

돼지 mtDNA D-loop 지역의 Large White 특이 중복현상 탐지

김재환·한상현·이성수·고문석·이정규¹·전진태¹·조인철*

농촌진흥청 국립축산과학원, ¹경상대학교 응용생명과학부

Received November 28, 2008 / Accepted March 29, 2009

Detection of a Large White-Specific Duplication in D-loop Region of the Porcine MtDNA. Jae-Hwan Kim, Sang-Hyun Han, Sung-Soo Lee, Moon-Suk Ko, Jung-Gyu Lee¹, Jin-Tae Jeon¹ and In-Cheol Cho*. National Institute of Animal Science, R. D. A., ¹Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University - The entire D-loop region of the porcine mitochondrial DNA (mtDNA) was amplified from six pig breeds (Landrace, Duroc, Large White, Korean native pig, Berkshire, and Hampshire) using a primer set designed on the basis of reported porcine mtDNA sequences. From analyses through cloning, DNA sequencing and multiple sequence alignment, an 11-bp (TAAAACACTTA) duplication was observed after known tandem repetition in the D-loop region, which promoted hetroplasmly in mtDNA. Although the existence of the 11-bp duplication has been previously reported in Duroc and Japanese native pigs, there have not been any attempts to know the characteristics of this duplication in other breeds so far. A 150 bp fragment containing the 11-duplication was amplified and typed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). All Large Whites had two duplication units and Duroc showed heteromorphic patterns, 11.2% (9/80) of the animals had the 11-bp duplication in total. On the other hand, Landrace, Berkshire, Hampshire and Korean native pigs were non-duplicated. This result showed that the 11-bp duplication could be used as a breed-specific DNA marker for distinguishing pure Landrace and Large White breeds.

Key words : mtDNA D-loop, Large White, 11-bp duplication, breed-specific DNA marker

서 론

우리나라의 양돈업에서는 품종 간의 교잡을 통하여 육질 및 성장형질 등 우수한 비육돈의 생산을 위해 노력하고 있으며, 이에 Landrace, Large White 및 Duroc 등 순종들을 사용하고 있다. 생산체계의 신뢰성을 유지하기 위해서는 순수한 순종혈통을 유지하고 공급할 수 있는 기반이 정착되어야 하며, 순종선발에 있어서 기존의 표현형에 근거한 선발보다 더욱 정확하고 신뢰성 높은 선발방법의 개발 및 활용이 절실히 필요한 실정이다. 또한 생산지에서 사육되고 있는 돼지의 품종들은 외형상으로 확인이 가능한데 반해 도체 후의 정확한 판별이 불가능하다는 약점을 이용하여 발생하는 일부 부정유통 사례의 방지를 위해서도 표현형적 판별과 병행하여 유전자형을 이용한 유전적 표지인자의 개발이 시급하다.

분자유전학적인 기법을 이용한 돼지의 품종구별은 KIT과 MC1R을 이용해서 많은 연구들이 이루어져 있다. KIT 내부의 유전자형에 근거하여 유색품종과 백색품종을 구별할 수 있다고 보고되어 있으며[12], MC1R의 분석을 통해서 각각의 품종들이 5개의 유전자형에 속함이 밝혀졌다[8,9]. 그러나 품종구별을 위해서 이 두 유전자를 제외한 접근은 거의 전무한 실정이다.

인간을 포함한 포유류의 계통유전학적, 진화학적 유연관계의 분석에 있어서 mitochondrial DNA (mtDNA)는 유용한 표지인자로서 사용되고 있다. MtDNA는 특이적으로 모계유전 형태를 보이고[6], 재조합 현상이 발생하지 않으며, 핵 DNA보다 10배 이상 높은 염기변이율을 보인다[1,17]. 특히, D-loop 부위는 mtDNA 내부의 다른 부위에 비해서 더욱 높은 염기변이율을 나타낸다[3]. 이런 이유에 근거하여 mtDNA는 DNA 다형성에 근거한 종간의 분석뿐 아니라 종내 계통 및 개체간 식별에도 유용하게 사용되고 있다[7,13,19].

돼지의 mtDNA D-loop 지역 내에는 특징적인 두 부위가 존재한다. 첫째는 10-bp (TACACGTGCG)가 반복되는 tandem repeat region으로서[5], 돼지만만 아니라 말, 사슴, 상어 등 다양한 종에서 보고가 되어 있지만[4,14,18], 특징적으로 돼지에서는 14회에서 29회까지의 반복수가 개체 내에서 다양하게 나타나는 heteroplasmy 현상으로 보고되어 있다[5]. 둘째는 11-bp (TAAAACACTTA)가 중복되는 부위로서, 이 중복현상은 일본재래돼지인 Satsuma에서 최초로 보고되었으며[15], 그 후 Duroc 품종에서도 보고되었다[20]. 하지만, 이 두 품종을 제외한 다른 품종에서는 밝혀져 있지 않을 뿐만 아니라, 여러 돼지의 품종별 분포양상 역시 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구는 돼지의 품종별로 11-bp 중복현상의 분포양상을 파악하고, 이와 관련하여 품종특이적인 DNA marker의 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 수행하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-31-290-1593, Fax : +82-31-290-1602

E-mail : choic4753@rda.go.kr

재료 및 방법

공시동물 및 DNA 추출

Landrace, Yorkshire, Duroc 각각 80두와 한국재래돼지 20두, Hampshire 5두, Berkshire 55두의 총 320두의 혈액으로부터 혈액을 채취하였다. Genomic DNA 추출은 sucrose-proteinase K 방법[2]을 일부 변형하여 수행하여 sucrose-proteinase K 완충액을 첨가하고 55°C에서 over-night 진탕하였다. 추출액에 RNase를 처리한 후, phenol-chloroform을 이용하여 정제하고, ethanol 침전법으로 DNA를 회수하여 TE buffer에 용해하였다. 준비한 DNA 용액은 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer로 흡광도를 측정 한 후 A₂₆₀/A₂₈₀ 1.8 이상인 DNA 용액들을 50 ng/μl로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

돼지 mtDNA D-loop 전체영역 증폭

돼지 mtDNA D-loop 지역의 전체 염기서열을 분석하기 위하여 기존에 보고된 mtDNA 염기서열(GenBank accession number: NC_000845)을 토대로 D-loop-F (16594-16613) 및 D-loop-R (1176-1195) primer를 제작하였다. 예상되는 증폭산물의 크기는 1,215 bp이며, tRNA-Pro 및 tRNA-Phe 서열 일부를 포함하고 있다. 각 primer 서열은 다음과 같다.

D-loop-F: 5'-TCT AAC TAA ATT ATT CCC TG-3'
 D-loop-R: 5'-ATA ATT TAA GCT ACA TTA AC-3'

PCR 반응은 genomic DNA 50 ng, 10×buffer (TaKaRa, Japan) 2.5 μl, 0.2 mM dNTP, 10 pmol primer 각각 1.5 μl, Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan) 2 unit, 증류수 14.8 μl를 첨가하여 전체 25 μl의 반응액을 제조하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 2분간 처리한 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 30 cycle을 수행하였으며, 72°C에서 5분간 최종 신장반응을 수행한 후 4°C에서 보관하였다.

유전자 cloning 및 염기서열 분석

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 PCR product를 ligation 시킨 후 Top 10 F' competent cell 내부로 형질전환을 수행하였다. DNA sequencing은 Applied Biosystems 3700 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 실시하였으며, 얻어진 염기서열은 Clustal X version 1.83 [16]을 이용하여 다중비교하였다.

11-bp 중복부위 증폭 및 PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 분석

11-bp 중복부위를 증폭하기 위해서 분석된 서열을 이용하여 primer를 제작하였으며, 중복부위를 포함하여 약 150-bp

크기의 절편을 증폭하였다. 제작된 primer의 서열은 다음과 같다.

150-F: 5'-CAC ACC CTA TAA CGC CTT GC-3'
 150-R: 5'-TAA GTG CCT GCT TTC GTA GC-3'

PCR 조건은 D-loop 전체영역 증폭방법과 동일하게 수행하였으며, PCR 반응조건은 94°C에서 2분간 처리한 후, 94°C에서 20초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 총 35 cycle을 실행하였으며, 72°C에서 5분간 최종 신장반응을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 8% polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 실시하였으며, 이 때 100 V에서 6시간 동안 반응시켰다. 그 후 ethidium bromide로 염색하고 UV 하에서 확인하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 돼지 mtDNA D-loop 지역에서 나타나는 11-bp 중복현상과 관련하여 품종별로 나타나는 분포양상을 파악하고 나아가 품종 특이적 DNA marker를 개발하기 위하여 수행하였다.

기존에 보고된 서열을 바탕으로 mtDNA D-loop 전체영역을 증폭하기 위한 primer를 제작하였으며, 6개의 품종을 대상으로 PCR 반응을 수행하였다. D-loop 영역 전체를 포함하는 PCR product는 cloning 및 DNA sequencing 과정을 통하여 염기서열을 분석하였다. D-loop 서열의 시작부위를 기준으로 대략 710-bp 위치에서 기 보고된 10-bp (TACACGTGCG)의 종특이 서열인 tandem repeat region이 존재하고 있음을 확인하였고, 이 부위에서 돼지 각각의 개체 간에 반복수가 14회에서 29회까지 다양하게 나타나는 heteroplasmy 현상이 보고된 바 있다[5]. Fig. 1은 D-loop 전체 염기서열을 바탕으로 작성한 모식도로서, 10-bp tandem repeat region으로부터 180-bp 뒤쪽으로 11-bp가 반복되는 중복현상이 발견되었다. Large White와 일부 Duroc 품종은 Type 1으로 11-bp의 염기서열이 중복되어 관찰된 반면, 일부 Duroc 품종을 포함한 나머지 품종들은 Type 2로서 중복현상이 발견되지 않았다(Fig. 1).

11-bp 중복현상은 일본재래돼지인 Satsuma에서 최초로 보고되었으며[15], 그 후 Duroc 품종에서도 보고되었다[20]. 그러나 이를 이용한 품종 간 중복현상의 유무 및 출현빈도에 대한 분석은 이루어지지 않았다. 또한 Large White 및 Duroc을 포함한 돼지 25품종에 대하여 D-loop 전체지역에 대한 분석을 하였으나, 중복현상에 대한 분석이 포함되어 있지 않았다[10]. 그러므로 품종별 중복현상의 분석을 위하여 분석된 D-loop 전체영역의 서열을 바탕으로 primer를 제작하였으며, 11-bp 중복지역을 포함한 약 150-bp의 절편을 증폭하였다. 증폭된 PCR product를 이용하여 PAGE 분석을 수행한 결과, 품종 특이적인 밴드양상이 확인되었고(Fig. 2), 돼지 품종별

Fig. 1. A schematic organization of two variable regions in the porcine mtDNA D-loop region. A is the 10-bp tandem repeat region which makes heteroplasmy of the porcine mtDNA and B is the 11-bp duplication motif which is specific in Large White. The sequence alignment above B region indicated two types related to duplication pattern. Upper- and underlined sequences denote orientation and position of primers for duplication detection using PAGE analysis.

Fig. 2. Band patterns generated by 11-bp duplication in the mtDNA D-loop region. M, the 100-bp ladder marker; Type 1, the 11-bp duplicated and Type 2, the non-duplicated.

11-bp 염기서열 중복현상에 대한 발생 빈도는 Table 1에 나타내었다.

Fig. 2의 전기영동 결과에서, 11-bp 중복현상이 나타나는 Type 1과 존재하지 않는 Type 2를 육안으로 확실히 구분할

수 있었다. 이런 중복현상은 Large White 품종과 Duroc 품종의 일부에서 발견되었으나, 나머지 5품종에서는 전혀 나타나지 않았다. Table 1은 본 연구에서 사용한 품종들 각각의 두수와 PAGE 분석으로 확인된 품종별 중복현상의 분포를 보여주고 있다. Large White 품종은 80두에서 모두 중복현상이 발생하는 것으로 확인된 반면 Duroc 품종은 heteromorphic pattern이 나타났는데, 전체 80두에서 9두에서만 중복현상이 발생하여 11.2%의 발생률을 나타내었다. 그러나 이 두 품종을 제외한 나머지 5품종에서는 중복현상이 전혀 발생하지 않았다. 특히 본 연구에서 사용한 Duroc 품종에 대한 혈통을 추적한 결과 유럽지역에서 도입한 개체에서는 중복현상이 없었으나, 미주지역에서 도입한 개체에서만 발견되었다. 이런 결과는 미주지역의 Duroc 품종은 중복현상을 갖는 다른 계통을 모계로 교잡되었을 가능성이 존재하는 것으로 추정된다.

Table 1. The types and frequencies of 11-bp duplication in the mtDNA D-loop region among seven pig breeds

Breed	Duplication patterns			Frequency of duplication (%)	Accession No.
	No. of tested	Type 1*	Type 2*		
Landrace	80	80		0	NC_000845
Large White	80		80	100	AY243481
Duroc	80	71	9	11.2	AY243481, AY338472
Hampshire	5	5		0	AY429460
Berkshire	55	55		0	AY429459
Korean native pig	20	20		0	AY343480

*, given in Fig. 2.

Band patterns generated by 11-bp duplication in the mtDNA D-loop region. M, the 100-bp ladder marker; Type 1, the 11-bp duplicated and Type 2, the non-duplicated.

돼지의 품종구분을 위한 현재까지의 연구들은 *KIT*과 *MC1R*을 이용한 분석에 의해서 이루어져 있다. *KIT*의 연구에 의하면 exon 17번과 intron 17번 사이에서 나타나는 splice mutation의 분석을 토대로 백색종인 Landrace, Large White 등의 백색품종과 Duroc, Berkshire, Hampshire 등의 유색품종을 구별할 수 있다고 보고되어 있다[12]. 또한 *MC1R*의 경우 대립유전자별로 *allele*1-6*으로 분류하여 각각의 품종들을 구분하고 있다[8,9]. Landrace와 Large White는 백색품종으로서 *KIT*와 *MC1R*을 이용한 구분은 현재 불가능하다. 11-bp 중복현상이 본 연구에서 Large White 전체와 Duroc의 일부에서 나타나지만, Duroc인 경우 *MC1R* 분석에 근거하여 특이적으로 *allele*4*며 구분이 가능하기 때문에, 본 연구결과를 토대로 Landrace와 Large White를 구분할 수 있는 DNA marker로서 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 돼지 6품종을 대상으로 mtDNA D-loop 지역에서 특이적으로 나타나는 11-bp 중복현상을 분석하였으며, 그 결과 Large White 전체에서, 그리고 Duroc의 일부에만 11-bp 중복현상이 확인되었다. 비록 Hampshire 품종과 한국재래돼지 분석두수가 적어 중복현상이 발생하지 않는 Type 1이 이 두 품종 특이 형태라고 단정할 수는 없지만, Large White 품종을 식별할 수 있는 DNA marker로서 사용 가능할 것으로 판단된다. 또한 Hampshire 및 한국재래돼지 분석두수를 추가적으로 확보하고 본 연구에서 제외된 타 품종을 수집하여 분석한다면 DNA marker로서 더욱 신뢰성을 높일 수 있을 것이며, 나아가 과거에 발생했을 것으로 추정되는 품종간 교잡의 실체를 파악하고 각 품종별, 특히 Large White와 Duroc의 기원을 밝히는데 중요한 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

돼지 6품종(Landrace, Duroc, Large White, 한국재래돼지, Berkshire, Hampshire)을 대상으로 기존에 보고된 서열을 바탕으로 제작한 primer를 이용하여 mtDNA D-loop 전체영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR product를 cloning 및 DNA sequencing, 다중염기서열비교를 통하여 분석한 결과, mtDNA에서 heteroplasmy가 나타나는 D-loop 내 tandem repeat region 이후에 11-bp 중복이 존재하는 것을 확인하였다. 이런 중복현상은 일본재래돼지와 Duroc에서 보고되었지만, 이를 이용한 돼지 품종별 중복현상의 빈도 및 분포에 관한 연구는 이루어져있지 않다. 품종별 11-bp 중복현상을 분석하기 위해서 6품종을 대상으로 중복지역을 포함한 약 150 bp 절편을 증폭하였으며, PAGE 방법을 통하여 분석하였다. 그 결과 본 연구에서 사용한 품종들 중 모든 Large White에서 중복현상이 발생하는 것을 확인하였으며, Duroc인 경우 11.2% (9/80)에서 중복현상이 확인되었다. 반면에 Landrace, 한국재래돼지,

Berkshire 및 Hampshire에서는 전혀 발견되지 않았다. 이런 결과로서, 11-bp 중복현상의 분석은 현재 구별이 불가능한 Landrace와 Large White를 구별할 수 있는 유용한 DNA marker로서 사용이 가능할 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 '바이오그린21사업(과제번호 20080401034053)'의 지원에 의해 이루어진 연구결과와의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

References

1. Avise, J. C. 1986. Mitochondrial DNA and evolutionary genetics of higher animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **312**, 325-342.
2. Birren, B., E. D. Green, S. Klapholz, R. M. Myers, and J. Roskams. 1997. *Genome analysis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
3. Cann, R. L., W. M. Brown, and A. C. Wilson. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* **325**, 31-36.
4. Cho, I. C., Y. H. Jung, J. K. Jung, P. N. Seong, B. W. Kim, J. G. Lee, and J. T. Jeon. 2003. Genetic Variation of Mitochondrial DNA in Duroc (*Sus Scrofa*) Using Single Stranded Conformation Polymorphism Analysis. *J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.)* **45**, 911-916.
5. Cook, C. E., Y. Wang, and G. Sensabaugh. 1999. A mitochondrial control region and cytochrome b phylogeny of Sika Deer (*Cervus Nippon*) and report of tandem repeats in the control region. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**, 47-56.
6. Ghivizzani, S. C., S. L. D. Mackay, C. S. Madsen, P. J. Laipis, and W. W. Hauswirth. 1993. Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. *J. Mol. Evol.* **37**, 36-47.
7. Giles, R. E., H. Blanc, H. M. Cann, and D. C. Wallace. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 6715-6719.
8. Jiang, S. W., E. Giuffra, L. Andersson, and Y. Z. Xiong. 2001. Molecular Phylogenetics relationship between six Chinese native pig breeds and three Swedish pig breeds from mitochondrial DNA. *Yi. Chuan. Xue. Bao.* **28**, 1120-1128.
9. Kijas, J. M. H., M. Moller, G. Plastow, and L. Andersson. 2001. A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics* **158**, 779-785.
10. Kijas, J., R. Wales, A. Trnsten, P. Chardon, M. Moller, and L. Andersson. 1998. Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pig. *Genetics* **150**, 1177-1185.
11. Kim, K. I., J. H. Lee, K. Li, Y. P. Zhang, S. S. Lee, J. Gongora, and C. Moran. 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim. Genet.* **33**, 19-25.

12. Lin, C. S., Y. L. Sun, and C. Y. Liu. 1999. Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence with Artiodactyla. *Gene* **236**, 107-114.
13. Marklund, S., J. Kijas, H. Rodriguez-Martinez, L. Rnnstrand, K. Funari, M. Moller, D. Lange, I. Edfors-Lilja, and L. Andersson. 1998. Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Res.* **8**, 826-833.
14. Mergen, H., R. Oner, and C. Oner. 2004. Mitochondrial DNA sequence variation in the Anatolian Peninsula (Turkey). *J. Genet.* **83**, 39-47.
15. Miracle, A. L. and D. E. Campton. 1995. Tandem repeat sequence variation and length heteroplasmy in the mitochondrial DNA D-loop of the threatened Gulf of Mexico sturgeon, *Acipenser oxyrinchus desotoi*. *J. Hered.* **86**, 22-27.
16. Okumura, N., N. Ishiguro, M. Nakano, H. Katsuya, A. Matsui, and M. Sahara. 1996. Geographic population structure and sequence divergence in the mitochondrial DNA control region of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*), with reference to those of domestic pigs. *Biochem. Genetics* **34**, 179-189.
17. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
18. Wilson, A. C., L. Cann, S. M. Carr, M. George, and U. B. Gyllensten. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* **26**, 375-400.
19. Xu, X. and U. Arnason. 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene* **148**, 357-362.
20. Yu, L., Q. W. Li, O. A. Ryder, and Y. P. Zhang. 2004. Phylogeny of the bears (Ursidae) based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **32**, 480-494.