

韓國家畜繁殖學會誌 27(2) : 97~102 (2003)
Korean J. Animal Reprod.

자돈의 제대혈 Genomic DNA를 이용한 PSS 유전자 검색

김계웅[†] · 유재영¹ · 박홍양¹ · 윤종만² · 조규석 · 정재록 · 김건중 · 이종완
공주대학교 산업과학대학 동물자원학과

Detection of PSS Gene through Genomic DNA of Umbilical Cord Blood by PCR-RFLP in Piglets

Kim, G. W.[†], J. Y. Yoo¹, H. Y. Park¹, J. M. Yoon², K. S. Cho, J. R. Chung,
G. J. Kim and J. W. Lee

Dept. of Animal Resource, College of Industrial Science, Kongju National University

ABSTRACT

This study was carried out to find out PSS(Porcine Stress Syndrome) with the PSE(Pale, Soft, Exudative) in different piglets. These experiments were accomplished with the aid of PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism). The samples were collected and examined from umbilical cord blood of piglets of Yorkshire, Landrace and Crossbred. And then, the PCR products were digested by restriction enzyme, Hha I.

The results obtained were as follows;

The PCR products of the blood genomic DNA of ryanodine receptor gene were length of 1.8kb in umbilical cord blood. Normal type(NN), heterozygous type(Nn) and recessively homozygous type(nn, PSS) as a result of digestion of restriction enzyme, Hha I, were 90.0%, 10.0% and 0.0% in Yorkshire piglets, 76.2%, 19.0% and 4.8% in Landrace, 69.1%, 23.8% and 7.1% in crossbred, respectively.

As already showing the above results, the blood from piglets umbilical cord can be available used for the determination of genotypes of PSS because of easiness of blood collection without stress in live piglets.

(Key words: PSS, Umbilical cord blood, PCR-RFLP, Restriction enzyme)

I. 서 론

PSS(Porcine Stress Syndrome)돼지는 상염색체 6번에 위치한 열성유전자의 점돌연변이에 의하여 스트레스(stress)에 의하여 근육의 강직, hypermetabolism, 체온의 상승, 세포내 이온 불균형 등을 초래하여 폐사하거나, 도축시 육질이 저하되어 심할 경우 창백하고, 연하며 삼출성이 심한 PSE

[†] Corresponding author : Dept. of Animal Resource, College of Industrial Science, Kongju National University : Tel : 041-330-1245, E-mail: kimgoong@kongju.ac.kr

¹ 건국대학교 축산대학 축산학과.

² 군산대학교 해양과학대학 해양생명과학부.

(Pale, Soft, Exudative) 돋육을 생산하는 돼지를 말한다(박 등, 1997; Maclennan 과 Phillips, 1992).

PSS 돈의 유발기전을 살펴보면, 세포내에서 Ca^{2+} 이온의 농도조절을 담당하고, 근육의 수축 및 대사를 조절하여 주는 Ca^{2+} release channel인 ryanodine receptor 유전자(RYR1 gene) 중 1843번째에 위치한 Cytosine이 Thymine으로 단일돌연변이를 일으켜 아미노산을 합성할 때 정상적인 돼지에서는 Arginine이 생성되는 반면, PSS 돼지에서는 Cysteine이 합성되어 Ca^{2+} 이온의 계속적인 방출에 의하여 세포내 이온의 불균형 현상을 초래하여 Malignant hyperthermia(MH)의 증상을 가져와, 특히 도축시 계속적인 근육의 수축에 의한 근육강직이 나타나며, 무산소상태에서의 해당작용을 촉진시켜 다량의 젖산 형성에 의한 pH 저하 등이 나타나게 된다(Fujii 등, 1991; Maclennan과 Phillips, 1992; 김 등, 1998). 이러한 PSS 돼지는 등지방이 얇고, 햄부위의 정육량을 많이 생산하는 경향이 있어 연구자들이 이에 대한 연구를 수행하기도 한다(김 등, 1998; Pommier 등, 1992). 그러나, PSS 돼지는 정상적인 돼지에 비하여 일당증체량 및 90kg 도달 일령이 늦어지기 때문에 사료비의 증가 및 폐사율 증가로 인하여 농가에 경제적인 타격을 입히게 되고, 거동이 불편하고, 절름거리거나 근육경련이 생기며, 행동반경이 얇고, 호흡이 빨라져 개구호흡을 하기도 한다. 폐사 직전에는 체온이 41°C 까지 올라가는 외부적인 현상을 동반하기도 한다. 이 때문에 최근에 들어서 농가에서는 PSS 돼지를 과감하게 도태시켜 버리고 있는 실정이다(박 등, 1997).

PSS 돼지를 찾아내기 위하여 많은 연구자들이 연구를 수행하게 되었는데, 최초로 Webb and Jordan(1978)에 의하여 휘발성 마취제인 halothane gas를 이용하여 8~10주령의 종돈을 3~5분간 마취시켜 근육의 경직성 정도를 조사하여 판별하는 방법을 이용하여 연구가 수행되어졌다. 그러나, 이와 같은 방법은 숙련자에 있어서 95% 이상 정확하게 판별할 수 있다고 보고되어지고 있으나, 정상적인(H^-H^-) 돼지에게도 해를 입힐 수 있다는 단점과 hetero돼지(H^+H^-)의 판별이 어려운 것이 단점이었다(김 등, 1997; 박 등, 1996; 박 등, 1997).

최근에 분자생물학의 발달로 인하여 PCR법이 수행된 이후 6번 상염색체 좌위에 위치한 RYR1 gene 부분을 증폭하여 제한효소를 이용하여 PSS 돼지를 감별하는 PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) 법을 이용하여 연구를 수행하게 되었다(Fujii 등, 1991; Prossor, 1993; 박 등, 1997). 최근에 우(2000)와 Kim 등(2002)이 채혈시 스트리스를 줄이는 방법으로 돼지의 모근에서 genomic DNA를 추출하여 증폭시켜 PCR-RFLP법을 적용하여 PSS 돼지를 판별하는 방법을 제시하였다. 제대혈(umbilical cord blood)에 관한 연구는 인체에서 많이 이루어지고 있다. 이는 백혈병이나 유전병 등에서 조혈모세포를 이식하여 줌으로서 치료할 수 있기 때문인데, Kundson(1974)가 제대혈에 조혈모세포가 존재함을 보고한 이후 많은 연구를 통하여 발전이 이루어져 왔다(성 등, 1995).

따라서 본 연구는 신생자돈의 제대혈에서 추출한 genomic DNA 분석을 통하여 불량한 PSS 돼지를 조기에 판별하는 방법을 개발하기 위한 기초적 실험으로 실시되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물 및 혈액채취

본 연구에 사용된 공시동물은 충남 예산군에서 사육되고 있는 Yorkshire(YY)종 2복자돈 20두, Landrace(LL)종 2복 자돈 21두, 교잡종(LYD 또는 YLD) 4복자돈 42두, 총 82두를 공시동물로 선정하였다.

제대혈은 선정된 공시동물의 분만을 기다려, 분만 직후 제대(臍帶)를 소독한 후, 바로 절단하여 흘러내리는 혈액을 항응고제(EDTA)가 처리된 tube를 이용하여 채취하였으며, 모체의 체액에 오염을 방지하기 위하여 milking하지는 않았다. 채취된 혈액은 ice box(약 4°C)에 저장 후 DNA를 추출하기 위하여 6시간 이내에 실험실로 이송하였다.

2. DNA 추출

제대혈 채취한 혈액으로부터의 DNA 추출은 Wi-

zard purification kit(Promega, USA)를 사용하여 표준 protocol에 따라 추출하였으며, isopropanol에 DNA를 침전시킨 후 TE buffer(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 녹인 후 PCR 증폭시까지 -20°C에 동결 보관하였다.

3. Primer의 제작

본 연구에서 사용된 primer는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다.

Primer는 혈액 genomic DNA의 RYR1 gene 부위 중 exon과 intron을 포함한 1881bp를 증폭하기 위하여 Harbitz 등(1992)이 보고한 primer를 녹십자(TaKaRa BioTechnology, Japan)에 합성을 의뢰하여 합성하였다. 합성된 primer의 구조는 sense primer 5'-GCCAACTGTGCCCTTTCTC C-3'와 antisense primer 3'-TCGTCTCCGTGGTGTGTC-AT-5'의 구조로 이루어져 있다. Fig. 1은 ryanodine receptor의 일부분으로서 밑줄 친 부분은 primer의 부분을 나타내고 있으며, 화살표 부분은 mutation 부분을 나타낸 것인데, 1666bp의 cytosine이 tryptophane으로 mutation됨으로서 PSS 돼지가 발현되게 됨으로, 이 부분을 포함하여 증폭할 수 있도록 417bp에서부터 437bp(21mer)의 sense primer와 2297bp에서 2277bp(21mer)까지의 antisense primer를 이용함을 나타내고 있다.

4. PCR 증폭

Wizard purification kit에 의하여 추출된 DNA sample을 template로서 PCR을 수행한 조건은 다음과 같다. 혈액으로부터 추출된 Pig genomic DNA 1μg과 sense primer와 antisense primer를 각각 1μM을 혼합하고 Taq 2.5U를 섞은 후, Thermal Cycler(PCR)에 넣어, 95°C에서 1분, 60°C에서 1분간의 annealing 반응을 실시하고, 72°C에서 2분간의 extension반응을 실시한 후 최종적으로 72°C 5분간의 신장반응을 실시하여 RYR1 gene 부분으로 예상되는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 DNA 단편은 1.0% agarose gel 전기영동을 실시하여 그 길이를 측정하였다.

5. Enzyme 처리 및 판독

PCR에 의하여 증폭된 단편의 유전자형을 확인하기 위하여 제한효소 Hha I(GCGC sequence 인식)으로 digest시켜 주었다. 반응액의 조성은 PCR 산물 5μl, 10×buffer 1μl(100mM Tris-HCl, pH 7.5, 100mM MgCl₂, 10mM DTT, 500mM NaCl), dDW 4.5μl, 그리고 Hha I 0.5μl(5 unit)를 첨가하여 37°C에서 2시간 이상 반응시켜 완전히 digest시켜 주었다. 그 결과는 1.0% agarose gel 전기영동을 실시하여 정상 band(N/N), hetero band(N/n) 및 PSS band(n/n)를 확인하였다.

```

361 cctgttgggt ctgaccctc tttccacccct cagcctctct gatccgtggc aatcgtgcca
421 actgtgccct tttctccaaac aacttggatt ggctggtcag caagctggat cgactggagg
      Sence primer
      :
1621 ctggatgtcc tgtgtccct gtgtgtgtgc aatggtgtgg ccgtgcgctc caaccaagat
      ↑ mutation t
1681 ctcattactg agaacttgct ccctggccgc gagcttctgc tgcagacaaa cctcatcaac
      :
2221 cctcctcttc tgtcccattt ctccgtcagc atccgccccca acatcttgc gggccgagca
2281 gagggcacca cacagtacag caaatggta tttgaggtca tgggtggacga agtggttcca
      Antisence primer
2341 ttccgtacag ctcaggccac ccacctgcgg gtggctggg ccctcaccga aggctacagc

```

Fig. 1. Partial sequence of ryanodine receptor(RYR1) gene. The site of sence primer and antisence primer sequence is underlined, and the point mutation site is shown by an vertical arrow.



Fig. 2. The length of 20kb and over from blood genomic DNA of pigs.
(M: Size marker, digested with λ-Hind III)

III. 결과 및 고찰

1. Genomic DNA의 추출

Wizard purification kit의 표준 protocol을 이용하여 돼지 혈액 genomic DNA를 추출한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 자돈의 제대혈에서 20kb 이상의 혈액 genomic DNA가 추출되었음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 혈액에 의하여 추출된 genomic DNA가 PCR에 사용될 수 있음을 확인하여 주고 있다.

2. PCR 증폭산물

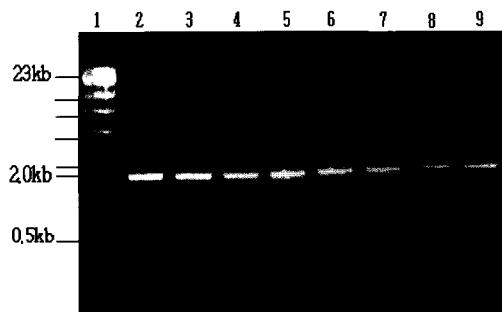


Fig. 3. PCR products of 1881bp fragment including mutation point in ryanodine receptor(Lane 1: size marker, digested with λ-Hind III, lane 2~9: PCR products from umbilical cord blood).

PSS 돼지를 발현시키는 ryanodine receptor 유전자(RYR 1 gene) 부분을 PCR 증폭한 산물의 결과는 Fig. 3에서 나타난 바와 같다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 약 1.8kb의 단일밴드로 증폭되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Fig. 1에서 제시된 primer를 통하여 예상된 RYR1 gene 부분의 유전자가 증폭되었음을 확인하여 주고 있다.

3. 제대혈 DNA에 의한 PSS 유전자 검색

제대혈에서 추출된 DNA의 PCR 증폭 단편을 가지고 Hha I 제한효소로 digest하여준 결과는 Fig. 4에서 나타난 바와 같다.

동복자돈의 제대혈에서 추출한 DNA를 판독한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 정상돼지는 1,881bp의 산물이 절단되어 1,250bp의 band와 631 bp의 2개의 band가 나타났으며, hetero 돼지는 정상적인 유전자와 PSS 유전자를 동시에 지니고 있기 때문에 1,881bp의 PCR산물과 Hha I효소에 의하여 절단된 1250bp의 band, 그리고 631bp의 band 세 개의 밴드가 출현하게 된다. 그리고 PSS 돼지는

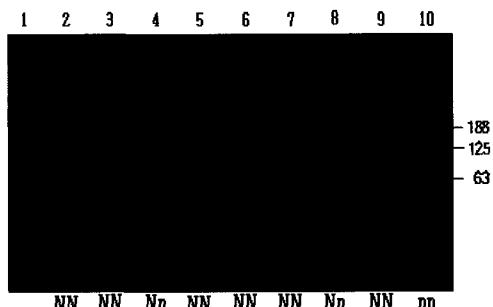


Fig. 4. Band patterns of different genotypes in 1.0% agarose gel following digestion by PCR products with Hha I restriction enzyme. The normal genotype(N/N) shows two digested fragments(1,250bp, 631bp: Lane 2, 3, 5~7 and 9), heterozygous genotype(N/n) shows two digested fragments and one undigested fragments(1,881bp, 1250bp, 631bp: Lane 4 and 8) and PSS genotype(n/n) shows one undigested fragments(1,881bp: Lane 10).

Table 1. Distribution of genotype and gene detected from umbilical cord blood of different breeds

	Genotype frequency			Total	Gene frequency		Total
	N/N	N/n	n/n		N	n	
Yorkshire	90.00 (18)	10.00 (2)	0.00 (0)	100.00 (20)	0.950	0.050	1.000
Landrace	76.19 (16)	19.05 (4)	4.76 (1)	100.00 (21)	0.857	0.143	1.000
Crossbred	69.05 (29)	23.81 (10)	7.14 (3)	100.00 (42)	0.810	0.190	1.000

(): Number of piglets.

1666번재의 cytosine→ thymine으로 돌연변이가 일어나면서(GCGC→GTGC) Hha I효소에 의하여 절단되어지지 않아 PCR 산물인 1881bp의 단일 band만이 나타났다.

Table 1에서 보는 바와 같이 Yorkshire 종 동복자돈에서 정상(NN)돼진은 90.0%, hetero돼지(N/n)는 10.0%였으나, PSS 돼지(nn)는 출현되지 않았다. Landrace 종은 hetero 돼지는 19.05%이고, PSS 돼지는 4.76%로 출현하였다. Crossbred는 hetero 돼지가 23.31%였고, PSS 돼지는 7.14%로 순종 품종보다 비교적 높은 출현율을 보였다.

이러한 결과는 조직에서 분석한 Fujii 등(1991)과 Harbitz 등(1992)에 의한 결과와 귀 조직으로 보고한 박 등(1997)의 결과, 그리고 우(2000)와 Kim 등(2002)이 모근에서 추출한 DNA를 이용하여 분석한 결과와 출현율의 차이는 약간 있었으나, 실험하여 검출된 결과와는 일치하였다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 제대혈에서 분석한 결과와 많은 연구자들이 조직, 모근 등에서 분한 결과와 동일하게 나타나므로 신생 자돈에서 PSS 돼지를 조기에 판별할 때 스트레스를 적게 주면서 간편하게 혈액을 채취할 수 있을 뿐만 아니라, 더욱더 신속하게 분석할 수 있는 방법이 될 것으로 사료된다.

IV. 요 약

본 연구는 분만시 동복 신생자돈의 제대혈에서

추출한 genomic DNA를 PCR-RFLP 기법을 이용하여 농가수입증대를 위하여 육질이 불량한 PSS 돼지를 판별하는 방법을 개발하기 위한 기초실험으로써 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

자돈 제대에서 혈액 genomic DNA를 추출하여 PCR에 의하여 증폭된 ryanodine receptor gene 영역의 산물은 자돈의 제대혈에서 1.8kb의 길이로 증폭되었음을 확인하였다. 제대혈에서 추출된 DNA의 PCR 증폭 단편을 가지고 Hha I 제한효소로 digest 하여준 결과에서 PSS 돼지는 Yorkshire 종에서 출현하지 않았으나, Landrace 종과 Crossbred 종에서 각각 4.76%와 7.14%로 교접종(LYD 또는 YLD)에서 더욱 많이 출현되었다.

이상의 결과로 볼 때 분만시 신생자돈의 제대혈을 채취하여 PSS 돼지를 조기에 선발하면 스트레스 감소는 물론 혈액채취의 간편성을 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

V. 인용문헌

- Fujii, I., Otsu, K., Zorzto, F., de Leon, S., Khanna, V., Weiler, J. E., O'Brien, P. J. and MacLennan, D. H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253:448-451.
- Harbitz, I., Kristensen, T., Bosnes, M., Kran, S. and Davies, W. 1992. DNA sequence of the

- skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg615-Cys615 mutation associated with porcine malignant hyperthermia. in Norwegian Landrace Pigs. Animal genetics. 23:395-402.
3. Kim, Y. C., Woo, S. C., Song, G. C., Park, H. Y., Im, B. S. and Kim, G. W. 2002. Three-Step PCR and RFLP Genotyping of the Swine Ryanodine Receptor Gene using Aged Single Hair Follicles Delivered by General Mail. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15(9): 1237-1243.
 4. Kundson, S. 1974. *In vitro* growth of granulocyte colonies from circulating cell in human cord blood. Blood. 43:357-361.
 5. MacLennan, D. H. and Phillips, M. S. 1992. Malignant Hyperthermia. Science. 256:789-794.
 6. Pommier, S. A., Houde, A., Rousseau, F. and Savoie, Y. 1992. The effect of the malignant hyperthermia genotype as determined by restriction endonuclease assay on carcass characteristics of commercial crossbred pigs. Can. J. Anim. Sci. 72:973-976.
 7. Prosser, J. 1993. Detecting single-base mutation. TIBTECH. 11:238-246.
 8. Webb, A. J. and Jordan, C. H. C. 1978. Halothane sensitivity as a field test for stress susceptibility in the pig. Anim. Prod. 26: 157-163.
 9. 김철욱, 조광근, 최윤재, 박외선, 권윤정. 1998. Porcine Ryanodine Receptor 유전자의 Mutation 을 확인하기 위한 Double Tube Allele Specific Primer PCR의 이용. 한국축산학회지. 40(3): 227-234.
 10. 박영일, 박태섭, 신영수, 이학교, 김형균, 오하식, 손창준, 한재용. 1997. PCR-RFLP기법을 이용한 PSS 돼지 검색에 관한 연구. 한국동물유전육종학회지. 1(1):73-80.
 11. 박용호, 백명기, 상병찬, 여정수, 이창수, 한재용, 황우석. 1996. 동물유전공학. 선진문화사.
 12. 성기웅, 최형수, 이재경, 유경하, 전종관, 김석현, 김의종, 박경덕, 박혜정, 박선옥, 장중환, 신희영, 안효섭. 1995. 제대혈이식을 위한 제대혈의 채혈. 대한혈액학회지. 30(3):463-472.
 13. 우승철. 2000. 돼지의 모근을 이용한 PSS 유전자형 결정에 관한 연구. 전국대학교 대학원 석사학위논문.
 14. 이기환. 2000. 우량돼지의 선발을 위한 PSS유전자 검색에 관한 연구. 공주대학교 대학원 석사학위논문.

(접수일자: 2003. 4. 10. / 채택일자: 2003. 5. 7.)