최 종
보고서

돼지의 산자수 증대를 위한 관련 유전자의 동정 및 고능력돈 선발용 kit개발

고려대학교

농 림 부

제출문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 " 돼지의 산자수 증대를 위한 관련 유전자의 동정 및 고능력돈 선발용 kit개발 " 의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. 28.

주관연구기관명: 고려대학교
총괄연구 책임자: 홍기창
세부과제 책임자: 박성수
세부과제 책임자: 고용
연구원: 서동삼
김지은
조시영

요 약 문

Ⅰ. 제 목

돼지의 산자수 증대를 위한 관련유전자의 동정 및 고능력돈 선발용 kit개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가축육종의 역사는 우수한 능력을 지닌 개체 또는 품종을 이용한 지속적인 선발과 교배로부터 시작되어 최근 인공수정술의 도입에 의하여 광범위한 개량의 효과를 거두고 있다. 최근 분자생물학의 발전과 유전자 조작을 이용한 형질변환동물의 작출 등이 가능해 짐에 따라 가축육종분야에서도 또한 양적형질들(quantitative traits)에 대한 미세분석을 통하여 유전형질의 후대전달을 보다 구체적으로 구명할 수 있게 되었다. 즉, 특정 양적형질을 대상 후대 개체에서 해당 유전자의 유무 내지는 변이의 양상을 DNA의 분석으로 발달 또는 발생 시기에 관계없이 확인 가능해짐으로 선별에 신속성이 부가되었다. 번식기능과 관련된 형질에 대한 분석은 곧바로 생산성과 직결된 사안이기 때문에 가축을 이용한 산업분야에서 그 의미가 매우 크다. 그동안 산자수 증가를 위한 선발노력이 여러 동물종을 대상으로 시도된 바 있으나 현재까지 그 실효성이 구체화된 예는 없는 실정이다. 이는 유전형질의 후대전달을 검증할 수단의 부재와 번식형질 자체가 성에 의존적인 점 등에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 번식기능은 그 자체가 유전적요인 외에 사양관리로 요약되는 다양한 환경적, 영양적 및 이에 따른 생리적 기구의 변화요인 등에 의하여 조절되기 때문에 그 분석이 더욱 어려웠다. 번식기능과 관련된 형질과 같이 복잡한 형질의 유전적 조절요인에 대한 분석에는 그 조절유전자에 대한 구체화와 형질 발현도정에 일어나는

생화학적 과정에 대한 이해가 필수적이다. 양적형질의 분석을 위한 가능한 접근 방법으로 표지유전자의 이용을 들 수 있다. 표지유전자에 의한 염색체상의 유전자좌위의 간접적인 추정은 작성된 연관지도와의 동시 분석에 의하여 보다 구체화 할 수 있다. 이와 같이 염색체상 위치에 대한 윤곽이 밝혀지면 유전자 탐색은 대상형질의 발현에 깊은 관련이 있는 개개 유전자의 분리와 cloning으로 진행시킬 수 있다. 이러한 접근 방법은 이미 인간을 대상으로 한 의학적 내지는 생화학적 연구를 통하여 밝혀진 유전자를 후보유전자로 하여 가축의 해당 유전자가 지니는 높은 구조적 유사성 (homology)을 근거로 동정하는 방법을 이용할 수 있다.

본 연구는 전통적인 육종에서 사용되어온 지속적이고 반복적인 교배를 통한 가축의 양적형질의 개량은 급변하는 시대적 요구에 순발력 있게 대응하는 개체의 선발을 위한 적합한 방법으로서의 가치가 하락하고 있으므로 이의 개선책을 마련하고자 하였다. 보다 구체적인 유전적 요인의 해부로 육종효과에 대한 정확한 예측을 가능케 하는 기술의 개발이 절실한 시점에서 우선적으로 선결하여야 할 과제로 양적형질을 지배하는 유전자의 분리 동정을 들 수 있다. 선별된 유전자에 의하여 지배되는 번식능력의 발현에 유전외적요인이 될 수 있는 번식기능과 관련된 내분비적 요인의 구명은 현재 국내 번식학 분야에서 돼지 뿐 만 아니라 전 가축을 대상으로 그 필요성이 보편적으로 요구되고 있다. 현재 이 분야는 수정란이식관련 인력의 훈련과 배양이 과거 10여 년간 충실하게 진행되어 온 것에 비교하여 간과되어 왔으나 그 중요성은 학문적 또는 산업적 측면에서 매우 중요하다. 앞에서 언급한 바와 같이 번식현상 자체가 다양한 요인에 의하여 발현되는 것임을 고려하면 이 두 분야의 기술적 지식의 깊이를 갖추는 것이 바로 경쟁력 확보의 우위를 선점할 수 있는 요건임은 자명한 사실일 것이다.

종돈의 관리 또한 유전자 분석에 의한 정확한 지표의 설정으로 우량한 개체의 조기선발이 가능해짐에 따라 보다 효율적이고 용이하게 이루어 질 수 있으며 이는 곧바로 생산비용의 절감과 직결될 것이다. 현재 양돈 선진국에 의존하는 종돈의 공급과 양돈기술의 도입에 의해서는 더 이상 소비자에게 설득력 있는 생산품의 공급이 어려워 질 것이다. 양돈경영이 번식돈과 비육돈 전업의 두 형태로 국내 양돈경영 유형을 고착시켜야 할 시점에

서 번식성적의 향상은 양돈경영에서 전반적인 생산비의 절감을 유도할 수 있는 시급한 과제이다. 또한 국제적으로 경쟁력을 갖춘 고유하며 중요도가 높은 양돈경영상 know-how의 개발이 시급하다. 이는 바로 본 과제에서 추구하는 양적형질을 지배하는 유전자의 동정과 이의육종을 통한 경영의 개선으로 가능하다. 이러한 인식은 국제적인 공통의 과제이며 국내에서도 시급하게 이에 대한 연구개발이 이루어 져야 할 것이다. 특히 돼지는 그 생리적 기능과 기전이 인간과 유사한 것으로 알려져 의약품 생산을 위한 bioreactor로서의 가치가 높은 동물이다. 최근에 널리 시도되고 있는 유전자변환동물 기술의 발전 추세에 비추어 돼지에 대한 유전학적 및 유전공학적 연구는 축산업의 차원을 넘어서 생물관련 산업분야의 향후 경제적 국제경쟁력확보를 위하여 필수적이다.

복당 산자수의 증가는 생산비에서 가장 높은 비율을 차지하는 번식능력의 향상이며 또한 동일한 생산성을 위한 종돈의 유지관리비의 절감 효과를 거둘 수 있는 보다 직접적인 방법이다. 유전자에 대한 구체적 조명은 육종효과의 극대화를 도모할 수 있음으로 사회적 및 시대적 요구에 보다 신속하게 대응할 수 있는 양돈산업의 개선효과를 거둘 수 있을 것으로 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1 세부과제 : 산자수 관련 유전자의 검색 및 cloning

기존에 보고된 연구(Rothschild 등, 1996)에서의 estrogrn receptor(ER) 염색체 좌위분석 자료를 근거로, 여러 종돈사이에 특이하게 발현되는 염색체 좌위를 찾기위해 human ER을 표지 유전자의 다형현상을 분석한 결과 동일한 연구결과를 확인하였다. 이에 다형현상에 의한 selection marker로써 ER 유전자의 이용가능성이 사료되기 때문에 염기서열의 유사성이 높은 돼지 ER 유전자를 RT-PCR과 5'-RACE에 의해 얻은 cDNA를

cloning하여 ER 유전자의 염기서열을 분석하였다. 나타난 결과에 의하면 본 연구에서 얻어진 돼지 ER 유전자의 염기 서열은 기존에 보고된 것과 약간 상이하였으며 이 것을 이용하여 산자수와 관련된 ER유전자에 대한 다형 현상을 밝히기 위해 클로닝한 돼지 ER cDNA를 표지유전자로 하여 산자수 생산능력에 있어 차이를 보이는 대상군의 genomic DNA를 분리하여 제한효소로 절단한 후 다양한 돼지 ER cDNA의 단편들을 probe로 사용하여 Southern blotting을 수행하였다. 현재 다형현상을 나타내는 돼지 genomic 상의 DNA 부분을 λFIX II vector (Stratagene)를 이용하여 library를 만들고 이를 위에 염기서열을 표시한 DNA를 가지고 선별하고 있는 중이다. 이 작업이 완료되면 PCR에 의해 신속하고 편리하게 산자수를 결정할 수 있는 primer를 제작할 수 있을 것으로 기대한다. 또한, ER 유전자가 멘델의 유전법칙에 따라 후대에 그 유전양식이 전달 되는지도 분석하였다.

2. 제 2 세부과제 : 산자수 관련 후보 유전자의 분포 및 생산 능력간의 상관분석

번식능력에 대한 유전적 특성을 파악하기 위하여 고능력 모돈군과 저능력 모돈군을 표본 추출하여 기초군의 총산자수·생시체중·포유두수 이유두수 및 이유시체중의 번식능력을 조사하였으며, 이에 대한 유전력과 반복력을 추정하였고 이에 세분화하고 계열화된 결과를 위하여 기초군의 산차에 따른 번식능력을 조사, 분석하였다. 또한, hER 유전자와 돼지에서의 중요한 번식형질인 생시 복당 총산자수 (total number born, TNB)와 생시 복당 실산자수 (number born alive, NBA)상관분석을 위해, 표본 추출된 5산차이상의 경산돈을 대상으로 Southern과 PCR-RFLP 분석을 수행하였고, 이들의 TNB 와 NBA를 산차별로 조사분석하였다. 앞서 시행한 연구를 바탕으로 하여 전 돈군, 전 산차에 걸쳐 모든 경산돈들을 임의 추출하여 hER 유전자 좌위에 있어서 유전자빈도의 산출을 최다 우도 추정법 (MLE)에 따라 추정하였다. 또한 산자수에 영향을 미치는 각각

의 효과를 살펴보기 위해 고정모형효과를 이용하여 산자수 관련 후보 유전자의 분포 및 생산능력간의 상관분석을 실시하였다.

3. 제 3 세부과제 : 다산종의 번식, 생리적 특성 구명

IGF 발현을 조절하는 인자들에는 steroid (estrogen), growth hormone, 다른 growth factor 영양상태등이 알려져 있다. 이들에 의하여 IGF계의 구성요소들인 IGF-Ⅰ, IGF-Ⅱ, type Ⅰ과 Ⅱ 수용체(receptor), IGF binding protein등의 발현이 변화되며 이는 이미 번식능력과 깊은 상관관계가 있음이 밝혀진바, 본 연구에서는 임신이 되기까지 성주기 동안에 일어나는 성장인자들의 형질변화를 Radioimmunoassay (RIA)를 실시하여 종돈군간 비교, 분석하였고, 자돈과 모체의 호르몬과 성장인자 발현정도에 따라 우량 종돈군과 열성 종돈군을 선발하고 이를 유전자형과의 연관성을 비교, 분석하였다. 여기에 종돈군내 스테로이드 호르몬 분석, 종돈군내 성장인자 결합 단백질 (IGF Binding Protein)의 분석과 종돈군간 성장인자와 호르몬의 발현분석을 하여 종돈군간 번식능력 차이를 보이는 형질인자 발견에 초점을 두었다. 또한 ER유전자형에 따른 함량을 조사하여 유전자형에 따른 내분비인자의 발현양상을 비교 분석하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 제 1 세부과제 : 산자수 관련 유전자의 검색 및 cloning

돼지의 산자수와 높은 상관관계를 갖고 있는 것으로 보고된

(Rothschild 등, 1996) human estrogen receptor (hER) 유전자를 표지 유전자로 이용하여 돼지에서 산자수에 대한 유전자 다형성 (AA, AB, BB형) 을 분석하여 이를 기초로 하여 돼지 ER에 대한 cDNA를 다음과 같이 cloning하였다.

① Porcine ER cDNA의 RT-PCR partial cloning

돼지의 난소 조직으로 추출한 RNA를 RT-PCR 반응을 통해서 전제 크기 1788 kb인 돼지 ER 유전자 중에서 891 bp 부분을 cloning하였고, 제한효소 지도를 제작하여 확인하였다. 돼지의 산자수 증진과 연관성이 보고된 estrogen receptor (ER) 유전자 좌위에서의 다형성을 비교·검토하기 위하여 Southern-RFLP를 실시하였고, 신속한 ER 유전자형 판별을 위하여 PCR-RFLP 기법을 확립하였다. 이를 근거로 고능력·저능력과 ER간의 연관지도 작성을 위하여 ER유전자형의 유전 양상을 분석하였다. 또한 신뢰도가 높은 표지유전자를 개발하기 위하여 돼지에서 ER 유전자를 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 방법을 이용하여 cloning 하였다.

Southern-RFLP는 돼지 게놈 DNA를 제한효소 *Pvu*II로 처리한 후 비방사선 동위원소로 표지된 human estrogen receptor 유전자를 탐식자로 하여 진행되었다. PCR-RFLP는 Southern-RFLP를 통해서 유전자 다형 현상을 보이는 돼지 게놈상의 *Pvu*II 절단부위 120 bp를 증폭한 다음 *Pvu*II 제한효소로 절단함으로써 개체의 유전자형을 분석하였다. 종돈장에서 표본 추출한 61두의 Yorkshire 경산돈들의 Southern 및 PCR -RFLP의 유전자형은 AA, AB 그리고 BB형이 관찰되었다. ER 유전자 유전양상을 종돈군내에서 파악하기 위해서 가계를 선정하였고, PCR-RFLP를 통하여 그 유전양상을 분석하였다. 이미 앞선 연구에서 891 bp의 돼지 ER 유전자 염기서열을, 5'-RACE 방법을 통하여 돼지 ER 유전자의 5'부위 734bp를

cloning 하였고, 염기서열의 분석과 ER 유전자의 제한효소 지도작성을 통하여 돼지 ER 유전자의 1차 구조를 분석하였다.

이 연구를 기본으로 하여, RT-PCR로 얻은 pER의 cDNA full length를 cloning 하여 Rhothschild등 (1996)이 연구 보고한 hER과 비교 분석하였다.

② Porcine ER cDNA의 RT-PCR full length cloning

돼지 estrogen receptor (ER)의 full-length cDNA를 cloning 하여 그 염기서열을 분석하였다. 돼지의 난소 조직으로 추출한 RNA를 RT-PCR 반응을 통해서 돼지 ER 유전자중 3′에서 894 bp 부분을, 5′-RACE을 이용하여 5′에서 751 bp를 cloning 하였고 이를 바탕으로 estrogen receptor (ER)의 full-length cDNA 1,645 bp을 cloning 하여 그 염기 서열을 분석하였다. 이중 3′말단쪽의 약 453 bp가 5′말단에 중복된 독특한 구조를 가지고 있음이 밝혀졌고, 돼지 ER 유전자의 5′말단의 DNA만이 다형현상을 나타내므로 3′말단과 중복되지 않은 5′말단의 162 bp 가 산자수에 따른 ER 유전자의 다형현상을 나타내는 부분일 것으로 생각한다. 그러므로 본 연구에서 밝혀진 돼지 **ER** 유전자의 염기서열은 지금까지 보고된 것과 전혀 다른 것으로서 새로운 유전자임이 판명되었다. 또한, 산자수 차이를 보이는 군간의 DNA에 대하여 Southern-RFLP를 수행한 결과 돼지 ER의 5′말단의 751-bp 가 산자수 증가와 밀접한 연관성이 있음을 밝혔다. 즉, 돼지 **genomic DNA**를 ***Msp*I** 과 ***Pvu*II** 의 제한효소로 각각 자른 후 **5**′말단의 **751-bp**를 표지 유전자로 하여 **Southern blot**를 수행한 결과 산자수가 높은 돼지 **(BB**형**)** 의 경우 독특한 **RFLP pattern**를 보였다. *PvuII* 제한효소에 대한 경우는 이미 밝혀진 것과 일치하였으며, ***MspI*** 제한효소에 의하여 다형현상을 나타내는 부위는 보고된 바 없는 것으로 새로운

것이다. 현재 이 부분을 λlibrary system을 이용하여 cloning 하고 있으며 염기서열이 분석되는 대로 산자수 평가를 위한 primer을 제작하여간편하고 효율적인 돼지 산자수 평가를 위한 kit로 개발하고자 한다.

③ Mendelian Inheritance

Human estrogen receptor (hER) 유전자를 표지유전자로 이용하여 돼지에서 산자수에 대한 유전자 다형성 (AA, AB, BB형) 을 분석하였다. 먼저 웅돈의 정액, 모돈의 혈액 그리고 자돈의 꼬리로부터 추출한 DNA를 PCR-RFLP로 가계분석을 한 결과, ER유전자가 멘델의 유전양식에 따라 자손에게도 유전됨을 알 수 있었으며 또한 본 연구에서 cloning하여 밝혀진 돼지 ER 유전자를 이용하여 후대로의 유전양상을 분석하고자 한다.

2. 제 2 세부과제 : 산자수 관련 후보 유전자의 분포 및 생산능력 간의 상관분석

Yorkshire 종돈군을 연구대상으로 선정하여 번식능력에 대한 유전적 특성을 파악하기 위하여 기초군과 고능력 및 저능력군의 총산자수 · 생시체중 · 포유두수 · 이유두수 및 이유시체중의 번식능력은 고능력 모돈의 경우, 저능력 모돈에 비해 총산자수를 비롯한 생시체중 · 포유두수 · 이유시체중이 확실히 높게 나타난 것을 볼 수 있다.

137두의 실험 축군에서 표본 추출된 61두의 번식형질 자료를 토대로 후보 표지 유전자인 hER 유전자와 종돈군의 번식 형질간의 연관성 분석을 실시한 결과, hER 유전자의 효과가 조사된 복당 총 생시산자수 (TNB)와 복당 실산자수 (NBA)에 대하여 통계적 유의성이 인정되었으며 특히, 이러한 번식형질에 대해 BB형이 가장 우수하여 AA형에 비해 최소 0.5두 이상의 복당산자수의 증가효과가 있음을 시사하고 있다. ER 유전자형과 산차의 상호작용 효과에서는 산차가 진행될수록 BB 유전자형에 있어서 TNB

와 NBA는 지속되었다. 또한 표본 집단내 ER 유전자빈도는 A 유전자가 0.38이었고, B유전자 빈도는 0.62로 나타났다. 이는 Rothschild (1996)등이 기존에 보고했던 분석과 비슷한 경향치를 보여주고 있다.

앞 선 연구를 기초자료로 하여, 전 돈군을 대상으로 TNB와 NBA에 대한 hER 유전자형, 산차, 분만년도의 효과를 분석하였다. 그 결과, 산차와 분만년도가 TNB와 NBA에 고도의 유의한 영향을 미쳤으나, ER 유전자형은 산자수에 대하여 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 그러나, 산차에 있어 고도의 유의성이 있다는 것은 ER 유전자가 번식 지속성에 큰 영향을 미치고 있음을 고려해볼 수 있다.

각 산차별 ER 유전자형이 복당 산자수에 미치는 효과에서 AA형의 경우, BB형에 비해 초산 성적이 좋은 반면, 6산차 이후 부터는 산자수가 급격히 떨어지는 경향이 두드러지는데 반해, BB형의 경우 다소 AA형에 비해 초산 성적은 떨어지지만 2산차부터는 꾸준한 번식능력을 발휘하는 경향치를 보였다. 또한, 번식지속성에 대해 AA형과 AB형의 개체들이 7산차까지 생존한 비율은 약 8.1%와 8.6%인데 반해 BB형은 13%의 비율로 돈군에 잔류하고 있었다. 또한 대상 모돈군을 이루고 있는 Yorkshire종의 유전자형 은 AA형이 12.1%, AB형이 53.9% 그리고 BB형이 34%를 차지하였다. 유전자 비율 추정치를 살펴보면 B 유전자 비율이 0.61로서 A 유전자가 차지하는 0.39보다 월등히 높았다. 즉, BB형은 AA형에 비해 번식 지속성, 생애 총산자수 그리고 적은 도태율을 보임으로서 고능력돈을 선발을 입증하는 좋은 자료가 될 것이다.

3. 제 3 세부과제 : 다산종의 번식, 생리적 특성 구명

임신 기간동안의 IGF-I 발현은 산자수가 높은 그룹이 상대적으로 높은 발현을 나타내었다. 임신 초기인 45일령에서 그룹간 유의적 차이 $(P<0.05)$를 보이며 신생자돈의 성장기간 역시 초기 30일령에서 산자수 높은 그룹이 산자수 낮은 그룹보다 좀더 높은 IGF-I의 농도를 나타냄으로써 종부후 산자수를 임신 초기에 예측하며, 성장이후 산자수 높은 개체가 될 가능성을 성장 초기에 파악할 수 있을 것으로 추정된다.

IGF-II의 발현은 주로 임신 중반 이후인 60일령에서 나타났으며, 특히 임신 60일령($P<0.01$), 75일령, 90일령, 105일령($P<0.05$)에서 각각 유의적 차이를 나타냄으로써 임신 초기에 유의적 차이를 나타내는 IGF-I과는 달리 IGF-II 발현은 임신 중반이후에 산자수를 예측할 수 있는 지표로 사료된다. 또한 신생자돈의 성장기간동안 IGF-II는 산자수가 낮은 그룹이 산자수 높은 그룹보다 유의적으로 높게 발현되었다. IGF의 기능을 조절하는 IGFBP도 역시 그룹간에 차이를 보였다. 비록 개체간 변이 차이가 커 통계적인 유의 차이는 알 수 없었지만 전체적으로 IGF-I과 발현되는 양상이 매우 유사함을 관찰할 수 있었으며 이러한 현상은 IGF-I과 IGFBP-3가 양의 상관관계가 있다는 기존의 보고를 다시 한번 확인할 수 있었다. Steroid 호르몬인 estradiol과 progesterone의 발현은 그 특성상 개체간의 변이가 매우 컸지만 IGF-I, II의 발현과 밀접한 관계를 관찰할 수 있었으며 이런 결과는 IGF system이 임신과정을 비롯한 번식 전과정에서 매우 중요한 부분을 차지하고 있음을 간접적으로 보여주는 예라고 할 수 있다.

위의 결과를 종합하여 보면 종부 이후 임신 초기(45일령)는 혈중 IGF-I의 함량을 조사하고 이를 근거로 1차 산자수를 예측할 수 있으며 임신 중반이후(60일령, 90일령)가 되면 혈중 IGF-II의 발현을 조사함으로써 1차 산자수 예측을 검정하는 동시에 2차 산자수 예측을 실시할 수 있다. 이는 임신 기간동안 외부에서 유래되는 환경이나 스트레스, 사료로 인한 산자수의 감소를 사전에 예측, 제거할 수 있는 지표로 사용될 수 있다. 또한 그 외에 IGFBP나 estradiol, progesterone의 발현을 동시에 조사함으로써 보다 신빙성 있는 산자수 예측을 가능하게 할 수 있다. 또한 임신기간뿐 아니라 종부전인 성주기(발정후기)동안 IGF-I과 II의 농도를 측정함으로써 임신 전에 산자수를 증가시킬 수 있는 개체를 선발함은 물론이고 후대 자돈의 성장기간 동안의 IGF-I(30일령)과 II(60일령)의 발현을 확인함으로써 모돈으로써의 가치를 자돈 성장기간동안 사전에 파악할 수 있는 중요한 자료로 활용될 가능성을 제시한다. 결과적으로 혈중 IGF-I, II, IGFBP의 발현은 모돈의 산자수 예측에 매우 유용한 지표로 활용할 수 있으며 그 외 기타 steroid hormone의 발현까지

접목된다면 임신돈은 물론 자돈에서도 좀더 정확한 산자수 예측을 할 수 있을 것으로 사료된다.

SUMMARY

This study was performed to focus on the cloning of candidate gene which is related to the increase of litter size in Pigs and on the development of Kit to select prolific sow.

First, the cloning of candidate gene, ER gene, related with litter size is based on the report that ER locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs using identified human ER as a probe (Rhothschild et al., 1996).

To develope a new marker DNA for the selection of prolific pigs, we have cloned the region of cDNA obtained from porcine ovary. Previously, we had cloned part of the ER gene using nested reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and sequenced 891 bp

in the downstream region of cDNA obtained from RNA of the porcine ovary. In a subsequent study, we sequenced a 734 bp 5′-RACE product corresponding to the unidentified upstream region of ER gene from porcine ovary. As a result, total sequences have been confirmed by Automated DNA sequencer. In this station, we have found the same sequences of 453 bp in the downstream and the upstream region which have been never reported before. As the result of Southern blotting using sequences in each region, we think that 162 bp in the upstream region must be related with the polymorphism of ER gene which can determine the litter size.

After performing Southern-RFLP with porcine genomic DNA digested by *Msp I* and 751 bp in the upstream as a probe, the result shows specific RFLP pattern in prolific sow. Therefore, we have been cloning the specific region with λ library system and preparing the selection Kit as a genetic tool to identify the prolific individuals in pigs. In addtion, we have also examined Mendelian segregation in sire half-sib families based on PCR-RFLP patterns of AA, AB and BB with 22 families: AA x AA, BB x BB, BB x AB. It was observed in reproductive traits inherited in offspring having the same allelic bands.

The second study is conducted to investigate a possible association of the porcine ER locus with the total number of born (TNB) and number of born alive (NBA) in Yorkshire pigs. After extracting DNAs from all individuals randomized in the whole farm, the genotype was determined by PCR-RFLP analysis. Among three types, AA, BB and AB, the BB genotype is related with prolific pigs, in contrast in AA. From 321 blood samples of Yorkshire in the resource population, the

ER allele frequencies were 0.39(A) and 0.61(B) and ER genotypes of Yorkshire showed AB(53.9%), BB(34.1%) and AA(12.1%), respectively. The result shows that BB has been continuously selected in the farm. The least squares means of the litter size per ER genotypes were evaluated. Litter size traits were analyzed by each parity and all parities. The Least square means of TNB and NBA per parity and year by ER genotype showed statistically significant. In the case of the first parity, homozygous AA pigs in TNB and NBA are higher than BB genotype but after sixth parity, the litter size in AA pigs trended to decrease more than BB genotype. Furthermore, the lasting reproductive ability of AA and BB in the population is 8.1% and 13%, respectively. Therefore, this study shows that ER genotype BB has total number born for whole life, stable reproductive ability and small culling rate rather than AA. Therefore, we can find stable selection of prolific individuals in the resource population.

The third study elucidates the possible association of porcine litter size with endocrine regulatory factor gene in prolific pig. Litter size has been one of the important economic traits in porcine reproduction. The insulin-like growth factor (IGF) system has been shown to mediate actions of the steroid hormone or to have a synergy with other endocrine factors so that it consequently plays roles in reproductive processes, including ovulation, implantation, maintenance of pregnancy, and fetal development. However, the effect of the serum IGF system on porcine litter size has not been deeply studied. Therefore, this study was conducted to relate serum IGF-I, IGF-II, IGF binding protein-3 (IGFBP-3), estradiol (E2), progesterone (P4) expression with high and low litter size in pigs. Moreover, the possible association of those with estrogen receptor (ER) as a candidate gene for litter size was

investigated. Swine were separated into two groups showing high and low litter sizes, and sera were collected from pigs in the estrous cycle to postnatal growth. Serum IGF-I,-II, E2, and P4 concentration was measured by radioimmunoassay (RIA) and IGFBP-3 expression was detected by Western ligand blotting. During the estrous cycle, IGF-I and IGFBP-3 expressions in both groups decreased moderately from metestrus to estrus, but IGF-II concentration showed a reverse pattern. Also, IGF-I, -II and IGFBP-3 expression decreased gradually as pregnancy proceeded. Unlike IGF-I and IGFBP-3, IGF-II decreased moderately as newborn pigs grew. Significant differences in serum IGF-I concentration between the two groups were partially detected at 45 d ($P < 0.05$) of pregnancy and postnatal growth. And significant differences in serum IGF-II amount between the two groups were partially detected at 60 ($P < 0.01$), 75, 90, and 105 d ($P < 0.05$) of pregnancy and at 60 ($P < 0.01$), 45, and 105 d ($P < 0.05$) of postnatal growth. Because the individual variations of estradiol and progesterone concentrations were so high, E2 and P4 concentrations were not significantly differ between high and low litter size group from estrous cycle to growth of newborn. Based on ER genotypes, a high litter size group with genotypes AB and BB showed lower IGF-I, and -II concentrations than a low litter size group with a genotype AA during pregnancy. Taken together, the results indicate that the serum IGF-I, -II and IGFBP-3 are correlated with the litter size in pigs. Therefore we suggest that if expressions or concentrations of IGF system and steroid hormones (estradiol and progesterone) are monitored during postnatal growth and pregnancy, the estimate of litter size at the level of estrogen receptor gene could be more assured.

(Key words: Estrogen receptor, Litter size, 5 -RACE, cDNA, TNB, NBA, IGF, IGRBP, Southern hybridization, Pigs)

CONTENTS

목 차

제 1장 서 론

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가축육종의 역사는 우수한 능력을 지닌 개체 또는 품종을 이용한 지속적인 선발과 교배로부터 시작되어 최근 인공수정술의 도입에 의하여 속하고 광범위한 개량의 효과를 거두고 있다. 우수한 유전형질의 보존과 이의 이용 측면에서 수정란 이식술의 중요성 또한 증대되고 있다. 최근 분자생물학의 발전과 유전자 조작을 이용한 형질변환동물의 작출 등이 가능해 짐

에 따라 가축육종분야에서도 또한 양적형질들(quantitative traits)에 대한 미세분석을 통하여 유전형질의 후대전달을 보다 구체적으로 구명할 수 있게 되었다. 이는 가축의 육종에서 집단유전학적 분석의 단점으로 제기 되어온 후대검정에 장기간이 소요되는 문제점을 극복 할 수 있는 수단의 제시라는 측면에서 의미가 매우 크다고 할 수 있겠다. 즉, 특정 양적형질을 대상 후대 개체에서 해당 유전자의 유무 내지는 변이의 양상을 DNA의 분석으로 발달 또는 발생 시기에 관계없이 확인 가능해짐으로 선별에 신속성이 부가되었다.

유전자의 연관 내지는 염색체상의 유전자지도 등에 대한 자료는 인간과 가축에서 중요한 생물학적 기능 및 질병을 조절하는 유전적 요인의 검색 및 동정을 가능케 해주었다. 하지만 이들 자료의 축적에 인간의 경우에는 그 동안 연구가 활발하게 진행되어 온 것에 비추어 많은 진전이 있으나, 가축 특히 돼지의 경우에 있어서는 매우 제한적으로 진행되어 왔다. 더욱이, 생산, 건강 및 번식능력 등과 관련된 복잡한 양적형질의 유전적 해부와 분석은 그 자체가 난제로서 인식되어 왔다. 하지만 최근 육종기술의 개선으로 품종간 교배능력의 향상과 이용 가능한 표지유전자의 수적 증가로 유전자의 전이에 대한 구체적 분석의 가능해 지게 되었다.

번식기능과 관련된 형질에 대한 분석은 가축을 이용한 산업분야에서 그 의미가 매우 크다. 즉 번식능력은 곧바로 생산성과 직결된 사안이기 때문이다. 산자수 증가를 위한 선발노력이 여러 동물종을 대상으로 시도된 바 있으나 현재까지 그 실효성이 구체화된 예는 없는 실정이다. 이는 유전형질의 후대전달을 검증할 수단의 부재와 번식형질 자체가 성에 의존적인 점 등에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 번식기능은 그 자체가 유전적요인 외에 사양관리로 요약되는 다양한 환경적, 영양적 및 이에 따른 생리적 기구의 변화요인 등에 의하여 조절되기 때문에 그 분석이 더욱 어려웠다. 번식기능과 관련된 형질과 같이 복잡한 형질의 유전적 조절요인에 대한 분석에는 그 조절유전자에 대한 구체화와 형질 발현도정에 일어나는 생화학적 과정에 대한 이해가 필수적이다. 양적형질의 분석을 위한 가능한 접근방법으로 표지유전자의 이용을 들 수 있다. 표지유전자에 의한 염색체상의 유전자좌위의 간접적인 추정은 작성된 연관지도와의 동시 분석에 의하여

보다 구체화 할 수 있다. 이와 같이 염색체상 위치에 대한 윤곽이 밝혀지면 유전자 탐색은 대상형질의 발현에 깊은 관련이 있는 개개 유전자의 분리 와 cloning으로 진행시킬 수 있다. 이러한 접근 방법은 이미 인간의 경우 질병조절 유전자 좌위의 동정 (Hall 등, 1990; Collins, 1995) 등에 성공적으로 적용된 바 있다. 돼지의 경우에 있어서도 돌연변이에 의하여 나타나는 질병의 일종인 porcine stress syndrome (PSS)의 유전자가 이와 같은 방법에 의하여 동정되었다 (Fujii 등, 1991). 면양에서 배란수의 증가와 산자수의 증가와 관련이 있는것으로 추정되는 FecB (Montgomery 등, 1994)와 FecX (Davis 등, 1991))의 동정은 불특정 표지 유전자의 이용으로 가능하였다. 특정 유전자의 동정을 위한 또 다른 접근 방법으로 후보 유전자를 이용하는 방법을 들 수 있다. 즉 가축에서 관심을 갖는 유전자의 검색을 위하여 이미 인간을 대상으로 한 의학적 내지는 생화학적 연구를 통하여 밝혀진 유전자를 후보유전자로 하여 가축의 해당 유전자가 지니는 높은 구조적 유사성 (homology)을 근거로 동정하는 방법을 이용할 수 있다.

본 연구는 전통적인 육종에서 사용되어온 지속적이고 반복적인 교배를 통한 가축의 양적형질의 개량은 급변하는 시대적 요구에 순발력 있게 대응하는 개체의 선발을 위한 적합한 방법으로서의 가치가 하락하고 있으므로 이의 개선책을 마련하고자 한다. 보다 구체적인 유전적 요인의 해부로 육종효과에 대한 정확한 예측을 가능케 하는 기술의 개발이 절실한 시점에서 우선적으로 선결하여야 할 과제로 양적형질을 지배하는 유전자의 분리동정을 들 수 있다. 선별된 유전자에 의하여 지배되는 번식능력의 발현에 유전외적요인이 될 수 있는 번식기능과 관련된 내분비적 요인의 구명은 현재 국내 번식학 분야에서 돼지 뿐 만 아니라 전 가축을 대상으로 그 필요성이 보편적으로 요구되고 있다. 현재 이 분야는 수정란이식관련 인력의 훈련과 배양이 과거 10여 년간 충실하게 진행되어 온 것에 비교하여 간과되어 왔으나 그 중요성은 학문적 또는 산업적 측면에서 매우 중요하다. 앞에서 언급한 바와 같이 번식현상 자체가 다양한 요인에 의하여 발현되는 것임을 고려하면 이 두 분야의 기술적 지식의 깊이를 갖추는 것이 바로 경쟁력 확보의 우위를 선점할 수 있는 요건임은 자명한 사실일 것이다. 가축육종에서 흔히 문제로 제기되어온 장기간 소요되는 후대검정도 이러한 유전

자의 동정으로 조기 검정 및 예측이 가능하다. 즉 본 연구자는 이미 돼지의 웅성 특이적 DNA의 분리동정을 성공적으로 수행하였고 이를 이용한 수정란에서의 조기 성감별 방법을 개발한 바 있다 (Jeon 등, 1993; 정 등, 1996). 이러한 연구를 통하여 축적된 기술과 경험은 본 연구에서도 적용될 수 있을 것이다. 또한 육종효과의 신속한 검증을 위한 기반수단으로서의 가치도 본 연구진의 과거 경험을 이용하여 제고시킬 수 있을 것으로 사료된다. 한편 본 연구의 목표 성취를 위한 기술적 검토로 알 수 있듯이 본 제안의 접근방법이 이미 타 분야에서 그 적용성의 보편성이 검증되었음에 미루어 그 실현성이 매우 높고 육종 및 번식학 분야의 연구에서 이의 응용에 의한 독창적 기술확보란 큰 의미를 지니고 있다고 사료된다.

2. 경제 • 산업적 측면

축산은 다른 일차산업과 마찬가지로 산업경제 규모의 신장과 부의 축적 및 기술력의 발전에 역행하여 종사인구의 감소 및 생산물의 가격 안정화 내지는 감소등이 야기되며 이로 인한 전반적인 생산성의 하락이 수반되게 된다. 이러한 현상이 최근 국내의 축산분야에서도 나타나고 있으며 현재까지 적용되어온 운영 관리체계를 통한 생산비용의 절감과 품질향상을 위한 노력은 매우 제한적일 수밖에 없었다. 다른 가축에서도 대동소이한 유형을 보이겠으나 양돈경영에서 수입에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 흔히 관심을 기울이지 않았던 산자수를 들 수 있다 (Table 1). 복당 산자수의 증가는 곧바로 종래의 경영개념에서 비춰보면 과외소득으로 간주 할 수 있겠으나, 과학적 경영에 의한 수입증대의 차원에서는 무시할 수 없는 중요한 요인이 된다. 이는 또한 향후 양돈 경영에서 성취하여야 할 우선과제라 하겠다.

현재 양돈산업에서 중요시하는 육질 저하의 유발이 없이 산자수를 증가할 수 있는 수단을 제시 할 수 있다면 이는 양돈 산업의 부가가치제고에 매우 큰 공헌도가 높게 적용될 수 있을 것이다. 산자수 증대를 위하여 사용되는 관리상의 대표적인 방법으로 종부전의 강정사양, 사료의 급여 방법 변화에 의한 임신유지, 종돈의 선발 및 이용, 방역관리 및 일부 종부 시기의 조절 등 다양하게 이루어져 오고 있으며 실제로 경영에서 세심한 주의

를 기울이며 실시되고 있다. 본 연구의 성과는 일차로 관리상 주의요건에 대한 관심도의 이완을 유기 할 수 있는 효과로 경영비의 절감이 자연스럽게 이루어질 수 있을 것이다. 또한 후대검정의 필요성이 감소되어 이로 인한 불필요한 경비의 지출 (인건비, 사양관리비등)이 억제되는 중요한 효과 또한 무시할 수 없을 것이다.

Table 1. The effect on incoming in the pig industry (정 등, 1986)

분 류	중요성비 (%)
년간 산자수	2
임신율	7
사료효율	13
복당산자수	83

종돈의 관리 또한 유전자 분석에 의한 정확한 지표의 설정으로 우량한 개체의 조기선발이 가능해짐에 따라 보다 효율적이고 용이하게 이루어 질 수 있으며 이는 곧바로 생산비용의 절감과 직결될 것이다. 이상 살펴본 경제적 이윤의 증대는 축산물 시장개방에 비추어 경쟁력의 확보와 자연스럽게 양돈경영의 합리화를 유도하는 기여효과와 연결될 수 있다. 현재 양돈 선진국에 의존하는 종돈의 공급과 양돈기술의 도입에 의해서는 더 이상 소비자에게 설득력 있는 생산품의 공급이 어려워 질 것이다. 양돈경영이 번식돈과 비육돈 전업의 두 형태로 국내 양돈경영 유형을 고착시켜야 할 시점에서 번식성적의 향상은 양돈경영에서 전반적인 생산비의 절감을 유도할 수 있는 시급한 과제이다. 또한 국제적으로 경쟁력을 갖춘 고유하며 중요도가 높은 양돈경영상 know-how의 개발이 시급하다. 이는 바로 본 과제에서 추구하는 양적형질을 지배하는 유전자의동정과 이의육종을 통한 경영의 개선으로 가능하다. 이러한 인식은 국제적인 공통의 과제이며 국내에서도 시급하게 이에 대한 연구개발이 이루어 져야 할 것이다. 특히 돼지는 그 생리적 기능과 기전이 인간과 유사한 것으로 알려져 의약품 생산을 위한 bioreactor로서의 가치가 높은 동물이다. 최근에 널리 시도되고 있는 유

전자변환동물 기술의 발전 추세에 비추어 돼지에 대한 유전학적 및 유전공학적 연구는 축산업의 차원을 넘어서 생물관련 산업분야의 향후 경제적 국제경쟁력확보를 위하여 필수적이다.

3. 사회 • 문화적 측면

돈육은 저렴한 동물 단백질 원으로서 우리의 식생활에 널리 이용되어져 왔다. 하지만 점차적인 식생활 양태의 변화 및 근래 양돈산업의 생산비 증가와 이에 기인한 시장의 불안정으로 인하여 돈육의 일반적 기호성이 점차 하락 추세에 있다. 이러한 전반적인 침체 현상을 극복하기 위한 수단이 바로 양돈산업의 효율성 제고를 들 수 있다. 이는 곧 생산품의 부가가치 제고로 이어 질 수 있을 것이다. 복당 산자수의 증가는 생산비에서 가장 높은 비율을 차지하는 번식능력의 향상이며 또한 동일한 생산성을 위한 종돈의 유지관리비의 절감 효과를 거둘 수 있는 보다 직접적인 방법이다. 유전자에 대한 구체적 조명은 육종 효과의 극대화를 도모할 수 있음으로 사회적 및 시대적 요구에 보다 신속하게 대응할 수 있는 양돈산업의 개선효과를 거둘 수 있을 것으로 사료된다.

4. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

돼지에 있어서 산자수의 증가를 위한 노력은 사양관리적 측면에서의 접근 방법이 전통적으로 시도되어 왔고 육종학적 접근 방법으로는 다산종과의 반복적인 교배에 의한 능력향상이 보편적으로 시행되어졌다. 산자수 증가와 관련하여 이들 방법에 의한 유전적 형질의 개량은 번식능력의 후대전달이 매우 낮고 성에 매우 의존적이라는 점 등에 의하여 그 효과가 매우 낮았다. 하지만 돼지에 있어서 품종간 산자수의 차이는 다양한 사양관리조건에도 불구하고 일관되게 나타나며, 다산종과의 반복된 교배에 의하여 작출된 개체에서 산자수의 증가효과가 간과할 수 없을 정도로 나타난다는 사실로 미루어 산자수 내지는 최소한 번식능력의 발현을 지배하는 유전자의 존재를 추정 할 수 있다 (Table 2). 특히 이러한 효과는 다산종으로 알려진 중국돈인 매산종 (Meishan)과의 교잡종에서 현저하다. 한편 돼지의 산자수를 조절하는 유전적 요인에 대한 연구가 주로 집단유전학적 접근에 제한되어왔으며 이에 대한 구체적 증거의 제시도 전혀 이루어지지 못한 반면

에 최근 면양에서 이러한 다산을 유기 하는 유전적 요인에 대한 연구는 체계적으로 진행되어 이 분야 연구에 대한 가능성을 제시하였다. 대부분의 면양 품종은 복당 1 내지 2두의 자축을 생산하지만 Booroola Merino, Cambridge, D'Man, Finnish Landlrace 및 Romanov등은 3두 이상의 산자를 생산하는 고능력 품종으로 알려져 있다. 이중 특히 Booroola Merino에서는 그 월등한 번식력이 단일 유전자에 의하여 지배를 받는다는 사실이 증명되었다(Davis et al., 1982; 1983). 이 품종에서는 상염색체상에 존재하는 유전자인 FecB의 변이에 의하여 발정주기당 배란율의 증가가 나타나며 그 효과가 우성의 양상으로 후대전달이 이루어지는 것으로 밝혀졌다 (Piper 등, 1985; Montgomery 등, 1992). 번식기능은 시상하부의 조절요인인 GnRH에서 신호가 시작되어 뇌하수체의 성선자극호르몬 (FSH 및 LH)이 난소의 granulosa 세포와 theca세포에 작용함으로써 발현이 된다. FecB 변이유전자를 갖는 후대 암컷을 대상으로 생리기능상의 변화를 검토한 연구결과에 의하면 FecB변이와 이들간의 상호 관련성은 매우 낮은 것으로 나타났다. 즉 FecB 변이 유전자와 이들의 유전자는 유전자 재조합시 서로 독립적인 것으로 밝혀져 (Montgomery 등, 1990; 1992) Booroola Merino의 증가된 산자수가 단일 유전적 요인에 의하여 지배된다는 가정을 지지해준다. 최근 표지유전자의 개발(Montgomery 등, 1993)과 이를 이용하여 FecB 유전자가 면양의 6번 염색체상에 위치하고 있음이 밝혀져 (Montgomery 등, 1994) 가까운 장래에 그 구체적인 동정이 가능할 것으로 기대된다.

돼지의 경우 산자수 증가를 위한 최근의 접근은 위에 기술한 바와 같은 기존 수단의 이용에서 탈피하여 동일 염색체상에 존재하며 유전자 거리가 보다 가까울 것으로 추정되는 표지유전자를 이용한 연관관계분석이 진행되고 있다. 이러한 접근은 비록 일부 제한된 연구자들에 의하여 시도되고 있으나 그 실효성이 면양을 대상으로 한 연구에서 입증된바와 같이 종래의 방법보다 월등한 것으로 사료된다. 따라서 돼지의 산자수 조절 유전자 검색을 위한 특정 유전자 혹은 불특정 표지유전자의 동정은 선발의 정확도 제고효과로 번식능력향상을 유도하기 위한 필수적인 과정이 될 것이다. 이에 대한 대표적인 예로 estrogen receptor (ER) 유전자를 표지유전자로 하여 다산종인 중국의 매산종과 Large White간의 교잡종에서의 유전자 다형

성을 분석한 연구보고를 들 수 있다 (Rothchild 등, 1996). 이들 보고에 의하면 ER유전자를 표지유전자로 한 유전자 다형성은 A와 B의 두 유형이 나타났으며 매산종에서 나타나는 B형이 교잡종 중에서 산자수 증가를 보인 개체와 그 가계에서도 일관되게 나타난다고 하였다. 유전적 요인에 의한 보상효과는 초산의 경우 약 20%의 산자수 증가로 나타났으나 산차가 증가함에 따라 점차 감소하는 경향을 보였다. 하지만 이 연구의 결과를 검토하면 이러한 산자수의 증가가 estrogen 또는 ER이 지니는 기타 생리적 활성상의 차이에 기인한 것인지 아니면 ER 유전자와 연관관계가 높은 독립된 유전자에 의한 효과인지에 대한 해답을 도출하기가 힘들다.

돼지는 일반적으로 체내 수정율이 95%이상 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Perry & Rowlands, 1962). 따라서 산자수는 이미 배란기에 결정이 되는 것이다. 다산종인 매산과 기타 품종간의 배란율에 대한 상반된 조사보고들은 각 품종들의 유지 관리상 나타나는 변수들에 매우 의존적이어서 그 결과에 대한 신뢰도가 낮은 것으로 사료된다 (Bolet 등, 1988; Anderson 등, 1993). 하지만 성선 자극 호르몬의 생산 분비 수준의 변화, 난소의 활성 지표인 steroid들의 수준 변화 및 기타 내분비 내지는 번식기능과 관련이 있는 성장인자들의 생리적 수준간의 변이 등에 대한 구명은 개체 또는 품종간 차이를 보이는 산자수간의 차이의 원인 구명을 위하여 반드시 실시되어야할 사항들이다. 이들 생리적 환경요인에 대한 분석을 배제한 유전적 요인의 구명은 비록 그 결과를 제시한다하더라도 설득력이 매우 낮을 것이다.

Table 2. Reproductive ability in F1 of Meishan and White breeds

Genotype of Dam		N	TNB	IN	NW	viability (%)	BW (kg)	W.B.W (kg)
3/4 MS	MS	58	13.9	13.2	11.9	90	15.0	52.6
	MS x (LWxMS)	47	15.1	14.2	12.9	91	16.5	64.2
	MS x (MSxLW)	63	14.2	13.6	12.6	92	16.3	64.4
	F1 x MS	40	13.9	13.3	11.8	89	15.2	58.5
F1	LW x MS	37	15.1	14.7	13.3	91	17.6	71.8
	MS x LW	45	14.2	13.5	12.4	93	17.0	71.7
F2	F1 x (LWxMS)	48	14.9	14.4	12.8	90	16.5	66.4
	F1 x (MSxLW)	39	12.6	11.9	10.1	87	15.1	56.1
3/4 LW	Lw x (LWxMS)	29	14.2	13.0	11.8	92	15.4	63.8
	LW x (MSxLW)	45	11.8	11.2	10.3	93	14.9	60.0
	F1 x LW	19	12.8	12.1	10.5	90	14.4	60.8
	LW	35	12.8	11.4	10.3	90	14.4	60.8

※ MS : Meishan, LW: Large white

TNB: Total Number Born, IN: Initial Number

NW : Number of Weaning, BW: Birth Weight, W.B.W: Weaning Weight

따라서 해당 유전자의 검색 및 동정과 아울러 문제의 해결을 시도하여야 할 분야가 바로 번식생리에 대한 기초 연구이다. 현재까지 돼지의 산자수 증가를 위한 육종학적 노력이 관련분야와의 연계에 의한 연구체계의 부재로 그 성과가 미미하였던 점 이 곧 연구진척도의 지연으로 반영되어 온 것이다.

앞에서 산자수를 조절하는 유전자의 탐색을 위한 전 단계로 표지 유전자 선발의 중요성에 대하여 서술하였다. 그 예로 ER유전자를 이용한 경우를 제시하였는데 ER 유전자는 1번 염색체 상에 존재하며 (Rothchild 등, 1991) 그 좌위상 특성이 인간의 경우 3번 염색체상의 ER유전자와 유사함을 보이는 것으로 밝혀졌다 (Table 3). Rothchild 등의 결과를 토대로 산자수를 지배하는 유전자가 ER유전자와 근거리상의 좌위에 존재한다면 이의 검색은 ER유전자와 이와 반대쪽에 위치한 좌위의 두 기점으로부터 실시할 수 있을 것이다. 하지만 현재 돼지의 ER유전자의 일차구조에 대한 연구가

전혀 이루어지지 않았으며 기타 표지 유전자로 이용될 수 있는 좌위에 대한 연구보고도 그 중요성에 비하여 부족하다. 따라서 이에 대한 연구의 시급성 증대와 결과의 독점에 대한 요구가 경쟁적으로 이루어지고 있음은 자명한 추세이다. 한편 돼지의 경우 산자수 증대를 위한 육종에서 심각하게 고려할 사항은 번식능력향상이라는 일방적 목표의 달성을 위하여 기타 비육 및 육질에 대한 고려가 간과될 수 있는 취약점을 들 수 있다. 이점이 바로 돼지의 육종에서 특히 난점으로 꼽힌다. 이러한 문제점은 최근 교잡종을 대상으로 한 연구에서 육질의 저하를 유발하지 않고 번식능력향상의 가능성이 제시되어 (Haley 등, 1992; Serra 등, 1992) 산자수 증가의 효과를 타 양적형질과 독립적으로 거둘 수 있을 것으로 사료된다. 특히 유전자의 동정에 이은 강도 높은 선발은 이러한 효과를 보다 구체화 시킬 수 있다는 육종상의 장점이 있을 것이다.

Table 3. Marker genes in Chromosome No. 1 in Pig

Locus	Gene	Marker Gene	Reference
CGA	glycoprotein hormones α-polypeptide	microsatellite	Moran (1993); Ellegren et al. (1994)
ESR	estrogen receptor	RFLP	Rothchild et al (1991)
ORM	orsomucoid	RFLP	Couperwhite et al. (1994)
S008	microsatellite CGT8	microsatellite	Fredholm et al. (1993)
S0020	DB3F1	microsatellite	Coppieters et al. (1993)
S0079	-	microsatellite	Wintero & Fredholm (1994)
S0082	MP66	microsatellite	Johansson et al. (1992)
S0112	-	microsatellite	Ruyter et al. (1994)
S0113	-	microsatellite	Ruyter et al. (1994)
S0122	A16	microsatellite	Robic et al. (1995)
S0155	-	microsatellite	Wintero & Fredholm (1994)
S0302	from cosmid BHT49	microsatellite	Hoyheim et al. (1992)
S0311	from chr 1 library (35-46)	microsatellite	Anderson Dear & Miller (1994)
S0312	from chr 1 library (41-42)	microsatellite	Anderson Dear & Miller (1994)
S0313	from chr 1 library (53-54)	microsatellite	Anderson Dear & Miller (1994)

후대의 능력검정은 유전자의 존재유무에 대한 정황적 근거를 바탕으로 하여 실제 발현되는 능력의 조절요인에 대한 분석자체가 유전외적 환경에 의하여 영향을 받을 수 있다. 최근 유전자진단에 대한 필요성이 강조되고 또한 이러한 진단기법이 인간과 동물의 경우 수정직후에서 착상전의 발달기에 있는 수정란을 대상으로 실시되어 개체의 조기선별이 가능함이 제시된 바 있다. 본 연구진도 소 (서 등, 1995; 1996) 및 돼지 (정 등, 1996) 등의 수정란에서 웅성특이적 DNA probe를 이용하여 성 판정기법을 확립하였다. 이러한 유전자 진단기법의 적용시 중요한 잇점은 첫째 후대의 유전자형에 대한 예측이 가능하며, 둘째로 능력검정의 필요성이 감소하므로 개체선발에 소요되는 기간의 단축과 셋째로 유전적 요인의 변수가 고정됨으로 관리상 발생하는 문제점의 해결이 용이해 지는 점 등을 들 수 있다. 본 연구의 결과는 산자수와 관련된 유전적 요인의 해부와 이의 발현에 영향을 미치는 생리적 환경의 표준지표설정이라는 커다란 의의를 가질 것이다. 이러한 연구에 대한 관심은 면양에서는 활발하게 이루어져 그 유전좌위에 대한 동정이 매우 근접하게 이루어 졌으며 내분비학적 자료도 축적이 된 반면에 돼지에서는 아직 초보단계에 머물러 있고 또한 내분비학적 연구 자체도 유전적 요인과는 독립적으로 이루어져 구조적 분석에는 아직 미흡한 실정이다. 국내에도 비록 산발적이기는 하나 산자수 증가를 위한 몇몇의 연구보고가 있기는 하다 (강 등, 1983; 신, 1984; 정과 박, 1986). 하지만 유전적 요인에 대한 세밀한 분석과 유전자동정에 초점을 두고 이루어져온 연구보고는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내는 물론이며 대외적으로도 구조화된 체계에서 실시되는 연구로는 선두에 속하는 것이라 사료된다.

제 2절 연구개발 목표 및 내용

본 연구는 다음과 같은 목표와 내용으로 연구를 수행하였다.

구 분		연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 97-98	제1세부과제	표지유전자(ER)를 이용한 유전자 다형성 분석	돼지의 산자수와 높은 상관관계를 갖고 있는 것으로 밝혀진 **estrogen receptor**를 표지유전자로 이용하여 돼지 품종간의 산자수에 대한 유전자다형성을 분석하기 위하여 cloning을 하고, 이를 이용하여 산자수와 연관도가 높은 유전자의 좌위를 검증한다.
	제2세부과제	번식종돈군의 개체별 가계별분석	국내의 종돈의 다산성형질발현 현황을 파악·분석하기 위해 번식종돈군을 개체별·세대 및 가계별로 분리·비교분석하며 또한 종돈내의 산차수에 따른 번식능력을 분석하여 체계화한다.
	제3세부과제	자돈의 사양관리및 성장인자 조사	번식 및 관리 체계가 확립되어 있는 양돈장으로 부터의 구입·사양·관리에 의한 개체간의 관리체계 불일치를 최소화한다. 자돈의 성성숙연령의 비교와 성주기동안에 일어나는 성장인자들의 형질변화를 종돈군간 비교분석한다.
2차년도 98-99	제1세부과제	상관유전자의 구조 분석	선발된 유전자의 좌위를 비교·검토하기 위해 개체간의 유전자 다형성분석을 시도하고 이를 근거로 고능력·저능력과 ER간의 연관지도를 작성한다. 또한 유전자의 일차구조분석을 위해 제한지도 및 염기서열분석을 표준방법에 따라 행한다.
	제2세부과제	다산성 종돈군의 유전형질 분석	유전자다형성 분석법을 통한 개체간의 번식유전형질(고능력, 저능력)을 산차수 및 세대별(F1, F2)로 계통화시키며 이를 번식능력기록과 상관비교분석함으로써 고, 저능력의 형질들이 후대에도 유전됨을 밝히며, 이를 바탕으로 다산성 개체를 구조적으로 선별할 수 있는 방법을 개발한다.
	제3세부과제	자돈의 시기별 발달 조사 및 신생자돈의 발육분석	자돈의 산자수와 성장인자 발현을 측정함으로써 자돈의 임신기간별 성장인자 발현에 따른 고능력·저능력 종돈간의 성장발달을 비교·분석한다. 또한, 신생자돈의 발육상태와 자돈수 그리고 성장인자 발현을 조사함으로써 종돈군간의 모체형질에 따른 내분비학적 상관관계를 비교·분석한다.

3차년도 99-2000	제1세부과제	**유전자 조기분석법의 개발 및 실용성 검토**	구체적인 후보유전자 형질검증을 위해서 probe를 합성하며, 유전자 조기분석법의 실용화를 위한 kit 개발을 목표로 첨단방법을 비교·분석·개발하여 이의 효율성·경제성을 분석·검토한다.
	제2세부과제	**후보유전자의 분포 및 번식능력과의 상관관계 분석**	유전형질과 번식능력의 비교분석을 토대로 다산성 개체의 산차수에 따른 변화를 조사·분석한다. 또한 후보유전자의 분포를 검증하고 산자수관련 형질발현유전자의 개체간 차이점을 번식능력과 상관분석한다.
	제3세부과제	**종돈군 호르몬과 성장인자 발현 비교분석**	자돈과 모체의 호르몬과 성장인자 발현정도에 따라 우량 종돈군과 열성 종돈군을 선발하고 유전형질 분석을 위한 유전 검증을 실시한다. 상반되는 종돈군간의 호르몬과 성장인자 발현을 조사하고 이들의 유전형질과의 비교·검토를 통하여, 종돈군간 번식능력 차이를 보이는 형질인자 발견에 초점을 맞춘다.

제 2장 산자수 관련 유전자의 검색 및 cloning

제 1절 서 론

유전자의 연관 또는 염색체상의 유전자지도는 생명체에서 다양한 표현형(phenotype)으로 발현되는 유전자에 대한 검색 및 동정을 가능케 해 주었다. 1970년대 이후 제한 효소의 발견 (Meselson 등, 1968)과 Southern blotting 기법 (Southern, 1975)의 개발은 분자 수준에서의 genome상의 유전자 분석의 길을 열어 주었다. 이 두 기법을 토대로 1980년대 초반 부터는 인간을 비롯한 고등동물의 genome분석이 시도되어 인간의 경우 현재까지 많은 자료들이 축적되어 있다 (Botstein 등, 1980; Collins 등, 1993). 하지만 가축의 경우에 있어서는 이러한 연구가 초기 단계에 머물러 있는 실정이다. 이와 같이 고등동물의 genome을 연구한 자료를 토대로 하여 가축의 성장률, 등지방층 두께, 산유량, 육질 그리고 산자수 같은 복잡한 양적형질 (quantitative trait)에 대한 분자 수준의 연구가 진행중이다 (Haley, 1995).

양돈산업에 있어서 산자수는 생산성과 직결된 경제형질로서, 그 표현양상이 연속적 (continuous)이고 한 형질의 발현에 여러 유전자 (polygene)가 관여하는 양적형질의 특징을 가진다. 돼지의 산자수 개량을 위해서 종래에는 통계수치에 의한 선발과 교배로 요약되는 유전·육종학적 기법과 영양 및 사양관리 측면에서의 접근 방법이 시도되어 왔다. 하지만 산자수의 증진과 관련하여 이들 방법에 의한 산자수와 관련된 형질의 개량은 번식형질이 한성 (sex-limited)형질이고 유전력 (heritability)이 낮아 그 효과가 매우 제한적이었다. 하지만, 돼지에 있어서 품종간의 산자수 차이는 다양한 사양관리 조건에도 불구하고 일관되게 나타나며 Meishan돈과 같은 다산종과의 반복교배를 통해서 얻어진 개체에서 산자수의 증가효과가 간과 할 수 없을 정도로 나타난다는 사실로 미루어 산자수와 관련된 유전적능력을 지배하는 유전자의 존재를 추정할 수 있다. 산자수와 같은 양적형질도 이들 형질 발현에 관계하는 유전자, 또는 유전자 좌위의 영향을 받는데, 이들을 Quantitative Trait Loci (QTL) 또는 Economic Trait Loci (ETL)이라고 한다 (Gelderman, 1975).

산자수와 관련된 QTL에 관한 연구는 돼지에서 보다 면양에서 먼저 체계적으로 이루어졌다. 대부분의 면양 품종은 복당 1 내지 2두의 자축을 생산하지만, Broola Merino종은 3두 이상의 산자를 생산하는 것으로 알려

져 있는데, 그 월등한 번식능력이 *Fec*B라는 단일 유전자에 의하여 지배를 받는 사실이 증명되었다 (Piper 등, 1985). 이 품종에서는 6번 염색체에 존재하는 유전자인 *Fec*B의 변이에 의하여 발정 주기당 배란율의 증가가 나타나며, 그 효과가 우성의 양상으로 후대에 전달되는 것으로 밝혀졌다 (Montgomerry 등, 1994). 돼지에서는 산자수에 영향을 미치는 QTL에 대한 접근방법으로 모돈의 번식생리와 자돈생산에 필수적인 estrogen과 관련된 유전자에 대한 표지유전자(marker gene)를 대상으로 연구 중이다.

현재 돼지의 산자수와 관련된 유전자로서 estrogen 관련 유전자가 연구의 대상이 되고 있다 (Rothschild 등, 1996). Estrogen은 스테로이드 호르몬으로서 estrogen receptor (ER)을 매개로 하여 포유동물의 임신에 영향을 준다. ER에 대해서는 그 생리현상 뿐만 아니라, 인간을 비롯한 여러 종에서 ER에 대한 유전자도 동정되어 있는 상태이다 (Green 등, 1986). 이와 같은 이유로 ER을 산자수와 관련된 유전자 동정을 위한 표지유전자(marker gene)로서 연구 중에 있다. 돼지에서도 ER 유전자가 cloning이 되었지만 (Boekennkamp 등, 1994), 이 유전자를 이용하여 산자수 관련 연구는 아직 보고되지 않고 있다.

ER은 그 1차 구조에서도 알 수 있듯이 (Fig. 1(a)) estrogen과 결합하는 수용체로서 작용할 뿐만 아니라 핵 내부까지 이동하여 DNA와도 반응하여 전사를 촉진하는 전사인자(transcription factor)의 역할도 수행한다.

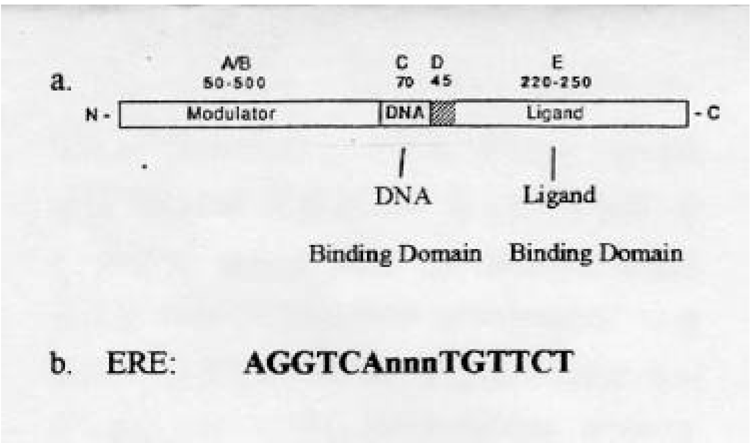


Fig. 1. (a) First structure of ER
(b) Sequences of ER Responsive Element(ERE)

현재로서는 ER과 산자수 증가에 대한 mechanism을 확실히 알 수 없으나, ER의 발현량이나 혹은 ER의 기능 즉 말하자면 전사인자로서의 활성화 기능 등을 고려할 수 있다. 이에 대한 예로 ER을 표지유전자로 하여 다산종인 중국의 Meishan종과 Yorkshire종간의 교잡종에서 유전자 다형성을 분석한 연구 보고를 들 수 있다 (Rothschild 등, 1996). 이들 보고에 의하면 ER 유전자를 표지유전자로 한 유전자 다형성은 A와 B의 두 유형이 나타났으며, Meishan종에서 나타나는 B형이 교잡종 중에서 다산인 개체와 그 가계에서 일관되게 나타난다고 하였다. Meishan종과 교배를 하지 않은 Yorkshire종의 개체와 가계에서도 역시 같은 양상의 산자수 관련 유전양상을 밝혀냈다. 하지만 이 연구 결과에서는 산자수의 많고 적음이 직접적으로 estrogen 또는 ER의 발현량에 의해서 인지, 아니면 간접적으로 ER유전자에 의해 전사되어지는 산자수와 관련된 다른 유전자에 영향을 미치는 것인지는 제시하지 못하였다. 즉, 현재까지 면양의 *Fec*B와 같이 산자수에 직접적인 영향을 미치는 QTL과 그 기작에 대해서는 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 산자수와 관련된 QTL을 구명하고자 하는 시도로서 ER을 이용한 산자수에 대한 유전적 다형성분석 (RFLP)의 결과로 양의 상관관계를 보이는 경우 그 locus region을 cloning (표지유전자의 cloning) 하고 분자유전학적 분석을 이용하여 산자수와 연관도 높은 표지유전자의 개발을 위하여 수행하였다.

제 2절 연구 재료 및 방법

1. 공시돈

산자수 관련 표지 유전자 (ER) 의 검색 및 cloning 분석을 위해 실험축

군 (resource population)으로 선정된 경기도 포천군 소재 (주) 세왕농장의 Yorkshire종의 경산돈을 대상으로 실시하였다. 유전자 다형성 분석을 위한 기초실험으로 번식능력을 분석하여 5산차 이상의 Yorkshire종 61두를, 전 돈군내 ER유전자의 유전양상과 가계분석을 위해 경산돈 348두(Landrace종 27두와 Yorkshire 321두)를 표본 추출하여, 경정맥으로부터 혈액을, 교배에 이용했던 웅돈 15두의 정액과 자돈 210두의 꼬리를 채취하여, DNA 추출후 돈군의 유전적 다형 분석을 수행하였다.

2. 표지유전자 다형성 분석 실험

가. 돼지 genomic DNA 추출

① 혈액으로부터의 DNA추출

유전자 다형성 분석을 위한 genomic DNA의 분리는 Sambrook 등 (1989)의 방법에 준하여 실시하였다. 돼지의 경정맥에서 10 ml의 혈액을 채취한 후, 응고를 방지하기 위해서 ACD 용액 (citric acid 0.48 g, sodium citrate 1.32 g, glucose 1.47 g to H_2O 100 ml) 2 ml을 첨가하여 4℃를 유지하여 실험실까지 운반하였다. 50 ml 원심 분리용 튜브에 옮긴 후 4℃ 1,300 g에서 15분간 원심분리하여 buffy coat를 모아 15 ml의 DNA extraction buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.0; 0.1M EDTA, pH 8.0; 0.5% SDS; 20 ㎍/ml)를 넣고 잘 섞은 후 37 ℃ 항온수조에서 1시간 동안 배양한다. 배양후 150 ㎕의 Proteinase K (200 ㎍/ml, BRL)를 혼합하여 37℃ 항온수조에서 12시간 동안 반응시켰다. 여기에 동량의 0.5M Tris-Cl (pH 8.0)으로 준비된 Phenol에 넣고 30분 동안 섞어 추출한 후 실온에서 15분간 5,000 g로 원심 분리하여 층이 생기도록 하였다. 이 과정을 3번 반복한 후, 직경이 0.3 cm되는 pippet으로 상등액을 취하여 50 ml Tris-Cl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0) 4 L에서 18시간 동안 4℃에서 dialysis하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 분리된 DNA 순도는 spectrophotometer (Beckman, USA)를 이용하여 흡광도 A_{260}과 A_{280}의 비율로 측정하였으며, 0.8% Agarose gel 전기영동을 시행하여 DNA의 분자량을 확인하였다.

② 정액으로부터의 DNA추출

냉동 정액을 200ul을 채취하여, 1.5ml 원심분리용 튜브에 넣고, PBS 1ml로 희석시킨후, 13,000rpm으로 5분간 원심분리시킨 후 상층액을 제거한다. 다시 PBS 1ml을 넣고 강하게 피펫으로 잘 섞어준 후, 다시 13,000rpm으로 5분간 원심분리시킨 후 상층액을 한번 더 제거하면, 튜브 바닥에 펠랫이 생기게 된다.. 이때, extraction buffer(10mM Tris.Cl pH8.0, 10mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS, 100ml NaCl)을 예열시켜 놓은 후, 800ul을 취해서, 펠랫과 섞은 후 0.5M dithiothreitol(DTT) 50ul와 Proteinase K(20mg/ml) 30ul을 첨가시킨후, 60℃ incubator에 12시간동안 배양후, Saturated NaCl용액을 넣고 잘 섞어준 다음, phenol을 동량을 넣은 후, 부드럽게 섞어준 다음, 13,000rpm에서 원심분리한 다음 상층액만을 모아 100% 에탄올로 처리후, DNA을 분리해 냈다. (Heyen등, 1997).

③ 꼬리로부터의 DNA추출

잘게 자른 꼬리를 막자사발에 액체질소를 부어가면서, 잘게 갈은 후, extraction buffer (10mM Tris.Cl pH8.0, 10mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS, 100ml NaCl)와 Proteinase K(20mg/ml) 60℃ incubator에 넣고 24시간 배양후, Saturated NaCl을 넣고, 잘 섞어준 다음 phenol을 동량 넣어준 다음 20분간 잘 섞어 준 후, 15,000rpm에서 10분간 원심 분리한다. 상층액만을 취해서, 100% 에탄올로 처리하여 DNA을 분리해 냈다.

3. RFLP 분석

가. PCR-RFLP

돼지 ER 유전자의 다형현상 분석과 ER 유전자와 번식형질간의 유전적 연관분석을 수행함으로서 유전양상의 확인을 위해 실시하였다.

① PCR

본 실험에서는 Short등이 1997년에 보고한 ESRF (5'-cct gtt ttt tac, agt, gac,ttt,tac, aga, g-3')와 ESRR (5'-cac ttc gag ggt cag tcc aat tag-3')을 forward와 reverse primer로 각각 사용하였다. PCR을 수행하기 위해여 ddH_2O 14.7ul, 10x PCR buffer (100mM TrisCl, pH 8.3, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$) 2ul, dNTP(2.5mM) 1.7ul, 게놈 DNA (150 200ng/ul) 0.4ul, forward와 reverse primer (20 pmol/ul) 각각 0.5ul, Taq DNA polymerase 0.2ul (5unit/ul; Takara, Japan)의 총 20ul를 사용하였다. PCR 조건은 우선 Pre-PCR 단계로서 94℃ 4분, 55℃ 1분, 70℃ 1분을 주고, extension 70℃ 1분으로 하여 총 31회를 반복한 후, 72℃ 8분으로 PCR을 종료하였다.

② 제한효소 처리 및 전기영동

PCR을 통해서 증폭된 DNA의 유전자형을 판별하기 위하여 제한효소인 *Pvu**II*** (Gibco BRL, USA)로 37에서 5시간 동안 반응시켜 증폭된 PCR 산물을 절단하였다. 절단된 단편을 확인하기 위하여 12% polyacrylamide gel로 2시간동안 200V로 전기영동 하였다.

나. Southern-RFLP

1) Human ER을 probe로 사용

① 비방사선 동위원소 표지 탐식자의 준비

돼지 ER과 염기서열에 있어서 90% 이상 상동성이 있는 인간 Estrogen receptor 유전자 (hER; Green등, 1986)를 본 실험의 탐식자로 사용하였으며, 이 유전자가 제한효소 EcoRi 절단부위애 포함되어 있는 pOR3를

American Type Culture Collection (USA)로부터 구입하여 hER만을 분리하였다. 이렇게 분리된 hER을 주형으로 하여 산자수와 관련된 유전자 다형성을 검색하기 위한 탐식자를 PCR을 이용해서 (Green등, 1986)을 근거로 PCR산물의 크기가 1,117bp가 되도록 primer 1쌍 (hER-F:'5-aag ccc gcc gtg tac aac ta-3'; hER :5'-gcc ctc tac aca ttt tcc ctg-3')을 제작하였다.

PCR을 이용한 탐식자의 비방사선 동위원소 표지에는 dNTP에 DIG-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Germany)을 혼합하여 이용하였다. PCR 조건은 denaturation 94℃ 1분, annealing 50℃ 40초, extention 72℃ 2분으로 하여 총 20회를 반복한 후, 72℃ 7분으로 PCR을 종료하였다.

② Southern hybridization

혈액에서 추출한 50 ㎍ 의 genomic DNA를 결정된 제한효소 *Pvu* ***II***로 절단하고, 절단한 DNA를 0.7% agarose gel 상에서 0.5X TBE완충액으로 전기 영동을 하였다. 전기영동후 젤을 연속적으로 탈퓨린화와 변성과정을 걸쳐 중화하였다. 처리가 끝난 젤은 20X SSC〔3M NaCl, 300mM Tris sodium acetate, pH7.0〕용액을 이용하여 젤상에 존재하는 DNA를 양전하 처리된 나일론 막(Boehringer Mannheim, Germany)을 전이시키고, UV cross-linker(UVP, USA)를 이용하여 고정시켰다. 이 나일론 막에 68℃로 준비한 혼성화 완충용액〔5X SSC; 1% blocking reagent(Boehringer Mannheim, Germany), 0.02% SDS, 0.1% N-lauroylsarcosine〕을 가하여 68℃에서 2시간 동안 예비 혼성화 시켜서 DIG-11-dUTP로 표지 된 탐식자를 첨가하여 68℃에서 12시간 동안 혼성화된 나일론 막은 세척과정을 거친 후, Chemiluminescent 검출을 하였다. 검출 반응은 Anti-DIG-AP, Fab fragment (Boehringer Mannheim, Germany)와 이것에 대한 발색 기질인 CDP-star (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 수행하였다 (Southern, 1975; Sambrook 등, 1989).

2) Porcine ER을 probe로 사용

Porcine ER cDNA의 RT-PCR partial cloning

① 시료채취

후보 표지유전자 cloning을 위한 RNA를 분리하기 위하여 서울시 동대문구 마장동 소재 (주) 우성농역의 도축장과 경기도 퇴계원 소재 (주) 남양식품의 도축장에서 후보 RNA가 존재하는 배란 후 시기의 난소와 그러한 난소들이 존재하는 자궁조직을 채취하였다 . RNA의 변성을 방지하기 위하여 바로 도축된 돼지의 조직을 채취하여 DEPC-H_2O에 처리한 후 -192℃ 액체질소에 보관하여 운반하였다.

② RNA 분리

돼지의 난소와 자궁조직에서 RNA를 분리하기 위하여 RNA zolTM B (TEL-TEST Co)를 사용하였다. -196℃ 액체질소에 보관중인 조직을 유발을 이용하여 가루로 만들고 이것을 10 ml의 RNA zolTM B 용액을 10 ml 넣고 4 ℃에서 균질화하였다. 균질액을 1.5 ml 튜브에 1 ml 분주하고 1 ml 당 0.1 ml의 chloroform을 첨가하여 15초간 강하게 섞어준 후 4℃에서 5분 동안 정치시킨 후 4℃ 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 새 튜브에 모아 동량의 isopropanol을 넣고 천천히 섞어준 후 4℃에서 15분간 정치 시킨 다음, 15분 동안 4℃ 15,000 rpm에서 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 튜브 당 75% ethanol 1 ml을 첨가하여 washing 해 주었다. 상층액을 버린 후 pellet을 건조시켜 50 μℓ의 DEPC 처리된 2차 증류수에 녹였다. 분리된 RNA의 상태를 확인하기 위해서 formaldehyde agarose gel 전기영동을 실시하였고, 260 nm 와 280nm의 O.D.(optical density)를 측정하여 RNA의 순도를 측정하고 정량하였다. 나머지 RNA sample은 -70℃에 보관하였다.

③ Oligonucleotides

이미 알려진 돼지 ER cDNA의 염기서열 (Boekenkamp 등., 1994)을 근거로하여 양 끝쪽의 primer (pERp#1, pER#1-1, pER#1-2, F9, pERp#4)와 nested primer (pERp#2, pERp#3, pER, p#3-1, R4)를 제작하여 5'-부위를 얻기 위한 PCR을 수행하였다. Primer 제작에는 OligoTech Version 1.0

(Oligos Etc. USA) 프로그램을 이용하였다. 사용된 primer의 염기서열과 위치는 아래의 Table 4에 제시하였다. 이상의 모든 primer는 Gibco BRL사에서 desalted form으로 주문하여 사용하였다.

Table 4. Primer for RT-PCR reaction

primer	primer length(bp)	product size (bp)	sequences
pERp#1	26	1100	5' **aag_ctt** atg acc atg acc cta cac ac 3'
pERp#3	24		5' tcc aaa aat cct ggc acc ctc ttt 3'
pERp#2	22	891	5' aca cac taa gaa gaa cag ccc g 3'
pERp#4	28		5' **gga_tcc** tca gat tgt ggt ggg gaa gtt c 3'

④ RT-PCR

cDNA의 cloning방법으로 널리 사용되고 있는 방법인 RT-PCR (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 이용하여 표지유전자 cloning 작업을 하였다. 돼지의 ER mRNA를 역전사 효소 (reverse transcriptase)에 의해 단일가닥의 cDNA로 역전사 하기 위해 dNTP's 6 mM, DTT 10 mM, RNase inhibitor 50 Unit, reverse primer 10 pmoles, RNA 200 ng를 섞고 DEPC 처리된 2차 증류수로 19 ㎕로 최종 부피가 되게 한 후 70℃에서 5분간 처리한 후 4℃에서 5분간 정치하였다. 5×RT reaction buffer (250 mM Tris-Cl, pH8.3; 300 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$) 5㎕와 SuperScriptTM RNaseH-reverse transcriptase (Gibco BRL, USA) 200 Unit를 섞어 만든 용액을 42℃에서 60분간 반응시켰다. 이 용액을90℃에서 5분간 처리하여 역전사효소를 변성시키고 4℃에서 5분간 정치시킨 다음 일부를 취해 PCR 반응에 쓰고 나머지는 -20℃에 보관하였다.

PCR은 역전사 반응용액 2.5 ㎕와 dNTP's 2 mM, 10×AmpliTaq Gold buffer 5 ㎕, forward primer, reverse primer를 각각 10 pmole 씩, AmpliTaq Gold polymerase (Perkin Elmer, USA) 5 Unit 등에 DEPC 처리된 이차증류수로 총반응량을 50 ㎕ 되도록 PCR 혼합액을 섞은 다음 반응을 시작하였다. PCR은 Gene Amp 2400 (Perkin Elmer, USA)을 이용해서 pre-denaturation step으로 94℃에서 15분간 1회 반응 후 denaturation 94℃ 1분, annealing 52℃ 1분, extention 72℃ 2분으로 구성된 반응 주기를 총 30 cycle을 반복하였다.

⑤ 플라스미드 분리 및 Agarose gel 상에서 PCR 산물 추출

플라스미드는 alkaline lysis 방법을 통하여 분리되었다 (Sambrook 등, 1989). DNA 염기서열 결정을 위한 플라스미드는 ampicillin이 첨가된 6ml LB 배지에서 6시간이상 37℃에서 배양 한 후 Quiagen-mini prep kit (Quiagen , USA)를 이용하여 추출하였다. Agarose gel 상에서 원하는 DNA band의 분리는 Jet Sorb kit (GENOMED, USA)를 사용하여 실시하였다.

⑥ *E. Coli* 의 형질 전환

Plasmid 형질변환을 위한 균주로서 DH5α (F-Φ 80d*lac*Z △(*lac*-ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rk-, mk+) *pho*A *sup*E44λ- *thi*- 1 *gyr*A96 rel A1.)을 사용하였다 (Hanahan, 1983). *E.coil*의 형질전환은 CaCl2 방법을 이용하여 실행하였다. *E.coil* 균주를 LB 액체 배지에 접종하여 late log phase (600nm, O.D.= 0.5-0.6)에 이를 때까지 배양하고 원심 분리하여 100 nM CaCl2로 현탁시켰다. 재조합된 DNA를 1-2㎍ 정도 넣은 후, 42℃에서 heat shock을 1분 30초간 준 후, LB배지를 800 ㎕ 첨가하여 37℃에서 1 시간 배양하였다. 이 배양액을 50 ㎍/ml의 ampicilin, 0.5 mM IPTG, 0.004% X-gal이 포함된 LB배지에 도말하고, 37℃에서 16시간 배양하여 형질전환된 colony를 선발하였다. 이 colony를 다시 LB배지에 키운 후, plasmid를 추출한 다음, 제한효소를 처리하여 형질변환체를 확인하였다. DH5α를 배양하기 위해서 LB배지 (Bacto Yeast extract 0.5%, Bacto trypton 1%, NaCl 1%) 와 형질전환 된 *E.coil*를 선

발하기 위해서 LB에 ampicilin (1 ㎍/㎖)이 포함된 배지에서 선발하였다.

⑦ PCR 산물의 Subcloning

실험에 사용한 DNA 중합효소의 특징에 따라 PCR 산물의 말단에 아데닌 염기가 overhang하게 되므로, T-vector를 이용하여 subcloning 하였고, 여러 가지 제한효소로 확인하였다. PCR 산물의 subcloning 을 위한 T-vector는 Novagen사의 pT7Blue(R)을 이용하였으며, 실험에 사용한 제한효소 및 변형효소는 Boehringer Manheim, NEB, Promega 등의 제품을 사용하였고, 반응조건은 제작사의 지시를 따랐다.

⑧ 유전자의 염기서열 분석 및 제한효소지도 작성

본 연구 수행 중에 얻어진 유전자들은 최종검증을 위해서 염기서열을 semi-automated sequencer (Li-Cor사)를 이용하여 결정하였다. Sequencing 반응에 이용된 Primer는 IRD41 표지된 M13 primer가 사용되었다. 염기서열 결정을 위해서는 didedeoxy chain-termination방법이 이용되었다. (Wallace 등, 1981; Sanger, 1977)

염기서열이 결정된 유전자의 제한 효소 절단부위에 대한 정보를 얻기 위하여 DNASIS 프로그램을 이용하여 제한효소 지도를 작성하였다.

⑨ 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

5 prime쪽의 염기서열을 분석하기 위해 5'-RACE 분석법을 시행하였는데 이때 5'-RACE system kit (Gibco-BRL)를 이용하여 수행되었다.

Porcine ER cDNA의 RT-PCR full length cloning

① 시료채취

후보 RNA가 존재하는 배란 후 시기의 난소와 자궁조직을 채취하였고,

RNA의 변성을 방지하기 위하여 바로 도축된 돼지의 조직을 채취하여 DEPC-H_2O에 처리한 후 -192℃ 액체질소에 보관하여 운반하였다.

② RNA 분리

돼지의 난소와 자궁조직에서 RNA를 분리하기 위하여 앞서 실시한 방법으로 분리된 RNA의 상태를 확인하기 위해서 formaldehyde agarose gel 전기 영동을 실시하였고, 260 nm 와 280nm의 O.D. (optical density)를 측정하여 RNA의 순도를 측정하고 정량하였고, 나머지 RNA sample은 -70℃에 보관하였다.

③ Oligonucleotides

앞선 연구를 통해 밝혀진 돼지 ER cDNA의 염기서열을 근거로 하여 reverse transcription를 위한 2 개의 primer와 PCR를 위한 2 개의 primer를 제작하였다.

pER-rt1; 5′-tca gat tgt ggt ggg gaa gtt c -3′
pER-rt2; 5′-gtc ggc tgt cag gga caa gac -3′
pER-1 ; 5′-atc agt gcc ttg ttg gag gc -3′
pER-2 ; 5′-aaa cag act aag aag agc cc -3′

이상의 모든 primer는 Gibco BRL사에서 desalted form으로 주문하여 사용하였다.

④ RT-PCR

돼지의 total RNA 5 ㎍과 20 pmole pER-rt1와 pER-rt2 primer를 각각

섞고 80℃에서 5분간 heating 하여 RNA의 2차구조를 제거한 후 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, RNase inhibitor 50 Unit, 5×RT reaction buffer (250 mM Tris-Cl, pH8.3; 300 mM KCl, 15 mM MgCl2)와 Super ScriptTM RNaseH-reverse transcriptase (Gibco BRL, USA) 200 Unit를 섞어 42℃에서 60분간 반응시켰다. 이 용액을90℃에서 5분간 처리하여 역전사 효소를 변성시키고 4℃에서 5분간 정치시킨 다음 일부를 취해 PCR 반응에 쓰고 나머지는 -20℃에 보관하였다.

PCR은 역전사 반응용액 2.5 ㎕와 2.5 mM dNTP's, 10×AmpliTaq buffer, 20 pmole pER-rt1, pER-1 primer와 AmpliTaq polymerase (Perkin Elmer, USA) 5 Unit를 섞어 총반응량을 50 ㎕ 되도록 PCR 혼합액을 섞은 다음 반응을 시작하였다. PCR은 Gene Amp 2400 (Perkin Elmer, USA) 을 이용해서 pre-denaturation step으로 94℃에서 5분간 1회 반응 후 denaturation 94℃ 1분, annealing 52℃ 1분, extention 72℃ 2분으로 구성된 반응 주기를 총 30 cycle을 반복하였다.

⑤ 돼지 유전자 cloning 및 염기서열 분석

RT-PCR에 의해 얻어진 product를 T7Blue vector (Novagene)에 클로닝한 후 semi-automated sequencer (Li-Cor사)를 이용하여 그 염기서열을 결정하였다.

⑥ 표지 유전자에 의한 유전자다형성 분석

PCR을 이용한 비방사선 동위원소 표지 탐식자 제조법의 확립

돼지 ER cDNA를 두 쌍의 primer pER1:pER-rt2, pER2:pER-rt2를 이용, PCR를 수행하여 각각 5‘ 말단 751bp와 3’말단의 894bp의 단편으로 나누고, DIG-labeling system (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 두 개의 probe를 제작하였다. 또한 PCR-RFLP에 사용된 primer을 이용하여 얻어진 120 bp DNA도 역시 같은 방법으로 probe로 제작하였다.

Southern hybridization

혈액에서 추출한 50 ㎍의 게놈 DNA를 제한효소로 절단하고, 절단한 DNA를 0.7% agarose 젤 상에서 0.5×TBE 완충액으로 전기영동 하였다. 전기영동 후 젤을 연속적으로 탈퓨린화와 변성과정을 걸쳐 중화하였다. 처리가 끝난 젤은 20×SSC [3 M NaCl, 300 mM Trisodium acetate (pH 7.0)] 용액을 이용하여 젤 상에 존재하는 DNA를 양전하 처리된 나일론 막 (Boehringer Mannheim, Germany)에 전이시키고, UV cross-linker (UVP, USA)를 이용하였다. 이 나일론 막에 68℃로 준비한 혼성화 완충용액 [5×SSC; 1% blocking reagent (Boeringer Mannheim, Germany), 0.02% SDS, 0.1% N-lauroylsarcosine]을 가하여 68℃에서 2 시간 동안 예비 혼성화시켜서 DIG-11-dUTP로 표지된 probe를 첨가하여 68℃에서 12 시간 동안 혼성화 하였다. 혼성화된 나일론 막은 세척과정을 거친 후, chemiluminescent 검출을 하였다. 검출반응은 Anti-DIG-AP, Fab fragment (Boehrigerm Mannheim, Germany)와 이것에 대한 발색 기질인 CDP-Sta (Boehrigerm Mannheim, Germany)를 이용하여 수행되었다 (Southern, 1975; Sambrook 등, 1989).

제 3절 연구 결과 및 고찰

1. 표지 유전자에 대한 유전자 다형성 분석

가. 유전자 다형현상

① 돼지 genomic DNA 추출

번식모돈군의 유전자 다형성 분석을 위한 RFLP 실험의 시료로 쓰기 위하여 돼지의 경정맥으로부터 혈액을 10 ml 추출하여 돼지 genomic DNA를 추출하였다. 앞서 언급한 일련의 방법을 통하여 추출된 DNA의 순도는 흡광도 A_{260}과 A_{280}의 비를 측정한 결과 그 값이 1.7 이상으로 모두 본 실험에 적합한 순도를 나타내었다

② 유전자 다형성분석을 위한 표지 유전자의 준비

RFLP 분석을 위한 표지 유전자를 준비하기 위하여 *E. coli*로부터 산자수와 관계가 알려져 있는 hER이 존재하는 pOR3 유전자를 추출하였다. 크기가 5.6 kbp인 pOR3로부터 hER만을 분리하기 위하여 제한효소인 EcoRI로 처리하여 1.3 kb인 hER을 전기영동 gel상에서 분리하였다 (Fig. 2). 이를 RFLP의 표지 유전자로 사용하기 위하여 dialysis tube를 이용한 electro-elution (Sambrook 등, 1989) 방법을 통해 정제하여 최종농도 0.3 0.4 μg/μℓ로 유지하여 보관하였다.

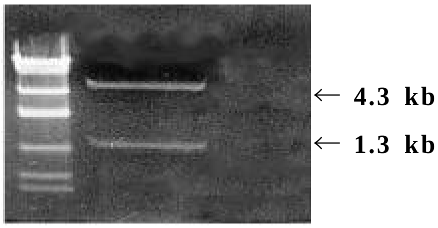


Fig 2. Electrophoresis analysis of pOR3 digetsed by EcoR I

유전자 cloning방법으로 널리 사용되고 있는 방법인 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction)을 이용하여 표지유전자 cloning 작업을 하여 PCR반응을 시킨 후 (Kawasaki, 1990), 산자수와 관련된 유전자 다형성을 분석을 하기 위하여 RFLP에 필요한 20여개의 제한효소를 결정하여 관련된 유전자 좌위가 번식형질과 관계되는 효소들을 선정하였다.

나. RFLP 분석

산자수 관련 유전자의 유전자형을 확립을 위한 시도로서 제한효소 *Pvu*II로 처리한 genomic DNA (Fig. 3)를 후보 표지 유전자인 hER을 이용한 Southern hybridization 분석을 수행하여 Table 4에서와 같이 2.3 kb 부위에서 고능력군 개체들과 저능력 개체들간의 차이를 발견하였다. 이러한 결과를 토대로 하여 비방사선동위원소 검색 방법을 이용한 RFLP 조건을 확립하였다.

Fig 3. Electrophoresis analysis genomic DNA digested by *Pvu II*

Lane 1: λDNA digested to completion with *Dra*I

Lane 2: F7619, lane 3: W7843 lane 4: F5840, lane 5: F6674

Table 5. Correlation between RFLP and litter size

		DNA			Record of litter size	
Individuals		5,2kb	3.3kb	2.3kb	TNB	Number of weaning
high group	F7619	○1)	○	X2)	15.00±3.55	10.67±0.94
	W7843	○	○	X	14.33±2.62	9.67±2.05
low group	F5840	○	○	○	6.25±1.09	-
	F6674	○	○	○	8.00±0.81	8.00±1.41

1); band: O, 2); band: X

다. 표지유전자의 cloning

돼지에서 인간 ER cDNA (Green **등**, 1986)**를** probe**로 한** Southern-hybridization**을 통하여 얻은** RFLP**와 생산 산자수간에 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있고** (Rothschild**등**, 1996), 1994**년** cDNA**의** cloning **된 돼지** ER**의** 3‘**말단 염기서열을 이용한** RT-RFLP**가 보고 된 바 있지만**(Drogemuller**등**, 1997), **돼지** ER **유전자** (pER)**를 이용하여 생산 산자수간의 관계를 구명하는 분석은 아직 이루어지지 않은 실정이다**. **따라서**, **돼지에서** ER cDNA**를** cloning**하여 산자수와의 연관성을 밝히는 실험을 통해서** ER**의 표지 유전자로서의 신뢰도를 높이기 위하여 이 실험이 진행되었다**. **이미 알려진** pER**말단의** 5‘**말단과** 3’**말단에 상보적인** forward**와** reverse primer**를 제작하여** RT-PCR**을 수행하였다**. RT-PCR**후 전기 영동을 한 결과 앞서** Table 4**에서 제시한 여러 가지** primer**쌍들중에서**, pERp#2**와** pERp#4**를** primer**로 이용한 반응에서** 891bp**크기로 추정되는** DNA**가 검출되었다** (Fig. 4).

1 2 3

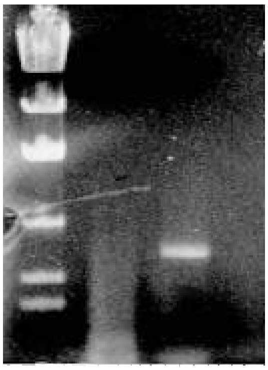


Fig. 4. 0.8% Agarose gel electrophoresis of DNA after RT-PCR

The DNA amplified by RT-PCR of RNA isolated from porcine ovary. Reverse transcription is done at ℃ for the shown RT-PCR products. Lane 1; λDNA size marker cut with *Dra* I, lane 3; RT-PCR products are shown. The 891 bp band shows the DNA size expected from nucleic sequences of the cDNAs encoding 880 bp of pER The lowest band is primer left after reaction DNA sizes are indicated by numers beside arrows

이 DNA가 pER의 cDNA임을 확인하기 위하여 증폭된 산물의 primer를 제작한 pER 유전자상에 작용부위가 존재하는 제한효소 *Rsa* ***I***, *Apa* ***I***, *Bgl* ***II*** *Pst* ***I***으로 처리한 후, 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 절단된 양상을 조사하였다.

전기 영동 결과 제한효소 *Apa* ***I***, *Bgl* ***II*** 그리고 *Pst* ***I***는 예상한 대로 PCR 산물내에 작용부위가 한 곳 존재하였으며, *Rsa* ***I*** 역시 3곳의 작용 부위가 존재함을 확인하였다 (Fig 5와 6). PCR산물을 pT7Blue vector에 cloning하여 sequencing한 결과 cDNA의 크기는 891 bp였으며, 이미 1994년 Boekenkamp등이 발표한 porcine estradial receptor의 호르몬 결합부위인 activation function-2(AF-2) 영역의 염기서열과 일치하였다. 이러한 결과는 RT-PCR산물이 pER유전자와 일치함을 보여 주며 RFLP분석에 이용될 probe로서 cloning 되었음을 보여준다.

1 2 3 4 5 6

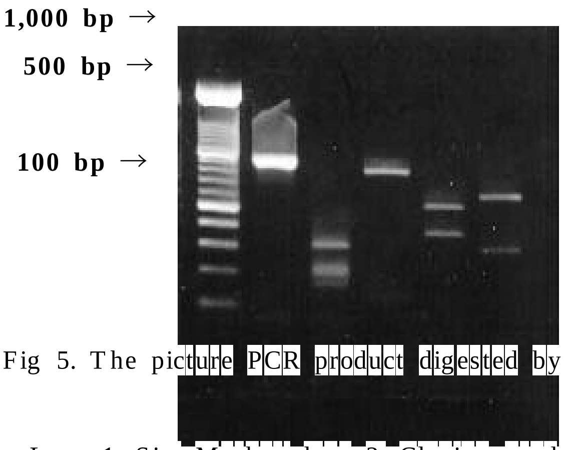


Fig 5. The picture PCR product digested by Enzyme

Lane 1. Site Marker, lane 2. Cloning product

Lane 3. plasmid DNA by *RsaI*, lane 4. plasmid DNA by *ApaI*

Lane 5. plasmid DNA by *BalII*, lane 6. plasmid DNA by *PstI*

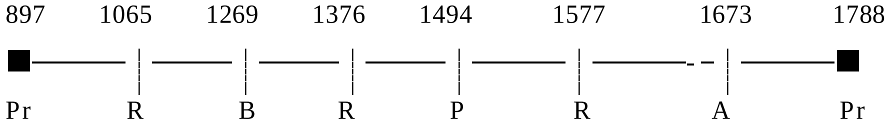


Fig 6. The enzyme map of PCR product

R: *Rsa* ***I***, B: *Bgl* ***II***, A: *Apa* ***I***, P: *Pst* ***I***, Pr: Primer

2. 상관유전자의 구조분석에 관한 연구

가. PCR을 이용한 비방사선 동위원소 표식 탐식자 제조법 확립

Southern-RFLP 수행에 있어서 가장 중요한 단계인 탐식자 표지의 효율적인 수행을 위하여 PCR을 이용한 비방사선 동위원소 표식탐식자 제조 방법을 확립하였다. 앞서 연구내용 및 방법에서 언급한 조건으로 PCR을 수행하여 Fig. 7 과 같은 전기영동결과를 얻었다. lane 1은 control, lane 2는 비방사선 동위원소를 이용해서 탐식자를 표지한 결과이다.

Marker 1 2

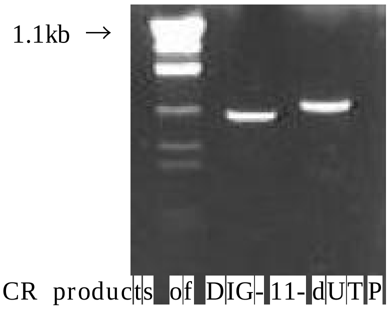


Fig. 7. PCR products of DIG-11-dUTP labeled hER

이 방법을 앞선 연구에서 탐식자를 표지하기 위해 사용한 Klenow 효소 표지 방법과 비교 해보면 보다 신속하고 다량의 표지된 탐식자의 확보가 가능해 짐으로서 보다 효율적인 유전자 다형성 분석을 수행 할 수 있게 되었다.

나. Southern / PCR - RFLP

ER유전자에 대한 다형 현상을 밝히기 위해 산자수와 상관관계가 보고된 hER을 표지유전자로 하여 Southern 및 PCR-RFLP분석을 수행하였다. 위에 제시한 방법으로 표지된 PCR 산물을 탐식자로 사용하여 *Pvu*II로 절단한 공시돈의 게놈 DNA와 혼성화 (hybridization)를 실시한 결과, 4.3 kb와 3.7 kb에서 다형현상이 나타남을 발견할 수 있었다 (Fig. 8). 이 다형현상 결과 4.3 kb와 3.7 kb에서만 나타난 절편의 유전자형을 각각 동형접합체인 AA와 BB 로 나타내었다. 또한 4.3 kb와 3.7 kb에서 동시에 절편이 관찰된 경우, 유전자형을 이형접합체인 AB형으로 표시하였다. PCR 증폭산물의 크기는 120 bp로서 제한효소인 *Pvu*II (CAG↓CTG)로 처리할 경우 인지부위의 돌연변이에 의해 증폭산물이 Fig. 9에 제시한 바와 같이 나타나게 되었다. Southern-RFLP에서의 BB형의 경우, PCR-RFLP에서는 120

bp PCR **증폭산물이** *Pvu*II**에 의해 절단되어** 55 bp**와** 65 bp **절편이 형성되며** AA**형에서는 절단되지 않아** 120 bp **의 증폭산물이 나타났다**.

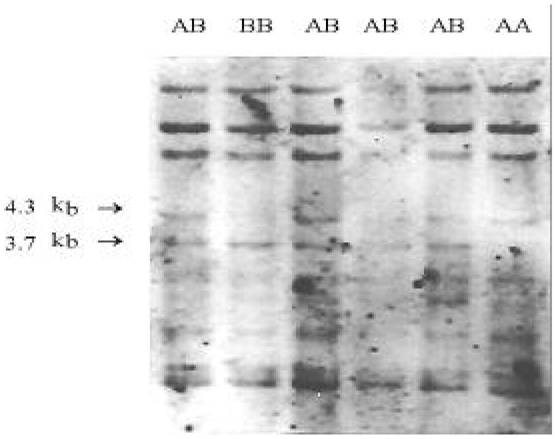


Fig. 8. Southern-RFLP analysis of 6 unrelated pigs.

The 4.3kb (A allele) and 3.7kb (B allele) fragments are shown with

heterozygous and homozygous pigs.

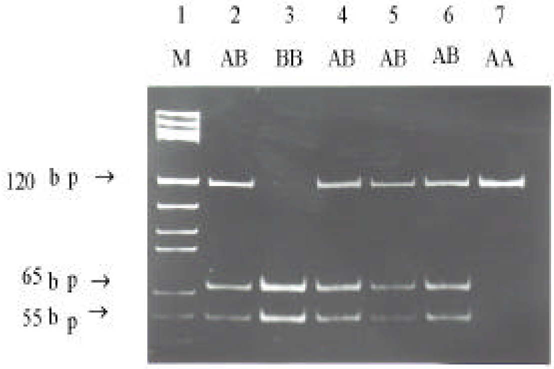


Fig. 9. PCR-RFLP analysis of 6 pigs genotyped by *Pvu*II

Lane 1: size marker pBR322 digested with *Hae*III.

Lane 2: homozygous animal for the A allele

Lane 5: homozygous B allele
Lane 2, 3, 4, 6, 7: heterozygous AB genotype

이형접합체인 개체의 경우 A유전자형과 B유전자형을 절반씩 가지므로 120bp, 65bp, 55bp의 세 종류 절편이 관찰되었다. 비록 본 연구에서 사용된 Southern-RFLP의 탐식자와 PCR-RFLP의 primer가 서로 다른 종으로부터 유래되었으나, 동일한 표본으로부터 유래한 돼지 염색체 1번의 단완(p-arm) 말단에 존재하는 ER 좌위변이를 검색하였으므로 RFLP 유형이 동일하게 나타남을 볼 수 있었다 (Ellegren 등, 1994).

본 연구에서는 Yorkshire 종돈군 중에서 표본 추출한 61두를 Southern-RFLP와 PCR-RFLP를 통하여 ER 유전자에 대한 유전자형을 판별하였다. 판별 결과 PCR-RFLP와 Southern-RFLP가 일치하는 것으로 나와 앞으로 많은 돼지들의 ER유전자형을 PCR-RFLP에 의해서 신속하고 정확하게 구분해 낼 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 1997년 Short등이 Yorkshire 경산돈의 ER 유전자형을 검색한 결과, ER 유전자형이 번식형질과 산육 형질에 영향을 준다고 보고하였다. 따라서, 이러한 ER유전자를 PCR을 이용한 RFLP를 실시함으로써 종돈 번식형질의 개량에 대한 DNA 표지인자로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 확립된 ER 유전자형은 번식형질 자료와의 연관성분석을 통하여 우리나라의 Yorkshire 종돈군에서 산자수 증진과 관련된 marker-assisted selection (MAS)의 실시를 위한 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.

다. 유전자의 염기서열 분석

① RT-PCR 산물의 염기서열 분석

산자수와 관련된 새로운 표지 유전자의 개발을 위하여 RT-PCR을 수행하여 약 900 bp 인 산물을 pT7Blue vector에 sub-cloning하여 Dideoxy termination method로 sequencing한 결과 cDNA의 크기는 891 bp 였으

며, 이미 1994년 Boekenkamp등이 발표한 porcine estradiol receptor의 호르몬 결합 부위인 activation function 2 (AF-2) 영역의 염기서열과 일치하였다. 이러한 결과는 RT-PCR 산물이 pER 유전자와 일치함을 보여 주며 RFLP 분석에 이용 될 probe로서 cloning 되었음을 보여준다 (Fig. 10).

```
  1    ACACACTAAG AAGAACAGCC CGGTCTTGTC CCTGACAGCC GACCAGATGA
 51    TCAGTGCCTT GTTGGAGGCT GAGCCCCCCA TAATCTATTC CGAGTATGAT
101    CCTACCAGAC CCCTCAGTGA GGCTTCAATG ATGGGCTTGC TGACCAACCT
151    CGCAGACAGG GAGCTGGTAC ACATGATCAA CTGGGCAAAG AGGGTGCCAG
201    GATTTTTGGA TTTAAGCCTC CATGATCAAG TGCATCTTCT GGAATGTGCC
251    TGGCTAGAGA TCCTCATGAT TGGTCTTGTC TGGCGCTCCA TGGAGCACCC
301    AGGGAAGCTC CTGTTTGCTC CTAACTTGCT CCTGGACAGG AACCAGGGCA
351    AGTGTGTCGA GGGAATGGTG GAGATCTTTG ACATGTTGCT GGCTACATCA
401    TCTCGCTTCC GTATGATGAA TCTCCAGGGA GAGGAGTTTG TGTGCCTCAA
451    ATCCATCATT TTGCTTAATT CTGGAGTGTA CACGTTTCTG TCCAGCACCC
```

```
501     TGAAGTCTCT GGAAGAGAAG GACCATATCC ACCGTGTCCT GGACAAGATC
551     ACAGACACCT TGATCCACCT GATGGCCAAA GCGGGCCTGA CTCTGCAGCA
601     GCAGCACCGG CGTCTCGCGC AGCTCCTCCT CATCCTGTCT CACTTCAGGC
651     ACATGAGTAA CAAAGGCATG GAGCATCTGT ACAACATGAA GTGCAAGAAC
701     GTGGTGCCCC TCTATGACCT GCTGCTGGAG ATGCTGGACG CCCACCGCCT
751     GCACGCCCCA ACCAACCTTG GGGGCCCACC CCCGGAGGAC ATGAGCCAGA
801     GCCAGCTGGC CACCTCGGCT CAACTCCATC GCATTCCTTG CAAATGTATT
851     ACATCACAGG GGAGGCGGAG AACTTCCCCA CCACAATCTG A
```

Fig. 10. Nucleotide Sequences of 891 bp RT-PCR product

② 5'-RACE 의 염기서열의 분석

RT-PCR 방법을 통하여 돼지 ER유전자의 cDNA를 cloning하기 위하여 Table. 4에 제시한 여러 가지 primer를 이용하여 여러 조건에서 PCR을 수행해 보았으나 5'-부위의 DNA를 얻을 수 없었다. 따라서 이에 대한 대안으로서 cDNA의 5'-부위만을 특이적으로 cloning할 수 있는 5'-RACE를 실시하여 약 700 bp의 산물을 얻을 수 있었고, 이를 T-vector에 subcloning 하였다. (Frohman 등, 1988)

Subcloning된 5'-RACE 산물의 염기서열 분석을 위하여 sequencing을 수행한 결과는 Fig. 11과 같다. 염기서열 분석결과를 살펴보면 진한 색의 염기서열은 이미 보고된 돼지 ER cDNA 염기서열과 상동성이 매우 높았고, 밑줄 그어진 염기서열의 경우 이미 보고된 돼지 ER cDNA의 927 1313 bp에 염기서열 부위가 동일하게 존재하였다. 이러한 결과는 기존의 보고와는 다른 것으로서 본 연구에서 산자수와 관계된 표지유전자에 대한 1 차구조에 대한 정보를 얻을 수 있었으며, 이 정보를 토대로 하여 돼지에서 다산성 개체 검색을 위한 새로운 탐식자 (probe)의 개발이 가능하게 되었다 .(Fig. 12).

```
  1   GTCCCTGACA CCCGACCAGA TGATCAGTGC CTTGTTGGAG GCTGAGCCCC CCATAATCTA
 61   TTCCGAGTA TGATCCTAC CAGACCCCTC AGTGAGGCTC AATTGATGGG CTTGCTGACC
119   AACCTCGCA CACAGGGAG CTGGTACACA TGATCAACTG GGCAAAGAGG GTGCCAGGAT
177   TTTTGGATT TAAGCCTCC ATGATCAAGT GCATCTTCTG GAATGTGCCT GGCTAGAGAT
236   CCTCATGAT TGGTCTTGT CTGGCGCTCC ATGGAGCACC CAGGGAAGCT CCTGTTTGCT
295   CCTAACTTG CTCCTGGAC AGGAACCAGG GCAAGTGTTC GAGGGAATGG TGGAGATCTT
353   TGACATGTT GCGGCTACA TCATCTCGCT TCCGTATGGT GCATCTCCAGG GAGAGGAGTTT
414   GTGTGCCTAC AATCCATACT TTTGCTTAATT CTGGAG GACA_TAATGACTACA_TGTGTCCAGCT
478   ACCAACCAGT_GCACAATTGA_TAAGAACAGGA_GGAAGAGCTGT_CAGGCCTGCCG_GCTACGCAAGT
542   GCTACGAAGT_GGGCATTGAT_GAAAGGGGGA_TACGGAAAGAC_CGGAGAGGAGG_GAGAATGTTGA
607   AGCACAAGCG_CCAGAGAGAT_GATGGAGAGGG_CAGGAATGAAG_CGGTGCCCCCT_GGAGACATGAG
672   ATCTGCCAAC_CTTTGGCCAA_GCCCTCTCTTG_ATTAAACACAC_TAAGAAGAAGA_CCCCGGTCT
```

Fig. 11. Nucleotide Sequences of 734 bp 5′-RACE product

③ 제한지도의 작성

5‘-RACE **결과 얻어진** DNA**의 염기서열 분석 결과를 토대로 제한지도 작성을 한 결과를** Fig 12**에 나타내었다**.

	R	N	T	A	H	H	
1	145	265	333	459	518	683	734

Fig. 12. Restriction enzyme map of 5'-RACE product

R: *RsaI*, N: *NcoI*, T:*TaqI*, A: *AflIII*, H: *HaeIII*

④ PCR-RFLP 산물에 대한 염기서열분석

돼지 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR-RFLP분석을 위해서 증폭한 AA형과 BB형 120 bp 유전자의 최종 검증을 위하여 Automated DNA sequencer (Li-Cor, USA)에 의하여 염기서열을 분석하였다 (Fig. 13). 분석 결과 AA형의 경우 *Pvu*II 절단부위가 없었고, BB형의 경우 PCR-RFLP의 결과에 상응하는 55 bp 와 65 bp 를 양분하는 부위에 *Pvu*II 절단부위 (cag↓Ctg)가 존재하였다. 이러한 결과는 AA형의 경우 *Pvu*II 절단부위 상에서 C에서 T로의 point mutation되었고, 이러한 사실은 BB형과 분자수준에서의 구분이 가능함을 의미한다.

a. cac ttc gag ggt cag tcc aat tag aat agg gtg gaa tgg gga

ctt gac aag a**ca_gT_tg**g tct cat aaa act tga ttc tgc atc

ttt aga tat act ctg taa aag tca ctg taa aaa cag g

b. cac ttc gag ggt cag tcc aat tag aat agg gtg gaa tgg gga

ctt gac aag a**ca**_**g**↓**C**_**tg**g tct cat aaa act tga ttc tgc atc

ttt aga tat act ctg taa aag tca ctg taa aaa cag g

Fig. 13. Nucleotide Sequences of PCR-RFLP product

a. AA type b. BB type

3. 유전자 조기 분석법의 실용성 검토

가. Porcine ER 유전자의 cloning 및 1차 구조 분석

지난 연구에서 5′-RACE와 RT-PCR 방법에 의해 클로닝한 돼지 ER 유전자의 부분 염기서열 분석을 통해 primer을 제작, RT-PCR 방법으로 full-length의 ER 유전자를 클로닝하였다. 돼지 ER의 full-length cDNA의 크기는 1,645 bp (Fig. 14: lane 2)로서 3′쪽의 약 453 bp가 5′말단에 중복된 독특한 구조를 가지고 있다. 이것은 기존에 알려진 돼지 ER 유전자와는 다른 새로운 것이다. 본 실험에서 클로닝한 돼지 ER 유전자의 염기서열은 Fig. 15 와 같다.

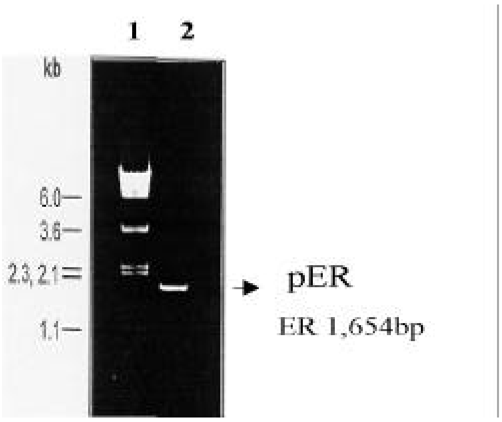


Fig. 14. PCR product of Porcine Estrogen receptor

lane 1. size marker, lane 2.. PCR product of pER

1 GTCTTGTCCC TGACAGCCGA CCAGATGATC AGTGCCTTGT TGGAGGCTGA GCCCCCCATA ATCTATTCCG

71 AGTATGATCC TACCAGACCC CTCAGTGAGG CTTCAATGAT GGGCTTGCTG ACCAACCTCG CAGACAGGGA

```
141     GCTGGTACAC ATGATCAACT GGGCAAAGAG GGTGCCAGGA TTTTTGGATT TAAGCCTCCA TGATCAAGTG
211     CATCTTCTGG AATGTGCCTG GCTAGAGATC CTCATGATTG GTCTTGTCTG GCGCTCCATG GAGCACCCAG
281     GGAAGCTCCT GTTTGCTCCT AACTTGCTCC TGGACAGGAA CCAGGGCAAG TGTGTCGAGG GAATGGTGGA
351     GATCTTTGAC ATGTTGCTGG CTACATCATC TCGCTTCCGT ATGATGAATC TCCAGGGAGA GGAGTTTGTG
421     TGCCTCAAAT CCATCATTTT GCTTAATTCT GGAGGACATA ATGACTACAT GTGTCCAGCT AGGAACCAGT
491     GCACAATTGA TAAGAACAGG AGGAAGAGCT GTCAGGCCTG CCGGCTACGC AAGTGCTACG AAGTGGGCAT
561     GATGAAAGGG GGGATACGGA AAGACCGGAG AGGAGGGAGA ATGTTGAAGC ACAAGCGCCA GAGAGATGAT
631     GGAGAGGGCA GGAATGAAGC GGTGCCCCCT GGAGACATGA GATCTGCCAA CCTTTGGCCA AGCCCTCTCT
701     TGATTAAACA GACTAAGAAG AGCCCGGTCT TGTCCCTGAC AGCCGACACA CACTAAGAAG AACAGCCCGG
771     TCTTGTCCCT GACAGCCGAC CAGATGATCA GTGCCTTGTT GGAGGCTGAG CCCCCCATAA TCTATTCCGA
841     GTATGATCCT ACCAGACCCC TCAGTGAGGC TTCAATGATG GGCTTGCTGA CCAACCTCGC AGACAGGGAG
911     CTGGTACACA TGATCAACTG GGCAAAGAGG GTGCCAGGAT TTTTGGATTT AAGCCTCCAT GATCAAGTGC
981     ATCTTCTGGA ATGTGCCTGG CTAGAGATCC TCATGATTGG TCTTGTCTGG CGCTCCATGG AGCACCCAGG
1051    GAAGCTCCTG TTTGCTCCTA ACTTGCTCCT GGACAGGAAC CAGGGCAAGT GTGTCGAGGG AATGGTGGAG
1121    ATCTTTGACA TGTTGCTGGC TACATCATCT CGCTTCCGTA TGATGAATCT CCAGGGAGAG GAGTTTGTGT
1191    GCCTCAAATC CATCATTTTG CTTAATTCTG GAGTGTACAC GTTTCTGTCC AGCACCCTGA AGTCTCTGGA
1261    AGAGAAGGAC CATATCCACC GTGTCCTGGA CAAGATCACA GACACCTTGA TCCACCTGAT GGCCAAAGCG
1331    GGCCTGACTC TGCAGCAGCA GCACCGGCGT CTCGCGCAGC TCCTCCTCAT CCTGTCTCAC TTCAGGCACA
1401    TGAGTAACAA AGGCATGGAG CATCTGTACA ACATGAAGTG CAAGAACGTG GTGCCCCTCT ATGACCTGCT
1471    GCTGGAGATG CTGGACGCCC ACCGCCTGCA CGCCCCAACC AACCTTGGGG GCCCACCCCC GGAGGACATG
1541    AGCCAGAGCC AGCTGGCCAC CTCGGCTCAA CTCCATCGCA TTCCTTGCAA ATGTATTACA TCACAGGGGA
1611    GGCGGAGAAC TTCCCCACCA CAATCTGA
```

Fig. 15. Sequences of Porcine ER

나. 표지 유전자에 의한 유전자 다형성 분석 및 연관지도 작성

산자수와 관련된 ER유전자에 대한 다형 현상을 밝히기 위해 클로닝한

돼지 ER cDNA를 표지유전자로 하여 Southern-RFLP분석을 수행하였다. 산자수 생산능력에 있어 차이를 보이는 대상군의 genomic DNA를 분리하여 *Pvu*II 제한효소로 절단한 후 다양한 돼지 ER cDNA의 단편들을 probe로 사용하여 Southern blotting을 수행하였다. 돼지 ER 유전자의 3′말단의 894 bp DNA probe는 산자수 차이에 따른 다형현상을 보이지 않았다 (Fig. 16).

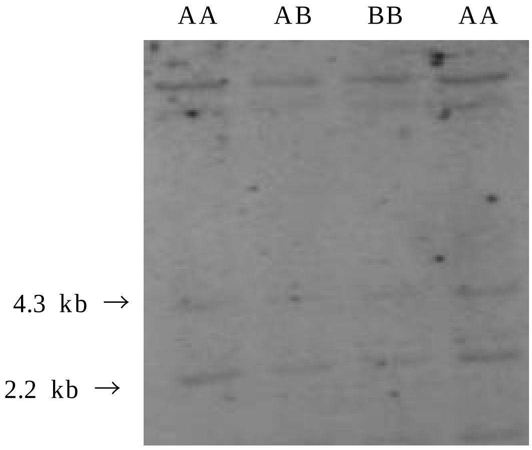


Fig. 16. Southern-RFLP ; Southern blotting with genmic DNA digested by *Pvu*II using 894 bp towards 3 prime as a probe

그러나 5′말단의 751 bp DNA probe는 human ER 유전자를 probe로 했을 때와 같은 다형현상를 보였다 (Fig. 17A and 17B). 즉 4.3 kb와 3.7 kb에서 다형현상이 나타남을 발견할 수 있었는데, 이 다형현상 결과 4.3 kb와 3.7 kb에서만 나타난 절편의 유전자형을 각각 동형접합체인 AA와 BB로 나타내었다. 또한 4.3 kb와 3.7 kb에서 동시에 절편이 관찰된 경우, 유전자형을 이형접합체인 AB형으로 표시하였다. 돼지 ER 유전자의 5‘ 말

단의 경우 약 453 bp 가 3' 말단과 중복된 구조를 가지므로 아마도 162 bp 가 산자수에 따른 ER 유전자의 다형현상을 나타내는 부분일 것으로 생각한다.

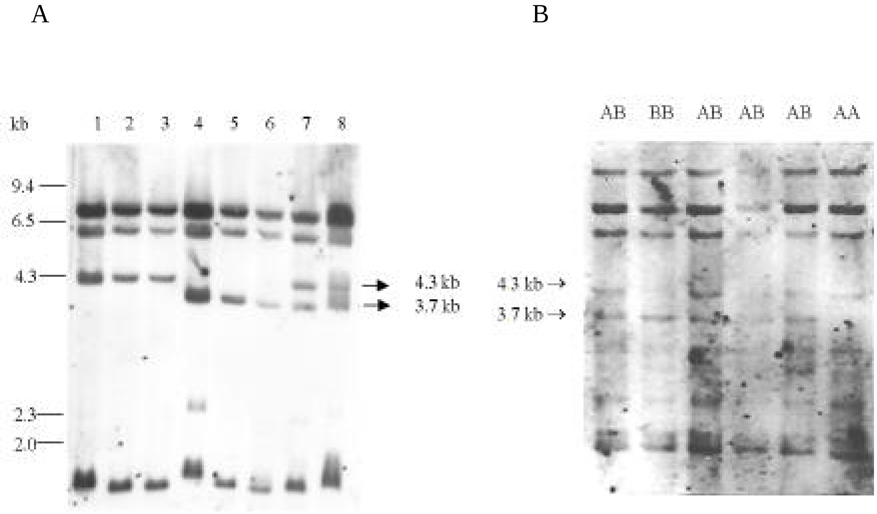


Fig. 17. Southern-RFLP

A: Southern blotting with genmic DNA digested by using 751 bp towards 5 prime as a probe

B:. Southern blotting with genomic DNA digested *Pvu*II using human ER

돼지 ER유전자의 5' 말단 751 bp 는 다형현상을 보이는 4.3 kb와 3.7 kb band이외에 다른 여러개의 band pattern을 나타내었는데 실제로 이 결과가 기존에 알려진 PCR-RFLP pmimer와 어떤 관계에 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 PCR-RFLP에 사용된 primer을 이용하여 PCR를 수행, 120 bp의 DNA 단편을 얻었고 이를 probe로 하여 Southern blotting를 하였다.

그 결과 120 bp DNA probe는 오직 다형현상을 보이는 4.3 kb와 3.7 kb band만을 나타내었다 (Fig. 18). 이 결과는 PCR-RFLP에 사용된 primer가 다형현상을 보이는 genomic DNA에서 cloning 된 것이라는 가설을 뒷받침 할 수 있다.

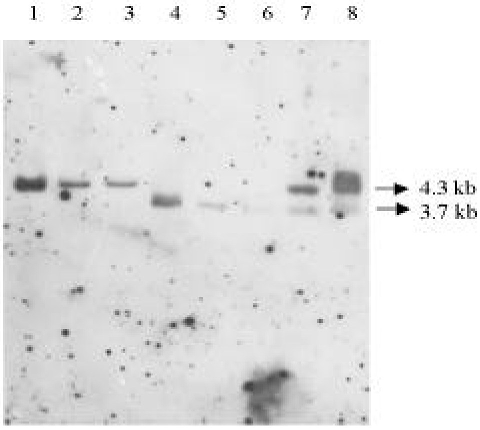


Fig. 18. Southern-RFLP

Southern blotting with genmic DNA digested by *Pvu*II using PCR product as a probe

다. 산자수 결정을 위한 kit 개발

지금까지 산자수와 상관관계가 보고된 경우는 모두 *Pvu*II 제한효소를 처리 할 경우에 대한 것이었다. 본 실험실에서는 종돈 번식형질의 개량을 위해 필요한 새로운 표지 유전자을 찾기 위해 표본 추출한 돼지의 genomic DNA를 *Msp*I의 제한효소로 처리하고 이를 돼지 ER의 5′말단 751bp를 probe로 사용하여 Southern-RFLP를 수행하였다. 그 결과 5.0 kb 와 5.7 kb 부근에서 산자수 증가에 따른 다형현상을 나타내었다. 즉, 산자수가 높

은 개체에서는 5 kb의 단일 band가 나타난 반면에 산자수가 낮은 개체에서는 5.7 kb의 단일 band가 보였다 (Fig. 19).

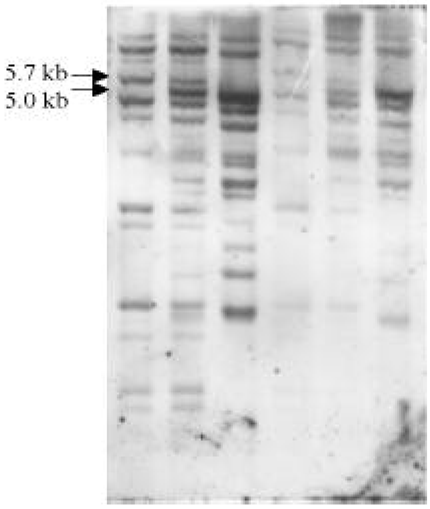


Fig. 19. Southern-RFLP

*MspI*의 제한효소로 처리한 돼지 genomic DNA를 돼지 ER의 5′말단 751 bp의 probe로 Southern blotting 한 결과. lane1,4는 산자수가 낮은 개체이고 lane 3, 6은 산자수가 높은 개체이다. lane 2, 5는 이형접합체. probe로 사용한 돼지 ER 유전자의 5′말단의 경우 약 453 bp 가 3'말단과 중복된 구조를 가지고 있다. 그런데 3′말단의 DNA를 probe로 사용할 경우 다형현상이 나타나지 않고 5'말단의 DNA만이 다형현상을 나타내므로 아마도 중복되지 않은 5′말단의 162bp가 산자수에 따른 ER 유전자의 다형현상을 나타내는 부분일 것으로 생각한다. 이때 다형현상을 나타내게 하는 돼지 ER 유전자상의 염기서열은 다음과 같다 (Fig. 20).

GGACATAATG ACTACATGTG TCCAGCTAGG AACCAGTGCA CAATTGATAA GAACAGGAGG

AAGAGCTGTC AGGCCTGCCG GCTACGCAAG TGCTACGAAG TGGGCATGAT GAAAGGGGGA

TACGGAAAG ACCGGAGAGG AGGGAGAATG TTGAAGCACA AG

Fig. 20. **돼지** ER**유전자 중 다형현상을 보이는 부분의 염기서열**

현재 본 실험실에서는 다형현상을 나타내는 돼지 genomic **상의** DNA **부분을** λFIX II vector (Stratagene)**를 이용하여** library**를 만들고 이를 위에 염기서열을 표시한** DNA**를 가지고 선별하고 있는 중이다. 이 작업이 완료되면** PCR**에 의해 신속하고 편리하게 산자수을 결정할 수 있는** primer**를 제작할 수 있을 것으로 기대한다.**

라. PCR-RFLP

본 실험에서는 Short **등**(1997)**이 발표한** primer**를 각각 사용하여 실시하였으며, 박 등**(1999)**이 이미 보고한 효소처리 방법으로 유전자 다형 현상을 분석하였다. 산자수 관련 유전자의 유전자형의 확립과 검증을 위해 표본수를 늘려 전체 돈군의 표본** 348**두를 임의 추출하여** PCR-RFLP **분석를 수행하여** Fig. 21 **에서와 같이** AA, AB, BB**의 유전자형이 검출되어 이전 연구 결과를 검증하고 있다.**

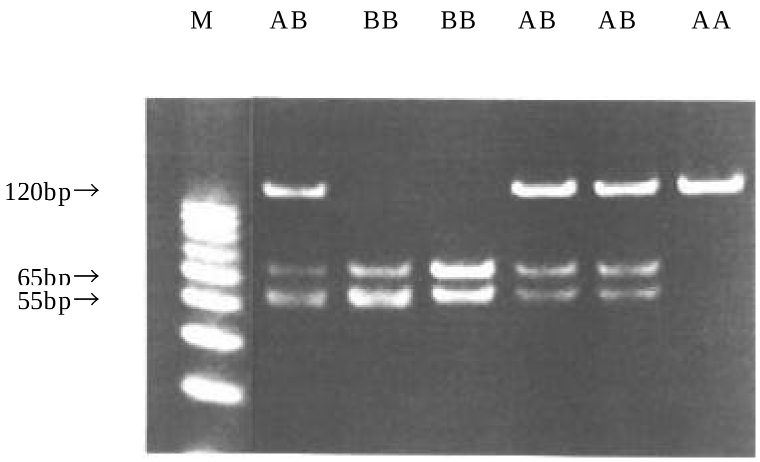


Fig. 21. PCR-RFLP analysis of pER gene

마. ER 유전자의 유전 양상

이미 돼지 ER 유전자 좌위에서의 유전자형은 종돈군에서 안정적으로 유전됨이 보고된 바 있다 (Rothschild 등, 1996). 본 연구에서는 PCR-RFLP를 이용한 분석한 결과, 자돈으로의 모돈과 웅돈에서의 ER 유전자의 유전양상은 멘델의 법칙을 따라 유전됨을 보여주고 있다 (Fig 22, 23 와 24). 이때, 웅돈에서는 정액에서 모돈은 혈액에서 그리고 자돈에서는 꼬리에서 DNA를 추출하여 PCR-RFLP를 실시하였다.

Mendelian Inheritance

① 웅돈 AA형 × 모돈 AA형

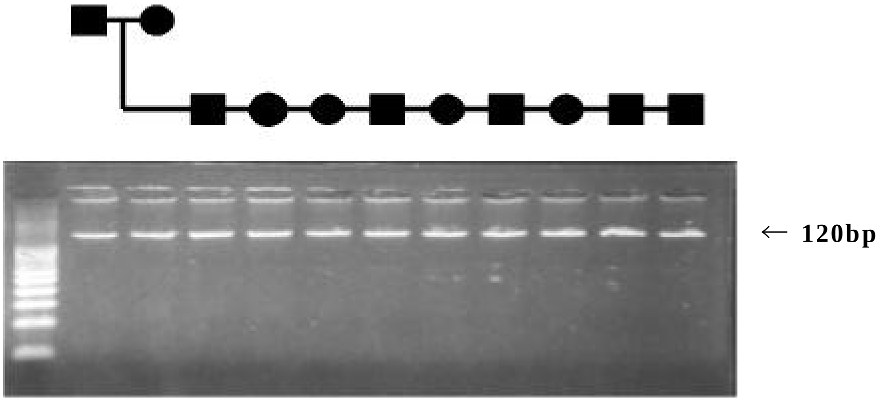


Fig. 22. The pedigree of Sire AA x Dam AA

Fig 22과 23는, 웅돈과 모돈의 ER유전자형이 동형접합체일 때의 그 자돈들의 유전자형을 난타낸 것이다. 이때, Fig. 22은 웅돈 AA형과 모돈 AA형으로 구성되어진 6개 가계에서의 분석 결과이며, Fig. 23는 웅돈 BB형과

모돈 BB형으로 구성되어진 6개의 가계에서의 유전 전달 양상을 잘보여주고 있다. 동형접합체로 이루어진 이 가계에서는 부모의 유전양식을 따라 자돈에서도 역시 동형접합체의 유전자형을 지니는 것으로 나타났다.

② 웅돈 BB형 × 모돈 BB형

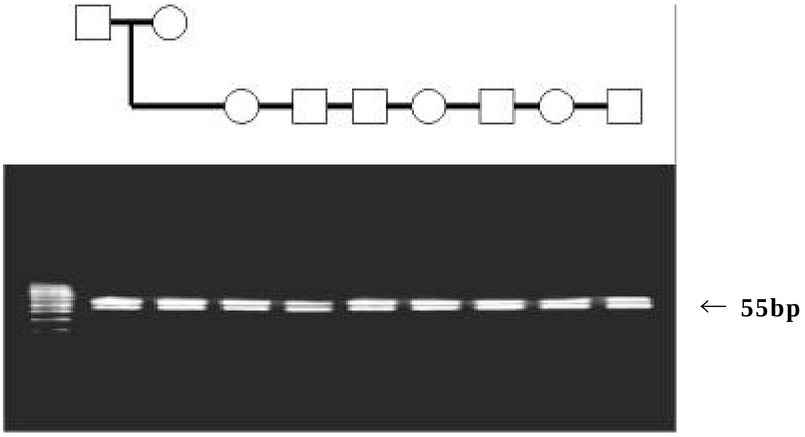


Fig. 23. The pedigree of Sire BB x Dam BB

③ 웅돈 AA형 × 모돈 AB형

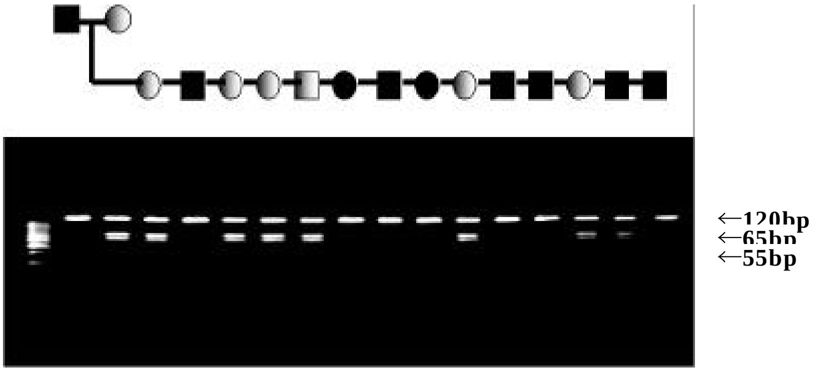


Fig. 24. The pedigree of Sire AA**형** ×Dam AB**형**

Fig. 24은 부모의 유전자형이 동형 접합체일때와 이형접합체일 경우에 ER 유전자의 유전현상을 나타낸 결과이다. 이 분석은 10개의 가계에 대해 자돈의 꼬리로 실시하였으며 AA형과 AB형의 비율이 1:1의 비율로 유전 전달되었다. 그러므로 기존의 연구(Rothschild 등, 1996) 결과를 뒷받침하고 있다.

제 3장 산자수 관련 후보유전자의 분포 및 생산 능력간의 상관분석

제 1절 서 론

1980년 이전까지 축산업에 있어서 관심대상이 되는 여러 가지 경제형질 (economic traits)들이나 심장병, 고혈압, 당뇨병처럼 복합적인 요인에 의하여 표현되는 양적형질 (Quantitative traits)들은 유전자형과 표현형간에 Mendel 의 유전양식을 따르지 않고 여러 유전자 (polygene)들과 환경적인 요인들과의 상호작용에 의해서 표현되므로 이 분야에 대한 연구는 집단 유전학 또는 통계유전학적인 접근방법에 의해서 이루어졌다 (East, 1916; Wright, 1968; Handerson, 1975; Elston, 1979).

그러나 1980년대 들어서 분자 유전학적 기법의 발전과 인간 및 동물에서 유전자 지도의 작성이 가능해지면서 개발된 DNA 다형현상에 근거한 다양한 종류의 유전적 표지들은 양적형질에 유전적 변이 연구분야에 있어서 강력한 도구로서 대두되었다 (Heley, 1994). 모돈의 생산능력과 관련된 형질들은 유전력이 낮고 복합적인 요인에 의하여 표현되는 이유로 기존의 개체 선발을 이용한 개량은 그 효과를 크게 기대하기 어려워, 통계 유전학적 방법론을 이용한 연구를 통해서 번식형질에 대한 유전적 개량이 크게 성과를 거두지 못하였다 (Stewart, 1945; 정과 박, 1986). 하지만, 최근 Merino 양과 Meishian 돼지에서 다산성이 유전적 요인과 높은 상관관계가 있음이 밝혀져 번식능력이 우수한 개체의 선발에 대한 가능성이 제시되었다 (Lanneluc 등, 1994; Rothschild 등, 1996).

따라서 모돈의 생산능력을 최대한 이용할 수 있는 개체의 선발에 기존의 통계유전학적 방법을 통한 분석과 함께 번식능력과 관련된 유전자를 분자적 수준에서 분석할 수 있는 분자유전학 기법을 이용한다면, 분석결과 얻어진 정보를 통하여 적절한 선발과 교배방법을 이용하는 MAS를 통해서 생산효율성을 높힐 수 있을 것으로 기대된다 (Visscher와 Haley, 1995; Davis 등, 1998). 번식형질에 대한 유전적 능력 개선에 MAS가 이용되기 위해서는 먼저 번식형질을 DNA 수준에서 검색할 수 있는 유전적 표지가 필요한 데, ER 유전자 좌위에서의 유전적 변이가 돼지의 TNB와 NBA와 통계적 관련성이 존재하는 것으로 보고 되었다 (Rothschild 등, 1996; Short 등, 1997).

번식형질과 같은 복잡한 형질 (complex traits)의 유전현상을 연구하는데 사용되는 분석방법들 중에는 관련성 분석 (association study)과 유전적 연관분석 (genetic linkage analysis)이 있다. 유전적 연관분석이란 가계 (pedigree)를 조성하여, 염색체 수준에서 특정형질과 그 형질발현에 영향을 미치는 요인들 함께 전달 되어지는데 대한 연구이다 (Kravitz 등, 1979). 이에 비해서 관련성 분석은 특별한 가계조성 없이 집단 수준에서 비 무작위적 (non random)으로 유전자와 어떤 형질간이 함께 출현하는 것에 대한 통계적 관계만을 설명한다 (Lander와 Schork, 1994).

관련성 분석을 위해서 이용되는 통계적 연구방법들을 살펴본다면 한 집단에서 어떤 인자에 영향을 받은 사례군 (case group)과 받지 않은 대조군 (control group)간의 비교연구를 통해서 어떤 표형 형질을 나타내는 개체에서 특정 유전자형이 관찰될 확률이 일반적으로 기대되는 것에 비해서 높은지 여부를 통계적으로 분석하는 사례-대조 연구 (case-control studies)와 관심대상 형질의 관측값을 종속변수로 하고 이에 대한 요인들을 독립변수로 하여 종속변수와 독립변수간의 선형 관계식을 나타내는 모형 (model)을 설정한 다음, 분사분석 (analysis of variance)과 정규방정식 (normal equation)을 통해서 얻을 수 있는 최소 제곱 평균 (least squares means)을 이용하거나 회귀모형 (regression model)을 이용하여 요인들이 관심대상 형질에 미치는 영향을 분석하는 선형모형 방법론이 있다(Searle, 1971; 허, 1987; 박과 이, 1996).

사례-대조 연구는 주로 임상연구에서 많이 쓰이는 데, HLA 대립유전자형과 idopathic hemochromatosis나 ankylosing spondylitis같은 질변의 유전양상을 연구하는데 (Laukens등, 1978; Khan등, 1981) 적용되며, 선형모형 방법론을 이용하는 경우는 축산분야에서 경제 형질과 유전자형간의 연관성 분석에 이용된다 (Cowan등, 1992; Mejdell등, 1993; Yoo와 Sheldon, 1998).

본 연구는 ER 유전자 좌위와 모돈의 총 산자수(Total Number Born, TNB)와 실산자수(Number Born Alive, NBA)간의 관련성을 선형모형 설정을 통하여 분석하고 모돈의 산자수 생산능력에 영향을 미치는 ER 유전자 좌위효과를 구명하여 돈군에서 번식능력을 개선과 관련된 MAS를 실시하기 위한 기초자료를 제시하고 자 한다.

제 2절 연구재료 및 방법

1. 번식종돈군의 개체별 · 가계별 분석

본 연구는 1997년 11월부터 1998년 8월까지 과제 수행에 적합한 종돈을 보유한 경기도 포천군 소재 (주) 세왕농장의 Yorkshire 종돈군을 연구대상으로 선정하여 분만 실태의 조사를 위하여 총 400두의 번식자료를 분석하였고, 이들 중 산차수에 따른 번식능력을 분석하여 유의성 있는 능력을 보이는 3산 이상의 137두의 종돈을 본 연구의 실험 축군(resource population)으로 선정하였으며, 이로부터 최종적으로 산자수 관련 후보 유전자와의 상관관계를 구명하기 위하여 선발된 고능력 모돈군 27두와 저능력 모돈군 17두를 표본 추출하여 분석을 실시하였다.

가. 조사 항목

번식능력에 대한 유전적 특성을 파악하기 위하여 기초군의 총산자수 ·

생시체중 · 포유두수 이유두수 및 이유시체중의 번식능력을 조사하였으며, 이에 대한 유전력과 반복력을 추정하였다. 세분화하고 계열화된 결과를 위하여 기초군의 산차에 따른 번식능력을 조사하였다.

번식능력에 따라 분리한 고능력 모돈군과 저능력 모돈군 중에서 유전자 다형성을 찾기에 적합한 경산 돈들을 고능력 모돈군에서 27두 및 저능력 모돈군에서 17두를 선발하여 총산자수 · 생시체중 · 포유두수 · 이유두수 · 이유시체중을 산차에 따라 분리하여 조사 · 분석하였다.

나. 통계분석방법

본 연구에서 자료의 분석은 SAS package를 이용하여 분석하였으며, 분석에 이용된 선형모형은 다음과 같다.

$Yj = \mu + si + ej$

Yj : i 번째 부에 속하는 j 번째 모돈의 능력측정치
μ : 전체평균
si : i 번째 부의 효과
ej : 임의효과

$Ykm = \mu + \alpha k + ekm$

Ykm : k 번째 개체의 m 번째 측정치
μ : 전체평균
αk : k 번째 개체의 효과
ekm : k 번째 개체내의 m 번째 측정치의 환경편차

2. 다산성 종돈군의 유전형질분석

가. 공시돈

본 연구는 경기도 포천군 소재 ㈜ 세왕 축산의 GGP농장의 무창 돈사 (confined pig house)에서 사육중인 400여두의 Yorkshire 종돈군을 연구 대상으로 선정하여 이들에 대한 번식자료를 분석하여 5산 이상의 137두의 종돈을 본 연구의 실험축군 (resource population)으로 선정하였으며, 이로부터 최종적으로 돼지 ER 유전자 좌위와 산자수간의 연관성을 분석하기 위하여 61두를 표본 추출하였다.

나. 조사 항목

본 연구에서 조사된 번식형질은 생시 복당 총산자수 (total number born, TNB), 생시 복당 실산자수 (number born alive, NBA) 이었으며, 표본 추출된 61두의 ER 유전자형을 판별하기 위해 Southern과 PCR-RFLP 분석을 수행하였고, 이들의 TNB 와 NBA를 산차별로 조사 · 분석하였다.

3. 후보유전자의 분포 및 번식능력과 상관관계분석

가. 공시돈

본 연구에서는 ER 유전자의 돈군내 분포 및 번식능력과 상관관계 분석을 위해 전돈군을 대상으로 임의 추출 하였으며 PCR-RFLP에 의해 분리된 유전자형분포를 전돈군과 품종별로 분석하였고, 유전자형이 밝혀진 Yorkshire와 Landrace를 포함한 348두중 이상치를 제외한 Yorkshire종 경산돈 292두에 한해, 산차별 생시복당총산자수(TNB) · 생시복당실산자수 (NBA)을 조사하여 ER 유전자와의 상관관계를 분석하였다.

나. 조사 항목

본 연구에서 조사된 번식형질은 생시 복당 총산자수 (total number born, TNB), 생시 복당 실산자수 (number born alive, NBA) 이었으며, 임의 표본추출된 348두의 ER 유전자형을 RFLP 분석을 수행하였고, 이중 이상치를 제외한 Yorkshire 292두로 TNB 와 NBA를 산차, 분만년도, genotype별로 조사 · 분석하였다.

다. 통계 분석 방법

① 유전자 빈도의 추정

돼지 ER 유전자 좌위에 있어서 유전자빈도의 산출은 최다 우도 추정법 (MLE)에 따라 추정하였다 (Park 등,1999).

② 고정 효과 모형

조사된 자료의 통계분석은 SAS 6.12 package를 이용하였고, 산자수에 영향을 미치는 각각의 효과를 살펴보기 위해서는 SAS/ GLM procedure의 분석결과 제공되는 4가지 제곱합중에서 불균형자료에 적합한 Type III 제곱합을 이용하여 분산분석을 하였으며, 고정효과를 설정하여 최소 제곱법으로 각 요인들에 대하여 최소 제곱 평균을 구하였다.

$$Y_{ijk} = \mu + g_i + p_j + r_k + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = 각 번식형질의 측정치
μ = 전체 평균
g_i = ER유전자형의 효과 (j=1,2,3)
p_j = 모돈 산차의 효과
r_k = 분만년도의 효과

ε_{ijk} = 각 개체의 고유한 임의오차.

공시돈들은 무창돈사 내에서 동일한 사료급여 프로그램하에서 온도, 습도, 광주기 같은 환경요인을 동일하게 적용 받기 때문에 계절과 같은 환경효과가 동일하게 적용되는 것으로 가정하고 모형설정에 있어서 배제하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 번식종돈군의 개체별 · 가계별 분석

가. 번식성적

번식능력에 대한 유전적 특성을 파악하기 위하여 기초군과 고능력 및 저능력군의 총산자수 · 생시체중 · 포유두수 · 이유두수 및 이유시체중의 번식능력은 Table 6 에서와 같이 조사되었다.

Table 6. Mean and Standard Error of each group on the reproductive ability

	N	L	TNB	B.W	N.M	N.W	W.B.W
F	137	455	11.01±0.15	14.91±0.20	10.11±0.14	9.33±0.06	57.40±0.56
High	27	89	12.93±0.25	17.19±0.35	11.82±0.25	9.34±0.14	58.06±1.24
Low	17	53	9.28±0.34	13.42±0.56	8.32±0.34	9.08±0.23	55.54±1.76

F : Foundation, H.G: High Group, L.G: Low Group, N: Number

L: Total Litter size, TNB: Total Number Born, B.W: Birth weight

N.M: Number of Mothering, N.W: Number of Weaning

W.B.W: Weaning Body Weight

Table 7. Mean and Standard Error of each parity in control group on reproductive ability

Parity	L	TNB	B.W	N.M	N.W	W.B.W
1	131	10.83±0.29	13.68±0.40	9.85±0.29	8.97±0.11	51.85±0.80
2	137	11.15±0.27	15.5±0.34	10.32±0.24	9.55±0.13	58.30±1.01
3	135	11.01±0.26	15.61±0.36	10.31±0.24	9.41±0.12	61.68±1.06
4	52	11.06±0.38	14.58±0.50	9.73±0.31	9.48±0.17	57.9±1.76

L: Total Litter size

TNB: Total Number Born, B.W: Birth weight

N.M: Number of Mothering, N.W: Number of Weaning

W.B.W: Weaning Body Weight

위의 Table들의 결과에서 보는 것과 같이 고능력 모돈과 저능력 모돈은 기초축을 기준으로 하여 현저한 차이를 나타내고 있다. 즉, 고능력 모돈은 저능력 모돈에 비해 총산자수를 비롯한 생시체중 · 포유두수 · 이유시체중이 확실히 높게 나타난 것을 볼 수 있다. 이는 앞에서 제시된 여러 가지 유전적 실험 등에 의하여 축군별 번식능력에 차이가 있다는 것을 알 수 있다.

보다 세분화하고 계열화된 자료를 얻기 위하여 기초군의 산차에 따른 번식능력은 Table 7과 같다. 산차별 평균 및 표준오차는 복수의 개수가 비슷한 1 · 2 · 3산차의 경우 산차가 3산차에서 비교적 높은 능력을 나타냈고, 이는 번식능력에 큰 영향을 미친다고 사료된다.

Table 8. Mean and Standard Error of high prolific sow on each parity

Parity	L	TNB	B.W	N.M	N.W	W.B.W
1	27	12.48±0.45	16.32±0.55	11.63±0.44	9.00±0.23	51.31±1.54
2	27	13.22±0.56	17.73±0.70	12.00±0.49	9.48±0.27	59.22±2.14
3	26	12.96±0.42	17.93±0.57	12.12±0.42	9.54±0.27	63.46±2.44
4	9	13.33±0.67	16.04±1.25	11.00±0.73	9.33±0.47	59.24±4.14

L: Total Litter size, B.W: Birth weight

N.M: Number of Mothering, N.W: Number of Weaning

W.B.W: Weaning Body Weight

Table 9. Mean and Standard Error of low performance sow on each parity

Parity	L	TNB	B.W	N.M	N.W	W.B.W
1	14	9.29±0.42	11.56±1.01	7.57±0.64	8.00±0.47	45.94±3.17
2	17	9.71±0.55	14.83±0.91	9.18±0.53	9.71±0.33	59.91±2.32
3	16	8.88±0.82	13.84±1.04	8.38±0.70	9.13±0.41	59.65±3.50
4	6	9.17±1.05	12.62±1.84	7.50±0.81	9.67±0.56	54.57±3.59

L: Total Litter size, B.W: Birth weight

N.M: Number of Mothering, N.W: Number of Weaning

W.B.W: Weaning Body Weight

고능력군의 산차에 따른 개체간의 번식능력은 Table 8과 같다. 고능력 모돈의 총산자수는 12.48에서 13.33 정도로 비교적 높은 수치를 보이며, 3산차의 경우 이유시체중도 63.46으로 우수한 것으로 사료된다.

저능력군의 산차에 따른 개체간의 번식능력은 Table 9와 같다. 저능력 모돈의 경우는 고능력 모돈의 수치보다 총산자수 · 생시체중 · 포유두수 등의 통계수치는 현저히 낮은 것으로 사료된다. 또한 이유두수와 이유시체중 등은 산차별 평균의 수치가 매우 불안정하게 값의 차이를 보이는 것으로 사료된다.

나. 유전력 및 반복력

Table 10는 기초군에서 총산자수 · 생시체중 · 포유두수 · 이유두수 및 이유시 체중에 대하여 추정된 유전력과 반복력이다.

Table 10. Estimated heritability and repeatability

		TNB	B.W	N.M	N.W	W.B.W
Control	H	0.08	0.06	0.001	0.18	0.03
	R	0.32	0.19	0.16	0.12	- 0.12
High	H	0.14	0.11	- 0.21	0.61	0.08
	R	0.07	- 0.16	- 0.60	0.29	- 0.26
Low	H	- 0.65	- 0.13	- 0.70	- 0.21	0.20
	R	- 1.22	- 0.31	- 1.33	- 0.23	- 0.003

H: heritability R: repeatability

대부분의 번식형질과 관련된 유전력은 매우 낮다고 보고된 바와 같이 기초군에서 추정된 유전력도 대부분의 형질이 0.1이하로 낮게 추정되었다. 산자수의 유전력은 평균 0.1이하로 추정되어진다고 알려진 바와 같이 본 연구에서도 0.08로 낮은 유전력을 나타내었다.

2. 다산성 종돈군의 유전형질분석

게놈상의 염기서열 변이에 근거한 유전적 표지 (DNA marker)들이 동물의 경제적 능력을 증진에 이용되기 위해서는 기존의 통계 유전학적 방법을 통한 표지 유전자와 생산 형질간의 연관성 분석이 요구된다. 이를 바탕으로 다산성 개체를 구조적으로 선발할 수 있도록 유전적 모수를 추정하였다. 또한 유전자 다형성 분석결과를 토대로 실험축군 내 산자수 관련 유전자의 유전자 빈도를 추정하였다. 이때, 표본 집단내 ER 유전자형

의 빈도를 추정한 결과 A 유전자빈도는 0.38이었고, B유전자 빈도는 0.62로 나타났다.

'번식종돈군의 개체별 · 가계별 분석' 에 관한 연구 수행결과 선정된 137두의 실험 축군에서 표본 추출된 61두의 번식형질 자료를 토대로 ER유전자 효과를 포함한 선형모형을 설정하여 후보 표지 유전자인 ER 유전자와 종돈군의 번식 형질간의 연관성 분석을 실시한 결과 ER 유전자의 효과가 조사된 번식형질에 대하여 통계적 유의성이 인정되었으며. ER 유전자 좌위의 다형 현상검색을 통해 확립된 AA, AB, 그리고 BB 유전자형 별로 대체효과를 알아보기 위하여 다중회귀 분석을 실시하였고 각각의 회귀계수의 통계적 유의성이 인정되었다.

다산성 개체의 선발 방법의 개발을 위해서는 번식 형질에 대한 정확한 유전적 모수의 추정이 필수적이라 할 수 있다. 이를 위하여 다양한 환경 및 유전적 요소를 분석하고 이에 따른 종축의 유전적 가치를 평가하기 위하여 Restricted Maximum Likelihood (REML)등의 분산 성분 추정방법을 이용하여 유전력을 산출하였다.

가. 축군내 ER유전자 빈도의 추정

실험 축군으로부터 추출된 61마리의 표본집단에서 RFLP를 통해 확인된 유전자형의 분포는 Table 11과 같다.

Table 11. Distribution of genotype and gene frequency determined by

Southern and PCR-RFLP

	Total	Genotype			Gene Frequency^a		Predicted Genotype Frequency		
		AA	AB	BB	p	q	p^2	2pq	q^2
Pigs	61	7 (11.5)	32 (52.4)	22 (36.1)	0.38	0.62	14.4	47.1	38.5

※ ^{a}p=A gene frequency and q=B gene frequency

Table 11에 제시한 바와 같이 AA형은 11.5%, AB형은 52.4%, BB형은 36.1%의 비율이 관찰되었다. 이 자료가 멘델의 유전양식을 따르는지 살펴보기 위해 5% 유의 수준에서 적합도 검정을 실시한 결과 멘델 유전양식에 부합되지 않았다 (χ^2=7.52 , P<0.05). 종빈돈 표본 집단 내 유전자 비율을 살펴보면 B유전자가 A유전자보다 많이 존재했는데 이러한 사실은 A와 B 유전자와 산자수 간의 관계로서 설명이 가능하다. 즉, 1996년에 발표된 Rothschild 등의 보고에 의하면 BB형 또는 AB형처럼 B유전자를 하나라도 가진 개체는 AA형처럼 B유전자를 하나도 가지지 않은 개체에 비하여 0.5두 이상의 복당 산자수 증가 효과가 있는 것으로 알려졌다. 따라서, 우리 나라 대부분의 종돈장의 경우 산자수에 대해서 저능력 개체들의 도태를 실시함으로서 산자수에 대한 저능력 유전자가 제외되었기 때문에 본 연구에 공시된 종돈군에서 산자수에 대한 저능력 유전자인 A 유전자가 제거되어 종돈군 내에 B 유전자의 빈도가 더 높게 나온 것으로 추측된다. 이는 Short 등 (1997)이 산자수 증진을 위한 선발프로그램이 적용된 Yorkshire 상업축군의 ER 유전자 빈도를 조사한 결과 A 유전자빈도가 낮았다는 보고와 일치하였다.

나. 분산 분석

본 연구에서 조사된 복당 자돈수와 복당 체중에 대한 ER 유전자형과 산차의 효과를 분석하기 위해 선형 모형을 설정하였고, 이 모형을 토대로 분산분석을 한 결과를 Table 12에 제시하였다. 각 요인에 대한 유의성 검정 결과를 보면 ER 유전자의 효과에 있어서 조사된 모든 형질에 대해 고도의

유의성 ($P < 0.01$)**이 인정되었다**. **이는** ER **유전자형에 의한 번식 고능력돈의 선발**, **즉** DNA **표지를 이용한 선발** (marker-assisted selection)**의 타당성을 제공한다**.

Table 12. Source of variation, degree of freedom, mean squares, tests of significance for sow litter size

Source	d.f.	Total number of born	Number born alive
ER genotype	2	120.33**	92.73**
Parity	6	3.21N.S.	5.06N.S.
ER genotype × Parity	12	5.24N.S..	6.73N.S.
Error	327	7.81	6.30

※ **P<0.01, N.S. : non-significance

다. ER 유전자형의 효과

분산분석을 통하여 산자수에 영향을 미치는 것으로 판명된 ER **유전자형의 구체적 효과는 고정효과모형을 통해 얻어진 최소제곱평균을 이용하여 추정하였다**. **산자수에 대한** ER **유전자형별 최소제곱 평균치와 표준오차는** Table 13**에 제시한 바와 같다**. TNB**와** NBA**의 경우** BB **형이 가장 우수하였고**, AA , AB **그리고** BB **순으로 번식형질 수치가 상가적 유전양상을 보였다**. **이러한 결과는** ER **유전자형중에서** BB**형 또는** AB**형의 경우가** AA**형보다 최소** 0.5**두 이상의 복당 산자수의 증가효과가 있다는 것을 보여주는 것으로서** 1996**년** Rothschild**등이 보고한 바와 일치함을 알 수 있다**.

Table 13. Least-squares means and standard errors for the traits by the ER genotype

ER genotype	N	Total number of born	Number of born alive
AA	7	9.82±0.50a	8.16±0.45a
AB	31	10.91±0.29a	9.85±0.26b
BB	23	12.70±0.31b	10.98±0.27b

※ N, total number of records

^{a,b} means in the same column with different superscript significantly differ at $^{**}P$ <0.01

라. 산차의 효과

본 연구에서 조사된 각 번식형질의 산차별 최소제곱 평균치와 표준오차는 Table 14.에 제시한 바와 같다.

Table 14. Least-squares means and standard errors for the traits by parity

Parity	Total number of born	Number of born alive
1	11.08±0.50	9.89±0.45
2	11.48±0.51	10.47±0.46
3	10.69±0.50	9.99±0.45
4	11.61±0.51	9.78±0.45
5	10.95±0.51	9.55±0.45

생시복당 총산자수에서는 4산차에서 가장 우수하였고, 생시 복당 실산자수는 2산차에서 가장 높았다. 생시 총산자수의 경우, 초산과 5산차에서 낮은 경향을 보였고, 2, 3, 4산차에서 높았다. 생시 실산자수의 경우 초산과 4산차 5산차에서 낮았고, 2, 3산차에서 높았다.

마. ER 유전자형과 산차의 상호작용 효과

본 연구에서 조사된 각 번식형질의 산차와 ER 유전자형의 상호작용의 최소제곱 평균치와 표준오차는 Table 15에 제시하였다.

Table 15. Least-squares means and standard errors for the traits by the ER genotype and parity interaction

ER genotype	Parity	Total number of born	Number of born alive
AA	1	10.60±1.26	8.40±1.12
	2	10.20±1.26	9.20±1.12
	3	8.40±1.26	7.80±1.12
	4	10.40±1.26	7.60±1.12
	5	9.00±1.26	6.60±1.12
AB	1	10.62±0.54	10.07±0.49
	2	11.44±0.54	10.48±0.48
	3	11.48±0.54	10.92±0.48
	4	11.92±0.56	10.80±0.50
	5	11.50±0.53	10.42±0.47
BB	1	12.00±0.63	11.20±0.56
	2	12.80±0.72	11.73±0.65
	3	12.20±0.63	11.25±0.56
	4	12.50±0.66	10.94±0.59
	5	12.35±0.68	11.64±0.61

복당 생시 총산자수를 살펴보면 AA 유전자형에서는 3, 5산차에서 낮고 1, 2, 4산차에서 산자수가 높은 경향을 보였고, AB 유전자형에서는 초산에서는 낮고 산차수가 올라감에 따라서 산자수가 증가되었다. BB 유전자형에서는 2산차에서 가장 높은 수치를 나타내었다.

복당 생시 실산자수의 경우는 AB 유전자형의 경우 1산차에서 낮았고, 2, 3, 4산차에서 증가하다가 다시 5산에서 감소하였고 BB 유전자형의 경우, 2산과 5산에서 높았고, 4산차에서 낮았다. AA 유전자형에 있어서는 산차가 증가 될수록 감소되는 경향을 보였다.

바. 다중 회귀분석

산자수에 영향을 미치는 ER유전자의 효과를 좀더 구체적으로 살펴보기 위하여 ER 유전자형과 산자수간의 관계를 다중회귀를 통하여 분석하였다. ER 유전자형별 회귀계수를 구하기 위해서 독립변수에는 0 과 1의 가변수 (dummy variable)가 쓰였다. 분석은 초산시의 산자수와 전체산차별 산자수를 구분하여 분석하였다. Table 16에서와 같이 각 유전자형별 회귀계수는 전체 산차를 분석한 결과에서 통계적 유의성이 인정되었다.

Table16. Quantitative effect of the porcine ER genotype on reproductive traits

ER genotypes	First parity		All parities	
	TNB(SE)	NBA(SE)	TNB(SE)	NBA(SE)
AA	2.03[a](.001)**	1.54(.001)[b]**	1.51(.30)*	0.83(.27)*
AB	2.61(.001)**	2.74(.001)**	2.90(.17)**	2.97(.16)**
BB	3.51(.001)**	3.24(.001)**	3.83(.20)**	3.59(.18)**
Additive[c]	0.74	0.85	1.16	1.38
Dominance[d]	- 0.16	0.35	0.23	0.76

※ [a] Results obtained from multiple regression analysis: The regression coefficients express the quantitative effects of the ER genotypes

[b] SE in parentheses, *$P<0.005$, **$P<0.001$ N.S. : non-significance

[c] means additive effect, [d] means dominance effect

유전자형별 회귀계수를 이용하여 Edwards 등(1987)이 제시한 밥법으로 B 유전자의 TNB와 NBA에 대한 상가적 효과와 우성효과를 추정하였다. 상가적 효과는 초산과 전체 산차에서 관철할 수 있었고, 우성효과에 있

어서는 그 효과가 상가적 효과보다 높지 않았으나 초산보다 전체 산차를 포함한 경우가 높았는데 이는 기존의 보고와 일치하는 경향을 나타내었다 (Rothschild 등, 1996; Short 등 1997).

사. 다산성 개체의 선발 방법

다산성 개체의 선발 방법의 개발을 위해서는 번식 형질에 대한 정확한 유전적 모수의 추정이 필수적이라 할 수 있다. 따라서 유전력을 구하기 위하여 앞서 제시한 혼합모형을 제시하였고, 설정된 모형으로부터 유전력을 구하기 위한 분산 성분을 얻기 위하여 SAS/STAT에서 제공되는 분산분석법 (analysis of variance-based methods), 최소분산 이차 불편 추정법 (minimum variance quadratic unbiased estimation, MIVQUE), 최우법 (maximum likelihood Estimation, ML) 그리고 최근에 개발된 제한 최우법 (resticted maximum likelihood Estimation, REML)의 방법을 이용하여 추정한 결과를 Table 17에 제시하였다.

산자수와 같은 번식형질의 경우에는 그 유전력이 낮다고 보고된 바와 같이 표본집단에서 추정된 유전력도 총산자수의 경우 0.2 였고, 실산자수의 경우에도 0.1로 낮은 유전력을 나타내었다. 4가지 다른 방법으로 각각 추정하였지만, 그 추정치는 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 17. Heritability on reproduction trait estimated by different methods

Heritability	ANOVA	MIVQUE	ML	REML
TNB	0.21	0.20	0.19	0.21
NBA	0.12	0.12	0.10	0.12

3. 후보유전자의 분포 및 번식능력과 상관관계분석

본 연구에서는 348두의 전 돈군을 대상으로 임의 추출하여, 각 개체의

ER 유전자를 PCR-RFLP하여 각각의 유전자형을 분석하였다. 이때, 산차가 있는 Yorkshire 321두 중 이상치를 제외한 288두만을 대상으로 ER 유전자형 분포와 번식능력간의 상관관계를 분석하였다.

가. 돼지 ER 유전자및 유전자형 빈도

실험 축군으로부터 임의 추출된 348마리의 전 돈군에서 RFLP를 통해 확인된 유전자형 빈도와 최다 우도 추정법 (MLE)으로 산출한 돼지 ER의 유전자형 기대빈도와 및 유전자형 기대 빈도의 분포는 Table 14에서 제시된 바와 같다 (Park 등, 1999). 대상 모돈군을 이루고 있는 Yorkshire 종의 유전자형 은 AA형이 12.1%, AB형이 53.9% 그리고 BB형이 34%를 차지하였다. 유전자 비율 추정치를 살펴보면 B 유전자 비율이 0.61로서 A 유전자가 차지하는 0.39보다 월등히 높았다. 이는 대부분의 종돈장의 특성상 산자수에 대해서 고능력 개체들의 선발 프로그램을 실시함으로서 Rothschild 등 (1996)에 의해 기존에 보고된 바와 같이 복당 산자수 증가와 관련이 있는 B 유전자가 A유전자에 반해 돈군내에 꾸준한 선발이 있었음을 제시하고 있다 (Table 18).

Table 18. Distribution of genotype and gene frequency for each breed

determined by PCR-RFLP

		Genotype			Gene Frequency[a]		Genotype Frequency		
	N	AA	AB	BB	p	q	p^2	$2pq$	q^2
Yorkshire	321	39 (12.1)	173 (53.9)	109 (34.0)	0.39	0.61	15.2	47.6	37.2
Landrace	27	9 (33.3)	15 (55.6)	3 (11.1)	0.61	0.39	37.2	47.6	15.2

※ [a]P= A gene frequency and q=B gene frequency

N: Number of records

나. 분산 분석

본 연구에서 조사된 TNB**와** NBA**에 대한** ER**유전자형**, **산차**, **분만년도의 효과를 분석하기 위해 설정한 고정효과 모형을 토대로 분산분석을 실시한 결과는** Table 19**에 제시된 바와 같다**. **각 요인에 대한 유의성 검정 결과를 보면**, **산차와 분만년도가** TNB**와** NBA**에 고도의 유의한 영향을 미쳤다** ($p< 0.01$). **한편**, ER genotype**은 산자수에 대하여 통계적 유의성이 인정되지 않았다**. **그러나**, **산차에 있어 고도의 유의성이 있다는 것은 번식 지속성에 큰 영향을 미치고 있음을 고려해볼 수 있다**.

Table 19. Source of variation, degree of freedom, typeⅢ mean squares, tests of significance for sow litter size using fixed effect model.

Source	d.f.	TNB	NBA
ER genotype	2	3.32N.S.	5.15N.S.
Parity	6	23.76**	21.07**
Year	3	56.71***	31.96**
Error	1021	7.00	6.48

※ * $p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.005$ N.S. : non-significance ($p>0.10$)

TNB: Total number of born, NBA: Number born alive

다. ER 유전자형과 산차의 효과

본 연구에서 조사한 각 산차별 ER 유전자형이 TNB, NBA에 미치는 효과의 최소 제곱 평균치와 평균을 Table 20에 제시하였다. 복당 생시 총산자수(TNB)의 경우, AB형은 산차에 관계없이 꾸준한 양상을 보인 반면, AA형과 BB형의 경우는 그 반대의 현상을 보여주고 있다. AA형의 경우, BB형에 비해 초산 성적이 좋은 반면, 6산차이후 부터는 산자수가 급격히 떨어지는 경향이 두드러지는데, BB형의 경우 다소 AA형에 비해 초산 성적은 떨어지지만 2산차부터는 꾸준한 번식능력을 발휘하는 경향치를 보였다. 또한, 번식지속성에 대해 AA형과 AB형의 개체들이 7산차까지 생존한 비율은 약 8.1%와 8.6%인데 반해 BB형은 13%의 비율로 돈군에 잔류하고 있었다. 이는 산자수에 대한 고능력돈을 선발한 Yorkshire 상업축군에서의 꾸준한 선발과 도태의 병행이 있음을 증명하는 좋은 자료로 제시된다.
복당 생시 실산자수 (NBA)의 경우, AA형, AB형 그리고 BB형의 초산 성적이 비슷하였으나, 복당 생시 총산자수와 마찬가지로 번식 지속성에서의 차이를 보였다.

Geno type	parity	N	TNB		NBA	
			LS Mean	Mean	LS Mean	Mean
AA	1	37	10.56±0.43	10.89±0.41	9.94±0.42	10.19±0.40
	2	34	10.51±0.61	11.00±0.46	10.06±0.58	10.29±0.43
	3	29	11.03±0.51	11.21±0.49	10.29±0.48	10.41±0.42
	4	19	10.98±0.59	10.95±0.56	10.60±0.61	10.58±0.58
	5	11	12.17±1.26	11.82±0.94	11.30±1.19	11.00±0.84
	6	6	9.86±1.01	9.67±0.67	8.38±0.91	8.33±0.84
	7	3	8.88±1.29	8.67±2.33	8.43±1.16	8.33±2.19
AB	1	152	10.42±0.22	10.63±0.22	9.91±0.22	10.09±0.21
	2	124	10.22±0.42	10.56±0.26	9.76±0.40	9.91±0.25
	3	98	10.85±0.28	10.99±0.28	10.37±0.27	10.47±0.27
	4	70	12.16±0.32	12.13±0.29	11.49±0.34	11.49±0.31
	5	52	11.69±1.01	11.44±0.36	11.11±0.96	10.85±0.34
	6	25	12.30±0.53	12.28±0.56	10.65±0.45	10.64±0.47
	7	13	12.64±0.62	12.09±0.43	11.82±0.56	11.85±0.41
BB	1	99	9.98±0.26	10.21±0.24	9.42±0.26	9.61±0.26
	2	85	10.62±0.95	10.99±0.32	10.04±0.43	10.22±0.29
	3	65	11.05±0.33	11.12±0.32	10.48±0.32	10.52±0.31
	4	49	11.50±0.38	11.47±0.36	10.85±0.39	10.84±0.35
	5	29	10.96±0.98	11.03±0.57	10.62±0.93	10.48±0.52
	6	20	11.89±0.59	11.95±0.61	10.64±0.49	10.65±0.46
	7	13	11.88±0.66	11.54±0.68	10.92±0.59	10.77±0.54

Table 20. Least-squares means and standard errors for the traits by the ER genotype

N : Number of records

TNB : Total Number Born

NBA : Number Born Alive

라. ER 유전자형의 효과

Table 21는 분산분석을 통하여 ER genotype과 산차에 의한 번식형질은 초산과 전체 산차로 구분하여 최소제곱 평균치와 표준오차를 추정하였다. Table 20에서 이미 언급한 바와 같이, 초산에서의 BB형은 AA형에 비해, 산자수가 떨어지는 반면 전 산차에 걸쳐서는 오히려 TNB와 NBA 모두에서 더 좋은 결과를 보였다. 이는 AA형은 산차가 지속될수록 번식력이 오히려 떨어지는 현상을 보이므로 종돈이 갖추어야 할 번식지속성에 부합하지 않은 결과를 증명하고 있다.

Table 21. Least - squares means and strand errors for the traits by the genotype and parity

ER genotype	N	first parity		all parity	
		TNB(SE)	NBA(SE)	TNB(SE)	NBA(SE)
AA	37	10.56(0.43)	9.94(0.42)	10.76(0.27)	10.04(0.26)
AB	150	10.42(0.22)	9.91(0.22)	10.95(0.19)	10.28(0.18)
BB	99	9.98(0.26)	9.42(0.26)	10.80(0.19)	10.10(0.19)

* N: Total number of records
SE: Standard Error

제 4장 다산종의 번식·생리적 특성 구명에 관한 연구

제 1절 서 론

돼지의 여러 경제형질들 중에 산자수는 생산성 향상이라는 관점에서 중요한 형질 중의 하나로서 대두되고 있다. 특히, 번식형질 중 배란율이나 수정란의 생존율, 호르몬 등의 형질들에 대해서는 많은 연구가 진행되어 왔으나 직접적으로 산자수에 미치는 효과는 밝히지 못하였다(Butler 등, 1981; Bennett와 Leymaster, 1989; Gama와 Johnson, 1993; Clutter 등, 1994). 그러나, 최근 산자수와 관련하여 면양에서 체계적인 연구가 먼저 이루어졌으며, 3두 이상의 산자를 생산하는 Booroola Merino 종으로부터 *FecB*(Fec=fecundity, B=Booroola) 유전자를 밝혀 이 유전자가 산자수와 발정 주기당 배란율의 증가에 관여하는 것으로 밝혀졌다 (Montgomery 등, 1994). 또한, 다산종인 Meishan 종에서는 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor, ER) 유전자를 표지유전자로 이용하여 Meishan 종과 Large White 종간의 교잡종에서 유전자 다형성(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)을 분석하고 ER 유전자형이 산자수와 연관되어 있음을 밝힘으로써, 번식능력 개체의 선발에 대한 가능성을 제시하였다 (Rothschild 등, 1996). 그러나 돼지에서는 면양에서와 같이 산자수에 미치는 배란율이나 호르몬 등 번식형질에 대한 조사는 밝히지 못하였으며, 이러한 연구에 관한 자료가 미흡한 상태이다.

번식형질의 발현에 영향을 미치는 내분비물질 중에는 호르몬과 비슷한 작용을 하지만 물질의 특성이 다른 성장인자 (growth factor)가 있다. 성장인자는 성장호르몬과 steroid 호르몬의 작용을 매개하고 교호작용을 하며 자가분비 (autocrine)와 측분비 (paracrine)의 작용에 의해 세포의 성장과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Deuel, 1987; 이, 1996; 고, 1997). 그 중 insulin-like growth factor (IGF) system은 자궁, 태반, 난소,

수정란 등 생식기관의 발달에 관여하며(Owens 1991; Jones와 Clemmons, 1995; 이, 1996), IGF-I, -II와 IGF-binding proteins(IGFBPs)와 type I IGF 수용체, type II IGF 수용체로 구성되어 있다.

이런 IGF system 중 IGF-I (insulin-like growth factor-I)은 somatomedin C 라고도하며 70개의 아미노산으로 구성된 7.5 kDa의 폴리펩타이드이며, 많은 조직에서 성장호르몬(growth hormone)의 성장촉진작용을 매개하는 중요한 물질로서 작용하고(Rotwein, 1991; Stewart와 Rotwein, 1996; 이, 1996), 혈액 또는 조직에서의 IGF-I은 저장과 운반체 역할을 하는 여러 종류의 IGFBPs와 결합하여 복합체 형태를 유지하고 있다 (Stewart와 Rotwein, 1996; 이, 1996; 고, 1997). 또한 IGF-II(insulin-like growth factor-II)는 67개의 아미노산으로 구성된 폴리펩타이드이며 태아와 신생자돈에서 매우 높은 발현을 보인다. 그러나 이러한 IGF-II 유전자는 출생후 급격한 전사의 억제로 단백질의 발현이 저하된다. IGF-II는 혈액 외에도 다양한 체액 (biological fluid)에서도 발견되며 내분비 기작 이외에 자가분비 (autocrine)와 측분비 (paracrine) 기작에 의해 자신의 고유한 작용을 수행한다.

IGF의 작용을 세포에게 매개하는 인자는 두 가지 수용체가 담당한다. Type I IGF 수용체는 insulin 수용체와 비슷한 구조를 가지고 있으며 ligand와 결합하는 두 개 α subunits 와 transmembrane에 있는 두 개의 β subunits으로 구성되어 있으며, Type II IGF 수용체는 dimeric의 구조를 가지고 있는 type I IGF 수용체와 구조가 다르게 monomeric 구조로써 type II IGF 수용체를 mannose-6-phosphate (M6P) 수용체라고도 하며 250 kDa의 transmembrane 당단백질 (glycoprotien)이다. 이들 수용체는 IGF가 세표표면에 위치해 있는 수용체와 결합함으로써 trans-phosphorylation을 통하여 신호를 핵으로 전달하고 이에 따라 핵은 필요한 단백질을 합성, 분비함으로써 IGF의 작용이 이루어지게 된다.

IGF-I, II의 활동을 조절하는 IGFBPs는 생물학적 조직의 다양성에 의해 생산되고 혈액이나 모든 체액에서 발견되며 서로 구조적으로 homology를 가지고 있는 것이 특징이며, IGF-I, II와 결합하나 insulin과는 친화력이 없다. IGFBPs은 주로 IGF의 생물학적 활동을 조절하는 등 주요한 4가지의

기능을 가지고 있다. 첫 번째로 IGFBPs은 혈장을 통해 IGF를 저장·운반하여 IGF유출을 조절한다. IGF를 저장·운반하는 IGFBPs의 대표적인 예로 IGFBP-3은 태어난 후부터 순환계에 가장 풍부한 IGFBP으로써 IGF-I,-II와 IGFBP-3가 ALS를 매개체로 결합하여 150 kDa의 ternary complex 구조를 형성하고, 혈장 내에 IGF-I,-II의 약 75%정도가 ternary complex구조로 운반하며 free IGF 또는 40kDa IGF:IGFBP complex의 혈장 반감기를 12 15h로 연장시키는 기능을 가지고 있다 (Guler 등, 1989; 이 1996). 두 번째 기능으로 IGFBPs은 IGF을 조직과 세포 특이성에 따라 국한적인 방법으로 공급한다. 세번째 기능은 type I IGF 수용체와 IGF의 상호작용을 조절하는 기능이다. IGFBPs는 IGF의 활동을 시기, 조직 특이적으로 촉진, 억제시켜 세포의 증식을 조절하며, 몇 가지의 IGFBPs 중 IGFBP-1, -2, -4, -6는 IGFs와 결합하여 IGF의 활동을 억제하고 IGF와 결합하는 type I IGF 수용체와의 결합을 막는 역할을 한다. 마지막 네 번째 기능은 IGF나 수용체와는 독립적으로 세포에 직접 작용함으로써 또 다른 IGFBP의 기능을 수행한다.

이러한 IGF system은 돼지의 난소, 자궁 및 수정란 등에서 estrogen과 progesterone의 상호작용에 관련되어 번식기관 발달과 분화에 영향을 주고, 일반적으로 임신전후의 전반적인 유지와 태아의 성장과 발달에도 관여하는 것으로 보고된 바 있다 (Simmen 등, 1990; Lee 등, 1991; 고, 1997). 이와 같은 특성을 갖는 IGF-I, -II, 결합단백질은 가축의 성장뿐만 아니라 난포형성과 임신 유지 및 태아의 성장 등에 영향을 주는 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 실험은 성주기, 임신기 그리고 자돈의 성주기 동안 각각 혈청내의 IGF-I, -II의 농도 및 IGFBP-3의 발현, estrogen과 progesterone 농도를 조사하여 산자수간의 관계를 비교·분석하고, 산자수의 표지유전자로 알려진 ER 유전자형과 IGF-I, -II 발현과의 관계를 비교·분석하여 내분비 물질인 성장인자를 이용한 돼지의 산자수 개량 가능성을 분석하고자 한다.

제 2절 연구 재료 및 방법

1. 연구대상

조사 대상군은 (주) 세왕농장이 보유하고 있는 전 년도에 성주기를 체크한 후보돈을 대상군으로 설정하여 실행하였다. 이 대상군들은 전 년도 번식자료에 근거한 연구분석 결과를 토대로 고능력 (산자수 높은 그룹)과 저능력 (산자수 낮은 그룹) 번식 모돈군으로 구분한 개체에서 태어난 자돈을 육성한 임신돈[이하: 임신돈이라 칭함]이며 임신이 확인된 대상축군과 확인된 임신돈에서 태어난 신생자돈을 대상으로 하였다.

2. 임신돈 및 신생자돈의 사양관리

번식 및 관리체계가 확립되어 있고 제반 환경적 영향을 최소화하기 위해 후보돈을 보유하고 있는 세왕농장에 위탁 관리하여 관리체계를 구축하였고, 대략 임신돈의 사양관리를 참고하여 소독을 1일 2회 l이상 실시하였으며, 돈사의 온도는 17 21℃정도 유지하고 급수는 1.5- 2.0 ℓ/1min 정도씩 급수하고 사료급여는 사양급여 표준에 근거하여 급여하였다. 대상군을 약 220 240일령 정도까지 육성하여 교배를 한 후 임신감정을 21일령, 30일령, 45일령까지 3차에 걸쳐 실시하였다. 또한 분만 후 사양관리는 분만사 관리 기준에 따라 분만사 온도는 21℃이상 유지하고 자돈구역의 온도는 27℃이상 유지하며 포유모돈의 사료는 5일령까지 4kg 급여할 수 있도록 유도하였다.

3. 채혈 및 혈청분리

각 그룹별로 성주기동안 발정전기, 발정기, 발정후기로, 임신돈은 45일령부터 105일령까지 분만 후 태어난 신생자돈은 30일령부터 15일 간격으로 경정맥(jugular vein)으로부터 약 10ml의 혈액을 채취하였으며, 채혈된 혈액은 실온에서 약 2시간 정치시킨 후 1,000g에서 15분간 원심분리하여 상층액의 혈청만을 회수하였다. 실험상의 오차로 나타날 수 있는 반복 구간의 변이를 최소화하기 위하여 일정량의 시료가 준비될 때까지 혈청을 -70℃에 냉동 보관하였다.

4. 종돈군내 insulin-like growth factor-I (IGF-I)의 분석 (방사선 면역 측정법)

각 그룹별로 임신기간의 혈청 IGF-I의 함량을 측정하기 위해 $[^{125}I]$IGF-I과 polyclonal IGF-I 항체를 이용한 방사선 면역측정법을 사용하였다(Ko 등, 1991). 재조합 human IGF-I은 R&D Systems Inc.으로부터 구입하여 chloramine T 방법에 의해 specific activity가 350-450μCi/μg이 되도록 조정하여 IGF-I을 iodination시켰다. 각 그룹의 시료(200μl)들은 800μl acid-ethanol(87.5% ethanol과 12.5% HCl)과 상온에서 1시간 동안 정치한 후 4℃에서 3,000g로 30분간 원심분리하여 IGF-I을 binding protein으로부터 분리하였다. IGF가 함유된 상층액을 10μℓ추출하여 RIA 완충액을 190μℓ 첨가하고 1:120,000으로 희석시킨 Anti-human IGF-I polyclonal antiserum(Rabbit)을 100μℓ 추가하였으며. 각각의 시험관에 $[^{125}I]$IGF-I 30,000cpm/μℓ 첨가하여 4℃에서 18시간 동안 정치시켰다. 정치 후 Goat anti-rabbit IgG antibody를 100μℓ 첨가하여 다시 4℃에서 1시간 정치한 후 침전물을 얻기 위해 normal rabbit serum을 100μℓ와 RIA 완충액을 1ml첨가하여 4℃에서 3,000g 에서 30분간 원심분리 하였다. 침전물에 있는 radioligand의 방사능은 gamma counter를 이용하여 측정하였으며 7배의 희석배율을 곱하여 혈청농도로 보정하였다.

5. 종돈군내 insulin-like growth factor-II (IGF-II)의 분석 (방사선 면역 측정법)

산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹의 성주기, 임신기, 자돈 성장기동안의 혈청 IGF-II의 함량을 측정하기 위해 ^{125}I-IGF-II 과 polyclonal IGF-II 항체를 이용한 방사선 면역측정법을 사용하였다(Ko 등, 1991). 재조합 human IGF-II은 R&D Systems Inc.으로부터 구입하여 chloramine T 방법에 의해 specific activity가 350-450μCi/μg이 되도록 조정하여 IGF-II을 iodination시켰다. 각 그룹의 시료(200μl)들은 800μl acid-ethanol(87.5% ethanol과 12.5% HCl)과 상온에서 1시간 동안 정치한 후 4℃에서 3,000g로 30분간 원심분리하여 IGF-II을 binding protein으로부터 분리하였다. IGF-II가 함유된 상층액을 10μℓ추출하여 RIA 완충액을 190μℓ 첨가하고 1:120,000으로 희석시킨 Anti-human IGF-II polyclonal antiserum (Rabbit)을 100μℓ 추가하였으며, 각각의 시험관에 ^{125}I-IGF-II 30,000cpm/μℓ 첨가하여 4℃에서 18시간 동안 정치시켰다. 정치 후 Goat anti-rabbit IgG antibody를 100μℓ 첨가하여 다시 4℃에서 1시간 정치한 후 침전물을 얻기 위해 100μℓ의 normal rabbit serum과 1ml의 RIA 완충액을 첨가하여 4℃에서 3,000g 에서 30분간 원심분리 하였다. 침전물에 있는 radioligand의 방사능은 gamma counter를 이용하여 측정하였으며 7배의 희석배율을 곱하여 혈청농도로 보정하였다.

6. 종돈군내 성장인자 결합 단백질 (IGFBP)의 분석 (Ligand Blotting)

산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹에 따라 성주기, 임신기, 자돈 성장기별로 10마리씩 선정하였다. SDS-PAGE(separating gel:12.5% stacking gel:5%)를 이용하여 전기영동을 실시하였고, 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane로 transfer하였다. Membrane을 TBS buffer로 세척한 후 1% blotto에 incubation 시켰다. 0.5-1.0×10^6cpm

^{125}I-IGF-II(Amersham Pharmacia Biotech)와 TBS로 실온에서 5시간 incubation시킨 후 -70℃에서 10일 동안 X-ray 필름에 감광시켰다.

7. 종돈군내 스테로이드 호르몬 분석 (방사선 면역측정법)

가. Estradiol (E2)

산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹에 따라 성주기, 임신기, 자돈 성장기별로 10마리씩 선정하였으며 혈청 estradiol농도 분석은 RIA kit(Coat-A-Count. DPC, Los Angeles, 90045, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정방법은 anti-estradiol이 coating된 tube에 0.1ml씩 분주하였다. 분주한 후, total tube, nonspecific binding과 calibrator tube 및 sample tube에 ^{125}I-estradiol을 1ml씩 각각 첨가한 후 실온에서 3시간 배양후 결합되지 않은 부분을 완전히 제거하여 gamma counter로 측정하였다.

나. Progesterone (P4)

산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹에 따라 성주기, 임신기, 자돈 성장기별로 10마리씩 선정하였으며 혈청 progesterone 농도 분석 역시 estradiol 농도 측정과 동일하게 Coat-A-Count[^{125}I]-progesterone kit를 사용하여 측정하였다.

8. ER PCR-RFLP

가. DNA 추출

임신돈의 혈액으로부터 혈청만 분리된 나머지 응고된 혈병은 서 등(1999)이 보고한 방법을 이용하여 DNA 추출한 후 250㎕ lysis 용액(360㎍/㎖ proteinase K, 150mM sodium chloride, 50mM EDTA, 2% SDS)에 150㎎의 응고 혈액을 첨가하여 균질화시킨 후 55℃에서 5시간 배양하였다. 배양 후 150㎕의 5.5M NaCl 과 600㎕ phenol: chloroform(25:24)을 첨가하여 30분간 현탁시켰다. 현탁 후 5,000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 채취된 상층액의 2배에 해당하는 99% 에탄올을 첨가하였다. 다시 5,000g에서 10분간 원심분리를 실시하여 DNA를 추출한 후 70% 에탄올로 세척·건조하여 TE용액 [10mM Tris-Cl (pH 7.5), 1mM EDTA]에 녹여 보관하였다.

나. 유전자 다형성 분석

추출된 DNA를 이용하여 에스트로겐 수용체에 대한 특정 부위를 증폭하여 증폭된 DNA 단편의 다형현상을 관찰하기 위하여 Short 등(1997)이보고한primer(ESRF 5'-CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG-3'; ESRR 5'-CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG-3')를 이용하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR PreMixTM Bioneer Corp., Cheong-won, Korea)에 약 30ng의 DNA를 혼합하여 실시하였다. 반응조건은 GeneAmp Ⓚ PCR System 2400(PERKIN ELMER CO.)을 사용하여 Short 등(1997)이 실시한 것과 동일한 조건으로(1cycle: 94℃ 4분, 55℃ 1분, 70℃ 1분; 31 cycles: 94℃ 1분, 55℃ 1분, 70℃ 1분; 1cycle: 72℃ 8분) 실시하였다. 증폭된 DNA는 제한효소(PvuII)를 10units첨가하여 37℃에서 5시간 배양하였으며, 제한효소에 의해 절단된 에스트로겐 수용체 유전자의 다형현상을 관찰하기 위하여 10% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)를 사용하였다.

9. 종돈군간 성장인자와 hormone의 발현 분석

산자수 관련 고능력 품종을 선발하기 위한 기준을 설정하기 위하여

산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹간의 IGF-I, II와 결합 단백질 그리고 호르몬(estradiol, progesterone)의 발현을 시기별로 비교·분석하였다.

제 3절 연구 결과 및 고찰

1. 종돈군내 insulin-like growth factor-I (IGF-I)의 비교·분석 (방사선 면역 측정법)

1) 성주기

Table 22는 발정기동안 IGF-II의 농도를 나타낸 표이다. 두 그룹간의 성주기동안 혈청 IGF-I 농도는 일반적으로 성주기 후기부터 발정기까지 감소하는 경향을 보여 주었으며, 산자수 높은 그룹의 혈청 IGF-I이 성주기 후기에 가장 높은 농도를 보여 나타났다. 특히 각 시기에 따라 그룹별로 혈청 IGF-I 농도를 조사한 결과 성주기 후기에 산자수 높은 그룹의 농도가 66.08±30.56 ng/ml로서 낮은 그룹의 농도 46.69±7.73 ng/ml와 0.01의 유의성 차이를 보여주었다. 또한 같은 그룹 내에서 시기에 따라 혈청 IGF-I 농도를 조사한 결과 유의적 차이는 보이지 않았으나 산자수 낮은 그룹의 성주기 전기는 발정기의 농도보다 낮은 농도수준을 보여 주었다.

Table 22. Comparison of porcine serum IGF-II concentration between high and low litter size groups during estrous cycle

	Serum IGF-II concentration (ng/ml)		
	Metestrus	Proestrus	Estrus
High litter size (n=10)	66.08 ±30.56	51.96 ±21.07	50.40 ±20.49a
Low litter size (n=10)	46.69 ±7.73	43.00 ±20.51	32.59 ±21.52b

a,b Means±SEM in the same column with different superscripts differ (P 〈 0.05)

2) 임신기간

Table 23은 임신기간동안 IGF-II의 농도를 나타낸 표이다. 두 그룹 모두 전반적으로 임신 105일령까지 혈중 IGF-I의 농도는 감소하는 경향을 보여 주었으며, 같은 그룹 내에서 임신 일령별 혈중 IGF-I 함량을 조사한 결과 유의적 차이는 보이지 않았다. 또한 높은 산자수 그룹의 임신 45일령에는 혈중 IGF-I의 함량이 32.43±23.18ng/ml로서 낮은 그룹 17.79±12.35ng/ml과 유의적인 차이를 보였다(*P* 〈0.05). 그러나 임신 60일령의 혈중 IGF-I 함량은 27.90±15.65ng/ml을 나타내면서 감소하는 경향을 보이며, 임신말기인 임신 90일령과 105일령의 IGF-I의 함량은 별다른 변화를 보이지 않음이 관찰되었다. 또한 산자수 낮은 그룹의 혈중 IGF-I 농도는 임신초기인 45일령 (17.79±12.35ng/ml)부터 임신말기인 105일령 (13.22±6.07ng/ml)까지 혈중 IGF-I의 함량은 전체 임신기간동안 비슷한 수준으로 감소 혹은 유지되는 경향을 보여주었다.

Table 23. Comparison of porcine serum IGF-I concentrations between high and low litter size group during pregnancy

	serum IGF-I concentration (ng/ml)				
	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105
High litter size (n=13)	32.43± 23.18a	27.90± 15.65	24.34± 10.47	22.83± 11.05	22.02± 7.39
Low litter size (n=13)	17.79± 12.35b	16.85± 10.90	14.66± 9.22	14.56± 8.16	13.22± 6.07

a,b Means±SEM in the same column with different superscripts differ ($P < 0.05$)

3) 자돈 성장기간

Table 24은 자돈 성장기간동안 IGF-II의 농도를 나타낸 표이다. 두 그룹 모두 105일령까지 혈중 IGF-I 함량이 올라가는 경향을 보여 주고 있으며, 성장하는 동안 두 그룹간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 임신돈과 다르게 전반적으로 산자수 높은 그룹에서 태어난 자돈의 혈중 IGF-I 함량은 낮은 그룹에서 태어난 자돈의 IGF-I 함량보다 낮게 나타났으며 특히 30일령에는 산자수 높은 그룹의 혈중 IGF-I 함량이 57.44±7.1ng/ml로 보여 주었으며 낮은 그룹의 함량은 60.28±24.29ng/ml로써 0.05의 유의적인 차이를 보여 주었다. 또한 30일부터 90일령까지는 계속 혈중 IGF-I 함량이 올라가는 경향을 보여 주었으나 105일령에는 각각 94.93±17.34ng/ml과 132.95±23.59로써 90일령보다 떨어지는 경향을 보여 주었다.

Table 24. Compare of porcine serum IGF-I concentration between high and low litter size group during growth of new born

	serum IGF-I concentration (ng/ml)					
	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105
High litter size (n=8)	57.43± 7.11a	60.16± 28.60	86.59± 26.60	108.58± 25.13	123.33± 43.76	94.93± 17.34
Low litter size (n=7)	60.28± 24.29b	80.22± 59.27	118.27± 51.57	120.65± 34.97	141.92± 27.81	132.95± 23.59

^{a,b}Means±SEM within a column with different superscripts differ (P 〈0.05)

2. 종돈군내 insulin-like growth factor-II (IGF-II)의 분석 (방사선 면역 측정법)

1) 성주기

Table 25는 발정기동안 IGF-II의 농도를 나타낸 표이다. 산자수가 높은 그룹이 전체적으로 산자수가 낮은 그룹보다 IGF-II 농도가 높게 나타났지만 개체간 변이가 커서 각 주기별 그룹간 유의적 차이를 보이진 않았다. 또한 발정전기에서 산자수가 높은 그룹이 489.8±243.3 ng/ml로 가장 높은 IGF-II의 농도를 보인 반면, 산자수가 낮은 그룹의 발정후기에서 269.7±79.8 ng/ml로 최저치를 나타내었다. 전체적으로

산자수가 낮은 그룹은 IGF-II의 발현이 감소하는 일정한 경향을 보이는 반면, 산자수가 높은 그룹은 발정기 전후로 증가하는 경향을 나타내었다.

Table 25. Comparison of porcine serum IGF-II concentration between high and low litter size groups during estrous cycle

	Serum IGF-II concentration (ng/ml)		
	Metestrus	Proestrus	Estrus
High litter size (n=10)	471.0 ± 210.2	489.8 ±243.3	423.0 ±103.7
Low litter size (n=10)	269.7 ±79.8	357.0 ±48.1	356.0 ±30.4

2) 임신기간

Table 26은 임신기동안 IGF-II의 농도를 나타낸 표이다. 임신 전 기간에서 산자수가 낮은 그룹이 산자수 높은 그룹보다 IGF-II의 농도가 높게 측정되었다. 또한 임신 중반이후인 75, 90, 105일령에서 유의적 차이를 보였으며($P < 0.05$), 특히 임신 60일령에서 산자수 낮은 그룹은 436.6±79.6 ng/ml, 산자수 높은 그룹은 317.6±89.4 ng/ml로 고도의 유의적 차이를 나타내었다($P < 0.01$). 전체적으로 임신이 진행됨에 따라 두 그룹 모두 IGF-II의 발현이 증가하였고, 이러한 증가는 출생직후까지 유지되며 출생이후에는 감소하는 경향을 보인다.

Table 26. Comparison of porcine serum IGF-II concentration between high and low litter size groups during pregnancy

	Serum IGF-II concentration (ng/ml)				
	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day105
High litter size (n=12)	335.3 ± 66.7	317.6 ± 89.4a	344.6 ± 61.7c	384.5 ± 67.8c	407.3 ± 93.3c
Low litter size (n=10)	390.2 ± 89.9	436.6 ± 79.5b	406.9 ± 55.8d	494.2 ±117.1d	550.4 ±162.8d

^{a,b}Means±SD within a column with different superscripts differ (P<0.01)

^{c,d}Means±SD within a column with different superscripts differ (P<0.05)

3) 자돈 성장기간

Table 27은 자돈의 성장기동안 IGF-II의 농도를 나타낸 표이다. 임신기간과 동일하게 자돈의 성장 전 기간동안 산자수가 낮은 그룹이 산자수가 높은 그룹보다 IGF-II의 농도가 높게 나타났다. 45일령과 105일령에서 두 그룹간 유의적 차이를 보였으며(P<0.05), 특히 60일령에서 산자수가 낮은 그룹은 926.3±137.2ng/ml, 산자수가 높은 그룹은 623.8±120.7ng/ml로 고도의 유의적 차이를 나타냈다(P<0.01). 전체적으로 출생 직후 증가된 IGF-II의 발현이 두 그룹 모두 자돈이 성장함에 따라 점차 감소하는 경향을 보이며, 105일령에서는 30일령의 절반의 농도까지 감소하였다.

Table 27. Comparison of porcine serum IGF-II concentration between high and low litter size groups during growth of newborn

	Serum IGF-II concentration (ng/ml)					
	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day105
High litter size (n=10)	1079.0 ±202.0	638.6 ±85.8c	623.8 ±120.7a	513.2 ±124.9	452.3 ±89.5	523.3 ±25.3c
Low litter size (n=10)	1227.3 ±374.0	948.8 ±287.2d	926.3 ±137.2b	684.3 ±145.9	617.0 ±78.9	707.7 ±106.5d

a,bMeans±SD within a column with different superscripts differ ($P<0.01$)

c,dMeans±SD within a column with different superscripts differ ($P<0.05$)

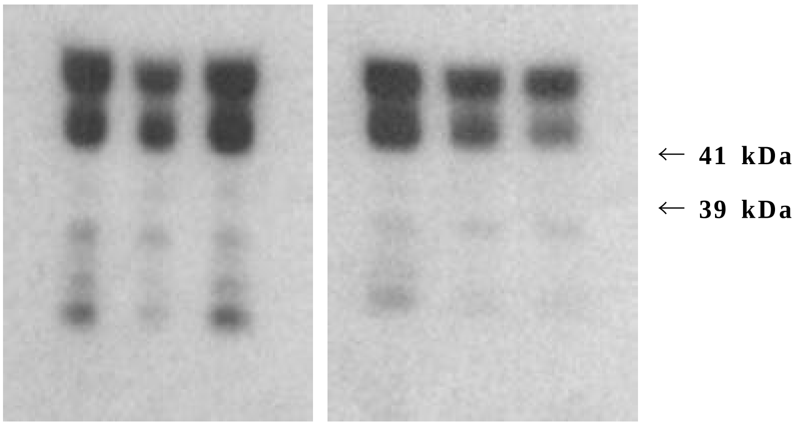
3. 종돈군내 성장인자 결합 단백질 (IGFBP)의 분석 (Ligand Blotting)

1) 성주기

산자수 높은 그룹과 낮은 그룹간에 태어난 육성돈의 성주기 기간에 혈청 IGFBP-3의 발현은 Fig. 25와 같다. 두 그룹간의 성주기 동안 혈청 IGFBP-3의 발현은 일반적으로 성주기 후기부터 발정기까지 감소하는 경향을 보여 주었으며, 산자수 낮은 그룹의 혈청 IGFBP-3가 발정기에 가장 높은 발현을 나타났다. 특히 성주기간 IGFBP-3의 발현은 전체적으로 임신기간이나 자돈의 성장기간의 발현보다 높게 나타나고 있다.

High litter size **Low litter size**

(A) M P E M P E



(B)

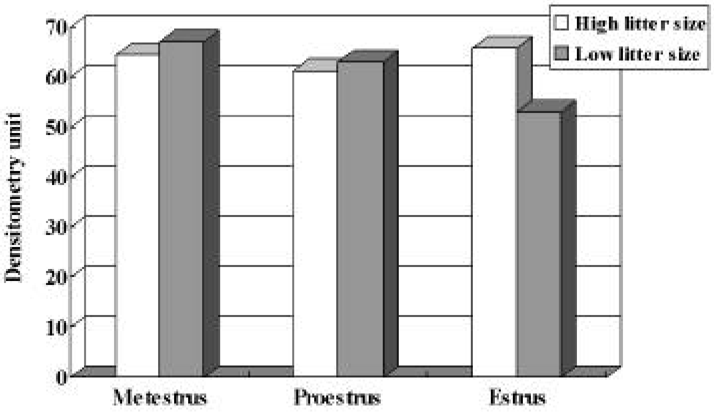


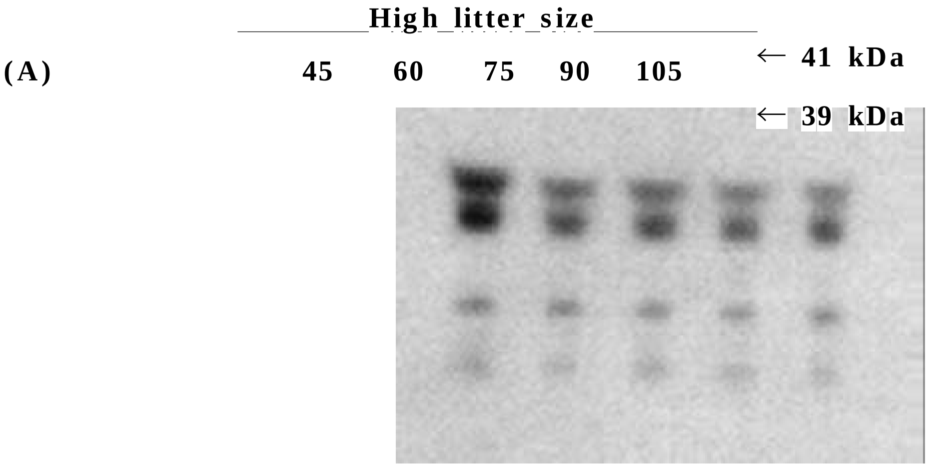
Fig.25. (A) Representative autoradiogram of an [125I] IGF-II Western ligand blotting for IGFBP-3 during estrous cycle

(B). Densitometric analysis of the autoradiogram depicting the IGFBP-3 during estrous cycle.

* Abbreviation : M(metestrus), P(proestrus), E(estrus).

2) 임신기간

임신기간 중 종돈장에서 선발된 산자수가 높은 그룹과 낮은 그룹의 혈청 IGFBP-3의 발현은 Fig. 26과 같다. 두 그룹 모두 임신 45일령부터 105일령까지 전반적으로 혈중 IGFBP-3의 발현은 감소하는 경향을 보여주었으며, 이는 IGF-I의 농도와 매우 유사한 양상을 보이고 있다. 또한, 비록 각 그룹간의 차이는 IGF-I보다 적지만 전체적으로 산자수 높은 그룹이 낮은 그룹보다 높은 발현 양상을 보이고 있다. 특히 각 그룹의 IGFBP-3은 발정기의 수준보다 상대적으로 매우 낮게 발현하는 것으로 나타났다.



Low litter size

45 60 75 90 105

(B)

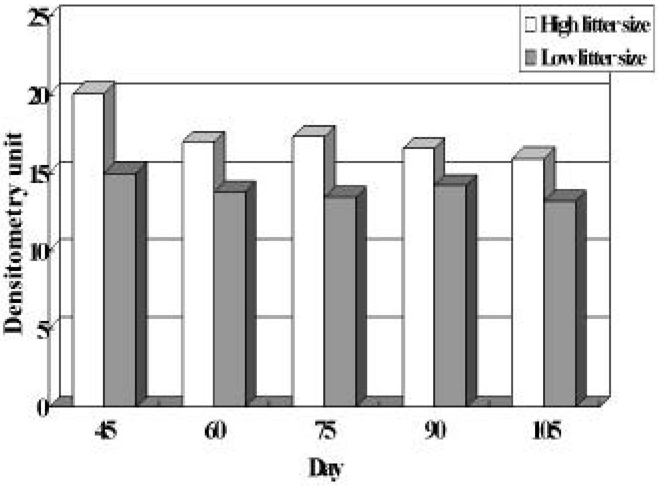


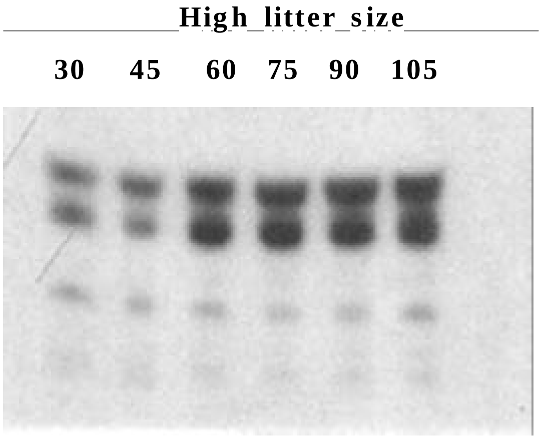
Fig. 26. (A). Representative autoradiogram of an [125I] IGF-II Western ligand blotting for IGFBP-3 during pregnancy.

(B) Densitometric analysis of the autoradiogram depicting the IGFBP-3 during pregnancy.

3) 자돈 성장기간

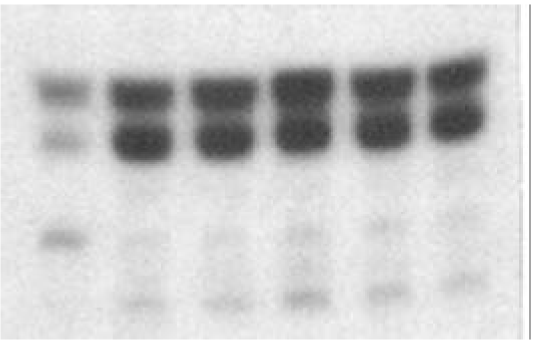
각 그룹의 임신돈으로부터 태어난 신생자돈의 혈청 IGFBP-3의 발현은 Fig. 27과 같다. 두 그룹 모두 105일령까지 혈중 IGFBP-3의 발현이 올라가는 경향을 보여 주고 있으며, 임신돈과 다르게 전반←으41 kDa수 높은 그룹에서 태어난 자돈의 혈중 IGFBP-3의 발현은 ←은39 kDa서 태어난 자돈의 IGF-I 함량보다 낮게 나타났다. 이는 역시 IGF-I의 농도와 유사한 양상을 보였다.

(A)

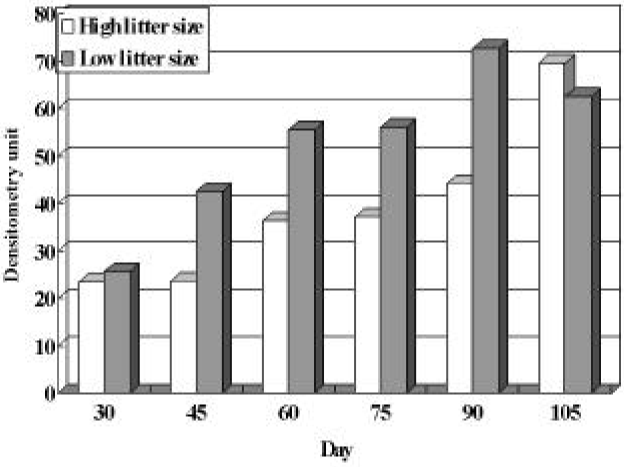


Low litter size

30 45 60 75 90 105



(B)



← 41 kDa

← 39 kDa

← 41 kDa

Fig. 27 (A). Representative autoradiogram of an [125I] IGF-II Western ligand blotting for IGFBP-3 during new born of pregnancy.

(B). Densitometric of the autoradiogram depicting the IGFBP-3 during pregnancy.

4. 종돈군내 스테로이드 호르몬(estradiol, progesterone) 분석 (방사선 면역측정법)

1) 성주기

성주기 기간 중 산자수 높은 그룹과 낮은 그룹간에 혈청 estradiol과 progesterone의 농도는 Fig. 28과 Fig. 29와 같다. 혈청 estradiol의 농도는 두 그룹 모두 발정기에서 높은 경향을 보여 주었으며, progesterone의 농도는 성주기 후기에 높게 나타났다. 산자수 높은 그룹과 낮은 그룹간에 혈청 estradiol과 progesterone의 농도는 전반적으로 높은 그룹의 농도가 낮은 그룹보다 높았다. Estradiol의 농도는 산자수 높은 그룹과 낮은 그룹간에 농도차이가 크게 나타나지 않았으나 progesterone의 농도는 최고 53.4±10.1 ng/ml에서 최저 0.17±0.06 ng/ml의 큰 농도 차이를 보여

주었으나 유의적 차이를 보이진 않았다. **또한 산자수 높은 그룹의 성주기 기간** progesterone**의 농도 변화는 개체간 변이가 커 유의적 차이를 보이진 않았지만** IGF-I **농도 변화와 비슷한 경향을 보여 주었다.**

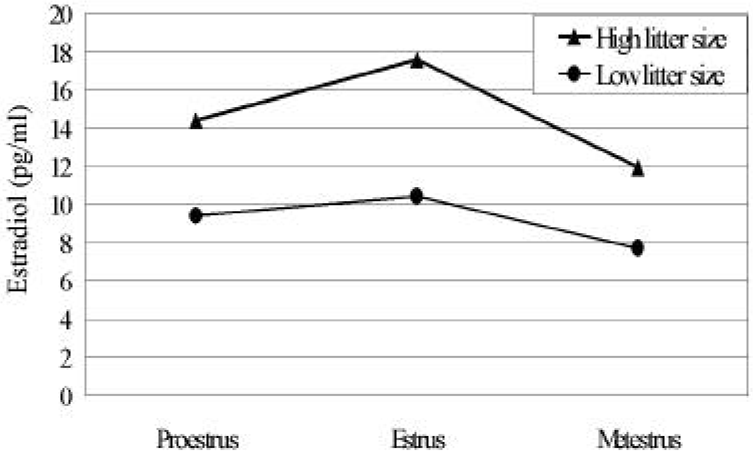


Fig.28. Concentration of serum estradiol (E2) during estrous cycle of the gilts in high and low litter size groups.

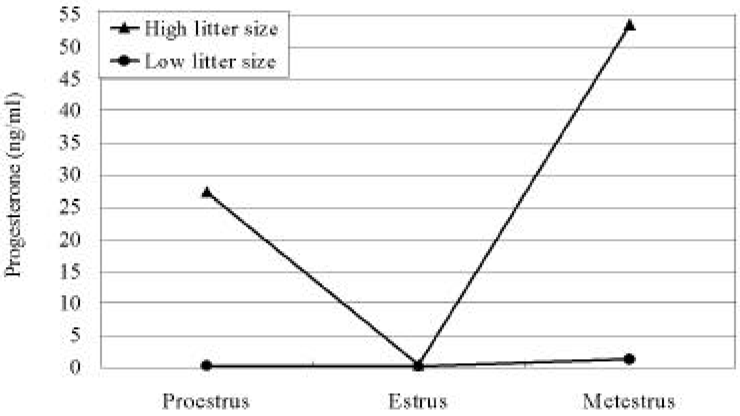


Fig. 29. Concentration of serum progesterone (P4) during estrous cycle of the gilts in high and low litter size groups.

2) 임신기간

임신기간 중 산자수 높은 그룹과 낮은 그룹간에 혈청 estradiol의 농도는 Fig. 30 이고 progesterone의 농도 결과는 Fig. 31과 같다. 두 그룹간에 estradiol의 농도는 분만 시기가 가까워지는 임신 90일부터 증가하였으며, 산자수 높은 그룹은 임신 105일령에 201±8.3 pg/ml를 낮은 그룹은 180.7±7.4 pg/ml의 농도를 보여 주었다. 반면, progesterone의 농도는 산자수 높은 그룹은 임신 60일령에 31.23±13.54 ng/ml 농도를 나타났으며, 낮은 그룹은 임신 45일령에 25.47±11.4 ng/ml의 높은 농도를 보여 주었다. 또한 estradiol과 progesterone의 농도는 개체간 변이가 커 유의적인 차이를 보이진 않았지만 산자수 높은 그룹의 estradiol과 progesterone 농도가 높게 측정되었으며, progesterone의 농도는 임신 90일령까지 감소하다 임신 105일령에 다시 증가하는 경향을 나타내었다.

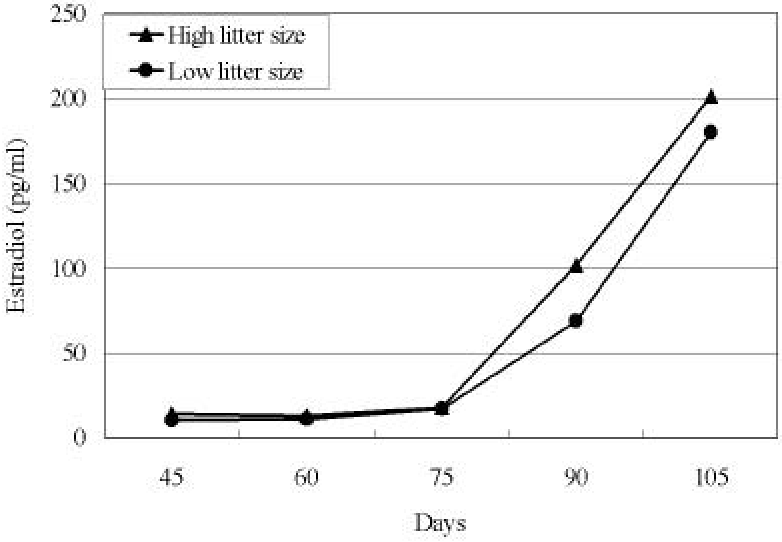


Fig. 30. Concentration of serum estradiol (E2) during pregnancy of the pigs in high and low litter size groups.

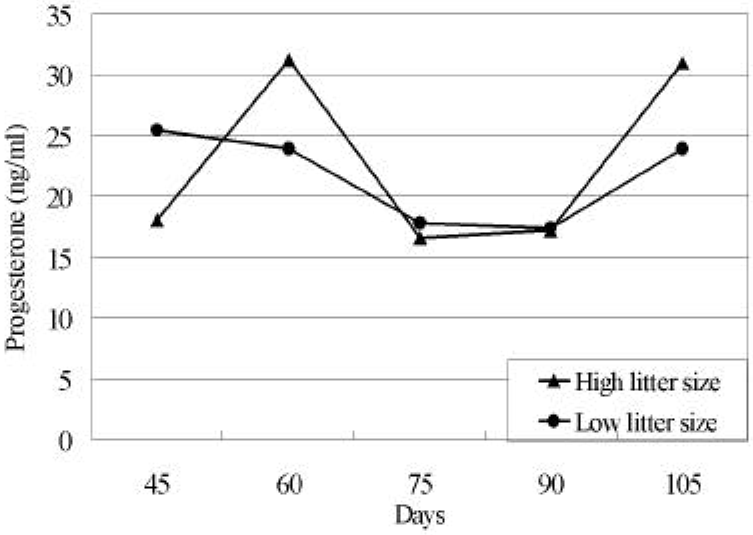


Fig. 31. Concentration of serum progesterone (P4) during pregnancy of the pigs in high and low litter size groups.

3) 자돈 성장기간

각 그룹의 임신돈에서 태어난 신생자돈의 혈청 estradiol과 progesterone의 농도 변화는 Fig. 32와 Fig. 33과 같으며 두 그룹 모두 신생자돈의 성장기 동안 estradiol과 progesterone 농도의 변화는 30일령을 제외한 전 기간동안 관찰할 수 없었다. 또한, 전반적으로 산자수 낮은 그룹의 estradiol의 농도가 높은 그룹 보다 높게 나타났으며(Fig. 5), 반대로 progesterone은 전반적으로 산자수 높은 그룹이 낮은 그룹보다 높게 나타났다. Fig 6과 같이 progesterone 농도는 두 그룹 모두 30일령에서 각각 0.88±0.25 ng/ml, 0.23±0.14 ng/ml로 매우 높은 차이를 보였으나, 그 이후 일령에 따른 변화는 없었다.

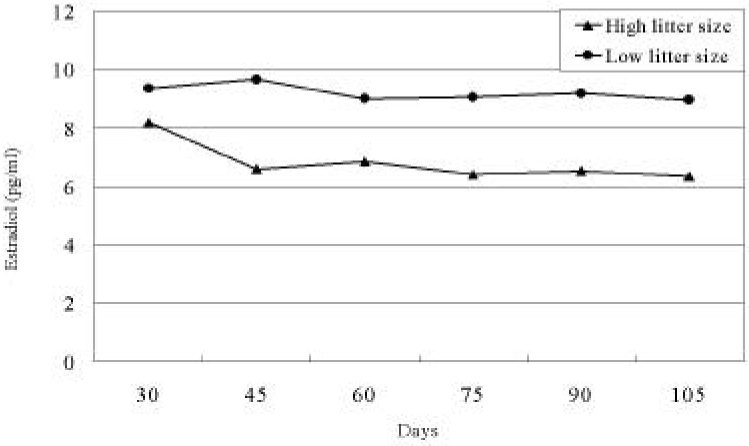


Fig. 32. Concentration of serum estradiol (E2) during growth of new born in high and low litter size groups.

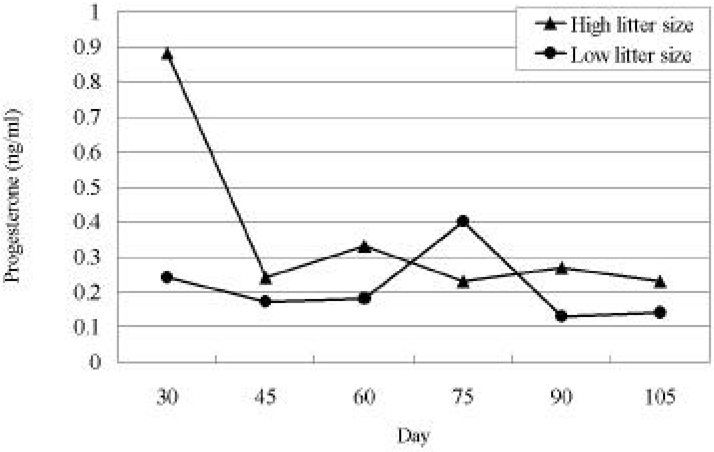


Fig. 33. Concentration of serum progesterone (P4) during growth of new born in high and low litter size groups.

5. 에스트로겐 수용체 유전자형에 따른 IGF-I, II의 비교 · 분석

산자수 높은 그룹과 낮은 그룹별로 산자수의 표지유전자인 에스트로겐 수용체에 대한 다형현상 (PCR-RFLP)**을 연구하였다**. *Pvu*II **제한효소에 의해 잘려진 단편은** Short **등**(1997)**이 제시한** AA(120bp), AB(120bp, 65bp, 55bp), BB(65bp,55bp)**형으로 분류할 수 있었으며**, 10% PAGE **상에서는** 65bp**와** 55bp**가** Fig. 34**와 같이 다형현상을 나타냈다**. **또한**, **유전자형별 산자수는** Short **등**(1997)**이 보고한 결과와 동일하게 유전자** **산자수의 차이를 볼 수 있었다**(Table 28). **에스트로겐 수용처** AA, AB, BB**에 따른 산자수는 각각** 8.8, 10.2, 11.1 **두로 조사되**

← 120 bp

← 65 bp

← 55 bp

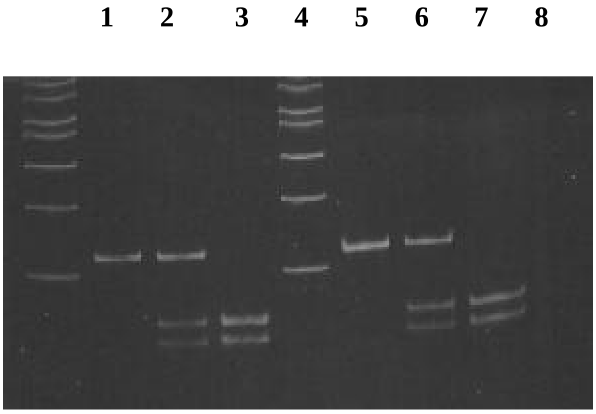


Fig. 34. The PCR-RFLP pattern for the ER polymorphism PAGE was used to identify the differential expression patterns of ER gene.

Lane 1,5: size marker, 1kb ladder
Lane 2,6: homozygous pig with genotype AA
Lane 3,7: heterozygous pig with genotype AB

Lane 4,8: homozygous pig with genotype BB

1) 임신기간

(1) IGF-I

산자수의 표지유전자인 에스트로겐 수용체의 유전자형을 조사한 후 이를 기준으로 혈청내 IGF-I 함량을 임신 일령별로 구분하여 비교한 결과는 Table 28과 같다. 산자수가 낮은 것으로 보고된 (Short 등, 1997) 에스트로겐 수용체 유전자형인 AA에서의 혈청내 IGF-I 함량은 다른 유전자형 보다 전반적으로 높게 나타났으며, 특히 임신 60일령의 IGF-I의 함량은 다른 임신 일령에 비해 높게 나타났다. 그러나 Table 2에서 관찰된 산자수 높은 그룹에서의 IGF-I의 함량 수준과는 반대로 산자수가 높은 것으로 보고된 유전자형인 BB에서의 IGF-I 함량은 전반적으로 다른 유전자형에 비하여 낮은 경향을 나타내었다. 특히, 임신 60일령에서 AA, BB 유전자형에 따른 혈청내 IGF-I 함량은 각각 33.6±15.66ng/ml과 13.4±4.34ng/ml로 유의적인 차이를 보였다($P < 0.1$). 또한, 임신 90일령에서 AA 유전자형의 IGF-I 함량이 26.6±10.64ng/ml을 그리고 BB 유전자형은 11.52±3.56ng/ml로서 유의성 있는 발현이 관찰되었는데($P < 0.05$), BB 유전자형의 90일령 IGF-I 함량은 다른 일령에 비해 제일 낮은 수준의 함량을 나타내었다.

Table 28. Comparison of porcine serum IGF-I concentration by estrogen receptor genotypes during pregnancy

ER Genotype	Average litter size	Serum IGF-I concentration (ng/ml)				
		Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105
AA (n=4)	8.8	29.82 ±23.8	33.6 ±15.66^{a}	28.28 ±14.63	26.6 ±10.64^{c}	19.39 ±12.40
AB (n=13)	10.2	28.11 ±23.41	24.33 ±15.44^{ab}	19.34 ±10.38	20.16 ±10.92^{cd}	18.13 ±8.22
BB (n=9)	11.1	16.98 ±3.23	13.4 ±4.34^{b}	16.55 ±8.62	11.52 ±3.56^{d}	14.87 ±4.93

^{a,ab,b}Means±SEM within a column with different superscripts differ (P 〈0.1)

^{c,cd,d}Means±SEM within a column with different superscripts differ (P 〈0.05)

(2) IGF-II

유전자형에 따라 AA, AB, BB의 3가지 타입으로 구분하여 임신기간별 IGF-II의 농도를 비교·분석하였다 (Table 29). 전체적으로 유전자형간 유의적 차이는 존재하지 않지만 45일령을 제외한 전 기간에서 AA 유전자형이 다른 유전자형보다 높은 발현양상을 보인다. 세 유전자형 모두 임신기간이 진행됨에 따라 IGF-II의 농도가 증가함을 알 수 있다.

Table 29. Comparison of porcine serum IGF-II concentration by estrogen receptor genotypes during pregnancy

ER Genotype	Serum IGF-II concentration (ng/ml)				
	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105
AA (n=3)	310.7 ±30.2	404.0 ±116.8	394.7 ±35.0	471.7 ±119.8	507.3 ±320.8
AB (n=12)	360.6 ±93.3	344.1 ±96.1	360.6 ±56.6	437.9 ±124.3	436.6 ±123.2
BB (n=7)	377.7 ±70.0	388.6 ±113.2	381.0 ±90.8	409.0 ±80.5	470.9 ±43.0

2) 자돈 성장기간

(1) IGF-I

신생자돈의 에스트로겐 수용체의 유전자형을 조사한 결과를 기준으로 혈청내 IGF-I **함량을 성장단계별로 구분하여 비교한 결과는** Table 30**과 같다**. **전반적으로 에스트로겐 수용체 유전자 단편에 따른 혈청내** IGF-I**의 함량은 신생자돈이 성장하면서 올라가는 경향을 보여 주고 있으며 이런 결과는** Table 3**의 경향과 비슷한 양상을 보여 주었다**. **또한 임신돈** BB **유전자에서의** IGF-I **함량이 제일 낮았던 결과는 자돈** BB **유전자의** IGF-I **함량이 낮은 결과와 동일하였다**. **그러나 이런 결과들은 자돈의** sample **수가 적은 관계로 단정할 수가 없으며 유의적인 차이의 대한 검정은 실행할 수가 없었다**.

Table 30. Comparison of porcine serum IGF-I concentration by estrogen receptor genotypes during growth of newborn

ER Genotype	Serum IGF-I concentration (ng/ml)					
	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105
AA (n=3)	59.84	99.40	105.55	120.85	137.06	131.67
AB (n=10)	60	63.88	101.4	115.49	129.8	115.05
BB (n=2)	51.03	53	94.53	97.92	99.2	108.79

(2) IGF-II

유전자형에 따라 AA, AB, BB의 3가지 타입으로 구분하여 자돈 성장기간별 IGF-II의 농도를 비교·분석하였다 (Table 31). 자돈의 성장기간은 자돈 성장 초기인 30일령에서 60일령까지는 BB 유전자형이 AA 유전자형보다 높은 IGF-II의 발현을 보인 반면, 성장 후반기에서는 반대로 AA 유전자형이 BB 유전자형보다 높은 경향을 관찰할 수 있었다.

Table 31. Comparison of porcine serum IGF-II concentration by estrogen receptor genotypes during growth of newborn

ER Genotype	Serum IGF-II concentration (ng/ml)					
	Day 30	Day 45	Day 60	Day 75	Day 90	Day 105
AA (n=3)	1131.5 ±244.0	730.0 ±126.8	703.3 ±161.6	675.7 ±167.8	568.7 ±119.5	650.5 ±157.7
AB (n=6)	1077.0 ±417.1	828.0 ±332.9	773.2 ±253.2	521.3 ±137.5	500.7 ±129.7	606.8 ±115.8
BB (n=1)	1277.0	880.3	777.3	641.0	-	480.0

5. 종돈군간 성장인자와 hormone의 발현 비교 · 분석

1차년도, 2차년도, 3차년도에 조사된 산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹의 IGF-I, II, 결합 단백질에 대한 시기별 발현 양상을 Fig. 11에 제시하였다. 이를 근거로 산자수 관련 고능력돈과 저능력돈간의 IGF-I, II, 결합단백질과 hormone (estradiol, progesterone)의 발현을 비교 · 분석하여 산자수 관련 고능력 품종선발 가능성을 제시하였다.

1) IGF-I

발정기 전 기간동안 IGF-I은 산자수가 높은 그룹이 산자수 낮은 그룹보다 좀더 많은 발현을 보였다. 특히 발정후기에서 두 그룹간의 유의적 차이($P<0.01$)를 관찰하였다. 또한 임신 기간동안의 발현 역시 산자수가 높은 그룹이 상대적으로 높은 발현을 나타내었다. 임신 초기인 45일령에서 그룹간 유의적 차이($P<0.05$)를 보임으로써 종부후 산자수를 임신 초기에서 예측할 수 있는 가능성을 제시하였다. 마지막으로 신생자돈의 성장기간 역시 초기 30일령에서 산자수 높은 그룹이 산자수 낮은 그룹보다 좀더 높은 IGF-I의 농도를 나타냄으로써($P<0.05$) 성장이후 산자수 높은 개체가 될 가능성을 성장 초기에 파악할 수 있을 것으로

추정된다.

2) IGF-II

발정기동안의 IGF-II 발현은 두 그룹간 특정한 경향을 보이지 않으며 또한 유의적 차이가 없기 때문에 이 기간동안 IGF-II의 발현으로는 산자수를 구분 짓기 어려울 것으로 사료된다. 그러나 발정기와는 반대로 임신기간에서는 두 그룹간 유의적 차이를 보이는 일령이 4곳으로 조사되었다. 주로 임신 중반이후에서 나타났으며, 특히 임신 60일령에서는 산자수 낮은 그룹이 산자수 높은 그룹보다 높게 발현되어 고도의 유의적 차이($P<0.01$)를 보였다. 그 외에도 임신 75일령, 90일령, 105일령에서 각각 유의적 차이($P<0.05$)를 나타냄으로써 임신 초기에 유의적 차이를 나타내는 IGF-I과는 달리 IGF-II 발현은 임신 중반이후에 산자수를 예측할 수 있는 지표로 사료된다. 신생자돈의 성장기간동안 IGF-II는 산자수가 낮은 그룹이 산자수 높은 그룹보다 유의적으로 높게 발현되었다. 특히 60일령에서 두 그룹간 고도의 유의적 차이($P<0.01$)를 보였으며, 45일령, 105일령에서도 역시 유의적 차이를 보였다($P<0.05$). 이로써 IGF-I에 이어 혈중 IGF-II도 역시 임신기간과 자돈의 성장기간중 산자수를 미리 예측할 수 있는 marker로 활용할 수 있는 가능성을 제시한다.

3) IGF 결합 단백질 (IGFBP)

성주기, 임신기, 자돈 성장기간동안 산자수 높은 그룹과 산자수 낮은 그룹간의 유의적 차이는 존재하지 않았다. 이것은 각 개체간 혈중 IGFBP의 함량이 변이가 크기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 전체적인 그룹간 경향은 분명히 차이를 확인할 수 있었다. 임신 전 기간동안 산자수 높은 그룹이 산자수 낮은 그룹보다 IGFBP의 발현이 보다 높았으며 특히 IGF-I과 동일하게 임신 초기인 45일령에서 가장 많은 차이를 보였다. 또한 자돈 성장기 역시 두 그룹간 현저한 차이를 보였으며, 성장 중반기인 60일령, 75일령, 90일령에서 가장 높은 발현의 차이를 관찰하였다. IGFBP의 발현만으로 산자수를 예측하기에는 어렵지만 IGF-I, II의 작용을

조절하는 고유 특성상 IGF-I과 II의 발현에 의한 산자수 예측을 뒷받침하는 좋은 자료로 활용될 것으로 사료된다.

4) Estradiol (E2)

Steroid hormone의 특성상 개체 변이가 심하고 영양이나 스트레스에 민감한 반응을 보이기 때문에 본 실험에서 유의적 차이를 보이는 곳은 관찰할 수 없었다. 그러나 성주기 동안 산자수가 높은 그룹이 산자수 낮은 그룹보다 전체적으로 높은 estradiol의 발현을 보이며 자돈의 성장기간 동안은 반대의 경향을 보이지만 이 기간 역시 산자수가 낮은 그룹이 산자수가 높은 그룹보다 높은 발현양상을 보인다. 따라서 IGFBP와 동일하게 IGF-I, II의 발현과 함께 고려된다면, 산자수 예측을 좀더 정확하게 뒷받침해 줄 수 근거로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

5) Progesterone (P4)

Estradiol과 동일한 steroid hormone이기 때문에 역시 유의적 차이를 보이는 곳은 존재하지 않았다. 그러나 성주기 기간중 두 그룹간 발정 후기와 발정 전기에서 최고 10배까지의 차이를 보였으며 자돈의 성장기간중 30일령에서 4배이상의 차이를 보임으로써 산자수를 예측할 수 있는 marker로의 가능성을 제시하고 있다.

6) 산자수의 예측

종부이후 임신 초기(45일령)는 혈중 IGF-I의 함량을 조사하고 이를 근거로 1차 산자수를 예측할 수 있으며 임신 중반이후(60일령, 90일령)가 되면 혈중 IGF-II의 발현을 조사함으로써 1차 산자수 예측을 검정하는 동시에 2차 산자수 예측을 실시할 수 있다. 이는 임신 기간동안 외부에서 유래되는 환경이나 스트레스로 인한 산자수의 감소를 사전에 예측, 제거할 수 있는 지표로 사용될 수 있다. 또한 그 외에 IGFBP나 Estradiol, Progesterone의 발현을 동시에 조사함으로써 보다 신빙성 있는 산자수 예측을 가능하게 할 수 있다. 또한 임신기간뿐 아니라 종부전인

성주기(발정후기)동안 IGF-I과 II의 농도를 측정함으로써 임신 전에 산자수를 증가시킬 수 있는 개선발함은 물론이고 후대 자돈의 성장기간 동안의 IGF-I(30일령)과 II(60일령)의 발현을 확인함으로써 모돈으로써의 가치 자돈 성장기간동안 사전에 파악할 수 있는 중요한 자료로 활용될 가능 제시한다.

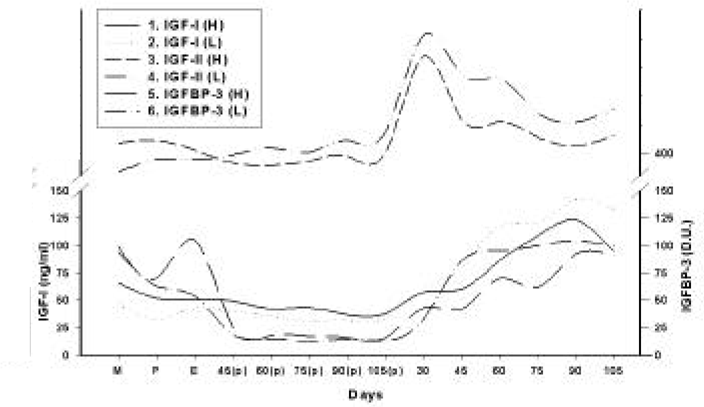


Fig. 35. Comparison of porcine serum IGF-I, IGF-II, and IGFBP-3 expression between high and low litter size groups from estrous cycle to postnatal growth

제 5장 종합 토의

제 1 세부과제 : 산자수 관련 유전자의 검색 및 cloning

돼지의 산자수와 높은 상관관계를 갖고 있는 것으로 보고된 (Rothschild 등, 1996) human estrogen receptor (hER) 유전자를 표지유전자로 이용하여 돼지에서 산자수에 대한 유전자 다형성 (AA, AB, BB형)을 분석하였다. 먼저 웅돈의 정액, 모돈의 혈액 그리고 자돈의 꼬리로부터 추출한 DNA를 PCR-RFLP로 가계분석을 한 결과, ER유전자가 멘델의 유전양식에 따라 자손에게도 유전됨을 알 수 있었다. 또한 표지유전자로서의 신뢰도를 높이기 위하여 돼지에서 ER 유전자를 cloning 하였다. 돼지의 난소 조직으로 추출한 RNA를 RT-PCR 반응을 통해서 돼지 ER 유전자중 3′에서 894 bp 부분을, 5′-RACE을 이용하여 5′에서 751 bp 를 cloning 하였고 이를 바탕으로 estrogen receptor (ER)의 full-length cDNA 1,645 bp을 cloning 하여 그 염기 서열을 분석하였다. 이중 돼지 ER 유전자의 5′말단의 DNA만이 다형현상을 나타내므로 3′말단과 중복되지 않은 5′말단의 162bp가 산자수에 따른 ER 유전자의 다형현상을 나타내는 부분일 것으로 생각한다. 그러므로 본 연구에서 밝혀진 돼지 **ER** 유전자의 염기서열은 지금까지 보고된 것과 전혀 다른 것으로서 새로운 유전자임이 판명되었다. 또한, 산자수 차이를 보이는 군간의 DNA에 대하여 Southern-RFLP를 수행한 결과 돼지 ER의 5′말단의 751-bp 가 산자수 증가와 밀접한 연관성이 있음을 밝혔다. 즉, 돼지 genomic DNA를 *MspI* 과 *PvuII* 의 제한효소로 각각 자른후 5′말단의 751-bp를 표지 유전자로 하여 Southern blot를 수행한 결과 산자수가 높은 돼지 (BB형) 의 경우 독특한 RFLP pattern를 보였다. *PvuII* 제한효소에 대한 경우는 이미 밝혀진 것과 일치하였으며, ***MspI*** 제한효소에 의하여 다형 현상을 나타내는 부위는 보고된 바 없는 것으로 새로운 것이다. 현재 이 부분을 λlibrary system을 이용하여 cloning 하고 있으며 염기서열이 분석되는 대로 산자수 평가를 위한 primer을 제작하여 kit로 개발할 예정이다.

이에 본 연구자는 그 동안 보고된 바가 없는 돼지 **ER gene**에서의

새로운_염기서열에_대한_특허권_신청을_준비하고_있다._농가에서_간편하게_고능력돈_선발을_가능하게_해_줄_수_있는_kit를_개발할_예정이며_이_kit가_완성이_되어_양돈가들에게_보급이_되면,_국내_양돈_산업은_고부가가치_미래지향적인_산업이_되며,_엄청난_경제적_이득을_양돈가들에게_줄_수_있으리라_사료된다._그러기_위해선_앞으로_보다_더_많은_연구가_지속되어야_한다고_본다.

제 2 세부과제 : 산자수 관련 후보 유전자의 분포 및 생산 능력간의 상관관계

산자수 관련 후보유전자인 human ER (hER) 유전자와 다산성 모돈의 조기 선발을 위해 연관성 분석을 위해 전 돈군을 대상으로 임의 추출하여, 각 개체의 hER 유전자를 PCR-RFLP하여 각각의 유전자형을 분석한 결과, 돈군내 유전자 비율 추정치를 살펴보면 B 유전자 비율이 0.61로서 A 유전자가 차지하는 0.39보다 월등히 높았다. 이는 대부분의 종돈장의 특성상 산자수에 대해서 고능력 개체 선발 프로그램을 실시함으로서 복당 산자수 증가와 관련이 있는 B 유전자에 대한 꾸준한 선발이 있었음을 제시하고 있다.

또한 초기 연구는 번식능력 기초분석으로서 조사 두수가 한정된데 반해 전 돈군을 대상으로 TNB와 NBA에 대한 hER유전자형, 산차, 분만년도의 효과를 분석하였다. 그 결과, 산차와 분만년도가 TNB와 NBA에 고도의 유의한 영향을 미쳤다. 한편, ER genotype은 산자수에 대하여 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 그러나, 산차에 있어 고도의 유의성이 있다는 것은 hER 유전자가 번식 지속성에 큰 영향을 미치고 있음을 고려해볼 수 있다.

각 산차별 ER 유전자형이 복당 산자수에 미치는 효과에서 AA형의 경우, BB형에 비해 초산 성적이 좋은 반면, 6산차 이후 부터는 산자수가 급격히 떨어지는 경향이 두드러지는데 반해, BB형의 경우 다소 AA형에 비해 초산 성적은 떨어지지만 2산차부터는 꾸준한 번식능력을 발휘하는 경향

치를 보였다. 또한, 번식지속성에 대해 AA형과 AB형의 개체들이 7산차까지 생존한 비율은 약 8.1%와 8.6%인데 반해 BB형은 13%의 비율로 돈군에 잔류하고 있었다.

즉, BB형은 AA형에 비해 번식 지속성, 생애 총산자수 그리고 적은 도태율을 보임으로서 고능력돈의 선발을 입증하는 좋은 자료가 될 것이다.

그러므로, 본 연구는 hER이 Yorkshire에 있어서 돼지 산자수와의 상관관계에 대해 분석하였다. 그러나, 본 연구자들은 제 1 세부과제에서 그동안 밝혀지지 않았던 돼지 estrogen receptor의 독특한 염기서열을 이용하여 앞으로 좀 더 많은 조사두수와 돈군의 유전자 다형현상을 분석하여, 그 돈군을 구성하고 있는 유전자를 규명하고 돼지 ER 유전자형과 고능력돈과의 상관관계를 통한 선발을 도모하는 동시에 지속적인 연구의 면밀한 검토가 필요하겠다. 더불어서 hER과 돼지 ER 에 대한 부합도 검정도 필요하다.

제 3 세부 과제: 다산종의 번식, 생리적 특성 구명

임신 기간동안의 IGF-I 발현은 산자수가 높은 그룹이 상대적으로 높은 발현을 나타내었다. 임신 초기인 45일령에서 그룹간 유의적 차이($P<0.05$)를 보이며 신생자돈의 성장기간 역시 초기 30일령에서 산자수 높은 그룹이 산자수 낮은 그룹보다 좀더 높은 IGF-I의 농도를 나타냄으로써 종부후 산자수를 임신 초기에 예측하며, 성장이후 산자수 높은 개체가 될 가능성을 성장 초기에 파악할 수 있을 것으로 추정된다. IGF-II의 발현은 주로 임신 중반 이후인 60일령에서 나타났으며, 특히 임신 60일령($P<0.01$), 75일령, 90일령, 105일령($P<0.05$)에서 각각 유의적 차이를 나타냄으로써 임신 초기에 유의적 차이를 나타내는 IGF-I과는 달리 IGF-II 발현은 임신 중반이후에 산자수를 예측할 수 있는 지표로

사료된다. 또한 신생자돈의 성장기간동안 IGF-II는 산자수가 낮은 그룹이 산자수 높은 그룹보다 유의적으로 높게 발현되었다. IGF의 기능을 조절하는 IGFBP도 역시 그룹간에 차이를 보였다. 비록 개체간 변이 차이가 커 통계적인 유의 차이는 알 수 없었지만 전체적으로 IGF-I과 발현되는 양상이 매우 유사함을 관찰할 수 있었으며 이러한 현상은 IGF-I과 IGFBP-3가 양의 상관관계가 있다는 기존의 보고를 다시 한번 확인할 수 있었다. Steroid 호르몬인 estradiol과 progesterone의 발현은 그 특성상 개체간의 변이가 매우 컸지만 IGF-I, II의 발현과 밀접한 관계를 관찰할 수 있었으며 이런 결과는 IGF system이 임신과정을 비롯한 번식 전과정에서 매우 중요한 부분을 차지하고 있음을 간접적으로 보여주는 예라고 할 수 있다.

위의 결과를 종합하여 보면 종부이후 임신 초기(45일령)는 혈중 IGF-I의 함량을 조사하고 이를 근거로 1차 산자수를 예측할 수 있으며 임신 중반이후(60일령, 90일령)가 되면 혈중 IGF-II의 발현을 조사함으로써 1차 산자수 예측을 검정하는 동시에 2차 산자수 예측을 실시할 수 있다. 이는 임신 기간동안 외부에서 유래되는 환경이나 스트레스, 사료로 인한 산자수의 감소를 사전에 예측, 제거할 수 있는 지표로 사용될 수 있다. 또한 그 외에 IGFBP나 estradiol, progesterone의 발현을 동시에 조사함으로써 보다 신빙성 있는 산자수 예측을 가능하게 할 수 있다. 또한 임신기간뿐 아니라 종부전인 성주기(발정후기)동안 IGF-I과 II의 농도를 측정함으로써 임신 전에 산자수를 증가시킬 수 있는 개체를 선발함은 물론이고 후대 자돈의 성장기간 동안의 IGF-I(30일령)과 II(60일령)의 발현을 확인함으로써 모돈으로써의 가치를 자돈 성장기간동안 사전에 파악할 수 있는 중요한 자료로 활용될 가능성을 제시한다. 결과적으로 혈중 IGF-I, II, IGFBP의 발현은 모돈의 산자수 예측에 매우 유용한 지표로 활용할 수 있으며 그 외 기타 steroid hormone의 발현까지 접목된다면 임신돈은 물론 자돈에서도 좀더 정확한 산자수 예측을 할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌 (총괄)

Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Johansson, K., Andersson-Eklund, I., Edfors-Lilja, M., Fredholm, I., Hanssom, J., Hakansson and Lundstrom, K. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fattness in pigs. *Science*. 263: 1771-1774.

Bennett, G. L. and K. A. J. Leymaster. 1989. Integration of ovulation rate, potential embryonic viability and uterine capacity into a model of litter size in swine. *J. Anim. Sci.* 67:1230-1241.

Bereskin, B. and L.T. Frobish. 1981. Some genetic and environmental effects on sow productivity. *J. Anim. Sci.* 53(3): 601-610.

Boekenkamp, D., Jungbult, P. W. and Thole, H. H. 1994. The C-terminal half of the porcine ER contains no post-translational modification: determination of the primary structure. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104: 163-172.

Burt, D. W., Bumstead, N., Bitgood, J. J., DeLeon, F.A.P., and Crittenden, L. B. 1995. Chicken genome mapping: a new era in avian genetics. *Trend. Genet.* 11: 190-194.

Butler, W. R., S. M. Fullenkamp, L. A. Cappiello and S. Handwerger. 1981. The relationship between breed and litter size in sheep and maternal serum concentrations of placental lactogen, estradiol and progesterone. *J. Anim. Sci.* 53:1077-1081.

Byers, M., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A., Park-Sarge, O. K . 1997. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol. Endocrinol.* 11: 172-182.

Clutter, A. C., Y. L. Kirby and M. K. Nielsen. 1994. Uterine capacity and ovulation rate in mice selected 21 generations on alternative criteria to increase litter size. *J. Anim. Sci.* 72: 577-583.

Cristian, L. L. 1992. Breeding Swine evaluation, 1992-1993 Winter Swine Series, Breeding, Feeding, and Marketing Lean Pork. Iowa State University.

Davis, G. P. and S. K. DeNise. 1998. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76: 2331-2339.

Davis, M.E., Simmen, R.C.M. (1997) Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor-I concentration and performance traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:317

Deuel, T. F. 1987. Polypeptide growth factors: Role in normal and abnormal cell growth. *Ann. Rer. Cell. Biol.* 3: 443-492.

Eddy, E. M., Washburn ,T. F., Bunch, D. O., Gouiding, E. M., Gaden , B. C., Lubahn, and Korach, K. S. 1996. Targeted distruption of the ER gene in male mice causes alteration of spermatogenesis, infertility.

Endocrinol. 137: 4796-4805.

Ellegren, H. B., Chowdhary, P., Johansson, M., Markund, L., Feredholm, M., Gustavsson, I. and Andersson L. 1994. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics.* 127: 1089-1100.

Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to quantitative genetics (4th ed.). Longman.

Fries, R., Eggen, A. and Womack, J. E. 1993. The bovine genome map. *Mamm. Gennom.* 4: 405-428.

Frohman, M.A., Dush, M.K, and G.R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(23):8998-9002

Gama, L. L. and R. K. Johnson. 1993. Changes in ovulation rate, uterine capacity, uterine dimensions and parity effects with selection for litter size in swine. *J. Anim. Sci.* 71:608-617.

Green, S., Walter, P., Krust, V., Krust, A., Bonert, J. K., Agros, P. and Chanbon, P. 1986. Human estrogen receptor cDNA sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature* 320: 134-139.

Guler, H. P., J. Zapf, C. Schmid, and E. R. Froesch. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta. Endocrinol. (Copenh)* 121: 753-758.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-560

Henderson, C.R. 1975. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31: 423-449.

Jeon, J. T., O. Carlbog, A. Tornsten, E. Giuffra, V. Amarger, P. Chardon, L. Andersson-Eklund, K. Andersson, I. Hansson, K. Lundstrom and L. Andersson. 1999. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nat. Genet.* 21: 157-158.

Jones, J. I. and D. R. Clemmons. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endcr. Rev.* 16: 3-34.

Ko, Y., C. Y. Lee, T. L. Ott, M. A. Davis, R. C. M. Simmen, F. W. Bazer and F. A. Simmen. 1991. Insulin-like growth factors in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-1 production during early pregnancy. *Biol. Reprod.* 45:135-142.

Korach, K. S. 1994. Insights from the study of animal lacking functional ER. *Science.* 266: 1524-1527.

Lanneluc, I., Drinkwater, R. D., Elsen, J. M., Hetzel, D. J., Nguyen, T. C., Piper, L. R. and Thimonier, J. 1995. Luminal flushings, and its production by endometrial tissues. *Biol. Reprod.* 52: 561-571.

Lee, C. Y., F. W. Bazer, T. D. Etherton and F. A. Simmen. 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.

Montgomery, G. W., E. A. Lord, J. M. Penty, K. G. Dodds, T. E. Broad, L. Cambridge, S. L. F. Sunden, R. T. Stone, and A. M. Crawford. 1994. The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics* 22: 148-153.

Murdoch, F. E., L. M Byrne, E. A. Ariazi, J. D. Furlow, D. A. Meier and J. Gorski. 1995. Estrogen receptor binding to DNA: affinity for nonpalindromic elements from the rat prolactin gene. *Biochemistry*. 34: 9144-9150.

Murphy, L.J., Murphy, L.C., Friesen, H.G. (1987) Estrogen induces insulin-like growth factor expression in rat uterus. *Mol. Endo.* 1:445

Owen, J. A. 1991. Endocrine and substrate control of fetal growth: Placental and maternal influences and insulin-like growth factors. *Reprod. Fertil. Devel.* 3: 501-517.

Paria BC and Dey SK 1990. Preiimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 87, 4756-4760.

Rathje, T. A., Rohrer, G. A. and R. K., Johnson. 1997. Evidence for Quantitative Trait Loci Affecting Ovulation Rate in pigs. *J. Anim. Sci.* 75: 1486-1494.

Rocha, J. L., Baker J. F., Womack, J. E., Sanders, J. O., Taylor, J. F.1992. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.*

70:3360-3370.

Rothschild, M. F. 1998. Recent Advances in Pig Genome Mapping. *Proc. 8th World Congr. on Anim. Prod.* 1: 186-192.

Rothchild, M. F., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki,M.,Vincent, S., Maclaren, A. D., Southwood, O., Van Der Steen, H., Mileham, A. and Plastow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 201-205.

Rotwein, P. 1991. Structure, evolution. expression, and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 5: 3-18.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

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

Schaufele, F. 1999. Regulation of estrogen receptor activation of the prolactin enhancer/promoter by antagonistic activation function-2-interacting proteins. *Mol Endocrinol.* 13: 935 - 945.

Searle, S. R. 1971. Linear Models, John Wiley.

Short, T. H., Rothschild, M. F., Southwood, O. I., McLaren, D. G., de Veries, A., Van Der Steen, H., Eckardt, G. R., Tuggle, C. K., Helm, J. Vaske, D. A. Mileham, A. J. and Plastow, G. S. 1997. Effect of the

Estrogen Receptor Locus on Reproduction and Prodction Trait in Four Commercial Pig Lines. *J. Anim. Sci.* 75: 3138-3142.

Simmen, R. C. M., F. A. Simmen, A. Hofig, S. J. Farmer and F. W. Bazer 1990. Hormonal regulation of insulin like growth factor gene expression in pig uterus. *Endocrinology*. 127: 2166-2174.

Southern, E. K. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Stewart, C. E. and P. Rotwein. 1996. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.* 76: 1005-1026.

Stewart, H. A. 1945. The inheritance of prolificacy in swine. *J. Anim.Sci.* 4: 359-357

Visscher, P. M. and C. S., Haley. 1995. Utilizing genetic markers in pig breeding programmes. *Anim. Breed.* Abstr. 63: 1-8.

Wallace, R. B., Johnson, M. J., Suggs, S. V., Miyoshi, K., Bhatt, R. and Itakura, K. 1981. A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. *Gene* 16: 21-26.

Wather, D.C., Perks, C. M., Davis, A.I. and Denning-Kendall, P. A. 1995. Regulation of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in the ovine ovary. *Biol. Reprod.* 53: 882-889.

Wright, S. 1968. Evolution and the Genetics of Populations. Univeristy of Chicago press.

Yeh, J., Danehy, F.T., Osathanondh, R., Villa-Komaroff (1991) mRNAs for insulin-like growth factor-II (IGF-II) and variant IGF-II are co-expressed in human fetal ovary and uterus. *Mol. Cell. Endo.* 80:75

고용. 성장인자들의 자궁에서의 역할. 1997. 고려대학교 자연자원대학연구소, 5:151-163.

김내수, 김정우, 박홍양, 상병찬, 여정수, 전광주, 최광수, 홍기창. 1993. 응용통계학, 유한문화사

박미라, 이재원 .1996. 임상시험연구를 위한 통계적방법, 자유아카데미

서동삼, 양성호, 박희복, 박성수, 홍기창, 고용. 1999. 에스트로겐 수용체 유전자의 다형현상 추정을 위한 응고 및 건조된 돼지 혈액의 이용. *한국가축번식학회지*, 23:161-165.

이철영. 1996. Insulin-like Growth Factor System의 생식기능에서의 역할: 자궁편. 대한내분비학회지, 23:247-268.

정흥우, 박영일. 1986. 돼지에 있어 복당산자수와 복당 포유개시 자돈수의 유전력과 유전상관. *한국축산학회지*. 28: 584-589.

허명회 .1993. 선형모형 방법론, 자유아카데미