

한국 재래 닭 품종 특성 및 초기성장 개량을 위한 분자표지 개발

오재돈¹ · 박미현¹ · 공홍식² · 이학교^{1,†} · 전광주¹ · 연성흠³ · 상병돈³ · 최철환³ · 조병욱⁴

¹한경대학교 유전정보연구소, ²축산물등급판정소, ³축산연구소, ⁴밀양대학교 동물자원학과

Characteristics and Improving Breed of Economic Traits of Korea Native Chicken

J. D. Oh¹, M. H. Park¹, H. S. Kong², H. K. Lee^{1,†}, G. J. Jeon¹, S. H. Yeon³, B. D. Sang³, C. H. Choi³ and B. W. Cho⁴

¹Genomic Informatics Center, Hankyong National University, ²Animal Products Grading Service,

³National Livestock Research Institute, ⁴Department of Animal Science, Miryang National University

ABSTRACT This study was conducted to estimate the effects of genotype for chicken major histocompatibility complex (MHC) B-LB genes on economic traits. To detect polymorphism, 400 bp fragments of MHC B-LB genes were obtained and sequenced. After digestions using restriction enzyme *Hea* III, two restriction enzyme sites were observed. There were two mutations at position 427 and 651 those were decided as Type I and Type II, respectively. Using RFLP analyses, type I were genotyped to TT, TC and CC, and type II to MM, Mm and mm. The relatively higher TC genotype frequencies (0.8) of Type I and Mm genotype frequencies (0.88) of Type II were observed in Korean native chickens. The effects of the genotype on 150 days body weight trait were investigated by the associations of CC and Mm genotypes ($P < 0.05$) in Korean native chickens. This result suggests that a significant association exists between the SNP and 150 days body weight.

(Key words : chicken major histocompatibility complex (MHC), Korean native chicken, economic traits)

서 론

재래 가축은 우리 민족의 중요한 축산물의 공급원이었으나 축산물 수요의 증가로 인해 생산성이 낮은 재래종 가축은 생산성이 높은 개량종 가축에 비하여 경제성이 낮기 때문에 재래종 가축의 사육수가 급격히 감소되면서 사육지역도 교통이 불편한 산간 벽지에 국한되고 이들 재래종 가축은 한우를 제외하고 거의 멸종상태에 이르게 되었다. 그러나 국민소득이 증가함에 따라 외래 수입종에서 생산되는 값싼 고기보다는 지방이 적고 맛이 좋은 재래종을 찾는 소비층이 증가하면서 고급 축산물인 재래종에 대한 관심이 높아졌다. 이로 인해 재래 닭 사육이 새로운 양계산업으로 발전하기 시작하였고 이제 재래 닭은 단순히 보존차원을 벗어나 하나의 소득 사업으로 자리를 잡아 나가고 있다. 그러나 이제까지의 재래 닭은 품질의 균일성이 부족하고 생산형질에 대한 개량도가 낮으며 계통이 정립되지 않아 생산물의 규격화 및

산업화에 어려움이 있어 왔다. 그러므로 재래 닭의 유전특성에 따른 고유 계통의 과학적인 유지 보존과 육성 및 경제적 부가가치 증대를 위한 육종 체계를 개발하는 것이 시급한 과제이다.

닭의 Major Histocompatibility Complex(MHC) class I (B-F), class II (B-LB)와 class IV (B-G) 유전자 내에는 많은 다인자 지역이 존재하고 있으며 매우 높은 다형성을 지니고 있다(Pink et al., 1977; Briles et al., 1983; Guillemot et al., 1998; Pharr et al., 1993; Kaufman et al., 1996; Jarvi et al., 1999; Li et al., 1999). 또한 MHC gene 내 다형성이 여러 가지 경제형질에 영향을 미치고 있음이 보고되고 있다(Gavora et al., 1986; Lamont et al., 1987; Abplanal et al., 1992; Lakshmanan et al., 1997). 최근 보고에 따르면 MHC B-F, B-LB와 B-G 지역 유전자의 Single-strand Conformational Polymorphism(SSCP)과 Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)을 이용하여 분석한 결과 유전자형에 따라 면역에 대한 저항성뿐만 아니라

[†] To whom correspondence should be addressed : lhkyu@hnu.ac.kr

라 산란과 번식에도 많은 영향을 미치고 있다고 한다 (Lakshmanan et al., 1997; Li et al., 1997; Zhang et al., 1999; Xi et al., 2000; Livant et al., 2001; Lglesias et al., 2003).

MHC 유전자는 면역 저항력, 산란과 번식 및 성장에 크게 관여하고 있는 유전자이다. 또한 매우 다양한 염기의 변이가 많은 지역에서 나타나고 있다. 따라서 본 연구는 MHC B-LB 지역의 다형성을 이용하여 한국 재래 닭의 유전적 특성을 규명하여 유전자원을 보존하는데 보다 과학적인 접근과 방법을 제시하고자 하며 또한 외래종에 비해 경제성이 낮은 재래 닭을 개량하여 경제적 부가가치를 높이는데 있다. 따라서 외래종과 한국 재래 닭 간의 유전적 차이를 구분할 수 있으며 경제형질 유전자 표지를 이용한 육종방법을 개발하는데 필요한 유전자형 정보를 구명, 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시축

한국 재래 닭 흑색종 30수, 적갈 30수, 황갈 30수, 백색 30수, 오골계 30수와 로드아일랜드 30수, 백색레그혼 F 계통 30수, 백색레그혼 B 계통 30수, 코니쉬 30수, 총 270수를 선발 후 혈액을 채취하여 공시재료로 활용하였다.

2. Genomic DNA 분리 및 유전자 증폭

채취한 혈액에서의 Genomic DNA 분리 및 정제는 Miller 등(1998)의 방법을 일부 변경하여 수행하였다. 분리 정제된 DNA는 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4 ; 1 mM EDTA)에 용해하여 분석에 사용하였다.

상기목적을 달성하기 위하여 분석결과에의 유효성 확인 실험에서 이들 집단에서 MHC Class II B-LB 지역 내 염기 변이 지역을 증폭할 수 있는 Primer를 국내 전문회사에서 Table 1과 같이 주문 제작하였다. PCR 반응액 조성은 PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)와 2.5 mM dNTPs, 3 pmol fluorescent dye labeling

primer pairs, 10 ng의 template DNA, 0.5 U *Taq* DNA polymerase(TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan)와 ddH₂O를 사용하여 총 반응액은 10 µL로 하였다. PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Co., USA)를 사용하였고, PCR 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 표 1에서 제시한 primer의 적정 온도 61°C에서 30초간 annealing, 그리고 72°C에서 1분간 extension을 35cycles 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 extension 과정을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 증폭된 단편의 크기가 예상된 범위내에 존재하는지를 확인하기 위하여 EtBr(ethidium bromide)이 포함된 2% agarose gel에 전기영동하고 UV상에서 관찰하였다.

3. 제한효소 반응을 이용한 유전자형 분석

전기영동 과정을 거쳐 확인된 증폭 산물 3 µL, 제한효소 Hae III 1.5 unit, Enzyme Buffer 1 µL와 ddH₂O를 사용하여 총 반응액은 10 µL로 조성하여 37°C에서 3시간 이상 제한효소에 반응을 시켜 처리를 하였다. 절단된 단편의 크기는 EtBr(ethidium bromide)이 포함된 3.5 % agarose gel에 전기영동하고 UV상에서 관찰하여 결과를 분석하였다.

4. MHC Class II B-LB Region 염기서열 분석

PCR product 5 µL에 ExoSAP-IT(Amersham Biosciences, USA) 2 µL을 첨가하여 총 부피를 7 µL로 하여 37°C에서 20분간 반응시켜 증폭된 산물 이외의 것들을 제거하여준 다음 E.T terminator dye(Amersham Biosciences, USA)을 제작사의 지침서에 따라 Table 1의 primer와 함께 GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)을 이용하여 재증폭 과정을 수행하였다.

전 처리 되어진 PCR product를 다시 한번 AutoSap (Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 purification한 후 염기서열 결정은 MegaBACE DNA Analysis systems (Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 수행하였으며, SeqMan™ II (DNASTAR Inc)을 이용하여 개체간의 DNA 염기서열 변이 여부를 분석하였다.

5. 통계분석

MHC Class II B-LB 지역의 각 유전자형에 대한 경제형질과의 연관성을 분석하기 위하여 SAS v8.1 Package/PC(SAS, 1990)를 이용하여 최소 자승법(least square method)으로 분석하였다. 분석에 이용한 모델식은 다음과 같다.

$$y_{ijk} = \mu + b_i S W_i + G_j + e_{ijk}$$

Table 1. Information on MHC Class II B-LB region for experiments

Primer	Sequence*
BLB2F	5'-tggagaggcacatctacaac-3'
BLB2R	5'-aacacttcacctcgatctc-3'

* The nucleotide in sequence on Gene Bank accession number: M26306.

위 식에서

y_{ijk} = 형질에 대한 관측치

μ = 형질의 전체평균

b_s = 회귀계수

SW_i = 개체의 150일령 체중

G_j = j 번째 유전자형 효과($j=1(AA), 2(BB), 3(AB)$)

e_{ijk} = 임의오차

결과 및 고찰

제작한 primer를 이용하여 PCR 증폭을 한 결과 400 bp의 예상하였던 크기의 증폭산물을 얻었음을 전기영동을 통해 확인하였으며 증폭산물의 제한효소 처리 결과 Fig. 1과 같은 유형들을 관찰할 수 있었다.

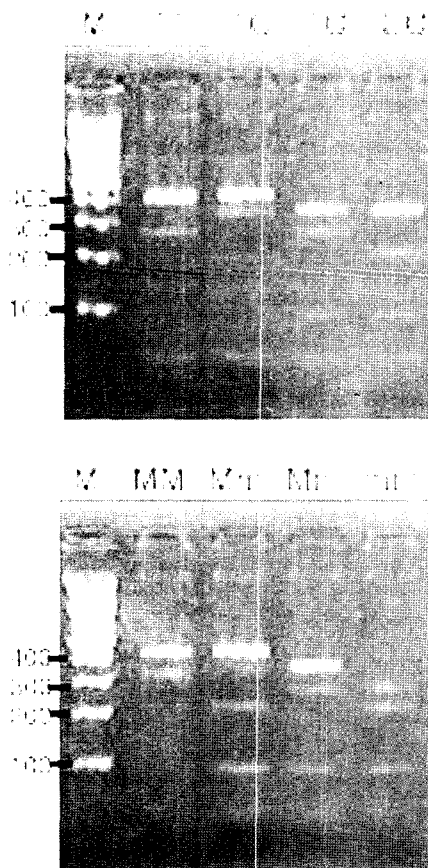


Fig. 1. The band patterns of 400 bp fragment digested by HaeIII restriction enzyme in chickens.

M: Molecular size marker(100 bp DNA ladder),

TT, TC, CC, MM, Mm, mm: corresponding genotypes.

Fig. 1은 400 bp의 PCR 증폭산물의 제한효소와 반응시킨 후 전기영동을 통해 얻어진 절단된 절편들의 유형이다. Fig. 2에서 제시한 바와 같이 증폭된 산물의 염기서열 내 두 곳의 제한효소 HaeIII의 site(GG/CC)가 존재하며, 400 bp의 염기서열(Gene Bank accession number: M26306) 중 27개 지역에서 염기변이 및 삽입이 검출되었다. 68 bp 지역에서 C가 T로 염기치환이 일어나고 있음을 알 수 있다. 또한 292 bp 지역에서 G 염기가 삽입된 것을 알 수 있었다. 67 bp 지역이 절단되는 유형을 바탕으로 Type I의 유전자형(TT, TC, CC)을 분석하였으며, 292지역이 절단되는 유형을 바탕으로 Type II의 유전자형(MM, Mm, mm)을 분석하였다. 여기서 400, 333, 292, 225 지역의 절편들의 유형을 분석에 이용하여 유전자형을 쉽게 알아낼 수 있다.

Table 2, 3은 제한효소 반응을 통해 얻어진 증폭산물의 절편들을 Type I과 Type II로 나누어 분석한 결과이며 각각의 표에서 보았을 때 Type I의 TC 유전자형이 재래 닭과 오골계에서 높게 나타남을 알 수 있으며 Type II의 Mm 유전자형이 재래닭에서 높게 나타나고 있음을 알 수 있다. 레그혼종에 있어서 C allele이 다른 품종에 비해 낮은 출현빈도를 보이고 T allele은 가장 높은 출현빈도를 보이고 있다. 또한 재래닭의 M allele 역시 다른 품종에 비해 낮은 출현 빈도가 m allele은 가장 높은 출현빈도가 검출되었다. 코니쉬의 M allele의 출현 빈도가 가장 높게 나타났으며 m allele은 가장 낮은 출현빈도가 검출되었다. 이는 Type I과 Type II의 유전자형의 발현빈도에서 품종간의 차이가 조금씩 있으며 이들을 조합하여 각 품종간의 차이를 보았을 때 품종집단간의 차이가 나타남을 알 수 있다. 유전자형과 형질간의 연관성 분석에 있어 오류를 방지하기 위해 집단별 유전자형의 Hardy-Weinberg 평형 여부를 χ^2 값을 이용하여 분석하였다. 분석 결과 각 집단의 유전자형은 연관 평형 상태에 있음을 확인할 수 있었다.

Table 4, 5에서는 한국 재래 닭과 오골계의 Type I, Type II의 유전자형이 150일령에 미치는 영향에 대한 분석 결과를 제시하였다. 결과에 따르면 Type I 유형의 CC 유전자형을 가진 재래 닭과 오골계 집단에서 150일령 체중에서 유의한 결과가 도출되었고, Type II 유형의 Mm 유전자형을 가진 재래 닭과 오골계 집단에서 150일령 체중에서 유의한 결과가 도출되었다. 따라서 한국 재래 닭의 개량에 있어 Type I의 CC, Type II의 Mm 유전자형은 초기성장에 영향을 미치는 것으로 사료되어지며 이와 같은 유전자형을 지닌 개체들을 개량에 활용하게 되면 초기성장에 있어 높은 능력을 지닌 집단으로 개량할 수 있다.

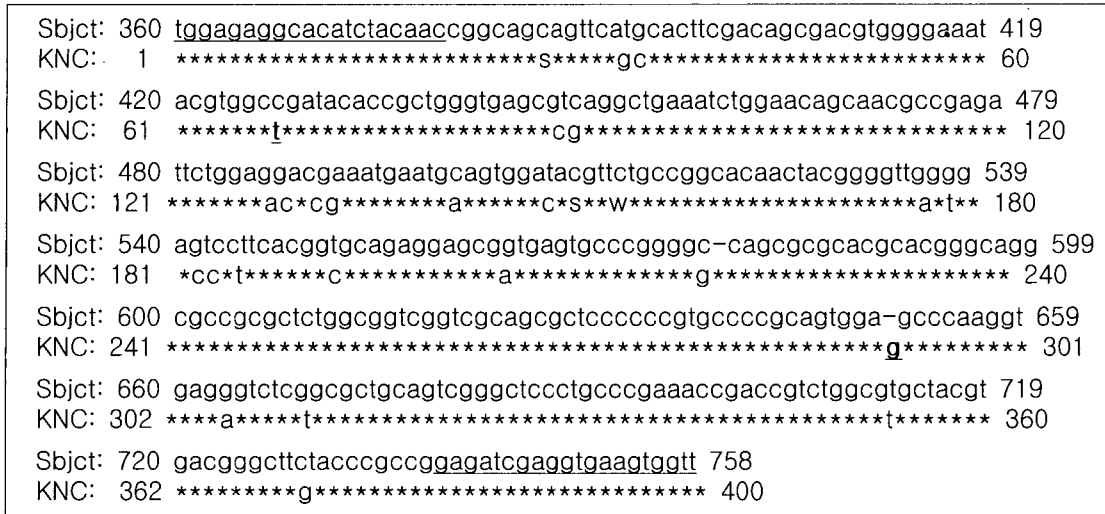


Fig. 2. Alignment of the PCR fragment (400 bp) of MHC B-LB in Korean Native Chickens to the expected sequence of MHC class II beta chain gene(Gene Bank accession number: M26306).

Sbjct = Gene Bank accession number: M26306

KNC = Korean Native Chicken.

_____ - primer site.

n - restriction site.

* - identical to sequence(Gene Bank accession number: M26306).

W = A or T, S = G or C

Table 2. Allele and genotype frequencies at type I locus of MHC B-LB gene in chickens.

Breed	No	Genotype frequencies			Allele frequencies		χ^2 -values
		TT	TC	CC	T	C	
KNC	120	0.08	0.80	0.12	0.52	0.48	0.266
KOC	30	0.00	0.81	0.19	0.60	0.40	2.400
Rhode Island	30	0.05	0.74	0.21	0.53	0.47	0.260
Leghorn	60	0.04	0.68	0.28	0.63	0.37	3.632
Cornish	30	0.10	0.72	0.18	0.53	0.47	0.266

KNC : Korean Native Chicken.

KOC : Korean Ogol Chicken.

Table 3. Allele and genotype frequencies at type II locus of MHC B-LB gene in chickens

Breed	No	Genotype frequencies			Allele frequencies		χ^2 -values
		MM	Mm	mm	M	m	
KNC	120	0.04	0.88	0.08	0.48	0.52	0.267
KOC	30	0.19	0.71	0.10	0.55	0.45	0.600
Rhode Island	30	0.21	0.74	0.05	0.56	0.44	1.060
Leghorn	60	0.19	0.76	0.05	0.58	0.42	1.666
Cornish	30	0.28	0.65	0.07	0.60	0.40	2.400

KNC : Korean Native Chicken.

KOC : Korean Ogol Chicken.

Table 4. Least square means of economic traits on the genotype(type I) in chickens

Strains	Body weight	Mean±SE		
		TT	TC	CC
KNC	150days	1,471.7±3.41 ^a	1,485.7±3.54 ^a	1,488.7±3.24 ^b
KOC	150days	-	1,389.5±5.44 ^a	1,393.8±5.99 ^b

KNC : Korean Native Chicken.

KOC : Korean Ogol Chicken.

Table 5. Least square means of economic traits on the genotype(type II) in chickens

Strains	Body weight	Mean±SE		
		MM	Mm	mm
KNC	150days	1,548.3±5.21 ^a	1,550.1±5.41 ^b	1,544.9±5.76 ^a
KOC	150days	1,389.9±5.95 ^a	1,391.9±5.95 ^b	1,387.5±5.29 ^a

KNC : Korean Native Chicken.

KOC : Korean Ogol Chicken.

레그혼종의 12가계를 조성하여 MHC(B blood group)의 haplotype 별 경제형질과의 연관성을 분석한 결과 수정란의 부화능력, 난생산, 40주령 체중 그리고 40주령 생산란의 무게에 있어 통계적 유의성이 보고된 바 있다(Abplanalp et al., 1992). 최근 발표되어지고 있는 MHC class 유전자에 대한 보고에 따르면 매우 다양한 변이 지역들을 포함하고 있으며 변이들에 의한 haplotype 역시 매우 다양하게 나타나고 있다. 본 연구에서 역시 MHC B-LB 영역에서 매우 다양한 지역에서 염기 변이를 발견할 수 있었다. 또한 백색 레그혼 집단의 MHC class II 지역의 RFLP 분석 결과 검출된 단편들을 이용하여 혈통을 규명하고 각 유전자형이 생산형질과 질병 저항력에 연관이 있음을 보고한 바 있으며 차후 QTL 연구를 통한 질병 저항력과 난 생산에 있어 강력한 후보유전자로서의 가능성을 보고하였다(Lakshmanan et al., 1997). 본 연구에서는 초기 성장률에 있어 유전자형이 미치는 영향이 통계적으로 유의한 결과가 도출되었다. 질병 저항력이 높을수록 초기 성장률이 높게 나타나는 것을 볼 때 앞서 발표되었던 보고들과 본 연구의 결과와 깊은 연관성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

이상 설명한 바와 같이 본 연구에 따르면 유전자형의 빈도를 이용하여 한국 재래 닭 집단의 특성을 규명할 수 있으

며 이를 바탕으로 유전자원의 보존에 활용할 수 있으며 Type I의 CC, Type II의 Mm 유전자형을 이용하여 우수한 경제형질을 보유하고 있는 개체들을 개량에 이용하여 부가가치를 높임과 동시에 한국 고유의 유전자원을 지속적이고 과학적으로 보존할 수 있는 효과를 얻을 수 있다고 사료된다.

적 요

본 연구는 한국 재래 닭의 유전적 특성을 분자표지를 이용하여 그 차이를 규명하고 초기 성장에 미치는 영향을 분석하여 이를 이용한 재래 닭의 개량에 목적으로 실시하였다. MHC class II B-LB 유전자 내의 염기변이체가 경제형질에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. MHC class II B-LB 유전자 내 400 bp 크기의 유전자를 증폭하여 염기서열 분석과 제한효소 처리를 이용한 다형성 분석을 실시하였다. 연구결과 두 개의 제한효소 절단지역이 발견되었으며 427 지역을 Type I으로 651 지역은 Type II로 정하여 RFLP 분석을 실시하였다. Type I 지역의 유전자형은 TT, TC, CC로 나타났으며, Type II 지역의 유전자형은 MM, Mm, mm으로 나타났다. TC와 Mm 유전자형이 다른 유전자형과 비교하였을 때 한국 재래 닭에서 높은 출현빈도를 보였다(0.8, 0.88). 유전자형이 한국 재래 닭의 150일령 체중에 미치는 영향을 분석한 결과 CC와 Mm 유전자형에서 통계적 유의성이 도출되었다($p < 0.05$). 따라서 본 연구의 결과를 이용하여 한국 재래 닭의 유전적 특성을 규명할 수 있으며 초기 성장이 높은 성적을 나타내는 CC, Mm 유전자형을 개량에 이용하게 된다면 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료되어진다. 본 연구의 결과는 차후 한국 재래 닭의 과학적이고 지속적인 유전자원의 보존과 육종 전략에 있어 매우 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 2003년도 과제인 “한국 재래 닭 경제형질관련 QTL 탐색 및 표지 유전자 개발”의 일환으로 수행되었다. 농촌진흥청 바이오그린21사업단 관계자들과 시료를 제공한 축산연구소 관계자들에게 깊은 감사를 드리는 바입니다.

인용문헌

- Abplanal HK, Sato DN, Reid J 1992 Reproductive performance of congenic leghorns carrying different haplotypes for major histocompatibility complex. *Poul Sci* 71:9-17.
- Briles WE, Briles RW, Taffs RE, Stone HA 1983 Resistance to malignant lymphoma in chicken is mapped to subregion of Major Histocompatibility (B) complex. *Science* 219:977-979.
- Gavora JS, Simonsen M, Spencer JL, Fairfull RW, Gowe RS 1986 Changes in the frequency of major histocompatibility haplotypes in chickens under selection for both high egg production and resistance to Marek's disease. *Z Tierzuechtungsbiol* 103:218-226.
- Guillemot F, Billault A, Pourquie O 1998 A molecular map of the chicken major histocompatibility complex; the class II β gene are closely linked to the class I gene and the nucleolar organizer. *EMBO Journal* 7:2775-2785.
- Jarvi SI, Goto RM, Gee GF, Briles WE, Miller MM 1999 Identification, inheritance, and linkage of B-G-like and MHC class I gene in cranes. *The Journal of Heredity* 90(1):152-159.
- Kaufmanm J, Wallny HJ 1996 Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of bird. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 212:128-141.
- Lakshmanan N, Gavora JS, Lamont SJ 1997 Major histocompatibility complex class II DNA Polymorphism in chicken strains selected for Marek's disease resistance and egg production or egg production alone. *Poul Sci* 76:1517-1523.
- Lamont SJ, Hou YH, Young BM, Nordskog AW 1987 Differences in major histocompatibility complex gene frequencies associated with feed efficiency and laying performance. *Poul Sci* 66:819-824.
- Lglesias GM, Aoria LA, Goto RM, AM Jar Miquel MC, Lopez OJ, Miller MM 2003 Genotypic variability at the major histocompatibility complex (B and Rfp-Y) in Comperos broiler chicken. *Animal Genetics* 34:88-95.
- Li L, Johnson LW, Ewald SJE 1997 Molecular characterization of major histocompatibility complex (B) haplotypes in boiler chickens. *Anim Genet* 28:258-267.
- Li L, Johnson LW, Livant EJ, Ewald SJ 1999 The MHC of a broiler chicken line: serology, B-G genotypic, and B-F/B-LB sequences. *Immunogenetics* 49:215-224.
- Livant EJ, Zhang D, Johnson LW, Shi W, Ewald SJ 2001 Three new MHC haplotypes in broiler chicken. *Anim Genet* 32:123-131.
- Miller SA, Kykes DD, Polesky HF 1998 A simple salting out procedure for extracing DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Reg* 16:1215.
- Pharr GT, Bacon LD, Dodgson JB 1993 Analysis of B-L β -chain tene expression in two chicken Cdna libraries. *Immunogenetics* 37:381-385.
- Pink J RL, Droege W, Hala K, Miggiano VC, Ziegler Z 1977 A three-locus model for the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 5:203-216.
- Xi Q, Li YY, Tang YX, Zhou ZH, Lian ZX, Ouyang JH, Sun H, Li N 2000 Analysis of sequence polymorphisms of B-L II β (β I exon) in silkie. *Journal of Agricultural Biotechnology* 8(2):138-142.
- Zhang DG, O'Keefe, Li L, Johnson LW, Ewald SJ 1999 A PCR method for typing B-L β II family (class II MHC) alleles in broiler chicken. *Anim Genet* 30:109-119.