offspring of the mating between WL and KNOC.

3. 재래닭 특이 표지인자의 특성파악

1차년도에 잠정적으로 개발된 재래닭 집단 특이적인 표지인자에 대한 특성을 파악하기 위해 각 집단의 개체별 DNA를 대상으로 특이 밴드의 빈도를 파악하였다. #327에 의한 경우는 개체별 DNA를 대상으로 점검한 결과 Cornish개체와 RIR의 일부개체에서 동일 밴드가 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 재래닭에서만 나타나는 특이성을 가지지 못하는 것으로 판단되었다.

Fig. 26은 #399에 의해 나타난 재래닭 특이 표지인자로서 각각 10개체를 혼합하여 대표하였다. K1-K6은 재래닭 6계통을 나타내며 외래종으로 로드종(R), 백색산란계종(W), 백색코니시종(C)을 포함하고 있다. K2를 제외한 재래닭 5계통에서 집단 특이적인 밴드가 증폭되어 나타나고 있으며(▶ 로 표시) 이를 Fig. 27에서와 같이 각 집단별 5개체의 DNA를 이용하여 대략적인 출현빈도를 확인하였다. 전체 6계통 30마리중 25개체에서 특이 밴드가 나타났다.

4. 개발된 재래닭 특이 유전인자의 미세 특성 파악

1, 2차년의 연구수행 결과에 의해 파악된 재래닭 특이 표지인자를 대상으로 하여 단편을 cloning하고 그 특성을 파악하고자 하였다. 각 개체별 혈액으로부터 DNA를 추출하고 전기영동과 UV spectrophotometer로 DNA 양을 측정하였다. 품종간 증폭양상에 있어서 차이를 보이는 primer들을 대상으로 AP-PCR을 실시하였다. 반응액은 1X reaction buffer(50mM KCl, 10mM Tris-Cl(pH 8.2), 1.5mM MgCl₂ 0.01% triton X-100;Sigma, 100ng genomic DNA, 200μM dNTP, 0.2 μM primer, 1 unit Taq DNA polymerase를 넣고 최종 volume 을 25μl로 맞추었다. 준비된 반응액은 95℃에서 5분간

유지하여 주형 가닥을 분리시킨 다음, 94℃에서 1분, 39℃에서 1분, 72℃에서 2분의 양상으로 50회 반복한 다음, 마지막으로 72℃에서 7분간 보상증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, UV상에서 band pattern을 관찰하였다. 2차년에 일부 그 특성이 파악된 #396-830bp 단편에 대한 분석을 그 목표로 하고 있다. 재래닭 특이 단편은 1.5%의 agarose gel로 부터 절단 분리하여 GeneClean kit(Bio101 Co., USA)를 이용하여 정제한 후 T가 붙어 있는 vector를 이용하여 ligation 시킨 후 E. coli 세포에 전이하여 증폭하였고 이 후 plasmid DNA를 분리하여 이용하였다.

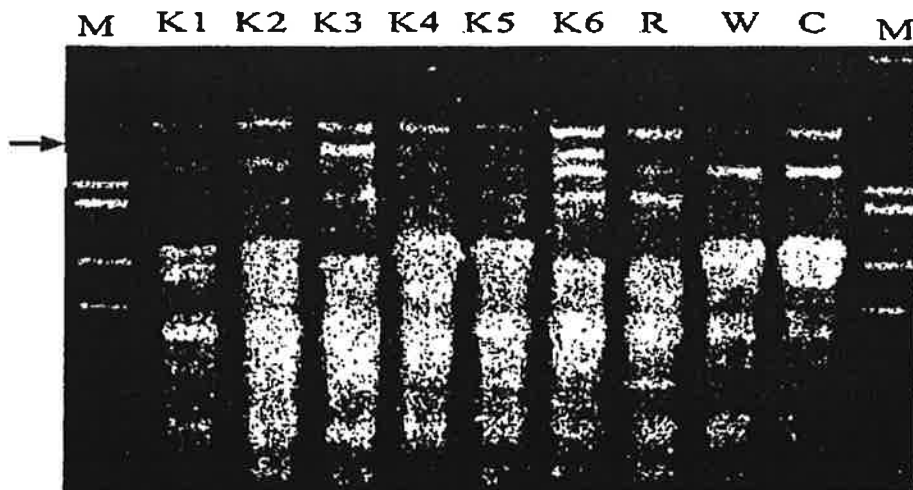


Fig. 26. Random amplified polymorphic DNAs analysis of Korean native chicken population and foreign breeds with arbitrary primer #399. Each lane represents 10 individuals of a breed or a population. M: lambda DNA digested with EcoR I and Hind III, K1-K6: Korean native chicken populations, R: Rhode Island Red, W: White Leghorn, C: White Cornish

#399

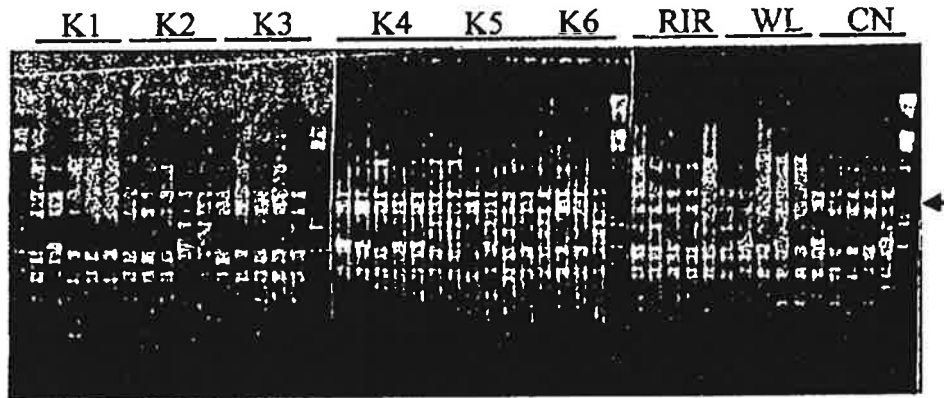


Fig. 27. Random amplified polymorphic DNAs analysis of Korean native chicken population and foreign breeds with arbitrary primer #399. Each lane was presented at individual level. M: lambda DNA digested with EcoR I and Hind III, K1-K6: Korean native chicken populations, RIR: Rhode Island Red, WL: White Leghorn, CN: White Cornish

Fig. 28은 재래닭 특이 표지인자로 확인된 #396-830bp을 plasmid vector pGem-T에 클로닝한 결과이다. 특이 표지인자가 적절하게 플라스미드에 ligation되었으며, 이를 이용하여 염기서열을 결정할 수 있는 것으로 파악되었다.

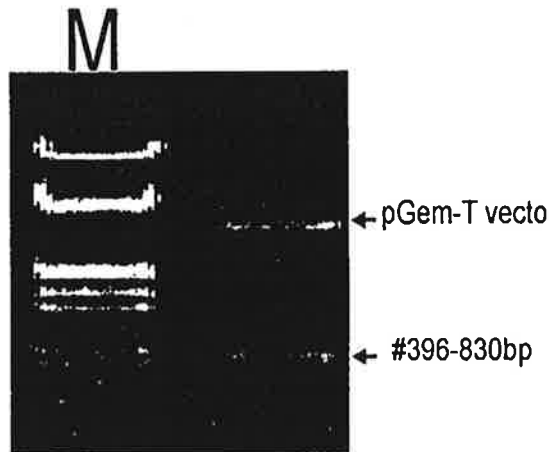


Fig. 28. Cloned fragment #396-830 showing breed specificity for Korean Native chicken. Purified DNA was ligated into pGem-T vector in modified enhanced condition. M: lambda DNA digested with Hind III/EcoRI.

또한 #396-830bp가 품종 특이적으로 존재하는 지 여부를 보다 정확하게 판별하기 위해 클로닝된 단편을 ^{32}P -ATP 로 표지하여 써던 hybridization을 실시하였다. 이를 위해서는 우선 RAPD에 의한 각 개체별 산물을 1.5% agarose gel에서 분리한 후 southern분석을 실시하였다. 한편 클로닝된 품종특이 단편의 특성을 파악하기 위해 genomic DNA를 대상으로 southern분석을 실시하였으며, 이를 통해 품종별 차이여부와 반복성 여부를 결정하였다. PCR 산물 또는 각각의 genomic DNA 10 μg 을 Hind III로 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 완전히 단편화시켜 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 0.25N HCl에 10분간 방치하고 증류수로 2회 washing 후, 변성용액(0.5N NaOH; 1M NaCl)에 넣고 60분, 중화용액(1.5M NaCl; 0.5M Tris-Cl, pH7.4)에

넣고 30분간 천천히 shaking하였다. 20XSSC를 transfer buffer로 하여 3MM paper에 gel을 놓은 후 gel 위에 Nylon membrane을 놓고 다시 3MM paper를 3장정도 놓은 후 paper towel을 놓고 blotting을 하였다. 클로닝된 품종특이 단편 #396-830bp를 제한효소를 사용하여 vector로부터 insert를 잘라 내고 low melting agar를 이용하여 추출하였다. Probe의 표지는 random priming 방법과 nick translation방법에 의해 실시하였다. Membrane을 prehybridization solution(0.3M phosphate buffer; 1mM EDTA; 7% SDS; 1% BSA)에 넣고 65°C에서 3시간 정도 shaking하면서 prehybridization시킨 후 probe를 넣고 65°C에서 18시간 정도 shaking하면서 hybridization시켰다. Washing solution I (0.25M phosphate buffer; 1% SDS)과 Washing solution II (2XSSC; 0.1% SDS), Washing solution III (1XSSC; 0.1% SDS)로 65°C에서 각각 15분간 washing하였다. Washing이 끝난 membrane위에 X-ray film을 놓은 후 intensifying screen에 넣어 -70°C에서 24시간에서 72시간 정도 감광하였고, 감광이 끝난 X-ray film에 현상, 정지, 고정액을 처리하였다.

Fig. 29은 다섯가지 품종에 대한 #396-830bp단편에 대한 상동성을 갖는 단편의 존재양상을 나타내고 있다. 이는 RAPD양상과 동일한 개체들에서만 상동성을 가지는 단편이 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 단편 #396-830bp는 재래종에서만 품종특이적 빈도를 보이는 유용한 표지인자임이 입증되었으며, southern분석을 통해 보다 정밀하게 증명되었다.



Fig 29. Autoradiography of hybridized RAPD products with cloned breed specific fragments. Amplified fragments of 4 individuals per breed were resolved in 1.5% agarose gel, transferred onto nylon membrane, then hybridized with radioisotope labeled DNA probe. Isolated cloned fragment #396-830bp was used as a probe for hybridization with the fragments of nylon membrane obtained with primer #396.
O: Korean Native Ogol Chicken, W: White Leghorn, R: Rhode Island Red, C: Cornish, K: Black Korean Native Chicken

이와 더불어 Fig. 30은 genomic DNA를 대상으로하여 품종특이적을 증폭양상을 보이는 부위의 반복성과 품종간의 다형성을 파악하고자 실시한 genomic southern분석 결과이다.

#396-830bp

O W R C K



Fig. 30. Hybridized patterns of fragments #396-830bp with digested genomic DNA with Hind III. Only single identifiable bands were obtained indicating both fragments are derived from non-repetitive sequences of chicken genome. O: Korean Native Ogol Chicken, W: White Leghorn, R: Rhode Island Red, C: Cornish, K: Black Korean Native Chicken.

Hind III로 절단된 단편에 대한 표지된 단편의 결합 양상으로 각 품종별로 5개체의 DNA를 대상으로 하여 실시된 결과이다. 각 품종별로 단일 단편에 대해서만 상동성을 가지는 것으로 나타나 #396-830bp는 계놈내의 단일 좌위에 존재하는 부위에서 유래한 것으로 추정되었다. 이는 품종간 차별적 증폭양상을 보이는 좌위에 있어서 유전적으로 기능성 부위에 해당될 가능성이 있는 것을 의미한다. 따라서 추후의 cDNA수준에서의 확장된 연구에 의해 유용 유전자의 개발 가능할 것으로 판단된다. 그러나 품종간의 제한효소 인식 좌위 차이에 의한 단편크기의 다형성은 재래종에 대해 특이성을 보이지 않았다. 따라서 RFLP에 의한 재래종 구분은 불가능할 것으로 나타났다. 그러나 오플계와 다른 로드종, 코니시종은 서로 다른 단편 크기를 보여 부분적으로 품종 구별에 유용한 표지가 될 수 있을 것으로 판단된다.

마지막으로 품종특이 단편 #396-830bp에 대한 특성을 파악하기 위하여 준비된 plasmid DNA를 대상으로 Sanger법에 의한 염기서열을 결정하였으며 결정하였다. Fig 31은 클론된 단편의 부분 염기서열을 나타내며(a) 상동성을 나타내는 서열을 제시하였다.

각각은 부분 염기서열을 나타내고 있으며 GenBank상의 상동성을 보이는 염기서열의 종류를 제시하고 있다. 그러나 제시된 상동서열들은 가축에서는 나타나지 않았고 특히 조류에서는 밝혀진 염기서열이 존재하지 않았다. 따라서 분리된 재래닭 특이 표지인자는 닭에서는 밝혀지지 않은 새로운 유전인자인 것으로 나타났다. 그러나 염기서열 단편의 크기가 200bp내외로 한정되었을 뿐 아니라, 상동성을 보이는 보이는 부위의 범위가 50bp 이내로 나타나, 보다 긴 단편을 대상으로 염기서열을 결정하여 상동성 검색을 실시하여야 분리된

(a) Determined sequences

- forward strand
 (Vector)-GAATGCGAGG(primer)-ACTGGGAAGGAAATGCCGCTTGCT
 GCTGAGAATGGTTGATTTTACTGTGGAATTACAAATATACTATTTG
 TATATTACTATTCTTTAGTAAGAAGGAGATTATAGGAAGTTCTCTT
 TTATTTTCCTTC

-reverse strand
 (Vector)-GAATGCGAGG(primer)-TATGACACTATTTTTACTGGTGAC
 AGCAAATCTACTTAGATATGCAAACACCCAGTAAGCATATCAA
 ACTGCAGGATACCACATTGCTCCCGTCAAATTCGAAGATCAGAGCTTCCA

(b) Related sequences

- forward strand

1. *Cyanophora paradoxa* cyanelle, complete genome, 65%
2. *Drosophila melanogaster*(subclone D26 5_g4 from p1 DS06238) DNA sequence, 69%
3. Human TBP-associated factor mRNA, 71%

- reverse strand

1. *Caenorhabditis elegans* cosmid F28H7, 60%
2. Bacteriophage LL-H ORF 109F, integrase, etc, 74%

Fig. 31. Sequences of partial portion of cloned fragment #396-830bp(a) and its related sequences in GenBank(b).

단편의 특성에 대한 결론을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다. 그러나 본 연구에 의해 얻어진 #396-830bp 단편은 재래종에 특이적인 증폭양상을 보일 뿐 아니라, 닭의 계놈내에 비반복적으로 존재하여

기능성 유전인자일 가능성이 높게 나타났으며, 현재까지 알려진 유전자들중에는 동일한 서열이 존재하지 않아 새로운 유전인자가 개발된 것으로 확인되었다. 따라서 재래종 특이 유전인자의 개발이 성공적으로 수행되었다.

제 6 절 퇴교배 집단에 대한 microsatellite typing

Microsatellite는 소, 돼지와 생쥐, 사람을 비롯하여 현재 진행중인 동물 유전체 연구와 유전자지도 연구에 있어 가장 기본적인 표지인자로 인정되어 개발·확립되어 닭에 있어서도 600여개 이상이 개발되어 있는 것으로 보고되고 있다(Cheng, 1997; Groenen 등, 1998). 따라서 본 연구 그룹은 닭의 유전자 지도를 효율적으로 작성하기 위해서 오골계와 백색산란계간의 차이를 보이는 RAPD유전 표지인자를 퇴교배 집단에 대해 유전자형을 파악하며 이를 microsatellite 좌위를 기준으로 한 유전자지도상의 위치를 결정하기 위해 20좌위의 기준 microsatellite 좌위를 선별하여 퇴교배 집단에 대한 microsatellite의 유전자형 결정을 시도하였다. 우선 이미 보고된 primer의 염기서열을 바탕으로 30좌위를 대상으로 30쌍의 PCR primer를 제작하였으며 일부 primer들에 대해 Automatic DNA sequencer를 이용한 유전자형 판별을 위해 형광 표지를 실시하였다. Table 14은 선별된 좌위와 이들의 염색체 상의 위치와 PCR primer

의 염기서열을 나타내고 있다.

따라서 준비된 primer를 바탕으로 각 좌위별 적정 유전자형 판별 조건을 설정하였다. 우선 각 좌위별 최적 증폭조건을 설정하고자 primer의 융합 온도와 Mg이온의 농도의 변화를 주어 증폭양상의 변화를 관찰하여 증폭의 효율성을 점검 하였다. 또한 각 좌위별 증폭산물의 크기에 따른 적정 전기영동 조건과 퇴교배 집단의 암수 부모 개체에 대한 다형여부를 점검하고자 30개 좌위에 대해 예비실험을 실시하였다.. 준비된 primer들을 바탕으로 21좌위에 대한 부모 개체들간의 다형성을 확인하였으며 이들의 정밀한 증폭조건을 설정하였다. Fig 32는 퇴교배 집단 조성시 이용된 백색산란계의 수컷과 오골계와의 1대 자손 암컷에 대한 각 좌위별 증폭조건 확인과 다형성 여부를 점검하기 위해 실시된 실험 결과이다.

ADL 144와 231의 경우는 증폭산물이 적절치 않거나 퇴교배에 이용된 개체들간의 단편의 크기차이를 보이지 않았다. 따라서 이들 좌위는 일단 분석에서 제외하였으며 ADL 154와 190, 191의 경우는 증폭산물과 다형성이 모두 적절하긴 하였으나 각 좌위별로 특징적인 차이점을 보이고 있다. 154에 의해 나타난 밴드 a와 c는 백색산란계 수컷에서 나타나고 이의 교잡된 암컷자손에서는 밴드 b와 a가 나타나고 있다. 따라서 교배에 이용된 오골계의 유전자형은 밴드 b/b를 가진다는 것을 알 수 있다. 좌위 190과 191의 경우는 교잡된 암컷자손에서 각각 백색산란계와 공통밴드 d와 h를 가지고 있으나 각 개체별로 밴드차이를 나타내고 있어 오골계의 유전자형이 이형접합 형태이며 백색산란계에서 나타나지 않는 밴드 e와 g가 오골계에서 유래되었음을 나타낸다. 또한 교잡 암컷 3수에 대해 동일한 양상을 보이지 않을 뿐 아니라 백색산란계 수컷과 동일한 밴드 양상을 보이

고 있으므로 이들간의 교배에 의해 생산된 퇴교배 자손에서의 밴드의 분리양상을 관찰하는 것은 불가능한 것으로 판단되었다. 따라서 각 좌위에 대한 예비적인 증폭양상의 관찰과 다형성여부의 확인은 microsatellite를 이용한 연관 유전자 지도 작성을 위해 필수적인 것으로 여겨지며 이를 위해 다수의 좌위에 대한 예비 검색을 실시하였다.

또한 각 좌위별 증폭양상과 다형성이 확인 검증된 경우의 좌위에 대한 검색을 위해 좌위 ADL 136을 비롯한 6좌위에 대한 퇴교배 자손의 유전자형을 관찰하였다. Fig. 33은 ADL 136 을 대상으로 한 유전자형 분리양상을 관찰한 것이다. 백색산란계 수컷과 이의 교잡 자손 3수를 대상으로 확립된 40수의 퇴교배 자손에서의 유전자형 분리양상을 관찰하였다.

Table 14. Selected chicken microsatellites and its related information from international mapping group

LOCUS NAME	Linkage group	Length	Forward Primer	Reverse Primer
ADL134	1	123	FAM TTC CAT AAG CCA TCA ATC AG	TTT TCC TCT CCC TCC ATT TT
ADL019	1	104	FAM TGC TGC CTA GAC CAG TTC AA	TCT GCT GGG ATT ATG TGT CA
ADL037	1	178	HEX ATG CCC CAA ATC TCA ACT CT	TCT CTA AAA TCC AGC CCT AA
ADL024	2	145	TGA AGC AAA AAC CCA GCA AG	GTT CCA TTA CAG AGT GAG GT
ADL127	2	148	HEX GAA CCA GCA ATT ATA TTA AAT A	TTA ACA CAA AAG AAC CAG GCA G
ADL115	2	109	HEX GGA TGA GAA GAA GAA AGG CA	CAA TGG TGG TTC AGG TAA TC
ADL143	5	168	HEX CCT GTC TCT GGT CTT TAT CC	AGT TTA CTT CCT TTT CTT GC

LOCUS NAME	Linkage group	Length	Forward Primer	Reverse Primer
ADL145	5	116	HEX CGT GGT GTT GTG TAT CAT TT	CTC TTT TGC AGT CCT CCT AC
ADL136	5	145	HEX TGT CAA GCC CAT CGT ATC AC	CCA CCT CCT TCT CCT GTT CA
ADL176	6	192	FAM TTG TGG ATT CTG GTG GTA GC	TTC TCC CGT AAC ACT CGT CA
ADL197	6	102	TET TTT TCT GGT TTT CTT TGG AA	TCT AAC AGG GGA AGG TAT GC
ADL157	6	156	TET CTC TGT CAG GAA GGG GTG TA	GTG CCT GTC CTC TGT TTC AT
ADL187	7	101	TET AAT TGT TTG TTT ACG CTT CT	GCT GGT GGC ACA GAT GAG AG
ADL034	11	126	AAC CTA AAA ACT CCT GCT GC	GGG AAC CTG TGG GCT GAA AG
ADL036	11	288	GTT TGG CTT ACA TTT ATT AT	TTT TTA GGA GTT ATT TGA CA
ADL195	15	118	FAM AGA TGG AAG ACA GGA CAA AT	TAG CAC AGA CAA TGT TAT GC
ADL122	15	228	FAM TGA AAT ACC AAG GCA TCT GT	TGG CTA AGA AAG TGG AAC TG
ADL101	15	171	FAM CCC CAA GGA GAA CTG ATT AC	GAA AAG TGA AAA CGC AAA CA
ADL102	29	122	FAM TTC CAC CTT TCT TTT TTA TT	GCT CCA CTC CCT TCT AAC CC
ADL106	29	150	HEX CAT TCT CTG ATT CTG CCT TT	AAC TCC TGG TGT GCT ACA AA
ADL210	30	130	FAM ACA GGA GGA TAG TCA CAC AT	GCC AAA AAG ATG AAT GAG TA
ADL123	30	135	HEX GCT GTG TCA AGA TTA GAA TCA C	AAC AAT GAA AAA CAC TAC CTG A
ADL118	35	163	FAM GAT CAC TCT TAG ATG CCA CA	AGA GAG GGG TTA CAA GGC TG
ADL191	36	142	HEX AAA GGA AAG CCT ATG TGA AT	AAA GCA CCA AGC GAG ATA CA
ADL132	36	187	HEX GCT GTT TCT AAG CCA TCT TC	CCA CTT GGA AGT AAT CTC CT
ADL105	42	232	HEX CAT TCC GTG CTC AAC TTC AA	CCC AAA CGC TGC TCT TGC TG
ADL171	43	104	TET ACA GGA TTC TTG AGA TTT TT	GGT CTT AGC AGT GTT TGT TT
ADL147	48	211	TET CTG GTG AAT GAG AAG CGA TG	GCT GCG GCA ATA AAC TCC CT
ADL117	Z	184	FAM TCT TGT TTT CCT TTT GTT GT	GCA TAC GGC TCC TTC AGT TG
ADL201	Z	140	HEX GCT GAG GAT TCA GAT AAG AC	AAT GGC TGA CGT TTC ACA GC

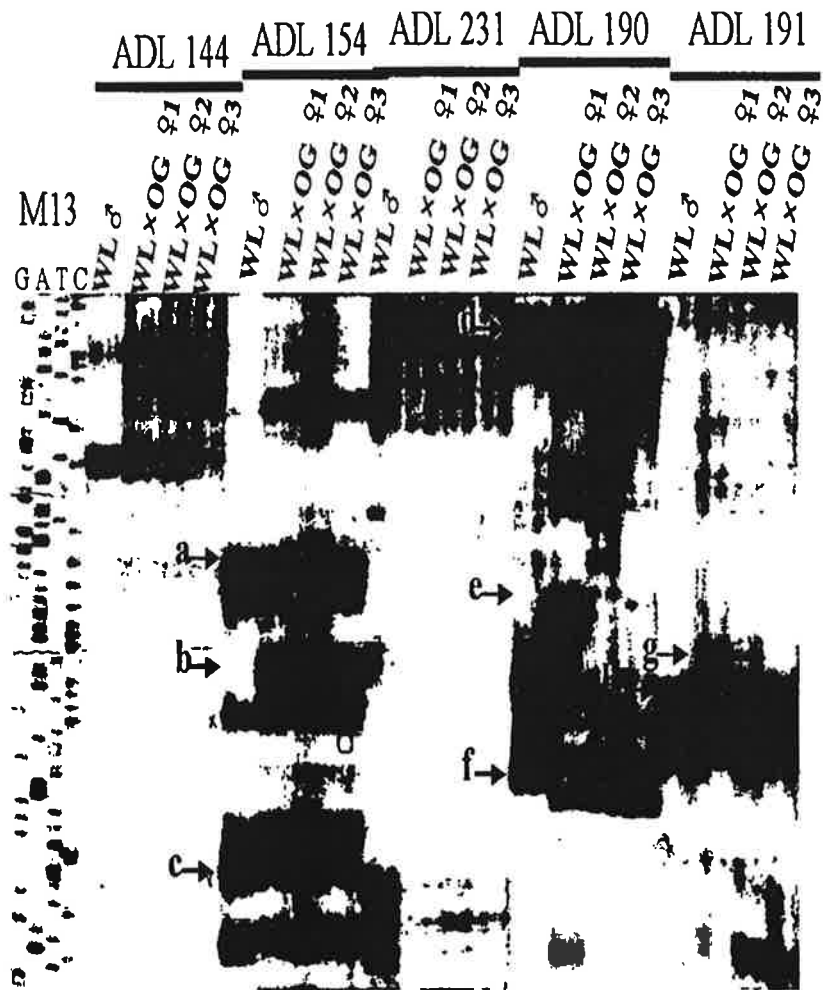


Fig. 32. Autoradiography of 5 amplified chicken microsatellites. Each locus was selected according to its map position, then, amplification patterns and polymorphisms between WL male and its F1 females were checked for further backcross genotyping.

밴드 b는 퇴교배 자손 38두 중 17두에서 나타나 멘델의 유전법칙에 적합한 분리양상을 보였으며 밴드 a는 부모 개체들에서 공통으로 존재하여 모든 자손 개체에서 공통적으로 나타남을 알 수 있다.

또한, microsatellite좌위를 보다 간편하게 분석하기 위해 automatic DNA sequencer를 이용한 증폭산물을 관찰하고자 형광염색 표지된 PCR primer를 준비하였다. 준비된 primer들은 증폭산물의 증폭양상과 목적 단편의 증폭량에 대한 수준을 파악하고자 각각 예비적인 증폭실험을 실시하였다. Fig 34는 16개의 형광표지된 microsatellite primer를 이용하여 증폭하여 관찰한 전기영동 양상이다. 9개의 좌위에서 검출가능한 수준의 증폭산물을 얻을 수 있었다. 또한 이들 좌위에서는 각각 백색산란계와 이의 교잡자손 암컷간의 차별적인 밴드 양상을 나타내었으며 유전자좌의 연관분석에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

형광표지된 primer를 이용하여 microsatellite를 관찰하는 것은 방사능 동위원소에 의해 표지된 dNTP 를 이용한 검출법에 비해 매우 효율적으로 수행될 수 있을 뿐 아니라, 방사능 동위원소 사용에 의한 위험이 감소되며, 다수의 시료를 단기간에 걸쳐 분석가능한 장점이 널리 알려져 있다. 또한 primer의 5' 말단에 형광을 부착시킨 형태의 분석방법은 방사능을 가진 dNTP 를 합성분자내 삽입하는 방법에 비해 정확도를 높일 수 있다. 이는 전자가 전기영동에 의한 단편의 크기 결정시 단일 가닥에 대한 이동여부만을 파악하는데 비해, 후자는 방사능이 삽입된 이중 가닥의 단편을 동시에 고려하여 분석하여야 하므로 DNA가닥간의 이동속도 차이에 따른 실험상의 오차가 나타날 수 있다. Microsatellite 와 동시에 백색산란계와 한국오골계간의 차이를 보이는 RAPD밴드의 유전적 분리양상은 2차년도

에 관찰한 바와 마찬가지로 다수의 밴드를 대상으로 퇴교배 집단내의 분리 양상을 관찰하고자 연구를 수행하였다. Fig 35는 primer #351과 392에 의해 증폭된 오골계 특이 밴드의 퇴교배 집단내에서의 유전분리양상이다. 백색산란계에서는 나타나지 않은 밴드 a와 b가 1대 교잡자손에서는 나타나고 있으며 이들은 퇴교배 자손에서도 안정적으로 분리되고 있음을 관찰할 수 있다.

오골계에서 나타나는 품종 특이 RAPD단편은 앞서의 microsatellite와 다소의 차이점을 갖는데, 알려진 바와 같이 RAPD에 의한 개체간의 유전적 변이는 microsatellite좌위에 대한 경우에 비해 낮게 나타났는데, Fig 35에서 보는 바와 같이 F1 암컷에서 공통적으로 동일한 밴드 양상을 보이고 있다. 이는 microsatellite 좌위에서 나타난 개체간의 차이가 보다 적게 나타나고 있기 때문으로 생각된다. 또한 microsatellite 좌위에서는 오골계와 백색산란계가 공히 이형접합자율이 높는데 비해 RAPD 다형 표지인자의 경우는 동형접합자율이 높은 것으로 나타났다. 따라서 RAPD에 비해 microsatellite 좌위에서는 백색산란계에만 존재하는 밴드에 대한 분리양상도 재조합을 판별에 이용될 수 있으므로 보다 정확한 유전자지도 작성이 가능할 것이다. 이에 비해 RAPD 표지인자가 갖는 장점은 적은 노력으로 오골계와 백색산란계간의 차이를 보이는 밴드를 관찰할 수 있을 뿐 아니라 관찰방법이 agarose gel을 이용하므로 microsatellite에 비해 손쉽다는 장점을 가지는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 이들 두 가지의 서로다른 형태의 유전적 다형 관찰 방법을 바탕으로 유전자지도 작성을 수행하여 연구의 효율성을 높일 수 있다.

ADL 136

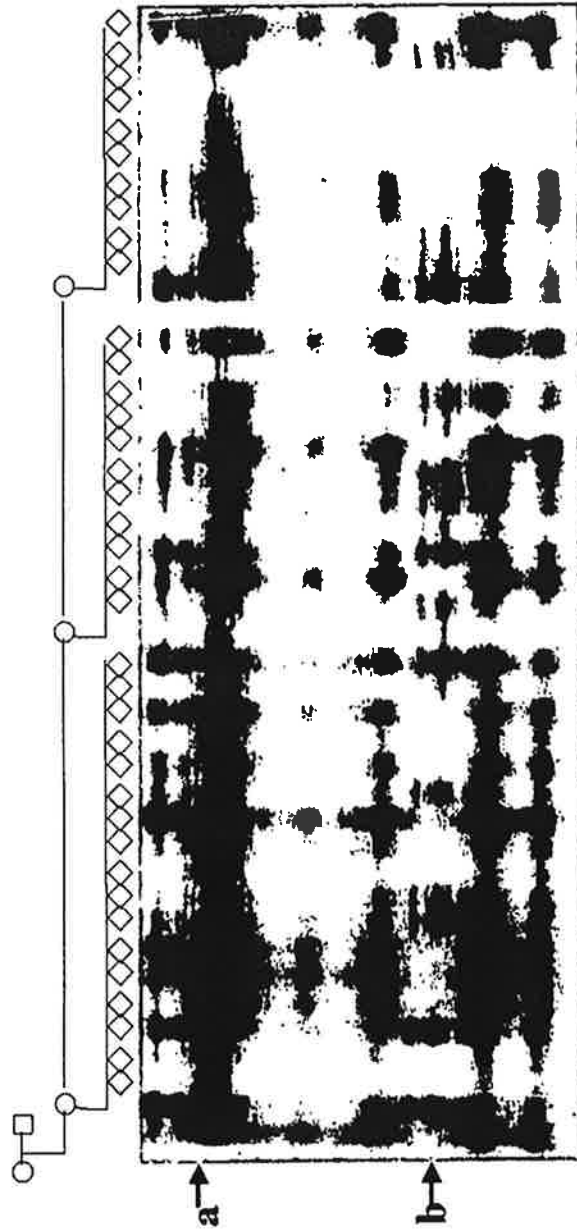


Fig. 33. Segregation pattern of microsatellites ADL 136 in backcross families. All the three hybrid female individuals shows specific band b which derived from KNOC female individual. Seventeen from 38 progenies showed band b and it were scored for linkage analysis.

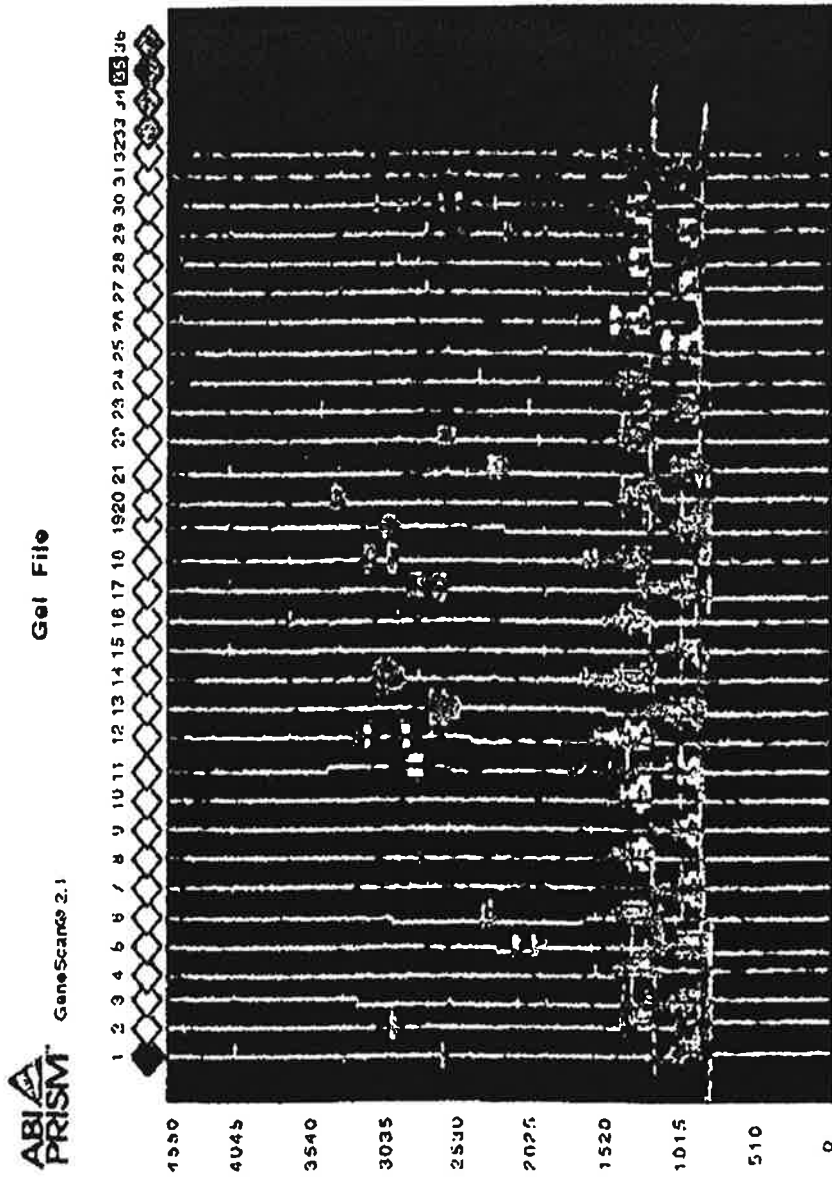


Fig. 34. Amplified pattern detected with automatic DNA sequencer ABI 377(Perkin Elmer Co.)
 Amplified products were mixed with internal lane standard for its size determination

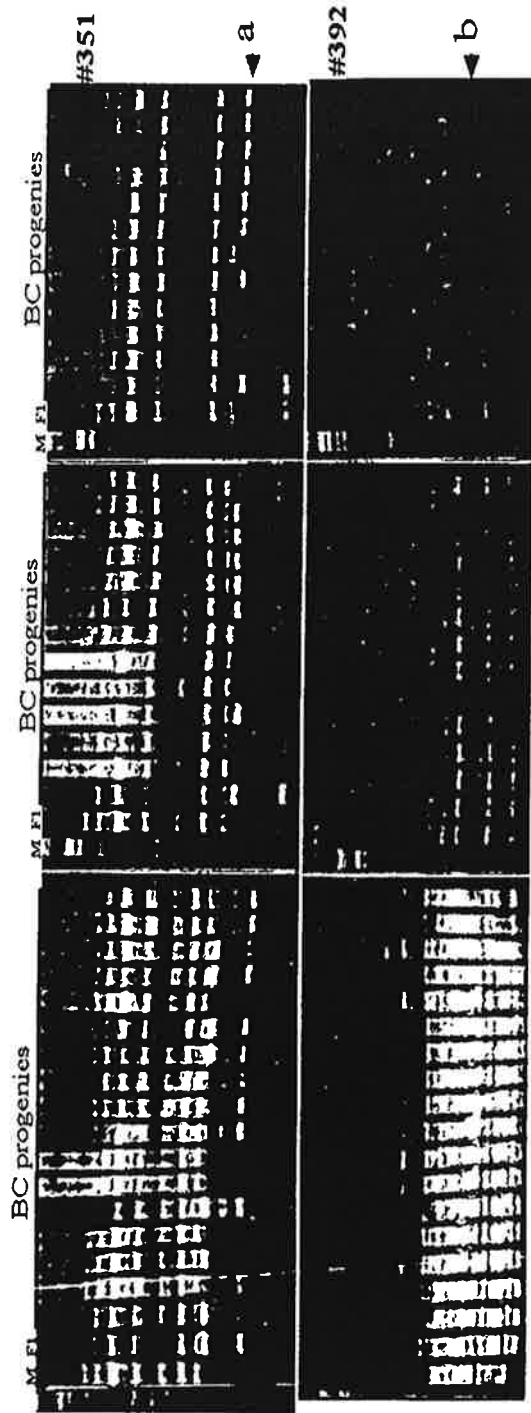


Fig. 35. Segregation of the polymorphic RAPD markers in the KNOC backcross population with primer #351 and #392. M: WL male, F1: female offspring of the mating between WL and KNOC, BC progenies: backcross progenies between M and F1.

제 7 절 개발된 유전인자의 연관분석

1. 연관지도의 작성

Microsatellite와 RAPD에 대한 유전자형의 파악이 완료된 21개 좌위를 이용하여 유전자 지도 작성을 실시하기 위해 MapMaker 프로그램을 이용하여 연관 검정을 실시하였다. 유전자형이 얻어진 21개 좌위를 바탕으로 유전자좌간의 연관여부를 실시하였다. 2점간의 연관분석을 실시하였으며 Cosambi mapping function을 이용하였다. Fig 36는 MapMaker(Ver 2.0) 분석에 이용된 각 개체별 유전자형을 나타낸다. 각 개체별 유전자형을 일련되게 나타내었으며 MapMaker에 의해 분석되었다.

Table 15는 21개 좌위를 바탕으로 얻어진 재조합율과 LOD 값을 나타내 주고있다.

표지인자 R327a와 R392간의 0.21의 재조합율이 관찰되었고 2.31의 LOD 값을 보이고 있다. 또한 R124a와 R159의 경우는 보다 낮은 재조합율과 높은 LOD값을 보여 동일 염색체에 존재하는 것으로 나타났다(0.11, 4.29). 또한 이들과 더불어 R013도 동일 연관그룹으로 존재하는 것으로 나타났다. 이들 외에도 R114a-R301a-ADL032, R497-ADL136-MCW04, ADL 171-ADL154-R114c 등이 각각의 연관그룹을 형성하는 것으로 나타났다.

```

data type f2 backcross
40 21 0

•R013 AAHHAAAHHHHAHAAAAAAHAAHAAHHHHHAHAAHAAHH
•R114a HHAHHHAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R114c AAHHHHAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R115 HHAHHHAAAHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R124a HHAHAAHAAAAHHAA-AHHAAHAAAAA-----
•R147 AHHHAAAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R159 HHAHAAHAAAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R167 AAHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R301a HHAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R327a HHHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R327b HHHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R351 HAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R392 AAHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R490 HHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•R497 AAAAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•MCW04 AAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•ADL154 HHAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•ADL171 HHAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•ADL190 AHHHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•ADL032 AAAAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH
•ADL136 AAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAHAAH

```

Fig. 36. F₂ backcross data of 21 RAPD and microsatellite markers for inputing to Mapmaker computer program. The genotype symbols followed are "H"(presence of KNOC specific bands), "A"(absence of KNOC specific bands) and "--"(missing data for the individual at this locus)

Table 15. Lod-table of pairwise analysis between a pair of marker. Upper row presents the recombination fraction and lower row shows the LOD scores.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	R01 3	R11 4a	R11 4c	R11 5	R124 a	R14 7	R15 9	R16 7	R30 1a	R327 a	R32 7b	R34 1	R34 2	R49 0	R49 7	MC W 04	ADL 154	ADL 171	ADL 190	ADL 032	
2	0.47 0.00																				
3	0.50 0.00	0.45 0.09																			
4	0.50 0.00	0.40 0.35	0.40 0.35																		
5	0.50 0.00	0.50 0.00	0.43 0.12	0.50 0.00																	
6	0.31 0.93	0.41 0.19	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00																
7	0.50 0.00	0.50 0.00	0.38 0.55	0.50 0.00	0.11 4.29	0.50 0.00															
8	0.38 0.46	0.44 0.14	0.49 0.01	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00														
9	0.50 0.00	0.30 1.43	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.19	0.50 0.00	0.50 0.00													
10	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.19	0.43 0.12	0.41 0.00	0.38 0.37	0.50 0.00	0.50 0.00												
11	0.50 0.00	0.41 0.19	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.29 1.15	0.50 0.00	0.45 0.07											
12	0.50 0.00	0.47 0.02	0.47 0.02	0.50 0.00	0.39 0.28	0.41 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.43 0.20	0.48 0.01	0.50 0.00										
13	0.30 1.43	0.50 0.00	0.43 0.20	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 2.31	0.50 0.00	0.50 0.00									
14	0.50 0.00	0.38 0.37	0.38 0.37	0.41 0.01	0.46 0.03	0.50 0.00	0.48 0.07	0.46 0.03	0.31 0.93	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.19	0.50 0.00								
15	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.38 0.46	0.35 0.79	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.19							
16	0.40 0.35	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.46 0.03	0.50 0.00	0.50 0.00	0.44 0.14	0.50 0.00	0.50 0.00	0.48 0.01	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.43 0.20						
17	0.50 0.00	0.50 0.00	0.45 0.09	0.50 0.00	0.36 0.50	0.50 0.00	0.43 0.20	0.50 0.00	0.45 0.09	0.45 0.07	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00					
18	0.50 0.00	0.39 0.37	0.29 1.51	0.41 0.21	0.31 0.86	0.50 0.00	0.37 0.58	0.50 0.00	0.45 0.09	0.41 0.20	0.50 0.00	0.41 0.00	0.41 0.00	0.33 0.66	0.50 0.00	0.50 0.00	0.16 4.24				
19	0.42 0.21	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.44 0.07	0.31 0.79	0.45 0.09	0.41 0.29	0.50 0.00	0.50 0.00	0.36 0.50	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00		
20	0.50 0.00	0.32 1.00	0.43 0.15	0.50 0.00	0.48 0.01	0.50 0.00	0.49 0.01	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.00	0.50 0.00	
21	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.46 0.05	0.50 0.00	0.50 0.00	0.41 0.19	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	0.28 1.82	0.25 2.27	0.47 0.02	0.50 0.00	0.50 0.00	0.50 0.00	

본 연구는 닭의 염색체가 38개가 존재하는데 비하여 비록 21좌위의 적은 수의 표지인자를 이용하여 연관분석을 실시하였으나 3쌍의 6개 표지인자간의 유의적인 연관이 검색되었을 뿐 아니라, 3개의 연관그룹에 9개 좌위 포함되는 잠정적인 수준의 연관관계도 확인할 수 있었다. 이는 다수의 미세염색체에 대해 1번에서 6번까지의 거대염색체가 전체 계놈의 50%이상을 차지하는 닭의 유전체 특성상, 본 연구의 결과에 의해 검색된 연관그룹은 거대 염색체에 존재할 가능성이 높을 것으로 판단되었다.

이는 본 연구그룹에 의해 수행되어온 연구과제가 성공적으로 수행되었음을 의미하는데, 조성된 집단이 정확한 가계도를 유지하였으며, 검색된 RAPD표지인자와 microsatellite 표지인자에 대한 분석 기법이 완벽하게 확립되었을 뿐 아니라, 조성된 퇴교배 집단이 닭의 연관유전자지도 작성을 위해 적절하게 조성되었다는 것을 제시한다. 따라서 본 연구에 이용된 표지인자와 퇴교배 집단은 성공적인 유전자지도 작성에 이용될 수 있으며 다수의 유전자좌의 유전자형을 추가하여 보다 확장된 유전자지도를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. Fig 37은 유의적 연관관계가 확인된 6그룹의 표지인자들에 대한 유전자지도를 나타낸다.

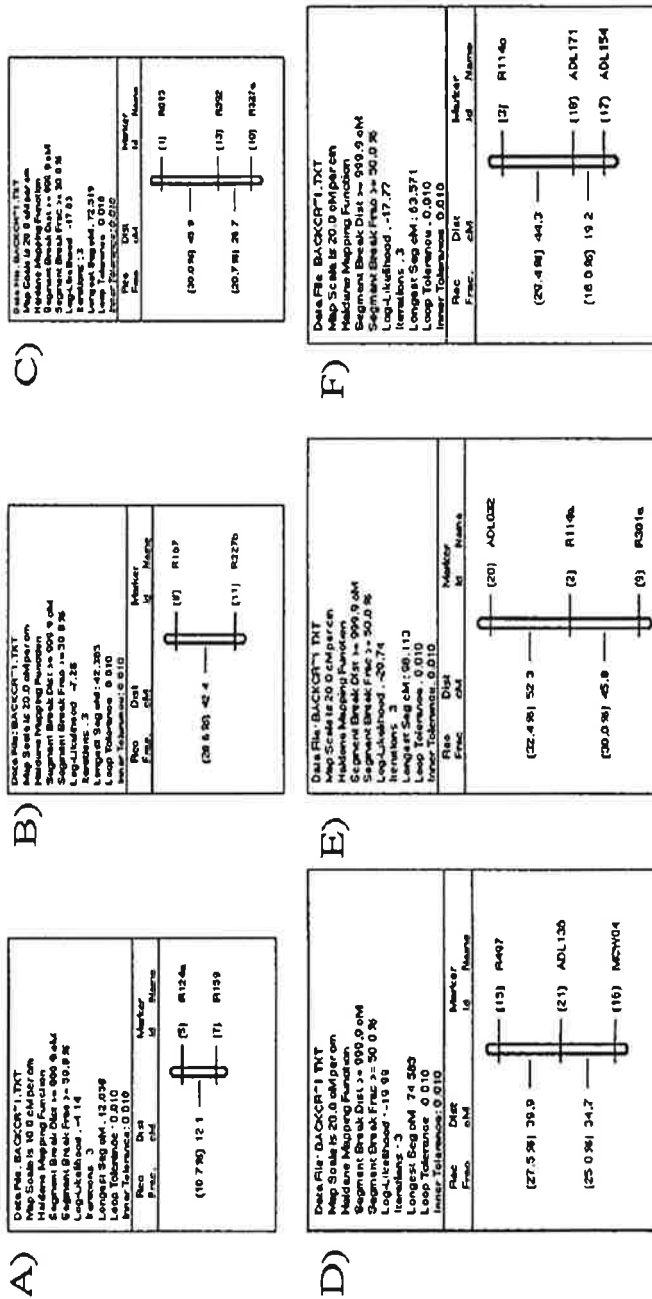


Fig. 37. Diagram of six groups of linked markers. Each pair shows significant level of LOD score for linkage determination.

2. 퇴교배 집단에 의해 작성된 연관지도상 표지인자의 염색체상의 위치결정

본 연구결과 얻어진 연관 표지인자 그룹은 보다 많은 수의 표지인자를 추가하여 보다 실질적인 연관 유전자지도로 개발되어야 할 뿐 아니라, 연관그룹이 실제 몇번 염색체에 해당하는지를 파악하여야 한다. 이를 위한 방법으로 표지인자의 일부를 직접 염색체 상에서 그 위치를 파악하기 위한 FISH기술을 적용하는 방법과 현재까지 알려진 표지인자에 대한 퇴교배집단내의 분리양상을 파악하여 연관분석을 실시하는 방법이 가능하다.

본 연구에서는 이를 위해 Fig 33과 36 에서 제시한 바와 같이 닭의 국제연구 그룹에서 제시하는 여러 표지인자들 중에서 MCW04, ADL136, ADL154, ADL171, ADL032, ADL190 의 6좌위의 임의의 좌위를 대상으로 퇴교배집단에서의 분리양상을 파악하여 RAPD를 이용하여 얻어진 표지인자들의 염색체상의 위치를 파악하였다. 이에 대한 결과는 Table 15의 표지인자 16-21에 대한 결과부분에 제시되었으며 4개 좌위에서 다른 RAPD표지인자들과의 연관이 확인되었다. Fig 38-40은 Fig 37에 제시된 연관그룹의 유전자지도를 공통 표지인자를 이용하여 미 농무성의 유전자지도와 비교한 것이다.

Fig 38은 표지인자 ADL032가 미 농무성 유전자지도상의 연관 그룹 E30에 존재하므로 R114a와 R301a 가 동일한 연관그룹에 존재하는 것을 알 수 있다. 또한 Fig 39에서는 ADL 171과 ADL154가 염색체 8에 존재하므로 R114c도 8번 염색체를 존재하는 것으로 파악된다. 이와 더불어 미농무성의 유전자지도상에는 ADL171-154간의 거리는 16.6M.U. 으로 나타나 있으나 본 연구에서는 19.2M.U.으로 나타나 약간의 차이를 나타냈다. 그러나 이는 표지인자의 수를 늘리

고 분석개체수를 늘리면 보다 정밀한 거리추정이 가능할 것이다. 이러한 결과는 또한 본 연구결과에 의해 조성된 퇴교배집단과 확립된 기술에 의해서도 충분히 닭의 유전자지도를 성공적으로 조성할 수 있다는 것을 제시하는 고무적인 결과라 할 수 있다.

Fig 40의 경우에는 MCW04가 염색체 3에 존재하므로 R497도 염색체 3에 위치함을 파악할 수 있다. 이러한 방법으로 다수의 개발된 표지인자들에 대한 해당염색체를 결정하였다.

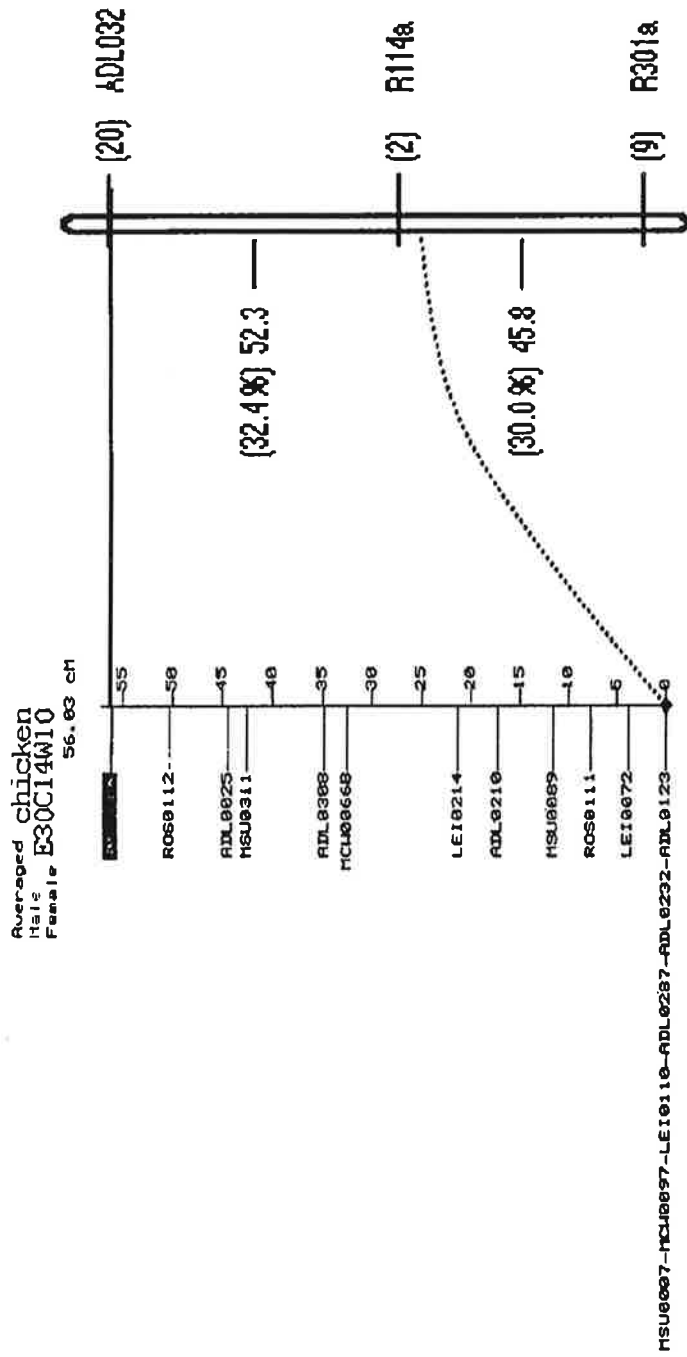


Fig. 38. Comparison of an identified linkage group of this study with East Lansing linkage(USDA) group E30. ADL032 was positioned on terminal of East Lansing linkage group E30, which has not yet been specified to any chromosome. R114 and R301a could be assumed to reside in same chromosome by this comparison.

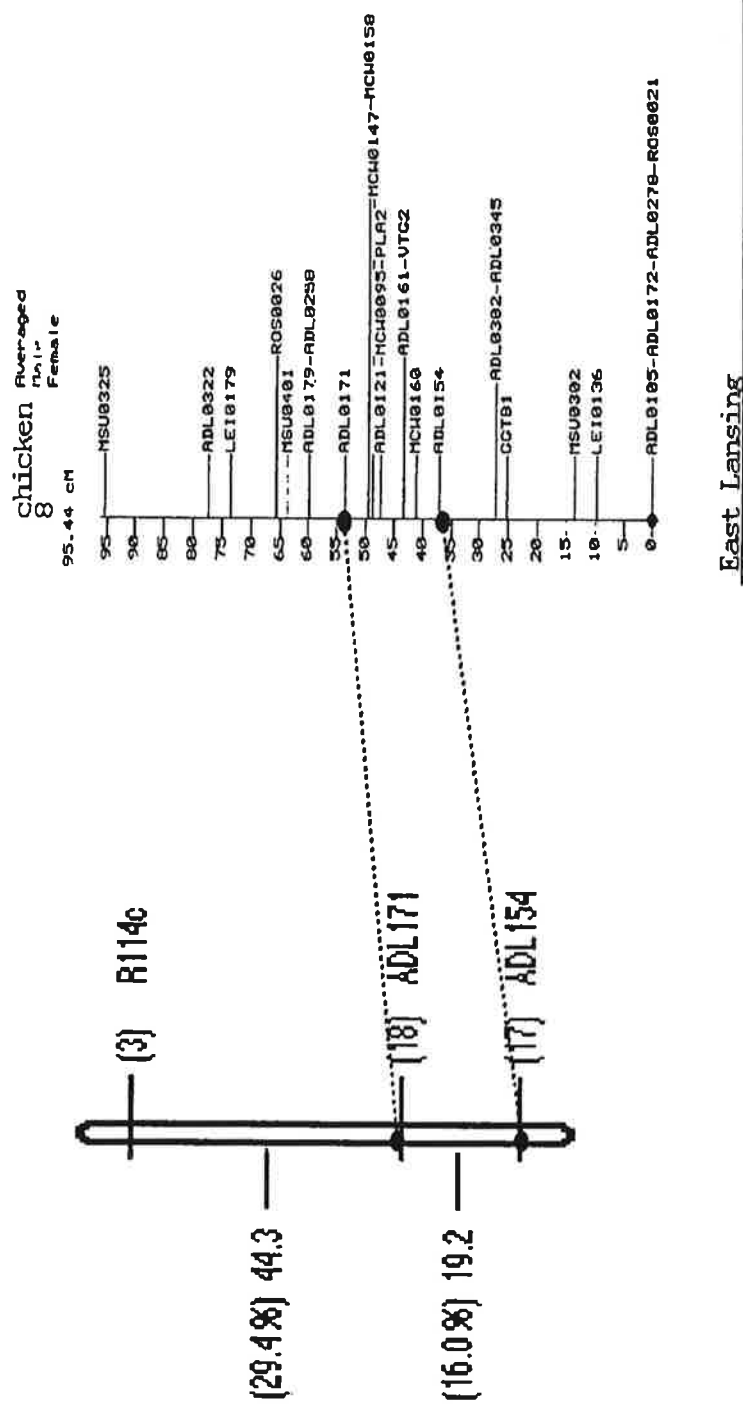
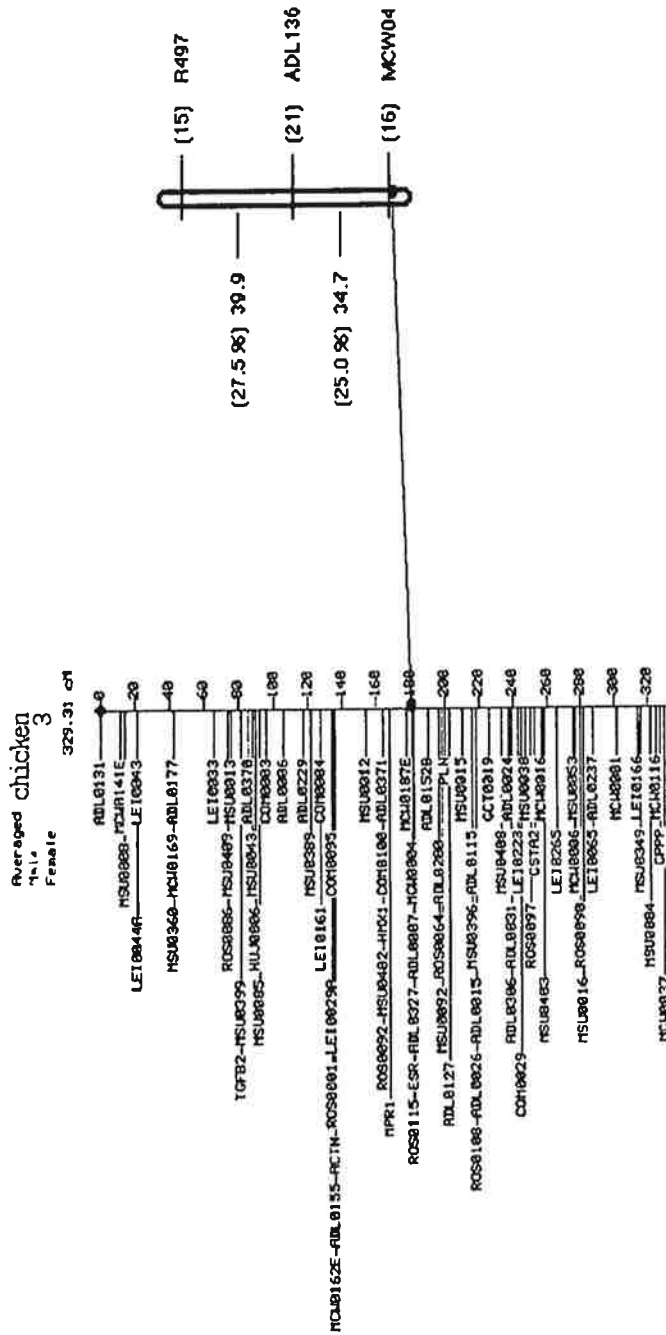


Fig. 39. Comparison of an identified linkage group of this study with East Lansing linkage(USDA) Map chromosome 8. ADL171 and ADL154 were tested to be linked in KNOX backcross population as in the case of East Lansing.



East Lansing

Fig. 40. Comparison of an identified linkage group of this study with East Lansing linkage(USDA) Map, chromosome 3.

제 4 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구 개발 결과

분자세포유전학적 기법을 이용한 닭의 유용유전자 개발에 관한 연구로부터 개발된 결과와 이의 활용 방안 및 연구 성과를 제시하면 다음과 같다.

1. 닭의 유전적 특성 규명 기술 확립으로 가축 전반에 걸친 유전학적 개량의 기술적 기초자료의 제공
 - 가. 닭 염색체 분석기법으로 새로운 염색체 분리기법의 개발과 확립
 - 1) 닭의 초기 배자로부터 효율적인 염색체 분리 기술 개발
 - 2) 닭 철액배양으로부터 백혈구의 분리 기술 및 고해상 염색체의 분리 기법 개발
 - 나. 닭 염색체의 분염 분석기술의 확립과 banding 양상의 구명
 - 1) 닭의 G-banding 기법 확립과 G-band 양상의 구명
 - 2) 닭의 C-banding 기법 확립 및 heterochromatin 양상의 구명
 - 3) 닭의 Q-banding 기법 확립과 Q-band 양상의 구명
 - 4) 닭의 HR-banding 기법 확립과 prophase chromosome의 band 양상 구명
 - 다. 닭 염색체의 표준 핵형 및 염색체 분염 표지 제시
 - 라. 닭에 있어 AP-PCR법에 의한 DNA 다형 관찰 방법의 확립과 제시

마. 닭에 있어 microsatellite typing 등에 의한 DNA 다형현상 관찰 방법 확립과 제시

바. FISH 기법의 확립과 제시

2. 염색체 변이와 형질간의 연관 구명으로 닭의 부화율에 미치는 원인 구명 및 품종간 발생학적 유전양상의 기초 자료 제공

가. 닭 품종별 염색체 이상 빈도 및 이상 양상의 분석

나. 품종별 초기 배자의 사망률과 염색체 이상간의 연관 구명

다. 품종간 수정시 성비의 비교 분석

3. 재래계 특이 표지인자의 개발

가. AP-PCR 법 및 microsatellite typing 기법에 의한 재래계 특이 표지인자의 개발

나. 발굴 확인된 유전적 표지인자의 유전적 신뢰성을 평가하여 지적 소유권화도 가능하리라 사료됨.

4. 닭에 있어 연관 유전자지도 및 물리적 유전자 지도 작성을 위한 제반 기술 확립과 특정 유전자의 지도 작성

가. 물리적 유전자 지도 작성을 위한 기초기술로써 FISH 기법의 확립

나. FISH 기법에 의한 Chick W-specific gene의 좌위 설정 및 본 probe를 이용한 학술 및 산업적 활용가능성 제시

다. 재래계 특이 유전자의 연관지도 작성

라. 퇴교배 집단에 의해 작성된 연관지도상의 대표적인 표지인자 (microsatellite 등)를 선정하여 이의 염색체상 위치 결정

마. 유전자지도 작성으로 유용유전자 개발의 기반 기술 확보가 가능
바. 확립된 유전자지도 작성을 위한 기반은 지속적인 개발로 상업적으로 유용한 유전자지도로 발전시킴

제 2 절 연구 성과(발표 논문)

본 연구과제 수행 중 개발된 기술 및 분석 완료된 결과들에 대한 발표 논문은 다음과 같다.

1. 손시환, 신영수. 1997. High-Resolution banding에 의한 닭의 핵형 분석. 한국유전육종학회지1(1):1-11
2. K. C. Hwang, Y. H. Hong, H. K. Lee, S. H. Sohn, B. W. Cho and J. Y. Han. 1997. Application of polymerase chain reaction with short oligonucleotide primers of arbitrary sequence for the genetic analysis of Korean Native Ogol chicken. Kor. J. Anim. Sci. 39(1):27-34
3. S. H. Sohn, E. K. Reau, K. H. Baik and C. H. Park. 1998. New methodology of chromosome preparation from chick embryo. Proceedings of the 8th World Conference on Animal Production. Vol II: 654-655
4. C. W. Kum, K. C. Hwang, G. B. Kim, H. K. Lee, S. H. Sohn and J. Y. Han. 1998. Development of genetic markers for the chicken breed discrimination using random amplified polymorphic DNAs(RAPD). Proceedings of the 8th World Conference on

Animal Production. Vol II: 672-673

5. K. C. Hwang, H. K. Lee, S. H. Sohn, and J. Y. Han. Detection of chicken genetic markers for breed differentiation of Korean domestic breed using RAPD-SCAR strategy.(투고중)
6. K. C. Hwang, H. K. Lee, S. H. Sohn, B. W. Cho and J. Y. Han. Genetic linkage mapping of polymorphic RAPD markers in Korean domestic breed backcross population.(투고중)
7. S. H. Sohn, E. K. Reau, K. C. Hwang, T. S. Park and J. Y. Han. Assignment of chick W-specific gene to chromosome Wp1-q1 by fluorescence in situ hybridization. (투고중)

참 고 문 헌

- Bumstead N and Palyga J. 1992. A preliminary linkage map of the chicken genome. *Genomics* 13:690-697.
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U and Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1968 Jan;49(1):219-22
- Ciampolini R, Moazami-Goudarzi K, Vaiman D, Dillmann C, Mazzanti E, Foulley JL, Leveziel H and Cianci D. 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *J Anim Sci* 73(11):3259-68
- Crittenden L, Bitgood J and Burt D. 1995. Genetic nomenclature guide. *Chick. Trends Genet Mar*:33-4
- Crooijmans RP, van der Poel JJ and Groenen MA. 1995. Functional genes mapped on the chicken genome. *Anim. Genet.* 26:73-78.
- Crooijmans RP, van Kampen AJA, van der Poel JJ and Groenen MA. 1993. Highly polymorphic microsatellite markers in poultry. *Anim. Genet.* 24:441-443
- Crooijmans RP, van Oers PA, Strijk JA, van der Poel JJ and Groenen MA. 1996. Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers:

- 77 new markers mapped. *Poult. Sci.*;75(6):746-54.
- Dunnington EA, Stallard LC and Siegel PB. 1993. Evaluating linkage between DNA fingerprint bands and quantitative traits in chickens: interactions. *Poult. Sci.* 72:1000-1004.
- Groenen MA, Crooijmans RP, Veenendaal A, Cheng HH, Siwek M and van der Poel JJ. 1998. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics* 15;49(2):265-74
- Hepkema BG, Blankert JJ, Albers GAA, Tilanus MGJ, Egberts E, van der Zijpp AJ and Hensen EJ. 1993. Mapping of susceptibility to Marek's disease within the major histocompatibility (B) complex by reifend typing of White Leghorn chickens. *Anim. Genet.* 24:283-287.
- Hillel J, Plotzy Y, Haberfeld A, Lavi U, Cahaner A and Jeffreys AJ. 1989. DNA fingerprints of poultry. *Anim. Genet.* 20:145-155.
- Hwang KC, Hong YH, Lee HK, Sohn SH, Cho BW and Han JY. 1997. Application of polymerase chain reaction with short oligonucleotide primers of arbitrary sequence for the genetic analysis of Korean Native Ogol chicken. *Kor. J. Anim. Sci.* 39(1):27-34
- Khatib H, Genislav E, Crittenden LB, Bumstead N and Soller M. 1993. Sequence-tagged microsatellite sites as markers in chicken reference and resource populations. *Anim. Genet.* 24:335-362

- Kodama H, Saitoh H, Tone M, Kuhara S, Sakaki Y and Mizuno S. 1987. Nucleotide sequences and unusual electrophoretic behavior of the W chromosome-specific repeating DNA units of the domestic fowl, *Gallus gallus domesticus*. *Chromosoma* 96(1):18-25
- Kuhnlein U, Dawe Y, Zadwony D and Gavora JS. 1989. DNA fingerprinting: a tool for determining genetic distances between strains of poultry. *Theor. Appl. Genet* 77:669-672
- Kuhnlein U, Zadworny D, Dawe Y, Fairfull RW and Gavora JS. 1990. Assessment of inbreeding by DNA fingerprinting: development of a calibration curve using defined strains of chickens. *Genetics* 125:161-165.
- Kum CW, Hwang KC, Kim GB, Lee HK, Sohn SH and Han JY. 1998. Development of genetic markers for the chicken breed discrimination using random amplified polymorphic DNAs(RAPD). *Proceedings of the 8th World Conference on Animal Production. Vol II: 672-673*
- Levin I, Crittenden LB and Dodgson JB. 1993. Genetic map of the chicken Z chromosome using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Genomics* 16:224-230
- Levin I, Santangelo L, Cheng H, Crittenden LB and Dodgson JB. 1994. An autosomal genetic linkage map of the chicken. *J. Hered.* 85:79-85.
- Litt M and Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the

- cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet;44(3):397-401
- Plotsky Y, Cahaner A, Haberfeld A, Lavi U, Lamont SJ and Hillel J. 1993. DNA fingerprint bands applied to linkage analysis with quantitative trait loci in chickens. Ajnim. Genet. 24:105-110.
- Shaw EM, Otis JS, Guise KS and Shoffner RN. 1990. Borate G-banding technique applicable to in situ deoxyribonucleic acid/deoxyribosenucleic acid hybridized chicken chromosomes. Poul. Sci. 69:1046-1050
- Sohn SH, Fechheimer NS and Ohh BK. 1990. Leukocyte culture technique for the study of chromosomes in the Japanese quail(*Courtnix courtnix japonica*). Kor. J. Anim. Sci. 32:748-751
- Sohn SH, Reau EK, Baik KH and Park CH. 1998. New methodology of chromosome preparation from chick embryo. Proceedings of the 8th World Conference on Animal Production. Vol II: 654-655
- Sohn SH. 1990. Chromosomal polymorphism of Japanese quail(*Courtnix courtnix japonica*). Kor. J. Poul. Sci.17:275-280
- Steffen P, Eggen A, Dietz AB, Womack JE, Stranzinger G and Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. Anim Genet 24(2):121-4
- Tone M, Nakano N, Takao E, Narisawa S and Mizuno S. 1982. Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA

- sequences in the domestic fowl, *Gallus g. domesticus*.
Chromosoma 86(4):551-69
- Wintero AK, Fredholm M and Thomsen PD. 1992. Variable
 (dG-dT)_n(dC-dA)_n sequences in the porcine genome
Genomics 12(2):281-8
- Yunis JJ. 1976. High resolution of human chromosomes. *Sci.* 191:
 1268 - 1270
- Zhang X, Mcdaniel GR and Giambrone JJ. 1995. Random
 Amplified Polymorphic DNA Comparisons among broiler lines
 selected for incidence of Tibial Dyschondroplasia. *Poult. Sci.*
 74:1253-1258.
- 손시환, 신영수. 1997. High-Resolution banding에 의한 닭의 핵형분
 석. *한국유전육종학회 지*1(1):1-11
- 손시환, 오봉국. 1987. 닭 염색체의 분리분석 방법에 관한 연구. *한국
 가금학회지* 14:89-96.
- 손시환, 이경희, Fechheimer NS. 1990. 일본산메추리(*Coturnix
 coturnix japonica*)의 핵형연구. *한국가금학회지* 17:269-274.
- 송기덕, 신영수, 한재용. 1993. Identification of Sex-specific DNA
 sequences in the chicken. *한국가금학회지* 20:177-188
- 여정수, 김재우, 최창본. 1994. 유전자지문을 이용한 한국 재래계의
 식별. *한국 축산학회지* 36:221
- 여정수, 정태완, 한재용, 최창본, 김재우, 정선부. 1993. 한국재래계의
 유전자지문에 관한 연구. *한국 가금학회지.* 20:209
- 오봉국, 손시환, 여정수. 1990. C-banding에 의한 닭의 hetero

-chromatin 다형현상. 한국축산학회지 32:1-8

이성진, 황규춘, 이학교, 한재용. 1995c. DNA fingerprinting을 이용한 재래 오골계의 유전분석에 관한 연구. 한국 축산학회지.

이학교, 정호영, 이수현, 김길수, 한재용, 조병욱. 1994. PCR을 이용한 Porcine Stress Syndrome(PSS)돼지 검색. 축산분야 종합학술대회. A9420

황규춘, 이학교, 이성진, 한재용. 1995. Genetic analysis of Korean Native Ogol Chicken with DNA fingerprinting and Random Amplified Polymorphic DNAs methods. 축산분야 종합학술대회. A9514

황규춘, 이학교, 한재용. 1994. RAPD marker에 의한 오골계의 유전적 특성에 관한 연구. 축산분야 종합학술대회. A9411