

## Differential display RT-PCR 기법을 이용한 돼지 등심조직의 품종 간 발현차이 유전자의 연구

김남국, 조중호, 임종현, 방경정, 송민진, 박범영<sup>2</sup>, 김언현<sup>1</sup>, 이창수\*

건국대학교 생명과학부 응용생화학전공

<sup>1</sup>건국대학교 축산학과, <sup>2</sup>축산기술연구소

### 서 론

재래돼지는 성장속도가 느리고 생산율이 낮아 양돈 농가의 경제적 부담으로 선호도가 낮았으나, 개량중에 비하여 지방이 단단하고 백색이며, 풍부하고 담백한 육즙으로<sup>(1)</sup> 최근 소비가 증가하는 추세에 있다. 돼지에 있어 육종개량의 목표는 종래 생산능력이나 지육의 경제성에 초점을 두었으나, 최근에는 육질을 중시하는 쪽으로 바뀌고 있다. 또한, 이러한 형질개량의 선발기준으로서 비교적 단순한 경제능력의 시험성적에서 표현형질에 영향을 미치는 유전적 요인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 재래돼지 육질 및 유전적 특성연구나 육질연관 유전자원에 대한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 현재까지 육질과 관련된 유전자로는 PSE (pale, soft, exudative) 돈육의 원인으로 알려진 ryanodine receptor gene (RYR)<sup>(2)</sup>과 산성 육에 관여하는 RN (Rendement Napole) 유전자(3)가 잘 알려져 있으나, 재래돼지와 연관성은 상당히 낮은 것으로 보고 되고 있다.

Differential display (DD) RT-PCR 방법은 PCR 기법을 이용하여 개체 간 발현의 차이를 보이는 유전자를 동정하는 실험기법으로 보편적으로 활용되고 있는 분자 유전학적 분석 기법이다. 이러한 분석기법을 활용한 다양한 유전자원의 확보는 돼지 육종개량을 위한 중요한 의미를 지니며, 재래돼지의 유전적 특성 및 육질관련 유전자 확보에 다양한 자료를 제공할 수 있다. 본 연구에서는 다양한 육질 특성을 지닌 돼지 품종을 이용하여 발현차이 유전자를 동정하고 이를 이용한 육질관련 유전자 marker를 확보하기 위하여 수행되었다.

### 재료 및 방법

#### Animal

발현차이 유전자 동정을 위해 평균 200일령 재래돼지, 랜드레이스 및 요크셔 품종 각 10두를 사용하였다. 시료는 도축 후 30분 이내에 등심 (*longissimus dorsi*)을 취하여 채취 즉시 액체질소로 냉각하였고, 결체조직과 지방조직을 제거 후 분쇄하고, 실험 전까지 -80℃에

보관하여 사용하였다.

#### Differential display RT-PCR

품종 간 서로 다르게 발현되는 유전자 (DEGs; differential expressed genes)를 탐색하기 위하여 TRizol reagent (Invitrogene Life Technologies, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하고<sup>(4)</sup>, 추출된 RNA 1 $\mu$ g을 이용하여 cDNA 합성에 이용하였다. GeneFishing DEG kits (Seegene, USA)의 서로 다른 40개의 ACP (annealing control primer)를 이용하여 발현차이 유전자 탐색에 이용하였다. 반응된 PCR product는 agarose상에서 확인하였고, 유전자 발현의 차이를 보이는 유전자 단편을 agarose상에서 회수하여 재 증폭한 후 cloning 기법을 통해 유전자 염기서열을 결정하였다.

#### mRNA analysis

발현의 차이가 관찰된 유전자의 발현량 분석을 위해 RT-PCR을 수행하였다. TRizol reagent를 이용하여 추출된 total RNA 1 $\mu$ g을 이용하여 cDNA를 합성하고, 이를 PCR 반응의 주형으로 이용하였다. 각 유전자의 발현량 비교를 위해 GenBank에 보고된 유전자 염기서열을 기초로 하여 primer를 제작하고 (Table. 1), 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 40초 조건으로 21회 반응시켜 PCR 산물을 확인하였다. PCR 산물은 Kodak 1D software를 이용 정량하고, Student *-t* test를 통해 품종 간 통계적 유의성을 검증하였다.

Table 1. Primer sequences for PCR amplification of specific genes

Gene		Sequences (5'-3')
NADH	Forward	CAG GAT GAG CAT CCA ACT CA
	Reverse	TAT GGC TAG GGG TCA GGA TG
ATP6	Forward	CTA TTC CCA ACA CCC AAA CG
	Reverse	TGG GTG TGA ATG AGT GTG GT
$\beta$ -Actin	Forward	ACA TCA AGG AGA AGC TCT GC
	Reverse	GGC GAT GAT CTT GAT CIT CA

## 결과 및 고찰

GeneFishing DEG kits을 이용한 발현차이 유전자를 확인한 결과 2개의 primer set에서 발현의 차이를 관찰할 수 있었다. 발현차이 유전자는 cloning기법을 통해 염기서열을 결정하고, BLAST program을 이용하여 상동성 검사를 실시하였다. 상동성 검색 결과 NADH dehydrogenase 1과 ATPase 6 유전자와 각각 99%의 상동성을 보였다 (Figure. 1). 두 유전자 모두 mitochondria 유전자로서 전자전달계와 관련되어 에너지 합성에 관련된 유전자로 잘 알려져 있다<sup>(5)</sup>. 확인된 2개의 유전자는 RT-PCR을 통해 품종 간 발현량 차이를 분석하였다. RT-PCR 결과 재래돼지에서 다른 외래 품종에 비해 모두 2배 이상 높은 발현을 보

임을 확인하였다 ( $p < 0.01$ ) (Figure. 2). 기존 연구에 있어 재래돼지를 포함한 돼지 품종에 대한 국내의 연구는 대부분 돈육의 이화학적 특성 분석에 초점을 두고 있었으며, 유전자원에 대한 연구는 아직 미흡한 실정에 있다. 본 연구를 통해 확인된 에너지 대사관련 유전자의 연구를 통해 재래돼지의 유전적 특성 및 기능에 대한 충분한 연구가 진행되어야 할 것이며, 현재 육질과의 관련성 분석을 수행 중에 있다.

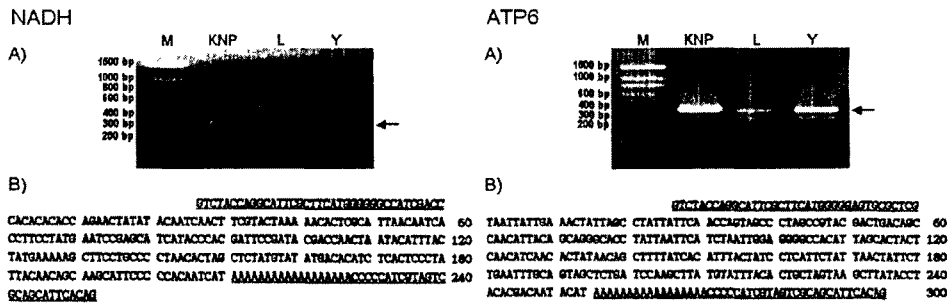


Figure 1. Expression patterns of the DD RT-PCR from the different breed. A) The RT-PCR products were electrophoresed on a 1.7% agarose gels and stained by ethidium bromide. M, 100bp-1kb DNA Ladder (Bio Basic Inc., Canada). B) Nucleotide sequence of the differentially expressed gene.

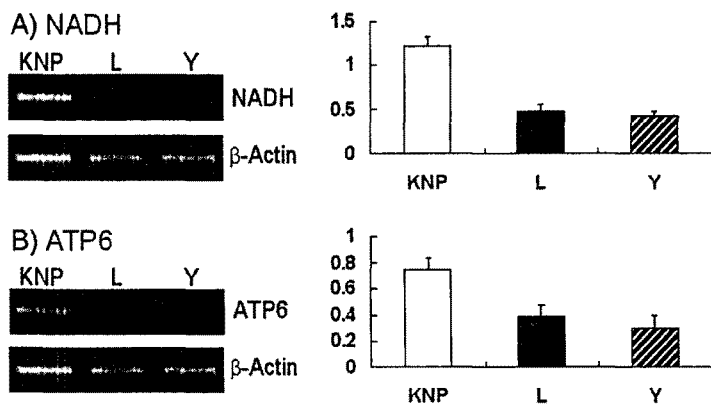


Figure 2. Expression patterns of the NADH, ATP6 and  $\beta$ -actin from the different breed. A) The RT-PCR products were electrophoresed on a 1.7% agarose gels and stained by ethidium bromide. M, 100bp-1kb DNA Ladder (Bio Basic Inc., Canada). B) The relative mRNA levels of the specific genes. The value of specific genes was normalized to that of housekeeping gene  $\beta$ -actin, as the ratio of target genes to  $\beta$ -actin gene. The data are expressed as means standard error (SE).

## 요 약

본 연구는 성장 속도 및 서로 다른 육질 특성을 지닌 돼지 품종을 이용하여, 육질 및 성장에 관련된 유전자원을 확보하고, 이를 이용한 유전 육종의 기초 자료를 제공하기 위하여 수행하였다. Differential display (DD) RT-PCR 기법을 통해 돼지 품종 간 발현 차이를 보이는 유전자인 NADH dehydrogenase 1과 ATPase 6를 동정하였다. 동정된 유전자의 발현량 분석을 위한 RT-PCR 결과, 각 유전자의 발현량이 재래돼지에서 외래 품종 (랜드레이스 및 요크셔)에 비해 2배 이상 높음을 확인 할 수 있었다 ( $p < 0.01$ ). 이러한 발현차이 유전자를 이용하여 육질과의 관련성 연구 및 유전자의 기능에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Jin, S. K. et al. (2001) *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 21, 142-148
2. Fujii, j., et al. (1991) *Sci.*, 253, 448-451
3. Josell, A., et al. (2003) *Meat Sci.*, 65, 651-660
4. Chomczynski, P., (1993) *Biotechniques*, 15, 532-53
5. Wikstrom, M., et al. (1980) *Current Topics in Bioenergetics* 10, 51-101