GOVP1200101815

거세돈의 도체 품질 개선을 위한 영양, 호르몬, 면역학적 기술 개발

Nutritional, Hormonal and Immunological Approaches for Improving the Carcass Quality of Finishing Barrows

진 주 산 업 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**거세돈의 도체 품질 개선을 위한 영양, 호르몬, 면역학적 기술 개발**” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 . 10 . 28 .

주관연구기관명 : 진주산업대학교

총괄연구책임자 : 이 철 영

연 구 원 : 김 두 환

연 구 원 : 문 승 식

연 구 원 : 문 여 황

연 구 원 : 박 만 종

연 구 원 : 송 영 민

연 구 원 : 이 정 규

연 구 원 : 이 진 희

연 구 원 : 진 상 근

요 약 문

Ⅰ. 제 목

거세돈의 도체 품질 개선을 위한 영양, 호르몬, 면역학적 기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

수퇘지는 암퇘지에 비해 성장률과 사료효율이 높으나 수퇘지 고기 특유의 웅취(boar-taint)를 내게 되어 돈육의 가치가 낮다. 수퇘지의 웅취는 주로 정소에서 분비되어 지방조직에 축적되는 androstenone에 기인하기 때문에 현재와 같이 110kg 생체중에서 비육돈을 출하하게 되면 수퇘지는 대부분이 웅취를 내기 때문에 수퇘지의 거세는 불가피하게 된다.

거세돈은 정소가 제거되었으므로 그 고기는 웅취는 없으나 지나치게 많이 사료를 섭취함으로써 거세하지 않은 수퇘지나 암퇘지에 비해 지방 침적이 높고 수퇘지에 비해 사료효율도 낮으며 무엇보다도 암퇘지에 비해 도체등급이 낮아질 우려가 있다. 거세돈의 과다 지방침적을 방지하는 방법으로는 크게 에너지 섭취량을 제한하는 방법과 외부적으로 지방침적을 억제하는 호르몬 제제를 투여하는 방법이 보고되었다. 영양소 섭취량을 제한하는 첫 번째 방법으로는 사료섭취량을 제한하는 방법이 잘 알려져 있으나 현장 적용상의 어려움 때문에 실제로는 널리 이용되지 못하고 있는 실정이고, 두 번째 방법으로는 저에너지 사료를 공급하는 방법도 보고된 바 있으나 역시 현장에서는 잘 이용되지 못하고 있는 실정이다. 호르몬적 방법으로 anabolic steroids를 implanting하는 방법이 유럽에서 소개되었으나 단지 제한된 시험 결과만이 보고되었고 그나마 국내에서는 전연 시도되지 않았다.

따라서 본 과제에서는 거세 비육돈을 제한급여, 저에너지 사료 급여 및

anabolic steroids implantation을 병합 처리하였을 때 지방 침적 및 도체 품질에 미치는 영향과 insulin-like growth factor(IGF) system의 발현에 미치는 영향을 구명하여 산업적으로는 과비를 방지할 수 있는 현실적인 방법을 도출·홍보하고, 학술적으로는 호르몬에 의한 체성분 제어 기전을 규명하며, IGF system의 체성장에서의 역할을 구명하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 크게 준비 단계, 사양시험 단계 및 사양시험 시료 분석 단계로 나뉠 수 있다. 준비 단계에서는 NRC 사양표준을 기준으로 기준(대조)사료와 대조사료의 85% 에너지를 함유하는 저에너지 사료를 시험 생산하여 예비 사양시험을 하고, 돼지 혈청으로부터 IGF-binding protein-3(IGFBP-3)를 정제하고 항혈청을 생산하여 RIA를 개발하며, 혈중 IGF system의 주요 component인 acid-labile(ALS) cDNA fragment를 cloning하는 단계이다. 제 2단계에서는 생체중 60kg의 거세 비육돈을 2[무제한 급여 대비 제한 급여(80% 무제한 급여)] × 2[대조사료 대비 저에너지 사료] × 2[no implantation 대비 anabolic steroids implantation] factorial 사양시험을 수행하였다. 105kg에 공시돈을 출하하여 RNA 추출용 간 시료를 채취하고 도체의 품질과 배최장근의 이화학적 특성을 분석하였다. 공시돈의 혈액 시료는 시험 개시일과 매 3주 채취하였다. 제 3단계에서는 공시혈청의 포도당, estradiol, testosterone, IGF-I, IGFBP-3 농도를 측정하고, 1단계에서 cloning된 ALS cDNA fragment를 probe로 사용하여 간 시료의 ALS mRNA level을 측정하였다. 또한 탐색적 연구로서 지방비율을 높이는데 일익을 하는 인자로 믿어지는

부신피질자극호르몬(adrenocorticotropic hormone; ACTH)에 대해 거세 비육돈의 육성기에서 비육기에 이르는 동안 능동면역(active immunization)시켰을 때 체성장에 미치는 영향을 구명하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구개발의 주요 결과와 결과의 유용성은 다음과 같다.

1. 저에너지 사료

가. 강피류 함량이 높은 거세 비육돈 용 저에너지 사료 개발

나. 저에너지 사료는 거세 비육돈의 등지방 침적을 낮추 수 있음을 확인 : 과비한 거세돈은 본 사료가 유용하게 쓰일 수 있음

다. 참여 사료공장은 저에너지 사료를 새로이 등록하고 홍보함 (본 보고서의 배포는 좋은 홍보 자료가 될 것임)

2. 제한 급여

가. 제한 급여는 지방 침적을 억제하고 성장률을 낮춤

나. 소규모 농장에서 거세돈의 과비 방지법으로 유용할 것임

3. Revalor(trenbolone + estradiol pellets) implantation

가. 지방 침적과 증체율 억제 및 사료효율 향상 효과 확인

나. Trenbolone이 외부생식기를 발달시켜 도축장에서 거세돈이 수퇘지로 오판되는 단점 때문에 현장 적용은 부적절 (estrogen만을 implantation하는 방법은 재시도의 가치가 있음)

4. IGF system 연구

가. IGFBP-3

1) IGFBP-3를 정제하여 항혈청을 만들고 RIA 개발

2) 비영리 연구를 위한 요청 시 IGFBP-3 항혈청을 공급할 수 있음

나. ALS cDNA fragment

1) 300-bp 돼지 ALS cDNA fragment cloning & sequencing

2) 비영리 연구를 위한 요청 시 cDNA clone을 공급할 수 있음

다. 영양, 사양 및 anabolic steroids와 IGF system과의 상호작용

1) IGF-I: 혈중 농도는 Revalor implantation에 의해 증가

사료 섭취량 및 에너지 함량과는 무관

증체율과 등지방두께와는 각각 정 & 부의 상관관계

2) 혈중 IGFBP-3 농도:

증체율과 정의 상관관계

사료섭취량, 에너지 함량 및 Revalor implantation과 무관

3) 간의 ALS mRNA 수준:

실험 처리에 의해 가시적인 변화가 관찰되지 않았음

4) IGF-I과 IGFBP-3 혈중 농도를 성장의 지표로 사용할 수 있는 가능성 제시

5. ACTH 능동면역

1) 비육 중기까지 ACTH 능동면역이 체성장에 가시적인 영향 없음

2) 탐색과제로서 출하시까지 관찰·측정 요망(예정)

SUMMARY

I. Title

Nutritional, hormonal and immunological approaches for improving the carcass quality of finishing barrows

II. Objectives and Significance

Boars grow faster and also utilize the feed more efficiently than gilts, but the carcass quality of the former is inferior to that of the latter because of the boar-taint. The boar-taint is caused mainly by androstenone which is secreted from testes and accumulated in adipose tissues. Under the current situation where market pigs are slaughtered at 110kg of body weight, it is inevitable to castrate the boar because of the boar-taint.

Barrows have no boar-taint because their testes have been removed; however, they accumulate much more fat and utilize the feed less efficiently than gilts or boars, and moreover, their carcass grade is likely to be inferior to that of gilts. As for the way for preventing the excessive fat deposition of barrows, restriction of energy intake and administration of exogenous hormonal agents have been reported. Restricted feeding is well known as a means to limit energy intake, but this is not widely used in the field because of a few practical limitations. Use

of low energy diets, which also is not widely used in the field, has been known as a second choice for limiting the energy intake. As a third line of approach, implantation of anabolic steroid(s), has been introduced in European countries, but this has not been even tried domestically.

The present project was undertaken to investigate the effects of restricted feeding, feeding a low-energy diet and implantation of anabolic steroids on fat deposition and carcass quality and the expression of insulin-like growth factor(IGF) system components in finishing barrows and thereby to derive and make public practical means to prevent the excessive fatness of barrows and also to find insights into hormonal regulation of body composition and the role of the IGF system in somatic growth.

III. Experimental Approaches and Scope

The present study can be divided into three main steps: preparation, feeding trial and analyses of experimental samples of the trial. The preparation step includes formulation of a NRC-based control diet and a low-energy diet containing 85% energy level of the former and a preliminary feeding trial of the experimental diets. Also performed during the first step were a development of IGFBP-3 RIA following purification of the protein from porcine serum and raising its antiserum in a

rabbit and cloning of a cDNA fragment of acid-labile subunit(ALS), a major component of the circulating IGF system. At the next step, a feeding trial was performed using finishing barrows weighing 60kg under a 2[ad libitum vs restricted(80% ad libitum) feeding] × 2[control vs low-energy diet] × 2[no implantation vs implantation of anabolic steroids] factorial arrangement of treatments. Animals were slaughtered at 105kg, after which liver samples were taken for RNA extraction and carcass quality and physicochemical characteristics of the longissimus muscle section were analyzed. Blood samples were taken at the beginning day of the experiment and subsequently at three weeks intervals. The final step involved determination of concentrations in sera of estradiol, testosterone, IGF-I and IGFBP-3 and also determination of hepatic ALS mRNA abundance using the ALS cDNA fragment as probe that had been cloned during the first step. Also included in the final step was an initiative trial where effects of active immunization against ACTH, which is believed to play a significant role in increasing the body fat ratio, during the growing and finishing period of barrows on growth was investigated.

IV. Key Results and suggestions for Their Utilization

Following are main results and their utilities of the

present research project.

1. Low-energy diet

1) Developed a low-energy diet containing a high percentage of grain by-product for finishing barrows.

2) Above low energy diet was confirmed to reduce the backfat thickness: this diet can be useful for excessively fat barrows.

3) The feed mill that participated in this project registered the low energy diet and made public the utility of it. (Distribution of this report is considered to be a good channel of publication.)

2. Restricted feeding

1) Suppressed fat deposition and growth rate.

2) Considered to be useful for small-scale production units.

3. Revalor(trenbolone + estradiol pellets) implantation

1) Suppressed fat deposition and weight gain and increased feed efficiency.

2) Found not to be suitable for practical application because implanted barrows were judged as boars at the slaughter house, apparently resulting from an androgenic effect of trenbolone on development of external genitalia (However, implantation of estrogen only deserves further investigation.)

4. Studies on the IGF system

1) IGFBP-3

(1) Purified IGFBP-3, raised a polyclonal antiserum against it and developed its RIA.

(2) The antiserum can be distributed at request for non-profit research purposes.

2) ALS cDNA fragment

(1) Cloned and sequenced a 300-bp porcine ALS cDNA fragment.

(2) This fragment can be distributed at request for non-profit research purposes.

3) Interactions of the IGF system with nutrition, feeding and anabolic steroids

(1) IGF-I:

serum concentration increased by Revalor implantation.

exhibited no relation to feed intake or dietary energy.

had positive and negative correlations with growth rate and backfat thickness, respectively.

(2) Serum IGFBP-3 concentration:

found to have a positive correlation with growth rate.

found not to be related to feed intake, energy content of the diet, or Revalor implantation.

(3) Hepatic ALS mRNA abundance:

no apparent change by any treatment

(4) IGF-I and IGFBP-3 concentrations are considered to be useful as indexes of growth potential.

5. Active immunization against ACTH

1) no apparent effects of the active immunization on growth up to mid finishing period.
2) further observations/measurements up to marketing required(planned) as an initiative trial

CONTENT

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 중요성

1. 목적

수퇘지의 거세는 수퇘지 고기 특유의 웅취를 제거할 수 있으나 거세돈은 사료의 과다 섭취에 의한 과비 현상으로 말미암아 수퇘지나 암퇘지에 비해 도체등급이 낮아지는 문제점이 있다. 본 과제는 사양, 영양, 외부적인 호르몬 물질 투여 및 특정 호르몬에 대한 능동면역적 방법을 이용하여 1) 거세돈의 과비를 방지하여 도체등급을 향상시킬 수 있는 효과적인 방법을 찾아내고, 2) 호르몬에 의한 체성분 제어 기전을 규명하며, 3) insulin-like growth factor(IGF) system의 체성장에서의 역할 연구와 추후의 IGF system 연구 기반을 구축하는데 그 목적이 있다.

2. 중요성

수퇘지는 암퇘지에 비해 성장률과 사료효율이 높으나 수퇘지 고기 특유의 웅취(boar-taint)를 내게 되어 돈육의 가치가 낮다(김 등, 1996). 수퇘지의 웅취는 주로 정소에서 분비되어 지방조직에 축적되는 androstenone에 기인한 것으로 알려져 있다(김 등, 1996). 웅취의 원인 물질이 androgen(웅성호르몬)인 고로 수퇘지의 웅취는 정소 발육이 활발해질수록 더 커진다. 따라서 현재와 같이 비육돈의 출하체중이 90kg에서 110kg으로 증가되면서 웅취는 더 큰 문제로 대두되어 추후 수퇘지의 전면적인 거세가 불가피할 것으로 전망된다.

거세돈은 정소가 제거되었으므로 그 고기는 웅취는 없으나 지나치게 많이 사료를 섭취함으로써 수퇘지나 암퇘지에 비해 지방 침적이 높고 사료효율도 낮으며 무엇보다도 암퇘지에 비해 현저하게 도체등급이 낮다. 그러므로

거세돈의 도체등급 개선은 양돈 농가의 수입과 직결되는 큰 과제가 아닐 수 없다.

거세돈의 과다 지방침적을 방지하는 방법으로는 크게 에너지 섭취량을 제한하는 방법과 외부적으로 지방침적을 억제하는 호르몬 제제를 투여하는 방법이 알려져 있다. 에너지 섭취량을 제한하는 첫 번째 방법으로는 사료섭취량을 제한하는 방법이 있다. 이 방법은 거세돈의 도체 품질과 사료효율을 향상시킬 수 있으나, 사육기간이 다소 길어지고 무엇보다도 현장적용상의 어려움 때문에 널리 이용되지는 못하고 있는 실정이다. 에너지 섭취량을 제한하는 두 번째 방법으로는 사료의 에너지 수준을 낮추는 방법이 있는데 이 방법은 간편하기는 하나 제한급여보다 도체 품질 개선 효과가 작다. 호르몬적 방법으로 anabolic steroids를 implanting하는 방법이 유럽에서 소개되었으나 단지 제한된 실험 결과만이 보고되었고 그나마 국내에서는 전연 시도되지 않았다.

이상 소개된 거세돈의 육질 개선 방법을 종합하면, ① 효과는 있으나 현실적인 적용이 어렵거나, ② 효과가 작거나, ③ 혹은 국외에 고무적인 결과가 보고되었으나 국내에는 시험자료가 지극히 미흡하거나 소개조차도 안된 방법이 있어 추후 이 방면에 많은 연구가 요망되고 있다. 또한 가장 효과적인 방법은 단일 방법보다도 각 방법의 조합에서 도출될 가능성도 있으나 이 방면의 시험은 국내외를 막론하고 전연 소개된 바가 없기 때문에 본 연구개발에서는 병합처리 효과를 구명하고자 한다. 이 외에도 타 가축이나 실험 동물에서는 체성분 제어에 관여하는 호르몬을 면역학적 방법으로 차단함으로써 체성분을 의도한대로 변화시킬 수 있었다는 보고가 있다. 그러나 아직 돼지에서는 이러한 시도가 거의 없어 거세돈의 도체 품질 개선을 위하여 특정 호르몬을 차단하는 면역학적 방법은 시기 적절한 시도라 할 수 있다.

3. 국내외 관련 기술의 현황과 문제점

1) 영양소 섭취량 제한에 의한 육질 개선

가) 제한급여

거세돈의 과다 지방 침적을 방지하는 방법으로 사료 섭취량을 제한하는 방법은 오래 전부터 알려져 왔다. Leymaster와 Mersmann(1991)은 거세돈의 사료급여량을 자유급여의 85% 수준으로 제한하였을 때 등지방두께는 15% 낮아지고, 사료효율은 9% 향상되었으나 증체율은 7% 감소하였다고 보고하였다. 국내에서 탁 등(1994)은 거세돈에 대한 사료 급여량을 무제한 섭취량의 80% 수준으로 제한했을 때 등지방두께는 14% 낮아지고 사료효율은 6.5% 향상되었으며, 도체 A, B등급 출현률이 25.5% 향상되었다고 보고하였다.

나) 저에너지 사료 급여

거세돈에 저에너지 사료를 급여함으로써도 지나친 지방 침적을 다소간 방지할 수 있다. 장과 정(1985)은 사료의 가소화에너지를 3.4Mcal/kg에서 3.0Mcal/kg으로 낮추었을 때 거세돈의 등지방두께가 11% 낮아졌다고 보고하였다. 그러나 사료의 에너지 수준을 낮추는 방법은 거세돈의 총 에너지 섭취량을 낮출 수 있다는 점에서는 제한급여와 비슷한 원리이나 지방 침적 억제 효과는 제한급여만 못하다. 이는 사료의 에너지 수준이 낮을 때 돼지의 사료 섭취량이 증가하기 때문이며, 바꿔 말하면 돼지는 총에너지 섭취량을 꽤 정확하게 제어한다는 가설(Baldwin 등, 1982)과 부합한다 할 수 있다. 따라서 사료의 에너지 수준을 낮추는 것만으로는 거세돈의 과다 지방 침적을 억제하기에 불충분할 수 있는 여지가 있기 때문에 다른 방법과의 병행 처리를 시도해 볼 가치가 있다.

2) 호르몬적 방법

가) 호르몬에 의한 체성분 제어 기전

동물의 성장 제어에는 여러 호르몬이 관여하나 이중 성장호르몬(growth hormone; GH)이 중추적인 역할을 한다(Etherton과 Kensinger, 1984; Lee, 1988). Insulin-like growth factor-I(IGF-I)은 GH의 자극에 의해 간을 비롯한 다수의 조직에서 발현·분비되어 후자의 성장 촉진 작용을 매개하는 7.5-kDa peptide 성장인자 이다(Jones와 Clemmons, 1995; 이, 1996; Liu와 LeRoith, 1999). 생체의 체액 중 정액과 초유를 제외하면 혈중에 가장 높은 농도의 IGF가 존재하기 때문에 혈중 IGF 농도는 생리학적으로 중요한 의미를 갖는다. 다른 체액은 물론 혈중 IGF는 일정 불변하게 IGF-binding protein(IGFBP)에 결합되어 발견되는데 혈중 대부분의 IGF는 40 45-kDa의 IGF-binding protein-3(IGFBP-3)와 85-kDa acid-labile subunit(ALS)와 ternary complex를 이룬 상태로 발견된다(Baxter 등, 1989; Lee와 Rechler, 1995a; Rechler와 Clemmons, 1998). Ternary IGF:IGFBP-3:ALS complex는 IGF를 혈관 내에 국한시킨 후 서서히 방출되게 하여 혈중 IGF의 이용률을 극대화하는 역할을 하는 것으로 믿어진다(Ueki 등, 2000). 따라서 IGF-I, IGFBP-3 및 ALS는 혈중 IGF system의 3대 요소라 칭할 수 있다.

현재까지 IGF-I은 peptide 및 cDNA 수준에서 돼지를 포함한 여러 가축과 인간 및 쥐에서 정제·cloning되었으나, 돼지 IGFBP-3[porcine IGFBP-3(pIGFBP-3)]는 전세계를 통해 단 한군데에서만 정제되어(Walton 등, 1989), pIGFBP-3에 대한 연구가 지연되고 있다. 더욱이 ALS protein과 cDNA는 단지 몇몇 종에서만이 정제·cloning되었을 뿐(Baxter 등, 1989; Leong 등, 1992; Dai와 Baxter, 1992; Baxter와 Dai, 1994; Delhanty 등, 1996; Lee와 Rechler, 1995b; Boisclair 등, 1996; Rhoads 등, 2000) 돼지에서의 연구는 전무한 상태이다.

나) Anabolic steroid를 이용한 체성장·체성분 제어

거세돈에 적용된 anabolic steroids는 trenbolone acetate[androst-4,9(10),11 trien-3-one, 17β acetate; TBA)]와 estradiol-17β가 있다. TBA는 androgen과 유사한 anabolic steroid로서 testosterone보다 강한 anabolic activity가 있으나 후자보다 웅성형질 발현 작용(androgenecity)이 훨씬 작기 때문에 이상적인 androgen계 합성 스테로이드라고 할 수 있다(Heitzman 등, 1977; Heitzman, 1979; Galbraith와 Topps, 1981; Lee, 1988). 상업적으로 TBA는 프랑스의 Roussel UCLAF에 의해 합성되어 Finaplix라는 이름으로 시판되고 있고, estradiol과 합제로 된 Revalor(TBA plus estradiol)라는 상품명으로 판매되기도 한다. 거세돈에서 anabolic steroids의 효과에 대해서는 지극히 제한된 결과만이 발표되었으나 Grandadam 등(1975)은 TBA(140mg) plus estradiol(14mg)을 거세 비육돈에 implanting하였을 때 등지방두께를 15% 낮추고 사료효율을 약 10% 향상시키는 효과가 있었다고 보고하였다.

돼지에서 TBA plus estradiol이 어떤 기전으로 anabolic action을 나타내는지는 알려지지 않았다. 그러나 거세우에서 TBA plus estradiol이 IGF-I의 혈중 농도를 높이고, cortisol 농도를 낮추었다는 결과(Lee 등, 1990)를 비추어 볼 때 이들 anabolic steroids의 효과 중 적어도 일부는 IGF-I을 통하여 매개될 것으로 추측되고 또 다른 일부는 testosterone과 유사한 작용(cortisol 분비 억제 등)에 의한 간접적인 효과일 것으로 추측된다. 그렇다면 이론적으로 TBA plus estradiol에 의한 IGF-I 농도의 증가는 IGFBP-3 혹은 ALS의 발현에도 영향을 미칠 가능성이 있으나 이에 대한 연구는 보고된 바 없기 때문에 본 과제에서 구명하고자 하였다.

다) 능동적 면역 방법(active immunization)에 의한 체성분 조절

체성분은 체성분 조절에 관여하는 호르몬을 면역학적 방법으로 차단시킴으로써도 바꿀 수 있다. 체성분 중 지방 비율을 높게 하는 호르몬으로서는 insulin과 glucocorticoid(cortisol)가 대표적이다. Glucocorticoids는 뇌하수체에서 분비되는 adrenocorticotropic hormone(ACTH)의 자극을 받아 부신피질에서 분비되는 catabolic hormone으로서 근육 단백질 분해를 촉진함으로써 간접적으로 생체의 지방 비율을 높게 한다(Henricks 등, 1984). 따라서 ACTH나 glucocorticoid hormone의 작용을 차단하면 체성분 중 지방의 비율을 낮출 수 있을 것이라는 가설을 세울 수 있다. 실례로 Sillence 등(1992)은 쥐에 ACTH 항체를 주사함으로써 37%의 성장률을 증가시킬 수 있었다고 하는 고무적인 결과를 보고하였다. 그러나 이와 같은 피동적 면역학적 방법(passive immunization)이 가축에 적용되기 위해서는 다음의 문제들이 선결되어야한다. ① ACTH 혹은 glucocorticoid를 차단했을 때 체성분은 어떻게 변할 것인가? ② 쥐에서 얻은 결과가 돼지에도 적용될 것인가? ③ 가축 수준에서 ACTH 항체 주사는 현실적으로 불가능하므로 실험적으로는 능동적 면역 방법에 의해 glucocorticoid를 차단해야 하는데, 그렇다면 능동적 면역의 효과가 피동적 면역의 효과와 같을 것인가? 이러한 점등을 고려하고, 타 동물에서 somatotropin의 차단 혹은 분비 자극을 의도한 능동적 면역 실험에서 의도된 결과가 도출되었던 예(Kirby 등, 1993)를 감안할 때 glcocorticoid hormone 차단을 위한 능동적 면역 실험은 매우 시기 적절한 시도라 할 수 있다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 사료의 영양 수준, 사료 급여 방법, anabolic steroids implantation 및 ACTH 능동적 면역이 거세 비육돈의 성장률, 도체 품질, 혈중 대사물 및 IGF system에 미치는 효과 구명을 골자로 하고 있다. Table 1-1은 연차별 세부적인 연구개발 목표, 내용 및 범위이다.

Table 1-1. Yearly objectives and scope

Year	Objectives	Scope
1st (1997)	· Development of a low-energy diet	· Formulation of a NRC-based control and a low-energy(85% NRC) diets
	· IGFBP-3 purification	· IGFBP-3 purification from porcine serum: cation exchange chromatography IGF-I affinity chromatography C18 reverse-phase HPLC
	· ALS cDNA cloning	· Cloning of a porcine ALS cDNA fragment (PCR) & sequencing
2nd (1998)	· Development of IGFBP-3 RIA	· N-terminal amino acids sequencing · Production of antiserum in a rabbit · Development of pIGFBP-3 RIA
	· Feeding trial	· Feeding trial using a 2(ad libitum vs restricted feeding) x 2(energy levels) x 2(none vs anabolic steroids) factorial arrangement of treatments · Measuring live wt & blood sampling · slaughtering & carcass analysis
3rd (1999)	· Analyses of samples	· Serum: glucose concentration, RIAs(IGF-I, IGFBP-3, estradiol, testosterone), Ligand blotting(total IGFBPs) · Hepatic ALS mRNA abundance: RNA extraction, Northern blotting RNAse protection assay
	· Active immunization against ACTH	· ACTH-carrier coupling & injection to growing pigs · Blood sampling & analysis: Antibody titering, cortisol concentration · Analysis of growth and body composition

제 2 장 준비: 실험사료, IGFBP-3 및 IGF-I RIAs 개발과 ALS Cloning

제 1 절 저에너지 사료 개발

1. 저에너지 사료 개발

가. 내용

거세돈의 과다 사료 섭취에 의한 과비(過肥)를 막는 방법 중의 하나로 본 연구에서는 저에너지 사료를 급여하기로 하였다. 본 연구에서는 NRC 사양표준(1988, 1998)에 근거하여 Table 2-1과 같이 대조사료는 NRC 표준 가소화에너지(digestibel energy; DE)의 103%를 함유하고 저에너지 사료는 대조사료의 85% 에너지를 함유하도록 하였으며, 조단백질 수준은 두 사료 공히 15% 되게 원료 배합률을 작성하였다. 사료 원료의 에너지 및 비타민 함량은 NRC 성분분석표를 따르고 조성분은 분석치를 따랐다. 원료 사료의 상한 배합비율은 각 원료별 특성, 기 발표된 문헌 및 본 과제 참여 연구자들의 경험에 의거하여 결정하였다. 실험사료는 부경양돈조합 김해 사료공장에서 배합하여 본 과제의 실험농장인 태원농장에 보급하여 40일 간의 예비 사양 시험을 하였다.

나. 결과 및 고찰

Table 2-2에 나타난 바와 같이 저에너지 사료 급여에 의해 일당증체량은 현저히 감소하였다. 저에너지 사료 급여에 의해 등지방두께도 역시 낮아졌는데, 이는 부분적으로는 저에너지 사료 급여 구의 출하체중이 대조구의 출하체중보다 다소 낮았던 데에 원인이 있었기도 하지만 등지방두께를 생체중 110kg 기준으로 보정하여도 저에너지 사료 급여에 의해 등지방두께가 낮아지는 경향($P = 0.11$)은 보였다. 이같은 결과를 장과 정(1985)의 결과와 비교해 보면 저에너지 사료에 의한 성장률 감소 효과는 두 실험간에 비슷한 결과를 보였으나 등지방 침적 억제 효과는 본 실험에서 다소 작게 나타났다.

Table 2-1. Composition of experimental diets

	Control diet1	Low E diet2
Ingredients		
corn, ground	62.68%	30.48
wheat	5.38	13.44
wheat bran		35.00
rice bran, polishings	3.00	3.00
soybean meal, sol.	17.76	9.64
rapeseed meal	2.00	2.00
limestone	0.48	0.88
dicalcium phosphate	1.80	1.62
salt	0.30	0.30
vitamin premix	0.30	0.30
mineral premix	0.26	0.26
tallow	3.04	
molasses	3.00	3.00
lysine-HCl		0.08
total	100.00	100.00
Chemical composition3		
crude protein	15.0	15.0
crude fat	6.2	3.2
crude fiber	3.4	5.2
crude ash	5.0	5.9
Ca	0.85	0.98
P	0.67	0.83
Lysine	0.75	0.75
Met. + Cys.	0.54	0.56
DE(kcal/kg)	3,509	2,946

1Contains 103% NRC(1998) digestible energy(DE) requirement.

2Contains 87% NRC(1998) digestible energy(DE) requirement.

3Calculated values

Table 2-2. Growth performance and carcass measurements of finishing barrows fed the low-energy diet

Items	Control diet(n=30)1	Low E diet(n=27)1,2
Initial wt, kg	70.7 ± 1.2	72.0 ± 1.3
Final wt, kg	107.7 ± 1.3	103.6 ± 1.4*
ADG, gm	756 ± 22	661 ± 23*
Carcass wt, kg	69.7 ± 1.1	68.4 ± 1.2
Backfat(measured), mm	17.3 ± 0.64	15.2 ± 0.67*
Backfat(corrected), mm	17.8 ± 0.64	16.2 ± 0.67
A,B grade ratio, %	90	93

1Data are LS means ± SE.

2Three stunted animals were excluded during the experiment.

*P<0.05.

한편 최종 도체 등급에 있어서는 두 실험구 공히 ≥90%의 높은 A,B 등급 출현율을 보임으로써 저에너지 사료 급여에 의한 도체등급 개선 효과는 발견되지 않았다.

제 2 절 실험 재료 확보 및 방법 확립

2. IGFBP-3 RIA 개발

가. IGFBP-3 정제

1) 혈청 준비

진주 시내 도축장에서 혈액을 채취하여 250ml centrifuge bottle에 넣고 JA-14 rotor로 3,000rpm(1,600 x g)/4。C에서 30분간 원심분리하여 혈청을 수거하였다. 수거된 혈청은 다시 위와 같이 원심분리하여 불순물을 제거하고 IGFBP-3 정제시까지 -20。C에 보관하였다. IGFBP-3는 Martin과 Baxter(1996)에 의해 처음 보고되고 Zapf 등(1988)과 Walton 등(1989)이 수정

한 방법에 따라 아래와 같이 정제하였다.

2) SP Sephadex C-25 cation-exchange chromatography

가) 50gm SP Sephadex C-25 cation-exchange resin을 1 M acetic acid(pH 3.0)에 equilibration시킨 후 상온에서 48시간 동안 swelling

나) cation-exchange resin이 swelling되는 동안 1l의 혈청과 1l의 2 M acetic acid/150mM NaCl 용액을 섞어 최종 pH가 3.0 되게 적정한 후 10개의 250ml centrifuge bottles에 옮겨 rotating shaker 위에서 상온에서 3시간 동안 혼합

다) 각각의 centrifuge bottle에 35ml의 swollen SP Sephadex C-25 resin을 넣고 상온에서 24시간 동안 rotating shaker 위에서 혼합

라) Resin을 가라앉히고 상등액을 cheese cloth와 Whatman filter로 걸러 수거한 다음 10 N NaOH로 pH 6.5 되게 적정

마) 중화된 시료는 40ml centrifuge tube에 옮겨 넣고 JA-20 rotor로 39,000 x g(18,000rpm)/4。C에서 1시간 동안 원심분리하여 침전물 제거

바) Whatman filter로 2회 더 침전물을 제거한 후 IGF-I affinity column에 loading

3) IGF-I affinity column 준비(Lee와 Rechler, 1995a)

가) 2mg recombinant IGF-I을 10mM HCl 1ml에 용해시키고 2ml coupling buffer[0.1 M NaHCO3/0.5 M NaCl(pH 8.0)] 첨가

나) 0.6gm CNBr-activated Sepharose-4B resin을 1mM HCl 50ml로 상온에서 15분간 swelling

다) 1mM HCl 100ml로 swollen resin을 sintered glass filter 위에서 washing하고 5ml coupling buffer를 가한 후 신속히 위에서 준비한 IGF-I 용액 첨가:

coupling reaction 개시.

라) Rocker platform 위에서 상온에서 2시간 동안 coupling

마) Reaction tube를 정치하여 상등액을 제거하고 5ml blocking buffer[50mM Tris-HCl, pH 8.0]를 넣고 혼합한 후 정치하여 상등액 제거

바) 10ml blocking buffer를 가하고 상온에서 3시간 동안 blocking

사) 4。C 냉장실에서 resin을 15ml column에 옮긴 후 0.1 M sodium acetate/0.5 M NaCl(pH 4.0) 20ml과 0.1 M NaHCO3/0.5 M NaCl(pH 8.3) 20ml로 washing; 3회 반복

아) 50mM sodium phosphate(pH 6.5)로 equilibration

4) IGF-I affinity chromatography

다음 절차는 모두 4。C 냉장실에서 수행하였다.

가) 연동 펌프를 이용하여 2)에서 준비한 시료를 IGF-I affinity column에 30 60ml/시간의 속도로 통과시킴(loading)

나) 1리터의 0.5 M NaCl(70ml/시간)로 washing

다) Affinity column에 결합된 IGF-binding proteins(IGFBPs)를 15ml의 0.5 M acetic acid(pH 3.0)로 elution

라) Centricon-30 ultraconcentrator로 농축시켜 진공건조기로 건조→4。C 보관

5) SDS-PAGE and electro-elution of IGFBP-3

가) IGF-I affinity chromatography에 의해 정제된 total IGFBPs를 Laemmli buffer에 용해→12.5%SDS-PAGE→한 lane을 Coomassie staining하여 IGFBP-3 위치 확인

나) IGFBP-3 band를 오려내어 세절한 다음 Molel 422 electro-eluter(Biorad)

로 5시간 동안 IGFBP-3 elution(9mA/barrel; SDS-PAGE buffer)

다) Centricon-30으로 농축→ – 20。C에 보관

*1리터 혈청으로부터 0.5 1mg의 IGFBP-3만이 정제되었기 때문에 충분한 양의 항원을 확보하기 위해 1) 5)의 과정을 수차례 반복

6) 정제된 IGFBP-3 순도 확인

정제된 total IGFBPs와 electro-elution된 IGFBP-3는 1차적으로 silver staining(Pierce)으로 순도를 확인한 다음(Fig. 2-1) total IGFBPs를 SDS-PAGE gel로부터 PVDF membrane에 transfer하고 IGFBP-3를 오려내어 기초과학 지원연구소에 의뢰하여 automated Edman degradation 방법에 의해 NH2-말단 아미노산서열을 결정하였다. Sequencing 결과 ---AVXTGPV와 같은 아미노산서열은 돼지 IGFBP-3 cDNA의 염기서열에 의해 예측된(Shimasaki 등, 1990) IGFBP-3의 서열과 일치하였다.

나. IGFBP-3 항혈청 생산

IGFBP-3 항혈청은 Lee와 Rechler(1996)가 설명한 바와 같이 아래 절차에 의해 생산하였다.

1) 최초 항원 주사

가) 0.2ml pIGFBP-3를 0.4ml 50mM PBS(pH 6.75)와 섞은 다음(최종 pH; 7.25) 0.6ml Freund's Complete Adjuvant와 혼합

나) New Zealand White rabbit(5kg) 이정맥으로부터 preimmune blood를 채취한 후 1ml 주사기(19 G needle)를 이용하여 위에서 준비한 pIGFBP-3 항원을 토끼의 등에 6군데 피하주사

Fig. 2-1. Silver staining of IGFBP-3 purified from porcine serum by SP Sephadex C-25 cation exchange chromatography, IGF-I affinity chromatography and electro-elution following SDS-PAGE. Lane 1, protein molecular mass standards representing 37, 43, 56 and 66kDa from the bottom to top, respectively. Lanes 2-4, 50, 200 and 800ng BSA, respectively. Lanes 5 and 6, purified IGFBP-3 after electro-elution representing 8.3 and 1.4ml serum equivalents, respectively. Lane 7, IGFBPs mixture(5ml serum equivalent) prior to electro-elution(after IGF-I affinity chromatography). Note 40-45kDa IGFBP-3 doublet bands in lanes 5 and 6 co-migrating with the 43kDa molecular mass standard.

2) Booster injection 및 항혈청 수거

가) pIGFBP-3를 PBS 및 Freund's Incomplete Adjuvant와 섞어 매 2주 주사

나) Booster injection한 다음 1주일 후에 최초 항원 주사일로부터 56, 70, 84일에 이정맥으로부터 8ml의 혈액을 채취하여 항혈청을 수거

다) 최초 항원 주사 후 98일에 심장으로부터 대량의 혈액 채취 및 혈청 수거

3) IGFBP-3 RIA 개발

가) pIGFBP-3 iodination(Lee와 Henricks, 1990)

(1) 1㎍ pIGFBP-3를 20㎕ 0.1M acetic acid로 용해→50㎕ 0.5M phosphate buffer(pH 7.0)로 중화→0.5mCi Na125I(pH 10.0; 5㎕) 첨가

(2) Chloramine-T(1.2mg/ml) 10㎕를 첨가하여 20초 동안 iodination 반응

(3) Sodium metabisulfite(6mg/ml) 20㎕를 첨가하여 iodination 반응 종식

(4) Sephadex G-50 chromatography(1.5 x 12cm column)로 free Na125I 제거 (buffer: 50mM PBS, pH 7.4/0.02% BSA, specific activity: 100 200㎌i/㎍)

(5) 사용할 때까지 -70。C에 보관

나) Antiserum titration: 70 & 98일 항혈청을 1: 300, 900, 2,700, 8100 희석하여 [125I]IGFBP-3 binding percentage 조사(1:1500이 최적으로 판정)

다) RIA conditions 확립: validation

(1) 면역학적 확인(Walton과 Etherton, 1989)

(가) 0.3ml total assay volume되게 RIA buffer[50mM PBS, pH 7.4/0.5% fatty acid-free BSA/0,02% NaN3], 1:1500 항혈청, 15,000cpm [125I]IGFBP-3 및 혈청 혹은 non-antigen peptide 첨가

(나) 4。C에서 16h 배양→0.1ml 1:10 goat anti-rabbit IgG 항혈청 + 0.1ml 1:30 normal rabbit serum 첨가→상온에서 1시간 배양

(다) 1ml ice-cold 6% PEG-8000 첨가→원심분리(3,000rpm/30분)→상등액 제거 (aspiration)→pellet을 ㅅ-counting

(2) 생리학적 확인

성장 단계별 암퇘지와 거세돼지의 혈청을 위와 같이 IGFBP-3 RIA를 수행하여 기 알려진 결과와 비교하였다.

(3) 결과

(가) 면역학적 확인

① 위의 RIA 조건하에서 non-specific binding(NSB)과 B0는 각각 5.3±0.3%와 36.8±2.8%였다.

② Unlabeled pIGFBP-3와 돼지혈청에 대한 [125I]IGFBP-3 displacement curves가 평행(parallelism)하므로 본 RIA가 유효함(Fig. 2-2)

③ pIGFBP-3 항혈청은 IGF-I, hIGFBP-3 혹은 소의 혈청에 대해서는 5%> 교차반응을 보였으므로 본 항혈청은 특이성이 높음

(나) 생리학적 확인: 성장발달하는 암퇘지와 거세돼지의 혈중농도 양상이 기 보고된(Owens 등, 1999)와 일치(Fig. 2-3)

3. IGF-I RIA 개발

가. 혈청 전처리: IGF-I RIA를 방해하는 혈중 IGFBPs 제거

1) 0.2ml + 1.3ml 1% aqueous trifluoroacetic acid(TFA)와 혼합(산성화)

2) C18 Sep-Pak cartridge preconditioning: CH3CN→H2O→aqueous 0.1% TFA

3) 산성화된 혈청 loading→3ml 0.1% aqueous TFA로 washing

4) Bound IGFs를 2ml 0.1% TFA를 함유하는 CH3CN으로 elution

5) 0.2ml aliquots로 나누어 진공건조기로 건조→RIA 때까지 4。C 보관

나. IGF-I iodination

IGFBP-3에서와 같이 Na125I와 chloramine-T를 이용하여 200~400㎕Ci/㎍g IGF-I 되게 labeling하여 Sephadex G-50 column으로 free Na125I free 제거

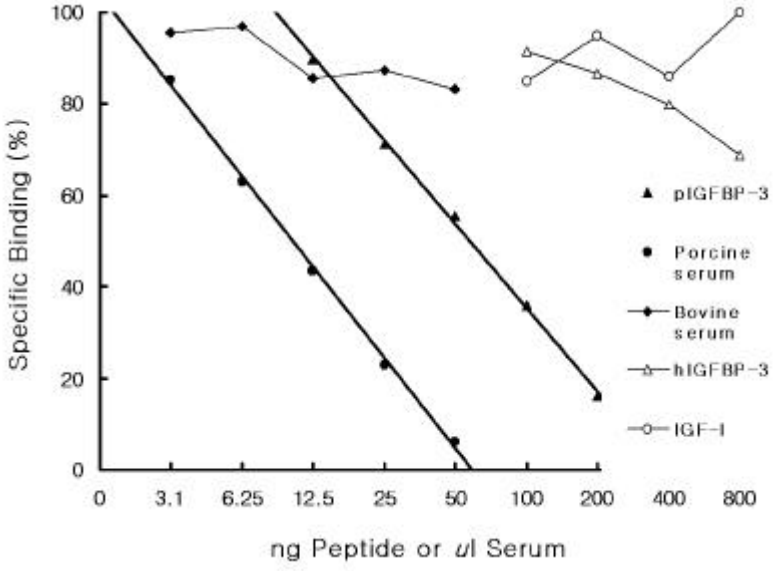

Fig. 2-2. Dose-response displacements of [125I]IGFBP-3 from porcine IGFBP-3(pIGFBP-3) antibodies by unlabeled pIGFBP-3, a pooled porcine serum, bovine serum and other non-antigen peptides.

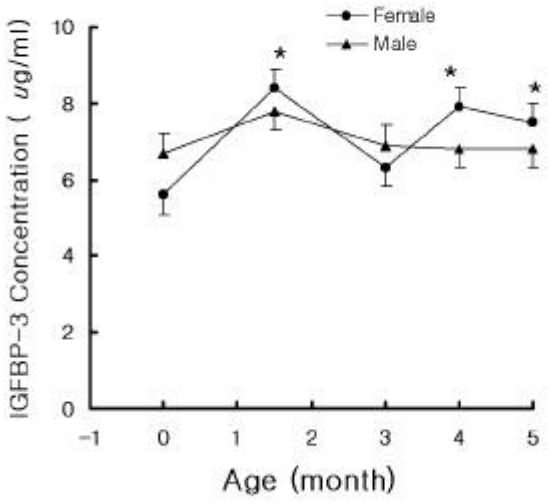

Fig. 2-3. Serum IGFBP-3 concentrations in gilts and barrows during development. At each sex × age, mean ± SE of eight different animals is indicated. *Different($P<0.05$) from the mean at birth within sex.

다. RIA conditions 확립: validation

1) 면역학적 확인

위에서 준비한 dried Sep-Pak eluate를 0.1M 초산으로 용해한 다음 1:104,000 항혈청(Gropep, Adelaide, Australia), 30,000cpm [125I]IGF-I, 가변량의 Sep-Pak eluate 및 RIA buffer[30mM sodium phosphate/10mM EDTA/0.2% protamine sulfate/0.05% Tween-20/0.02% NaN3, pH 7.5)를 섞어 총 부피가 0.4ml 되게 하여 pre-treated 혈청과 unlabeled IGF-I standard에 의한 dose-response [125I]IGF-I displacement curves의 평행(parallelism) 여부를 확인하였다.

2) 생리학적 확인

성장 단계별 암퇘지와 거세돼지의 혈청을 위와 같이 Sep-Pak chromatography로 IGFBPs를 제거한 다음 2㎕ serum에 해당하는 0.1M acetic acid에 용해된 Sep-Pak eluate를 RIA하여 기 알려진 결과와 비교하였다.

라. 결과

1) 면역학적 확인

Fig. 2-4에 나타난 바와 같이 Unlabeled IGF-I과 돼지혈청에 대한 [125I]IGF-I displacement curves가 평행(parallelism)하므로 본 RIA가 유효함

2) 생리학적 확인

Fig. 2-5에 나타난 바와 같이 IGF-I 농도는 성장발달하면서 계속 증가하였는데 이러한 결과는 기 보고된 Lee 등(1991)의 결과와 일치하므로 본 RIA는 생리학적으로도 유효

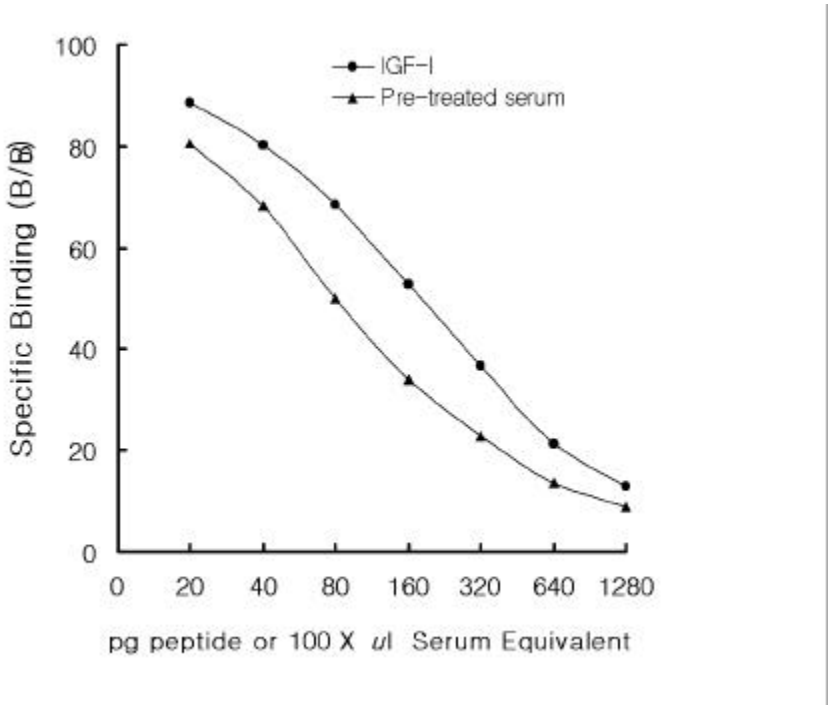

Fig. 2-4. Dose-response displacements of [125I]IGF-I from IGF-I antibodies by unlabeled IGF-I and a pre-treated pooled porcine serum. Serum was subjected to acidic C18 Sep-Pak chromatography, after which IGFBP-free Sep-Pak eluate was dried and reconstituted in 0.1M acetic acid prior to IGF-I RIA.

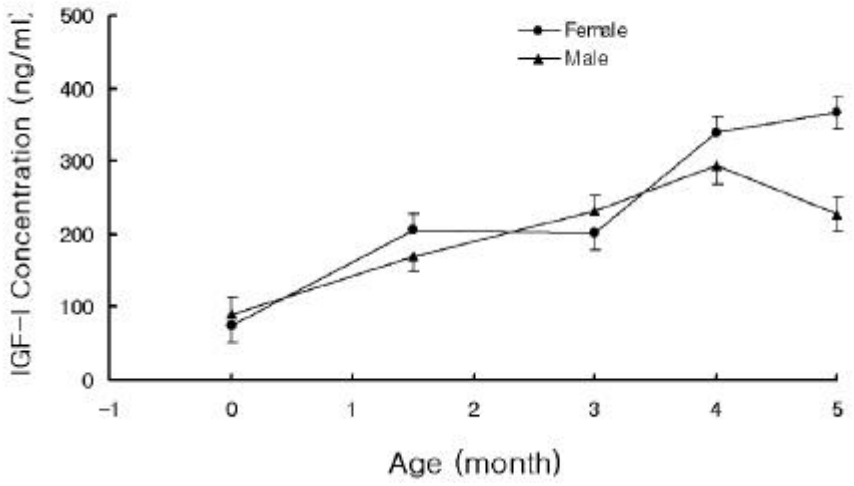

Fig. 2-5. Serum concentrations of IGF-I in gilts and barrows during postnatal development. At each sex × age, mean ± SE of eight different animals is indicated. Effects of sex, age and a sex × age interaction were significant($P<0.05$).

4. ALS cDNA fragment cloning 및 ALS mRNA 측정법 확립

pALS cDNA는 돼지 liver RNA와 두 개의 primer pairs를 이용하여 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법으로 증폭한 다음 TA-cloning하여 염기서열을 결정하고, Northern blotting과 RNAse protection assay를 시도하여 간의 ALS mRNA abundance 측정법으로서의 적합성 여부를 평가하였다.

가. RNA 추출

돼지의 간조직으로부터 Trizol을 이용하여 total cellular RNA를 추출하

고, poly(A)+ RNA는 standard procedure(Sambrook 등, 1989)대로 oligo(dT) cellulose chromatography에 의해 정제하였다.

나. 역전사(reverse transcription; RT)

위에서 준비한 poly(A)+ RNA 100ng을 cDNA Cycle kit(Invitrogen)를 이용하여 역전사하고 총 역전사물을 20㎕ H_2O에 용해시켰다.

다. polymerase chain reaction(PCR; Innis 등, 1989)

1) PCR primers 제작

인간과 쥐의 ALS cDNAs 염기서열중 잘 보존된 부위를 택하여 아래와 같이 304F와 303R primer pair를 제작하였다. 인간 ALS cDNA numbering을 기준으로 304F와 303R primers는 각각 nt104 120 및 390 406에 해당한다. PCR 증폭 후 pGem-3Z plasmid vector에 cloning하기 위해 이들 primers의 말단에는 밑줄과 같이 각각 Eco RI site와 Bam HI site를 삽입하였다.

Primer 304F: 5' AGCTGAATTCCTGGGTGGCACTGGGCC 3'

Primer 303R: 5' AGTCGGATCCGCCTGTGGCTCCAGGCT 3'

2) PCR

위에서 준비한 역전사물(liver RT products) 2㎕, 304F & 303R primers 각각 25pmoles를 High Fidelity PCR reagents(Boehringer Mannheim)를 이용하여 [94。C 2분→(94。C 1분, 60。C 1분, 72。C 2분) × 35cycles → 72。C 10분→4。C]과 같이 PCR을 수행하여 agarose gel 전기영동으로 돼지 ALS cDNA fragment가 증폭되었음을 확인하였다.

라. ALS cDNA fragment cloning & sequencing

1) PCR에 의해 증폭된 300-bp ALS cDNA fragment를 Wizard DNA Purification kit를 이용하여 agarose gel로부터 추출

2) 추출된 cDNA fragment를 pCR 2.1 TA-cloning vector kit(Invitrogen)를 이용하여 ligation & transformation한 후 blue/white screening

3) Positive colony를 증폭하여 plasmid를 추출하고 [35S]dATP와 Sequenase version 2.0(USB)를 이용하여 standard dideoxy chain termination 방법(Sanger 등, 1977)으로 cDNA fragment의 염기서열 결정(Figs. 2-6 & 7)

tggcaggcac ggagcccggg gcgccatcgg acgccgaggg cctgccgtgc 50

ccggctgcct gctcctgcgg ccacgacgac tacacggacg agctcagcgt 100

cttctgcagc tcccggaacc tcacgcagct gcccgacggc atcccagacg 150

ccgccagggc cctgtggctg gacagcaaca acttctcctc cgtccccgcg 200

ggggctttcc gtaacctctc cagcctgggc ttcctcaacc tgcagggcag 250

c

Fig. 2-6. Base sequence of a pALS cDNA fragment amplified by RT-PCR. Sequence homology to human cDNA is 80.8%.

AGTEPGAPSD AEGLPCPAAC SCGHDDYTDE LSVFCSSRNL TQLPDGIPDA 50

ARALWLDSNN FSSVPAGAFR NLSSLGFLNL QGSG 84

Fig. 2-7. Deduced amino acid sequence of a pALS cDNA fragment amplified by RT-PCR. Sequence similarity to human ALS is 84.5%; identity is 69.0%.

4) Directional cloning of the ALS cDNA fragment into pGem-3Z plasmid

RNAse protection assay시 *in vitro* transcription에 의한 riboprobe 합성을 위하여 TA-cloning vector에 들어있는 ALS cDNA fragment를 아래와 같이 pGem-3Z plasmid vector에 cloning 하였다.

가) ALS cDNA fragment가 들어있는 TA-cloning vector를 Eco RI과 Bam HI으로 잘라 agarose gel 전기영동

나) 300-bp ALS cDNA fragment를 gel로부터 정제하여 Eco RI/Bam HI-cut pGem-3Z(Promega) plasmid vector에 standard procedures에 의해 ligation & transformation시켜 위에서와 같이 blue/white screening하고, transformed plasmid를 추출하여 Eco RI/Bam HI digestion하여 agarose gel 전기영동으로 ALS cDNA fragment가 들어있음을 확인하였다.

마. ALS mRNA abundance 측정

간의 ALS mRNA abundance 측정법을 확립하기 위해 아래와 같이 Northern blotting과 solution hybridization/RNAse protection assay를 수행하였다.

1) Northern blotting

가) 출하돈의 여러 조직으로부터 Trizol을 이용하여 total RNA를 추출하고 oligo(dT)-cellulose chromatography로 poly(A)+ RNA 정제

나) 20㎍ poly(A)+ RNA를 2.2M formaldehyde-1.5% agarose gel 전기영동

다) Nylon membrane에 overnight capillary transfer(20× SSC)

라) Prehybridization: 2h/42。C, formamide-containing buffer

마) Hybridization: nick-translated pALS cDNA fragment(1 x 106 cpm/ml, 42。C/overnight)

바) Washing: 2× SSC 30min/상온→0.2× SSC 15min/50。C

→autoradiography

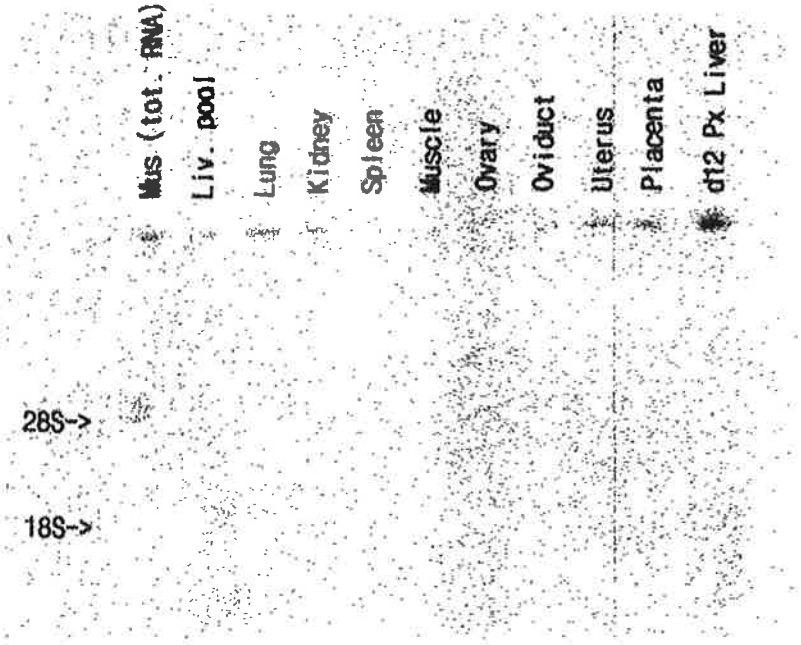

Fig. 2-8. ALS Northern blot analysis. In each lane 20μg total or poly(A)$^+$ RNA was loaded. See text for details.

사) 결과(Fig. 2-8): 간에서만 2.2-kb ALS mRNA 가 발견되었으나 intensity가 너무 낮아 ALS mRNA abundace 측정법으로는 부적합할 것으로 판정됨

2) Solution hybridization/RNAse protection assay

가) pGem-3Z plasmid에 들어있는 ALS cDNA fragment clone을 Eco RI digestion하여 linearization→agarose gel 전기영동→linearized DNA 추출

나) 0.5μg DNA를 50μCi ^{32}P-UTP 존재하에서 SP6 promoter를 이용하여 37 °C에서 1시간 동안 *in vitro* transcription

다) hybridization: 1 x 105 cpm + 0.5㎍ poly(A)+ RNA/45。C/overnight

라) RNAse T1 digestion(template 제거): 37。C/30min

마) Free nucleotide 제거: Sephadex G-50 chromatography

바) RNAse 처리(single strand RNA 제거): 56。C/1h

사) EDTA, ammonium acetate 및 yeast RNA 첨가(반응 종식)

아) Phenol/chloroform extraction→ethanol precipitation

자) 6% polyacrylamide gel electrophoresis→autoradiography

차) 결과(Fig. 2-9)

(1) 간에 가장 높은 수준의 ALS mRNA 존재

(2) 간을 제외한 타 조직에서도 낮은 수준의 ALS mRNA 존재

(3) 간의 ALS mRNA abundance 측정법으로 적합할 것으로 판명됨

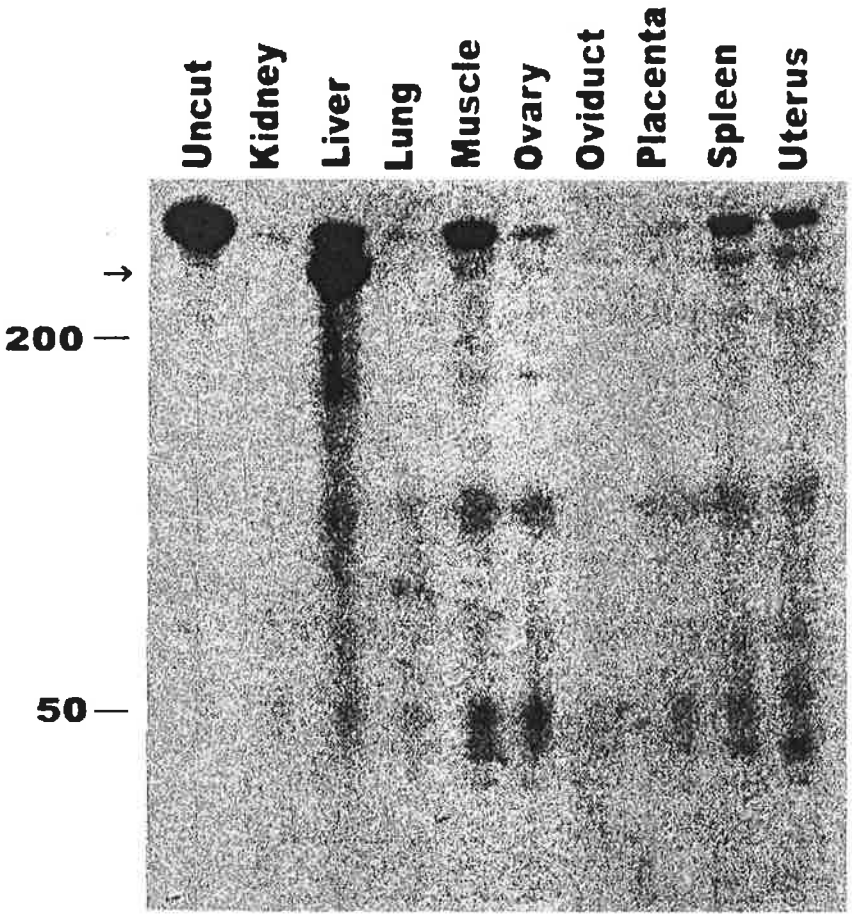

Fig. 2-9. Solution hybridization/RNAse protection assay. Note the ~300-bp protected band indicated by an *arrow* on the left of the autoradiogram. See text for details.

제 3 절 고 찰

1. 저에너지 사료 개발

제 3장에서 기술되는 사양시험을 수행하기 위한 전단계로 저에너지 사료를 개발하고 그 효과를 확인하였다. 당초 저에너지 사료의 에너지 함량은 NRC 권장량(3,400kcal DE/kg; 1988, 1998)의 85% 수준으로 하고 대조사료는 3,400kcal DE/kg으로 맞출 계획이었으나 참여 사료공장의 지역 특성상 밀기울을 제외한 강피류 조달이 어렵기 때문에 저에너지 사료의 에너지 수준을 당초 계획대로 낮출 수는 없었다. 그러나 본 연구에서 개발한 NRC 권장량 대비 103%와 87%를 함유하는 대조사료와 저에너지 사료는 실험 목적상 타당성 있고 예비 사양실험 결과는 실험 목적에 부합한 것으로 해석된다.

2. 실험 재료 확보

IGF system이 동물의 성장에 있어서 중요한 역할을 한다는 사실은 잘 알려져 있으나 돼지에서는 IGF system 연구의 기본적인 실험재료가 되는 RIA나 cDNA 등을 자유로이 이용할 수 없는 어려움을 안고 있다. 본 연구에서는 혈중 IGF system components 중 3대 요소라고 할 수 있는 IGF-I과 IGFBP-3에 대해 RIAs를 개발하고, ALS cDNA fragment를 증폭·cloning하여 학술적 기반을 마련하기도 하고 제 3장의 사양시험 시료 분석에 쓰일 연구재료 및 방법을 확보하였다.

돼지 IGFBP-3 항원은 인간 IGFBP-3와는 달리 상업적으로 구할 수 없고, 돼지 IGFBP-3 항혈청은 세계적으로 2 3 실험실에서 보유하고 있으나 연구자간에 자유로이 배분되지 않기 때문에 본 연구는 돼지 IGFBP-3 정제, 항혈청 생산, IGFBP-3 및 IGF-I RIAs 개발과 같은 일련의 준비과정이 필요하였다. 본 연구에서 준비된 IGFBP-3 항혈청은 타종의 IGFBP-3 혹은 IGFs와는 거의 교차

반응을 보이지 않았기 때문에 IGFBP-3 antigen이 성공적으로 정제되어 항혈청이 잘 형성되었음을 확인할 수 있었다. 또한 IGFBP-3와 IGF-I RIAs 상에서 보여진 각각의 antigen standard와 혈청에 대한 dose-response displacement curves의 parallelism과 실제 IGF-I & IGFBP-3 농도 양상이 알려진 일련의 돼지 혈청 시료에 대해 이들 농도를 정량하여 기존의 결과와 일치함을 확인함으로써 본 연구에서 시도한 RIAs가 성공적으로 개발되었음을 확인하고 다음 실험에 착수하였다. 또한 본 연구를 통하여 확보된 ALS cDNA fragment clone은 세계적으로도 돼지에서는 처음으로 cloning된 DNA이기 때문에 학술적으로도 의미가 있다.

본 연구에서 확보된 IGFBP-3 항혈청과 ALS cDNA fragment clone은 연구 목적으로 타 연구자가 요청할 때 자유로이 분배해 줄 수 있기 때문에 학술적으로 기여할 수 있고, IGF-I RIA procedure의 확립 및 validation은 타 연구자에게도 좋은 참고 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

제 3 장 사양시험

제 1 절 서 언

본 사양시험은 거세 비육돈의 과비를 방지하여 도체 품질을 개선할 수 있는 현실적인 방법을 찾아내고, 성장과 IGF system과의 상호 작용을 규명하여 IGF system의 성장에서의 역할에 관한 통찰을 얻고자 착수되었다. 이와 같은 목적을 달성하기 위해 본 사양시험에서는 거세 비육돈에서 제한급여, 저에너지 사료 급여 및 anabolic steroids implantation를 병합 처리하였을 때 성장률, 도체의 질과 특성 및 IGF system의 발현에 미치는 영향을 구명하고자 한다. 또한 탐색적 연구로서 생체의 지방 비율을 높이는데 큰 역할을 하는 호르몬으로 예상되는 부신피질자극호르몬(adrenocorticotropic hormone; ACTH)을 거세돈에 능동면역시켰을 때 체성장에 미치는 영향도 구명할 것이다. 이와 같은 목적을 달성하기 위해 2장에서 기술된 준비 단계에서는 저에너지 사료와 대조사료를 개발하여 본 사양시험의 목적에 부합함을 확인하였고, 또한 돼지 혈청을 위한 IGF-I & IGFBP-3 RIAs를 개발하고 ALS cDNA fragment를 cloning하여 간의 ALS mRNA abundance 측정 방법을 확립하였다. 따라서 본 실험에서는 준비 단계에서 확립된 모든 방법과 재료들이 이용될 것이다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 공시돈

진주시 수곡면 소재 태원 농장에서 생체중 50kg되고 118±7일령의 LYYD 거세 비육돈을 선발하여 아래(Table 3-1)와 같이 2 × 2 × 2 factorial 실험설계 하에 8개의 돈방에 임의 배치하였다. 공시돈은 2주 동안의 새로운 환경과 실험사료에 적응하게 하고 실험 개시일에 경정맥으로부터 혈액 시료를

Table 3-1 Experimental design of the feeding trial

Feeding	Ad libitum				Restricteda			
Diet	Control		Low Energyb		Control		Low Energy	
Steroids	None	Impc	None	Imp	None	Imp	None	Imp
Number of animals	8	8	8	8	8	8	8	8

aGiven 80% ad libitum feed intake of the corresponding diet × steroids. For example, the fifth group from the left received 80% intake of the first.

bContains 85% digestible energy(DE) of the control diet(3509kcal DE/kg). Composition of the diets is shown in Table 2-1.

cImplanted with Revalor(140mg trenbolone acetate + 14mg estradiol-17β).

채취하고 steroids implantation 구에는 귀의 하단부에 Revalor H(Roussel UCLAF, France)을 implantation하였다. 사료섭취량은 매일 정해진 양을 급여한 후 이튿날 남은 사료를 계량하여 측정하였고, 제한급여 구의 사료급여량은 주단위로 해당 diet × steroids 구의 전주 사료섭취량의 80%를 급여하였다. 생체중은 매 3주 측정하였고 혈액 시료는 생체중 측정시 18 혹은 19 gauge needle을 이용하여 경정맥으로부터 채취하였다. 공시 혈액은 얼음에 넣어 실험실로 운반하여 하룻밤 동안 4。C에서 응고시킨 다음 4。C 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 수거하고 1ml씩 분주하여 분석할 때까지 –20。C에 보관하였다. 실험 개시일로부터 50일이 경과한 후부터는 주단위로 4주간 생체중이 105kg에 달한 공시돈을 각 돈방에서 골라내어 생체중을 측정하고 real-time ultrasonic scanner(Aloka SSD--500V, Aloka Co.)를 이용하여 10번째 늑골 부위에서 등심단면적을 추정하고 부산경남양돈축산업협동조합 산하 축산물공판장에 운반·계류 후 이튿날 아침 도축하였다. 내장 적출시 간 시료

를 채취하고 액체질소에 넣어 실험실로 운반하여 RNA 추출시까지 −70。C에 냉동 보관하였다.

2. 도체 특성 및 육질 분석

도체는 4。C에서 하룻밤 동안 냉각한 후 육류등급사에에 의해 도체 특성과 등급이 측정·판정되었다. 육질분석을 위한 시료는 등지방을 포함하는 배최장근을 잘라내어 얼음에 넣어 실험실로 운반하여 당일에 이화학적 분석을 수행하였다. 육색 및 등지방색깔은 배최장근 중앙 부분을 절단한 후 단면을 Chromameter(Minolta Co. CR 301)를 이용하여 측정하였다.

등지방경도는 냉장 보관중인 시료를 실온에 30분간 방치한 후 Rheometer(CR 100, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이때 분석 조건은 chart speed 120㎜/min, maximum load 2000g, 측정속도 20㎜, 시료의 높이 25㎜, adapter No. 4(직경 13㎜2)로 측정하였다.

배최장근의 pH는 마쇄한 시료 10g을 증류수 90㎖과 섞어 Polytron homogenizer로 14,000rpm으로 1분간 균질한 후 측정하였다.

등심의 수분과 지방 함량은 근육을 갈아서 A.O.A.C.(1993) 방법으로 분석하였다.

3. 혈청 분석

공시혈청의 IGF-I 및 IGFBP-3 농도는 2장에서 개발된 radioimmunoassays(RIAs)에 의해 측정하였다. IGF-I 및 IGFBP-3 RIAs의 intra- and inter-assay coefficients of variation은 각각 15.3% & 19.3% 및 13.5% & 10.6%이었다.

혈청의 estradiol-17β 및 testosterone 농도는 RIA kits(Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA)를 이용하여 제조자의 지시에 따라

측정하였다. 이들 RIAs는 각각 1회만 수행하였고 estradiol-17β RIA의 intra-assay coefficient of variation은 4.4%였다.

혈중 총 IGFBPs의 농도는 기 설명된 바(Hossenlopp 등, 1986; Lee 등, 1991)와 같이 1㎕ 혈청을 SDS-PAGE한 다음 nitrocellulose membrane(0.45㎛ pore size)에 electro-transfer하여 [125I]IGF-II를 이용한 Western ligand blotting으로 반정량(semi-quantitation)하였다. 포도당 농도는 GLU-P strip과 DRI-CHEM 3000(Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 정량하였다.

4. ALS Northern blotting & RNAse protection assay

-70。C에 보관되었던 간 시료로부터 total RNA는 Puissant와 Houdebine(1990)에 의해 수정된 guanidinium-phenol-chloroform extraction 방법으로 기 보고된 바(Lee 등, 1993)와 같이 추출하였다. ALS Northern blot analysis와 solution hybridization/RNAse protection assay는 2장에 설명된 바와 같이 각각 30㎍과 10㎍ total RNA를 분석하였다.

5. 통계분석

생체, 도체 및 호르몬 농도 측정치는 SAS(1986)의 general linear models procedure를 이용하여 분산분석을 수행하였다. 분석 모델에는 사양(feeding), 사료(diet) 및 implantation(steroids)의 주효과(main effects), 이들간의 3개의 상호작용(interactions) 및 feeding × diet × steroids가 포함되었다. 또한 동일 공시돈에 대한 반복된 호르몬 측정치에 대한 분산분석에서는 혈액 채취일과 그에 상응하는 interactions 및 공시돈 즉 animal(nested within feeding × diet × steroids)을 분석 모델에 첨가하였고 main effects와 main effects간의 상호작용의 유무는 animal(nested

within feeding × diet × steroids)를 error term으로 사용하여 분석하였다. 등지방두께와 등심단면적(loin muscle area; LMA) 측정치는 National Swine Improvement Federation(NC State Univ., 1995)의 지침에 따라 아래 공식에 의해 생체중 110kg 기준으로 보정하였다.

등지방두께 보정치=실측치+[(보정체중 – 실측체중)×실측 등지방두께÷
(실측 체중 – b)]; b=+30 for barrows(단위: 파운드)

LMA 보정치=LMA 실측치+[(보정체중 – 실측체중)×실측 LMA÷
(실측체중+155)]; 체중 단위는 파운드

제 3 절 결과

1. 성장 및 도체 형질

출하체중을 일정하게 하기 위해 공시돈을 생체중별로 매주 4회에 걸쳐 출하하였으나 제한급여 구의 출하체중이 자유급여 구보다 낮았다(Table 3-2). 일당증체량은 제한급여 및 anabolic steroids implantation에 의해 감소하였다. 도체중은 제한급여 및 저에너지 사료 급여에 의해 낮아졌는데 이는 대부분 이들 각각의 대조 구에 비해 출하체중이 낮았던 데 기인한다. 대조사료와 저에너지 사료 급여 구 간에 출하체중은 차이가 없었으나 저에너지사료 급여 구는 대조사료 급여 구에 비해 도체중과 도체율이 낮았다. 등지방두께는 저에너지 사료 급여와 steroids implantation에 의해 낮아졌으나 제한급여에 의해서는 영향을 받지 않았다. 반면, ultrasonic scanning에 의해 추정된 등심단면적은 제한급여에 의해 낮아졌다. A,B 등급 출현률은 실험 구간 가시적인 차이가 없었고, 괄목할만한 사실은

Table 3-2. Effects of restricted feeding, low energy diet and implantation of anabolic steroids on growth performance and carcass traits in finishing barrows

Item	*Ad libitum* feeding				Restricted feeding1				P<0.05
	Control diet		Low E2		Control diet		Low E2		
	None	Imp3	None	Imp3	None	Imp3	None	Imp3	
Initial wt (kg)	58.0 ±2.5	59.9 ±2.5	60.0 ±2.5	60.1 ±2.5	61.0 ±2.5	60.6 ±2.5	57.0 ±2.5	56.9 ±2.5	
Final wt (kg)	112.7 ±2.4	107.5 ±2.3	108.5 ±2.3	110.0 ±2.3	105.7 ±2.3	102.3 ±2.3	102.8 ±0.23	98.2 ±2.3	Feeding
ADG (kg)	0.96 ±0.04	0.81 ±0.04	0.86 ±0.04	0.79 ±0.04	0.78 ±0.04	0.67 ±0.04	0.74 ±0.04	0.61 ±0.04	Feeding, Imp
Carcass wr(kg)	82.7 ±1.87	78.3 ±1.75	78.1 ±1.75	79.3 ±1.75	76.8 ±1.75	74.5 ±1.87	72.2 ±1.75	70.1 ±1.75	Feeding Diet
Dressing (%)	75 ±1.0	72 ±0.9	72 ±0.9	71 ±0.9	72 ±0.9	72 ±1.0	70 ±0.9	71 ±0.9	Diet
BF thickness4 (mm)	22.3 ±1.58	17.5 ±1.47	20.0 ±1.47	18.0 ±1.47	22.7 ±1.47	18.4 ±1.58	15.7 ±1.47	15.3 ±1.47	Diet Imp
LMA5 (cm^2)	39.9 ±1.05	38.3 ±0.99	39.3 ±0.99	40.0 ±0.99	39.0 ±0.99	37.3 ±0.99	37.2 ±0.99	37.1 ±0.99	Feeding
A,B grade ratio6	6/7	〃	8/8	〃	6/8	〃	5/8	〃	not applicable
Feed/gain7	3.37	3.14	4.61	3.59	3.29	3.15	4.02	3.66	not applicable

※No two-way or three-way interactions observed

1 80% *ad libitum*

2 85% control diet ME

3 Revalor(140㎎ trenbolone acetate + 14㎎ estradiol-17β)

4 Corrected for 110kg body weight

5 Estimated by ultrasound and corrected for 110kg body weight

6 Implanted animals excluded(misjudged as boars at the slaughter house)

7 Mean values, all the other values: means ± SE

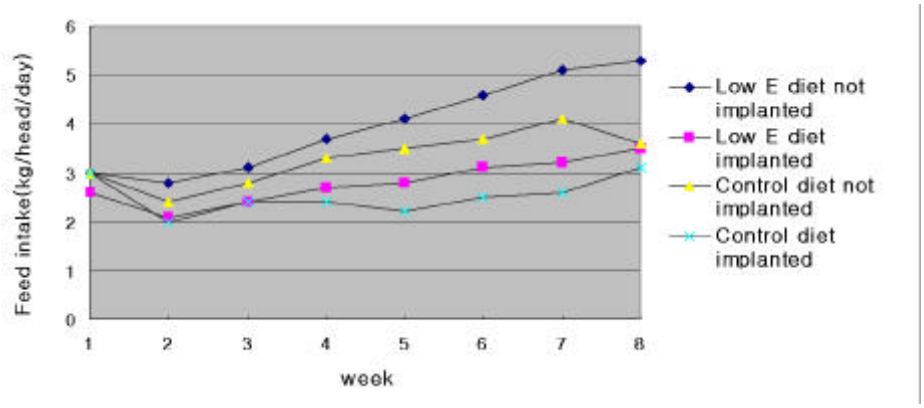

Fig. 3-1. Daily feed intake with increasing number of weeks of experiment in *ad libitum* groups

steroids implantation된 구의 공시돈은 거의 모두 수퇘지로 오판되었기 때문에 Tabe 3-2에서 제외시켰다. 또 한가지 괄목할만한 사실은 steroids implantation 구는 non-implanted 구에 비해 사료섭취량이 20 30% 감소하였다(Fig. 3-1).

등지방 경도는 실험처리 인자에 의해 영향을 받지 않았다(Table 3-3). 등지방의 백색도를 나타내는 L* 값은 각 처리간에 차이가 없었으나 적색도와 황색도를 나타내는 a* 값과 b* 값은 제한급여에 의해 증가하였다. 배최장근의 수분 함량은 제한급여와 steroids implantation에 의해 증가하였고, 반면 지방 함량은 이들 처리에 의해 감소하였다. 배최장근의 pH는 제한 급여 및 steroids implantation에 의해 증가하였으나 그 증가폭이 0.2 unit 이하이었기 때문에 생리·화학적 의미를 부여할 수는 없었다. 육색에 있어서 백색도를 나타내는 L* 값은 실험 처리간 차이가 없었으나 적색도와 황색도를 나타내는 a*와 b* 값은 steroids implantation에 의해 낮아졌다. Steroids implantation에 의한 b* 값의 저하는 제한급여했

Table 3-3. Effects of restricted feeding, low energy diet and implantation of anabolic steroids on physicochemical characteristics of the longissimus muscle section in finishing barrows1

Item			Ad libitum feeding				Restricted feedinga				P<0.05
			Control diet		Low Eb		Control diet		Low E		
			None	Impc	None	Imp	None	Imp	None	Imp	
Back fat	Hardness (g/cm2)		506 ±59	633 ±54	524 ±59	503 ±47	553 ±59	546 ±59	471 ±54	515 ±54	
	Color	L*	75.0 ±0.79	75.6 ±0.72	74.5 ±0.79	75.2 ±0.62	75.6 ±0.79	74.6 ±0.79	74.6 ±0.72	74.1 ±0.72	
		a*	3.82 ±0.52	3.17 ±0.48	3.17 ±0.52	3.78 ±0.41	3.35 ±0.52	4.96 ±0.52	4.63 ±0.48	4.01 ±0.48	Feeding
		b*	4.48 ±0.46	5.03 ±0.42	4.54 ±0.46	4.69 ±0.37	5.32 ±0.46	5.77 ±0.46	5.69 ±0.42	5.56 ±0.42	Feeding
Meat	Moisture (%)		72.3 ±0.53	74.2 ±0.49	73.3 ±0.53	74.3 ±0.42	74.0 ±0.53	74.7 ±0.53	73.7 ±0.49	75.2 ±0.49	Feeding Imp
	Fat(%)		3.86 ±0.37	3.20 ±0.34	3.09 ±0.37	3.04 ±0.29	2.91 ±0.37	2.37 ±0.37	3.02 ±0.34	2.09 ±0.34	Feeding Imp
	pH		5.48 ±0.08	5.56 ±0.07	5.52 ±0.08	5.53 ±0.06	5.57 ±0.08	5.86 ±0.08	5.47 ±0.07	5.69 ±0.07	Feeding Imp
	Color	L*	50.4 ±2.2	51.1 ±2.0	46.5 ±2.2	47.2 ±1.7	52.0 ±2.2	47.9 ±2.2	52.6 ±2.0	46.0 ±2.0	
		a*	8.60 ±0.84	7.26 ±0.77	6.62 ±0.84	6.72 ±0.66	7.73 ±0.84	6.58 ±0.84	9.38 ±0.77	6.67 ±0.77	Imp
		b*	5.50 ±0.59	4.89 ±0.54	4.50 ±0.59	4.84 ±0.46	5.67 ±0.59	4.01 ±0.59	6.44 ±0.54	4.22 ±0.54	Imp

1Dara represent means ± SE.

aFed 80% ad libitum feed intake.

bContains 85% energy of the control diet(3509kcal DE/kg).

cImplanted with Revalor(140mg trenbolone acetate + 14mg estradiol-17β).

을 때는 두드러졌고, 무제한 급여를 했을 때는 효과가 없었다(P value of feeding × steroids interaction<0.05).

2. 혈중 호르몬 및 대사물 농도

Table 3-4는 혈청의 포도당 및 estradiol, IGF-I, IGFBP-3 농도이다. 포도당의 혈중 농도는 실험 구간 차이가 없었다. 이 표에는 제시되지 않았으나 모든 공시돈의 testosterone 농도는 0.02ng/ml 이하이었기 때문에 모든 공시돈이 성공적으로 거세되었음이 확인되었다. Estradiol 농도는 steroids implantation된 공시돈 간에 변이가 크기는 하였으나 implanted 공시돈의 평균 농도는 non-implanted 공시돈의 농도보다는 높았다.

IGF-I 농도는 implantation에 의해 현저히 증가(non-implanted vs implanted = 187 vs 226ng/ml, SE = 7ng/ml)하였으나, 제한급여(무제한 급여 vs 제한급여 = 213 vs 200ng/ml, P = 0.16) 혹은 저에너지 사료 급여(대조사료 vs 저에너지 사료 = 210 vs 202ng/ml, P = 0.39)에 의해서는 변하지 않았다. 반면 IGF-I 농도는 공시돈이 성장하면서 증가하였다(P<0.01; Fig. 3-2).

IGFBP-3 농도는 실험 처리에 의해서는 변하지 않았으나 공시돈이 성장하면서 IGF-I 농도 증가에 비해 완만하게 증가하였다(실험개시일 vs 21일 vs 42일 = 3.0 vs 3.3 vs 3.4㎍g/ml, SE = 0.05㎍g/ml; P<0.01). 실험구간 IGFBP-3 농도는 [125I]IGF-II를 이용한 Western ligand blotting에서도 가시적인 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 3-3).

IGF-I과 IGFBP-3의 농도간 및 이들 각각의 농도와 성장 및 도체 특성과의 상관관계는 Table 3-5에 제시되었다. IGF-I 농도와 IGFBP-3 농도는 정의 상관관계가 있었다. 이들간의 상관관계는 실험이 진행되면서 즉 공시돈이 성장하면서 두드러졌고 steroids-implanted 공시돈보다 non-implanted 공시돈에서 더 두드

Table 3-4. Effects of restricted feeding, low energy diet and implantation of anabolic steroids on serum concentrations of glucose and hormones in finishing barrows

Item	*Ad libitum* feeding				Restricted feedinga				P<0.05
	Control diet		Low Eb		Control diet		Low E		
	None	Impc	None	Imp	None	Imp	None	Imp	
E2d (pg/ml)		47.1 ±10.5		23.8 ±10.5		35.0 ±10.5		15.5 ±10.5	Imp
IGF-Ie (ng/ml)	198 ±15	243 ±13	175±13	224 ±13	175 ±13	214 ±13	187 ±13	209 ±13	Imp
IGFBP-3 (μg/ml)	3.3 ±0.15	3.4±0.14	3.1 ±0.14	3.3 ±0.14	3.0 ±0.14	3.3 ±0.14	3.3 ±0.14	3.1 ±0.15	
Glucose (mg/dl)	91 ±3.0	93 ±2.7	90 ±2.7	92 ±2.7	88 ±2.7	90 ±2.7	91 ±2.7	87 ±2.7	

aFed 80% *ad libitum* intake.

bContains 85% energy of the control diet(3509kcal DE/kg).

cImplanted with Revalor(140mg trenbolone acetate and 14mg estradiol-17β).

dNon-implant groups were at the detection limit(3.34pg/ml).

eIncreased with increasing weeks of experiment(growth).

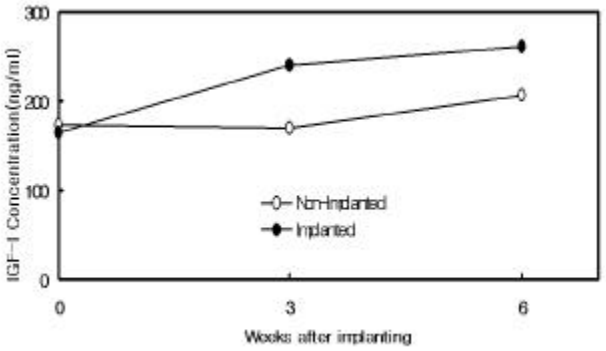

Fig. 3-2. Mean serum concentrations of IGF-I after implantation of Revalor(140mg trenbolone acetate + 14mg estradiol-17β).

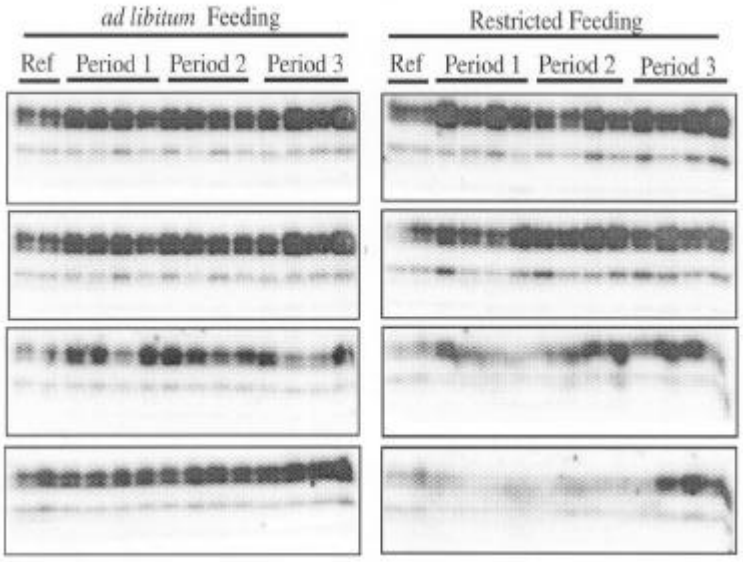

Fig. 3-3. Ligand blotting of serum IGFBPs. Four animals out of each group were randomly selected and 1㎕ serum out of each animal at each experimental period was subjected to 12.5% SDS-PAGE, electro-transfer onto nitrocellulose membrane, blotting with [^{125}I]IGF-II followed by autoradiography. On Ref lanes, same amounts of a pooled reference serum taken from market pigs were loaded; periods 1, 2 and 3 correspond to 0, 3 and 6 weeks after implantation of Revalor(140mg trenbolone acetate + 14mg estradiol-β). *Upper two row panels*, fed a control diet; *lower two row panels*, fed the low energy diet; *1st and 3rd row panels* from the top, non-implanted; *2nd and 4th panels*, implanted with Revalor(140mg trenbolone acetate + 14mg estradiol-β). On the blot, top two doublet bands correspond to glycosylation variants of IGFBP-3; middle and bottom dim bands are a mixture of unidentified IGFBPs and deglycosylated IGFBP-4, respectively.

러졌다(non-implanted 공시돈에서 실험개시일, 21일 및 42일에 대한 상관계수: 0.17, 0.40 & 0.54, P=0.34, 0.03 & <0.01, 결과 미제시). 실험 날짜에 관계 없이 일당증체량은 IGF-I 혹은 IGFBP-3 농도와 유의적인 상관관계가 없었다. 그러나 steroids-implanted 공시돈은 일당증체량은 감소한 반면 혈중 IGF-I 농도는 증가하였기 때문에 이러한 불일치를 감안하여 non-implanted 공시돈만을 고려하였을 때는 일당증체량과 실험 21일의 IGF-I 농도(r=0.69, P<0.01) 및 IGFBP-3 농도(r=0.50, P<0.01)는 높은 상관관계를 나타냈다(결과 미제시). 반면 등지방두께는 IGF-I 특히 실험 42일 IGF-I 농도와 부의 상관관계를 보였고, 실험 42일 IGF-I 농도와의 부의 상관관계는 non-implanted 공시돈에서도 명백하였다(r=−0.45, P=0.01). 배최장근의 지방 함량은 일당증체량 및 등심단면적과 정의 상관관계를 보였다. 물론 배최장근 지방 함량과 이들간의 유의적인 상관관계는 부분적으로는 제한급여와 steroids implantation이 이들 변수 모두를 저하시킨 데(Table 3-2) 기인하기는 하였으나 무제한급여, non-implanted 공시돈에서도 배최장근 지방함량과 일당증체량(r=0.48, P=0.16) 및 등심단면적(r=0.34, P=0.33)과는 전체 공시돈에서와 유사한 상관관계가 관찰되었다(결과 미제시).

Table 3-5. Pearson correlation coefficients between serum concentrations of IGF-I and IGFBP-3 and selected carcass traits

	Hormone		Growth and Carcass traits				
	IGF-I	IGFBP-3	ADG	Backfat	Dressing	LMAa	LM fatb
Correlation with hormone concentration at day 0 of Exp.							
IGF-I	·	0.19 (p=0.13)	0.21 (p=0.10)	0.02 (p=0.86)	−0.21 (p=0.10)	0.21 (p=0.09)	−0.02 (p=0.90)
IGFBP-3	·	·	−0.07 (p=0.55)	0.01 (p=0.91)	−0.04 (p=0.74)	−0.09 (p=0.48)	0.22 (p=0.15)
Correlation with hormone concentration at day 21 of Exp.							
IGF-I	·	0.44 (p<0.01)	0.16 (p=0.20)	−0.25 (p=0.05)	0.03 (p=0.83)	−0.05 (p=0.72)	0.05 (p=0.73)
IGFBP-3	·	·	0.22 (p=0.09)	−0.04 (p=0.75)	0.07 (p=0.62)	−0.06 (p=0.63)	0.12 (p=0.48)
Correlation with hormone concentration at day 42 of Exp.							
IGF-I	·	0.57 (p<0.01)	−0.02 (p=0.88)	−0.47 (p<0.01)	−0.18 (p=0.17)	−0.17 (p=0.18)	−0.18 (p=0.33)
IGFBP-3	·	·	−0.01 (p=0.93)	−0.7 (p=0.20)	0.02 (p=0.90)	−0.26 (p=0.04)	0.26 (p=0.09)
Growth and carcass traits							
ADG	·	·	·	0.24 (p=0.06)	0.23 (p=0.08)	0.33 (p<0.01)	0.47 (p<0.01)
Backfat	·	·	·	·	0.35 (p<0.01)	0.31 (p=0.01)	0.33 (p<0.02)
Dressing	·	·	·	·	·	0.14 (p=0.27)	0.46 (p<0.06)
LMA	·	·	·	·	·	·	0.01 (p=0.97)
LM fat	·	·	·	·	·	·	·

aLongissimus muscle area at the 10th rib.

bFat content of the whole longissimus muscle.

3. Northern blotting and RNAse protection assay

Fig. 3-4 & 5는 공시돈 간의 ALS Northern blotting과 solution hybridization/RNAse protection assay 결과이다. ALS mRNA abundance는 개체간의 변이가 크고, 해상도가 낮았으나 일괄하여 실험 처리간 가시적인 차이는 관찰되지 않았다.

Ad libitum Feeding				Restricted Feeding			
Control Diet		Low E		Control Diet		Low E	
None	Imp	None	Imp	None	Imp	None	Imp

Fig. 3-4. Northern blot analysis of hepatic ALS mRNA abundance. Thirty micrograms of total RNA were subjected to Northern blot analysis using a porcine ALS cDNA fragment as probe. Cnly the 2.2-kb ALS mRNA band is shown. See Section 4 of Chaper II for details. Ref, reference liver sample.

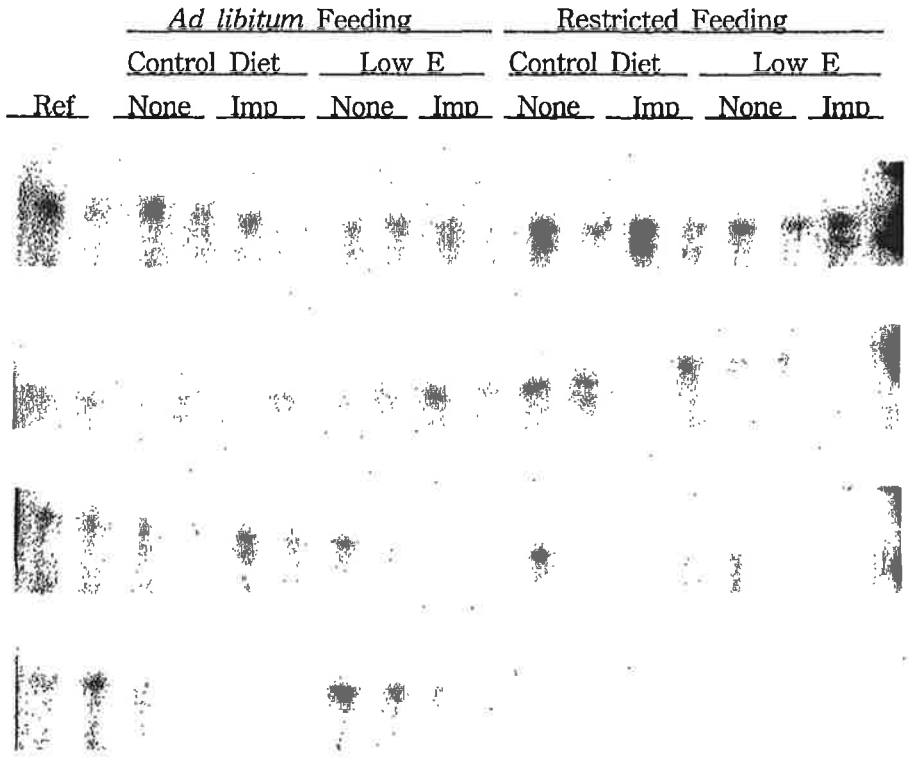

Fig. 3-5. Solution hybridization/RNAse protection assay of hepatic ALS mRNA abundance. Ten micrograms of total RNA were subjected to the assay using a ^{32}P-labeled, 303-nucleotide(nt) porcine ALS riboprobe. Only the 303-nt protected band is shown. See Section 4 of Chaper II for details. Ref, reference liver sample.

제 4 절 고 찰

1. 실용적 측면

가. 제한급여

제한급여는 예상대로(Leymaster와 Mersmann, 1991; 탁 등, 1994) 일당증체량을 저하시키고 통계적인 유의차는 없었으나 등지방 두께를 낮게하는 경향을 보였다. 도체 특성에 있어서 제한급여는 등지방의 백색도에 영향을 미치지 낳았고 배최장근의 지방함량을 낮추었다. 이상을 종합하면 제한급여는 육질에 크게 영향을 미치지 않고 거세돈의 과비를 방지할 수 있는 효과적인 방법으로 평가되나 자동급이 시설이 설치된 양돈 농가에서 제한급여의 현장 적용은 오히려 비현실적인 면이 많기 때문에 이 방법은 노동력에 크게 제한을 받지 않는 소규모 양돈장에서 과비 방지 방법으로 유효할 것으로 사료된다.

나. 저에너지 사료 급여

저에너지 사료 급여는 장과 정의 결과(1985)와 같이 등지방두께를 낮게 하고 통계적인 유의차는 없었으나 일당증체량을 낮추는 경향을 보였고, 등지방 질의 척도나 배최장근의 지방함량에는 영향을 미치지 않았다. 저에너지 사료 급여는 손쉽게 현장에 적용할 수 있기 때문에 이 방법은 양돈 농장의 규모나 시설에 관계없이 거세돈의 과비를 방지할 수 있는 가장 현실적인 방법으로 평가된다.

다. Anabolic steroids implantation

Anabolic steroids는 돼지에는 널리 적용되지는 않고 있으나

일반적으로 지방합성을 억제하는 반면 단백질 합성은 촉진하여 사료 효율을 높이는 효과가 있기(Galbraith와 Topps, 1981) 때문에 본 연구에서는 비교적 간편하게 돼지의 과비를 방지할 수 있는 가능성을 탐색하기 위해 steroids implantation을 시도하였다. 합성 androgen계인 trenbolone acetate와 estradiol을 함유하는 Revalor implantation에 의해 일당증체량과 등지방두께가 두드러지게 낮아졌다. 이 같은 결과는 Revalor implantation에 의해 일당증체량이 오히려 증가하였다고 보고한 Grandadam 등(1975)의 결과와는 대치되고 De Wilde와 Lauwers(1984)의 결과와는 일치하며, 등지방두께 감소는 이들 연구자들의 결과와 일치한다. 현재로서 Revalor implantation의 일당증체량에 미치는 영향이 연구자에 따라 다른 원인을 판명할 수는 없으나 본 실험의 결과만으로 볼 때 Revalor implantation에 의한 일당증체량과 등지방두께 감소는 무엇보다도 implantation된 실험구는 implantation 되지 않은 실험구에 비해 사료섭취량이 20 30% 감소하였던 한데 기인한 것으로 해석된다. 같은 맥락으로 본 연구의 결과는 또한 steroids implantation에 의해 사료 효율을 높일 수 있음을 시사한다.

Revalor implantation은 등지방 질의 척도에는 영향을 미치지 않았으나 근간지방 함량과 근육의 적색도를 낮게하여 전체적으로 육질에는 다소의 좋지 않은 효과가 있는 것으로 해석된다.

거세돈에서 Revalor implantation은 몇몇 바람직하지 못한 효과가 있음이 본 연구에서 관찰되었다. Revalor-implanted 공시돈은 모발이 현저하게 거칠어지고 잦은 승가행위를 보이는 등 상당한 웅성 행위를 나타냈고 도축장에서는 거의 모든(>90%) implanted 공시돈이 수퇘지로 오판되기도 하였다. 본 연구에서 Revalor-implanted

공시돈이 웅성형질을 나타낸 원인은 Revalor implanting pellets이 거세우를 대상으로 개발되었기 때문에 비록 trenbolone의 웅성호르몬 역가가 낮기는 하지만(Heitzman 등, 1977) 아마도 돼지에서는 androgenecity를 발현시키기에 충분한 용량이었던 것으로 추측된다.

라. 종합 평가

이상 각각 방법이 거세돈의 성장 및 도체 품질/특성에 미치는 효과는 상호작용이 없었고, 따라서 각각 방법의 병합 효과는 가산적이었다. 실용적으로 저에너지 사료가 거세돈의 과비를 방지하는 가장 간편하고 현실성 있는 방법으로 평가되고, 제한 급여는 추가 노동력이 요구되는 등의 현실적인 어려움 때문에 노동력 공급에 무리가 없는 소규모 양돈 농가에 적합할 것으로 사료되며, Revalor implantation은 implanting pellet에 함유된 합성 웅성호르몬 trenbolone의 부작용 때문에 실용성이 없는 것으로 평가된다. 그러나 본 연구의 결과는 anabolic steroids는 지방 침적을 억제하는데 탁월한 효과가 있고 사료효율을 높일 수 있는 가능성이 충분하다는 통찰을 제시하였기 때문에 추후에는 estrogen만을 implantation하는 실험을 재시도해 볼 가치가 있음을 제시한다.

현재 시장 상황하에서 위에 제시한 거세돈의 과비 방지 방법의 용도는 한정적이다. 본 연구가 착수될 때만 하여도 등지방두께가 20㎜ 이하로 낮아야 좋은 등급을 받을 수 있었으나 1998년 도체 등급 기준이 바뀌어 A,B 등급의 등지방두께 허용폭이 넓어짐에 따라 거세돈의 과비에 의한 도체 등급의 저하에 대한 염려가 감소되었다. 따라서 현실적으로 등지방두께가 지나치게 높은 거세돈군에서는 본 연구 결과가 좋은 지침으로 쓰일 수 있을 것이나 정상적인 거세돈

군에서는 본 연구에서 시도한 과비 방지법으로 일당증체량과 등지방 두께를 낮춤으로써 오히려 경제적인 손실이 초래될 수 있기 때문에 일부러 지방 침적을 억제할 필요가 없을 것이다. 그러나 국제적으로 돈육은 지방보다는 적육을 요구하기 때문에 앞으로 돈육 수출이 재개될 경우 본 연구의 결과는 현재보다 유용한 지침이 될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 학술적 측면

본 연구의 결과는 혈중 IGF system의 돼지 성장에서의 역할, 영양 및 anabolic steroids와의 상호작용 및 성장능력의 지표로서의 가능성 등에 대해 시사한 바가 크다. Non-implanted 공시돈에서 IGF-I 및 IGFBP-3의 혈중 농도와 일당증체량과의 정의 상관관계는 Owens 등(1999)의 보고와도 일치하는 결과로서 혈중 IGF-I 농도가 증체량의 좋은 척도가 될 수 있음을 시사한다. 또한 IGF-I 농도와 등지방두께와의 부의 상관관계는 혈중 IGF-I이 단백질 합성을 촉진하는 반면 지방합성을 억제하여 즉 anabolism을 높임으로써 체성장을 촉진시킨다는 개념과 일맥상통하는 것으로 해석될 수 있다 (Gluckman 등, 1991; Laager 등, 1993; Jones와 Clemmons, 1995). 같은 맥락으로 Revalor implantation에 의한 혈중 IGF-I 농도 증가와 체지방 감소는 거세우에서의 보고(Lee 등, 1990)와도 일치하는 결과로서 Revalor [trenbolone (androgen) + estrogen]의 anabolic action의 상당 부분이 IGF-I에 위해 매개됨을 시사한다. 그러나 trenbolone과 estradiol 중 어느 steroid가 IGF-I의 분비를 촉진하였는지를 판명하기 위해서는 추가의 연구가 요망된다.

Revalor implantation에 의한 일당증체량 및 지방침적 감소와

혈중 IGF-I 농도 증가는 해석상의 주의를 요한다. 이 같은 결과는 일당증체량 감소는 무엇보다도 implanted steroids에 의한 사료섭취량 감소에 기인한 간접적인 결과였고 IGF-I 농도 증가는 implanted steroids의 직접적인 효과이었기 때문에 본 연구 결과를 일당증체량과 혈중 IGF-I 농도가 일치하지 않는 것으로 해석해서는 타당치 않다. 바꿔 말하면 사료섭취량에 관계 없이 주어진 에너지 섭취량 한도 내에서 anabolic stroids는 IGF-I 분비를 촉진하고 IGF-I은 전자의 anabolic action을 매개하는 것으로 해석되어야 타당하다. 이러한 연유 때문에 IGF-I 및 IGFBP-3의 농도와 성장 형질과의 상관관계는 전체 공시돈과 non-implanted 공시돈으로 구분하여 결과를 제시하였다. 한편 혈중 IGF-I 및 IGFBP-3 농도는 에너지섭취량 제한에 의해 감소하는 것으로 널리 알려져 있으나(Hall 등, 1999), 본 연구에서 제한급여 혹은 저에너지 사료 급여에 의해 IGF-I 혹은 IGFBP-3 농도가 유의성 있게 낮아지지 않았던 점은 에너지섭취량이 자유섭취량의 수십 퍼센트 이하로 제한되어야 비로소 혈중 IGF system components의 농도에 변화가 일어날 수 있음을 의미한다. 이러한 관점에서 insulin system이 영양섭취상태를 거의 절대적으로 반영한다면 혈중 주요 IGF system components는 영양섭취와 anabolism 간의 부분적인 매개인자로 해석될 수도 있다.

제 5 절 탐색적 연구: ACTH 능동적 면역이 성장에 미치는 영향

1. 서언

주어진 유전적 배경과 영양 상태 하에서 동물의 성장률과 체성분 조성은 대부분 호르몬 작용에 의해 제어된다. 체성장 제어에는 여러 호르몬의 작용과 상호작용이 관여되나 골격과 근육 성장에는 성장호르몬이 중추적인 역할을 하고 지방조직 성장 혹은 지방 비율을 증가시키는 데는 insulin과 glucocorticoid(cortisol)의 작용이 큰 비중을 차지한다(Etherton과 Kensinger, 1984). Glucocorticoids는 뇌하수체에서 분비되는 adrenocorticotropic hormone(ACTH)의 자극을 받아 부신 피질에서 분비되는 catabolic hormone으로서 근육 단백질 분해를 촉진함으로써 간접적으로 생체의 지방 비율을 높이는 것으로 믿어지는 스테로이드 호르몬이다(Henricks 등, 1984). 따라서 면역학적으로 ACTH 혹은 glucocorticoid hormone의 작용을 차단함으로써 지방 비율을 낮출 수 있는 가능성이 있고, 실례로 Sillence 등(1992)은 쥐에 ACTH 항체를 주사함으로써 37%의 성장률이 증가되었다고 보고하였다. 그러나 ACTH를 능동적으로 면역시켰을 때의 효과는 보고된 바 없고, 더욱이 가축에 ACTH에 대해 능동면역시켰을 때 과연 쥐에서 피동적으로 면역시켰을 때(passive immunization)의 효과가 얻어질 수 있을 지의 여부는 미지수이다. 따라서 탐색 연구로서 본 실험에서는 거세돈을 육성·비육기 동안 ACTH에 대해 능동면역시켰을 때 체성장 및 체조성에 미치는 영향을 연구하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 실험 설계

3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide(MBS; Sigma)와 glutaraldehyde 두 종류의 cross-linker를 써서 keyhole limpets hemocyanin(KLH; Sigma) 혹은 human histone carrier protein에 돼지 뇌하수체에서 추출한 ACTH(Sigma) 혹은 cross-linker:carrier만을 cross-linking하여 실험구당 8두씩 면역시키는 2 × 2 × 2 factorial 실험설계(Table 3-6) 하에 본 실험을 착수하였다.

Table 3-6 Experimental design for the active immunization against ACTH

Cross-linker	MBS				Glutaraldehyde			
Carrier	KLH		Histone		KLH		Histone	
Hapten	None	ACTH	None	ACTH	None	ACTH	None	ACTH
# of animals	8	8	8	8	8	8	8	8

나. Hapten coupling

Hapten은 MBS와 glutaraldehyde를 이용하여 아래와 같이 carrier protein에 coupling시켰다.

1) MBS cross-linker

가) 70mg KLH와 human histone을 각각 4.4ml PBS(pH 7.4)에 용해

나) Rocker 위에서 875㎕ MBS 용액(25mg/4.16ml N,N-dimethyl-formamide(DMF; Sigma)]를 서서히 첨가하여 상온에서 30분간 혼합

다) Frit이 있는 column에 loading하여 침전물을 제거하여 보관하고 eluate는 받아서 Centricon-30로 농축

라) P-6 column(Biorad; 10ml bed volume)에 loading하여 1ml씩 받아 fractions 2 4(void volume) 혼합

마) 다)의 침전물을 가하여 suspension시킴

바) 70mg ACTH[in 13.2ml PBS, pH 7.4)와 혼합(최종 pH 7.0)
[이때 non-hapten coupling은 PBS와 혼합]

사) stirring plate 위에서 상온에서 3시간 혼합

아) 투석막(cut-off MW: 1000)에 넣어 1리터 PBS에 12시간 간격으로 4。C에서 3회 투석

자) PBS(pH 7.4)를 가하여 총 부피가 40ml되게 하고 5개의 aliquots로 나누어 -70。C에 보관

2) Glutaraldehyde cross-linker

가) 70mg KLH와 histone을 각각 15ml PBS(pH 7.4)에 용해

나) Fume hood 속에서 70mg ACTH 첨가
[이때 non-hapten coupling은 ACTH 첨가 없음)

다) 15ml 0.2% glutaraldehyde 15ml을 첨가하고 1시간 혼합

라) 50mM PBS(pH 7.2)에 용해시킨 1M glycine 용액을 첨가하여 (최종 glycine 농도: 200mM) 1시간 혼합(blocking)

마) 1)에서와 같이 투석 및 희석한 후 5 aliquots로 나누어 -70。C에 사용시까지 보관

다. ACTH 능동면역 사양시험

실험 당일 8종류의 carrier-conjugated ACTH 혹은 conjugated carrier aliquots를 용해시켜 동량의 Freund's complete adjuvant(Sigma)와 섞어 immunogen을 준비하였다. 진주시 수곡면 소

재 태원농장에 사육중인 생체중 25kg의 LYD 거세 육성돈 64두를 생체중을 측정한 다음 8두씩 위에서 준비한 immunogen 2ml/두 주사하고 8돈방에 나누어 사육하였다. 공시돈은 시판 육성돈 사료를 자유급여하였다. 최초 immunogen 주사후 매 4주에 immunogen을 Freund's incomplete adjuvant에 섞어 최초 immunogen 주사 때와 같이 booster injection하였다. 생체중은 booster injection 후 매 2주 측정하였고, 생체중 80kg 시에는 real-time ultrasonic scanner(Aloka SSD--500V, Aloka Co.)를 이용하여 10번째 늑골 부위에서 등지방두께와 등심단면적을 추정하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 3-7은 생체중 80kg까지의 일당증체량과 ultrasonic scanner를 이용하여 추정한 등지방두께 및 등심단면적이다. 이상의 결과 일당증체량과 등심단면적은 coupler와 coupler 및 carrier의 영향 받았으나 ACTH hapten에 의한 능동면역의 효과는 관찰되지 않았다. 그러나 공시돈이 출하되기까지는 아직 상당한 시일이 요구되기 때문에 ACTH 능동면역에 의한 항체 형성의 여부와 titer, 혈중 cortisol 농도 및 성장에 미치는 영향은 좀 더 관찰되어야 종합적인 결론을 내릴 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3-7. Growth parameters of barrows actively immunized against ACTH with different couplers and carriers.

Item	MBS				Glutaraldehyde				P<0.05
	KLH		Histone		KLH		Histone		
	None	ACTH	None	ACTH	None	ACTH	None	ACTH	
Initial wt(kg)	28.4 ±1.4	25.0 ±1.6	25.4 ±1.4	28.4 ±1.4	26.1 ±1.4	25.9 ±1.4	25.1 ±1.4	23.9 ±1.4	
Final wt (kg)	83.0 ±3.2	77.6 ±3.2	79.0 ±3.0	77.5 ±3.0	81.3 ±3.0	86.4 ±3.0	81.6 ±3.0	76.4 ±3.2	
ADG (gm)	805 ±41	767 ±44	801 ±38	733 ±38	804 ±38	903 ±38	843 ±38	785 ±41	coupler
Backfata (mm)	10.2 ±0.8	11.8 ±0.8	11.4 ±0.8	10.8 ±0.7	9.5 ±0.7	10.1 ±0.7	11.6 ±0.7	10.3 ±0.8	
LMA[a,b] (cm^2)	29.9 ±1.3	30.9 ±1.3	34.4 ±1.3	31.2 ±1.2	31.4 ±1.2	31.9 ±1.2	35.8 ±1.2	34.8 ±1.3	coupler carrier

[a]Corrected for 80kg body weight.

[b]Loin muscle area corrected for 80kg body weight.

제 4 장 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 주요 결과와 제언

다음은 본 연구개발 과제의 주요 결과와 결과의 유용성에 관한 제언이다.

1. 저에너지 사료

가. 강피류 함량이 높은 거세 비육돈 용 저에너지 사료 개발

나. 저에너지 사료는 거세 비육돈의 등지방 침적을 낮추 수 있음을 확인 : 과비한 거세돈은 본 사료가 유용하게 쓰일 수 있음

다. 참여 사료공장은 저에너지 사료를 새로이 등록하고 홍보함 (본 보고서의 배포는 좋은 홍보 자료가 될 것임)

2. 제한 급여

가. 제한 급여는 지방 침적을 억제하고 성장률을 낮춤

나. 소규모 농장에서 거세돈의 과비 방지법으로 유용할 것임

3. Revalor(trenbolone + estradiol pellets) implantation

가. 지방 침적과 증체율 억제 및 사료효율 향상 효과 확인

나. Trenbolone이 외부생식기를 발달시켜 도축장에서 거세돈이 수퇘지로 오판되는 단점 때문에 현장 적용은 부적절 (estrogen만을 implantation하는 방법은 재시도의 가치가 있음)

4. IGF system 연구

가. IGFBP-3

1) IGFBP-3를 정제하여 항혈청을 만들고 RIA 개발

2) 비영리 연구를 위한 요청 시 IGFBP-3 항혈청을 공급할 수 있음

나. ALS cDNA fragment

1) 300-bp 돼지 ALS cDNA fragment cloning & sequencing

2) 비영리 연구를 위한 요청 시 cDNA clone을 공급할 수 있음

다. 영양, 사양 및 anabolic steroids와 IGF system과의 상호작용

1) IGF-I: 혈중 농도는 Revalor implantation에 의해 증가

사료 섭취량 및 에너지 함량과는 무관

증체율과 등지방두께와는 각각 정 & 부의 상관관계

2) 혈중 IGFBP-3 농도:

증체율과 정의 상관관계

사료섭취량, 에너지 함량 및 Revalor implantation과 무관

3) 간의 ALS mRNA 수준:

실험 처리에 의해 가시적인 변화가 관찰되지 않았음

4) IGF-I과 IGFBP-3 혈중 농도를 성장의 지표로 사용할 수 있는 가능성 제시

5. ACTH 능동면역

1) 비육 중기까지 ACTH 능동면역이 체성장에 가시적인 영향 없음

2) 탐색과제로서 출하시까지 관찰·측정 요망(예정)

제 2 절 연구 성과(발표 논문)

1. 이철영. 2000. Insulin-like growth factor system과 성장, 대사 및 영양과의 관계. 한국동물자원과학회지(인쇄중).

2. 이철영, 정정수. 2000. 암퇘지와 거세돼지의 성장발달에 따른 혈중 insulin-like growth factor(IGF-I)과 IGF-binding protein-3(IGFBP-3)의 농도 양상: 돼지 IGFBP-3 정제, IGFBP-3 및 IGF-I RIAs 개발과 이용. 한국동물자원과학회지(심사중).

3. 이철영, 이희포, 제길수, 송영민, 이진희, 심만섭, 김병우, 이정규, 진상근, 김철욱. 1999. 제한급여, 저에너지사료 급여 및 anabolic steroids implanting이 거세비육돈의 체성장에 미치는 영향, 제 8회 축산분야 종합학술대회, Proceedings p211 (초록)

4. 이철영, 정진희. 2000. 제한급여, 저에너지사료 급여 및 anabolic steroids implanting이 거세비육돈의 체성장과 혈중 IGF-I 및 IGF-binding protein-3 농도에 미치는 영향, 제 9회 축산분야 종합학술대회, Proceedings Vol. II, p78 (초록)

5. Lee CY, Kwak I, Simmen RCM, Simmen FA. 1999. Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit (ALS) of the 150-kilodalton IGF-binding protein complex. Program & Abstracts of the 81st Annual Meeting of the Endocrine Society, p411 (Abstract)

6. 논문 준비중:

Lee CY et al. Effects of restricted feeding, low energy diet and implantation of anabolic steroids on growth and circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in finishing barrows.

제 5 장 인 용 문 헌

1. A.C.A.C. 1993 Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
2. Baldwin BA, Cooper TR, Parrott RF 1982 Effect of cholecystokinin octapeptide on food intake in pigs. Proc Nutr Soc 41: 119-121
3. Baxter RC, Dai J 1994 Purification and characterization of the acid-labile subunit of rat serum insulin-like growth factor binding protein complex. Endocrinology 134: 848-852
4. Baxter RC, Martin JL, Beniac, VA 1989 High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. J Biol Chem 264: 11843-11848
5. Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Coi GT 1996 Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. Proc Natl Acad Sci USA 93: 10028-10033
6. Dai J, Baxter RC 1992 Molecular cloning of the acid-labile subunit of the rat insulin-like growth factor binding protein complex. Biochem Biophys Res Commun 188: 304-309
7. Delhanty P, Baxter RC 1996 The cloning and expression of the baboon acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. Biochem Biophys Res Commun 277: 897-902
8. Etherton TD, Kensinger RS 1984 Endocrine regulation of fetal and postnatal meat animal growth.J Anim Sci 59: 511-528
9. Galbraith H, Topps JH 1981 Effect of hormones on the growth and body

composition of animals. Nutr Abst Rev-Series B 51: 521-540

10. Gluckman PD, Douglas RG, Ambler GR, Breier BH, Hodgkinson SC, Koea JB, Shaw JHF 1991 The endocrine role of insulin-like growth factor I. Acta Pediatr Scand 372(suppl): 97-105

11. Grandadam JA, Scheid JP, Jobard A, Dreux H, Boisson JM 1975 Results obtained with trenbolone acetate in conjunction with estradiol 17β in veal calves, feedlot bulls, lambs and pigs. J Anim Sci 41: 969-977

12. Hall K, Hilding A, Thoren M 1999 Determinants of insulin-like growth factor-I. J Endocrinol Invest 22(suppl): 48-57

13. Heitzman RJ 1979 The efficacy and mechanism of action of anabolic agents as growth promoters in farm animals. J Steroid Biochem 11: 927-930

14. Heitzman RJ, Chan KH, Hart IC 1977 Liveweight gains, blood levels of metabolites, proteins and hormones following implantation of anabolic agents in steers. Br Vet J 133: 62-70

15. Henricks DM, Cooper JW, Spitzer JC, Grimes LW 1984 Sex differences in plasma cortisol and growth in the bovine. J Anim Sci 59: 376-383

16. Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S, Binoux M 1986 Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding sites. Anal Biochem 154: 138-143

17. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ 1989 PCR Protocols A Guide to Methods and Applications. Eds, Academic Press

18. Jones JI, Clemmons DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev 16: 3-34

19. Kirby CJ, Armstrong JD, Huff BG, Stanco RL, Harvey RW, Heiner EP, Campbell RM 1993 Changes in serum somatotropin, somatotropin mRNA, and serum and follicular insulin-like growth factor-I in response to feed restriction in cows actively immunized against growth hormone releasing factor. J Anim Sci 71: 3033-3042

20. Laager R, Ninnis R, Keller U 1993 Comparison of the effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and insulin on glucose and leucine kinetics in humans. J Clin Invest 92: 1903-1909

21. Lee C-Y 1988 Effects of castration and anabolic steroid implants on serum hormones, weight gain and body composition in young cattle. MS Thesis, Clemson University, U.S.A.

22. Lee CY, Bazer FW, Etherton TD, Simmen FA 1991 Ontogeny of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in porcine serum during fetal and postnatal development. Endocrinology 128: 2336-2344

23. Lee CY, Chung CS, Simmen FA 1993 Ontogeny of the porcine insulin-like growth factor system. Mol Cell Endocrinol 93: 71-80

24. Lee CY, Henricks DM 1990 Comparisons of various acidic treatments of bovine serum on insulin-like growth factor-I immunoreactivity and binding activity. J Endocrinol 127: 139-148

25. Lee CY, Henricks DM, Skelley GC, Grimes LW 1990 Growth and hormonal response of intact and castrate male cattle to trenbolone acetate and estradiol. J Anim Sci 68: 2682-2689

26. Lee CY, Rechler MM 1995a A major portion of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) complex in adult

rat serum contains unoccupied, proteolytically nicked IGFBP-3 that binds IGF-II preferentially. Endocrinology 136: 668-678

27. Lee CY, Rechler MM 1995b Purified rat acid-labile subunit and recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 can form a 150-kilodalton binary complex *in vitro* in the absence of IGFs. Endocrinology 136: 4982-4989
28. Lee CY, Rechler MM 1996 Proteolysis of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in 150-kilodalton IGFBP complexes by a cation-dependent protease activity in adult rat serum promotes the release of bound IGF-I. Endocrinology 137: 2051-2058
29. Leong SR, Baxter RC, Camerato T, Dai J, Wood WI 1992 Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. Mol Endocrinol 6: 870-876
30. Liu JL, LeRoith D 1999 Insulin-like growth factor I is essential for postnatal growth in response to growth hormone. Endocrinology 140: 5178-5184
31. Martin JL, Baxter RC 1986 Insulin-like growth factor binding protein from human serum. J Biol Chem 261: 8754-8760
32. NRC 1988 Nutrient Requirements of Swine. 9th Revised Edition, National Academy Press, Washington, D. C.
33. NRC 1998 Nutrient Requirement of Swine. 10th Edition, National Academy Press, Washington, D. C.
34. Owens, PC, Gatford, KL, Walton PE, Morley W, Campbell RG 1999 The relationship between endogenous insulin-like growth factors and growth in pigs. J Anim Sci 77: 2098-2103

35. Puissant C, Houdebine L-M 1990 An improvement of the single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. BioTechniques 8: 148-149

36. Rechler MM, Clemmons DR 1998 Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. Trends Endocrinol Metab 9: 176-183

37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd eds, Cold Spring Harbor Laboratory

38. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467

39. SAS User's guide: Statistics. 1986. SAS Inst, Inc., Cary, North Carolina, USA

40. Sillence MN, Jones MR, Lowry P, Bassett JR 1992 Passive immunization with antiserum to adrenocorticotropin increases weight gain in normal female rats. J Anim Sci 70: 1382-1388

41. Sczesniak AS, Brandt MA, Friedman H 1963 Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and sensory methods of texture evaluation. J Food Sci 28: 397-403

42. Ueki I, Coi GT, Tremblay ML, Hurst KR, Bach LA, Boisclair YR 2000 Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. Proc Natl Acad Sci USA 97: 6868-6873

43. Walton PE, Baxter RC, Burleigh ED, Etherton TD 1989 Purification of the serum acid-stable insulin-like growth factor binding protein from

the pig (*sus scrofa*). Comp Biochem Physiol 92: 561-567

44. Walton PE, Etherton TD 1989 Effects of porcine growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on immunoreactive IGF binding protein concentration in pigs. J Endocrinol 120: 153-160

45. Zapf J, Born W, Chang J-Y, James P, Froesch ER, Fischer JA 1988 Isolation and NH2-terminal amino acid sequences of rat serum carrier proteins for insulin-like growth factors. Biochem Biophys Res Commun 156: 1187-1194

46. 김윤숙, 박우문, 유익종 1996 수퇘지 웅취 판별기술개발. 한축지 38: 85-93

47. 이철영 1996 Insulin-like growth factor system의 생식기능에서의 역할: 자궁편. 대한불임학회지 23: 247-268

48. 장 원경, 정숙근 1985 돼지의 사양기술에 관한 연구. 시험연구보고서 농촌진흥청 축산시험장

49. 탁태영, 정일병외 양돈과 전직원, 조성근, 황의경, 윤순식, 신진호, 김상철, 박정운, 이종하, 변상천, 안기홍, 진길부, 김태봉, 김대성 1994 고품질 수출돼지 생산을 위한 종합 사양 기술 확립 연구. 시험연구보고서 농촌진흥청 축산시험장