

IGF system components의 혈중농도를 이용한 종돈의
선발지표 개발: cloning, expression 및
RIA 개발과 그 이용

Circulating concentrations of the IGF system components as
a potential selection index for breeding pigs: cloning,
expression, development of a RIA and its utilization

진 주 산 업 대 학 교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “IGF system components의 혈중농도를 이용한
종돈의 선발지표 개발: cloning, expression 및 RIA 개발과 그
이용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 . 11 . 15 .

주관연구기관명 : 진주산업대학교

총괄연구책임자 : 이 철 영

연 구 원 : 김 경 태

연 구 원 : 김 상 훈

연 구 원 : 김 용 환

연 구 원 : 박 준 규

연 구 원 : 박 화 춘

연 구 원 : 안 승 훈

연 구 원 : 이 동 희

연 구 원 : 진 상 근

요 약 문

I. 제 목

IGF system components의 혈중농도를 이용한 종돈의 선발지표
개발: cloning, expression 및 RIA 개발과 그 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

'90년대 초반까지의 종돈육종은 일당증체량, 등지방두께 및 산자수 등과 같은 양적 경제형질 위주로 주로 집단유전학에 기초한 통계적 기법에 의존해 왔으며, 이와 같은 방법은 지금까지 성공적으로 수행되어왔다. 그러나 '90년대 초반부터 양적 경제형질에 대한 분자유전학·생물학적 방법의 도입으로 가속개량사업을 가속화할 수 있는 계기가 되었으며, 최근까지 도축해야만 측정이 가능했던 경제형질에 대한 접근을 가능하게 하였다. 따라서 이러한 경제형질과 관련된 생물학적/유전적 표지인자(marker)의 개발 및 활용(marker-assisted selection)은 종자산업의 경쟁력 제고로 산업의 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

현재까지 돈육의 질과 관련하여 돼지 스트레스증후군(porcine stress syndrome; PSS)과 연관된 ryanodine receptor(HAL) gene과 주로 햄프셔 품종에서 산성육의 원인이 되는 Rendement Napole(RN) 유전자가 잘 알려져 실제 산업적으로 이용되고 있다. 그러나 최근 양적 경제형질과 관련된 표지인자를 개발하기 위하여 주로 PCR products의 polymorphism이 널리 시도되고 있으나 아직 기술적으로 실용화단계에는 미치지 못하기 때문에 이의 보완 혹은 대체 방법으로 생물학적 원인과 결과에 근거한 양적인자의 생리학적 표지인자 개발

의 필요성이 대두된다.

동물의 양적 형질과 관련하여 최근의 연구 결과에 의하면 성장형질은 물론 난포발육과 배란, 태아발육, 유선성장 및 비유 등과 같은 번식능력의 발현에 insulin-like growth factor-I(IGF-I)이 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀져 IGF-I의 혈중 농도는 성장과 번식능력 발현을 위한 내분비적 상태를 유추할 수 있는 지표를 제공해 줄 수 있게 되었다. 혈중 IGF의 95% 이상은 현재까지 알려진 6개의 IGF-binding proteins(IGFBPs) 중 한 개와 단단하게 비공유결합된 상태로 존재하는데, 이 중 2/3 이상의 IGF는 40~45kDa의 IGFBP-3와 ~85-kDa의 acid-labile subunit(ALS)와 결합하여 ternary complex 형태로 존재하기 때문에 혈중 IGF system을 연구하기 위해서는 IGF-I과 IGFBP-3는 물론 ALS에 대한 연구의 필요성이 대두된다. 그러나 IGF-I과 IGFBP-3에 대한 연구는 상당히 진척되었으나, 돼지의 ALS에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 ① 일차적으로, 돼지 ALS DNA cloning, expression 및 RIA를 개발하고, ② 이차적으로, IGF system components의 혈중농도와 종돈의 성장 및 번식형질간의 상관관계를 도출하여 전자를 이용한 종돈의 선발지표 개발을 목표로 착수되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 pALS genomic DNA cloning과 ALS 유전자의 생체 발현 특성 구명, pALS expression과 expressed pALS protein의 항혈청 생산 및 IGF system components의 RIAs 개발과 종돈의 성장단계 및 모돈의 번식단계별 IGF system components의 혈중농도와 경제형질과의 상관관계 구명으로 대부분될 수 있다. 먼저 pALS genomic DNA를 cloning하기 위해 타 종에서 보고된 consensus sequences 부위에서

primers를 합성하고, genomic DNA를 template로 하여 PCR 방법으로 증폭시켜 얻은 3개의 overlapping DNA 단편을 sequencing함으로써 mature pALS의 모든 coding sequence를 확보하였다. 생체 조직에서의 ALS 유전자 발현 특성을 구명하기 위해서는 태아기부터 성돈에 이르기까지 간에서의 mRNA abundance를 Northern blot 방법으로 분석하였고, 성돈의 간 이외 조직에서의 ALS 유전자 발현 여부와 상대적인 수준은 Northern blotting보다 감도가 높은 solution hybridization/RNase protection assay로 확인하였다.

pALS의 expression construct를 제작하기 위해 먼저 mature pALS의 모든 coding sequence를 포함하는 두 개의 overlapping pALS genomic DNA 단편을 in-frame되게 PCR로 증폭하여 annealing시킨 다음 pBS plasmid vector에 삽입시켰다. pBS vector에 삽입된 insert는 vector로부터 잘라내어 pGEX-2T plasmid(procaryotic) expression vector와 pEBG baculovirus(eucaryotic) expression vector에 삽입하였다. 이들 expression systems로부터 생산된 glutathione S-transferase(GST)-pALS fusion protein은 affinity chromatography로 정제하였고, recombinant eucaryotic pALS protein은 New Zealand White rabbit에 주사하여 다클론(polyclonal) 항혈청을 확보하였다.

먼저 농협중앙회 종돈사업소 보유 종돈을 육종가 기준으로 low vs high 성장능력 lines와 low vs high 번식능력 lines로 구분하였다. 성장형질 분석에서는 종돈의 성장단계별(25, 60 & 100kg) 혈액을 채취하고 100kg시 일당중체량, 등지방두께, 등심단면적 및 정육률을 측정하고 품종별/성장단계별 IGF system components 혈중 농도의 low- vs high-lines간의 차이 유무와 각각의 성장형질과의

상관관계를 분석하였다. 번식형질에서는 모돈(gilts)의 임신 90일과 분만 후 15일에 혈액을 채취하고 산자수 및 총 이유자돈 체중을 측정하여 품종별/번식단계별 IGF system components 혈중농도의 low-vs high-lines간의 차이 유무와 각각의 번식형질과의 상관관계를 분석하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구개발의 주요 결과와 결과의 유용성은 다음과 같다.

1. 돼지(porcine) ALS(pALS) genomic DNA clones

가. pALS protein의 모든 coding sequence를 포함하는 3개의 DNA 단편 cloning 완료

나. 활용

- 1) ALS 유전자 구조와 전사조절 메커니즘 연구를 위한 기초자료
- 2) ALS의 분자생물학적 연구에 필요한 probes 제공

2. pALS 유전자의 생체 발현 특성 규명

가. 간에서의 ALS 유전자 발현의 성장호르몬 의존성 규명 및 간 이외의 조직에서 ALS 유전자 발현 확인

나. 활용

- 1) 혈액 이외의 체액과 조직에서의 ALS protein 분포와 기능 연구의 교두보
- 2) IGF:IGFBP와 무관한 ALS 기능 연구의 학술적 근거

3. pALS expression 및 항혈청 생산

가. Pro- & eucaryotic pALS expression systems 확립 및 항혈청 생산 완료

나. 활용

- 1) ALS 연구를 위한 ALS protein 생산
- 2) 세포 수준에서의 ALS 연구를 위한 transfection용 ALS expression construct 제공
- 3) pALS RIA 개발과 이용

4. IGF system components의 혈중농도와 종돈의 성장 및 번식형질간의 상관관계 구명

가. 주요 연구내용과 결과

- 1) 농협중앙회 종돈사업소 보유 종돈에 대해 가계의 유전능력을 활용하여 BLUP-animal 기법으로 성장 및 번식형질에 대한 육종가를 계산하고, 경제형질별 계산된 육종가를 기준으로 품종별 low-line과 high-line으로 분류
- 2) 품종별, 형질별 및 성장 혹은 번식 단계별 low-line 대비 high-line의 IGF system components의 혈중농도 차이 유무 분석
- 3) 품종별, 형질별 및 성장 혹은 번식단계별 IGF system components의 혈중농도와 성장 혹은 번식형질간의 상관관계 분석
- 4) 2 & 3) 결과의 일관성 검정
- 5) 주요결과
 - 가) 25kg & 60kg시 IGF-I의 혈중농도는 선발시(100kg) 등지방두께 및 정육률과 부의 상관관계
 - 나) 60kg시 IGF-I의 혈중농도는 선발시까지의 일당중체량과 정의 상

관관계

나. 활용

- 1) IGF 혈중농도를 이용한 조기선발지표 개발을 위한 기초자료 제공
- 2) IGF 혈중농도를 육종가로 계산하여 신빙성 검증

SUMMARY

I. Title

Circulating concentrations of the IGF system components as a potential selection index for breeding pigs: cloning, expression, development of a RIA and its utilization

II. Objectives and Significance

Swine breeding up to early nineties was mainly dependent on population genetics-based statistical methods mostly for the improvement of quantitative traits such as average daily gain, backfat thickness and litter size, and this has been successful to date. However, applications of molecular genetic and other biological methods in animal breeding from early nineties have not only shortened the time required for the improvement of economic traits but also enabled the improvement of some qualitative traits which previously were measurable only at slaughter. As such, identification of genetic and other biological markers associated with economic traits and the marker-assisted selection of breeding animals are expected to greatly contribute to the development of animal breeding industry.

In qualitative traits, the porcine stress syndrome(PSS)-associated ryanodine receptor(HAL) gene and the Rendement

Napole(RN) gene which is known to cause the acidic pork in Hampshire breed have been identified and also are industrially utilized. However, many attempts to identify DNA markers for quantitative traits based on the polymorphism of PCR products have not been connected to industrial utilization in terms of technical practicality, which makes it necessary to identify physiological markers based on causes and effects as supplements to or substitutes for the PCR method.

According to the latest literature related to economic traits, insulin-like growth factor-I(IGF-I) plays an important role not only in growth but also in reproductive phenomena including follicular development and ovulation, fetal development, mammary gland development and lactation, suggesting the possibility that circulating IGF-I concentration may reflect the animal's growth and reproductive potentials. Over 95% of total circulating IGF is bound to one of the six known IGF-binding proteins(IGFBPs). Moreover, more than two thirds of plasma IGF is bound to 40~45-kDa IGFBP-3 and ~85-kDa acid-labile subunit(ALS) to form ternary complexes. It is therefore imperative to study characteristics of the ALS protein in addition to IGF-I and IGFBP-3 to comprehensively understand the circulating IGF system. However, virtually no research has been reported to date regarding porcine ALS(pALS), although studies on IGF-I and IGFBP-3 have been substantially progressed. The present study was therefore undertaken with

following objectives: ① to clone pALS DNA and subsequently to express pALS and to develop its RIA at the first step, ② secondly, to analyze the relationship between circulating concentrations of the IGF system components and growth and reproduction traits in breeding pigs and thereby to derive a selection index based on the former.

III. Experimental Approaches and Scope

The present study can be divided into three parts: cloning of pALS genomic DNA and characterization of *in vivo* pALS gene expression, expression of pALS and pALS RIA development including antiserum production and analysis of relationships between plasma concentrations of the IGF system components and growth/reproduction traits at various growth/reproduction stages. In the first part, three overlapping DNA fragments spanning a region coding for the entire pALS protein were amplified by PCR using genomic DNA as template, followed by nucleotide sequencing. Hepatic ALS gene expression during fetal and postnatal development up to the marketing stage was determined by Northern blot analysis using a cloned pALS genomic DNA fragment as probe. In addition, non-hepatic pALS gene expression also was detected by a more sensitive solution hybridization/RNase protection assay.

To make a pALS expression construct, the entire coding

sequence for mature pALS protein was amplified from two overlapping pALS genomic DNA fragments, followed by annealing of the two in-frame fragments and insertion into the pBS plasmid vector. The insert isolated from the pBS vector was next inserted into the pGEX-2T plasmid(procaryotic) vector and the pEBG baculovirus(eucaryotic) expression vector. The glutathione S-transferase(GST)-pALS fusion protein from these expression systems was purified by an affinity chromatography, after which a polyclonal antiserum was obtained following injection of the recombinant eucaryotic pALS into a New Zealand White rabbit.

All the breeding pigs of the Swine Breeding Center of National Agricultural Cooperatives Federation were divided into low- vs high- growth ability lines and also into low- vs high-reproductive ability lines. For the analysis of growth ability, blood samples were taken at different stages(25, 60 & 100kg) and average daily gain, backfat thickness, loin muscle area and lean percentage were measured at 100kg. Analyzed were the significance of difference between the low- vs high-lines in plasma concentrations of the IGF system components and also the correlations between the concentrations of the IGF system components and the growth traits at different growing stages in different breeds. In reproductive traits, blood samples were taken from experimental gilts at day 90 of pregnancy and subsequently at day 15 post-partum and their litter sizes and

total weaned litter weights were recorded, followed by analysis of significance of differences between the low- vs high-lines in plasma concentrations of the IGF system components and also the analysis of correlations between the concentrations of the IGF system components and the reproductive traits at different stages in different breeds.

IV. Key Results and Suggestions for Their Utilization

Following are main results and their potential utilities.

1. pALS genomic DNA clones

1) Three pALS genomic DNA fragments spanning the entire coding sequence for mature pALS protein were amplified and cloned.

2) Utilities

(1) They will provide basic information for the study of ALS gene structure and the regulatory mechanism of transcription of the gene.

(2) They can be used as probes in molecular biological studies of ALS.

2. Characterization of *in vivo* ALS gene expression

1) The growth hormone-dependence of hepatic ALS gene expression and also non-hepatic ALS gene expression were found.

2) Utilities

- (1) Results are the starting point for studying the distribution of ALS protein in non-vascular fluids and tissues and the function of non-vascular ALS.
- (2) Results also provide a rationale for studying the IGF: IGFBP-independent function of ALS.

3. pALS expression and antiserum production

- 1) Pro- and eucaryotic pALS expression systems were established and a pALS antiserum was produced.

2) Utilities

- (1) ALS production needed for various ALS studies
- (2) The expression construct can be used in transfection studies at the cellular level.
- (3) pALS will be used for a development and utilization of RIA.

4. Relationships between circulating concentrations of the IGF system components and growth/reproductive traits were analyzed.

1) Key analyses/results

- (1) Breeding values for growth and reproduction traits for all the breeding animals of the Swine Breeding Center of National Agricultural Cooperatives Federation were estimated and the animals were divided into low- and high-growth/reproduction ability lines.

(2) The significance of differences between the low- and high-lines in plasma concentrations of the IGF system components at different growing/reproductive stages in different breeds was tested.

(3) Correlations between plasma concentrations of the IGF system components and the growth/reproductive traits at different stages in different breeds were analyzed.

(4) Consistency of the (2) and (3) results was evaluated.

(5) Key results

- Negative correlations between IGF-I concentrations at 25 & 60kg and backfat thickness and lean percentage at 100kg
- A positive correlation between IGF-I concentration at 60kg and average daily gain up to the selection at 100kg.

2) Utilities

(1) Results will provide useful information when developing an index for an early selection based on plasma IGF concentration.

(2) The reliability of the present results can be tested by converting the IGF concentration into the breeding value followed by field application.

CONTENT

CHAPTER 1. Introduction-----	19
1. Objectives and significance-----	19
2. Experimental approaches and scope-----	25
CHAPTER 2. ALS genomic DNA cloning and characterization of <i>in vivo</i> ALS gene expression-----	28
1. Introduction-----	28
2. Materials and methods-----	29
3. Results and discussion-----	33
CHAPTER 3. Expression of ALS and production of ALS antiserum-----	41
1. Introduction-----	41
2. Prokaryotic expression-----	42
3. Eucaryotic expression-----	49
4. Antiserum production-----	56
CHAPTER 4. Analysis of correlations between plasma concentrations of the IGF system components and economic traits of breeding pigs-----	57
1. Introduction-----	57
2. Materials and methods-----	59
3. Results-----	69
4. Discussion-----	75
5. Appendix: purification of ALS and IGFBP-3-----	77

CHAPTER 5. Key results and suggestions for their	
utilization-----	90
1. Key results and suggestions-----	90
2. Accomplishment(publication)-----	92
CHAPTER 6. References-----	93

목 차

제 1 장 서론-----	19
제 1 절 연구개발의 목적과 중요성-----	19
제 2 절 연구개발 내용 및 범위-----	25
제 2 장 ALS Genomic DNA Cloning과 생체조직의 ALS 유전자 발현	
특성 구명 -----	28
제 1 절 서설-----	28
제 2 절 재료 및 방법-----	29
제 3 절 결과 및 고찰-----	33
제 3 장 ALS expression과 항혈청 생산-----	41
제 1 절 서설-----	41
제 2 절 Procaryotic expression-----	42
제 3 절 Eucaryotic expression-----	49
제 4 절 항혈청 생산-----	56
제 4 장 IGF system components의 혈중농도와 종돈의 경제형질	
간의 상관분석-----	57
제 1 절 서설-----	57
제 2 절 재료 및 방법-----	59
제 3 절 결과-----	63
제 4 절 고찰-----	75
제 5 절 별첨: ALS 및 IGFBP-3 정제 -----	77
제 5 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의-----	90
제 1 절 주요 결과와 제언-----	90
제 2 절 연구 성과(발표 논문)-----	92

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 중요성

1. 목적

학술·산업적으로 돼지의 경제형질과 IGF system components의 발현과는 상관관계가 높을 가능성이 크나 이들간의 상관관계에 대한 연구가 미흡하여 이 분야의 연구가 요망되고, 산업적으로 정확한 우수 종돈의 선발 특히 조기선발은 매우 중요하나 생리학적 표지인자(marker)를 이용한 종돈선발 방법은 거의 개발되지 못하였다. 따라서 본 연구는 1) 돼지 IGF system의 주요 요소인 acid-labile subunit(ALS)의 coding sequence를 cloning하여 ALS 유전자의 생체 발현 특성을 구명하고, 2) ALS protein의 coding sequence를 expression시키고 recombinant ALS에 대한 생화학적 특성을 구명하고 항혈청을 생산함으로써 학술적 발전을 도모하고, 3) 주요 IGF system components에 대한 IRAs를 개발하고 종돈의 성장 및 번식형질과 IGF system components의 혈중농도와의 상관관계를 분석하여 후자를 이용한 종돈의 선발지표를 개발하고자 착수되었다.

2. 중요성

가. 기술적 측면

재래적으로 종돈육종은 일당중체량, 등지방두께 및 산자수 등과 같은 양적 경제형질 위주로 주로 통계적 육종기법을 통한 양적 유전학적인 방법에 의존해 왔으며, 이와 같은 방법은 지금까지 성공적으로 수행되어왔다. 그러나 '90년대 초반부터 양적 경제형질에 대한 분자유전학·생물학적 방법의 도입으로 가축개량사업의 첨단과학화 및 가속화할 수 있는 계기가 되었으며, 최근까지 도축해야만 측정이 가능했던 육질관련 형질에 대한 접근을 가능하게 하였

다. 따라서 이러한 경제형질과 관련된 생물학 및 유전적 표지인자(marker)의 개발 및 활용(marker-assisted selection)은 종자산업의 경쟁력제고로 산업의 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

현재까지 돈육의 질과 관련하여 크게 두 개의 유전자가 밝혀졌는데 그중 하나는 HAL gene으로 알려진 ryanodine receptor gene으로서 이 유전자가 point mutation 될 경우(Fujii 등, 1991) 돼지 스트레스증후군(porcine stress syndrome; PSS)을 일으킬 가능성이 높아지는 것으로 알려져 있으며(Ellis 등, 1999), 국내에서도 polymerase chain reaction(PCR) 방법 등에 의해 PSS 감수성 유전자의 유무를 실용적으로 검출해 내고있다(박 등, 1997; 김 등, 1998). 햄프셔 품종에서 잘 나타나는 Rendement Napole(RN) 유전자는 근육의 과다한 해당작용을 유발하여 산성육의 원인이 되는 유전자임이 밝혀졌다(Enfalt 등, 1997). 한편 돼지의 번식형질인 산자수와 관련하여 중국 메산돈(Meishan pig)의 다산성은 estrogen receptor gene의 한 allele(다산성유전자)을 가지고있는데, 메산돈의 estrogen receptor gene allele이 백색 계통 돼지에 유전되어도 산자수가 증가한다는 사실이 밝혀져(Rothschild 등, 1996; Short 등, 1997) 앞으로 산업에 활용될 전망이다.

최근 양적 경제형질과 관련된 표지인자를 개발하기 위하여 주로 PCR 방법에 의한 PCR products 길이의 polymorphism을 이용한 방법이 널리 시도되고 있으나 아직 기술적으로 실용화단계에는 미치지 못하기 때문에 이의 보완 혹은 대체 방법으로 생물학적 원인과 결과에 근거한 양적인자의 생리학적 표지인자 개발의 필요성이 대두된다.

주어진 유전적 배경과 영양을 포함한 환경 조건 하에서 가축의 성장과 번식 형질의 발현은 다수의 호르몬 작용에 의해 제어된다. 증체율과 체성분 조성을 포함한 동물의 성장은 인슐린, 갑상선호르몬, 부신피질호르몬 및

성장호르몬 등에 의해 제어되나 이 중 성장호르몬이 중추적인 역할을 한다는 사실은 오래 전부터 알려져 왔다(Etherton과 Kensinger, 1984; Lee, 1988). 성장호르몬은 지방합성을 억제하는 반면 근육과 뼈의 성장을 촉진하여 실질적으로는 등지방두께를 저하시키고 등심을 포함한 근육질의 양을 높이는 효과가 있다(Chung 등, 1985; Klindt 등, 1992). 따라서 이론적으로 성장호르몬의 혈중 농도를 이용하여 성장형질 개량을 목표로한 종돈 선발 지표 개발을 가상해볼 수 있으나 이 호르몬은 박동형으로 분비(pulsatile secretion 혹은 circadian rhythm)되기 때문에 현실적으로 몇 차례의 혈액시료 분석으로는 생체의 성장호르몬 분비 상태를 측정할 수 없다(Lee, 1988). 그러나 다행히도 성장호르몬의 대부분의 성장 촉진 작용은 성장호르몬의 작용에 의해 발현·분비되는 insulin-like growth factor-I(IGF-I)에 의해 매개되고(Jones와 Clemmons, 1995; 이, 1996, 2000), IGF-I의 혈중 농도는 circadian rhythm이 없기 때문에(Gluckman 등, 1991) IGF-I의 혈중농도에 근거하여 동물의 성장호르몬 분비 상태를 유추할 수 있게 되었다. 동물의 난포발육과 배란, 태아발육, 유선성장 및 비유 등과 같은 번식능력의 발현에는 전통적으로 성선자극호르몬과 성선호르몬에 의해 제어되는 것으로 알려져 왔으나 최근 연구 결과 이들 성호르몬 작용의 많은 부분이 IGF에 의해 매개되거나 IGF와 교호작용을 하는 것으로 밝혀졌다(Adashi 등, 1991; Lee 등, 1993a; Liu 등, 1993; 이, 1996, 1997; Cox, 1997; Cohick, 1998). 따라서 IGF의 혈중 농도는 성장과 번식능력 발현을 위한 내분비적 상태를 유추할 수 있는 지표를 제공해 준다. 한편 동물의 혈중에는 IGF-I과 구조적으로 유사한 IGF-II도 있으나 후자는 성장호르몬에의 의존성이 없고 그 생리학적 역할도 명확치 않으나, 많은 *in vitro* 실험에서 IGF-I과 유사한 작용을 하기 때문에 IGF-I 연구시 추가 항목으로 연구할 가치가 있는 물질로 알려져 있다.

혈중 IGF의 95% 이상은 현재까지 알려진 6개의 IGF-binding

proteins(IGFBPs) 중 한 개와 단단하게 비공유결합된 상태로 존재하고, 이중 2/3 이상의 IGF는 40~45-kDa의 IGFBP-3와 ~85-kDa의 acid-labile subunit(ALS)와 결합하여 ternary complex 형태로 존재한다(Baxter 등, 1989; Baxter와 Dai, 1994; Lee와 Rechler, 1995a; Rechler와 Clemmons, 1998). 따라서 ALS, IGFBP-3와 IGF ligand는 IGF system components의 중심 부위를 차지한다. IGFBP-3는 혈중 주요 IGF carrier 역할을 하고 ALS는 IGF:IGFBP-3 binary complex를 결합하여 IGF ligand가 서서히 방출되게 함으로써 IGF 이용률을 극대화하는 역할을 한다. 최근 homologous recombination technique에 의해 ALS gene이 파괴된 생쥐는 혈중 IGF-I 농도가 저하되고 성장도 저하되었다는 연구보고(Ueki 등, 2000)는 위에 언급한 ALS의 생리학적 역할을 단적으로 증명하고 있다. 따라서 IGF system에 의한 성장과 번식능력의 발현 기전을 이해하고 나아가 IGF system을 이용한 가축의 생산성을 높이는 방법을 고안하기 위해서는 ALS에 관한 연구가 꼭 필요할 것으로 사료되나 세계적으로 ALS에 관한 연구는 타 IGF system components에 비해 뒤져있는 실정이다. 본 연구가 착수될 당시 ALS cDNA 혹은 genomic DNA는 단지 인간(Leong 등, 1992), 쥐(Dai와 Baxter, 1992; Boisclair 등, 1996) 및 baboon(Delhany와 Baxter, 1996)에서만 cloning되었고, ALS protein은 단지 인간(Baxter 등, 1989)과 쥐(Baxter와 Dai, 1994; Lee와 Rechler, 1995b)에서만 정제되고 그 항혈청이 만들어졌다. 따라서 본 연구에서는 돼지의 IGF system 자체에 대한 학술적 연구와 혈중 IGF system components의 농도를 종돈의 선발지표 개발에 이용하고자 한다.

나. 경제·산업적 측면

WTO 체제하에 세계의 돈육시장이 개방됨에 따라 우리나라의 양돈업은 국내 소비자뿐만 아니라 외국 소비자의 기호성까지도 수용해야하는 상황에 처

하게 되었다. 국내 소비자는 비교적 지방함량이 높은 돈육을 좋아하는 반면 근육질 함량이 높은 등심이나 험에는 관심이 낮기 때문에 1998년 국내 도체 등급기준은 이러한 기호성을 반영하여 개정되었다. 이러한 기준하에서 내수용 종돈은 이미 등지방두께가 충분히 혹은 지나치게 낮아졌다는 우려까지 있으나 해외 수요자들은 지방함량이 낮은 돈육을 요구하는 바 등지방두께는 낮고, 등심단면적은 큰 이른바 정육율이 높은 돼지를 요구하기 때문에 수출을 위해서는 이들을 지표로한 종돈선발이 절실히 요망되고 있다. 실제로 1998년 한 해 동안 일본에만도 3억 1만불(3,720억, 1,200원/\$)의 돈육을 수출하였고, 2000년 구제역 발생 후 대일 수출이 중단되었으나 2002년 이후에는 수출이 재개될 것으로 예상된다. 따라서 양돈산업의 국제경쟁력을 높이기 위해서는 국제시장에서 비싸게 거래되는 등심의 양(등심단면적)을 비롯하여, 정육률, 산자수, 이유두수 및 이유체중(비유량 지표)과 같은 경제형질 개선을 목표로 한 종돈개량이 이루어져야 할 것이다.

현대 종돈 개량 방향은 소비자가 찾는 맛있는 고기생산(우수한 육질, 등심과 같은 인기 부분육량 증대)과 양돈농가의 생산성 제고(산자수, 포유능력, 빠른 성장, 얇은 등지방층)에 있으며, 이중 산자수는 오래전부터 종돈의 선발지표로 사용되어 왔으나 사실상 비유량은 고려되지 못한 실정이나 무유증 및 낮은 비유량으로 인한 포유자돈 도태율이 5-10%까지 이른다는 점을 감안할 때 특히 우리나라와 같이 자돈생산비가 높은 상황하에서는 막대한 경제적 손실이 아닐 수 없다. 이러한 점들을 고려하여 본 과제에서는 IGF system components의 혈중농도와 상기한 성장 및 번식능력과의 상관관계를 도출하여 종돈선발의 표지인자를 개발하고자 한다.

Marker에 의한 선발은 가축의 세대간격을 줄이고 선발의 정확도를 증가시킴으로써 고능력 돼지의 조기 확보를 가능하게 하며 돼지의 도체형질에 대한 조기 선발을 통해 고급육 생산을 위한 토대로 삼을 수 있어 축산물의 국

제 경쟁력 확보를 도모할 수 있으며, 후대검정과 같은 고비용 육종방법을 배제할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

모든 기술력이 집대성된 종돈업은 양돈업의 SOC임과 아울러 그 능력과 규모는 경쟁력의 척도로서 사회적으로는 양돈산업의 자긍심과 아주 밀접한 관계가 있다. 이러한 종돈산업이 육질개량과 생산성 향상 측면에서 과학적이며 체계적으로 발전할 때 우리나라의 양돈업은 무한경쟁시대에 수입 축산물과의 경쟁에서 이길 수 있는 산업으로 발전될 수 있을 것이다.

우리나라의 축산 분야 중에서 양돈은 국제경쟁력을 확보할 수 있는 여력을 가지고 있는 산업이나 지금까지 국내 종돈 생산 체계는 주로 외국으로부터 도입된 품종에 의존하였기 때문에 생산비용이 높고 종돈의 종속성이 계속되는 문제점이 있다. 따라서 국내 종돈(업)계는 신속하고 정확한 종돈의 능력을 평가할 수 있는 방법을 개발함으로써 외화를 절약하고 종돈의 해외 종속성을 낮춰야할 사명을 안고 있다.

종돈업은 종자산업이다. 이제 새로이 맞이한 21세기에서 우수한 유전자원의 확보는 관련된 모든 질적 정보 또는 자원의 결정체라 할 수 있으며, 이것이 종자전쟁을 주도하며 사회·문화적으로 긍지를 갖는 초석이 될 것이다. 따라서 이러한 산업의 육성과 그를 위한 체계적인 연구가 요구되는데, 본 연구는 세계적으로 종돈육종의 생산적 측면에서 비효율적인 지방량 감소와 외국에서 인기가 높은 등심량 증대 및 번식능력 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

1. 연차별 연구개발 목표

Table 1-1. Yearly objectives

Year	Objectives
1st (1999)	<ul style="list-style-type: none"> • Cloning of the entire pALS coding sequence • GH injection and liver sample collection in market barrows • Establishment of pALS pro- and eucaryotic expression systems • Establishment of IGF-I & -II, IGFP-3 RIAs • Collection of bloods and records from experimental animals <ul style="list-style-type: none"> - for the study of growth traits: ≥ 30 litters - for the study of reproduction traits: 60 gilts
2nd (2000)	<ul style="list-style-type: none"> • Characterization of developmental, GH-dependent and tissue-specific ALS gene expression: Northern analysis and RPA • Biochemical characterization of recombinant pALS • pALS antiserum production and RIA development • RIAs of IGF system components for blood samples • Analysis of correlations between economic traits and blood concentrations of the IGF system components • Estimation of the breeding value for blood concentrations of the IGF system components

2. 연구 내용 및 범위

가. pALS genomic DNA cloning과 생체 조직에서의 발현 특성

1) pALS cloning

Genomic DNA를 template로 하여 PCR 방법으로 ~800, 1,000-bp 및 ~1200-bp 3 개의 overlapping DNA fragments를 증폭하고, 증폭된 DNA 단편을 plasmid vector에 삽입하여 sequencing

2) ALS 유전자의 생체 조직에서의 발현 특성

가) 성장발달에 따른 ALS gene expression

- (1) 태아에서 성돈에 이르기까지 간 시료를 채취하여 RNA 추출
- (2) 1)에서 얻은 genomic DNA 단편을 probe로 Northern analysis

나) ALS 유전자 발현의 성장호르몬 의존성

거세 비육돈에 1일 혹은 1주일간 성장호르몬을 주사하고 간 시료를 채취하여 가)에서와 같이 Northern analysis 수행

다) ALS 유전자 발현의 조직 특성

성돈의 여러 조직에서 RNA를 추출하고 ~300-nucleotide ALS RNA probe를 이용하여 solution hybridization/RNase protection assay로 조직별 ALS 유전자발현의 유무와 상대적 수준 측정

나. pALS expression과 항혈청 생산

1) pALS expression

가) “가”에서 얻은 overlapping pALS genomic DNA fragments를 다시 in-frame되게 PCR로 증폭하여 annealing

나) Plasmid vector에 삽입시켜 pALS의 모든 coding sequence 확보

다) pALS coding sequence를 plasmid expression vector와 baculovirus system을 이용하여 expression

라) Expressed pALS의 \pm IGF-I하에서 IGFBP-3와의 결합 특성 구명

2) Recombinant pALS를 토끼에 주사하여 항혈청 생산

다. IGF system components의 RIAs 개발과 이용

1) RIAs 개발

가) Acid-ethanol extraction procedure를 이용하여 혈장시료의 IGF-BPs를 제거하고 double-antibody procedure로 IGF-I &

-II RIAs 확립

나) 본 연구진에 의해 생산된 pIGFBP-3 항혈청을 이용하여 double-antibody RIA procedure 개발 및 validation

나) “나”에서 알려진 pALS 항혈청을 이용하여 RIA 개발

2) IGF system components의 혈중농도와 종돈의 경제형질과의 상관분석

가) 성장형질과의 상관분석

Landrace, Yorkshire, Duroc 품종별 생체중 25, 60 & 100kg시 IGF system components의 혈중농도와 100kg까지의 일당증체량 및 100kg시 등지방두께, 등심단면적 및 정육률과의 상관분석

나) 번식형질과의 상관분석

Landrace와 Yorkshire 미경산돈 각각 30두씩 임신 90일과 분만 후 15일 시점의 IGF system components의 혈중농도와 산자수 및 총이유자돈체중과의 상관분석

제 2 장 ALS Genomic DNA Cloning과 생체 조직의 ALS 유전자 발현 특성 구명

제 1 절 서 설

Acid-labile subunit(ALS)는 ~85-kDa의 glycoprotein으로서 40~45-kDa의 IGF-binding protein-3(IGFBP-3)와 7.5-kDa의 IGF와 함께 혈중에 존재하는 150-kDa ternary IGF complex의 구성요소이다(Rechler와 Clemmons, 1998). ALS는 그 자체로서 IGF를 결합하는 성질은 없으나 IGF:IGFBP-3 혹은 IGF:IGFBP-3(Twig와 Baxter, 1998)와 결합하여 ternary complex를 형성하는데 혈중 2/3 이상의 IGF-I과 IGF-II는 IGF:IGFBP-3:ALS ternary complex 상태로 존재한다. 150-kDa ternary complex에 결합된 IGF는 혈중에 존재하는 IGFBP-3-specific protease activity에 의해 IGFBP-3가 ternary complex 내에서 부분분해(limited proteolysis)되면서 서서히 방출되어(Lee와 Rechler, 1996) 조직으로 확산된다. 따라서 ALS는 혈중 IGF의 plasma half-life를 높이는 저장체 역할을 함으로써 IGF의 bioavailability를 극대화하는 기능을 가진다(Ueki 등, 2000).

본 연구가 착수될 당시 ALS에 대한 연구는 지극히 제한적이었다. ALS cDNA와/혹은 genomic DNA가 cloning된 종은 인간(Leong 등, 1992), 쥐(Dai와 Baxter, 1992; Boisclair 등, 1996; Delhanty와 Baxter, 1997) 및 baboon(Delhanty 와 Baxter, 1996)이 고작이었고, 가축에서의 cloning은 전무한 상태였으나 본 연구 수행중 Rhoads 등(2000)에 의해 양의 ALS genomic DNA가 cloning되었다. 따라서 가축에서의 ALS DNA cloning은 그 자체로서도 충분한 학술적 가치가 부여된 상태였다. 본 연구가 시작되기 전 연구책임자는 돼지(porcine) ALS(pALS) cDNA를 cloning하기 위해 시판 porcine liver cDNA

library를 구입하여 screening을 시도하였으나 cDNA library 자체의 신빙성이 없어 환불받는 사태까지 있었고, 차선의 방법으로 reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) 방법과 ALS protein의 모든 coding sequence(~1.75 kb)가 들어있는 ALS gene의 exon 2 부위를 genomic DNA를 template로 하여 PCR 방법으로 증폭을 시도하였으나 이 또한 증폭부위가 너무 길어 성공적이지 못하였다. 따라서 이와 같은 예비실험에서의 실패를 거울삼아 본 실험에서는 돼지 genomic DNA를 template로 하여 pALS의 coding sequence를 ~800-bp, ~1000-bp 및 ~1,200-bp 세 개의 overlapping fragments로 증폭하여 cloning하였다.

실험동물과 인간에서 ALS는 IGF-1 및 IGFBP-3와 같이 성장호르몬 (growth hormone: GH)의 자극에 의해 주로 간에서 분비되기 때문에 간의 ALS mRNA 수준과 혈중 ALS protein 농도는 생후 GH receptor의 출현과 함께 증가한다(Baxter와 Dai, 1994; Dai와 Baxter, 1994). 쥐에서의 연구 결과에 의하면 ALS는 거의 전적으로 hepatocyte에서만 발현되는 것으로 보고되었으나 (Chin 등, 1994), 과연 타 종에서도 쥐에서와 같이 ALS 유전자가 간에서만 특이하게 발현되는지의 여부는 알려지지 않았기 때문에 본 연구에서는 pALS 유전자 발현의 성장호르몬 의존성과 조직적 특이성을 검사하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. PCR 방법에 의한 pALS genomic DNA 증폭

가. PCR primers

PCR primers는 인간과 쥐의 ALS cDNAs 중 잘 보존된 부위를 택하여 아래와 같이 합성하였다; F는 forward를 의미하고, R은 reverse를 의미하며,

3' 다음의 number는 hALS cDNA numbering을 기준으로 한 nucleotide number를 의미한다: 665F, 866F 및 996R primers는 Dr. Y. R. Boisclair(Cornell University)로부터 제공받았다: 304F primer, 303R primer 및 305R primers의 밑줄친 부위는 각각 pGem-3Z plasmid vector에 cloning하기 위한 Eco RI과 Bam HI sites 및 reverse termination codon이다: 665F, 866F 및 305R은 degenerate primers이다 .

304F: 5'-agctgaattcctgggtggcactgggcc-3' 120

665F: 5'-agctgganctgagcaggcg-3' 739

866F: 5'-tggttgacctgtcncacaaccg-3' 885

303R: 3'-tcggacctcgggtgtccgcctaggctga-5' 406

996R: 3'-gtgaaggacctcctngacgtcga-5' 1018

305R: 3'-gkgtraaacrmgkgacgactg-5' 1875

나. PCR 증폭

1) PCR 증폭

아래와 같은 조건하에서 pALS genomic DNA 부위를 PCR로 증폭하였다.

- Template: porcine genomic DNA 0.2 μ g
- Primer pairs: 304F-996R pair, 665F-305R pair 및 866F-305R pair 각각 25pmol/primer
- Buffer: PCR Optimizer kit(Invitrogen, San Diego, CA, USA)의 A buffer [60mM Tris-HCl, pH 8.5; 25mM (NH₄)₂SO₄; 1.5mM Mg²⁺], 총 50 μ l
- Polymerase: High-fidelity *Taq* polymerase(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 1U
- Thermal cycle: 95 °C 5분 → (95 °C 1분→55 °C 1분→70 °C 2분) × 30 →

70 °C 10분

2) PCR product 정제: Wizard DNA Purification Kit(Promega, Madison, WI, USA) 이용

3) Cloning

- TA-cloning plasmid vector에 ligation & transformation: TA Cloning Kit pCR2.1 이용(Invitrogen)
- Base sequencing: dideoxy chain termination 방법(Sanger 등, 1977)
- Nucleotide sequence 비교: NCBI의 Blast program 이용

2. 간의 ALS 유전자 발현의 GH 의존성

가. GH 처리

- 생체중 100~115kg의 거세비육돈을 170 μ g/kg 생체중의 porcine somatotropin(pST; LG 화학, 대전)을 어깨부위에 근육 주사 후 2시간 뒤에 도축하거나 100 μ g pST/kg 생체중을 매일 1주일간 주사하고 6시간 후 도축
- 도축시 간 시료를 채취하여 액체질소에 넣어 급속냉동시킨 다음 RNA 추출시 까지 -70 °C에 보관

나. RNA 추출

Modified guanidinium thiocyanate 방법(Puissant와 Houdebine, 1990) 방법으로 total RNA 추출

다. Northern blot 분석

- 30 μ g total RNA를 1.5% agarose/2.2M formaldehyde gel 전기영동(Lee 등, 1993b)
- TurboBlotter(Schleicher & Schuell, Biotrans, ICN, Irvine, CA, USA)를

이용하여 capillary transfer

- ~1200-bp pALS genomic DNA 단편을 random priming kit(Life Technologies, Gaithersburg, MA, USA)를 이용하여 ³²P-labeling
- Membrane을 42 °C에서 overnight incubation 후 washing(Lee 등, 1993b)

3. ALS 유전자의 조직 발현 특성

가. Northern blot 분석

임신 75과 112일 모든 1두씩을 도축하여 태아의 간을 적출하고, 초기 임신돈을 도축하고 다수의 모든 조직을 채취하여 위에서와 같이 RNA를 추출하고 Northern blot 분석

나. Solution hybridization/RNase protection assay(RPA)

1) probe 제작

- 성돈의 간으로부터 추출한 poly(A)⁺ RNA를 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) kit(Invitrogen)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 304F-303R primer pair를 이용한 PCR로 303-bp cDNA 단편 합성
- 303-bp PCR product를 agarose gel 전기영동 방법으로 정제하여 pGem-3Z plasmid vector에 삽입
- 303-bp insert를 포함하는 plasmid vector 0.5μg을 Eco RI으로 절단
- SP6 promoter와 50μCi [³²P]UTP를 이용하여 *in vitro* transcription(Choi 등, 1995)
- DNase I 처리 → Sephadex G-50 gel filtration(free nucleotide 제거)

2) RPA

- 5μg poly(A)⁺ RNA를 4 × 10⁵ cpm ³²P-antisense riboprobe와 45 °C에서

overnight incubation

- RNase 처리 → phenol/chloroform extraction → ethanol precipitation
→ 7.1M urea/6% polyacrylamide gel electrophoresis → autoradiography

제 3 절 결과 및 고찰

1. pALS genomic DNA cloning

가. Cloning

Genomic DNA를 template로 하고 304F-996R, 665F-305R 및 866F-305R primer pairs를 이용하여 각각 915-bp, 1015-bp 및 1158-bp 3 개의 overlapping fragments를 증폭하고 cloning하였다. 이들 3 개의 단편은 ALS cDNA의 중앙부위 155-bp를 공유하고, overlapping 부위를 제외한 총 길이는 1775-bp이었다(Fig. 2-1).

나. pALS genomic DNA sequence의 주요 내용

- Human, rat, mouse 및 baboon ALS cDNAs와의 염기서열 상동성: 84, 79, 79 & 84%
- Human, rat, mouse 및 baboon ALS와의 아미노산서열 상동성: 81, 77, 78 & 79%
- Central domain에 연속되는 20개의 leucine-rich repeats: conserved
- NH₂-terminal domain의 4개의 cysteine residues: conserved
- Human, rat & baboon ALS proteins의 COOH-terminal에 보존된 4개의 cysteine residues: pALS는 앞부분의 2개 cysteine residues가 없음
- pALS는 hALS 및 rALS보다 각각 1개 및 2개의 amino acid residues가 많다.

304F															
C	W	V	A	L	G	P	C	■	L	A	G	T	E	18	
ccc	ggg	gcg	cca	tog	gac	gcc	gag	ggc	ctg	ccg	tgc	ccg	gct	60	
P	G	A	P	S	D	A	E	G	L	P	C	P	A		
gcc	tgc	tcc	tgc	ggc	cac	gac	gac	tac	acg	gac	gag	ctc	agc	102	
A	C	S	C	G	H	D	D	Y	T	D	E	L	S		
gtc	ttc	tgc	agc	tcc	cgg	aac	ctc	acg	cag	ctg	ccc	gac	ggc	144	
V	F	C	S	S	R	N	L	T	Q	L	P	D	G		
atc	cca	gac	gcc	gcc	agg	gcc	ctg	tgg	ctg	gac	agc	aac	aac	186	
I	P	D	A	A	R	A	L	W	L	D	S	N	N		
ttc	tcc	tcc	gtc	ccc	gcg	ggg	gct	ttc	cgc	aac	ctc	tcc	agc	228	
F	S	S	V	P	A	G	A	F	R	N	L	S	S		
ctg	ggc	ttc	ctc	aac	ctg	cag	ggc	agc	ggc	ctg	gcc	agc	ctg	270	
L	G	F	L	N	L	Q	G	S	G	L	A	S	L		
303R															
gag	ccg	cag	gcg	ctg	ctg	ggc	ctg	cag	aac	ctg	tac	cac	ctg	312	
E	P	Q	A	L	L	G	L	Q	N	L	Y	H	L		
cac	ctc	gaa	cgg	aac	cag	ctg	cgc	agc	ctg	gcg	gcc	cac	acc	354	
H	L	E	R	N	Q	L	R	S	L	A	A	H	T		
ttc	ctg	cac	acg	ccg	ggc	ctg	gcc	tca	ctc	ggc	ctc	cac	aac	396	
F	L	H	T	P	G	L	A	S	L	G	L	H	N		
aac	ctg	ctc	agc	cgg	gtg	gag	gag	ggc	ctc	ttc	cag	ggc	ctg	438	
N	L	L	S	R	V	E	E	G	L	F	Q	G	L		
acc	aac	ctc	tgg	gac	ctc	aac	ctg	ggc	tgg	aac	agc	ctg	gcc	480	
T	N	L	W	D	L	N	L	G	W	N	S	L	A		
gtg	ctg	cct	gac	act	gcg	ttc	cat	ggc	ctg	gcc	aac	ctg	cgg	522	
V	L	P	D	T	A	F	H	G	L	A	N	L	R		
gag	ctg	gtg	ctg	gcc	ggc	aac	aag	ctg	acc	tac	ctg	cag	ccc	564	
E	L	V	L	A	G	N	K	L	T	Y	L	Q	P		
665F															
gcg	ctc	ttc	tgc	ggc	ctg	ggc	gag	ctg	cgc	gag	ctg	gac	ctg	606	
A	L	F	C	G	L	G	E	L	R	E	L	D	L		
agc	agg	aac	gcc	ctg	cgg	agc	gtc	aag	gcc	aac	gtc	ttc	gtc	648	
S	R	N	A	L	R	S	V	K	A	N	V	F	V		
aag	ctg	ccc	aag	ctc	cag	aag	ctg	tac	ctg	gac	cac	aac	ctg	690	
K	L	P	K	L	Q	K	L	Y	L	D	H	N	L		
ctg	gcc	gcc	gtg	gcc	ccg	ggc	gcc	ttc	ctg	ggc	atg	aag	gcc	732	
L	A	A	V	A	P	G	A	F	L	G	M	K	A		
866F															
ctg	cgc	tgg	ctg	gac	ctg	tcc	cac	aac	cgc	gtg	ggg	ggc	ctc	774	
L	R	W	L	D	L	S	H	N	R	V	G	G	L		
ctg	gag	gac	acg	ttc	ccc	ggc	ctg	ctg	ggc	ctg	cat	gtc	ctg	816	
L	E	D	T	F	P	G	L	L	G	L	H	V	L		
cgc	ctg	gcg	cac	aat	gcc	ctc	gcc	agc	ctg	cgg	ccc	cgc	acc	858	
R	L	A	H	N	A	L	A	S	L	R	P	R	T		
996R															
ttc	aag	gac	ctg	cac	ttc	ctg	gag	gat	ctg	cag	ctc	ggc	cac	900	
F	K	D	L	H	F	L	E	D	L	Q	L	G	H		
aac	cgc	ctc	cgg	cag	ctg	ccc	gag	aag	gcc	ttc	gag	ggc	ctg	942	
N	R	L	R	Q	L	P	E	K	A	F	E	G	L		
ggc	cag	ctg	gag	gtg	ctc	gcg	ctc	aat	gac	aac	cag	atc	cag	984	
G	Q	L	E	V	L	A	L	N	D	N	Q	I	Q		
gag	atc	aag	gca	ggc	gcc	ttc	ctg	ggc	ctc	ttc	aac	gtg	gcc	1026	
E	I	K	A	G	A	F	L	G	L	F	N	V	A		
gtc	atg	aac	ttg	tct	ggc	aac	tgc	ctg	cgg	aac	ctg	ccg	gag	1068	
V	M	N	L	S	G	N	C	L	R	N	L	P	E		
cag	gtc	ttc	cgg	ggc	ctg	ggc	aag	ctg	cac	agc	ctg	cac	ctg	1110	
Q	V	F	R	G	L	G	K	L	H	S	L	H	L		
gag	cac	agc	tgc	ctg	ggc	cgc	gtc	ggc	ctg	cac	acc	ttc	gcc	1152	

2. 성장발달과 GH 투여에 따른 간의 ALS 유전자 발현

Northern blot 분석 결과 임신 75일 태아의 간에서는 ALS mRNA가 검출되지 않았으나 112일 태령의 간에서는 낮은 수준의 2.2-kb ALS mRNA가 검출되었고 출하돈에서는 훨씬 높은 수준이 검출되었다. 이 같은 ALS 유전자 발현 양상은 성장발달에 따른 GH receptor 발현양상(Breier 등, 1989)과 매우 흡사한 결과로서 ALS 유전자가 GH에 의해 up-regulation됨을 간접적으로 시사한다.

출하 거세돈에서 생리학적 수준 보다 높은($170\mu\text{g}/\text{kg}$ 생체중) 수준의 GH를 주사한 후 2시간 뒤 간의 ALS mRNA abundance는 증가하지 않았다(Fig. 2-2). 본 보고서에는 제시하지 않았으나 IGF-I의 혈중농도 또한 GH 주사에 의해 변하지 않았다. 그러나 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 생체중의 GH를 1주일 동안 매일 1회씩 주사하고 6시간 뒤에 도축한 비육돈 간의 ALS mRNA abundance는 vehicle(saline)을 주사한 돼지의 mRNA 수준보다 현저히 높았다. 이 두 결과를 종합하면 간의 ALS 유전자 발현은 GH에 의해 up-regulation되나, ALS 유전자 발현이 높아지기 위해서는 GH의 지속적인 자극이 필요하거나 GH의 자극 후 2시간 이상의 lag time이 필요한 것으로 해석된다.

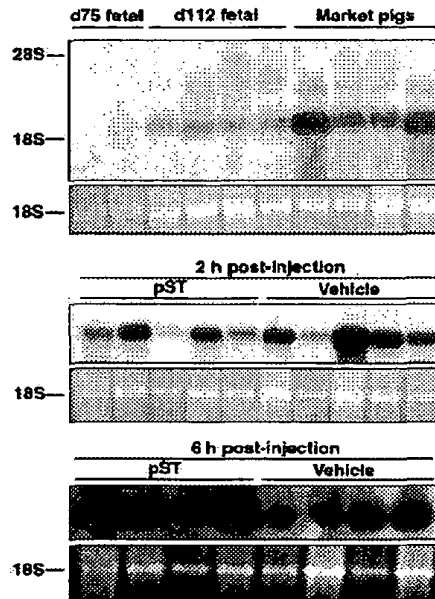


Fig. 2-2. Northern blot analysis of hepatic ALS mRNA abundance during development and in response to pST. Top panel. Ten micrograms of total RNAs extracted from days 75 and 112 fetal livers and castrated male pigs weighing ~100kg (market pigs) were electrophoresed, transferred to a nylon membrane and hybridized with a ^{32}P -labeled 1158-bp pALS genomic DNA fragment. Middle panel. Market pigs weighing ~115kg received a single injection of pST (or saline) at a dose of $170\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (BW), after which liver samples were taken at slaughter 2 h after the injection. The effect of pST was not significant ($P > 0.05$; means \pm SE of the 2.2-kb ALS mRNA band intensity were 9.4 ± 2.6 and 15.9 ± 4.2 for the pST-injected and saline-injected groups, respectively, by an arbitrary densitometric unit). Bottom panel. Market pigs (~100kg) received a daily intramuscular injection of $100\mu\text{g}$ pST/kg BW for 7 days and liver samples were taken 6 h after the last injection. The effect of pST injection on the 2.2-kb ALS mRNA abundance was significant ($P < 0.05$; 36.0 ± 4.7 vs 21.9 ± 1.2 for the pST-injected vs saline-injected group).

3. ALS 유전자 발현의 조직 특성

성돈에서 Northern blot analysis에 의해서는 간 이외의 조직에서 ALS mRNA가 검출되지 않았다(Fig. 2-3). Northern 분석은 여러 개체를 대상으로 수 차례 반복해 보았으나 ALS mRNA는 단지 간에서만 검출되었다. 이러한 결과를 좀 더 확인하기 위해 antisense riboprobe를 이용하여 Northern blotting보다 감도가 높은 RNase protection assay(RPA)를 수행한 결과는 Northern 분석 결과와는 다소 달랐다. RPA에서도 Northern 분석에서와 같이 간에서 가장 높은 수준의 ALS mRNA가 검출되었으나, 근육, 난소, 비장 및 자궁에서도 낮은 수준의 ALS mRNA가 검출되었고, 신장, 폐, 수란관 및 태반은 RPA에서도 ALS mRNA가 검출되지 않았다(Fig. 2-4).

Northern 분석에 의해 간 이외의 조직에서 ALS mRNA가 검출되지 않았던 본 연구 결과는 쥐(Dai와 Baxter, 1994)와 baboon(Delhanty와 Baxter, 1996)에서의 결과와도 일치한다. 그러나 본 연구의 RPA 결과는 쥐 조직의 *in situ* hybridization 실험에서 hepatocyte 이외의 조직에서는 ALS mRNA가 검출되지 않았다는 보고(Chin 등, 1994)와는 다소 대치된다. 따라서 본 연구의 RPA 결과는 아마도 돼지는 쥐와는 달리 간 이외의 조직에서도 ALS 유전자가 발현됨을 시사하며, 그렇다면 적어도 돼지에서는 ALS가 전격적으로 plasma protein이라는 통념과는 달리 말초조직에서도 IGF 혹은 IGFBP와 무관한 생물학적 기능이 있을 가능성을 시사하므로 앞으로 본 PRA 결과의 확인 실험과 ALS protein의 분포 및 미지의 ALS 기능에 대한 추가 연구가 요망된다.

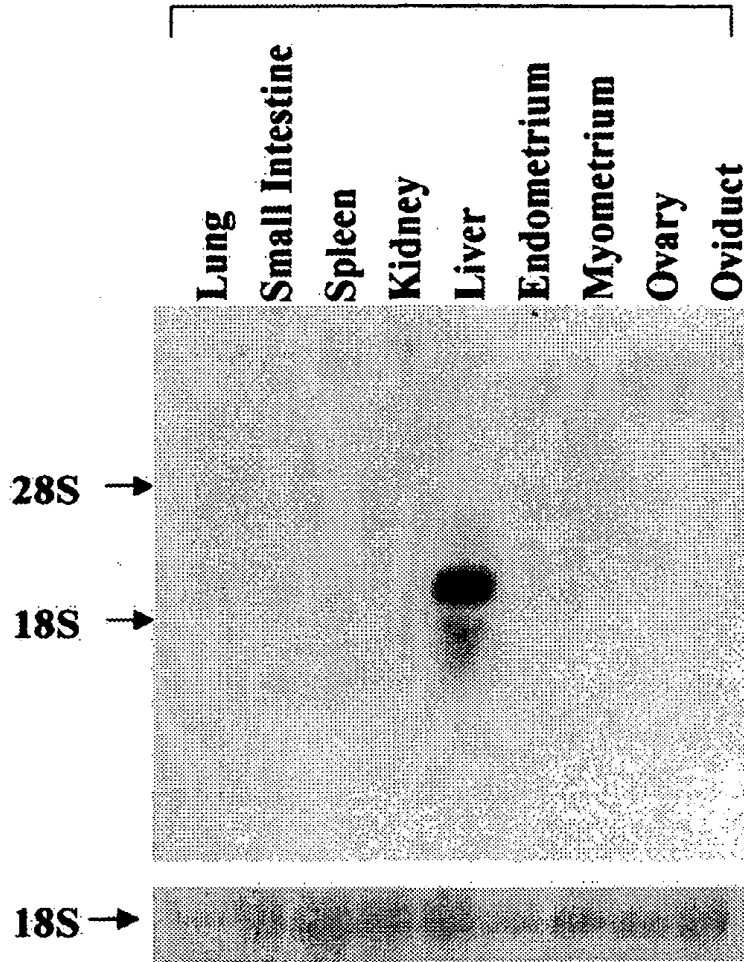


Fig. 2-3. Northern blot analysis of ALS mRNA in adult pig tissues. Total RNAs ($30\mu\text{g}/\text{lane}$) extracted from the indicated internal organs/tissues and reproductive tissues of a pig in early pregnancy were hybridized with the ^{32}P -labeled 1158-bp pALS DNA fragment after electrophoresis and transfer to a nylon membrane. The positions of the 28S and 18S rRNAs and ethidium bromide-stained 18S rRNAs are shown on the left and at the bottom of the blot, respectively. A representative result only is shown in this figure.

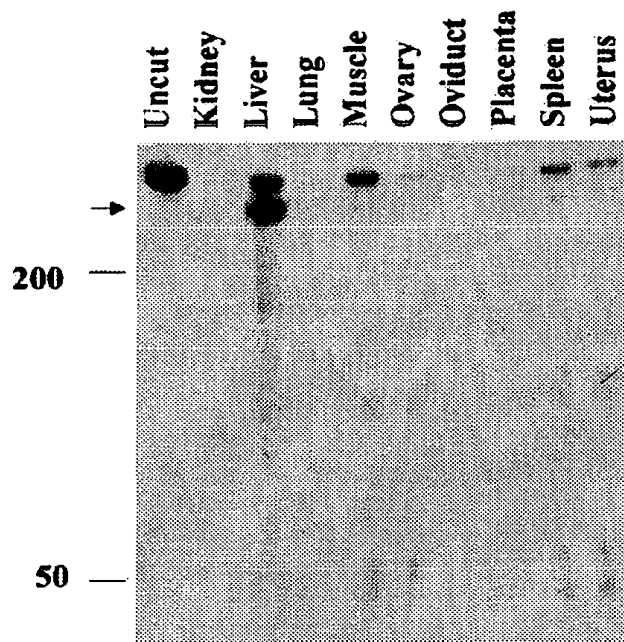


Fig. 2-4. RNase protection assay of ALS mRNA in adult pig tissues. A 303-bp pALS cDNA fragment that had been obtained by RT-PCR of liver RNA using 304F and 303R primers was inserted into the Eco RI and Bam HI sites of the pGem-3Z plasmid. After linearization of the plasmid by Eco RI digestion, a 367-bp nucleotide antisense RNA, including a 64-nucleotide vector sequence, was synthesized by *in vitro* transcription using the SP6 promoter and [³²P]UTP. Pooled poly(A)⁺ RNAs (5μg/lane) extracted from market pig tissues were incubated with 4×10^5 cpm of the ³²P-labeled antisense riboprobe, followed by RNase digestion, 7.1M urea/6% polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. The position of size markers and a 303-nucleotide protected band(*arrow*) are indicated on the left of the autoradiogram. In the 'Uncut' lane, undigested, 367-nucleotide antisense RNA (3×10^3 cpm) was loaded.

제 3 장 ALS Expression과 항혈청 생산

제 1 절 서 설

Acid-labile subunit(ALS)는 insulin-like growth factor-binding protein-3(IGFBP-3)의 'secondary BP'로서 후자와 함께 혈중 2/3 이상의 IGF와 150-kDa ternary complex를 형성하여 IGF의 혈중 반감기(plasma half-life)를 높임으로써 IGF의 bioavailability를 극대화하는 기능을 가진 물질이다(Baxter 등, 1989; Ueki 등, 2000). 생화학적으로 ALS는 ~65-kDa의 peptide core와 ~20kDa에 상당하는 당잔기(carbohydrate residues)를 가진 당단백질(glycoprotein)이다. 일반적으로 당단백질의 당잔기는 단백질 자체의 고유기능을 좌우하기보다는 단백질의 half-life를 높이고 표적물질을 인지하는데 필요한 부위로 알려져 있으나 ALS protein의 당잔기에 대한 역할은 명확치 않다.

세계적으로 ALS에 대한 연구는 영장류와 실험동물에서만 cDNA와/혹은 genomic가 cloning되었고(이, 2000), 본 연구가 착수된 후 양의 ALS genomic DNA가 cloning(Rhoads 등, 2000)되었을 뿐 가축에서의 ALS 연구는 전무한 실정이었다. ALS protein에 있어서는 단지 Baxter group 연구자들 Baxter, 1990; Baxter와 Dai, 1994)과 Lee와 Rechler(1995b)에 의해 인간과/혹은 쥐의 ALS protein을 혈청으로부터 정제하여 항혈청을 생산한 것이 고작이다. 따라서 본 연구에서는 2장에서 cloning된 돼지(porcine) ALS(pALS) genomic DNA의 coding sequence 단편들을 in-frame되게 PCR-증폭한 후 annealing시켜 pALS expression construct를 만들고 procaryotic(*E. Coli*) & eucaryotic(baculovirus expression system) recombinant pALS protein을 생산하여 당잔기의 유무에 따른 IGFBP-3와의 결합 특성을 구명하고 pALS의 항혈청을 생산하고자 착수되었다.

제 2 절 Procaryotic expression

① ALS coding sequence 단편의 절단 및 연결

제 2 장에서 설명한 pALS genomic DNA clones는 pCR 2.1 TA-cloning vector에 들어있는 5'-side 915-bp ALS coding sequence와 3'-side 1,015-bp 및 1,058-bp ALS coding sequence 단편들로 이들중 3'-side 단편들은 180-bp 정도가 겹치는데 이 겹치는 부위에 Nsp I restriction site가 존재함이 확인되었다. (Nearly) full-length ALS coding sequence를 cloning하기 위해 Fig. 3-1과 같이 한 clone은 Bam HI/Nsp I으로 자르고 또 한 clone은 Nsp I/Not I으로 잘라 방출된 partial inserts를 ligation시켜 Bam HI/Not I-cut pBS vector에 ligation시켰다.

② pBS vector에 들어있는 ALS coding sequence insert를 template로 하 full-length coding sequence를 증폭하였다.

5'primer : 5'-CGC-GGA-TCC-ATG-ACG-GAG-CCC-GGG-GCG-CCA-TCG-3'

3'primer : 5'-CGC-GGA-TCC-TCA-CAG-GTC-CAG-GCC-AGA-CAC-AGC-3'

(밑줄은 Bam HI site, translation start site 및 reverse termination codon, ATG 다음 ACG는 mature ALS protein의 다섯 번째 아미노산에 해당)

③ PCR product를 Bam HI digestion 시킨 다음 pGEX-2T expression vector의 Bam HI site에 삽입 후 아래와 같이 Bam HI digestion과 agarose gel 전기영동으로 ~1,700-bp insert를 확인하였다(Fig. 3-2).

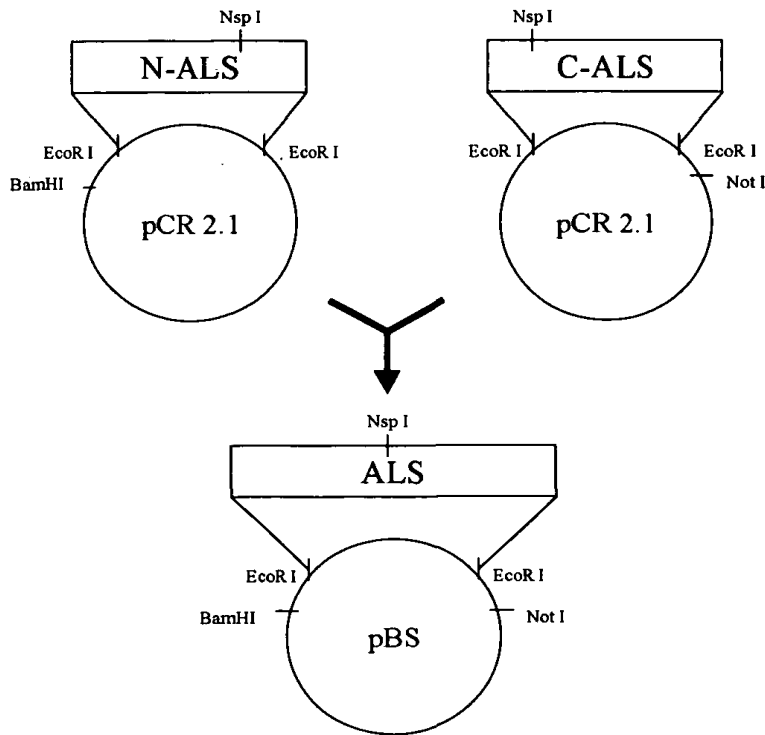


Fig. 3-1. Strategy for cloning a full-length ALS DNA coding sequence. A Bam HI/Nsp I-cut partial insert of a pCR 2.1 clone containing a 915-bp 5'-side ALS coding sequence(*upper left*) and a Nsp I/Not I-cut partial insert of a second clone containing a 1,015-bp 3'-side coding sequence(*upper right*) were ligated and inserted into Bam HI/Not I sites of the pBS vector(*bottom*). DNA insert of coding sequence in each vector is denoted by a box.

④ Expression vector를 BL21(DE3) *E. Coli* cell에 transformation시켜 IPTG 로 induction 하였다.

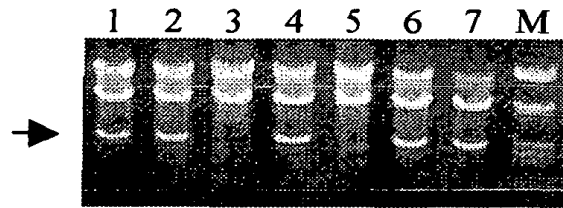


Fig. 3-2. Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of Bam HI-digested pGEX-2T expression vector following insertion of an ALS coding sequence and transformation. Lanes 1-7 and M correspond to colony numbers and DNA size marker, respectively. A ~1,700-bp coding sequence insert is indicated by *arrow* at the left margin.

⑤ Induction

GST-ALS 융합단백질 형태로 expression 되는 pGEX-2T expression vector를 *E. Coli*에 transformation시킨 후 IPTG로 induction하여 procaryotic expression을 조사하였다 (Fig. 3-3). 즉, inoculation 과정을 통해 얻어진 recombinant ALS를 함유한 *E. Coli*. suspension 200 ml을 LB broth 2 l에 넣고 37 °C shaking incubator 에서 3시간 incubation 시킨 후 1 ml을 취해 13,000 rpm에서 2분간 spin down 시켜 얻어진 pellet을 -80°C에 보관하였다(IPTG -). 0.5 M IPTG 1600 μ l를 넣고 다시 3시간 동안 incubation 시킨 후 1 ml을 취해 13,000 rpm, 2분간 spin down 시켜 얻은 pellet을 -80 °C에 보관하고(IPTG +), 나머지 ALS는 4,000 rpm에서 10분간 spin down 시켜 pellet을 취하였다.

⑥ Sonication

Induction 후 취한 pellet에 10× PBS를 넣어 현탁시킨 다음 Ultra sonicator를 이용하여 sonication시킨 후 Triton-X100을 첨가하여 rotator 에서 30분간 incubation 시키고, 4,000 rpm에서 10분간 spin down 한 뒤 상층액만 취하였다.

⑦ ALS-GST fusion protein 발현 확인

ALS 융합단백질을 정제하기 위하여 모아진 *E. Coli* cell lysate의 상층액을 Bio-Rad Protein assay kit을 이용하여 단백질 농도를 측정한 다음 glutathione-Sepharose bead에 단백질 추출물을 넣어준 후 30분간 rotator 에서 incubation 시켰다. 이들 GSH-bead sample을 4,500 rpm에서 5분간 spin down 시켜 pellet을 취한 뒤 10× PBS 로 세척하고 protein용 dye와 10× PBS를 넣고 boiling 한 후 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 3-3).

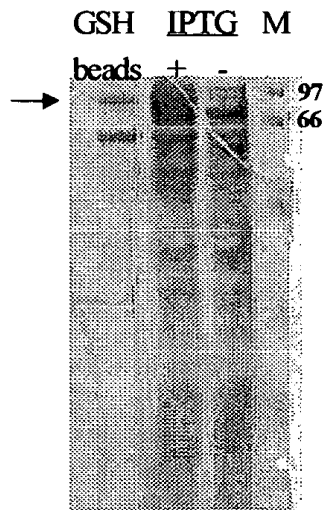


Fig. 3-3. SDS-PAGE and Coomassie staining of GST-ALS fusion protein. After the induction with IPTG, GST-ALS fusion proteins were precipitated by GST-pull down assay(GSH-beads). M denotes protein size marker. Presumptive expressed ALS protein is indicated by *arrow* at the left margin.

⑧ GST-ALS fusion protein 정제: SDS-PAGE & electro-elution

Polyacrylamide gel상의 lane 중에서 protein marker와 IPTG -, + 그리고 GSH-bead sample 중 한 lane만을 cutting하여 Coomassie blue 로 염색시키고 나머지 sample들의 gel 부위는 wrap으로 감싼 후 냉장 보관하였다. 염색을 통해 GSH-bead에 conjugate된 ALS-GST fusion protein의 size를 확인한 다음 staining 시키지 않고 냉장 보관중인 나머지 부분의 gel과 잘 맞추어 원하는 size(92 kDa)의 band 부위만을 gel에서 cutting하였다. 이들 samples들을 electro-eluter (Biorad Model 422)를 이용하여 약 5시간 동안 elution 시켰다. 이렇게 elution된 ALS-GST fusion protein을 다시

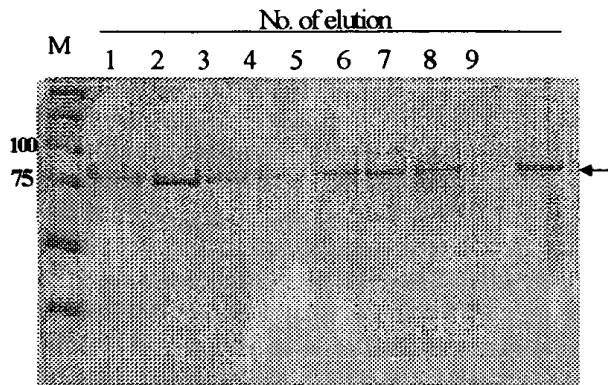


Fig. 3-4. SDS-PAGE and Coomassie blue staining of the GST-ALS fusion protein purified by SDS-PAGE and electro-elution. M indicates protein size marker. Presumptive expressed GST-ALS fusion protein is indicated by *arrow* at the right margin.

SDS-PAGE 시킨 후 Coomassie blue staining 방법으로 확인하였다(Fig. 3-4).

⑨ GST-fusion protein 절단과 ALS 정제

SDS-PAGE와 electro-elution 방법으로 2차 정제된 융합단백질에서 ALS 단백질만을 분리하기 위하여 Factor Xa을 처리하여 ALS-GST 융합단백질을 절단하고 SDS-PAGE와 electro-elution 방법으로 ALS 단백질만을 정제하였다 (Fig. 3-5). ALS의 yield는 100L culture당 약 120 μ g 밖에 되지 않아 ALS의 항혈청 생산을 위해서는 다음 절에 언급되는 eucaryotic expression system을 이용하여 expression시켰다.

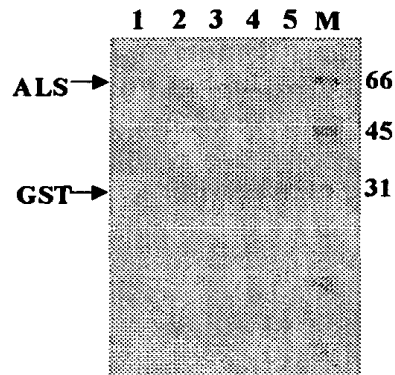


Fig. 3.5. SDS-PAGE and Coomassie blue staining of pALS protein. pALS was purified by cleavage of the GST-pALS fusion protein with Factor Xa followed by SDS-PAGE of the cleaved protein and electro-elution. Lanes 1-5, pALS purified from the GST-pALS fusion protein; M, molecular mass standard.

Fig. 3.5의 ALS band는 PVDF membrane에 transfer한 다음 기초과학지원연구원(대전)에 의뢰하여 NH₂-terminal amino acid 서열을 의뢰하였으나 불행히도 NH₂-terminal이 blocking되어 sequencing이 되지 않았다.

제 3 절 Eucaryotic expression

pBS vector에 삽입한 ALS coding sequence를 pFASTBacHTb transfer vector의 Eco RI site 내로 삽입시켰다. ALS-pFASTBacHTb는 bacmid를 포함하고 있는 DH10_{Bac} competent cell 내로 transformation 한 뒤, DNA recombination에 의해 ALS coding sequence를 포함하는 gene의 일부가 bacmid의 LacZ 내로 insertion되게 하였다. 그리고 나서 recombinant bacmid DNA를 추출하여 Sf9 cell에 transfection시킨 후, recombinant baculovirus를 제조하여 expression시켰다. 다음은 이러한 과정의 세부 절차이다.

- ① ALS coding sequence가 들어있는 pBS vector를 Eco RI으로 잘라내어 pFASTBacHTb vector에 삽입하였다.
- ② pFASTBacHTb vector에 삽입된 insert (ALS)의 orientation을 확인하였다. ALS sequence와 transfer vector내부에 Xho I site가 있기 때문에, Xho I으로 처리한 후 agarose gel electrophoresis상에 나타나는 digestion products의 sizes로 insert의 orientation을 확인하였다. 그 결과, Eco RI으로 처리하였을 때는 pFASTBacHTb vector (4.9kb)와 ALS (1.8kb)의 두 밴드가 나타났고, Xho I으로 처리하였을 때는 orientation이 정확하여 약 6kb 와 650-bp의 두 밴드가 나타났다(Fig. 3-6).

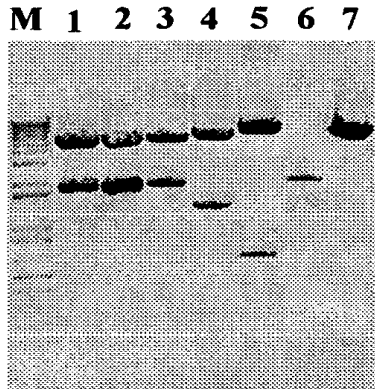


Fig. 3-6. Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of Eco RI-digested pFASTBacHTb vector following insertion of an ALS coding sequence. M, 1kb puls ladder (GIBCO-BRL); lanes 1-3, Eco RI-cut pFastBacHTb-ALS; lane 4, Xho I-cut pFASTBacHTb vector as in lane 2; lane 5, Xho I-cut pFASTBacHTb vector as in lane 4; lane 6, ALS coding sequence; lane 7, linearized pFastBacHTb vector. Note the right orientation of subcloning shown in lanes 3 and 5.

- ③ pFASTBacHTb-ALS vector를 DH10_{Bac} competent cell안으로 CaCl₂ 방법을 이용하여 transformation시킨 후 항생제 (Tet, Gm, Kan)와 X-gal 및 IPTG가 들어있는 Luria-agar plate에 plating하여 blue/white screening을 하였다.
- ④ White colony를 LB broth(containing Kan, Tet, Gm)에 배양하여 Quiagen Large-Construction kit을 사용하여 recombinant bacmid(>150kb)를 추출한 다음 PCR로 recombinant bacmid DNA가 제대로 만들어졌는지 여부를 확인하였다. Fig. 3-7에서 보는 바와 같이 (a)에서는 Blue colonies (Gm⁻, +) 모두 300-bp의 밴드가 났으며, white colony의 경우는 약 4kb에서 밴드가

나와야 하나 white colony의 product size가 너무 커서 PCR이 되지 않았다. (b)에서는 ALS coding sequence를 포함하지 않는 blue colonies 들은 모두 PCR이 되지 않았으며, white colony만이 약 1.5kb에서 band가 나타났다. 이를 통해 recombinant ALS가 vector에 제대로 integration 된 것을

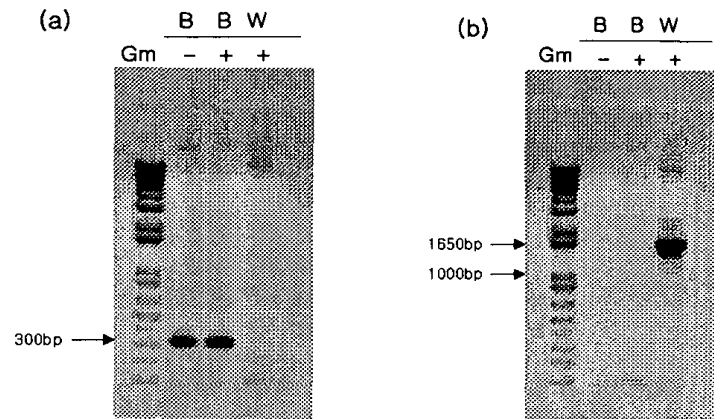


Fig. 3-7. Agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of the recombinant bacmid DNA following PCR reaction showing recombinant bacmid DNA. (a) M13 primer site in pFastBachTb transfer vector was used for PCR reaction. The PCR mixture contained: 10× PCR buffer, 2.5μl; 25mM MgCl₂, 1.5μl; 10mM dNTP, 0.5μl; 10μM primer each, 1μl; template DNA 0.5μg; Taq(5U/μl), 0.25μl; total volume, 25μl. Conditions of the thermal cycle were: 94°C, 30s; 52°C, 45s; 72°C, 1min. B, blue colony; W, white colony. (b) PCR products. The forward primer spans nucleotides #843-862 of the ALS sequence; the M13/puc reverse primer was used as the reverse one. The PCR condition was same as above except for 54°C of annealing temperature.

확인 할 수 있었다.

⑤ Viral stock의 준비.

- P-1 viral stock

1.5×10^6 Sf9 cells를 T25 flask에서 27°C/18h배양→FBS와 antibiotic이 들어있지 않은 Sf900II SFM medium으로 cell washing→recombinant bacmid DNA 12 μ g을 transfection시켜 27°C/5h 배양→FBS와 antibiotic이 첨가된 Sf900II SFM으로 교환하여 27°C/72h 배양→virus가 들어있는 상등액을 수거하여 -80°C에 보관하였다.

-P-2 , P-3 와 P-4 viral stocks

새로운 Sf9 cell culture에 p-1 viral stock을 접종하여 배양한 뒤 상등액을 수거하였다. P-3와 P-4 viral stock 제조 방법은 위의 방법과 동일하였다. Sf9 cell culture 및 viral stock의 제조는 TNF-FH insect medium을 사용하였다.

⑥ Small scale expression 및 recombinant baculovirus의 확인

Recombinant virus가 제대로 생성되었는지 확인하기 위해서 2×10^6 개의 Sf9 cell이 seed된 T25flask에 3차 virus를 0.25ml infection시키고, 2일간 27°C에서 배양한 뒤 harvest하였다. 이때 serum과 antibiotic이 첨가되지 않은 TNM-FH medium 또는 Sf900II SFM insect medium을 사용하였다. 배양 후 pellet을 lysis buffer[50mM Tris-HCl(pH8.0), 5mM 2-mercaptoethanol, 100mM KCl, 1mM PMSF, 1% IGEPAL CA-630]으로 lysis시켜 준 뒤, ALS를 포함하고 있는 상등액을 취하여 western blotting으로 확인하였다(Fig. 3-8). 두 종류의 medium (TNM-FH medium과 Sf900II SFM

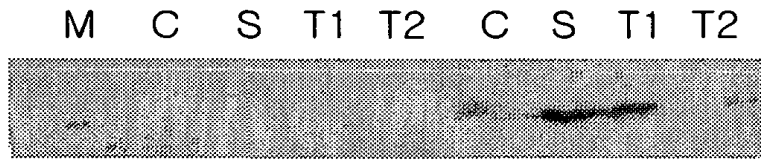


Fig. 3-8. Western blotting of recombinant GST-pALS fusion protein. Primary antibody against the His-tag was used (1:300) in this blotting. M, molecular mass marker; lanes 1-4, 3× sample buffer(total loaded amount of protein: 93.93 μ g); lanes 5-8, 2× sample buffer (70.45 μ g protein loaded). C, control(no virus infection); T1 and T2, Sf9 cells cultured in TNM-FH insect medium; S, Sf9 cells cultured in Sf900II SFM medium.

insect medium)중 어떤 것을 사용하여도 단백질 발현에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었으며, T2의 경우는 RIPA buffer를 사용하여 lysis 시킨 결과이다. RIPA buffer의 경우 protein에 영향을 준 것 같으며, 3× sample buffer를 사용한 sample의 경우 이 buffer가 protein에 영향을 주어서 밴드가 나타나지 않은 것으로 생각된다.

ALS protein의 발현을 scale-up 하기 위해, 우선 small scale에서 protein의 발현 정도를 확인했다. 4차 virus를 제조한 후, 2×10^6 개의 Sf9 cell이 seed된 T25 flask에 각각 0.1ml, 0.25ml, 0.5ml의 4차 virus를 infection시켰다. 2일 배양후, harvest하여 lysis시킨 다음, western blotting을 하였다(Fig. 3-9). Primary antibody를 1:200으로 secondary

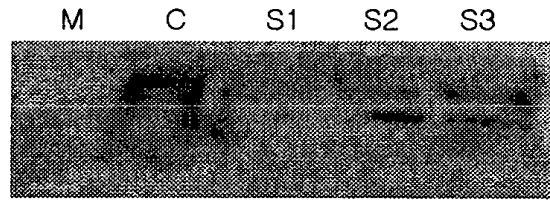


Fig. 3-9. Western blotting of the GST-pALS fusion protein using the His-tag primary antibody. The fusion protein used in this experiment was produced from the Sf9 cell culture following viral infection of varying extents. M, molecular mass standard; C, control(no virus infection); S1, 0.1ml of p-4 viral stock; S2, 0.25ml of p-4 viral stock; S3, 0.5ml of p-4 viral stock.

Ab를 1:1000으로 사용하였다. 5% non-fat milk를 blocking solution으로 사용하였으며, TBS-T buffer로 10분간 3번씩 washing하였다. 그 결과, 4차 virus를 0.25ml infection하였을 때 발현정도가 가장 높은 것을 알 수 있었다.

⑦ Large scale expression

ALS가 expression되고 있음과 최적의 expression을 위한 4차 viral stock의 양이 T25 flask에서 0.25ml임을 확인하였기 때문에 large scale을 위한 T75 flask에서는 T25 flask의 세배인 0.75ml의 4차 바이러스를 infection 시켜서 large scale expression을 하였다. Large scale로 ALS protein을 발현시키기 위해서, $6\sim7\times 10^6$ Sf9 cells을 T75 flask에 seed하였다. 18 시간 후에 serum과 antibiotic이 없는 10ml의 TNM-FH medium을 첨가하고,

0.75ml의 4차 recombinant baculovirus로 infection하였다. 2일동안 27℃에서 배양시킨 후 harvest하였다. Pellet은 lysis buffer[50mM Tris-HCl(pH 8.5), 5mM 2-mercaptoethanol, 100mM KCl, 1mM PMSF, 1% IGEPAL CA-630, 10µg/ml leupeptin, 10µg/ml pepstatin, 10µg/ml aprotinin at 4℃]로 lysis한 다음, 10분 동안 12,000 rpm에서 centrifuge하여 cell debris를 제거하였다. Ni-NTA resin 1ml이 packing된 column(Bio-Rad)에 위에서 얻은 sample을 부어준 다음 ALS protein을 정제하였다. Buffer A[20mM Tris-HCl(pH8.5), 500mM KCl, 20mM imidazole, 5mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, at 4℃] 와 B[20mM Tris-HCl(pH8.5), 1M KCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol at 4℃], 로 washing 시킨 다음 elution buffer[20mM Tris-HCl(pH8.5), 100mM KCl, 100mM imidazole, 5mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol at 4℃]로 elution하여 fraction당 1.5ml씩 받았다. Fig. 3-10은 eluted protein을 SDS-10% PAGE한 다음 Coomassie blue staining을 시킨 결과이다. Fractions 7-12에서 ALS band가 검출되었다.

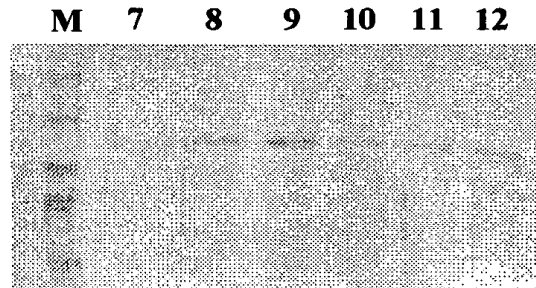


Fig. 3-10. Coomassie staining of GST-pALS fusion protein following SDS-PAGE. Numbers on top of the figure correspond to fraction numbers of the eluted protein from the Ni-NTA column. M, molecular mass standard.

제 4 절 항혈청 생산

Eucaryotic GST-pALS fusion protein을 전술한 바(Lee와 Rechler, 1996)와 같이 New Zealand White rabbit에서 아래와 같은 절차에 의해 항혈청을 생산하였다.

- ① GST-affinity chromatography로부터 얻은 GST-pALS fusion protein $\sim 200\mu$ g(~ 2 ml)를 7개의 aliquots로 나누어 주사할 때까지 -70°C 에 보관
- ② 최초 하원 주사 당일 immunogen을 주사하기 전에 New Zealand White rabbit(~ 5 kg)의 이정맥으로부터 19 G needle를 이용하여 pre-immune blood ~ 10 ml을 채취하고 혈청 수거
- ③ pST-fusion protein 한 aliquot를 용해하여 50mM phosphate buffered saline(PBS; pH 7.2)를 넣어 총 부피가 1ml 되게 한 다음 1ml의 Freund's complete adjuvant(Sigma, Saint Louis, MO, USA)와 혼합하여 등의 4군데에 주사
- ④ 매 2주 위에서와 같이 GST-pALS fusion protein 한 aliquot를 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 booster injection
- ⑤ Boster injection한 다음 1주일 후에 이정맥으로부터 10ml의 혈액을 채취하여 혈청 수거
- ⑥ 6번째 booster injection 한 후 최초 항원 주사일로부터 101일 시점에 토끼를 전신마취시켜 심장으로 부터 혈액을 채취한 다음 안락사

제 4 장 IGF System Components의 혈중농도와 종돈의 경제형질간의 상관분석

제 1 절 서 설

전통적으로 동물의 성장과 번식형질의 발현에는 각각 성장호르몬 [somatotropin(ST); growth hormone(GH)] 과 성선자극호르몬의 작용에 의해 제어되는 것으로 이해되어져 왔다. 그러나 최근 이들 호르몬에 대한 연구가 진척되면서 GH의 대부분의 성장 촉진 작용은 GH의 자극에 의해 간을 비롯한 다수의 조직에서 발현·분비되는 insulin-like growth factor-I(IGF-I)에 의해 매개되는 사실이 밝혀졌다(이, 2000). 따라서 IGF-I의 혈중농도는 내생 성장호르몬의 분비상태를 잘 반영하기 때문에 IGF-I의 혈중 농도가 높은 개체를 계대선발하면 성장률이 높은 line의 동물군을 조성할 수 있는 가능성도 생각해 볼 수 있다. 실례로 Siddiqui 등(1990)은 생쥐를 혈중 IGF-I 농도를 기준으로 low-line과 high-line으로 7대까지 계통조성하였을 때 high-line은 low-line에 비해 출생체중이 높고 생후 성장률도 low-line이나 무작위 교배 line보다 높았다고 보고하였다. 또한 본 연구가 착수될 무렵 육성·비육돈에서도 혈중 IGF-I 및 IGFBP-3 농도와 성장형질과의 상관관계가 보고되어(Owens 등, 1999) 본 연구의 당위성을 지원하였다.

제한적이기는 하나 IGF-I system components의 혈중농도와 번식형질의 발현과는 상관관계가 있다. Kroonsberg 등(1989)은 high IGF-I line 암생쥐는 low-line에 비해 혈중 IGF-I 농도는 12%, 한배 새끼수는 19%, 태아당 무게는 7%, 총 태아무게는 30% 증가하였다고 보고하였다. 이와 관련하여 돼지를 포함한 가축에서 IGF-I은 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone; FSH)와 교호적으로 난소의

스테로이드호르몬 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Hammond 등, 1993; Cox, 1997). 보다 직접적으로 GH는 돼지의 난포발육을 촉진하는 작용이 있고, IGF-I 역시 돼지 난포의 퇴화를 억제하는 기능이 있어 GH의 난포 발육 촉진 작용이 국소적으로 생성되는 IGF-I에 의해 매개될 가능성이 시사되기도 하였으나 이들 호르몬 물질의 배란을 증강 효과는 실험자에 따라 변이가 있는 것으로 보고되었다(Cox, 1997). 한편 본 연구가 진행되는 동안 Yun 등(2001)은 모돈(gilts + sows)을 high-litter size와 low-litter size line으로 구분하였을 때 임신중 low-litter size line은 high-litter size line에 비해 IGF-II의 혈중농도가 높아 IGF-II는 IGF-I과는 달리 난포발육과 배란 혹은 태아 발육의 'negative regulator' 역할을 할 가능성을 시사하였다. 또한 이들은 임신중 Western ligand blot analysis (Hossenlopp 등, 1986)에 의해 검출되는 ~40-kDa IGFBP-3의 혈중농도는 low-line과 high-line과 차이가 없었던 것으로 보고하였다. 그러나 이 같은 결과는 본 연구의 귀중한 참고자료이기는 하나, 공시동물의 수가 제한적이었고, 혈중 IGFBP-3는 Western ligand blot analysis에 의해 검출되는 ~40-kDa intact IGFBP-3 외에도 다량의 ≤ 31 -kDa truncated IGFBP-3가 포함되기 때문에(Lee 등, 1991) 좀더 확정적인 결론을 내리기 위해서는 추가의 연구결과가 요망된다.

IGF-I과 IGFBP-3 외에도 acid-labile subunit(ALS)는 전자와 같이 혈중 150-kDa ternary IGF complex의 구성요소로서 주로 GH에 의해 발현이 제어되기 때문에(Furlanetto, 1980; Ooi 등, 1997) ALS의 혈중 농도 또한 동물의 성장 및 번식 형질의 지표가 될 수 있는 가능성이 크다. 따라서 당초 본 연구는 농협중앙회 종돈사업소에서 사육중인 공시종돈을 다수 확보하여 IGF-I, IGF-II, IGFBP-3 및 ALS

의 혈중농도와 성장 및 번식형질 간의 상관관계를 구명하여 종돈의 선발지표 개발을 목표로 실험에 착수하였다. 이를 위해 ALS를 expression시키고 항혈청 생산까지 완료하였으나 ALS 및 IGFBP-3의 radioimmunoassy(RIA) 용 standards 정제상 예상치 못한 문제가 발생하여(제 5절 별첨: ALS 및 IGFBP-3 정제) 본 연구에서는 이들에 대한 RIAs를 포함하지 못하였다. IGFBP-3 RIA에 대해서는 마지막 수단으로 hIGFBP-3 항혈청과 recombinant hIGFBP-3 standard(Gropep, Adelaide, Australia)를 이용한 heterologous RIA를 시도해 보았으나 hIGFBP-3가 iodination 후 쉽게 degradation되고 RIA상에서 non-specific binding이 높아 RIA에 쓸 수가 없었다. 따라서 IGFBP-3 및 ALS에 대한 혈중농도 분석은 이들의 RIA procedures가 확립되는 대로 차후에 수행하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 실험 돈군의 기초자료 분석

농협중앙회 종돈사업소에서 1990년부터 보유했던 종돈은 총 24,861두 이었는데 이중 본 연구가 착수될 당시 17,970두의 종돈에 대한 산육능력 검정을 완료하였다. 표 4-1은 그 결과로서 표현형적 능력은 산육능력 검정 기록이 있는 종돈에 대한 것이며, 유전능력은 가계(족보)와 능력을 활용하여 BLUP-animal 기법을 통하여 추정된 육종가(breeding value)이다.

Table 4-1. Phenotypic and breeding values of the breeding herd for major economic traits

Item		Phynotypic value			Breeding value		
		n	Mean	SD	n	Mean	SD
Total	ADG, g	17,970	575	44.2	24,861	2.27	13.444
	backfat thickness, mm	17,970	13.4	2.88	24,861	-0.059	1.122
	Days at 90kg	17,970	155	12.4	24,861	-0.55	3.912
	Litter size, head				24,861	0.17	0.515
	Return to estrus, days				24,861	-0.03	0.995
Duroc	ADG, g	3,936	589	39.6	4,624	1.53	12.086
	backfat thickness, mm	3,936	14.2	2.33	4,624	-0.045	1.035
	Days at 90kg	3,936	151	11.4	4,624	-1.01	3.640
	Litter size, head				4,624	0.15	0.431
	Return to estrus, days				4,624	-0.17	0.864
Landrace	ADG, g	5,743	574	45.6	8,480	3.60	12.212
	backfat thickness, mm	5,743	13.2	2.91	8,480	0.039	1.072
	Days at 90kg	5,743	155	12.5	8,480	-0.843	3.696
	Litter size, head				8,480	0.140	0.502
	Return to estrus, days				8,480	0.196	1.056
Yorkshire	ADG, g	8,291	568	43.6	11,757	1.61	14.672
	backfat thickness, mm	8,291	13.2	3.03	11,757	-0.135	1.183
	Days at 90kg	8,291	157	12.3	11,757	-0.168	4.140
	Litter size, head				11,757	0.209	0.550
	Return to estrus, days				11,757	-0.143	0.969

본 연구에서는 Table 4-2와 같이 성장 및 번식형질별 육종가 능력기준(평균 \pm 0.5표준편차)으로 high-line과 low-line으로 구분하여 IGF system components에 대한 측정단계별 기초통계량을 계산하고 이들간의 유의성을 검정하였다.

Table 4-2. Breeding values of the high- and low-lines for major economic traits

	Total	Duroc	Landrace	Yorkshire
ADG, g	8.97	7.57	9.80	8.95
Backfat, mm	-0.62	-0.56	-0.58	-0.76
LMA ¹ , cm ²	48.9	46.8	48.1	49.9
Lean, %	56.9	55.4	55.9	57.8
Litter size, head	0.387	-	0.435	0.345

¹LMA, loin muscle area.

2. 생체 측정 및 시료 채취

가. 성장형질

부모 평균 일당중체량에 대한 육종가 기준으로 Low(L)-line과 High(H)-line의 Landrace, Yorkshire, Duroc 총 438두의 공시돈을 임의 선발하여 생체중 25, 60, 100kg(선발)시 경정맥으로부터 EDTA-Vacutainer에 혈액을 채취하여 혈장을 수거한 후 1ml씩 분주하여 -20 °C에 분석할 때까지 보관하였다. 종돈 선발시 일당중체량을 계산하고, 초음파측정기를 이용하여 등지방두께, 등심단면적 및 정육율을 추정하였다.

나. 번식형질

보유 미경산돈의 육종가 분석에 의하여 산자수에 대한 부모 평균 육종가를 Low(L)-line과 High(H)-line으로 구분하고 총 63두의 Landrace와 Yorkshire 핵돈군(GGP) 미경산돈을 선정하여 임신 90일에 위에서와 같이 혈액을 채취하였다. 분만한 공시돈에 대해서는 산자수를 기록하고, 복당 자돈을 9두로 고정시켜 3주령 이유시 비유량의 지표로서 복당 총이유자돈체중을 측정하였다.

3. IGF-I & -II radioimmunoassay(RIAs)

IGF RIA를 방해하는 혈중 IGF-BPs는 전술한 바(Lee등, 1990)와 같이 acid-ethanol extraction(Daughaday 등, 1980) 방법으로 제거하였다. 0.2ml 혈장을 0.8ml acid-ethanol(87.5% ethanol + 12.5% 2N HCl)과 섞어 vortexing하고 상온에서 30분 방치한 후 4 °C 3,000rpm으로 30분간 원심분리하여 IGF-BPs를 포함하는 불용물질을 침전시키고 0.5ml 상등액을 채취하여 0.2ml 0.855M Tris 용액으로 중화시켰다. 중화된 acid-ethanol extract는 Gropep(Adelaide, Australia)의 IGF-I & IGF-II 항혈청을 이용하여 double-antibody procedure에 의해 IGF-I & IGF-II RIAs를 수행하였다(이와 정, 2000). 적혈구 용해물질이 많이 함유된 혈액 시료는 RIA 값 특히 IGF-II 값이 매우 낮게 분석되었기 때문에 붉은 빛을 띤 시료는 분석에서 제외하였다.

4. 통계분석

생체측정치, 혈장의 IGF-I & -II 농도의 high-line과 low-line간 차이의 유의성은 SAS(1996)의 GLM procedure를 이용하고

이들 변수간의 상관관계는 Corr procedure를 이용하여 분석하였다. 종돈 선발시 성장형질 즉 일당증체량, 등지방두께, 등심단면적 및 정육률에 대해서는 체중을 공변수(covariate)로 통계분석 모델에 삽입하였다.

제 3절 결과

1. 성장형질

가. High-line 대비 low-line간 표현형, 육종가 및 IGFs 농도 비교

1) 일당증체량

Table 4-3은 일당증체량에 대한 low-line 대비 high-line의 표현형, 육종가 및 혈장 IGF-I & -II의 농도 비교 결과이다. 표현형과 육종가 기준 공히 high-line이 low-line보다 일당증체량이 컸으나($P < 0.0001$) IGF-I 농도는 두 lines간 유의차가 검정되지 않았다. IGF-II 농도는 25kg 생체중시 전체공시돈에서 low-line이 high-line보다 높았고($P < 0.01$) Yorkshire 품종도 이러한 경향을 나타냈으나($P < 0.10$), 60 & 100kg시나 타 품종에서는 두 line간 차이가 없었다($P > 0.05$).

2) 등지방두께(Table 4-4)

High-line은 low-line에 비해 품종에 관계 없이 등지방두께가 현저히 낮았고($P < 0.0001$), IGFs 농도에서 괄목할 만한 결과는 Landrace($P < 0.01$), Yorkshire($P < 0.03$) 및 전체 공시돈($P < 0.01$)에서 25kg시 IGF-I 농도가 high-line이 low-line보다 낮았다. 반면 IGF-II 농도는 전체 공시돈에서 60 kg시 high-line의 농도가 low-line의 농도보다 낮았던 점($P < 0.01$)을 제외하고

는 두 lines간 유의적인 차이가 없었다.

3) 등심단면적(Table 4-5)

High-line은 low-line보다 모든 품종에서 등심단면적이 컸고 ($P < 0.0001$), IGF-I에서는 Yorkshire, Duroc 및 전체 공시돈에서 100kg시 high-line의 농도가 low-line의 농도보다 낮았으나 Landrace 품종에서는 60kg시 high-line의 농도가 낮은 경향($P < 0.07$)을 보였다. 한편 IGF-II는 두 lines간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

4) 정육률(Table 4-6)

정육률 역시 high-line이 low-line보다 높았고($P < 0.0001$), IGF-I 농도는 품종에 따라 25kg시 혹은 60kg시 high-line이 low-line보다 높거나 낮은 경우를 보여 전체적으로 일률적인 경향을 나타내지 않았고, IGF-II 농도는 품종과 생체중에 관계 없이 low-line과 high-line간 차이를 보이지 않았다.

Table 4-3. Low-line vs high-line in ADG and plasma IGFs concentrations

Breed	PADG ¹ (g)		BVADG ²		BW (kg)	IGF-I(ng/ml)		IGF-II(ng/ml)	
	Low	High	Low	High		Low	High	Low	High
Land-race (n=151)	518.8 ±2.90	559.5 ±2.38	1.4 ±0.66	16.4 ±0.72	25	229.7 ±47.58	281.1 ±47.58	259.2 ±50.83	302.5 ±41.43
					P < 0.47		P < 0.53		
					60	373.7 ±33.88	412.4 ±21.03	292.4 ±30.23	290.1 ±18.31
					P < 0.38		P < 0.95		
Yorkshire (n=241)	530.8 ±2.90	566.6 ±2.43	1.9 ±0.51	19.9 ±0.66	25	277.6 ±22.40	261.3 ±21.90	214.5 ±50.90	347.7 ±45.40
					P < 0.61		P < 0.10		
					60	322.9 ±16.50	331.0 ±15.34	285.3 ±21.37	267.59 ±20.41
					P < 0.73		P < 0.56		
Duroc (n=46)	525.3 ±4.23	580.1 ±3.17	0.0 ±1.80	0.15 ±0.77	25				
					60	449.4 ±61.30	437.9 ±25.54	268.1 ±83.25	324.4 ±40.57
					P < 0.86		P < 0.56		
					100	373.4 ±25.36	396.5 ±51.84	170.3 ±36.99	190.1 ±20.19
Total (n=438)	526.2 ±2.03	566.0 ±1.62	1.6±0 .40	18.1± 0.46	25	250.3 ±11.03	272.0 ±20.05	253.5 ±10.31	321.4 ±24.05
					P < 0.35		P < 0.01		
					60	330.4 ±12.74	360.3 ±12.53	268.9 ±13.02	289.9 ±13.12
					P < 0.11		P < 0.27		
Total (n=438)	526.2 ±2.03	566.0 ±1.62	1.6±0 .40	18.1± 0.46	100	406.1 ±16.69	393.3 ±11.92	150.4 ±7.23	143.2 ±5.30
					P < 0.56		P < 0.45		

¹PADG, phenotypic average daily gain(ADG); ²BVADG, breeding value of ADG.

Table 4-4. Low- vs high-line in backfat thickness and IGFs concentrations

Breed	PBF ¹ (mm)		BVBF ²		BW (kg)	IGF-I(ng/ml)		IGF-II(ng/ml)					
	Low	High	Low	High		Low	High	Low	High				
Land- race (n=151)	16.61 ±0.278	12.00 ±0.227	1.35 ±0.121	-1.17 ±0.085	25	301.7	116.52	272.0	316.1				
						±28.39	±51.78	±39.46	±62.24				
					P < 0.01		P < 0.58		60	423.1	291.8	281.0	340.4
					±16.63	±36.25	±15.20	±34.30					
P < 0.0001		P < 0.0001		100	428.5	417.2	136.4	115.0					
±19.13	±43.36	±7.78	±15.45										
P < 0.81		P < 0.22		York- shire (n=241)	25	295.3	222.2	294.1	281.5				
15.77 ±0.177	11.90 ±0.138	0.57 ±0.075	-1.53 ±0.069			±18.53	±25.13	±60.41	±68.44				
					P < 0.03		P < 0.90		60	324.63	332.9	260.7	312.19
					±13.11	±19.37	±16.80	±25.81					
				P < 0.0001		P < 0.0001		100	384.8	395.9	140.7	147.8	
±14.49	±21.94	±5.28	±7.94										
P < 0.68		P < 0.46		Duroc (n=46)	25								
17.83 ±0.501	13.14 ±0.330	0.42 ±0.189	-1.38 ±0.092			60	469.2	408.2	264.1	358.2			
					±32.80		±33.87	±52.51	±50.57				
					P < 0.0001		P < 0.0001		100	368.1	391.7	177.1	193.2
				±27.44	±29.54	±20.77	±22.44						
P < 0.56		P < 0.60		Total (n=438)	25	296.7	239.8	268.2	263.4				
16.39 ±0.151	12.10 ±0.110	0.89 ±0.068	-1.39 ±0.049			±18.42	±11.14	±25.24	±10.81				
					P < 0.01		P < 0.86		60	344.9	346.5	260.5	308.7
					±11.21	±13.89	±11.40	±14.26					
				P < 0.0001		P < 0.0001		100	397.5	398.8	143.1	151.5	
±10.78	±16.23	±4.83	±6.96										
P < 0.95		P < 0.32											

¹Phenotypic backfat thickness; ²Breeding value of the backfat thickness.

Table 4-5. Low- vs high-line in loin muscle area and plasma IGFs

Breed	LMA ¹ (cm ²)		BW (kg)	IGF-I(ng/ml)		IGF-II(ng/ml)	
	Low	High		Low	High	Low	High
Landrace (n=151)	44.1 ±0.38	53.2 ±0.0.41	25	271.9	285.6	243.6	278.5
				±17.36	±23.11	±10.65	±14.94
			P < 0.64		P < 0.06		
			60	424.8	362.7	297.0	280.1
				±20.57	±25.66	±18.04	±24.00
			P < 0.07		P < 0.58		
100	444.7	402.0	142.5	115.9			
	±23.15	±27.10	±8.97	±11.27			
P < 0.0001		P < 0.81		P < 0.07			
Yorkshire (n=241)	15.77 ±0.177	11.90 ±0.138	25	251.0	248.8	276.4	255.1
				±12.25	±12.32	±9.03	±9.86
			P < 0.90		P < 0.12		
			60	347.2	309.6	292.4	259.8
				±15.70	±14.15	±21.05	±18.39
			P < 0.08		P < 0.25		
100	418.2	357.1	139.3	146.6			
	±16.84	±17.17	±6.22	±6.45			
P < 0.0001		P < 0.01		P < 0.43			
Duroc (n=46)	41.9 ±0.58	50.7 ±0.55	25	265.8	274.4	274.1	286.8
				±21.59	±17.96	±18.84	±20.30
			P < 0.76		P < 0.66		
			60	460.3	430.7	275.7	326.9
				±43.00	±28.13	±67.67	±41.71
			P < 0.57		P < 0.53		
100	436.5	334.0	154.2	207.9			
	±27.80	±24.60	±22.16	±19.48			
P < 0.0001		P < 0.01		P < 0.08			
Overall (n=438)	44.6 ±0.25	53.6 ±0.25	25	252.2	261.4	262.6	272.0
				±7.33	±9.49	±5.39	±7.92
			P < 0.45		P < 0.33		
			60	369.6	314.0	285.9	268.9
				±11.43	±13.00	±11.93	±13.55
			P < 0.01		P < 0.35		
100	425.3	367.1	143.9	148.1			
	±12.23	±12.98	±5.46	±5.95			
P < 0.0001		P < 0.01		P < 0.61			

¹LMA, loin muscle area.

Table 4-6. Low- vs high-line in lean percentage and plasma IGFs

Breed	Lean(%)		BW (kg)	IGF-I(ng/ml)		IGF-II(ng/ml)	
	Low	High		Low	High	Low	High
Landrace (n=151)	52.5 ±0.30	59.0 ±0.20	25	302.4	255.6	240.7	267.0
				±20.65	±18.76	±13.45	±11.91
			P < 0.10		P < 0.15		
			60	456.9	357.4	278.1	302.0
±24.07	±20.73	±21.18		±19.81			
P < 0.01		P < 0.43					
100	424.7	428.2	135.4	129.5			
	±27.27	±24.80	±11.12	±9.81			
P < 0.0001		P < 0.93		P < 0.70			
Yorkshire (n=240)	55.2 ±0.21	60.0 ±0.14	25	269.9	232.8	265.8	267.17
				±12.55	±11.58	±11.03	±8.45
			P < 0.03		P < 0.92		
			60	327.5	324.2	254.9	289.5
±15.42	±14.86	±19.72		±19.55			
P < 0.88		P < 0.22					
100	387.0	387.0	140.2	143.4			
	±19.03	±16.37	±6.84	±5.89			
P < 0.0001		P < 1.00		P < 0.73			
Duroc (n=47)	53.0 ±0.56	57.6 ±0.26	25	261.9	279.1	295.3	252.6
				±22.94	±21.69	±19.03	±28.00
			P < 0.63		P < 0.28		
			60	490.5	385.6	296.8	332.4
±32.39	±33.51	±51.01		±57.35			
P < 0.04		P < 0.67					
100	376.2	381.7	182.4	186.5			
	±30.99	±30.15	±23.51	±22.84			
P < 0.0001		P < 0.90		P < 0.91			
Overall (n=438)	53.7 ±0.18	59.4 ±0.11	25	244.3	265.0	265.2	266.1
				±8.65	±7.85	±6.06	±6.73
			P < 0.08		P < 0.93		
			60	355.5	329.9	274.7	282.4
±11.32	±13.39	±11.64		±14.01			
P < 0.15		P < 0.67					
100	383.2	407.1	152.1	140.8			
	±14.54	±12.00	±6.41	±5.29			
P < 0.0001		P < 0.22		P < 0.19			

나. 상관관계 분석

Tables 4-7 & 8은 전체 공시돈(Table 4-7) 및 품종별(Table 4-8) 공시체중에 따른 IGF-I & -II 혈중농도와 성장형질간의 상관 분석 결과이다. 몇몇 경우는 체중별 IGF의 혈중농도와 성장형질간에는 유의적인 상관관계가 검출되기는 하였으나 전체적으로 상관계수는 낮았다. 또한 IGF 농도와 성장형질간의 상관관계는 대체로 low-line 대비 high-line의 IGF 혈중농도 비교 결과와 잘 일치하지 않았으나 Landrace 품종에서는 25kg시 IGF-I 혈중농도와 등지방두께가 정의 상관관계를 보임으로써 low-line 대비 high line 결과(Table 4-3)와 일치하였다.

Table 4-7. Pearson's correlations between plasma IGF concentrations and growth traits at different body weights in total experimental animals

BW (kg)	IGF conc.	r & P	PADG ¹	BVADG ²	PBF ³	BVBF ⁴	LMA ⁵	Lean (%)
25	IGF-I	r	0.145	-0.029	0.264	0.290	0.048	-0.248
		P	0.157	0.776	0.009	0.004	0.647	0.016
	IGF-II	r	-0.001	-0.027	-0.191	-0.256	0.091	0.203
		P	0.991	0.819	0.096	0.024	0.438	0.080
60	IGF-I	r	0.358	0.395	0.170	0.294	-0.124	-0.090
		P	0.0001	0.0001	0.053	0.001	0.159	0.311
	IGF-II	r	0.242	0.269	-0.004	0.058	-0.058	0.042
		P	0.007	0.003	0.962	0.527	0.526	0.645
100	IGF-I	r	-0.002	0.031	-0.128	-0.118	-0.129	0.074
		P	0.986	0.770	0.218	0.259	0.218	0.479
	IGF-II	r	0.004	0.024	0.080	0.098	-0.215	-0.138
		P	0.971	0.833	0.476	0.381	0.055	0.222

¹PADG, phenotypic ADG; ²BVADG, breeding value of the ADG; ³PBF,

phenotypic backfat thickness(BF); ⁴BVBF, breeding value of the BF;

⁵LMA, loin muscle area.

Table 4-8. Pearson's correlations between plasma IGF concentrations and growth traits in three different breeds

Breed	BW (kg)	IGF conc.	r & P	PADG ¹	BVADG ²	PBF ³	BVBF ⁴	L. Mus. (cm ²)	Lean (%)
Land-race (L)	25	IGF-I	r	0.145	-0.029	0.264	0.290	0.048	-0.248
			P	0.157	0.776	0.009	0.004	0.647	0.016
		IGF-II	r	-0.001	-0.027	-0.191	-0.256	0.091	0.203
			P	0.991	0.819	0.096	0.024	0.438	0.080
	60	IGF-I	r	0.358	0.395	0.170	0.294	-0.124	-0.090
			P	0.0001	0.0001	0.053	0.001	0.159	0.311
		IGF-II	r	0.242	0.269	-0.004	0.058	-0.058	0.042
			P	0.007	0.003	0.962	0.527	0.526	0.645
	100	IGF-I	r	-0.002	0.031	-0.128	-0.118	-0.129	0.074
			P	0.986	0.770	0.218	0.259	0.218	0.479
		IGF-II	r	0.004	0.024	0.080	0.098	-0.215	-0.138
			P	0.971	0.833	0.476	0.381	0.055	0.222
Yorkshire (Y)	25	IGF-I	r	0.058	0.076	0.124	0.304	-0.072	-0.251
			P	0.426	0.297	0.090	0.0001	0.332	0.001
		IGF-II	r	0.084	0.261	-0.010	0.087	-0.073	-0.049
			P	0.394	0.007	0.920	0.377	0.466	0.623
	60	IGF-I	r	0.207	0.110	0.043	0.007	-0.132	-0.067
			P	0.008	0.159	0.584	0.925	0.094	0.394
		IGF-II	r	0.065	-0.065	-0.155	-0.309	-0.018	0.025
			P	0.437	0.437	0.062	0.0001	0.834	0.767
	100	IGF-I	r	-0.084	-0.073	-0.134	-0.111	-0.189	-0.063
			P	0.291	0.355	0.089	0.161	0.017	0.430
		IGF-II	r	-0.121	-0.130	-0.112	-0.053	0.062	-0.108
			P	0.145	0.117	0.175	0.520	0.455	0.194
Duroc (D)	25	IGF-I	r	0.054	0.046	-0.109	-0.001	0.118	0.181
			P	0.729	0.766	0.482	0.997	0.452	0.246
		IGF-II	r	0.120	-0.216	0.346	0.417	-0.033	-0.131
			P	0.544	0.269	0.072	0.027	0.871	0.517
	60	IGF-I	r	0.183	0.131	0.549	0.467	-0.024	-0.475
			P	0.258	0.420	0.0002	0.002	0.883	0.002
		IGF-II	r	0.120	0.010	-0.239	-0.122	0.272	0.176
			P	0.500	0.955	0.173	0.492	0.119	0.321
	100	IGF-I	r	-0.066	0.010	0.036	0.044	-0.351	0.009
			P	0.679	0.950	0.823	0.783	0.023	0.957
		IGF-II	r	0.109	-0.023	-0.035	0.049	0.289	0.102
			P	0.502	0.886	0.831	0.762	0.071	0.532

¹PADG, phenotypic ADG; ²BVADG, breeding value of the ADG; ³PBF, phenotypic backfat thickness(BF); ⁴BVBF, breeding value of the BF.

Table 4-9는 품종별 체중별 혈중 IGF-I과 IGF-II 농도간의 상관관계이다. 25kg과 100kg시 두 변수간 상관관계는 거의 없었고, 60kg 체중시에는 세 품종중 Landrace와 Yorkshire 품종에서 정의 상관관계를 보여 전체적으로 낮은 수준의 상관관계가 분석되었다.

Table 4-9. Correlations between plasma IGF-I and IGF-II concentrations at different body weights in three different breeds

Breed	BW(kg)	r	P
Landrace(L)	25	-0.164	0.155
	60	0.438	0.001
	100	-0.043	0.709
Yorkshire(Y)	25	-0.097	0.327
	60	0.210	0.011
	100	0.114	0.173
Duroc(D)	25	-0.100	0.612
	60	-0.001	0.993
	100	-0.044	0.790
Total (L+Y+D)	25	-0.071	0.24
	60	0.232	0.0001
	100	0.006	0.97

2. 번식형질

가. Low-line과 high-line의 비교

본 실험에 쓰인 Landrace와 Yorkshire 품종 공시돈의 산자수는 low-line과 high-line간 유의적인 차이가 있었으나($P < 0.001$), 이유시 자돈의 총체중은 두 lines간 차이가 없었다(Table 4-10). 임신 90일 시점 Landrace 공시돈과 전체 공시돈에서 high-line은 low-line에 비해 IGF-II 농도가 높은 반면 두 lines간 IGF-I 농도에는 차이가 없었고, 분만 후 15일 시점의 Landrace 공시돈은 high-line이 low-line보다 IGF-I 농도가 낮았다($P < 0.02$).

Table 4-10 Reproduction traits and plasma IGFs concentrations of the low-line and high-line breeding gilts

Variable		Line	Breed		
			Landrace(L) ¹	Yorkshire(Y) ¹	L + Y ¹
Litter size (phenotypic)	Low		9.90 ± 0.309	8.99 ± 0.461	9.28 ± 0.313
	High		11.78 ± 0.309	11.91 ± 0.461	11.67 ± 0.274
	P		0.001	0.001	0.001
Litter (breeding value)	Low		0.09 ± 0.084	-0.32 ± 0.117	-0.21 ± 0.083
	High		0.78 ± 0.084	1.01 ± 0.117	0.84 ± 0.072
	P		0.001	0.001	0.001
Total litter wt at weaning	Low		61.75 ± 2.801	56.40 ± 2.420	59.65 ± 2.006
	High		58.16 ± 2.801	59.12 ± 2.181	58.41 ± 1.650
	P		0.373	0.411	0.633
Day 90 pregnancy	IGF-I conc.	Low	178.0 ± 13.316	166.8 ± 11.877	173.4 ± 9.328
		High	162.3 ± 13.783	169.2 ± 12.597	165.3 ± 8.615
		P	0.422	0.893	0.525
	IGF-II conc.	Low	205.6 ± 12.771	342.4 ± 26.242	192.5 ± 10.354
		High	247.7 ± 13.219	388.9 ± 23.654	230.7 ± 9.706
		P	0.030	0.200	0.009
Day 15 postpartum	IGF-I conc.	Low	411.2 ± 30.871	192.3 ± 14.511	373.6 ± 23.271
		High	301.1 ± 31.950	212.1 ± 15.896	355.6 ± 19.552
		P	0.020	0.365	0.555
	IGF-II conc.	Low	140.5 ± 8.918	141.3 ± 14.660	137.5 ± 9.694
		High	120.5 ± 8.918	145.5 ± 14.660	137.5 ± 8.451
		P	0.130	0.842	0.990

¹Numbers of gilts of the low-line vs high-line in L, Y and L + Y were 14 vs 14, 16 vs 16 and 34 vs 26, respectively.

나. IGFs 농도 및 번식형질들간의 상관분석

Tables 4-11 & -12는 총 공시돈(4-11) 및 품종별(4-12) 임신 90일 및 분만 후 15일 IGFs 농도 및 번식형질들간의 상관관계이다. Low-line vs

high-line 결과와는 다소 대조적으로 품종별 및 총 공시돈에서 임신 90일 IGF-I 농도와 산자수와는 부의 상관관계가 있었고 동일 IGF-II 농도와는 상관관계가 없었다.

Table 4-11. Pearson's correlations between reproduction traits and plasma IGFs concentrations at different stages in total animals

		r & P	Day 90 Px		Day 15 post-partum		Litter size		Total litter wt weaned
			IGF-I conc.	IGF-II conc.	IGF-I conc.	IGF-II conc.	pheno- typic	breedig value	
Day 90 pregnancy	IGF-I conc.	r		-0.167	0.280	-0.055	-0.352	-0.226	0.123
		P		0.194	0.034	0.721	0.006	0.082	0.361
	IGF-II conc.	r			-0.194	-0.112	0.195	0.147	-0.098
		P			0.149	0.471	0.139	0.265	0.470
Day 15 postpar- tum	IGF-I conc.	r				0.434	-0.018	-0.130	-0.106
		P				0.003	0.897	0.340	0.432
	IGF-II conc.	r					0.128	-0.007	-0.248
		P					0.421	0.963	0.104
L i t t e r s i z e	pheno- typic	r						0.640	-0.018
		P						0.000	0.894
	breeding value	r							-0.078
		P							0.571

Table 4-12. Pearson's correlations between reproduction traits and plasma IGFs concentrations in Landrace and Yorkshire gilts

Breed	Variable		r & P	Day 90 Px		Day 15 post-partum		Litter size		Total litter wt weaned
				IGF-I conc.	IGF-II conc.	IGF-I conc.	IGF-II conc.	pheno- typic	breeding value	
Land- race	Day 90 Px	IGF-I conc.	r		-0.434	0.340	0.132	-0.464	0.286	0.327
			P		0.019	0.071	0.580	0.013	0.141	0.089
		IGF-II conc.	r			-0.256	-0.320	0.533	0.356	-0.246
			P			0.180	0.169	0.004	0.063	0.206
	Day 15 post- partum	IGF-I conc.	r				0.194	-0.241	-0.364	0.075
			P				0.413	0.216	0.057	0.704
		IGF-II conc.	r					0.128	-0.001	0.160
			P					0.601	0.997	0.502
	Litter size	pheno- typic	r						0.562	-0.010
			P						0.002	0.961
		breeding value	r							-0.356
			P							0.069
York- shire	Day 90 Px	IGF-I conc.	r		0.019	0.194	0.031	-0.307	-0.210	-0.189
			P		0.916	0.313	0.886	0.088	0.248	0.325
		IGF-II conc.	r			-0.124	-0.015	0.028	0.051	-0.004
			P			0.528	0.946	0.883	0.785	0.983
	Day 15 post- partum	IGF-I conc.	r				0.737	0.251	0.046	-0.387
			P				0.000	0.199	0.818	0.038
		IGF-II conc.	r					0.119	-0.001	-0.524
			P					0.590	0.995	0.009
	Litter size	pheno- typic	r						0.662	-0.027
			P						0.000	0.892
		breeding value	r							0.070
			P							0.705

제 4절 고찰

혈중 IGF-I과 IGF-II 농도를 기준으로 한 성장과 번식형질의 선발 지표 개발의 가능성을 구명하기 위해 본 실험에서는 농협중앙회 종돈사업소 보유 핵돈군(GGP) 공시돈을 해당 형질 기준으로 low-line과 high-line으로 나누어 단계별 low-line 대비 high-line의 IGFs 농도 차의 유무를 분석한 다음 IGF 농도와 해당 형질간의 상관관계를 분석하여 두 분석 결과의 일관성 여부를 확인하였다. 전체적으로 low-line 대비 high-line의 IGF 농도 비교 결과와 IGF 농도와 해당 경제형질간의 상관분석 결과가 일치하지 않는 경우도 있었고 상관계수도 대체로 낮았으나 몇몇 분석 결과는 일관된 경향을 보여 고무적이었다. 품종별 혹은 전체 공시돈에서 25 & 60kg시 IGF-I 농도와 선발시(100kg) 초음파로 추정된 등지방두께 및 정육률과는 부의 상관관계를 나타내었고 이와 일치하여 high-line(얇은 등지방두께; 고정육률)은 low-line(얇은 등지방두께; 저정육률)보다 낮은 IGF-I 농도를 보임으로써 IGF-I 농도가 이들 성장관련 경제형질의 조지선발 표지인자로 쓰일 수 있는 가능성을 제시하였다. 반면 IGF-II 농도와 등지방두께 혹은 타 형질과의 관계는 많은 경우 IGF-I과의 관계와 반대되는 경향을 보였는데, 이는 IGF-II가 IGF-I 작용의 'negative regulator' 역할을 했던 양에서의 결과(Koea 등, 1992)와 일치하는 것으로 해석될 수도 있을 것 같다. IGF의 혈중농도와 성장형질간의 관계에서 또 하나 주목할만한 것은 전체공시돈에서 60kg시 IGF-I 농도와 일당증체량간 정의 상관관계는 육성·비육돈에서 관찰되었던 이들 두 변수간의 상관관계와 일치하는 결과(Owens 등, 1999; Lee 등, 2002)로서 이 시점의 IGF-I 농도의 이용 가능성을 제시하였다.

Landrace 공시돈에서 임신 90일 high-line(높은 산자수)은 low-line에 비해 IGF-I 농도는 낮은 반면 IGF-II 농도는 높았고 상관분석 결과 또한

산자수와 임신 90일 IGF-I 농도와는 부의 상관관계를, IGF-II 농도와는 정의 상관관계를 나타내었다. 그러나 이러한 일관된 결과는 Yorkshire 공시돈에서는 관찰되지 않았고, Yun 등(2001)의 결과에 의하면 임신 90일 high-line의 IGF-II 농도가 low-line보다 낮았기 때문에 번식형질과 임신중 IGFs의 농도와 의 관계는 좀 더 많은 연구를 요한다. 이 외에도 두 lines간 상당수의 유의차가 관찰되었으나 IGF의 혈중농도와 성장 혹은 번식 관련 경제형질간의 상관분석 결과와 일치하지 않은 경우도 있었고 상관계수는 대체로 낮았다. 이 같은 결과는 근본적으로 개체간 IGFs의 혈중농도 변이가 컸기 때문이며, 따라서 본 보고서에 제시된 일부 유의차 혹은 상관계수 중에는 우연한 결과이었을 가능성도 완전히 배제할 수는 없다.

결론적으로 25kg 및 60kg시 IGF-I의 혈중농도는 등지방두께와 정육률과 부의 상관관계가 있으므로 조기선발의 지표로서의 가능성이 있고 임신중 혈중 IGF 농도와 번식형질간의 관계는 불분명하다. 현 단계에서 본 연구 결과는 산업적인 의미보다는 학술적인 의미가 크고, 산업적으로 이용하기 위해서는 추가의 확인 실험이 필요할 것으로 사료된다.

제 5절 별첨: ALS 및 IGFBP-3 정제

1. pALS 정제

ALS의 생화학적 특성을 구명하고 RIA를 개발하기 위해서는 GST-pALS fusion protein으로부터 각종 salts 특히 iodination 과정에서 ^{125}I 대신에 tyrosine ring에 incorporation될 수 있는 halogen 이온(Cl^-)을 제거해야 된다. 본 연구에서는 recombinant eucaryotic GST-pST fusion protein에 들어있는 salts를 제거하기 위해 투석 (dialysis) 방법과 Centricon(Amicon, Beverly, MA, USA)을 이용한 ultraconcentration 방법을 시도하였으나 미지의 원인에 의해 두 방법 모두에서 GST-pALS fusion protein이 plastic material에 흡착되어 소기의 목적을 이루지 못하였다.

차선의 방법으로 쥐의 ALS 정제 때(Lee와 Rechler, 1995b)와 같이 ① DEAE Sephadex A-50 anion exchange chromatography로 돼지 혈청을 IGFbps fraction과 ALS fraction으로 분리한 다음 ② ALS fraction을 2mg IGF-I이 conjugation되어 있는 Sepharose-4B-IGF-I affinity column에 2mg recombinant non-glycosylated hIGFBP-3(Celtrix, Santa Clara, CA, USA)를 (비공유)결합시킨 소위 'IGF-I-IGFBP-3 sandwich' affinity column에 loading하여 ALS를 결합시키고 ③ salt로 결합된 ALS를 elution시키는 방법을 시도하였으나 이 또한 성공적이지 못하였는데 사신에 의하면 T. D. Etherton (Pennsylvania State University) 역시 비슷한 경험을 하였다고 전하였다. 마지막으로 ALS가 혈중에서 IGF:IGFBP-3:ALS ternary complex를 형성하는 생화학적 특성을 이용하여 pIGFBP-3 immuno-affinity chromatography 방법으로 pALS 정제를 시도하였으

나 이 또한 미지의 이유로 말미암아 성공적이지 못하였다. 다음은 recombinant GST-pALS fusion protein을 ultraconcentration 방법과 pIGFBP-3 immuno-affinity chromatography로 ALS 정제를 시도했던 과정과 결과이다.

가. Ultraconcentration 방법

GST affinity chromatography로 정제된 GST-pALS fusion protein($\sim 0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1.5ml을 Centricon-30 ultraconcentrator에 넣

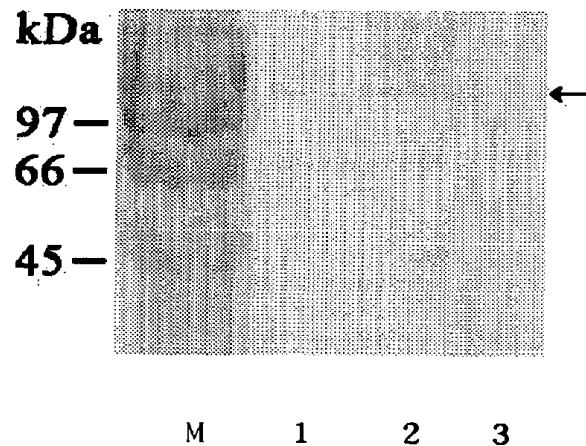


Fig. 4-1. SDS-PAGE and Coomassie staining of GST-pALS fusion protein before(lanes 1 & 2) and after(lane 3) ultraconcentration and buffer change. M, molecular mass standards; lanes 2 and 3, 6 and 13 μl of GST-pALS fusion protein($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) before ultraconcentration; lane 3, 13 μl of the protein after ultraconcentration and buffer change.

어 원심분리한 다음 동량의 50mM sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 넣는 과정을 반복하여 buffer를 교환하자 GST-pALS fusion protein이 소실되었다(Fig. 4-1).

나. IGFBP-3 immuno-affinity chromatography 방법

본 방법은 기 확보된 IGFBP-3 항혈청에서 Immunoglobulin G를 추출하여 소규모의 IGFBP-3 immuno-affinity chromatography에 의해 돼지 혈청의 ALS를 정제하고자 하는 시도이다.

1) Protein A-agarose(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)를 이용한 IgG 정제

가) Buffer preparation

- Wash/binding buffer(pH 7.4): 20mM sodium phosphate/150mM NaCl/0.02% NaN₃
- Elution buffer(pH 3.0): 100mM glycine-HCl
- Neutralization buffer(pH 9.0): 1M Tris-HCl

나) Antiserum preparation

- IGFBP-3 항혈청 2 ml를 binding buffer로 1:5 비율로 희석
- 0.45 μ m filter로 filtration

다) Resin preparation and IgG purification (4°C에서 수행)

- Resin(protein A-agarose) 4ml을 충분한 양의 wash/binding buffer로 equilibration

- 조심스럽게 나)에서 희석된 항혈청을 column에 loading하고 peristaltic pump를 이용하여 column flow-through를 overnight recirculation
- Column을 wash/binding buffer로 washing
- 10ml의 elution buffer로 결합되어있는 IgG를 elution
- 250 μ l의 neutralization buffer를 eluate에 첨가하여 중화
- Column regeneration
- 10% SDS-PAGE & Coomassie staining(Fig. 4-2)
- 결과: Fig. 4-2의 lanes 4 & 9에서 알 수 있듯이 mg 단위의 IgG 분리 성공

2) Affi-Prep HZ hydrazide support(BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용한
IGFBP-3 immuno-affinity chromatography

가) Buffer preparation

- Oxidation buffer: 0.02M sodium acetate(pH 5.0)/0.15M NaCl
- Coupling buffer: 0.1M sodium acetate(pH 4.5)/1M NaCl

나) Antibody preparation

- 1)에서 IGFBP-3 항혈청으로부터 정제된 IgG를 oxidation buffer 속에서 dialysis(MWCO: 6~8,000)

다) Immobilization procedure

- IgG의 oxidation
 - 0.5M sodium periodate (NaIO₄) stock solution 준비(4℃)
 - 정제된 antibody의 1/50에 해당하는 periodate stock solution을 첨가

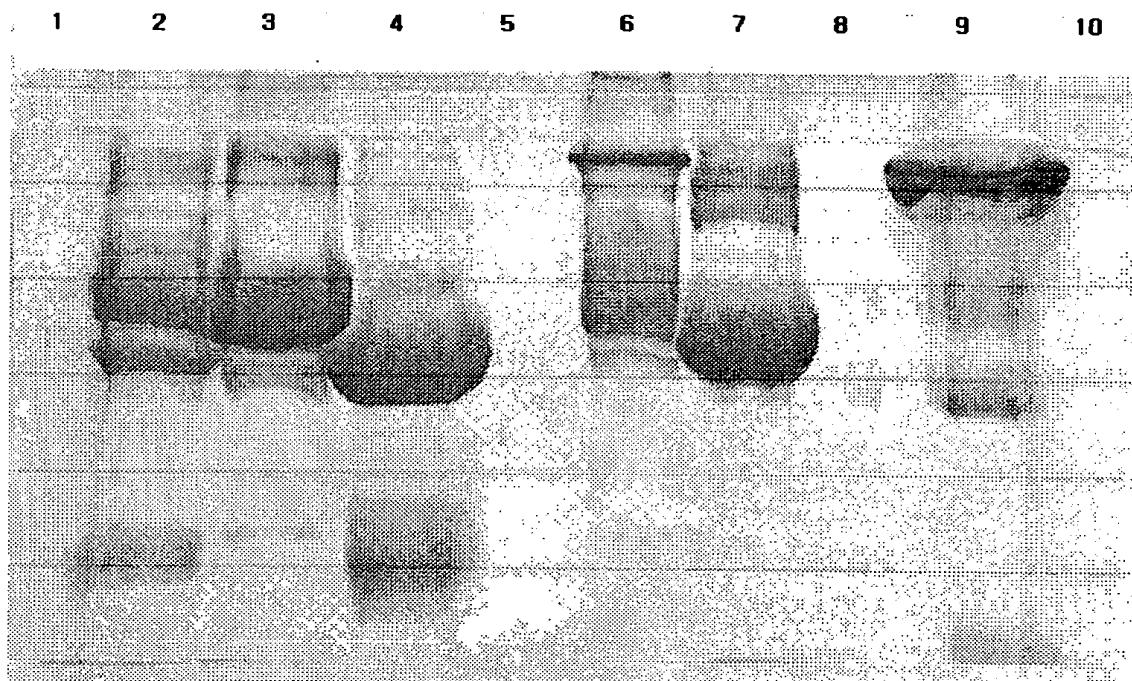


Fig 4-2. SDS-PAGE and Coomassie staining of IgG purified from pig IGFBP-3 antiserum using Protein A-agarose. Lanes 2 & 6, 0.5 μ l serum; lanes 3 & 7, 5 μ l 0.5% BSA; lanes 4 & 8, 12 μ l IgG. Lanes 2, 3 and 4 were electrophoresed under non-reducing conditions; lanes 6, 7 and 9 were under reducing conditions.

- Container를 호일로 싸서 보통 실온에서 30분간 반응
- Oxidation 후 곧바로 1/20 부피의 glycerol을 첨가하고 10분간 섞음
- Sodium periodate를 제거하기 위해 coupling buffer로 교환(Dialysis, O/N)→약 5 ml 정도 되었다.

- Affi-prep HZ support 준비
 - 적당량의 support를 bottle에 옮겨 가라앉혀 isopropanol 상층액을 제거
 - 10배의 증류수로 washing
 - 10배 부피의 coupling buffer(pH 4.5)로 washing, x2
- 산화된 IgG를 Affi-prep HZ support에 coupling
 - Support에 동량의 buffer를 첨가하여 섞고 slurry를 container로 옮긴 후 침전시키고 coupling 전에 settled support 위의 buffer 제거
 - Washed Affi-prep HZ support에 oxidized IgG를 첨가
 - 실온에서 24시간 rocker 위에서 coupling 반응
 - Coupling 반응이 끝난 후 Affi-prep HZ/IgG slurry를 column(1.5 x 15cm)에 packing
 - 3배 부피의 washing buffer(20mM sodium phosphate/0.5M NaCl, pH 7.0)를 함유하는 buffer로 washing
 - Column eluate 수거
 - 0.02% sodium azide를 함유하는 buffer에 column 보관(4℃)
- Aliquot를 SDS-PAGE하여 IgG coupling efficiency 추정(Fig. 4-3)

라) IGFBP-3 immuno-affinity chromatography

- Diafiltration(MWCO: 100kDa) unit 준비
 - 전날 Alcohol로 충분히 diafiltration unit를 soaking(O/N)
 - Alcohol 제거
 - Distilled H₂O 1.5 ℓ 로 10분간 diafiltration unit washing, x2
 - 새로운 물 2 ℓ 로 10분간 system washing
 - 1x 10mM PBS 2 ℓ 로 10분간 system washing, x2

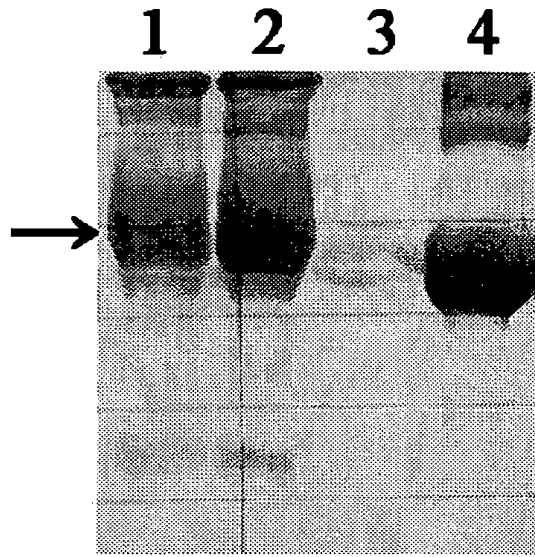


Fig 4-3. SDS-PAGE and Coomassie staining of IgG before and after coupling. Lane 1, IgG purified from IGFBP-3 antiserum; lane 2, oxidized IgG before coupling; lane 3, IgG after coupling. An equivalent amount of sample was loaded in lanes 1~3(see procedures for details). For reference, 25 μ g BSA was loaded on lane 4. Based on the relative band intensity, the coupling efficiency was estimated to be >80%.

- 혈청 준비

- 1L의 돼지혈청 시료를 동부피의 10mM PBS와 혼합하고 여과
- Diafiltration 개시
- Diafiltration된 800ml sample을 filter paper로 여과한 후 0.45 μ m filter로 재여과(diafiltrated sample의 pH로 buffer exchange 확인)

- GFBP-3 immuno-affinity chromatography
 - Affi buffer(10mM PBS/0.02% NaN₃)로 equilibration 된 IGFBP-3 항체-Hydrazide(6ml bed vol)에 10mM PBS (pH 7.5)/0.02% NaN₃로 equilibration된 ~800ml의 혈청시료를 섞고 rotating shaker에서 incubation(4℃, 0/N)
 - 다음날 가만히 세워 상층액 제거
 - 상층액을 sintered glass filter 위에서 washing
 - Washed resin은 2개의 ~15ml Econo column에 packing시키고 affi buffer로 washing
- 아래와 같은 방법으로 항체에 결합된 항원을 elution

Column 1: NaCl elution

- ① 50mM PBS/1M NaCl(pH 7.5)로 elution시키고 2ml fractions 수거
- ② 12ml 0.5 M AcH(pH 3.0)로 ①에서 제거되지 않은 물질을 elution시키고 Centricon-30을 이용하여 ~0.3ml로 농축

Column 2: NaSCN elution

- ① 4M NaSCN(pH 7.0)으로 elution시키고 2ml fractions 수거
- ② 12ml 0.5M AcH(pH 3.0)로 ①에서 제거되지 않은 물질을 elution시키고 Centricon-30을 이용하여 ~0.3ml로 농축

마) Modified ligand blotting으로 정제된 ALS 양과 순도 확인(Fig. 4-4)

- hIGFBP-3 존재 혹은 비존재하에 [¹²⁵I]IGF-II ligand blotting을 하여 ALS의 존재 여부 확인(Lee와 Rechler, 1995b); ligand blotting에서 ALS는 hIGFBP 존재하에 [¹²⁵I]IGF-II 및 hIGFBP-3와 결합하여 membrane 위에서 ~85-kDa band 형성.

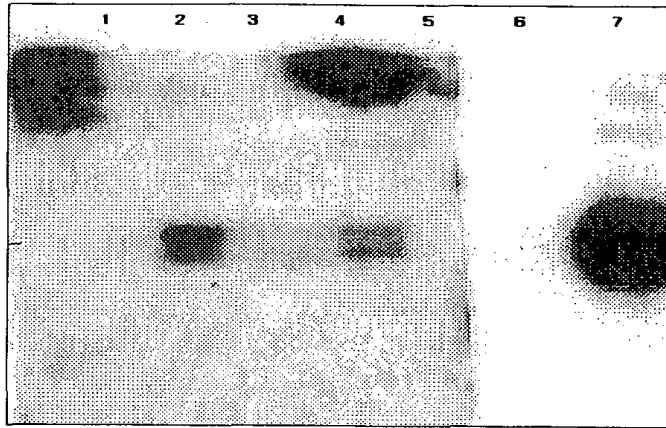


Fig. 4-4. Ligand blot analysis using [¹²⁵I]IGF-II in the presence(lanes 1~4) or absence(lanes 6 and 7) of hIGFBP-3(1μg). Lane 1, porcine serum; lane 2, serum IGFBPs purified by IGF-I affinity chromatography; lane 3, NaSCN eluate from the IGFBP-3 immuno-affinity column; lane 4, NaCl eluate from the affinity column; lane 5, blank; lane 6, NaSCN eluate; lane 7, NaCl eluate.

- 결과:

- Lanes 3 & 4에서 40~45-kDa의 doublet IGFBP-3 bands는 검출되었으나 ~ 85-kDa의 ALS band는 검출되지 않았으므로 이 결과는 NaCl 혹은 NaSCN에 의해 충분한 양의 ALS가 IGFBP-3 immuno-affinity column으로부터 elution 되지 않았음을 의미한다.
- Lanes 6 & 7의 결과는 1M NaCl에 의해서는 affinity column의 IGFBP-3 항체에 결합되었던 IGFBP-3는 거의 모두 elution되었으나 4M NaSCN에 의해서는 제한된 양의 IGFBP-3만이 elution되었음을 의미한다.
- Immuno-affinity column eluate을 ±hIGFBP-3 하에 disuccinimidyl suberate로 [¹²⁵I]IGF-II와 affinity cross-linking 하여 SDS-PAGE &

autoradiography로 검사해 보았으나(Lee 와 Rechler, 1995a) eluate 속에 ALS의 존재를 확인할 수 없었다(결과 미제시).

2. 돼지(porcine) IGFBP-3(pIGFBP-3) 정제

두 가지 방법으로 돼지 혈청으로부터 pIGFBP-3의 정제를 시도하였다. 두가지 방법 공통적으로 산성 pH하에서 SP Sephadex C-25 cation exchange chromatography로 IGFBP에 결합되어 있는 IGF ligand를 제거한 다음 IGF-I affinity chromatography로 total serum IGFbps를 정제하였다. Total IGFbps로부터 IGFBP-3 분리는 ① SDS-PAGE & electro-elution 다음 Bio-Bead SM-2를 이용하여 SDS를 제거하고 Centricon으로 농축시키는 방법과 ② C_{18} reverse-phase HPLC 방법을 시도하였다. 본 연구기간 동안 총 20L 이상의 돼지혈청으로부터 total IGFbps를 정제하여 IGFBP-3 분리를 시도하였으나 ① 방법은 SDS가 완전히 제거되지 않거나 4 °C 보관중 degradation되어 RIA standard로 쓸 수 없음이 밝혀졌고(결과 미제시), ② 방법은 두 기종의 HPLC units를 써서 기 발표된 procedure(Zapf 등, 1988)대로 수차례 chromatography를 시도하였으나 IGFBP-3가 분리되지 않았다. 다음은 ② 방법의 과정과 대표적인 결과이다.

가. SP Sephadex C-25 cation exchange chromatography

- 50gm SP Sephadex C-25 cation-exchange resin을 1 M acetic acid(pH 3.0)에 equilibration시킨 후 상온에서 48시간 동안 swelling
- cation-exchange resin이 swelling되는 동안 1L의 혈청과 1L의 2 M acetic acid/150mM NaCl 용액을 섞어 최종 pH가 3.0 되게 적정한 후 10개의 250ml centrifuge bottles에 옮겨 rotating shaker 위에서 상온에서 3시간 동안

혼합

- 각각의 centrifuge bottle에 35ml의 swollen SP Sephadex C-25 resin을 넣고 상온에서 24시간 동안 rotating shaker 위에서 혼합
- Resin을 가라앉히고 상등액을 cheese cloth와 Whatman filter로 걸러 수거한 다음 10 N NaOH로 pH 6.5 되게 적정
- 중화된 시료는 40ml centrifuge tube에 옮겨 넣고 JA-20 rotor로 39,000 x g(18,000rpm)/4 °C에서 1시간 동안 원심분리하여 침전물 제거
- Whatman filter로 2회 더 침전물을 제거

나. IGF-I affinity chromatography

- 2mg IGF-I이 결합된 Sepharose-4B-IGF-I affinity column(Lee와 Rechler, 1995a)에 “가”에서 준비한 시료를 loading(1ml/분; 4 °C)
- 0.5 M NaCl(70ml/시간)로 affinity column을 washing
- 결합된 IGF-BPs를 15ml의 0.5 M acetic acid(pH 3.0)로 elution
- Centricon-30 ultraconcentrator로 농축시켜 진공건조기로 건조→4 °C 보관

다. C₁₈ reverse-phase HPLC

- 건조되어 4 °C에 보관되었던 total IGF-BPs를 0.2ml의 solution A(3 vol.)와 solution B(1 vol.) 혼합액(아래 참조)에 용해시켜 Zapf등(1988)의 procedure에 따라 다음과 같이 HPLC를 수행하였다(Table 4-13).

Table 4-13 The mobile phase gradient of C₁₈ reverse-phase HPLC¹

Retention time (min)	Solution A ^a	Solution B ^b	Effective [CH ₃ CN]
0	75%	25%	20%
18	55	25	36
78	34	45	52.8
91	27	66	58.4
101	75	73	20

¹1min/fraction: 1.5ml/fraction.

^a0.1M heptafluorobutyric acid(CF₃CF₂CF₂COOH).

^b20% solution A + 80% acetonitrile(CH₃CN).

- 각각의 HPLC fraction으로부터 50μl 씩을 건조시켜 silver-staining을 하고 나머지는 건조하여 4 °C에 보관하였다.

- 결과:

- Zapf 등(1988)의 쥐 혈청 IGFBP_s에서와는 달리 pIGFBP-3는 타 IGFBP_s로부터 분리되지 않았다(Fig. 4-5).
- 본 실험을 수차례 반복하였으나 IGFBP-3는 분리되지 않았다.

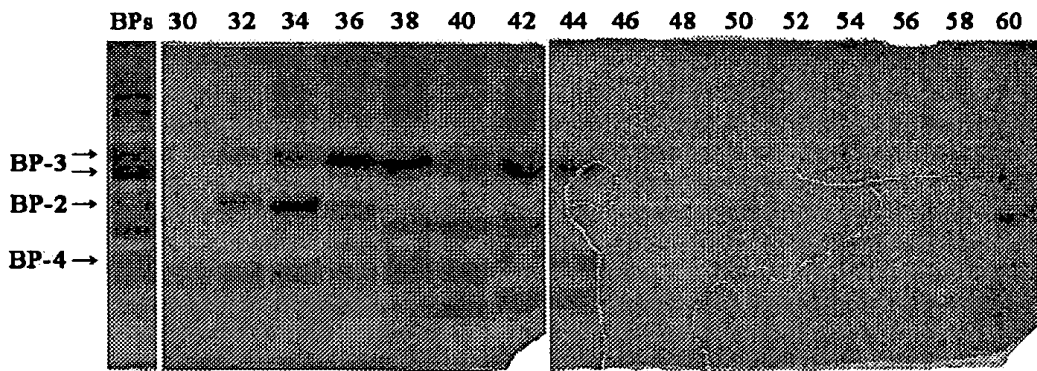
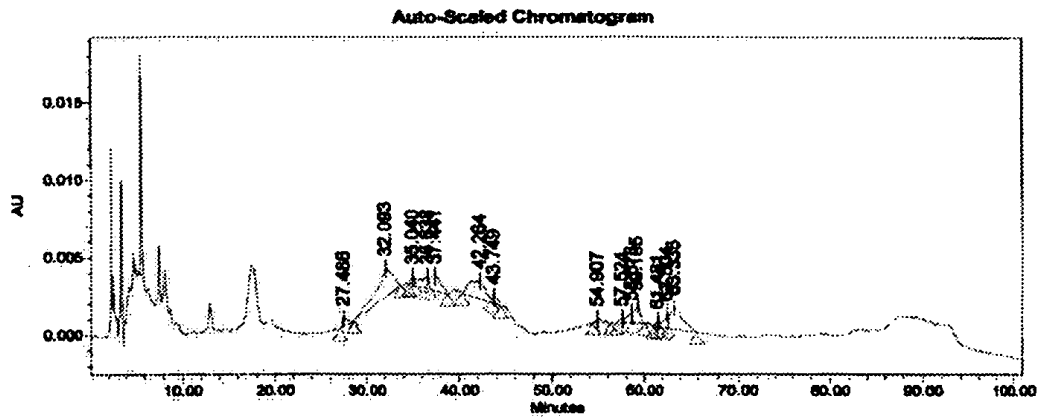


Fig. 4-5. C₁₈ reverse-phase HPLC of IGFbps. *Upper panel*, A₂₈₀ of the HPLC fractions. *Lower panel*, silver staining of the HPLC fractions following SDS-PAGE. For reference, a typical silver-staining result of the total IGFbps preparation which was used for the HPLC is shown at the leftmost lane.

제 5 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1절 주요 결과와 제언

다음은 본 연구개발 과제의 주요결과와 결과의 유용성에 관한 제언이다.

1. 돼지(porcine) ALS(pALS) genomic DNA clones

가. pALS protein의 모든 coding sequence를 포함하는 3개의 DNA 단편 cloning 완료

나. 활용

- 1) ALS 유전자 구조와 전사조절 메커니즘 연구를 위한 기초자료
- 2) ALS의 분자생물학적 연구에 필요한 probes 제공

2. pALS 유전자의 생체 발현 특성 규명

가. 간에서의 ALS 유전자 발현의 성장호르몬 의존성 규명 및 간 이외의 조직에서 ALS 유전자 발현 확인

나. 활용

- 1) 혈액 이외의 체액과 조직에서의 ALS protein 분포와 기능 연구의 교두보
- 2) IGF:IGFBP와 무관한 ALS 기능 연구의 학술적 근거

3. pALS expression 및 항혈청 생산

가. Pro- & eucaryotic pALS expression systems 확립 및 항혈청 생산 완료

나. 활용

- 1) ALS 연구를 위한 ALS protein 생산
- 2) 세포 수준에서의 ALS 연구를 위한 transfection용 ALS expression construct 제공
- 3) pALS RIA 개발과 이용

4. IGF system components의 혈중농도와 종돈의 성장 및 번식형질간의 상관관계 구명

가. 주요 연구내용과 결과

- 1) 농협중앙회 종돈사업소 보유 종돈에 대해 가계의 유전능력을 활용하여 BLUP-animal 기법으로 성장 및 번식형질에 대한 육종가를 계산하고, 경제형질별 계산된 육종가를 기준으로 품종별 low-line과 high-line으로 분류
- 2) 품종별, 형질별 및 성장 혹은 번식 단계별 low-line 대비 high-line의 IGF system components의 혈중농도 차이 유무 분석
- 3) 품종별, 형질별 및 성장 혹은 번식단계별 IGF system components의 혈중농도와 성장 혹은 번식형질간의 상관관계 분석
- 4) 2 & 3) 결과의 일관성 검정
- 5) 주요결과

가) 25kg & 60kg시 IGF-I의 혈중농도는 선발시(100kg) 등지방두께 및 정육률과 부의 상관관계

나) 60kg시 IGF-I의 혈중농도는 선발시까지의 일당증체량과 정의 상관관계

나. 활용

- 1) IGF 혈중농도를 이용한 조기선발지표 개발을 위한 기초자료 제공
- 2) IGF 혈중농도를 육종가로 계산하여 신빙성 검증

제 2 절 연구 성과(발표 논문)

Lee CY, Chung CS, Choi WS, Simmen RCM, Simmen FA 2001 Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit of the insulin-like growth factor-binding protein complex and detection of ALS gene expression in hepatic and non-hepatic tissues. J Mol Endocrinol 26:135-144

제 6 장 인 용 문 헌

Adashi EY, Resnick CE, Hurwitz A, Ricciarelli E, Hernandez ER, Roberts CT, Leroith D, Rosenfeld R 1991 Insulin-like growth factors: the ovarian connection. *Hum Reprod* 6: 1213-1219

Baxter RC 1990 Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (α) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1347-1353.

Baxter RC, Dai J 1994 Purification and characterization of the acid-labile subunit of rat serum insulin-like growth factor binding protein complex. *Endocrinology* 134:848- 852

Baxter RC, Martin JL, Benian VA 1989 High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. *J Biol Chem* 264:11843-11848

Boisclair YR, Seto D, Hsieh S, Hurst KR, Ooi GT 1996 Organization and chromosomal localization of the gene encoding the mouse acid labile subunit of the insulin-like growth factor binding complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10028-10033

Breier BH, Gluckman PD, Blair HT, McCutcheon SN 1989 Somatotropic receptors in hepatic tissue of the developing male pig. *J Endocrinol* 123: 25-31

Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA 1994 Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex. *Endocrinology* 134:2498-2504

Chung CS, Etherton TD, Wiggins JP 1985 Stimulation of swine growth by porcine growth hormone. J Anim Sci 60: 118-130

Cohick WS 1998 Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation J Dairy Sci 81: 1769-1777

Cox NM 1997 Control of follicular development and ovulation rate in pigs. J Reprod Fert Suppl 52: 31-46

Dai J, Baxter RC 1992 Molecular cloning of the acid-labile subunit of the rat insulin-like growth factor binding protein complex. Biochem Biophys Res Commun 188: 304-309

Dai J, Baxter RC 1994 Regulation *in vivo* of the acid-labile subunit of the rat serum insulin-like growth factor-binding protein complex. Endocrinology 135:2335-2341

Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL 1980 Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. J Clin Endocrinol Metab 51:781-788

Delhanty P, Baxter RC 1996 The cloning and expression of the baboon acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. Biochem Biophys Res Commun 227:897-902

Delhanty PF, Baxter RC 1997 Cloning and characterization of the rat gene for the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex. J Mol Endocrinol 19:267-277

Ellis M, McKeith FK, Miller KD 1999 The effects of genetic and

nutritional factors on pork quality. *AJAS* 12: 261-270

Enfalt AC, Lundstrom K, Karlsson A, Hansson I 1997 Estimated frequency of the RN-allele in Swedish Hampshire pigs and comparison of glycolytic potential, carcass composition, and technological meat quality among Swedish Hampshire, Landrace, and Yorkshire pigs. *J Anim Sci* 75: 2924-2935

Etherton TD, Kensinger RS 1984 Endocrine regulation of fetal and postnatal meat animal growth. *J Anim Sci* 59: 511-528

Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH 1991 Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253: 448-451

Furlanetto RW 1980 The somatomedin C binding protein: evidence for a heterologous subunit structure. *J. Clin Endocrinol Metab* 51:12-19

Gluckman PD, Douglas RG, Ambler GR, Breier BH, Hodgkinson SC, Koea JB, Shaw JHF 1991 The endocrine control of insulin-like growth factor I. *Acta Padiatr Scand Suppl* 372: 97-105

Hammond JM, Samaras SE, Grimes R, Leighton J, Barber J, Canning SF, Guthrie HD 1993 The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. *J. Reprod Fertil suppl* 48:117-125

Hansen HO, Knudsen J 1991 Lactating goat mammary gland cells in culture. *Comp Biochem Physiol* 99A: 129-135

Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Gardouin S, Binoux M 1986

Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding sites. *Anal Biochem* 154:138-143

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

Kaelin WG Jr, Pallas DC, Decaprio JA, Kaye FJ, Livingston DM 1991 Identification of cellular proteins that can interact specifically with T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64:521-532

Klindt J, Buonomo FC, Yen JT 1992 Administration of porcine somatotropin by sustained- release implant: growth and endocrine responses in genetically lean and obese barrows and gilts. *J Anim Sci* 70: 3721-3733

Koea JB, Breier BH, Shaw JHF,, Gluckman PD 1992 A possible role for IGF-II: evidence in sheep for *in vivo* regulation of IGF-I mediated protein anabolism. *Endocrinology* 130:2423-2425.

Kroonsberg C, McCutcheon SN, Siddiqui RA, Mackenzie DD, Blair HT, Ormsby JE, Breier BH, Gluckman PD 1989 Reproductive performance and fetal growth in female mice from lines divergently selected on the basis of plasma IGF-I concentrations. *J Reprod Fert* 87: 349-353

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

Lee CY, Bazer FW, Etherton TD, Simmen FA 1991 Ontogeny of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in porcine

serum during fetal and postnatal development. *Endocrinology* 128: 2336-2344

Lee CY, Bazer FW, Simmen FA 1993a Expression of components of the insulin-like growth factor system in pig mammary glands and serum during pregnancy and pseudopregnancy: effects of oestrogen. *J Endocrinol* 137: 473-483

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

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

Lee CY, Lee HP, Jeong JH, Baik KH, Jin SK, Lee JH, Sohn SH 2002 Effects of restricted feeding, low-energy diet, and implantation of trenbolone acetate plus estradiol on growth, carcass traits, and circulating concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 in finishing barrows. *J Anim Sci*(in press)

Lee CY, Rechler MM 1995a A major portion of the 150-kilodalton insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) complex in adult rat serum contains unoccupied proteolytically nicked IGFBP-3 that binds IGF-II preferentially. *Endocrinology* 136: 668-678

Lee CY, Rechler MM 1995b Purified rat acid-labile subunit and recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 can form a 150-kilodalton binary complex *in vitro* in the absence of IGFs. *Endocrinology* 136: 4982-4989

Lee CY, Rechler MM 1996 Proteolysis of insulin-like growth factor (IGF)

binding protein-3 (IGFBP-3) in 150-kilodalton IGFBP complexes by a cation-dependent protease activity in adult rat serum promotes the release of bound IGF-I. *Endocrinology* 137: 2051-2058

Leong SR, Baxter RC, Camerato T, Dai J, Wood WI 1992 Structure and functional expression of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor-binding protein complex. *Mol Endocrinol* 6: 870-876

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (IGFr). *Cell* 75: 59-72

Ooi GT, Cohen FJ, Tseng LY, Rechler MM, Boisclair YR 1997 Growth hormone stimulates transcription of the gene encoding the acid-labile subunit (ALS) of the circulating insulin-like growth factor binding protein complex and ALS promoter activity in rat liver. *Mol Endocrinol* 11:997-1007

Owens PC, Gatford KL, Walton PE, Morley W, Campbell RG 1999 The relationship between endogenous insulin-like growth factors and growth in pigs. *J Anim Sci* 77:2098-2103

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

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

Rhoads RP Greenwood PL, Bell AW, Boisclair YR 2000 Organization and regulation of the gene encoding the sheep acid-labile subunit of the

150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein complex. *Endocrinology* 141:1425-1433

Rothschild M, Jacobson C, Vaske D, Tuggle C, Wang L, Short T, Eckardt G, Sasaki S, Vincent A, McLaren D, Southwood O, van der Steen H, Mileham A, 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

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

SAS 1996 User's Guide: Statistics. SAS Inst., Cary, NC, USA

Short TH, Rothschild MF, Southwood OI, McLaren DG, de Vries A, van der Steen H, Eckardt GR, Tuggle CK, Helm J, Vaske DA, Mileham AJ, Plastow GS 1997 Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J Anim Sci* 75: 3138-3142

Siddiqui RA, Blair HT, McCutcheon SN, Mackenzie DD, Gluckman PD, Breier BH 1990 Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and body growth in mice from lines divergently selected on the basis of plasma IGF-I. *J Endocrinol* 124: 151-158

Twigg SM, Baxter RC 1998 Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273:6074-6079

Ueki I, Ooi GT, Tremblay ML, Hurst KR, Bach LA, Boisclair YR 2001 Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc Natl Acad Sci USA*

97:6868-6873

Yun JS, Kang WJ, S대 DS, Park SS, Hong KC, Lee CY, Ko Y 2001 Association of endocrine factors (insulin-like growth factor-II) and binding protein-3) with litter size in pigs. J Asian-Aust J Anim Sci 14:307-315

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

김철욱, 조광근, 최윤재, 박외선, 권은정 1998 Porcine ryanodine receptor 유전자의 mutation을 확인하기 위한 double tube allele specific primer PCR의 이용. 한국축산학회지 40: 227-234

박영일, 박태섭, 신영수, 이학교, 김형균, 오하식, 손창준, 한재용 1997 PCR-RFLP 기법을 이용한 PSS 돼지 검색에 관한 연구. 한국동물유전육종학회지 1: 73-80

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

이철영 1997 착상기 insulin-like growth factor system의 역할. 한국수정란이식학회지 12: 229-246

이철영. 2000. Insulin-like growth factor system과 성장, 대사 및 영양과의 관계. 동물자원지 42:795-816

이철영, 정정수 2000 암돼지와 거세돼지의 성장발달에 따른 혈중 insulin-like growth factor-I(IGF-I)과 IGF-binding protein-3(IGFBP-3)의 농도 양상: 돼지 IGFBP-3 정제, IGFBP-3 및 IGF-I RIAs 개발과 이용. 한국동물자원과학회지 42:817-826