

DNA 검사기법을 이용한 PSE 돈육 생산 돼지 진단

정 의 룡* · 정 구 용¹

상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과
¹상지대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Diagnosis of Pigs Producing PSE Meat using DNA Analysis

Eui-Ryong Chung* and Ku-Young Chung¹

Dept. of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University

¹Dept. of Animal Science and Technology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University

Abstract

Stress-susceptible pigs have been known as the porcine stress syndrome (PSS), swine PSS, also known as malignant hyperthermia (MH), is characterized as sudden death and production of poor meat quality such as PSE (pale, soft and exudative) meat after slaughtering. PSS and PSE meat cause major economic losses in the pig industry. A point mutation in the gene coding for the ryanodine receptor (RYR1) in porcine skeletal muscle, also known calcium (Ca²⁺) release channel, has been associated with swine PSS and halothane sensitivity. We used the PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) and PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) methods to detect the PSS gene mutation (C1843T) in the RYR1 gene and to estimate genotype frequencies of PSS gene in Korean pig breed populations. In PCR-RFLP and SSCP analyses, three genotypes of homozygous normal (N/N), heterozygous carrier (N/n) and homozygous recessive mutant (n/n) were detected using agarose or polyacrylamide gel electrophoresis, respectively. The proportions of normal, carrier and PSS pigs were 57.1, 35.7 and 7.1% for Landrace, 82.5, 15.8 and 1.7% for L. Yorkshire, 95.2, 4.8 and 0.0% for Duroc and 72.0, 22.7 and 5.3% for Crossbreed. Consequently, DNA-based diagnosis for the identification of stress-susceptible pigs of PSS and pigs producing PSE meat is a powerful technique. Especially, PCR-SSCP method may be useful as a rapid, sensitive and inexpensive test for the large-scale screening of PSS genotypes and pigs with PSE meat in the pork industry.

Key words : pigs, PSS, PSE meat, DNA diagnostic test, PCR-RFLP and SSCP

서 론

돼지는 각종 스트레스 인자에 감수성이 높은 동물로서 스트레스에 대해 특이적으로 민감한 반응을 보이는 병적 증상을 돼지 스트레스 증후군(porcine stress syndrome; PSS)이라고 부르며, 이 같은 돼지는 도축 시 육질이 저하되는 PSE(pale, soft, exudative) 돈육을 생산하는 것으로 잘 알려져 있다(Louis

et al., 1990; Mitchel and Heffron, 1982). 스트레스 감수성 돼지는 번식능력 퇴화현상을 초래하며 모돈의 경우 복당 산자수 및 이유두수가 정상개체보다 적다. 또한, 자돈의 폐사율이 급증하며 육성 비육돈에 있어서는 성장률이 낮을 뿐만 아니라 폐사율이 높고 생존한 돼지는 스트레스에 대한 민감성 때문에 90% 이상의 높은 비율로 PSE 돈육의 육질이 크게 저하된 불량 저급육을 생산하게 된다(Jones et al., 1994; Sather et al., 1991; Simpson and Webb, 1989). 일명 물돼지라고 부르는 PSE의 이상돈육은 육색이 창백하고 육 조직은 연약하며 다량의 육즙이 삼출되어 보수성, 결착력 및 유효력이 매우 열악한 돈육의 상태를 의미하는데 PSE 돈육은 외관상 불량하여 신선

* Corresponding author : Eui-Ryong Chung, Department of Biotechnology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel: 82-33-730-0541, Fax: 82-33-730-0503, E-mail: erchung@mail.sangji.ac.kr

육으로서의 가치가 매우 떨어질 뿐만 아니라 가공 특성도 낮아 양돈 생산농가 및 돈육 가공업체에 막대한 경제적 손실을 초래한다(Briskey, 1964). 특히, 국내에서 생산되는 수출용 돼지에서 PSE 돈육 발생율이 40%나 되어 미국 10%, 덴마크 3%, 영국 12% 및 일본 12%에 비해 상대적으로 높아 돈육수출에 커다란 장애요인으로 지적되고 있다(축산연구소, 2002; 한국축육개량협회, 2002). 따라서 스트레스에 의한 돼지 폐사율을 크게 줄이고 고품질 돈육 생산을 통한 양돈 산업의 경쟁력을 제고하기 위해서는 물태지 생산과 밀접한 관련이 있는 PSS 불량 유전자 색출을 위한 신속 간편하고 정확성이 높은 진단 기술 개발과 이를 이용한 PSE 돈육 발생을 감소 방안이 확립되어야 한다.

그동안 돼지 스트레스 감수성에 대한 검정방법으로서 1970년대에 개발된 할로탄 검정방법(halothane challenge test)이 전 세계적으로 널리 이용되어져 왔다. 그러나, 할로탄 가스 마취를 이용하는 전통적인 방법은 할로탄 감수성 유전자(Hal)를 지니고 있는 열성의 동형접합체 개체의 확인은 효과적이지만 이형접합체와 정상 동형접합체 개체 간에 구별은 불가능하여 PSS 잠재성의 이형접합체 개체(carrier)를 검출할 수 없는 기술적 한계성을 지니고 있다(Rempel et al., 1993). 한편, 돼지 근육의 수축과 대사 작용에 중요한 역할을 하는 Ca^{2+} 은 skeletal muscle ryanodine receptor(RYR1) 유전자에 의해 조절되지만 이 유전자에 돌연변이가 일어날 경우 세포내 Ca^{2+} 의 이상 증가로 인하여 악성고열증(malignant hyperthermia, MH)의 병적 증상을 유발한다(MacLennan and Philips, 1992). 또한, RYR1 유전자와 MH(Hal) 유전자는 돼지 6번 염색체에 연관되어 있는 열성유전자로서 돼지 스트레스 증후군은 할로탄 마취에 의해 현저한 근육 강직현상을 나타내는 MH로 알려져 있고(Knorr et al., 1994) MH는 RYR1 이라고 부르는 근소포체의 calcium release channel(CRC) 결함과 밀접하게 관련되어 있다는 사실이 확인되었다(Houde et al., 1993; MacLennan and Philips, 1992). 따라서, 돼지 골격근에서 Ca^{2+} 방출통로(CRC)로서 기능을 담당하고 있는 RYR1 유전자는 악성고열증과 관련되어 있을 뿐만 아니라 PSS 인자와도 밀접한 관계를 맺고 있어 스트레스 감수성 유전인자의 검색을 위해서는 RYR1 유전자의 염기변이를 검출할 필요가 있다.

최근에 분자유전학적 연구의 발달에 따라 Fujii 등(1991)이 PSS와 직접적으로 관련되어 있는 RYR1 유전자의 단일 염기 돌연변이를 구명함으로써 DNA의 분자수준에서 스트레스 감수성 돼지의 조기진단이 가능해졌다. 즉, DNA 검사방법은 종래의 할로탄 검정법으로는 확인 불가능한 이형접합체의 잠재성 개체에 대한 검출이 가능하여 스트레스 감수성 돼지 즉, PSE 육 생산돼지의 새로운 진단 방법으로 PSE 돈육 발생을 감소를 위한 PSS 유전인자의 검색에 이용할 수 있다. 본

연구는 기존의 halothane 검정법을 대체할 수 있는 새로운 돼지 PSS 유전자 진단기술로서 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism) 및 PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism) 두 종류의 DNA 검사 기법을 이용하여 PSE 돈육을 생산하는 PSS 돼지의 조기 진단 및 검출에 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시돈 및 재료

강원도 및 경기도 일대에 위치하고 있는 종돈장에서 종돈 120두(Large Yorkshire 57두, Landrace 42, Duroc 21)와 일반 양돈장에서 사육 관리되고 있는 식육용 교잡종 돼지 150두로부터 각각 채취한 모근을 공시재료로 이용하였다.

모근으로부터 Genomic DNA 추출 및 정제

각 검정대상 공시돈으로부터 채취한 모근의 genomic DNA 추출은 Trommelen 등(1993)의 방법을 일부 변경하여 수행하였다. 즉, 두당 5~10개의 모근을 100% ethanol에 10초간 담근 후 3차 증류수로 수세하고 1.5 mL effendorf tube에 옮긴 다음 150 μ L의 extraction buffer(Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 10mM NaCl, 0.5% SDS)와 protease K (500 μ g/mL)를 첨가하고 65°C에 10분간 배양한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상등액에 phenol: chloroform: isoamylalcohol(25: 24: 1)을 동량으로 첨가한 후 다시 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 DNA 농도를 정량한 후 PCR 증폭을 위한 template DNA 시료로 이용하였다.

Oligonucleotide primer의 설계 및 합성

돼지의 RYR1 유전자 돌연변이를 검출하기 위하여 ryanodine receptor cDNA의 염기서열상에서 염기치환 부분인 1843 번째를 포함하는 영역을 증폭하기 위하여 3종류의 서로 다른 primer를 합성하여 이용하였다. PCR-RFLP 분석을 위한 primer로서 659 bp 크기의 단편을 증폭하기 위하여 RYR-F 5'-TCCAGTTTGCCACAGGTCCTACCAGT-3' 및 RYR-R5'-ATTACACGGAGTGGAGTCTCTGAG-3' 그리고 81 bp 단편을 증폭하기 위하여 RYR1-F 5'-GTTCCCTGTGTGTGTGCAA TGGTG-3' 및 RYR1-R 5'-ATCTCTAGAGCCAGGGAGCAAG TTCTCTCAGTAAT-3'를 각각 설계 합성하였다. 한편, PCR-SSCP 분석을 위한 primer는 1795번째부터 1928번째까지의 134 bp 단편을 증폭하기 위하여 RYR1-F 5'-GTGCTGGATG TCCTGTGTCCCT-3' 및 RYR1-R 5'-CTGGTGACATAGTTG ATGAGGTTTG-3'을 설계 합성하였다(Fig. 1).

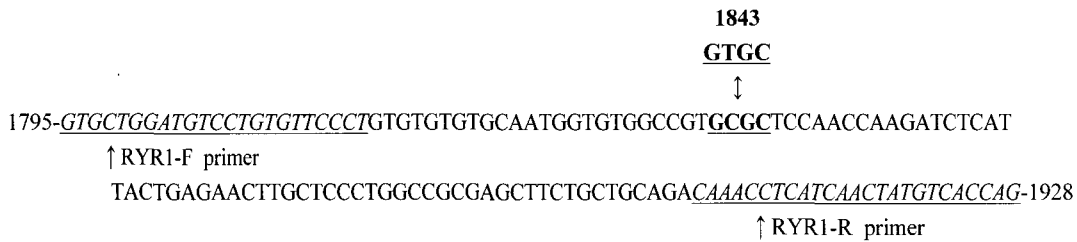


Fig. 1. Partial sequence of ryanodine receptor gene (cDNA 1795-1928) contained the missense mutation (1843 C→T). The sites of RYR1 primer sequence for SSCP analysis are underlined.

PCR 기법에 의한 RYR1 유전자 증폭

돼지 RYR1 유전자의 PCR 증폭을 위한 반응 조건은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin - Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, PCR 반응액은 template DNA 50 ng, primer 각 0.5 μ M, dNTP 각 200 μ M, 10 X PCR buffer 5 μ L 그리고 Taq DNA polymerase 1 unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 μ L로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94°C에서 5분간 예비가열한 후 94°C에서 1분, 67°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간의 cycle을 총 35회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 5분간 가열하고 DNA 증폭과정을 종료하였다.

PCR-RFLP 분석

PCR 종료 후 RYR1 유전자의 RFLP 분석을 위해 10 μ L 증폭산물에 5 units의 *Hha* I(Pharmacia)제한효소를 첨가한 다음 37°C의 incubator에서 3시간 이상 반응시켜 절단하였다. 659와 81 bp 두 종류의 증폭산물을 제한효소로 각각 절단하여 얻어진 DNA 단편은 TBE buffer(90mM tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0)을 이용하여 659 bp는 4% NuSieve GTG agarose gel 그리고 81 bp는 15% polyacrylamide gel로 약 3~4시간 정도 전기영동하여 분리하고 영동 후 gel은 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV 상에 발현된 DNA band 양상을 관찰하고 각 검정 개체별 PSS 유전자형을 판정하였다.

PCR-SSCP 분석

SSCP 분석은 PCR 증폭 산물 3 μ L에 5~6배의 formamide dye (98% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)를 첨가하고 95°C에서 5분간 변성시킨 후 즉시 ice에 5분간 보관하여 reannealing을 방지한 다음 10~12% 비변성 polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시한 후 silver staining으로 SSCP의 DNA band를 검출하고 각 banding pattern에 따른 PSS 유전자형을 판정하였다.

결과 및 고찰

돼지에서 스트레스 감수성 유전인자는 PSE 이상육의 주된 원인이 되고 동시에 스트레스와 관련하여 갑작스런 폐사의 주요 원인으로 작용할 뿐만 아니라 돼지의 생존능력, 환경적응 능력 및 번식능력의 감소 현상을 통하여 양돈 생산 농가에 커다란 경제적 손실을 일으키는 열성의 불량 유전형질로 잘 알려져 있다. 국내산 돼지고기의 PSE 돈육 발생율은 '99년도 17%에 비하여 '01년에 45~70%로 해마다 증가하는 추세이다. 따라서, 각종 스트레스에 의한 돼지 폐사율 및 PSE 불량 돈육의 발생율을 크게 줄이고 고 품질 돈육생산을 통한 양돈생산 농가의 경쟁력 제고를 위하여 스트레스 감수성 돼지에 대한 정확한 검색 기술 개발과 이를 이용한 PSE 돈육 발생 방지는 우리나라 양돈 산업에 있어 매우 중요하고 반드시 해결해야 할 주요 과제라고 지적할 수 있다.

돼지 PSS는 Ca^{2+} 이온 channel을 합성하는 ryanodine receptor(RYR1) 유전자의 특정 부위에 점 돌연변이가 일어나 발생하는 것으로 알려져 있다. PSS의 유전적 결함은 RYR1의 cDNA 상의 1843번째에 cytosine 염기(CGC)가 thymine 염기(TGC)로 치환(C→T)됨으로써 615번째 아미노산의 arginine이 cytosine으로 변화되어 발생한다(Fujii et al., 1991). 즉, RYR1 유전자의 cDNA의 염기배열은 614번째 아미노산인 Val의 codon으로서 GTG가 해당되고 615번째 아미노산으로 Arg는 CGC의 배열로서 이들 2개의 아미노산을 code하고 있는 부위(GTGCGC)에 GCG[▼]C의 *Hha* I 제한효소의 인지 부위가 존재한다. 본 실험에서 PCR-RFLP 방법으로 PSS를 유발하는 RYR1 유전자의 단일 염기 돌연변이(C→T;Arg¹⁶⁵→Cys)를 포함하는 659bp 부위를 PCR로 증폭한 다음 증폭산물을 *Hha* I 제한효소로 처리하여 2% agarose gel 전기영동법으로 검출한 DNA 유전자형은 Fig. 2와 같다. 즉, 돌연변이 유전자가 존재하지 않는 정상 동형접합체인 PSS 저항성 개체(N/N)는 493과 166 bp 2개의 band가 검출되었다. 그러나, 돌연변이 유전자를 동형(homo) 접합체 상태로 보유하고 있는 열성의 PSS 감수성 개체(n/n)는 C→T의 단일 염기치환으로 제한효소의 인지 부위가 소실되어 절단되지 않는 659 bp의 단일 band만이 검출되었다. 그리고 돌연변이 유전자를 이형(hetero)접합체

상태로 보유하고 있는 잠재성 개체(carrier; N/n)는 정상 유전자와 돌연변이 유전자를 절반씩 보유함으로 659, 493 및 166 bp 3개 band가 모두 발현되었다. 또한, 659 bp 보다 증폭산물의 크기가 훨씬 작은 81 bp의 증폭산물을 동일한 *Hha* I 제한 효소로 처리하고 15% polyacrylamide gel을 이용하여 검출한 DNA 유전자형은 Fig. 3과 같다. 즉, 스트레스 저항성의 정상 개체의 RYR1 유전자에는 *Hha* I 인지부위가 존재하여 81 bp 증폭산물이 절단됨으로써 49와 32 bp 2개의 band로 검출되었으나 스트레스 감수성의 PSS 개체는 돌연변이 발생으로 제한효소 절단부위가 소실되어 81 bp의 단일 band만이 확인되었다. 그리고 이형접합체의 잠재성 개체는 이들 81, 49 및 32 bp 3개의 band가 모두 검출되었다. 한편, PCR-SSCP 기법은 DNA의 물리적 성질을 이용한 새로운 DNA 염기변이 검출방법으로서 점 돌연변이(point mutation)의 단일 염기치환에 의한 염기서열 변화로 발생한 DNA 단일 가닥(single strand)의 형태 또는 구조변경에 따른 전기영동상의 이동능력 차이로 기인된 유전자 다형성(polymorphism)을 검출하는 방법이다 (Orita et al., 1989). 본 실험에서 PCR-SSCP 기술을 이용하여 돼지 RYR1 유전자내의 돌연변이에 의한 염기 치환으로 DNA 단일가닥의 형태 또는 구조변경에 따른 전기영동상의 mobility shift를 비교 분석한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 PSS 저항성 개체와 감수성 개체 간 SSCP band의 이동거리에 차이가 인정되었다. 즉, PSS 저항성 개체(N/N)는 이동도가 빠른

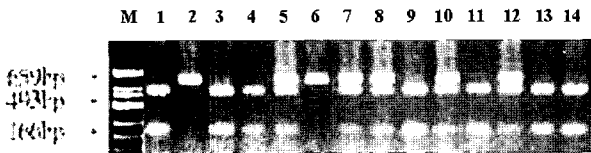


Fig. 2. DNA banding patterns of RYR1 genotypes in 2% agarose gel following digestion with *Hha* I enzyme using PCR-RFLP technique. Lanes 1, 3~4, 9, 11, 13 and 14, homozygous normal genotype (N/N); lanes 2 and 6, homozygous recessive genotype (n/n); lanes 5, 7~8, 10 and 12, heterozygous genotype(N/n). M: molecular size marker (Φ X-174/Hae III digest).

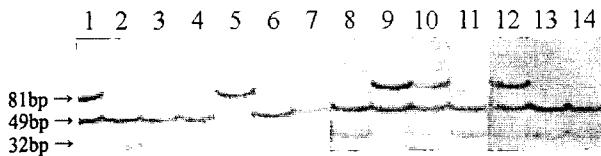


Fig. 3. DNA banding patterns of RYR1 genotypes in 15% polyacrylamide gel following digestion with *Hha* I enzyme using PCR-RFLP technique. Lanes 2~4, 6, 8, 11, 13 and 14, homozygous normal genotype (N/N); lane 5, homozygous recessive genotype (n/n); lanes 7, 9, 10 and 12, heterozygous genotype (N/n).

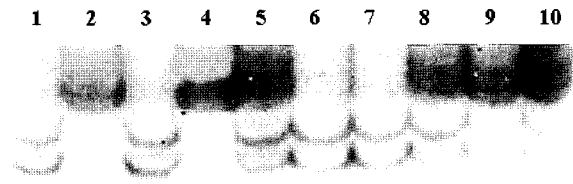


Fig. 4. DNA banding patterns of RYR1 genotypes in 12% polyacrylamide gel using PCR-SSCP technique. Lanes 1, 3, 6 and 7, homozygous normal genotype (N/N); lanes 2 and 4, homozygous recessive genotype (n/n); lanes 5 and 8~10, heterozygous genotype (N/n).

2개의 SSCP band를 나타냈으나 돌연변이 유전자를 갖는 PSS 감수성 개체(n/n)는 상대적으로 이동도가 느린 2개의 SSCP band를 가지고 있으며 이형접합체의 잠재성 개체(N/n)는 이들 4개의 band를 모두 갖는 것으로 나타났다. PCR-SSCP 분석기법은 기존의 PCR-RFLP 방법과 비교하여 특정 제한효소 사용 없이 보다 신속 정확하고도 간편하게 유전자 돌연변이를 검출할 수 있어 PSS 유전자 및 PSE육 생산 돼지의 조기 진단에 효율적이고 경제적인 방법이라고 할 수 있다. 따라서, PCR-SSCP 기법을 활용할 경우, 종래의 PCR-RFLP 방법으로 진단이 불확실한 시료에 대한 정확한 판정이 가능하여 검사 결과의 정확도를 크게 향상시킬 수 있으며 특히, 대규모 집단이나 시료의 검색에 매우 효과적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

이상과 같이 PCR-RFLP 및 PCR-SSCP 두 종류의 DNA 진단법으로 국내 돼지 품종별 PSS 유전자형 출현빈도와 대립 유전자 빈도를 분석한 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다. Landrace는 조사한 42두 가운데 정상 동형접합체 유전자형을 갖는 PSS 저항성 개체가 57.1%, 이형접합체의 잠재성 개체가 35.7% 그리고 열성의 동형접합체 유전자형을 갖는 PSS 감수성 개체의 출현비율은 7.1%로 각각 분석되었다. 그리고 L. Yorkshire는 57두 가운데 PSS 저항성 개체가 82.5%, 이형접합체의 잠재성 개체가 15.8% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 1.7%로 나타났으며, Duroc은 21두 가운데 PSS 저항성 개체가 95.2%, 이형접합체의 잠재성 개체가 4.8% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 0%로 나타났다. 국내 비육용 교잡돈(crossbreed)의 경우에는 총 150두 가운데 정상 개체가 72.0%, 이형접합체의 잠재성 개체가 22.7% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현비율은 5.3%로 조사되었다. 본 연구의 이러한 결과는 Park 등(1997)이 국내 주요 돼지 품종으로 Landrace, Large Yorkshire 및 Duroc 3 품종을 대상으로 PSS 출현율을 조사한 성적으로서 정상 76.7%, 잠재성 20.4% 및 PSS 2.9%와 대체적으로 유사한 결과를 보였다. 그리고 우리나라 비육돈 생산 방식이 대부분 Large Yorkshire, Landrace 및

Table 1. Distribution of RYR1 genotype by DNA diagnostic test in pig breeds

Breed	No. of pigs	DNA genotype ¹⁾			Gene frequencies	
		N/N	N/n	n/n	C1843	T1843
Landrace	42	24(57.1) ²⁾	15(35.7)	3(7.1)	0.75	0.25
L. Yorkshire	57	47(82.5)	9(15.8)	1(1.7)	0.90	0.10
Duroc	21	20(95.2)	1(4.8)	0(0.0)	0.97	0.03
Crossbred	150	108(72.0)	34(22.7)	8(5.3)	0.83	0.17

¹⁾ DNA type determined by PCR- RFLP and SSCP for the porcine RYR1 gene. N/N : homozygous normal pig, N/n : heterozygous pig(carrier), n/n : homozygous recessive pig (PSS).

²⁾ Values in parentheses indicate the percentage of each genotype.

Duroc의 3개 품종을 이용한 3품종 교잡방식으로서 백색 품종인 Landrace와 Large Yorkshire의 1대 잡종(F₁)에 Duroc 옹돈을 사용하여 3원 교잡종을 작출하기 때문에 종돈 3품종의 평균 PSS 유전자 출현빈도와 큰 차이가 나지 않는 것으로 추정된다. 한편, 외국의 연구 결과를 살펴보면 Houde 등(1993)은 Landrace, Yorkshire 및 Duroc의 PSS 유전자형 분석결과에서 PSS 잠재성 개체의 비율이 각각 27.3%, 17.9% 및 3.2% 그리고 PSS 감수성 개체가 각각 1.4%, 1.9% 및 1.6%로 보고하였고, Knorr 등(1994)은 German Landrace, Pietrain 및 Large White 품종에서 PSS 잠재성 개체의 출현비율이 각각 53.1, 1.5 및 1.85%, PSS 감수성 개체는 각각 19.6, 98.5 및 0.0%로 보고하였다. 일반적으로 PSS 유전자의 출현율은 품종에 따라 많은 차이를 보이고 있으며 특히, Pietrain 종에서 PSS 유전자의 출현빈도가 가장 높은 것으로 알려져 있고 다음으로 Landrace 종이 타 품종에 비해 상대적으로 높은 것으로 보고되어 있다(Houde et al., 1993; Knorr et al., 1994). 앞으로 국내 비육돈 집단에 있어 PSS 발생율을 줄이기 위해서는 특히, 종돈에 대한 PSS 유전자 검색을 실시하여 PSS 유전자의 확산을 방지하고 품종집단으로부터 이 열성의 불량 유전자를 제거하기 위한 진단 프로그램의 개발과 도입이 이루어져야 한다. 또한 외국으로부터 도입되는 수입종돈에 대해서도 PSS 유전자 진단을 실시하여 불량형질의 국내 확산을 사전에 예방할 필요가 있다.

본 연구에서 PCR- RFLP 및 SSCP 기법을 이용한 DNA 진단 기술은 돼지의 PSS 열성 불량유전자를 연령이나 성별에 관계없이 조기에 신속 정확하게 색출하고 제거할 수 있어 PSE의 불량 이상 돈육의 발생율을 근본적으로 감소시킴으로써 고품질 돈육 생산에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 특히, PCR-SSCP 기법은 PCR-RFLP 방법과 달리 제한효소 처리과정 없이 PCR 증폭 후 바로 전기영동으로 PSS 유전자형을 판정할 수 있어 다수의 개체를 대상으로 한 PSE육 생산 돼지 진단에 효율적으로 이용할 수 있을 것이다. 앞으로 이 같은 DNA 진단기술을 이용하여 국내 종돈장 및 일반 양돈장

에서 보다 정확하고 신속하게 PSS 유전인자의 보유돼지를 검출함으로써 생산성 향상 및 PSE 돈육의 발생을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, PSE 돈육 발생을 최소화함으로써 돈육 수출에 따른 불량 저급육 반송 비율을 크게 줄여 돼지고기 수출 확대에도 기여할 것으로 사료된다.

요 약

돼지 골격근 근소포체의 Ca²⁺ 방출통로(calcium - release channel)를 지정하는 ryanodine receptor (RYR1) 유전자의 이상은 악성고열증(malignant hyperthermia, MH)을 유발하고, RYR1 유전자의 점 돌연변이는 돼지 스트레스 증후군(porcine stress syndrome, PSS)과 밀접하게 관련되어 있다. PSS 유전인자 보유 돼지의 90% 이상은 PSE 돈육을 생산하는 것으로 알려져 있어 물떼지 발생과 생산성 하락으로 경제적 손실을 초래하는 유전적 원인의 PSS 유전자를 검사하여 제거하는 것은 고품질 돼지고기 생산 및 국내 양돈산업의 경쟁력 향상에 매우 중요한 과제라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구는 PCR-RFLP 및 PCR-SSCP 기법을 이용하여 PSE 돈육을 생산하는 PSS 돼지 유전자 진단기술을 개발하고 이를 이용한 국내 종돈 및 교잡 비육돈의 PSS 유전자형 출현빈도를 파악하고자 수행하였다. 돼지 PSS의 원인이 되는 RYR 유전자의 단일염기 돌연변이 (RYR1 C1843T)를 포함하는 DNA 영역을 PCR로 증폭한 후 RFLP 및 SSCP 기법을 이용하여 분석한 결과 동형접합체의 정상 개체(N/N), 이형접합체의 잠재성 개체(N/n) 그리고 열성의 돌연변이 유전자를 동형접합체 상태로 갖는 PSS 감수성 개체(n/n)에 각각 특이적인 RFLP 및 SSCP 유전자형이 검출되어 PSS 저항성, 잠재성 및 감수성 개체의 정확한 판별이 가능하였다. 돼지 주요 품종 집단내 PSS 유전자형 출현빈도를 조사한 결과 Landrace는 PSS 저항성 개체가 57.1%, 잠재성 개체가 35.7% 그리고 PSS 감수성 개체의 출현 비율은 7.1%로 분석되었고 L. Yorkshire는 82.5, 15.8 및 1.7%, Duroc은 95.2, 4.8 및 0.0%로 각각 조사되었다. 비육용 교잡돈

은 정상 개체가 72.0%, 잠재성 개체가 22.7% 그리고 PSS 감수성 개체는 5.3%였다. 특히, PCR-SSCP 기법을 이용한 RYR1 유전자 돌연변이 검출 방법은 보다 신속 간편하면서도 상대적으로 분석비용이 저렴한 정확성이 높은 PSS 돼지 진단기술로서 대규모 돼지집단 검색이나 RFLP 방법으로 판정이 불확실한 시료의 재검에 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Briskey, E. J. (1964) Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. *Adv. Food Res.* **13**, 89-178.
2. Fujii, J., Otsu, K., Zorzaton, F., De Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., O'Brien, P. J., and MacLennan, L. (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**, 448-451.
3. Houde, A., Pommier, S. A., and Roy, R. (1993) Detection of the ryanodine receptor mutation associated with malignant hyperthermia in purebred swine populations. *J. Anim. Sci.* **71**, 1414-1418.
4. Jones, S. D. M., Cliplef, R. L., Fortin, A. F., McKay, R. M., Murray, A. C., Pommier, S. A., Sather, A. P., and Scafer, A. L. (1964) Production and ante-mortem factors influencing pork quality. *Pig News Inform.* **15**, 15N.
5. Knorr, C., Schwille, M., Moser, G., Muller, E., Bartschlager, H., and Geldermann, H. (1994) Calcium-release-channel genotypes in several pig populations-associations with halothane and CK reactions. *J. Anim. Breed. Genet.* **111**, 243-252.
6. Louis, C. F., Gallant, E. M., Remple, W. E., and Mickelson, J. R. (1990) Malignant hyperthermia and porcine stress syndrome. *Pig News Inform.* **11**, 341-344.
7. MacLennan, D. H. and Phillips, M. S. (1992) Malignant hyperthermia. *Science* **256**, 789-794.
8. Mitchell, G. and Heffron, J. J. A. (1982) Porcine stress syndrome. *Adv. Food Res.* **28**, 167-318.
9. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874-879.
10. Park, Y. I., Park, T. S., Shin, Y. S., Lee, H. K., Kim, H. K., Oh, H. S., Son C. S., and Han J. Y. (1997) Detection of porcine stress syndrome using PCR-RFLP. *Anim. Genetics and Breeding* **1**, 73-80.
11. Remple, W. E., Lu, M., Kandelgy, S., Kennedy, C. F. H., Irvin, L. M., Mivhelson, J. R., and Louis, C. F. (1993) Relative accuracy of the halothane challenge test and a molecular genetic test in detecting the gene of porcine stress syndrome. *J. Anim. Sci.* **71**, 1395-1399.
12. Sather, A. P., Jones, S. D. M., and Tong, A. K. W. (1991) Halothane genotype by weight interactions on pig meat quality. *Can. J. Anim. Sci.* **71**, 645-651.
13. Simpson, S. P. and Webb, A. J. (1989) Growth and carcass performance of British Landrace pigs heterozygous at the halothane locus. *Anim. Prod.* **49**, 503-510.
14. Trommelen, G. J. M., Den Dass, N. H. G., Vijg, J., and Uitterlinden, A. G. (1993) Identity and paternity testing of cattle: Application of a deoxyribonucleic acid profiling protocol. *J. Dairy Sci.* **76**, 1403-1411.
15. (사)한국중축개량협회 (2002) 종돈의 PSS 유전자 검사 사업 추진계획. pp. 1-5.
16. 축산기술연구소 중축개량부 (2002) 종돈 PSS 유전자 검사업무 협의회 자료. pp. 1-5.

(2004. 8. 9. 접수 ; 2004. 12. 9. 채택)