

대요크샤 및 랜드레이스종 근교계통돈의 총산자수와 후보유전자에 대한 다형성과 육종가 간의 연관성 분석

김명직 · 조규호 · 김두완 · 소경민 · 최봉환 · 김인철[†]

농촌진흥청 국립축산과학원

Association and Polymorphism of Porcine Candidate Genes with Breeding Values in Litter Size of Large Yorkshire and Landrace Inbred Lines

Myung Jick Kim, Kyu Ho Cho, Doo Wan Kim, Kyung Min So, Bong Hwan Choi and In Cheul Kim[†]

National Institute of Animal Science, R.D.A.

ABSTRACT

The objective of this study was to find out candidate genes associated with litter size trait in pigs of inbred Large Yorkshire and Landrace populations. 86 sows were screened for candidate genotypes along with litter size data recordings. Association of litter size with genotypes of candidate genes were investigated to verify the usefulness of each gene's genotypes as markers for the trait. For the lines of Large Yorkshire, PRLR3 and RBP4 genes were genotyped. Frequency distribution of PRLR3 with genotypes AA, AB and BB were each 0.14, 0.44 and 0.42. And the average litter size by PRLR3 genotypes were 8.83, 10.81 and 10.70 piglets per litter, the average estimated breeding values of which were 0.243, 0.332, 0.365, respectively for AA, AB and BB genotypes. Genotypic frequencies of RBP4 by AA, AB and BB genotypes were 0.10, 0.44 and 0.46. The average litter size by genotypes of RBP4 were 10.40, 10.57 and 10.35 piglets per litter and their corresponding average estimated breeding values were 0.451, 0.353 and 0.261, respectively for genotypes AA, AB and BB. Significance in differences among genotypes were not observed, but B allele of RBP4 seems to be associated with litter size. In Landrace lines, frequencies of RBP4 genotypes, AA, AB and BB were 0.29, 0.55 and 0.16. And the average litter size of these genotypes were 10.50, 11.08 and 11.00 piglets per litter. The corresponding averages of estimated breeding values of each genotypes were 0.172, 0.135 and 0.104. In Landrace lines, allele A was more likely to be associated with litter size, even if differences among average litter size were not significant. We conclude that genotyping of two candidate genes is a helpful tool to identify genetic potentials of litter size in pigs.

(Key words : Line breeding, Candidate gene, Polymorphism, RFLP, SNP)

서 론

돼지에서 번식형질과 관련하여 처음으로 연구가 시도되었던 ESR 유전자는 스테로이드 호르몬인 estrogen의 결합에 의하여 활성화되어 전사자로 작용하고 대상 유전자들의 전사수준을 높임으로서 estrogen의 번식을 비롯한 광범위한 생리현상을 매개로 ESR 유전자가 돼지의 산자수 증진에 영향을 줄 수 있는 후보유전자(candidate gene)로서 연구가 이루어졌는데, ESR 유전자 좌위에서 PCR-RFLP의 다형현상을 이용하여 다산종인 중국의 Meishan 종과 Yorkshire 종간의 교잡종에서 ER 좌위의 유전자 다형현상에 대한 분석이 이루어졌다(Rothschild 등, 1996;

Short 등, 1997). ESR 유전자는 산자수와 관련이 있는 후보 유전자로서 많은 연구가 보고되었으며(Van Rens 등, 2000; Kaminski 등, 2003), 여러 경제형질과도 영향을 미치는 것으로 보고되었고(Short 등, 1997), Rothschild 등 (2000)은 돼지의 산자수와 관련하여 ESR, PRLR, RBP4 유전자가 유의적인 연관성이 있다고 보고하였다. PRLR(prolactin receptor) 유전자는 번식형질과 관련이 있다고 보고된 바 있으며(Vincent 등, 1998), RBP4 유전자 역시 번식형질 등 여러 경제형질과 연관성이 있는 것으로 많은 연구를 통하여 알려지고 있다(Huang 등, 2004). 본 연구는 앞에 제시한 3개의 후보 유전자들에 대해 국립축산과학원에서 사육하고 있는 돼지 랜드레이스종과 대요크샤종 근교계통 집단에서의 총산자수 형질과의 연관성을 검

[†] Corresponding author : Phone: +82-41-580-3440, E-mail: kickic@korea.kr

증하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 연구의 육종가 추정을 위해 국립축산과학원에서 계통조성한 대요크샤종 및 랜드레이스종 근교계통돈 86두의 산자능력검정 자료와 혈액을 공시하여 총산자수와 번식관련 유용후보유전자 다형성간의 연관성을 분석하였다.

Genomic DNA 정제

공시축의 혈액으로부터 DNA의 분리 및 정제는 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer™)으로 지침서에 따라 실행되었고, 분리된 DNA는 TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA)에 용해하였다.

DNA 증폭 및 RFLP

각 유전자의 다형성 검정을 위해 Table 1에 제시한 primer와 조건을 이용하여 PCR을 수행하였다. 각 유전자를 증폭하기 위한 PCR 반응액은 약 50~80 ng의 주형 DNA, primer 각 10 pmol, dNTPs 50 μM, 10× reaction buffer 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ 및 1 unit Taq polymerase(IBM, Korea)를 혼합하여 최종 부피를 50 μl로 하였다. 반응조건은 94°C에서 2분간 denaturation한 후 94°C에서 30초(denaturation), 62°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분 20초 extension을 35 cycle 수행한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 extension 과정을 주면서 GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer Co, USA) 기기에서 수행하였다. PCR 증폭 산물은 단편의 크기가 예측되는 대립유전자 크기 범위 내에 존재하도록 증폭되었는지 PCR 조건의 적정성 여부를 확인하기 위하여 1% TBE agarose gel을 이용하여 UV상에서 전기 영동하였다. 각 유전자의 다형성 분석은 각각의 제한 효소를 이용하여 적정 반응 온도(TaqI : 65°C, BsaHI : 37°C, HinfI : 37°C, PvuII : 37°C)에서 6시간 동안 처리한 후 전기영동을 실시한 후 유전자형을 결정하였다.

육종가 추정 및 통계 분석

본 연구에 공시된 대요크샤종과 랜드레이스종 근교계통돈의 산자능력검정 자료에 대하여 1985년 캐나다 돼지 개량 프로그램의 단형질 애니멀 모델(Hudson and Ke-

nedy, 1985)의 유전분산 및 공분산 분석 프로그램인 DF-REML (Boldman and Van Vleck, 1991)을 이용하여 분석하였으며, 본 연구에서 조사된 총산자수의 육종가 추정에 사용된 Linear model은 다음과 같다.

$$Y_{ijklm} = \mu + b_i + P_j + Yr_k + M_l + a_{ijklm} + e_{ijklm}$$

여기서 μ 는 전체 평균, b_i 는 i 번째 종모돈의 고정 효과, P_j 는 j 번째 산자의 고정 효과, Yr_k 는 k 번째 분만 년도의 고정 효과, M_l 은 l 번째 분만월의 고정 효과, a_{ijklm} 은 각 개체의 임의효과이며, e_{ijklm} 은 각 개체의 고유한 임의오차이다.

조사된 경제형질별 측정치에 대한 유전자형의 효과를 추정하기 위한 통계 분석은 SAS 9.2 Package/PC를 이용하여 일반선형모형(GLM) 분석을 하여 육종가 간의 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

산자수와 관련하는 유전자로 알려진 PRLR3, ESR, RBP-4 후보유전자 3종의 유전자 빈도를 분석하여 산자수 관련 후보유전자의 다형성을 확인하였다. 각 유전자의 다형성 검정을 위한 PCR을 수행한 결과는 다음과 같다(Fig. 1~3).

PRLR3, ESR, RBP4 후보유전자의 유전자형 빈도는 Table 2에 나타나 있다. 대요크샤종에서 ESR 후보유전자

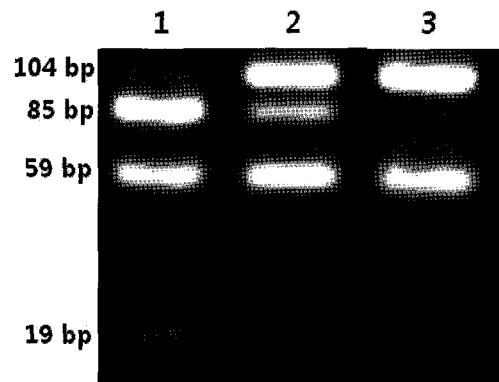


Fig. 1. The PCR-RFLP test for the prolactin receptor polymorphism (PRLR3). Lane 1 has a homozygous A allele. Lane 3 has a homozygous B allele. Lane 2 contain heterozygous animal.

Table 1. Primer sequence and PCR-RFLP information for genes analysis

Gene	Forward (5'→3')	Temp. ¹⁾	Size ²⁾	Enzyme ³⁾
PRLR3	F : CGTGGCTCCGTTTGAAGAACC R : CTGAAAGGAGTGCATAAAGCC	59°C	163	AluI
ESR	F : CCTGTITTTACAGTGACTTTTACAGAG R : CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG	55°C	120	Pvu II
RBP4	F : GAGCAAGATGGAATGGGTT R : CTCGGTGTCTGTAAAGGTG	60°C	550	MspI

¹⁾ Temp: annealing temperature, ²⁾ Size: PCR product size (bp), ³⁾ Enzyme: Restriction enzyme.

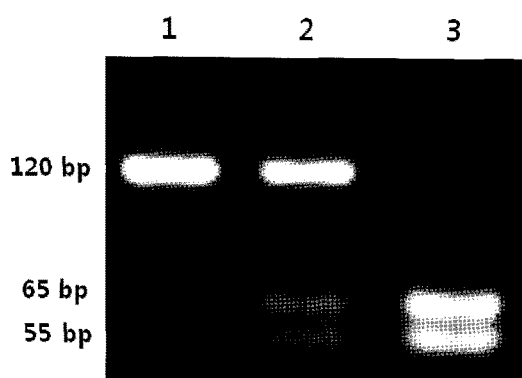


Fig. 2. The PCR-RFLP test for the estrogen receptor polymorphism (ESR). Lane 1 has a homozygous A allele. Lane 3 has a homozygous B allele. Lane 2 contain heterozygous animal.

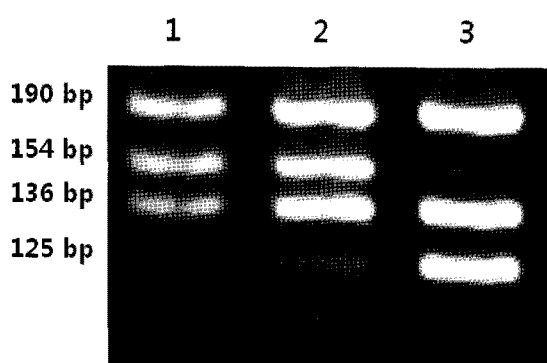


Fig. 3. The PCR-RFLP test for the retinol binding protein 4 polymorphism(RBP4). Lane 1 has a homozygous A allele. Lane 3 has a homozygous B allele. Lane 2 contain heterozygous animal.

는 다형성을 보이지 않았으나 PRLR3, RBP4 후보유전자에서 다형성을 보였으며, 총산자수에 대한 유전자형과 표현형 및 육종가의 연관성을 분석한 결과(Table 3), PRLR3 후보유전자는 AA, AB 그리고 BB 유전자형 빈도가 각각 0.14, 0.44 및 0.42를 보여 AA 유전자형의 빈도는 낮게 나타났고 유전자형별로 표현형은 각각 8.83 ± 1.722 , 10.81 ± 2.400 및 10.70 ± 1.767 두로 나타났으며, 육종가는 각각 0.243 ± 0.1088 , 0.332 ± 0.2301 및 0.365 ± 0.1280 두로 나타나 B대립 유전자가 유의적인($p < 0.05$) 연관성을 가지고 있었으며, RBP4 후보유전자는 AA, AB 그리고 BB 유전자형 빈도가 각각 0.10, 0.44 및 0.46을 보여 역시 AA 유전자형의 빈도는 낮게 나타났고, 유전자형별로 표현형은 각각 10.40 ± 2.191 , 10.57 ± 2.344 및 10.35 ± 2.317 두로 나타났으며, 육종가는 각

각 0.451 ± 0.0516 , 0.353 ± 0.1209 및 0.261 ± 0.2389 두로 나타나 유의적인 차이는 없었지만, B대립유전자가 연관성을 가지고 있는 것으로 추정되었다. 이는 듀록종에서 유전자 B형을 갖는 개체들은 산자수 증가와 유의적으로 연관되어져 있는 것으로 추정한 보고와 일치하였다(Drogemüller, 2001). 랜드레이스종에서 PRLR과 ESR 후보유전자는 다형성이 나타나지 않았으며, RBP4 후보유전자에서 다형성을 보여 AA, AB 그리고 BB 유전자형 빈도가 각각 0.29, 0.55 및 0.16으로 나타나 BB 유전자형의 빈도는 낮게 나타났다. 총산자수에 대한 유전자형과 표현형 및 육종가의 연관성 분석 결과(Table 3), 유전자형별로 표현형은 각각 10.50 ± 2.563 , 11.08 ± 2.139 및 11.00 ± 2.916 두로 나타났고, 육종가는 각각 0.172 ± 0.0771 , 0.135 ± 0.1298 및 0.104 ± 0.2692 두로 나타나 유의적인 차이는 없으나, A대립유전자가 연관성을 가지고 있는 것으로 추정되어 랜드레이스종에서 유전자 A형을 갖는 개체들은 산자수 증가와 연관되어져 있다고 (Rothschild, 2000) 보고한 바와 같은 결과이다. 본 연구 결과를 활용하여 유의적인 차이가 나타난 후보유전자의 유전자형을 고려하여 후보종돈을 선발할 경우 번식 능력의 향상에 효과적일 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 국립축산과학원에서 조성한 대요크샤종 및 랜드레이스종 근교계통돈 86두에 대해 산자수에 관여하는 유전자로 알려진 PRLR3, ESR, RBP4 후보유전자 3종의 유전적 다형성을 분석하여 이들 후보유전자와 총산자수의 표현형 및 육종가 간의 연관성을 검증함으로써 경제형질과 관련된 유용표지인자 활용 방법을 개발하고자 수행하여 유전적 다형성을 확인하였다. 대요크샤종에서는 PRLR3, RBP4 후보유전자의 AA형 유전자 빈도가 낮게 나타났으나 이들 모두 다형성을 보였고, 이중 PRLR3 후보유전자는 B대립유전자가 유의적인($p < 0.05$) 연관성을 가지고 있었으며, RBP4 후보유전자 역시 유의적인 차이는 없었지만 B대립유전자가 연관성을 가지고 있는 것으로 추정되었다. 랜드레이스종에서 PRLR과 ESR 후보유전자는 다형성이 나타나지 않았으며, RBP4 후보유전자에서 BB형 유전자 빈도가 낮게 나타났으나 다형성을 보였고, 유의적인 차이는 없었으나 A대립유전자가 총산자수의 표현형 및 육종가와 연관성을 가지고 있는 것으로 추정되었다. 본 연구 결과를 활용하여 유의적인 차이가 나타난 후보유전자의 유전자형을 고려하여 후보종돈을 선발할 경우 번식 능력의 향상에 효과적일 것으로 판단된다.

Table 2. Genotype frequency by candidate genes in Landrace and Large Yorkshire

Gene	No. of head (heads)	Large Yorkshire			Landrace		
		AA	AB	BB	AA	AB	BB
PRLR3	86	0.1400	0.4400	0.4200	0.6842	0.3158	0.0000
ESR	86	0.6400	0.3400	0.0200	1.0000	0.0000	0.0000
RBP4	86	0.1042	0.4375	0.4583	0.2895	0.5526	0.1579

Table 3. Means of phenotypic value and breeding value for total number born by genotype of candidate genes in Landrace and Large Yorkshire

Gene	Genotype	Total number born(TNB)			
		Large Yorkshire		Landrace	
		PV ¹⁾	BV ²⁾	PV ¹⁾	BV ²⁾
PRLR	AA	8.83±1.722 ^a	0.243±0.1088 ^a	10.69±2.213	0.145±0.1277
	AB	10.81±2.400 ^b	0.332±0.2301 ^b	11.20±2.616	0.132±0.1881
	BB	10.70±1.767 ^b	0.365±0.1280 ^b	-	-
ESR	AA	10.08±2.205	0.280±0.1995	10.88±2.338	0.141±0.1463
	AB	11.15±2.154	0.414±0.1160	-	-
	BB	-	-	-	-
RBP4	AA	10.40±2.191	0.451±0.0516 ^a	10.50±2.563	0.172±0.0771
	AB	10.57±2.344	0.353±0.1209 ^{ab}	11.08±2.139	0.135±0.1298
	BB	10.35±2.317	0.261±0.2389 ^b	11.00±2.916	0.104±0.2692

¹⁾ PV : Phenotypic value, ²⁾ BV : Breeding value.

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly different, $p < 0.05$.

인용문헌

- Boldman K, Van Vleck LD (1991): Derivative-free restricted maximum likelihood estimation in animal models with aspaes matrix solver. *J Dairy Sci* 74: 4337.
- Drogemuller C, Hamann H, Distl O (2001): Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *J Anim Sci* 79(10):2565-70.
- Huang LS, Ma JW, Ren J, Ding NS, Guo YM, Ai HS, Li L, Zhou LH, Chen CY (2004): Genetic variations of the porcine PRKAG3 gene in Chinese indigenous pig breeds. *Genet Sel Evol* 36(4):481-6.
- Hudson GFS, Kennedy BW (1985): Genetic evaluation of swine for growth rate and backfat thickness. *J Anim Sci* 61:83.
- Kaminski S, Rusc A, Brym P (2003): Relation between Ava I polymorphism within the estrogen receptor gene (ESR) and meatiness in Polish Large White boars. *J Appl Genet* 44(4):521-4.
- Rothschild MF, Jacobson C, Vaske, DA, Tuggle CK, Wang L, Short T, Eckardt G, Sasaki S, Vincent A, McLaren DG, Southwood O, van der Steen H, Mileham A, Plastow G (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 MF, Messer L, Day A, Wales R, Short T, Southwood O, Plastow G (2000): Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm Genome* 11:75-77.
- Short TH, Rothschild MF, Southwood OI, McLaren DG, de Vries A, Van der Steen H, Eckardt GR, Tuggle CK, Helm J, Vaske DA, Mileham AJ, Plastow GS (1997): Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. *J Anim Sci* 75(12):3138-42.
- Van Rens BT, Hazeleger W, Van der Lende T (2000): Perioovulatory hormone profiles and components of litter size in gilts with different estrogen receptor (ESR) genotypes. *Theriogenology* 1;53(6):1375-87.
- Vincent AL, Evans G, Short TH, Southwood OI, Plastow GS, Tuggle CK, Rothschild MF (1998): The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. In: *Proc. 6th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Armidale, NSW, Australia*. 27: 15-18.

(접수일자: 2011. 9. 2 / 채택일자: 2011. 9. 9)