

## 에스트로젠 수용체 유전자의 다형 현상 추정을 위한 응고 및 건조된 돼지 혈액의 이용

서동삼\* · 양성호 · 박희복 · 박성수\*\* · 홍기창 · 고 용  
고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과

### Utilization of Porcine Clotted and Dried Blood for Estrogen Receptor Gene PCR-RFLP

Seo, D. S.\*, S. H. Yang, H. B. Park, S. S. Park\*\*, K. C. Hong and Y. Ko

Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University

#### SUMMARY

Recent development of the molecular biology techniques has made it possible to characterize and analyze early diagnoses of genetic disorders and economic trait loci.

In this study, porcine genomic DNA was extracted from both clotted and dried blood to analyze the porcine estrogen receptor (ER) gene by polymerase chain reaction (PCR). By the methods reported here, genomic DNA extracted from clotted or dried blood was efficient enough to detect ER gene by PCR. Moreover, the PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) of ER gene was identified by *PvuII* restriction enzyme. Thus the results obtained from this study show that the clotted and dried blood was useful for identification of the certain genotype in a rapid manner with low cost.

Importantly, this study implies that the whole blood can be economically utilized in studies of endocrinology, molecular biology, and genetics by obtaining both serum and DNA simultaneously in an efficient manner.

(Key words : Clotted and dried blood, Genomic DNA, ER, PCR-RFLP)

#### I. 서 론

최근 분자생물학적 기법의 발달은 유전병에 대한 조기진단과 경제형질 유전자에 대한 동정과 분석을 가능하게 하였다. 특히 경제형질과 관련하여 돼지의 산자수 증진 방안으로써 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor) 유전자를 표지인자로 사용하여 분석하였다

(Rothschild 등, 1994; 1996). 이러한 표지인자에 대한 유전자 분석은 대부분이 전혈 (whole blood) 또는 전혈로부터 분리된 백혈구층 (buffy coat)을 이용하여 genomic DNA를 추출하여 이루어져 왔다 (Sambrook 등, 1989). 그러나, 많은 표본을 분석할 경우와 빠른 유전분석 결과를 요구하는 실험의 경우 원심분리에 의한 백혈구층의 분리는 시간뿐만 아니라 경제적으로 소비가 많다고 할 수 있다. 또한 실험실에서 혈액표

본 연구는 1997년도 농림기술개발연구과제 연구지원비의 일부에 의해 수행되어진 연구 결과임.

\* : 고려대학교 자연자원연구소

\*\* : 고려대학교 생명공학원

본을 추출할 경우 혈액응고를 방지하기 위하여 EDTA를 사용하기도 한다. 이런 경우 전혈을 직접적으로 사용하여 PCR을 수행하였을 때 EDTA에 의해 PCR 수행능력이 다소 떨어지기도 한다 (Panaccio와 Lew, 1991).

응고 및 건조된 혈액을 이용한 연구는 사람뿐만 아니라 동물의 혈액 내에 특정 바이러스나 기생충의 감염에 의한 질병을 항원-항체반응을 이용하여 진단하기 위한 수단으로 이용되었다. 하지만 Campbell과 Hess (1997)가 신경계 발달과정 기작을 밝히기 위해 PCR을 이용하여 건조된 혈액으로부터 돌연변이 생쥐의 유전자형을 밝히는 연구를 실시한 것처럼, 최근에는 PCR 기법을 사용하여 감염된 병원체 유전자의 일부분을 증폭하여 원인 병원체에 대한 진단을 경제적이면서 신속하게 실시하고 있다 (Cox-Singh 등, 1997; Tan 등, 1997; Almeida 등, 1998).

한편, 내분비학적실험을 위해 채취된 혈액은 혈청을 추출하고 난 후 대부분의 응고된 혈액은 폐기 처분된다. 그러나 유전분석 실험이 병행될 경우 동일한 실험 동물로부터 혈액을 두 번 채취하는 불편을 갖게 된다. 따라서 이러한 시간과 경비가 소모적인 방법을 개량하기 위해서 본 연구에서는 내분비학적 실험을 목적으로 채취된 돼지의 혈액으로부터 혈청을 추출한 후, 응고된 혈액과 이를 건조시킨 혈액으로부터 유전적 분석을 위하여 효율적인 DNA 추출방법을 개발하고, 이 방법으로부터 추출된 DNA를 이용하여 돼지의 산자수와 연관된 표지인자인 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor) 유전자에 대한 PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)를 수행하여 유전자 분석의 가능성을 제시하고자 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시동물

호르몬 분석을 실시하기 위하여 경기도 포천에 소재하고 있는 세왕농장에서 임신 45일령인 24마리의 Yorkshire 중빈돈으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액 채취 시 혈액 응고 방지제를 첨가하지 않았으며, 응고된 혈액은 5℃에서 냉장 보관하였다. 또한 응고된 혈액은 본 연구실에서 제작한 분석용 건조지에 옮겨 clean bench 내의 실온에서 건조하여 일주일 이상 보관하였

다.

## 2. DNA 추출

### 1) 응고 혈액 표본

응고된 혈액으로 부터의 DNA 추출은 Kanai 등 (1994)이 보고한 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 250 $\mu$ l lysis 용액 (360  $\mu$ g/ml proteinase K, 150 mM sodium chloride, 50 mM EDTA, 2% SDS)에 150mg의 응고 혈액을 첨가하여 잘 섞어준 다음 55℃에서 3시간 배양하였다. 배양 후, 5.5M NaCl과 600 $\mu$ l phenol:chloroform (25:24)을 첨가하여 30분간 현탁시켰다. 현탁 후 5,000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 채워진 상층액의 2배에 해당하는 99.99% 에탄올을 첨가하였다. 다시 5,000g에서 10분간 원심분리를 실시하여 DNA를 모아서 70% 에탄올로 세척·건조하여 TE 용액 [10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1 mM EDTA]에 녹여 보관하였다. 추출된 DNA를 확인하기 위하여 1% agarose gel을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 또한 순도를 측정하기 위하여 UV spectrophotometer (Beckman, DU 650)를 사용하여 260nm와 280nm에서 각각 O.D값을 측정하였다.

### 2) 건조 혈액 표본

건조 보관된 혈액 표본이 lysis 용액에 잘 혼합될 수 있도록 1ml 증류수나 링거액에 건조 혈액 표본 50mg을 넣어 37℃에서 1시간 배양하여 잘 혼합한 후, 이로부터 200 $\mu$ l를 채취하여 250 $\mu$ l lysis 용액에 첨가하여 잘 섞었다. 55℃에서 3시간 배양한 후, 5M NaCl과 phenol:chloroform (25:24) 등의 처리 과정은 응고 혈액 표본에서 실시한 방법과 동일하게 실시하였다.

### 3. PCR 반응 및 제한효소 처리

추출된 DNA를 이용하여 에스트로겐 수용체에 대한 특정 부위를 증폭하여 증폭된 DNA 단편의 다형현상을 관찰하기 위하여 Short 등(1997)이 보고한 primer (ESRF 5'-CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG-3'; ESRR 5'-CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG-3')를 이용하였다.

PCR 반응은 AccuPowerTMPreMix-Top (BIO-

NEER Co.)에 50ng의 DNA을 혼합하여 실시하였으며, 반응조건은 Short 등(1997)이 실시한 것과 동일하게 실시하였다 (1 cycle: 94℃ 4분, 55℃ 1분, 70℃ 1분; 31 cycles: 94℃ 1분, 55℃ 1분, 70℃ 1분; 1cycle: 72℃ 8분). PCR 반응은 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co.)을 사용하여 실시하였다.

PCR 반응 후 증폭된 DNA 단편은 2.5% agarose gel을 사용하여 확인하였다. 또한 증폭된 DNA는 제한효소 (Pvu II)를 0.5μl (10 units) 첨가하여 37℃에서 5시간 배양하였으며, 제한효소에 의해 절단된 에스트로겐 수용체 유전자의 다형 현상을 관찰하기 위하여 2.5% agarose gel을 사용하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 추출된 genomic DNA

경제적이고 효율적인 DNA 추출방법을 이용하여 각각 응고·건조된 혈액으로부터 추출된 genomic DNA는 Fig. 1에서 보이는 것과 같이 온전한 상태를 나타내고 있다. 추출된 DNA에 대한 260nm/280nm에서의 흡광도 비율은 응고 혈액과 건조 혈액에서 각각 1.44~1.75와 1.38~1.85 범위였으며, DNA의 양은 응고 혈액과 건조 혈액에서 각각 0.74μg/ml~3.17μg/ml, 0.45μg/ml~0.70μg/ml 이었다. 이는 Tas(1990)가 제시한 흡광도 비율 보다는 다소 떨어지지만 phenol:chloroform(25:24)의 반복처리에 의해 충분히 극복할 수 있었다. 그러나 추출된 genomic DNA를 Hind III 제한효소를 이용하여 처리한 결과 추출된 DNA가 모두 잘 잘려졌음을 확인할 수 있었는데 (Fig. 2), 이는 분리된 DNA가 구조적으로 온전함을 암시해 주고 있다. 또한 이러한 연구 결과는 중요하게는 전혈에서 혈청을 분리한 후, 혈병을 장기 보관할 수 있고 그로부터 생물학적으로 온전한 DNA를 추출할 수 있음으로 인해 획기하고 값비싼 시료의 효율성을 증진시킬 수 있을 것이라 사료된다.

#### 2. PCR 반응

Fig. 3은 응고 혈액과 건조 혈액으로부터 추출된 genomic DNA를 이용하여 돼지 에스트로겐 수용체의 발현양상을 증폭한 결과이다. 추출된 genomic DNA

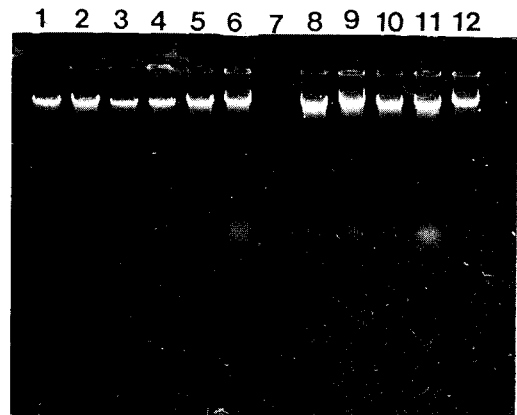


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of porcine genomic DNA (1μg per lane) purified from clotted and dried blood. (Lane 1~6: clotted blood; Lane 7: blank; Lane 8~12: dried blood).

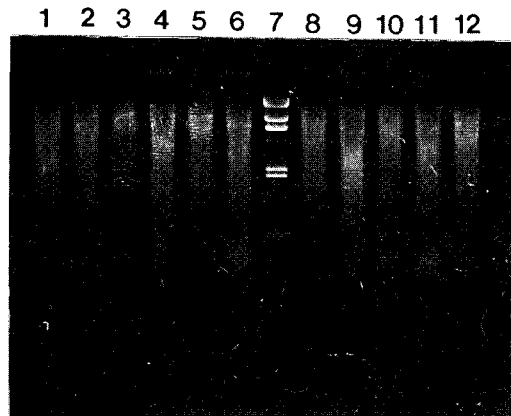


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of digested porcine genomic DNA (1μg per lane) purified from clotted and dried blood. (Lane 1~6: clotted blood; Lane 7: Size marker (λ-Hind III); Lane 8~12: dried blood).

의 순도가 다소 떨어진다 하더라도 PCR을 수행하여 에스트로겐 수용체의 특정부위(120 bp)를 증폭하여 발현을 확인하였다. 이는 DNA의 순도가 다소 떨어지지만 PCR 반응에 사용하는 데에는 문제가 없는 것을

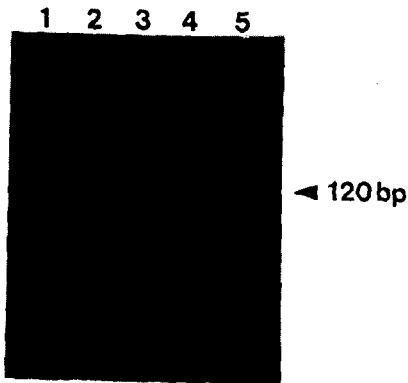


Fig. 3. The PCR products for estrogen receptor gene shown in 2.5% agarose gel. (Lane 1~2: clotted blood; Lane 3: PCR marker, Promega Co.; Lane 4~5: dried blood).

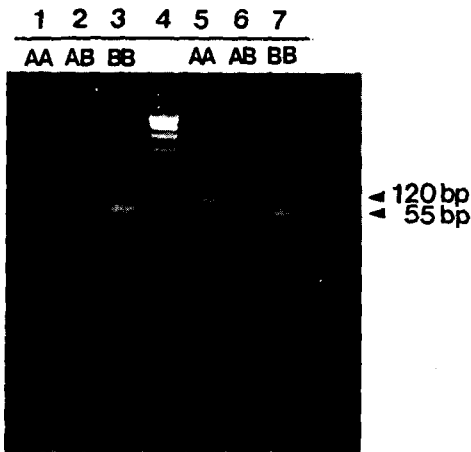


Fig. 4. The PCR-RFLP pattern of estrogen receptor gene in pigs. 2.5% Agarose gel electrophoresis was used to identify differential expression pattern of estrogen receptor gene. (Lane 1~3: clotted blood; Lane 4: size marker,  $\lambda$ -Dra I; Lane 5~7: dried blood).

나타내는 것으로서, 본 연구에서 제시한 DNA 추출 방법은 phenol 처리과정을 단축시킴으로써 특정유전자를 빠르면서 경제적으로 증폭할 수 있음을 제시하였

다. 따라서 본 결과는 분자생물학을 이용하는 타학문에서의 혈액 이용도를 한층 증가시키는 데에 일익을 담당할 것으로 사료된다.

### 3. PCR-RFLP

응고 및 건조된 혈액으로부터 증폭된 에스트로겐 수용체 유전자에 대한 다형 현상(PCR-RFLP)은 Fig. 4에 제시되었다. PvuII 제한효소에 의해 잘려진 단편은 각각 65bp와 55bp이며, 유전자형은 Short 등(1997)이 각각 제시한 AA (120bp), AB (120bp, 65bp, 55bp), BB (65bp, 55bp)형으로 분류할 수 있었다. 이러한 돼지의 에스트로겐 수용체 유전자에 대한 유전적 변이를 Rothschild 등(1991)이 밝힌 이후, 산자수 증대에 대한 표지유전자 (genetic marker)로서 에스트로겐 수용체 유전자의 이용 가능성이 보고되었다 (Rothschild 등, 1994; 1996).

결론적으로 본 연구에서는 돼지의 임신기간 중 분비되는 내분비 물질 분석 실험의 부산물인 응고·건조된 혈액을 사용하여 분석하고자 하는 개체의 유전자형을 부수적으로 밝힐 수 있으며, 내분비학적·분자유전학적 분석방법을 동시에 수행함으로써 내분비 물질 발현과 유전자형간의 관계를 동시에 구명할 수 있는 연결 가능성을 제시하고 있다. 또한 여타 축종에서도 본 연구에서 제시한 방법을 이용한다면 다량의 혈액 채취 없이 간편하면서도 경제적으로 경제형질과 관련된 유전자 분석을 실시할 수 있다는 가능성을 표출하였다.

## IV. 적 요

최근 분자생물학적 기법의 발달은 유전병에 대한 조기진단과 경제형질 관련 유전자에 대한 동정과 분석을 가능하게 하였다. 본 연구에서는 내분비학적 실험을 목적으로 채취된 돼지의 혈액으로부터 혈청을 추출한 후, 응고된 혈액과 이를 건조시킨 혈액으로부터 유전 분석을 실시하기 위해 genomic DNA를 추출하였다. 또한, 추출된 DNA를 이용하여 에스트로겐 수용체 유전자에 대한 PCR을 수행하여, 그 산물을 적절한 제한효소를 처리하여 유전자 다형 현상을 관찰할 수 있었다.

따라서 본 연구에서는 돼지의 내분비 물질 분석 실험의 부산물인 응고·건조된 혈액을 사용하여 경제적

이면서 신속하게 분석하고자 하는 개체의 유전자형을 밝힐 수 있으며, 내분비학적·분자유전학적 분석방법을 동시에 수행함으로써 내분비 물질 발현과 유전자형 간의 관계를 구명할 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 사 사

실험에 협조해 주신 (주)세왕GGP 농장 관계자 여러분께 깊은 감사를 드립니다.

## V. 인용문헌

- Almeida, P. P., M. Ndao, N. V. Meirvenne and S. Geerts. 1998. Diagnostic evaluation of PCR on dried blood samples from goats experimentally infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Tropica*, 70: 269-276.
  - Campbell, D. B. and E. J. Hess. 1997. Rapid genotyping of mutant mice using dried blood spots for polymerase chain reaction (PCR) analysis. *Brain Research Protocols*, 1: 117-123.
  - Cox-Singh, J., S. Mahayet, M. S. Abdullah and B. Singh. 1997. Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using simple sampling and DNA extraction. *International J. Parasitology*, 27(12): 1575-1577.
  - Kanai, N., T. Fujii and T. Yokoyama. 1994. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. *J. Clin. Pathol.*, 47: 1043-1044.
  - Panaccio, M. and A. Lew. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1151
  - Rothschild, M., C. Jacobson, D. Vaske, C. Tuggle, L. Wang, T. Short, G. Eckardt, S. Sasaki, A. Vincent, D. McLaren, O. Southwood, H. van der Steen, A. Mileham and G. Plastow. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 201-205.
  - Rothschild, M. F., C. Jacobson, D. A. Vaske, C. K. Tuggle, T. H. Short, S. Sasaki, G. R. Eckardt and D. G. McLaren. 1994. A major gene for litter size in pigs. *Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, 21: 225-228.
  - Rothschild, M. F., R. G. Larson, C. D. Jacobson and P. Pearson. 1991. PvuII polymorphism at the porcine estrogen receptor locus (ESR). *Anim. Genet.*, 22: 448.
  - Sambrook, J., E. R. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E5-E7.
  - Short, T. H., M. F. Rothschild, O. I. Southwood, D. G. McLaren, A. de Vries, H. van der Steen, G. R. Eckardt, C. K. Tuggle, J. Helm, D. A. Vaske, A. J. Mileham and G. S. Plastow. 1997. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.*, 75: 3138-3142.
  - Tan, T. M. C., J. S. Nelson, H. C. Ng, R. C. Y. Ting and U. A. K. Kara. 1997. Direct PCR amplification and sequence analysis of extrachromosomal Plasmodium DNA from dried blood spots. *Acta Tropica*, 68: 105-114.
  - Tas, S. 1990. Purification of DNA from clotted blood. *Clinical Chemistry*, 36(10): 1851.
- (접수일자 : 1999. 4. 30. / 채택일자 : 1999. 6. 5.)