

최 종  
연구보고서

ADSF/resistin 유전자 탐색과 이를 이용한  
한우경제형질 연관관계 분석 연구  
Molecular cloning, characterization and  
analysis of the ADSF/resistin gene polymorphism  
associated with carcass traits in Hanwoo

진주산업대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “ADSF/resistin 유전자 탐색과 이를 이용한 한우경제형질  
연관관계분석 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 진주산업대학교

총괄연구책임자 : 문양수

세부연구책임자 : 서강석

세부연구책임자 : 김상훈

# 요 약 문

## I. 제 목

ADSF/resistin 유전자 탐색과 이를 이용한 한우경제형질 연관관계분석 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인체지놈 프로젝트가 완료되고(2001년 6월) 이후 생쥐 및 기타 동, 식물의 지놈 염기서열 분석도 속속 발표되고 있다. 염기서열 분석에서 얻을 수 있는 것은 여러 가지가 있을 수 있지만 그 개체의 유전자의 수를 어느 정도 예측할 수 있다는 것이다. 그러나 중요한 것은 특정 유전자의 생체 내 고유한 역할을 알아내는 것이다. 따라서 앞으로의 연구는 새로운 유전자를 탐색하고, 유전자의 기능을 밝히고, 그 유전자를 그 특성에 맞게 활용하는 연구가 활발히 이루어 질 것이다.

지방대사 및 지방분화와 관련된 연구는 비교적 많이 이루어 졌지만 이들 연구가 직접 가축생산이나 품질향상에 적용된 경우는 많지 않다. 소득의 증대와 함께 소비자들의 요구는 과거의 양적인 소비양상이 질적인 소비양상으로 변하고 있고, 농축산물 수입자유화에 따른 국내 생산 축산의 생존전략으로 축산물의 차별화를 위한 품질향상에 관한 연구 등이 축산관련 연구자들에게는 새로운 도전이 되고 있다. 특히 한우의 경우 지방의 근내 침착도가 육질의 등급을 좌우하는 주요 요소임에도 불구하고 근내 지방침착에 관련된 유전자나 지방분화와 관련된 연구가 극히 미약한 실정이다. ADSF/resistin은 가장 최근(2001)에 밝혀진 호르몬으로서 지방세포 특이적으로 분비되고 지방세포분화를 억제한다는 연구가 본 총괄연구책임자에 의해서 밝혀졌으며, 인체에서는 비만과 당뇨에 영향을 한다는 연구가 미국의 Mitchell Lazar 실험실에 의해 Nature지에 발표되었다.

ADSF/resistin 유전자에 관한 연구는 인체와 실험동물에 국한되어 연구가 이루어지고 있으며, 가축에 대한 이 유전자의 탐색 및 특성규명에 관한 연구는 전무하다.

경제·산업적 측면에서 볼 때, 농산물과 축산물의 수입자유화에 따라 한우의 고품질, 고능력화를 통한 국제 경쟁력 제고는 오래 전부터 축산인과 연구자들의 관심사였다. 인간과 생쥐의 지놈 프로젝트가 완료된 이후 분자생물학등 생명공학기술 등의 첨단

기술을 이용한 가축의 개량이나 생산성을 향상시키기 위한 기술은 그 가속도를 더하고 있다. 동물과 사람에 있어서 Leptin 유전자의 발견(1994년)과 이에 대한 연구는 사람의 비만과 당뇨 및 가축의 개량을 위하여 수 없이 많이 이루어 졌다. ADSF/resistin도 leptin과 같이 지방에서 분비되는 호르몬이면서 지방대사에 관여하고 특히 지방분화와 연관이 있는 것으로 밝혀졌다. 한우 ADSF/resistin을 cloning하고 이에 대한 기능이 더 깊게 밝혀지면 고품질, 고능력화를 위한 이 호르몬의 연구가 집중될 것이고 또한 한우ADSF/resistin 호르몬과 항혈청을 유전공학적인 방법으로 대량생산하여 이를 연구하는 곳에 제공할 수 있고, 이런 기술은 돼지 및 닭의 연구 즉, ADSF/resistin cloning 및 호르몬과 항혈청 생산에도 적용될 수 있을 것이다.

사회·문화적 측면에서는 생명공학의 발달과 이를 응용한 새로운 품종의 개발과 생산물의 품질 향상은 이제 피할 수 없는 시대의 흐름이 되고 있다. 한우는 우리 민족과 함께 하면서 오랫동안 한반도에서 사육되어 왔으나 이제는 쇠고기시장 개방화시대에서 살아 남을 수 있는 길을 모색해야할 시기가 되었다. 특히 한우의 고급육화 전략에 부합하는 근내지방도에 연관한 ADSF/resistin 유전자의 기작에 관한 연구는 생체 내 지방 기작의 비밀을 해결 할 수 있는 중요한 연구 과제이다. 또한 ADSF/resistin은 사람에 있어서는 비만과 당뇨에 관련된 연구의 기초자료를 제공해 줌으로서 인류를 성인성 질환으로부터 해방시켜 건강한 노후생활을 보내는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 지방분화에 관여하는 호르몬 ADSF/resistin 유전자를 한우에서 탐색하고, 이 유전자 단백질의 대량생산 방법의 개발과, ADSF/resistin 유전자의 다형현상을 분석하여 이들 DNA다형 현상과 한우의 경제 형질들과의 상관관계를 도출하여 고급육 또는 성장 관련 표지 인자로서의 활용방안을 제시하고자 실시하였다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

지방세포분화조절 호르몬 ADSF/resistin유전자의 탐색과 한우 고급육 생산을 위한 활용방안을 모색하기 위한 본 과제는 아래와 같이 3개의 세부 과제로 구성되어 있다.

제 1 세부과제는 한우 ADSF/resistin 유전자 cloning 및 다형현상 규명을 목표로, 한우지방조직채취, total RNA 분리, cDNA cloning, DNA염기서열 분석, ADSF/resistin DNA 구조해석(제한효소 지도작성), ADSF/resistin DNA(exon, intron) polymorphism 분석, ADSF/resistin promoter 탐색 및 polymorphism 분석등을 실시하였다.

제 2 세부과제는 한우 ADSF/resistin 유전자의 다형현상 분석 및 고급육 표지 인자로서 활용을 목표로, 한우 시험 설계 계획 및 시료 채취, 성장 시기별 체중 조사 및

초음파 육질 및 육량 측, 성장 단계별 BCS(Body condition score) 조사, 27개월 령 시 시험 도축 후 도축 성적 조사, 근내지방도, 등지방두께 등을 측정하였으며, 유전자 다형현상과 한우 경제 형질 간의 연관 관계 분석을 위하여 유전자의 다형현상과 체중, 근내지방도, 등지방 두께등 한우의 주요 경제 형질과의 연관 관계 분석, 계획 교배에 의한 중모우 및 중빈우의 효과와 ADSF/resistin 유전자의 다형현상과의 연관성 규명, 한우의 육종가(Breeding Value)가와 ADSF/resistin 유전자간의 연관성 분석등을 실시하였다.

제 3 세부과제는 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현벡터 개발 및 단백질 특성규명을 목표로, 한우ADSF/resistin 단백질 발현벡터 구축, 한우 ADSF/resistin 단백질의 발현벡터의 세포내 도입, 한우ADSF/resistin 단백질의 생산, 정제 및 항혈청 생산, 한우ADSF/resistin 단백질의 특성 규명 등을 실시하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

###### 가. 한우 ADSF/resistin 유전자 cloning 및 다형현상 규명

본 연구는 한우에서 ADSF/resistin 호르몬 유전자를 cloning 하고 이 유전자의 DNA다형현상을 탐색하고자 실시하였다. GenBank에 등록된 사람, 쥐, 생쥐의 ADSF/resistin 염기서열을 비교 분석하여 한우의 ADSF/resistin 유전자를 탐색할 PCR primer들을 제작하여 클로닝을 실시하였다. PCR에 의하여 330 bp의 cDNA를 cloning하였으며, 이 유전자를 분석한 결과 coding DNA 염기서열은 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있으며 109개의 아미노산으로 이루어진 단백질이었다. genomic DNA상의 coding DNA sequence와 intron을 합한 948 bp의 DNA 염기서열을 미국 NCBI GenBank에 등록하였으며 그 등록번호는 AY618903이다. 이후 이 유전자의 5'과 3'의 영역을 더 탐색한 결과 한우 ADSF/resistin 유전자는 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있었으며 한우 ADSF/resistin를 구성하는 intron은 모두 GT-AG splicing법칙에 따랐다. 한우 ADSF/resistin와 사람 ADSF/resistin의 cDNA는 82% 높은 identity를 나타냈다. 한우 ADSF/resistin이 발현하는 아미노산을 사람과 비교한 결과 71.6%의 identity를 나타냈으며 아미노산을 hydropathy를 분석한 결과 일반적으로 호르몬에서 나타나는 양상인 앞부분은 소수성 아미노산으로 구성되어 있었으며 그 뒤는 친수성인 아미노산으로 구성되어 있었다. 그리고 조직별 ADSF/resistin mRNA 발현 양상을 분석하기 위해 RT-PCR법을 이용하였다. 그 결과 지방조직인 피하지방과 신장지방에서 특이적으로 발현되고 근육(등심, 우둔)과 간

에서는 ADSF/resistin이 발현되지 않았다. 그러나 지방전구세포 또는 성숙된 지방세포에서 발현되는지를 확인하기 위해서는 지방세포를 이용한 세포배양시험을 실시하여 밝혀야 할 것으로 사료된다.

한우 ADSF/resistin의 promoter를 탐색하기 위해 Inverse PCR법을 이용하였으며 그 결과 이 유전자의 5' 영역 즉 promoter 부위인 -1745bp 클로닝 하였다. 이 프로모터 영역에서 전사조절부위를 탐색하기 위하여 TRANSFAC database의 분석방법을 적용하여 잠재적 전사인자결합 부위를 조사하였다. 분석 결과 이 promoter에서 유전자 분화와 관련된 transcription factor인 SRE와 C/EBP $\alpha$ 가 결합할 수 있는 위치를 확인하였으나 또 다른 인자인 PPAR $\gamma$ 가 결합하는 위치는 현재 클로닝 된 영역에서는 발견되지 않은 상태이다. 한우와 Hereford의 promoter를 비교한 결과 99.4%의 높은 identity를 나타냈다.

본 연구의 또 다른 목적은 ADSF/resistin유전자와 관련된 SNP(Single Nucleotide Polymorphism)를 탐색하여 궁극적으로 한우 경제형질과의 상관관계를 분석하는 것이다. 이를 위하여 이 유전자의 exon 영역과 intron 그리고 promoter영역을 대상으로 축산연구소에서 후대검정우로 이용된 한우 295두와 일반 농장인 대상목장의 한우 약 50여두를 대상으로 혈액을 취하여 DNA다형현상 분석에 이용하였다. 분석결과 exon과 promoter에서는 SNP가 발견되지 않았으며, intron 2와 intron3에서 SNP가 있음을 확인하였다. 확인된 개체와 SNP위치와 관련된 자료는 한우경제형질과의 상관분석을 위하여 제2세부과제의 서강석 연구사에게 의뢰하였으며 그 결과는 제2세부과제에 기술되어 있다.

#### 나. ADSF/resistin 유전자 다형현상과 한우 경제형질간의 연관관계 분석

본 연구는 ADSF/resistin 유전자의 DNA다형현상과 한우의 경제형질과의 연관관계를 분석하여 한우 고급육생산을 위한 표지인자로서 활용방안을 모색하기 위하여 실시하였다.

보다 정확한 검정 성적을 확보하고 가축의 유전 능력인 육종가와이 상관 관계를 추정하기 위하여 35차 후대검정우 146두와 36차 후대검정우 149두에 대하여 검정 성적을 조사하고 아울러 혈액 채취를 실시하였다. 검정 성적의 조사항목은 도살전 체중, 도체중, 도체장, 등지방두께, 배장근단면적, 육량지수, 근내지방도, 육색, 지방색, 조직감, 성숙도, 육질등급, 육량등급 및 경락단가 등 14개 항목에 대하여 실시하였으며 이 중 주요 경제형질인 도체중, 등지방두께, 배장근 단면적 및 근내지방도에 대해서 유전능력평가를 실시하고 이를 ADSF/resistin 유전자와의 상관 관계를 조사하였다.

ADSF/resistin 유전자 다형성에 대한 한우 주요 경제형질의 표현형 및 육종가와의 연관 관계 추정을 위하여 한우 후대검정우에 대한 유전능력 평가를 실시하였다. 유전능력은 Henderson이 제안한 BLUP-Animal Model에 의하여 실시하였으며

Boldman 등의 MTDFREML package를 이용하여 각 조사형질에 대한 육종가를 추정하였으며 육종가 추정에 이용된 모델은 다음과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + YS_i + L_j + D_{ijk} + A_{ijk} + e_{ijk}$$

여기서 Y는 관측치,  $\mu$ 는 전체 평균, YS는 연도-계절효과('80~2002, 사사기, 방목기), L은 출생지역의 효과(가축개량사업소, 개량농가), D는 도축일령에 대한 co-variate, A는 Random Direct Additive Effects 그리고 e는 Random Error 이다.

주요 경제형질에 대하여 BLUP-Animal Model을 이용하여 육종가를 추정하고 표현형가 및 육종가와 ADSF /resistin 간의 연관관계 추정을 위하여 아래와 같은 모델을 이용하여 SAS 9.1 package-GLM procedure를 이용 분산 분석을 실시하였으며 유사한 염기서열간의 관계도 동시에 규명하고자 분석된 염기서열에 대해 phylogenetic tree를 작성하고 이를 그룹화 시켜 분석에 같이 활용하였다.

- 표현형 모델

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + G_j + e_{ijk}$$

여기서 Y는 관측치,  $\mu$ 는 전체 평균, L은 검정지역의 효과(남원, 대관령), G는 SNP 다형성 그리고 e는 Random Error

- 육종가 모델

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

여기서 Y는 관측치,  $\mu$ 는 전체 평균, L은 검정지역의 효과(남원, 대관령), G는 SNP 다형성 그리고 e는 Random Error

35차 후대검정우에 대한 ADSF/resistin 유전자의 효과를 살펴보기 위하여 Intron 3 region에 대한 SNP를 발굴하고 이에 대한 유의성 검정을 실시하였다. 조사된 8개 부위의 SNP와 group 효과에 대하여 890C del과 그룹에서는 등지방 두께에 대하여 유의적으로 나타났으며 894C del와 C894T는 도체중에 대하여 유의적인 효과가 있는 것으로 나타났다. 표현형과 육종가 간의 차이는 찾아볼 수 없었으며 SNP의 효과에 대해서는 변이가 생긴 개체의 도체중이 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 더 무거웠으며 등지방 두께가 더 두꺼웠음을 볼 수 있었다. Group 효과에 있어서는 Group 2의 등지방 두께가 가장 두꺼웠으나 Group 3과의 유의적인 차이는 없었으며 Group 1과는 유의

적인 차이를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 본 연구의 결과 ADSF/resistin 유전자는 지방 뿐 아니라 한우의 체중과도 연관이 있는 것으로 나타났다. 그러나 염기서열 분석 부위가 짧았으며 유전 양상에 대한 검증이 아직 완료되지 않아 더 많은 연구가 필요하다고 사료되었다 이에 따라 36차 후대검정우 시료에 대해서는 Intron 2와 3 지역에 대한 보다 넓게 염기서열을 분석하였다. 36차 후대검정우에서 발견된 6개의 SNP에 대한 빈도는 각각 8.2%, 5.9%, 18.8%, 5.9%, 11.8% 및 7% 였으며 G849A의 경우 35차 후대검정우에서 16%가 발견되었으며 농가 시험축에서도 18%가 발견되어 유전표지 인자로의 가능성을 가졌으나 반면에 각 형질에 대한 유의성은 나타내지 못했다. 36차 후대검정우에 대한 유의성 검정결과 649A ins에 대한 근내지방도의 효과가 있었으나 36차 검정우의 경우 전체 149두중 86개체만이 분석이 이용되어 변별력이 저하되는 것으로 사료되었다. 본 연구 결과 ADSF/resistin 유전자는 한우의 도체중과 등지방두께와 유의적으로 상관이 있는 것으로 사료되었으며, 근내지방도에 대해서는 보다 많은 개체분석을 통하여 이 유전자와 연관관계 유무를 결론 내려야 할 것으로 사료된다.

#### **다. 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현벡터 개발 및 단백질 특성규명**

본 연구는 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현벡터 개발 및 단백질 특성규명을 위하여 실시하였다.

한우ADSF/resistin 단백질 발현벡터 구축을 위해 한우 ADSF/resistin을 pGEX2T 벡터에 클로닝하였다. pGEX2T 벡터는 일반적으로 원핵세포에서 안정적으로 단백질을 과발현하는 것으로 알려져 있으며 생성되는 단백질의 N-terminal에 GST가 tagging되어 발현한다. pGEX2T 벡터에 한우 ADSF/resistin 유전자를 클로닝하기 위해 제작한 primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 대략 330bp의 한우 ADSF/resistin 유전자를 확인할 수 있었다. 증폭된 유전자에 EcoRI과 BamHI 제한 효소를 처리하여 동일한 제한효소로 절단되어 있는 pGEX2T 벡터와 ligation 시켰다. 이를 박테리아에 형질전환시켜 형성된 colony에서 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 EcoRI과 BamHI 제한 효소로 처리한 다음 전기영동을 실시하였다. 그 결과 정상적인 insert DNA가 삽입된 클론을 선발할 수 있었다. 확인된 클론은 DNA 염기서열 분석을 통해 실제로 한우 ADSF/resistin 유전자가 제대로 삽입되었는지를 재확인하였다. 동일한 방법으로 진핵세포 발현벡터인 pcDNA3.1-myc-His vector에 클로닝 하였다. 진핵세포주의 경우는 myc-tag된 벡터인 pcDNA3.1(BamH I /EcoR I)에 삽입하기 위해 PCR을 통해 증폭한 한우ADSF/resistin을 BamH I /EcoRI으로 절단하고 pcDNA3.1(BamH I /EcoR I)와 함께 4℃에서 overnight으로 ligation시켰다. 그 결과 각각 5.4kb pcDNA3.1/ 와 330bp 한우ADSF가 관찰되었다. 구축된 벡터가 제대로 확립된 것인지를 확인하기 위해 염기서열을 분석하였다.



한우ADSF/resistin 형질전환체를 이용한 단백질 생산을 위하여 클로닝 된 벡터를 BL21 박테리아에 transformation시켜 생성된 colony를 배양한 다음, 0.5mM의 IPTG를 첨가하여 ADSF/resistin단백질의 과발현을 유도하였다. pGEX-2T 벡터만 가진 형질전환체에서는 IPTG 첨가시 GST 단백질(26kDa)이 강하게 과발현 되었으며, 한우 ADSF/resistin-GST fusion protein은 미약하지만, IPTG에 의해 세포내에서 과발현이 유도됨을 관찰할 수 있었다. ELISA를 통해 특정항원에 대한 반응력을 조사한 다음 이를 토대로 실제 한우 ADSF/resistin 단백질을 인지하는지를 조사하기 위해 혈청을 1:2,000으로 희석하여 ADSF/resistin이 과발현되는 박테리아 추출물과 한우 등심조직에서 western blotting을 실시하였다. 그 결과 한우 조직과 혈액에서는 밴드가 관찰되지 않았지만, 박테리아 추출물에서는 GST-ADSF/resistin이 위치한 34kDa 부위의 단백질 밴드가 명확하게 관찰되었다. 그러나, ADSF/resistin이 과발현 되지 않은 박테리아에서도 밴드가 감지되었다. 이는 34kDa 부위의 모든 박테리아 단백질을 elution하여 항체를 제작하는데 사용했기 때문으로 추정된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 다시 affinity-purified 항체를 생산하였다. 31kDa에서 관찰되는 밴드는 비특이적인 밴드로 생각된다. ADSF/resistin에 대한 항체를 정제하기 위해 GST만이 과발현된 단백질과 반응시켜 GST 단백질을 인식하는 항체를 제거하였다. 이후 membrane depletion method을 이용하여 ADSF/resistin만을 인식하는 항체를 정제하였다. 이렇게 하여 생산된 affinity purified ADSF/resistin antibody를 이용하여 ADSF가 과발현되는 293 cells에서 단백질 발현을 조사하였다. 먼저, 구축된 myc-tagged pcDNA3.1(-)-ADSF/resistin plasmid를 293 세포주에 transfection시켰다. 성공적으로 ADSF/resistin plasmid가 세포내로 주입되었다면 plasmid내에 myc 펩타이드가 장착되어 있기 때문에 myc 항체를 이용하여 ADSF/resistin의 발현 여부를 간접적으로 확인할 수 있다. 그 결과 벡터만 transfection했을 때는 ADSF/resistin 단백질 크기를 나타내는 13kDa 밴드가 관찰되지 않았지만, pcDNA3.1(-)-ADSF/resistin이 과발현되는 세포에서는 ADSF/resistin 밴드가 잘 감지됨을 확인할 수 있었다. 이후 affinity purified ADSF/resistin 항체를 이용하여 같은 샘플에서 ADSF/resistin 단백질의 발현 여부를 조사하였다. 그 결과 13kDa의 myc-tagged ADSF/resistin 단백질이 명확하게 관찰되었다. 이러한 결과는 정제된 ADSF/resistin 항체가 특이적으로 반응하고 있음을 의미한다. 55kDa에 보이는 밴드는 background로 추정된다.

ADSF/resistin 유전자가 지방세포 분화에 어떠한 역할을 하는 지를 조사하기 위하여 지방 전구세포 3T3 L1에 한우ADSF/resistin을 과발현 시킨 다음, 지방세포 분화 여부를 조사하였다. ADSF/resistin에 의한 지방 분화 관련성을 조사하기에 앞서 먼저 분화가 제대로 이루어졌는지를 확인할 수 있는 Oil-Red-O 염색액을 사용하여 지방세포의 적절한 분화 조건을 확립하였다. 먼저 ADSF/resistin 유전자가 꾸준히 과발현되는 stable 세포주를 구축하기 위해 plasmid vector와 retroviral vector를 3T3 L1

세포주에 주입한 다음 positive 세포주를 선발하였으나 지속적으로 ADSF/resistin이 발현되는 세포주가 선발되지 않았다. 이는 ADSF/resistin 유전자가 세포의 기본 대사에 중요한 작용을 하는 것으로 사료되어진다. 따라서 ADSF/resistin 유전자의 기능 분석은 transiently transfection 방법을 이용하여 실시하였다.

pcDNA3.1(-)-ADSF/resistin plasmid의 transfection efficiency를 증가시키기 위해 electroporation 방법을 이용하여 지방전구세포인 3T3-L1 cells에 transfection 시켰다. 그 결과 ADSF/resistin이 과발현되는 세포에서는 지방세포의 분화가 상대적으로 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과는 한우 ADSF/resistin 유전자가 지방세포의 분화를 억제하는 역할을 한다는 것을 의미한다.

## 2. 활용에 대한 건의

- 가. 한우 고급육 생산을 위한 표시인자로서 활용
- 나. 확보된 ADSF/resistin 유전자를 한우연구자들의 유전자 연구에 제공
- 다. ADSF/resistin 항체 및 호르몬 대량생산에 활용
- 라. 확보된 ADSF/resistin 유전자의 GenBank등록
- 마. 국내 저명학술지(1편) 및 국제학술지 SCI(E)급 논문 3편 이상 투고

## SUMMARY

### (영문 요약문)

**Molecular cloning, characterization and analysis of the ADSF/resistin gene polymorphism associated with carcass traits in Hanwoo**

#### **I. Molecular cloning of ADSF/resistin gene and investigation of polymorphism in Korean native cattle**

The objective of this study was to clone a gene encoding ADSF/resistin and to investigate its DNA polymorphism in Korean Native Cattle (Hanwoo). Genomic DNA sequence of the Hanwoo ADSF/resistin gene was amplified by PCR from the genomic DNA using human ADSF/resistin primers. The 5' and 3' flanking region of the gene were cloned by inverse PCR using primers designed from the amplified region of the fragment previously. The cDNA of Hanwoo ADSF/resistin was cloned by RT-PCR from the total RNA of the subcutaneous fat tissue. The genomic and cDNA sequences were aligned to locate the exons and introns of the gene. The exon/intron boundaries were amplified and confirmed by PCR with genomic DNA templates and primers designed from the cDNA sequences. The sequence of genomic DNA including 5' and 3'UTR (untranslated region) was 1478 bps. The genomic sequence of the Hanwoo ADSF/resistin was deposited in GenBank (Accession number: AY618903). The nucleotide coding DNA sequence of bovine ADSF/resistin shares homology with 87% with swine, 82% with human, and 73% with rat. It revealed 3 introns and 4 exons matched GT-AG rule of splicing mechanism. The 5' splice donor and 3' splice acceptor sites correspond to conserved GT/AG exon/intron boundaries. The first two bases of the intron are GT, and the last two are AG in Hanwoo ADSF/resistin gene. The start and stop codons are in the second and fourth exons in the gene. The polyadenylation signal sequence (AATAAA) is located in the almost end of the exon 4.

The open reading frame encodes a 109 amino acid protein with a calculated 14.7kDa and 73% homology between the Hanwoo and human sequence. The comparison of amino acid sequence of bovine ADSF/resistin with that of human, swine, rat, mouse showed 73%, 80%, 58%, and 57% identity, respectively. The Hanwoo ADSF/resistin contains the characteristic cysteine-rich protein motif (CX11-CX8-CX-CX3-CX10-CX-CX-CX9-CC) at the C-terminus (51-109aa) of

the molecule. In this well-conserved region, ADSF/resistin shares the highest homology with swine ADSF/resistin with a sequence identity of 96% and the high homology in human with 91% identity as well. But the sequence identities are 63% with rat and mouse ADSF/resistin. In contrast, in the N-terminal (1-50aa) part of the molecule is less conserved with other species swine, human, rat and mouse with 62%, 54%, 54% and 48% identities, respectively. The overall sequence identities are 80% with swine, 73% with human, 58% with rat, and 57% with mouse. A signal peptide of ADSF/resistin was predicted by the Kyte-Doolittle hydropathy plots. A hydrophobic stretch is located within the first Nterminal residues containing 14 non-hydrophobic amino acids that is a characteristic of a signal sequence.

The mature protein, ADSF/resistin, is cleaved from the signal peptides that in turn secreted into blood stream. The coding sequence was 330 base pairs and it encoded a protein of 109 amino acids. An NCBI BLAST-search revealed the cloned cDNA fragment shared significant homology (82%) with the cDNA encoding the human ADSF/resistin. The nucleotide sequence homology of the Hanwoo sequence was 73% and 64% for the rat and mouse, respectively. A 1.7kb ADSF/resistin gene promoter was cloned and putative binding sites of transcription factors were identified. Computer assisted analysis (TFSEARCH program based upon the TRANSFAC database) of Hanwoo ADSF/resistin promoter revealed that there are several putative cis-elements that might have potential roles in the transcriptional regulation of ADSF/resistin gene expression. The putative C/EBP-binding sites were found at 9 bp, -365 bp, -463 bp upstream of the 5'- ADSF/resistin flanking region. In addition, Hanwoo ADSF/resistin promoter contains several E-box motifs and Sp-1 binding sites. However, we could not find the SREBP binding site, SRE motif, from our ADSF/resistin promoter region. The putative PPAR response element was not found within the 1.7kb upstream of the Hanwoo ADSF/resistin promoter. Tissue distribution of ADSF mRNA was examined in liver, skeletal muscles (tenderloin, biceps femoris), subcutaneous fat, and perirenal fat by RT-PCR. ADSF mRNAs were detected in fat tissues but not in liver and muscles, suggesting that ADSF/resistin expression may be induced during adipogenesis. Although, the physiological function of ADSF/resistin in the cow remains to be determined, these data indicate ADSF is related to the adipocyte phenotype and may have a possibly regulatory role in adipocyte function. To investigate DNA polymorphism in Hanwoo ADSF/resistin gene, blood samples were taken from 146 Hanwoo steers belonging to 35th progeny testing and 149 Hanwoo steers of the 36th progeny testing at Hanwoo Improvement Center in Korea. DNA was extracted, sequenced and point mutations were undertaken at

Introns 2 and 3 regions. Eight and six single nucleotide polymorphisms(SNPs) were found on the 35th progeny and on the 36th progeny test, respectively.

## **II. Analysis of the corelation between DNA polymorphism of ADSF/resistin gene and carcass traits in Hanwoo**

Adipocyte-specific secretory factor (ADSF)/resistin is a small cysteine rich protein secreted from adipose tissue. It is hypothesized that ADSF might be responsible for the marbling of Hanwoo. Therefore this study was aimed to analysis the corelation between the breeding values (BV) carcass traits and the polymorphism in ADSF/resistin gene. Blood samples were taken from 146 Hanwoo steers belonging to 35th progeny testing and 149 Hanwoo steers of the 36th progeny testing at Hanwoo Improvement Center in Korea. DNA was extracted, sequenced and point mutations were undertaken at Introns 2 and 3 regions. Eight SNP's were found on the 35th progeny testing although only three SNP's were significant. Six single nucleotide polymorphism (SNP) were found in 36th progeny test: 649A ins exhibited 18.8%, G849A 11.8%, 641Gins 8.2%, C1099T revealed 7% and both 647Gins and 652Gdel showed 5.9% Carcass trait breeding values were live weight (LW), carcass weight (CW), dressing % (DP), eye muscle area (EMA), backfat thickness (BF) and marbling score (MS). T-test revealed significant correlation ( $P<0.01$ ) of BV on MS only at 649Ains A computer simulation was conducted to assess the efficiency of marker assisted selection (MAS) versus the conventional breeding scheme. Results revealed that MAS was more efficient as a breeding tool compared to the conventional.

## **III. Production of recombinant ADSF/resistin protein and characterization of ADSF/resistin in adipocyte**

In the present study, we have focused on the production of bovine ADSF/resistin protein to explore how bovine ADSF/resistin regulates the process of preadipocyte differentiation. We cloned the bovine ADSF/resistin gene into the

pGEX-2T vector to establish prokaryotic expression system. The ADSF/resistin protein as antigen was produced in transformant cells. After injecting the antigen into rabbit, we obtained crude serum and tested its titer by ELISA. Due to high background, we purified anti-bovine ADSF/resistin antibody by using membrane depletion technique. Finally in mammalian cells the purified anti-ADSF/resistin antibody was detected ADSF/resistin protein at 34kDa by western blotting. In addition, we also determined the role of ADSF/resistin on adipocyte cells. When 3T3 L1 preadipocyte cells were transfected with ADSF gene, the adipogenic process in cells was partly suppressed. Taken together, we believe that recombinant ADSF/resistin protein and its antibody will be useful to investigate the process of adipocyte differentiation in cattle.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

<b>Chapter 1. Introduction</b>	<b>16</b>
1. Research Background	16
2. Research Objectives	17
3. Research Scope	17
<b>Chapter 2. Current Status of Technology in Korea and Other Countries</b>	<b>19</b>
1. Present Status and Problems in Target Research Area	19
2. Prospect of the Research	19
<b>Chapter 3. Material Methods and Results</b>	<b>20</b>
1. Molecular cloning of ADSF/resistin gene and investigation of polymorphism in Korean native cattle	21
1) Materials and Methods	21
2) Results	25
2. Analysis of the corelation between DNA polymorphism of ADSF/resistin gene and carcass traits in Hanwoo	55
1) Materials and Methods	55
2) Results	56
3. Production of recombinant ADSF/resistin protein and characterization of ADSF/resistin in adipocyte	71
1) Materials and Methods	71
2) Results	73
<b>Chapter 4. Achievements and Contributions</b>	<b>85</b>
<b>Chapter 5. Result Application</b>	<b>87</b>
<b>Chapter 6. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	<b>88</b>
<b>Chapter 7. References</b>	<b>89</b>

# 목 차

제1장 연구개발과제의 개요 -----	16
제1절 연구개발의 필요성 -----	16
제2절 연구개발의 목적 -----	17
제3절 연구개발의 내용과 범위 -----	17
제2장 국내외 기술개발현황 -----	19
제1절 국내외 관련기술의 현황과 문제점 -----	19
제2절 앞으로의 전망 -----	19
제3절 기술도입의 타당성 -----	19
제3장 연구개발 수행내용 및 결과 -----	20
제1절 연구개발 목표 및 내용 -----	20
제2절 수행내용 및 결과 -----	21
1. 한우 ADSF/resistin 유전자 cloning 및 DNA 다형현상 규명 -----	21
가. 연구방법 -----	21
나. 연구결과 -----	23
2. ADSF/resistin 유전자 다형현상과 한우 경제형질간의 연관관계 분석 -----	55
가. 연구방법 -----	55
나. 연구결과 -----	56
3. 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현벡터 개발 및 단백질 특성규명 -----	71
가. 연구방법 -----	71
나. 연구결과 -----	73
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	85
제1절 연구개발 목표의 달성도 -----	85
제2절 관련분야의 기여도 -----	86
제5장 연구개발결과의 활용계획 -----	87
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	88
제6장 참고문헌 -----	89



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

인체지놈 프로젝트가 완료되고(2001년 6월) 이후 생쥐 및 기타 동, 식물의 지놈 염기서열 분석도 속속 발표되고 있다. 염기서열 분석에서 얻을 수 있는 것은 여러 가지가 있을 수 있지만 그 개체의 유전자의 수를 어느 정도 예측할 수 있다는 것이다. 그러나 중요한 것은 특정 유전자의 생체 내 고유한 역할을 알아내는 것이다. 따라서 앞으로의 연구는 새로운 유전자를 탐색하고, 유전자의 기능을 밝히고, 그 유전자를 그 특성에 맞게 활용하는 연구가 활발히 이루어 질 것이다. 지방대사 및 지방분화와 관련된 연구는 비교적 많이 이루어 졌지만 이들 연구가 직접 가축생산이나 품질향상에 적용된 경우는 많지 않다. 소득의 증대와 함께 소비자들의 요구는 과거의 양적인 소비양상이 질적인 소비양상으로 변하고 있고, 농축산물 수입자유화에 따른 국내 생산 축산의 생존전략으로 축산물의 차별화를 위한 품질향상에 관한 연구 등이 축산관련 연구자들에게는 새로운 도전이 되고 있다.

특히 한우의 경우 지방의 근내 침착도가 육질의 등급을 좌우하는 주요 요소임에도 불구하고 근내 지방침착에 관련된 유전자나 지방분화와 관련된 연구가 극히 미약한 실정이다. ADSF/resistin은 가장 최근(2001)에 밝혀진 호르몬으로서 지방세포 특이적으로 분비되고 지방세포분화를 억제한다는 연구가 본 총괄연구책임자에 의해서 밝혀졌으며(Kim 등, 2001), 인체에서는 비만과 당뇨에 영향을 한다는 연구가 미국의 Mitchell Lazar 실험실에 의해 Nature지(Steppan 등, 2001)에 발표되었다. ADSF/resistin 유전자에 관한 연구는 인체와 실험동물에 국한되어 연구가 이루어지고 있으며, 가축에 대한 이 유전자의 탐색 및 특성규명에 관한 연구는 전무하다.

### 2. 경제·산업적 측면

농산물과 축산물의 수입자유화에 따라 한우의 고품질, 고능력화를 통한 국제 경쟁력 제고는 오래 전부터 축산인과 연구자들의 관심사였다. 인간과 생쥐의 지놈 프로젝트가 완료된 이후 분자생물학등 생명공학기술 등의 첨단기술을 이용한 가축의 개량이나 생산성을 향상시키기 위한 기술은 그 가속도를 더하고 있다. 동물과 사람에 있어서 Leptin 유전자의 발견(1994년)과 이에 대한 연구는 사람의 비만과 당뇨 및 가축의 개량을 위하여 수 없이 많이 이루어 졌다. ADSF/resistin도 leptin과 같이 지방에서 분비되는 호르몬이면서(Ahima와 Flier, 2000; Beltowski, 2003; Kershaw과 Flier, 2004) 지방대사에 관여하고 특히 지방분화와 연관이 있는 으로 밝혀졌다

(Steppan 등, 2002; Gregoire 등, 1998). 한우 ADSF/resistin을 cloning하고 이에 대한 기능이 더 깊게 밝혀지면 고품질, 고능력화를 위한 이 호르몬의 연구가 집중될 것이고 또한 한우ADSF/resistin 호르몬과 항혈청을 유전공학적인 방법으로 대량생산하여 이를 연구하는 곳에 제공할 수 있고, 이런 기술은 돼지 및 닭의 연구 즉, ADSF/resistin cloning 및 호르몬과 항혈청 생산에도 적용될 수 있을 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

생명공학의 발달과 이를 응용한 새로운 품종의 개발과 생산물의 품질 향상은 이제 피할 수 없는 시대의 흐름이 되고 있다. 한우는 우리 민족과 함께 하면서 오랫동안 한반도에서 사육되어 왔으나 이제는 쇠고기시장 개방화시대에서 살아 남을 수 있는 길을 모색해야할 시기가 되었다. 특히 한우의 고급육화 전략에 부합하는 근내지방도에 연관한 ADSF/resistin 유전자의 기작에 관한 연구는 생체 내 지방 기작의 비밀을 해결 할 수 있는 중요한 연구 과제이다. 또한 ADSF/resistin은 사람에게 있어서는 비만과 당뇨에 관련된 연구의 기초자료를 제공해 줌으로서(Steppan 등, 2002; Sul 등, 2001; Fain 등, 2003; Mcternan 등, 2002) 인류를 성인성 질환으로부터 해방시켜 건강한 노후생활을 보내는데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제2절 연구개발의 목적

본 연구는 지방분화에 관여하는 호르몬 ADSF/resistin 유전자를 한우에서 탐색하고, 이 유전자 단백질의 대량생산 방법의 개발과, ADSF/resistin 유전자의 다형현상을 분석하여 이들 DNA다형 현상과 한우의 경제 형질들과의 상관관계를 도출하여 고급육 또는 성장 관련 표지 인자로서의 활용방안을 제시하고자 실시하였다.

## 제3절 연구개발의 내용과 범위

제 1 세부과제: 한우 ADSF/resistin 유전자 cloning 및 다형현상 규명

-ADSF/resistin cDNA cloning

-DNA염기서열 분석

-ADSF/resistin DNA 구조해석

-한우 후대검정우의 ADSF/resistin DNA(exon, intron) polymorphism 분석

-한우 ADSF/resistin promoter 탐색 및 promoter에서 후대검정우 DNA polymorphism 분석

제 2 세부과제: 한우 ADSF/resistin 유전자의 다형현상 분석 한우 경제형질간의 연관관계 분석

○성장단계별, 비만정도별 한우 시험 설계 계획 및 시료 채취

- 성장 시기별 체중 조사 및 초음파 육질 및 육량 측정
  - 성장 단계별 BCS(Body condition score) 조사 : 살찐 정도 측정
  - 27개월령 시 시험 도축 후 도축 성적 조사 : 근내지방도, 등지방두께 등
- 유전자 발현양상과 한우 경제 형질 간의 연관 관계 분석
- 성장 단계별 유전자의 다형현상과 체중, 근내지방도, 등지방 두께등 한우의 주요 경제 형질과의 연관 관계 분석
  - 계획교배에 의한 종모우 및 종빈우의 효과와 ADSF/resistin 유전자의 다형현상과의 연관성 규명
  - 한우의 육종가(Breeding Value)가와 ADSF/resistin 유전자간의 연관성 분석으로 고급육 또는 성장 관련 표지 인자로서의 활용성 타진

제 3 세부과제: 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현백터 개발 및 단백질 특성규명

- 한우ADSF/resistin 단백질 발현백터 구축
- 한우ADSF/resistin 단백질의 발현백터의 세포내 도입
- 한우ADSF/resistin 단백질의 생산, 정제 및 항혈청 생산
- 한우ADSF/resistin 단백질의 특성 규명

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

ADSF/resistin는 가장 최근(2001년)에 미국의 University of Pennsylvania(Nature 409:307-312)와 University of California at Berkeley (J. Biol. Chem. 276:11252-11256)에서 비슷한 시기에 밝혀진 호르몬으로서 지방에서 분비되어 비만과 당뇨에 관여하는 호르몬으로서 또는 지방분화와 관련된 호르몬으로서 이 분야의 연구자들의 주요관심사가 되고 있다(Kim 등, 2003; Degawa-Yamauchi 등, 2003). 이 유전자는 현재 사람, 생쥐, 쥐에 대한 유전자만 알려져 있는 상태이고 주요연구가 인체에 중점을 두고 연구가 되고 있는 실정이며, 국내에서 관련연구 및 발표된 연구는 전무한 상태이다. 본 총괄연구책임자는 UC Berkeley에서 약 5년간 연구하면서 ADSF/resistin을 최초로 밝혀낸 경험(rat ADSF/resistin gene)이 있고, 최근까지 미국에서 ADSF/resistin형질전환동물을 생산하여 관련 연구를 수행하여 왔다.

### 제2절 앞으로 전망

ADSF/resistin에 관한 연구는 시기적으로 초기단계이고 앞으로 연구해야 할 분야가 무한정 넓다.

가축에 대한 새로운 유용 유전자원의 개발은 국내외적으로 경쟁이 높을 것이므로 시기적으로 시각을 다투는 사안이고 독자적으로 개발된 유전자는 우수한 품종을 육성하고 생산성 및 품질향상을 시킬 수 있을 뿐만 아니라 특허권을 행사할 수 있을 것으로 사료된다. 인류에게는 ADSF/resistin와 관련된 비만과 당뇨 연구에 큰 기여를 할 것이다.

### 제3절 기술도입의 타당성

한우ADSF/resistin는 아직 외국에서도 cloning이 되지 않은 유전자이기 때문에 기술도입은 불가능한 실정이다. 유전자의 탐색과 발굴된 유전자의 특허를 획득하는 일은 시간을 다투는 일이며, 이 유전자가 축산물 생산에 유용한 유전자로 밝혀지면 특허를 출현하여 오히려 외국으로부터 기술료를 받을 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구개발의 목표 및 내용

#### 1. 연구개발 목표와 내용

##### 제 1 세부과제: 한우 ADSF/resistin 유전자 cloning 및 다형현상 규명

- 한우지방조직채취
- Total RNA 분리
- 한우 ADSF/resistin cDNA cloning
- DNA염기서열 분석
- ADSF/resistin DNA 구조해석
- 한우 후대검정우의 ADSF/resistin DNA(exon, intron) polymorphism 분석
- 한우 ADSF/resistin promoter 탐색 및 프로모터에서 후대검정우 대상 DNA polymorphism 분석

##### 제 2 세부과제: 한우 ADSF/resistin 유전자의 다형현상과 한우 경제형질과의 상관관계 분석

- 성장단계별, 비만정도별 한우 시험 설계 계획 및 시료 채취
  - 성장 시기별 체중 조사 및 초음파 육질 및 육량 측정
  - 성장 단계별 BCS(Body condition score) 조사 : 살찐 정도 측정
  - 27개월령 시 시험 도축 후 도축 성적 조사 : 근내지방도, 등지방두께 등
- 유전자 발현양상과 한우 경제 형질 간의 연관 관계 분석
  - 성장 단계별 유전자의 다형현상과 체중, 근내지방도, 등지방 두께 등 한우의 주요 경제 형질과의 연관 관계 분석
  - 계획교배에 의한 종모우 및 종빈우의 효과와 ADSF/resistin 유전자의 다형현상과의 연관성 규명
  - 한우의 육종가(Breeding Value)가와 ADSF/resistin 유전자간의 연관성 분석으로 고급육 또는 성장 관련 표지 인자로서의 활용성 타진

##### 제 3 세부과제: 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현백터 개발 및 단백질 특성규명

- 한우ADSF/resistin 단백질 발현백터 구축
- 한우ADSF/resistin 단백질의 발현백터의 세포내 도입

- 한우ADSF/resistin 단백질의 생산, 정제 및 항혈청 생산
- 한우ADSF/resistin 단백질의 특성 규명

## 제 2절 연구개발의 수행내용 및 결과

### 1. 한우 ADSF/resistin 유전자 cloning 및 DNA 다형현상 규명

#### 가. 연구 방법

##### 1) Total RNA와 genomic DNA의 추출

한우에서 채취한 피하지방에서 total RNA를 추출하기 위하여 Trizol reagent (Invitrogen)을 사용하였다. 추출된 RNA는 DEPC로 처리된 용액에 용해시켜 -80 C에 저장하였으며 single strand cDNA을 합성하기 위한 주형으로 이용하였다. ADSF/resistin 유전자의 genomic DNA를 cloning하고 이들의 DNA다형현상을 탐색하기 위하여 혈액과 간 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다. 각 한우개체로부터 혈액의 채취는 도살장 혹은 대상농장 및 남원 축산연구소 등에서 실시되었으며 채취된 혈액은 EDTA가 함유된 튜브에 보관하였으며, 이들 샘플은 Wizard genomic DNA purification kit(Promega)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 간으로부터의 genomic DNA의 추출은 조직을 digestion buffer에서 homogenization한 후 50℃에서 over night 시킨 후 phenol: chloroform: isoamylalcohol(Merck, Germany)을 digestion buffer와 동일 양을 혼합하여 20초간 교반시킨 후 원심 분리하여 상층액만 새 튜브로 옮긴 후 전체 부피의 1/2의 7.5M ammonium acetate와 2배의 100% alcohol을 첨가하였다. 이후 가볍게 inverting하여 DNA를 응집하였으며 응집된 DNA만 분리하여 70% alcohol로 2~3회 수세시켰다. alcohol을 완전히 자연 건조 시킨 후 ddH<sub>2</sub>O를 첨가하여 65℃에서 1시간 동안 배양하였다. 분광광도계로 정량 분석하였으며 다음 단계의 실험을 위하여 4℃에 보관하여 이용하였다.

##### 2) Regenerative PCR primer제작

한우의 ADSF/resistin 유전자를 찾기 위하여 이미 NCBI의 GenBank에 등록된 사람, 쥐, 생쥐의 유전자 염기서열을 비교 분석하여 유사성(homology)이 높은 영역을 기준으로 PCR primer 16개를 제작하였다.

##### 3) RT-PCR

역전사는 Reverse Transcription System(Promega)을 이용하여 실시하였다. 사용한 primer는 oligo(dT)혹은 Random primer를 이용하였다, 반응조성은 RNA 1.5µg, buffer 4µl,

MgCl<sub>2</sub>(25mM) 3 $\mu$ , dNTP(2.5mM) 1 $\mu$ l, Reverse Transcriptase 1 $\mu$ l, primer 0.5 $\mu$ g, DEPC H<sub>2</sub>O 2 $\mu$ l의 조성이었다. 이들 반응물은 25C에서 5분간 annealing과정과 42C에서 60분간 extension 과정을 통하여 cDNA를 합성하였으며 이후 70C에서 15분간 열처리를 하여 역전사 효소를 불활성화 시켰다. 생성된 cDNA는 다음 단계의 실험을 위하여 -20C에 보관하였다. ADSF/resistin유전자를 찾기 위하여 위에서 제작된 primer들의 조합으로 합성된 cDNA를 주형으로 하여 PCR를 시행하였다.

#### 4) ADSF/resistin promoter 탐색

##### 가) Restriction enzyme digestion

ADSF/resistin promoter를 탐색하기 위하여 inverse PCR(IPCR)를 실시하였다. 먼저 inverse PCR를 실시하기 전에 확보된 genomic DNA를 restriction enzyme Taq I (Takara, Japan)을 사용하여 digestion 시켰다. 반응 조성은 genomic DNA 3 $\mu$ g, 10X Reaction Buffer 10 $\mu$ l, restriction enzyme 5 $\mu$ l, 0.1% BSA 10 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 75 $\mu$ l이다. 이들 반응물들은 65 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시킨 후 효소의 활성을 정지시키기 위하여 80 $^{\circ}$ C에서 20분간 열처리 하였다. 이 반응물을 Geneclean Kit(Q-BIO gene, Europe)로 정제시켰다. 정제된 반응물은 150 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O에 resuspend 시켜서 사용하였다.

##### 나) Circularization

정제된 반응물은 self ligation을 시켰다. 반응물 조성은 정제된 반응물 50 $\mu$ l, 5X ligation buffer(Takara, Japan) 12.5 $\mu$ l, T4 ligase(Takara, Japan) 3 $\mu$ l, 15uM hexamine cobalt chloride(sigma, USA) 7.5 $\mu$ l이다. 이들 반응물은 18 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시킨 후 Geneclean Kit(Q-BIO gene, Europe)로 정제시켜 2~3분 끓인 후 IPCR을 실시하였다.

##### 다) Inverse PCR(IPCR)

한우 ADSF/resistin의 promoter를 탐색하기 위하여 inverse PCR법(Figure 1-1)을 실시하였다. PCR에 사용한 forward primer는 5'-CAGTAGCCTAAGACTGCGTTG-3'와 reverse primer 5'-GAGAGAGCCTTCATCCTGCAG-3'을 사용하였으며 반응물의 조성은 template 2 $\mu$ l, 2.5mM dNTP(5pmol/ $\mu$ l) 2 $\mu$ l, 10X Reaction Buffer 2 $\mu$ l, Taq polymerase (0.5units/ $\mu$ l) 0.1 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 9.9 $\mu$ l 넣어 총량이 20 $\mu$ l이 되도록 하였다. 혼합된 PCR 반응물은 94 $^{\circ}$ C 5분간 최초의 변성을 시키고, 9

4°C 1분간 변성, 58°C 2분간 접합, 72°C 4분간 확장의 3단계 과정을 35 cycle 순환시킨 후 마지막으로 확장단계 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 PCR 생성물은 1.5% agarose gel로 전기 영동하여 밴드의 위치를 확인하였으며 위 실험결과 한우 ADSE/resistin의 upstream을 -300bp 클로닝 하였다.



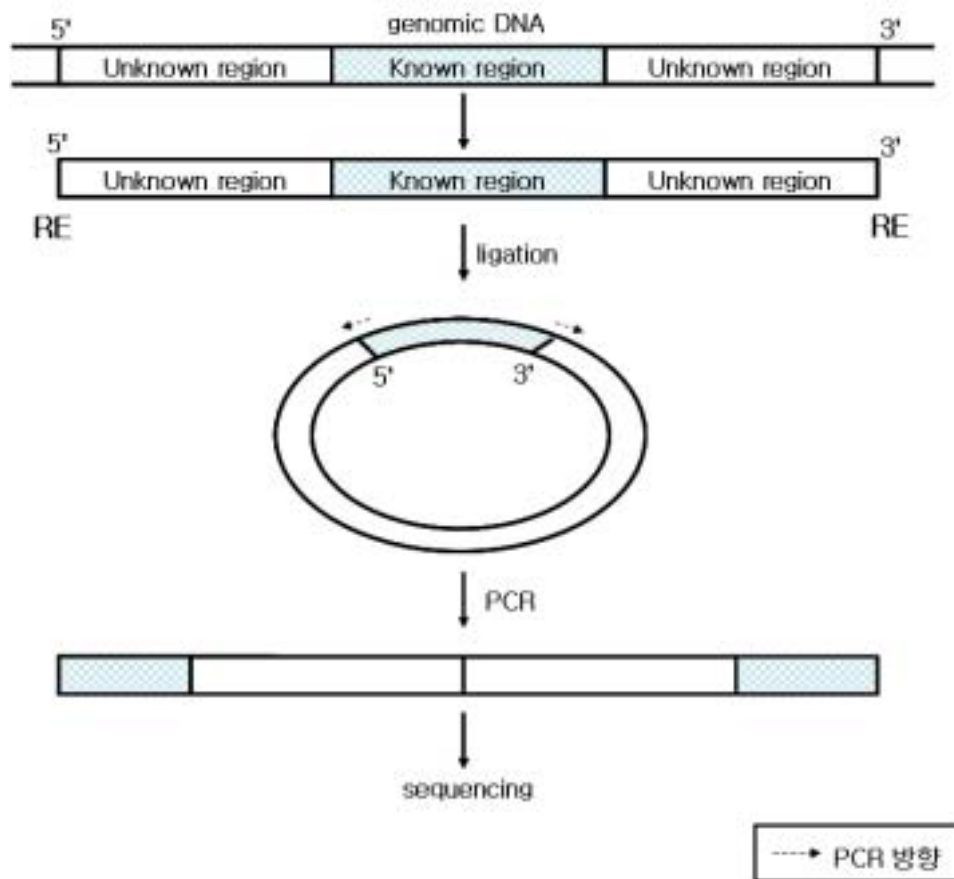


Figure 1-1. Diagram of inverse PCR for ADFS/resistin gene promoter cloning.

The procedure consists of four steps including genomic DNA isolation, circularization of double-stranded DNA, reopening of the circular DNA and amplification of reverse DNA fragment. The black and open bars represent the known and unknown sequence regions of double-stranded cDNA, respectively.

RE: restriction enzyme site.

## 나 연구결과

### 1)한우ADSF/resistin 유전자 cloning

한우 ADSF/resistin 유전자를 클로닝하기 위하여 여러 조합의 PCR을 시행하였다. 여기에 이용된 PCR primer들은 사람, 쥐, 기존에 일부 알려진 소 등의 genbank 염기서열 정보를 이용하여 제작하였다. 그 중 대표적인 결과는 Figure 1-2에서 보는 바와 같다. 1번 lane과 2번 lane 에 사용한 primer는 Forward bADSF-F7, 5'-CCTGCAGGATGAAGGCTC TC-3'; Reverse bADSFR8, 5'-CAAGCGCAGTCTTAGGCTACTG-3' 그리고 Forward hADSFF7, 5'-CCTGCAGGATGAAGCTCTC 와 Reverse bADSFR8, 5'-CAAGCGCAGTC TTAGGCTACTG-3' 이었다. PCR 조건은 94C에서 1분간 반응 후 94C 1분, 56C 1분, 72C 1분 과정을 32회 반복하였으며 마지막으로 72C에서 10분간 처리하여 반응을 종결시켰다. 예상되는 유전자의 크기가 약 400 bp전후로서 전기영동결과 예측된 크기와 일치하여 TA cloning vector에 삽입 하였다.

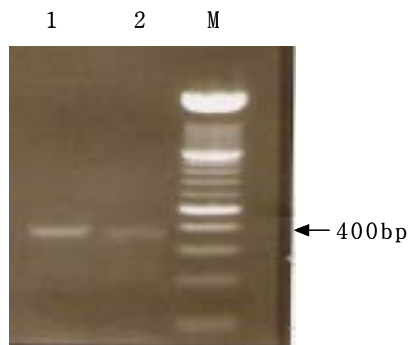


Figure1-2 RT-PCR for ADSF/resistin gene cloning in Korean Native Cow(Hanwoo)

primer sets: lane1-bADSF F7, bADSF R8; lane2-hADSF F7, bADSF R8

### 2) TA cloning 및 ADSF/resistin cDNA 탐색

한우 ADSF/resistin 유전자를 찾기 위하여 위에서 확인한 PCR product를 TA cloning vector(Invitrogen)에 삽입하기 위하여 T4 DNA ligase와 PCR product, ligation buffer을 이용하여 14 C water bath에서 10시간 이상 ligation하였다. ligation mix는 XL1 blue competent cell(Stratagene)에 42C에서 heat shock방법을 이용하여 transformation 시켜 agar plate 에 도말하여 37C에 배양하였다. 16-20시간 배양후 생성된 박테리아 colony들은 colony PCR을 이용하여 insert의 vector 삽입 여부를 확인 하였다. 사용한 PCR primer 들

은 위의 RT후 PCR을 위한 primer와 같으며 PCR 조건도 동일하게 하여 실시하였다. PCR colony에서 확인된 colony들은 다시 LB배지에 접종하여 배양한 다음 plasmid mini preparation(Qiagen)을 실시하여 plasmid를 추출하였다. Plasmid DNA는 DNA sequencing을 실시하였다(Bioneer). Sequencing 결과는 NCBI에서 BLAST search을 이용하여 비교 분석하였으며 기존에 알려진 ADSF/resistin 과 유사성을 확인하였다. DNA sequencing(407bp) 에 대한 결과는 Figure 1-5에 보는 바와 같다. 제한효소 분석결과 ADSF는 N-terminal의 PstI과 C-terminal 의 ApoI에 의하여 109 아미노산을 coding하는 전체 부분을 절단 할 수 있으며, CDS내에 약 39개의 제한효소의 잠재적 작용자리가 존재하고 있다.

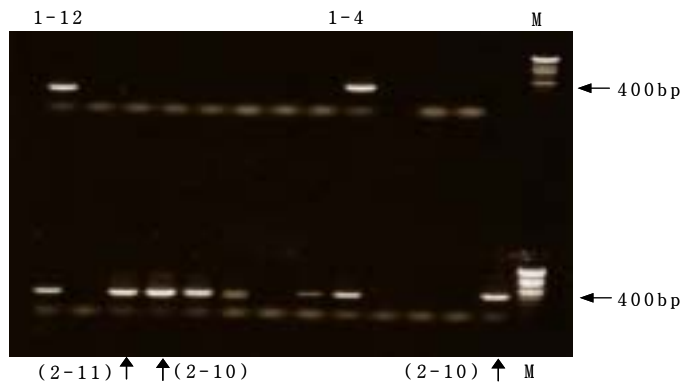


Figure 1-3. Colony PCR to verify the insert in TA cloning vector from E. coli colony plate. primer: top lanes 1-4&1-12(hADSF F7, bADSF R8), bottom lanes 2-1&2-10&2-11(bADSF F7, bADSF R8 )

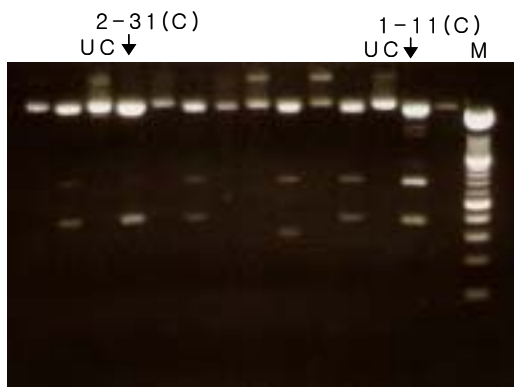


Figure 1-4. conformation of insert (restriction enzyme digest: *EcoRI*)

Figure1-4는 insert의 ligation 과 plasmid mini prep후에 insert의 삽입을 확인하기 위하여 cloning된 vector를 EcoRI으로 자른 후에 전기영동을 실시한 결과이다. 확보된 cDNA는 협동연구자인 경희대학교로 보내어 후속 연구를 진행하도록 하였다.

>11-1-T7 sequence exported from chromatogram file

```

GGATATCTGC AGAATTCGGC TTCCTGCAGG ATGAAAGCTC TCTCCTTCCT
CTTCATCCCA GTCCTGGGGC TGCTGGTGTG TGGCCAGTCG CTGTGCCCCA
TAGATAAAGC CATCAGTGAG AAGATCCAGG AGGTCACCAC CTCCTAGTT
CCTGGGGCAG TAAGGATCAC TGGCCTGGAC TGCCGGAGTG TCACCTCTAG
AGGGTCCCTG GTCACCTGCC CTTCAGGCTT CGCCGTCAC TGGCTGCACGT
GTGGCTCCGC CTGTGGCTCG TGGGACGTAC GTGCTGAGAC CACGTGCCAC
TGCCAGTGCG CTGGCATGGA CTGGACTGGA GCTCGCTGCT GCCGCCTGCA
TATCCAGTAG CCTAAGACTG CGCTTGAAGC CGAATTCCAG CACACTGGCG
GCCGTTA

```

Figure1-5. DNA sequencing for ADSF/resistin gene in Korean Native Cow

3) genomic DNA로부터 intron서열 탐색

ADSF/resistin 유전자의 구조분석을 위하여 intron을 genomic DNA로부터 탐색하였다.

Figure 1-5에서 확보된 mRNA 염기서열을 기본으로 하여 genomic DNA로부터 intron을 찾기 위하여 6개의 primer들을 제작하였다. 그 중에서 259 bp의 intron 2와 299 bp의 intron3가 새롭게 확인 되었다.

Intron 2를 위한 primer는 forward bADSFF7 5'-CCTGCAGGATGAAGGCTCTC-3'과 reverse hADSFR4 5'-CTCTGGCACTCCAGCCAATG-3'이다.

Intron3를 위한 primer는 forward hADSFF4 5'-CATTGGCCTGGAGTGCCAGAG-3' 과 reverse bADSFR8 5'-CAAGCGCAGTCTTAGGCTACTG-3' 이다. PCR에 의해 얻은 산물을 TA cloning과 plasmid prep을 거쳐 DNA sequencing을 실시하였다. Sequencing 결과를 NCBI에서 BLAST 검색을 한 결과 아직 등록이 되지 않은 염기서열로인 intron 2와 intron3로 확인되었다. Figure 1-7은 intron 2와 3가 있는 ADSF/resistin 유전자의 DNA 염기서열이다. 그리고 Figure1-8은 한우와 Hereford의 cDNA를 blast한 결과로 99.8%의 identity를 나타냈으며 아미노산을 coding하지 않은 exon 1에서 2개의 염기가 다른 것으로 나타났다.

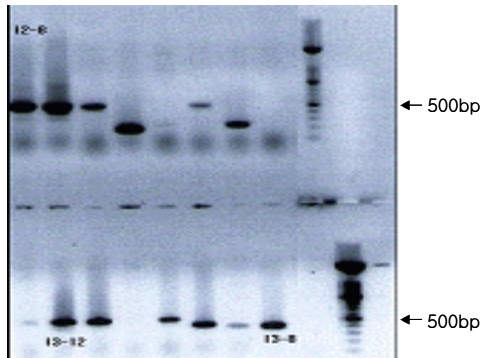


Figure1-6. Searching of introns from ADFS/resistin gene in Korean Native Cow. Top lanes are for intron 2, bottom lanes are for intron 3 indicating approximately 500bp size of intron with exons.

```

1 ATGAAGGCTCT CTCCTTCTC TTCATCCCAG TCCTGGGGCT GCTGGTGTG TGGCCAGTCG
61 CTGTGCCCCAT AGATAAAGCC ATCAGTGAGA AGATCCAGGA GGTACCAC CTCCCTAGGT
121 GAGAACCCTCC CATCCAATT CTGCTAGGCC TTCAGGGGCC TCTCTGATT CCTGCCATGG
181 CGACCACCAGG CCAGCCCTTC CCAACCAAT CTCAACCCCC AACCCCAAC CCACCGAGCC
241 AATCTTCCACT GGTTTCCACC TCTAACTACT GCTCAAACC CTCCTCCCT CAAAAACGCC
301 CACTCAGGACT GAATCCTTGG AGGTGGGAG TTCCCCACCT ACTGGGCCT TCCCCAGGGG
361 CGTTTTCTTGA CCCTCTGCC ATCTCCAAC CACCAGGCC TAGGCAGCA TGAGAAGGGG
421 GTTGGGGCAGC TTGGTCTTCC TGGGGCAGTA AGGATCACTG GCCTGGACT GCCGGAGTGT
481 CACCTCTAGAG GGTCCCTGGT CACCTGCCCT TCAGGTAGGT ACAGAACTC CGTTGTCCAG
541 TCTCCGGCTC TATTCTCAGC ACCCATACC CCGCTCCACT GTGTTTAGG TTCCATTTCT
601 CTAGAACCACG GAGTCCAGC CTCTAATTCC TTAATATCCT GGTCTGCAC TCCCGGCCTT
661 GTCCCCTCCCC CAACTCCCAG GCCCCATTTT CTCAGGACAC TGGTGTCCA GGCCCCAGC
721 ATCCCTGCCAC CCACGCTGCC AGCCCCCTGG AAGCCCAAAC TCAAAGCTT CTGGCTCGGG
781 GTCCAAGCTCT CTCCTCCTTG CTCCCCCTCG CAGGCTTCGC CGTCACTGG CTGCACGTGT
841 GGCTCCGCCTG TGGCTCGTGG GACGTACGTG CTGAGACCAC GTGCCACTG CCAGTGCCT
901 GGCATGGACTG GACTGGAGCT CGCTGCTGCC GCCTGCATAT CCAGTAG

```

Figure 1-7. ADFS/resistin gene with introns in Korean Native Cow  
Intron 2 and 3 are indicated with bold capital letter with line.

Hereford	1	GATGCCAAGG-GTCTTAGCCAAGACAGGAAGCTGTACAGCC-GGCAGCCT	48
Hanwoo	1	GATGCCAAGG GTCTTAGCCAAGACAGGAAGCTGTACAGCC GGCAGCCT	50
Hereford	49	TAAAAAGGGAGCGGAGGCAGGGGCGCAGAATTAGTGTTCAAATTTGGCC	98
Hanwoo	51	TAAAAAGGGAGCGGAGGCAGGGGCGCAGAATTAGTGTTCAAATTTGGCC	100
Hereford	99	TGCTGAGTCCACAGAGAGGCACCTGCAGGATGAAGGCTCTCTCCTTCCTC	148
Hanwoo	101	TGCTGAGTCCACAGAGAGGCACCTGCAGGATGAAGGCTCTCTCCTTCCTC	150
Hereford	149	TTCATCCAGTCTCTGGGGCTGCTGGTGTGTGGCCAGTCGCTGTGCCCAT	198
Hanwoo	151	TTCATCCAGTCTCTGGGGCTGCTGGTGTGTGGCCAGTCGCTGTGCCCAT	200
Hereford	199	AGATAAAGCCATCAGTGAGAAGATCCAGGAGGTCACCACCTCCCTAGTTC	248
Hanwoo	201	AGATAAAGCCATCAGTGAGAAGATCCAGGAGGTCACCACCTCCCTAGTTC	250
Hereford	249	CTGGGGCAGTAAGGATCATTGGCCTGGACTGCCGGAGTGTACCTCTAGG	298
Hanwoo	251	CTGGGGCAGTAAGGATCATTGGCCTGGACTGCCGGAGTGTACCTCTAGG	300
Hereford	299	GGGTCOCTGGTCAOCTGCCCTTCAGGCTTCGCCGTCACTGGCTGCACGTG	348
Hanwoo	301	GGGTCOCTGGTCAOCTGCCCTTCAGGCTTCGCCGTCACTGGCTGCACGTG	350
Hereford	349	TGGCTCOGCTGTGGCTCGTGGGACGTACGTGCTGAGACCACGTGCCACT	398
Hanwoo	351	TGGCTCOGCTGTGGCTCGTGGGACGTACGTGCTGAGACCACGTGCCACT	400
Hereford	399	GCCAGTGCGCAGGCATGGACTGGACTGGAGCTCGCTGCTGCCGCCTGCAT	448
Hanwoo	401	GCCAGTGCGCAGGCATGGACTGGACTGGAGCTCGCTGCTGCCGCCTGCAT	450
Hereford	449	ATCCAGTAG	457
Hanwoo	451	ATCCAGTAG	459

Figure1-8. Comparison of nucleotides between Korean Native Cattle and Hereford ADSF/resistin gene.

Two base pairs are mismatched at position 11 and 42 nucleotide of Hanwoo.

#### 4) GenBank등록

mRNA로부터 확보된 cDNA와 genomic DNA로부터 탐색된 intron을 연결한 결과 Coding DNA sequence가 시작되는 ATG부터 종료 codon이 있는 TAG까지 948bp로 이루어져 있으며 이 사이에는 3개의 exon과 2개의 intron이 존재하고 있었다. 한우 ADSF/resistin 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank에 등록하였으며 GenBank accession number AY618903을 확보하였다. Figure 1-9은 GenBank의 한우 ADSF/resistin에 대한 등록 정보와 DNA 염기서열을 나타낸 것이다.

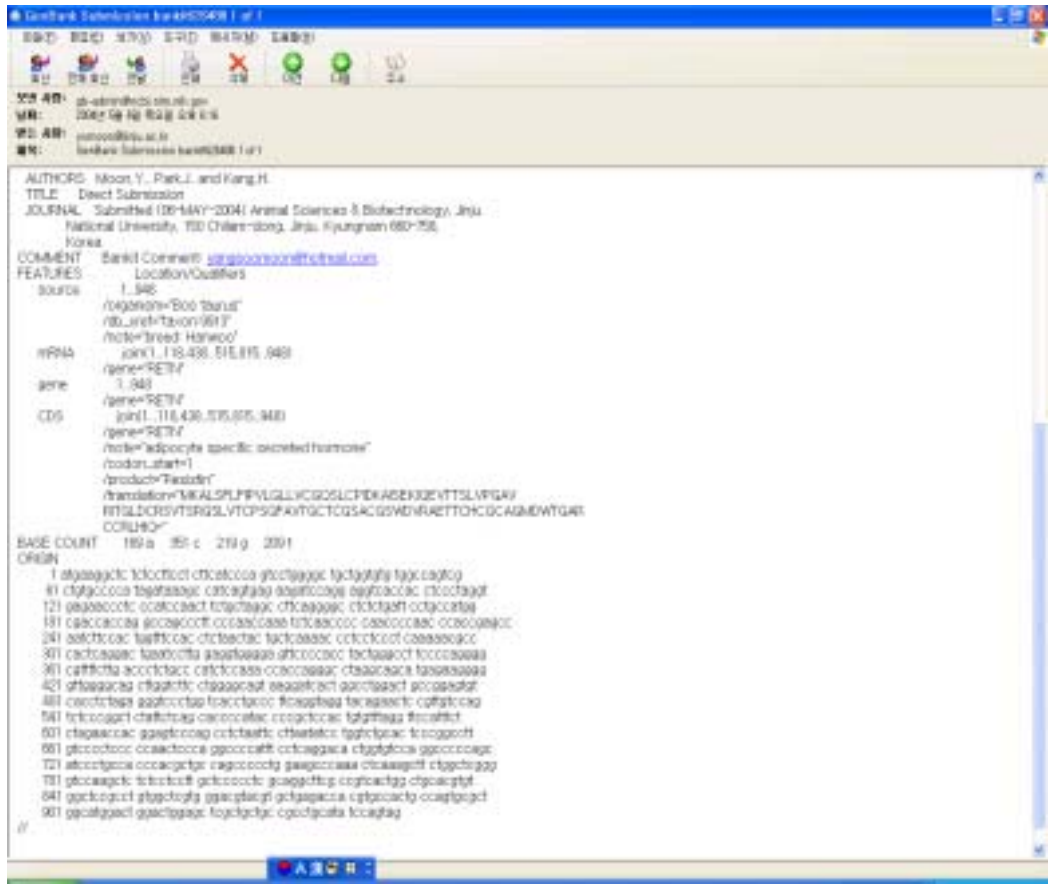


Figure 1-9. GenBank information for ADSF/resistin gene in Korean Native Cow(Hanwoo).

5) 한우 ADSF/resistin genomic DNA 구조

한우 ADSF/resistin gene의 genomic fragment는 사람의 유전정보를 바탕으로 forward primer, reverse primer를 제작하여 genomic DNA를 PCR 방법을 사용하여 분석하였다. 한우 ADSF/resistin 구조를 연구한 결과, 한우 ADSF/resistin은 exon 4 개, 5'-UTR(Untranslated Region), 3'-UTR로 구성되어 있으며 그 구성은 125bp의 5'-UTR과 109개의 아미노산을 coding하는 330bp의 cDNA, 116bp의 3'-UTR이다. Figure 1-10은 한우 ADSF/resistin의 구조를 나타낸 것으로 밑줄로 표기한 것이 exon이며, 그 나머지는 intron을 의미한다. 그리고 3개의 intron은 GT-AG splicing 법칙을 따르는 것을 확인하였다. exon 1, 2, 3, 4의 크기는 각각 125bp, 128bp, 78bp,

250bp로 구성되며 intron 1, 2, 3은 각각 163bp, 128bp, 299bp로 한우 ADSF/resistin을 구성하였다.

Figure 1-11은 마우스, 사람, 한우 ADSF/resistin의 genomic 구조를 비교한 것으로 그림에서 보는바와 같이 마우스는 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되어 있고 사람은 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성되어 있는 것을 볼 수 있다. 한우 exon 1은 사람 exon 1보다 크기가 훨씬 크며, exon 2, exon 3은 같은 크기이고 exon 4는 사람 exon 4보다 크기가 약간 크다. 한우와 사람 염기서열의 identity를 분석한 결과 exon 4, exon 2, exon 3은 각각 77.60%, 75.76%, 70.61%의 identity를 나타낸 반면 exon 1은 identity를 나타내지 않았다. 그리고 start codon과 stop codon은 각각 exon 2와 exon 4에 위치하며 한우 ADSF/resistin의 genomic sequence는 GenBank(Accession number:AY618903)에 등록하였으며 이 sequence는 GenBank Accession number NW931836 Bos taurus의 chromosome 7 contig와 일치하는 것을 확인하였다. 한우와 사람, Hereford ADSF/resistin의 cDNA를 blast한 결과 각각 82%, 99.4%의 identity를 나타냈다. Figure 1-10에서 보는바와 같이 한우와 Hereford는 5'-UTR인 exon 1에서 한우가 Hereford보다 염기 2개가 삽입된 것을 확인할 수 있다.



```

1  GATGCCAAGGTGCTTAGCCAAGACAGGAAGCTGTACAGCCTGGCAGCCTTAAAAAGTGG
61 AGCTGGAGTGACAGGTGCGCAGAATTAGTGTTCAAAATTGGCCTGCTGAGTCCACAGAG
121 AGGTAAGTGACAGCTGCTCCTGCCTGTAGGGGCAAAGCTGGGTCTCCAGCCCCATCCTC
181 AGTTGGGACCCACAGCTCCCAATTCACATGCTCTGTGGGTCTGAGCTTCCCCAGGATGG
241 GGAGGGGTAGACCCAGCTGGGGGTTTCTTGGTTTTTTTTCTTGCAGCACCTGCAGGATGA
301 AGGCTCTCTCCTTCTTCCATCCCAGTCTGGGGCTGCTGGTGTGTGGCCAGTCGCTGT
361 GCCCCATAGATAAAGCCATCAGTGAGAAGATCCAGTGAGGTCACCACCTCCCTAGGTGAGA
421 ACCCTCCCATCCAACCTCAGCCAGGCCCTCAGGGGCTCTCTGATTCTGACATGGAGCG
481 AACATCAGGCCAGCCCCAACCCAAACCAATCTCAACCCAAACCCAACCCAACGCCAAT
541 CTTCCACTGGTTTCCACCTCTAACTACAGCTCAAAACCCTCCTCCCTCAAAAACGCCAC
601 TCAGGACAGAATCCTTGGAGGTGGGGAGTTCCCCACCTACTGGGCCTTCCCCAGGGGCGT
661 TTTCTTGACCCTCTGCCATCTCCAAACCACAGGGCCTAGGCAGCATGAGAAGGGGGTT
721 GGGGCAGCTTGGTCTCACAGTTACTTTGCATCACCCCTTCCCGCAGTTCCTGGGGCAGTA
781 AGGATCATTGGCCTGGACTGCCGGAGTGTACCTCTAGGGGGTCCCTGGTCACTGCCCT
841 TCAGGTAGGTACAGAACTCCGTTGTCCAGTCTCCCGGCTCTATTCTCAGCACCCATACC
901 CCGCTCCACTGTGTTTAGGTTCCATTTCTCTAGAACCACGGAGTCCAGCCTCTAATTCC
961 TTAATATCCTGGTCTGCACTCCCGGCCTTGTCCCTTCCCCCAACTCCCAGGCCCCATTC
1021 CTCAGGACACTGGTGTCCAGGCCCCAGCATCCCTGCCACCCACGCTGCCAGCCCCCTGG
1081 AAGCCAAACTCAAAGCTTCTGGCTCGGGGTCCAAGCTCTCTCCTTGTCCCCCTCG
1141 CAGGCTTCGCCGTCACCTGGCTGCACGTGTGGCTCCGCCTGTGGCTCGTGGGACGTACGTG
1201 CTGAGACCACGTGCCACTGCCAGTGCAGGCATGGACTGGACTGGAGCTCGCTGCTGCC
1261 GCCTGCAATCCAGTAGCCTAATACTGCGCTTGCAGCGGTGCAAGCCTGGGGGGCGTGCC
1321 AGGCATTTGGGGGCGGGTCAATCTCTGAGGGGCCGGGCCAGGCCCGGCTGGAAATAAA
1381 CCTCTTGAGATG -----

```

Figure 1-10. Genomic DNA sequence of ADSF/resistin gene in Korean Native Cattle.

Exons are underlined and polyadenylation signal sequence(AATAAA) is marked with dashed underline.

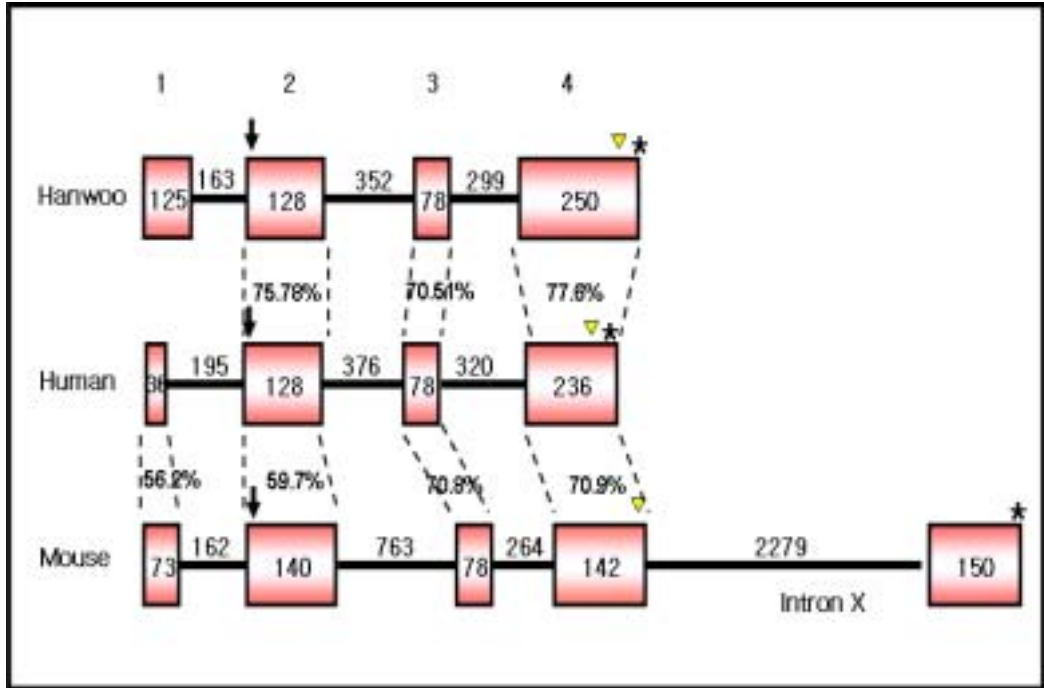


Figure 1-11. Genomic organization of Hanwoo and human, mouse ADSF/resistin. Exons are represented by solid boxes with length mentioned in base pairs and the introns are shown by connecting solid lines. Arrows and arrowheads denote the positions of the start and stop codons, respectively. Polyadenylation signals are marked by asterisks.

6) 종별 ADSF/resistin이 발현하는 아미노산의 비교

RELM/FIZZ family는 c-terminal에 특이적인 cysteine의 반복 motif를 가지고 있다. 이러한 cysteine은 두 개의 monomers가 disulfide 결합을 형성하여 dimerization을 형성하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Banerjee과 Lazar, 2001). 이러한 single disulfide 결합은 homodimer에서 resistin의 subunit가 결합하는데 필요로 한다.

Intramolecular와 intermolecular에서 disulfide 결합의 형성은 단백질 접힘에서 중요한 과정이다. Disulfide 결합은 단백질의 적절한 접힘과 분비를 위해 요구되어지며

polypeptide growth factors 및 hormones의 4차원 구조를 위해서 매우 중요하다. 그리고 Cys26은 resistin의 dimerization을 위하여 요구되어지며 resistin과 RELM $\beta$ 에 존재하는 11번째 cysteine은 disulfide 결합을 통해 homodimerization에 필수적이다 (Banerjee과 Lazar, 2001). 그리고 나머지 10개의 cysteine은 intramolecular disulfide 결합과 관련되어 있다. Figure 1-12는 다양한 종별에 따른 ADSF/resistin이 발현하는 단백질을 비교한 것으로 CX12CX8CXCX3CX10CXCX9CC의 cysteine의 반복 motif를 확인할 수 있다. 이러한 반복된 cysteine은 한우 ADSF/resistin이 dimer를 형성하는데 중요한 역할을 할 것이라고 사료되어진다.

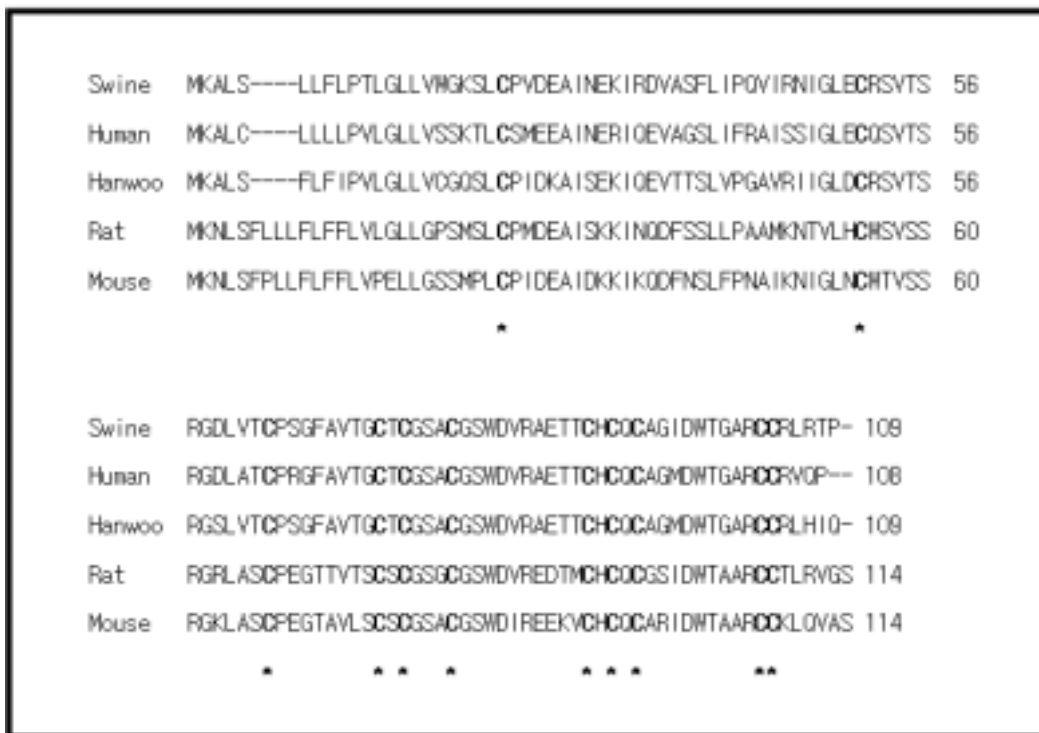


Figure 1-12. Deduced amino acid multiple sequence alignment of ADSF/resistin gene. Cysteine residues are marked by asterisks (CX12CX8CXCX3CX10CXCX9CC).

#### 7) 한우 ADSF/resistin의 hydropathy

단백질의 합성은 세포질에 위치한 리보솜에서 생산되고 단백질 자체가 가지고 있는 아미노산의 특정 서열(signal sequence)에 의해서 이루어진다. 다시 말해, 각각의 단백질은 올바른 소기관으로 이동시키는 특정 신호인 sorting signal을 가지고 있다. 단백질에 존재하는 signal sequence는 약 15-20개로 구성되어 있으며 소기관으로 이동된 후 이 signal sequence는 잘려진다. 1980년 Kyte-Doolittle에 의해 고안된 hydropathy plots은 구성 아미노산이 소수성인지 친수성인지를 예측할 수 있으며 이러한 방법은 분자생물학 분야에서 널리 이용되고 있으며 표준 기구로 사용되어진다.

단백질의 hydrophilicity/hydrophobicity는 단백질의 위치와 기능을 결정한다. 그리고 단백질을 구성하는 아미노산은 친수성 또는 소수성에 따라 hydropathy 값이 주어지고 그 범위는 대략 -4.5에서 +4.5이며 음의 값은 아미노산은 친수성을 나타내고 양의 값은 소수성을 나타낸다. Figure1-13은 한우 ADSF/resistin의 아미노산의 2차 구조를 나타낸 것으로 signal peptide는 N-terminal에 14개의 소수성 아미노산으로 구성되어 있으며 한우 ADSF/resistin의 성숙한 단백질이 호르몬으로 분비되어질 때 signal peptide는 분리되어지고 친수성의 아미노산만 분비 되어지는 것으로 예측되어진다.

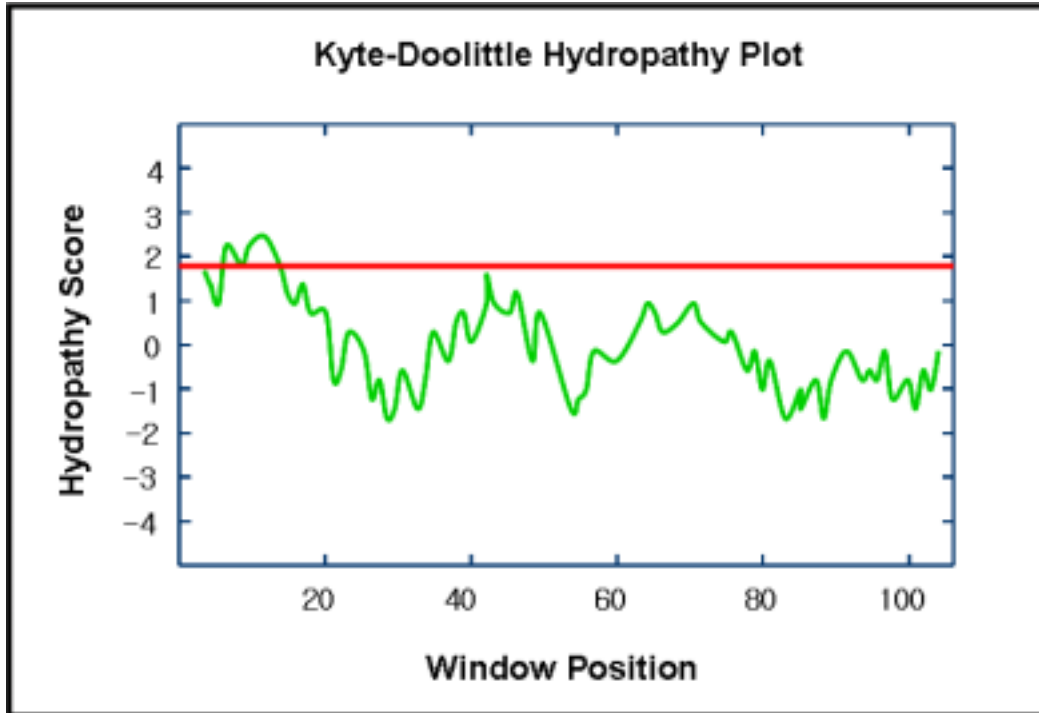


Figure1-13. Prediction of a secondary structure for amino acids sequence of Hanwoo ADSF/resistin using Kyte-Doolittle Hydropathy plot.

Each amino acid is given a hydrophobicity score between -4.5 and 4.5. A score of 4.5 is the most hydrophobic and a score of -4.5 is the most hydrophilic. Transmembrane regions are identified by peaks with scores greater than 1.8 using a window size 19. The Y-axis is represented the number of amino acids.

#### 8)한우 ADSF/resistin gene promoter cloning

지방세포는 매우 분화적인 세포이며, 수많은 유전자가 지방세포에서 특이적으로 발현되어진다. 과잉으로 유입된 지방은 triglyceride의 형태로 에너지를 저장한다. 그리고 지방의 기능에 대한 연구자들의 관심은 지난 수십 년 동안 수동적인 지방의 역할에서 능동적인 호르몬 분비 기관으로서 그 관심이 옮겨지기 시작하였다(Hauner, 2004).

ADSF/resistin promoter 부위는 이 유전자를 조절하는 주요 부위이기 때문에 promoter를 클로닝하고 잠재적 transcription factor들의 작용 부위를 확인하고 그것이 매우 중요하다고 판단되어 ADSF/resistin의 promoter를 탐색하였다. 한우

ADSF/resistin의 promoter를 클로닝하기 위하여 Figure1-1에 제시한 inverse PCR법과 Hereford의 유전정보를 바탕으로 primer를 제작하여 Figure1-14와 같은 전기영동 결과를 얻을 수 있었다. 각 PCR 산물의 염기서열 분석 결과 한우 ADSF/resistin promoter를 -1476bp cloning하였으며(Figure1-18) 컴퓨터 분석(the TFSEARCH program based upon the TRANSFAC database)에 의해 한우 ADSF/resistin promoter region에 결합하는 다양한 putative *cis*-elements를 확인할 수 있었다(Figure1-17). 한우 ADSF/resistin의 exon 1의 ATG의 upstream -9와 -237bp에 C/EBP $\alpha$ 가 결합하는 부위와 -330bp, -1595bp에서 -1645bp사이에서 SREs가 결합하는 부위를 확인하였으며 또한 SP-1과 RAR/RXR이 결합하는 부위도 확인하였다(Figure 1-17). 서 등에 의해 사람 ADSF/resistin의 promoter region에서는 exon 1의 ATG에서 upstream 방향으로 -760 ~ -600bp 사이 여러 개의 SRE가 결합하는 부위와 -231bp에 C/EBP $\alpha$ 가 결합하는 부위를 확인하였다(Seo 등, 2003). 사람과 한우 ADSF/resistin의 promoter -819bp를 비교한 결과 46.2%의 identity를 나타냈으며(Figure 1-20), ADSF/resistin 유전자 발현 조절에 SREBP와 C/EBP 등과 같은 전사인자가 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되어진다(Darlington 등, 1998; Cao 등, 1991). 그리고 마우스와 사람 ADSF/resistin promoter와 같이 유전자 발현에 관련된 전사인자인 PPAR $\gamma$ 가 결합하는 부위는 현재 확보된 promoter 부위에서는 발견되지 않았다. 그러나 PPAR $\gamma$ 가 promoter region의 어느 곳에서 enhancer 역할을 할 가능성을 배제할 수 없다(Patel 등, 2003; Way 등, 2001; Rosen 등, 1999; Savage 등, 2001).

Figure 1-21은 한우와 Hereford ADSF/resistin의 upstream을 blast한 결과로 identity는 99.4%이며 10개의 염기서열이 서로 다른 것으로 분석되었다.

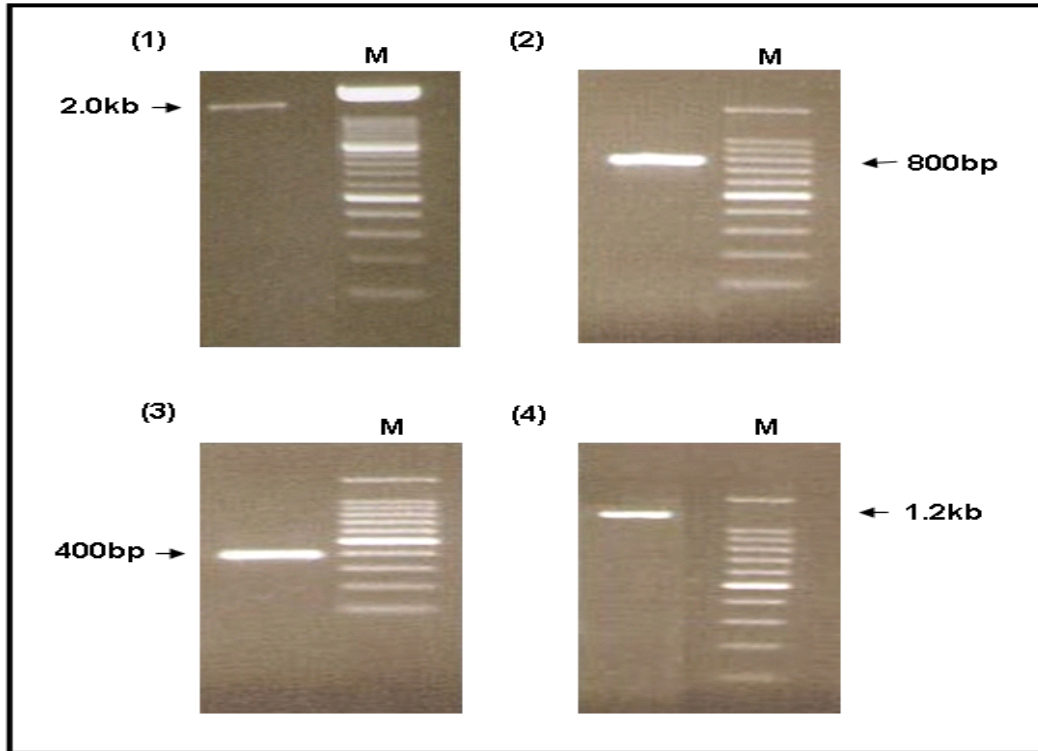


Figure1-14.. Cloning of the promoter region of ADSF/resistin gene by PCR in Korean Native Cattle. Multiple PCR amplications were conducted to obtain to a 1745bp fragment of promoter.  
M: DNA size marker.

#### 9) ADSF/resistin gene promoter 탐색

ADSF/resistin 유전자의 promoter를 탐색하기 위하여 Inverse PCR 방법을 이용하였다.

NCBI에 등록되어 있는 한우 ADSF genomic DNA의 정보를 바탕으로 primer를 제작한 후 이 실험에 사용하였다. 따라서 제작된 primer로 inverse PCR을 실시하면 한우의 ADSF 염기서열과 일치하는 부분이 존재해야만 한다. Figure1-15는 이번 실험에서 promoter 부분을 cloning하기 위하여 inverse PCR 실시 후 얻은 전기영동 결과이다. PCR 산물 Lane 1, 2, 3, 4, 6번을 sequence한 결과 한우 ADSF 염기서열과 일치하는 부분이 존재하지 않았고, Lane 5번은 NCBI에 등록되어 있는 한우 ADSF와 일치하는 부분이 존재하였다. Figure1-16에서 보는바와 같이 염기서열을 보면 붉은색이 이미 NCBI에 등록되어 있는 한우 ADSF 염기서열부분이다. 그리고 나머지염기서열은 한우 ADSF의 promoter부분이라고 할 수 있다. upstream쪽으로

-654에서 -1까지 promoter부분이다. 이후 upstream 방향으로 더 탐색하여 -1.7kb까지 클로닝하였다.

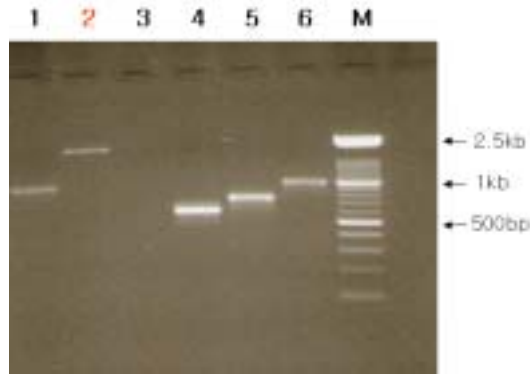


Figure 1-15. Inverse PCR 후 agarose 전기영동 결과

Lane 1- primer: ADSFint3F1, bADSF9, restriction enzyme: Sau3A1

Lane 2- primer: bADSF8, bADSF7, restriction enzyme: Taq1

Lane 3- primer: hADSF6, bADSF7, restriction enzyme: Sau3A1

Lane 4, 5- primer: ADSFint3F1, bADSF9, restriction enzyme: Sau3A1

Lane 6- primer: ADSFint3F1, bADSF9, restriction, enzyme: Taq1

```

GGGGAGAATACTTTTCATTTTTGGAGAATAAGTTTTCTGGGGGAAATGAGAAGGTCCAAAAG
ATACAGGGTTTGCAAGGGTTATTTGTGTGTATTTTCTAAGGGATAGGTTTGCCAAGGTGT
CTAAAAGAGAAAGTTTTTCGAATGAGTGTATAAACTAATTATCTGTTTTTGCGAGAGTTA
AATTATTTCTTTTTACTGGGAAAGGGGAATTTTTCTGGGAGGTTTCAGGGGTTTATAAT
TTCGTGACAGCGTAGGTTTTAGGTGAACGTGATGATGTCAAAGTGTTCAGTGACAACCT
TTCCCCTGTTTTTTGACCACTGTGTACTCAAAGGTGTTTATACTCGTTAAACAGTTGAA
AGCCTCGCAAGGTATGTCATTAACAGGTGGATCACCTGGGGAGTCCAGCATGCAGTTCTG
ACCCATGGACATGGCTCCAGTCACGTGTGTGTGCCCTCTCTCGGGTCCACATAAGTTGGT
TTCTCTATAAGCTGTTAAGTCTATGGTTATTTTACCAGGTACTATCTTCCGGACCAGCCC
CCAGCCTAGATGAGGGCAGGGAAGGCTCTGGAAGGCGGAGTTTGTGGCATTACTAGGTCC
CTGGACTTTACCCCGGGGGCTTCTCTTAGCCCCGGATGTGGAAGGGAGGCCAGGATG
CCAAGGGTCTTAGCCAAGACAGGAAGCTGTACAGCCGGCAGCCTTAAAAAGGGAGCGGAG
GCAGGGGGCGCAGAAATTAGTGTTCAAAATTTGGCCTGCTGAGTCCACAGAGAGG
    
```

Figure 1-16. Inverse PCR 에 의해 cloning된 한우 ADSF/resistin promoter

\*Red color- exon 1 sequences



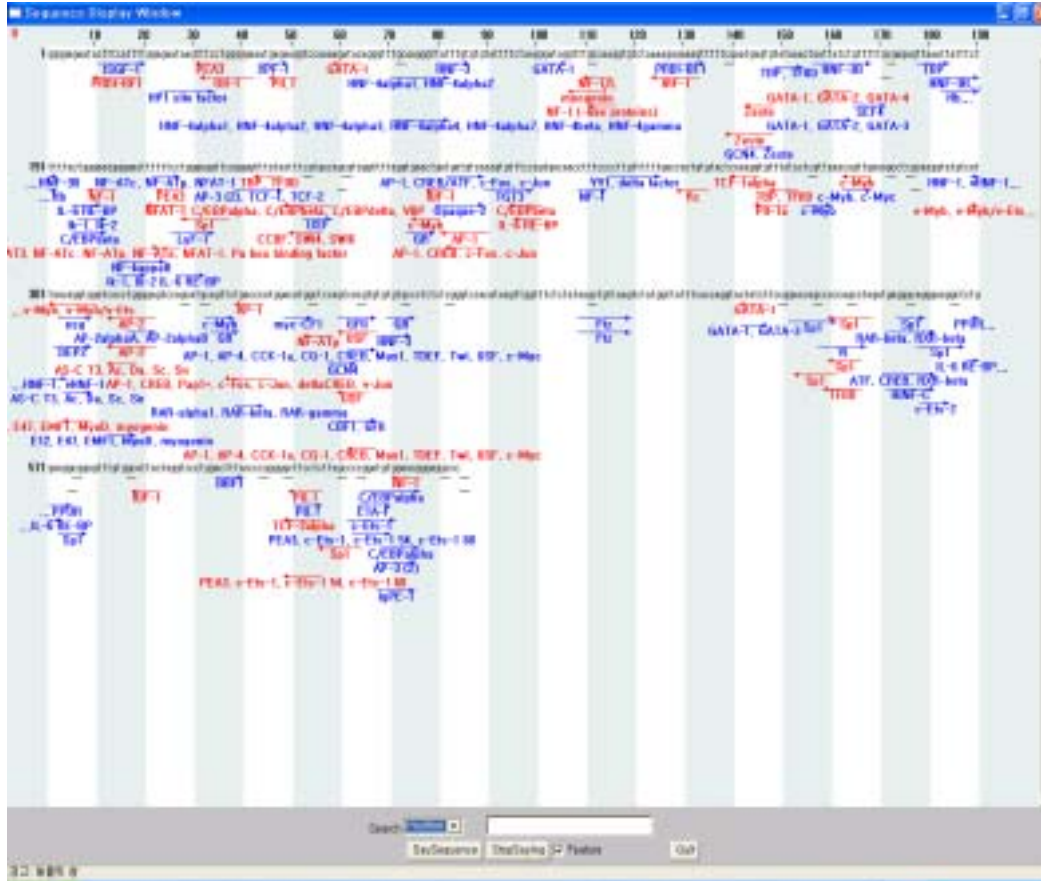


Figure 1-17. Putative binding sites of several transcription factors at the bovine ADSF/resistin promoter

Figure 1-17은 ADSF/resistin bovine promoter의 전사 조절부위를 검색하기 위하여 TESS: Transcription Element Search Software ([www.cbil.upenn.edu/tess](http://www.cbil.upenn.edu/tess))을 이용하여 분석하였다. 이 분석에 의하면 일반적으로 지방특이적 발현 유전자에서 볼 수 있는 transcription factor 인 C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  등이 작용할 수 있는 부위는 관측되었으나 PPAR $\gamma$ 의 binding site가 없는 것으로 보아 이 유전자를 절절히 조절하기 위해서는 본 과제에서 cloning된 부분만으로는 불충분 한 것으로 사료된다. 따라서 앞으로 promoter의 up-stream 부위에 PPAR $\gamma$  조절부위가 있는 곳까지 더 promoter search 가 필요할 것으로 사료되어 현재 이를 위한 실험을 진행 중이다.

```

-1745                                     AGCAT
-1740 CTGCCTGCTAATGCAGGTGACACAGGTTTGATCCCTGGTCGGGGAAGATCCCACATGCCA
-1680 TGGAGCAGTGAAGTCCATGTGCCGCAAGTACTGAAGCCCACGTGCCTAGAGCCCATGCTC
-1620 CACAAGAGAAGCCACTGCAATGAGAAGCCTACTCACCGCAACTGGAGAGTAGCCCCCGCT
-1560 CACCAAACTAGAGAAAGCCTGTGTGCAGCAACAAAGATCCAATGCAGCCAAAAAAAAAAA
-1500 AAAAAATTCCTTTGAAAAAAAAACATTTTTTTTAAAGGGGGAAACAACCTAACTGTCCATC
-1440 AACAAAGGGATGACACACAAAATCCAGGGGGTACATAAAATTGAATATTACCCTGAAAAA
-1380 GGAATGAGGTTTTGATCCATGCTACAACATGGATGAATGTTAAATGTTATGCTAGTGAA
-1320 ATAAGTCAGGCACAAAAGGGTAACTATCCTAGGATTCCACTTATTTGTGGTATAAATAGG
-1260 CAAATTCATAGGAACAGAAAGTAGATTAGAGGTTACCAGGGACTTCAGGAAGAGGAAGTG
-1200 GGAGTTAGTGTTTATGGGTAAGTCAAGTTTAGAATGATTAATAAAAAAAAAATGTGGAAATG
-1140 GACAGAGGTGATGATTACACAACACCGTGTGTGACTGAAATCAAGCCACACTCCCTTTAA
-1080 AGGCTCTGGGAAAGAATCAGTTCTGGAGTCTTCCAGCTTCTCGTGGCTGCTGGCATCCT
-1020 TTTGCTTTTGGCCACAACAGTCCCCTGTCTGCCCTCGGTGGTTGCTCCATCTTAGTGCCGA
-960 TGAACCGTACACTTGAAAATGGTACATTTTATGTTATGTGTGTTTACCACAGTATTTAA
-900 AAAATCCATGTTGGAAACAAAAACAAAACCAAAACAAATGTAAAAACCATTCTTAGCTCATG
-840 GGTTGTACAAAAATAGATGGTGGGCAAAGCTCCCTGGTGGTCCAGTGATTAAGAGTCCGA
-780 GCTTCCACTGCAGAGGGTACCGGTATTCCATCCCTGGTGGGGAAGTATGCCATACATGA
-720 TGCATGGTGTAGCCAAAAAGAAAAAGAAAGATGGTGGCTAGATCTAGCCCATGGGCCAT
-660 AGTTTGACAACCTCAGTTGTCCATTATCCTTTGAAGAAATAAATCATGGTTTTATTTC
-600 TATTGTGATAGGCATTTGGGAATGAACATGGCATGTAGTCTTTTTTTTAAAGATTTATT
-540 TGTCTATTGGCTGGGCTGGGTCTTCATTGCTGCACTAGGACTTCTCTAGTTGCAGTGAG
-480 GTGGGAGTTACTTCTAGTTGCAGTGCTTGGGCTTCTCATTAGAGTGGCTTCTCGTTGCG
-420 GAGCACAGGCTCTAAGTTCGAGGGCTCAGTATTGCAGAATGTGAGTCTGGGGTTGTGG
-360 CACACGGGCAGAGTTGCTTTGAGGCATGTGGGATCTTCCAGGACCAGCGATCGATCTGGT
-300 GTCTCCTGCATTGCAAGGCAGATCCTTAACAATGGACCACCAGGGAAGCCAGCATGCA
-240 GTTCTTACACAAGGACATGGCTCTGGTCAAGTGTGTGCCCCTCCACCGCTCCACATAA
-180 GCTGGTTTCTCTCTCTGCTCTTCTGACTATGGTATTCCACCAGGTAATCTTCCGGAC
-120 CAGCCCCAGCCTAGATGAGGGCAGGGAAGGCTCTGGAAGGCGGAGTCTGTGGCATTACT
-60  AGGTCCCTGGACTCTACCCCGGGGGCTTCTCTTAGCCCCGGATGTGGAAAGGGAGGCC
GATGCCAAGGGTCTTAGCCAAGACAGGAAGCTGTACAGCCGGCAGCCTTAAAAAGGGAG
CGGAGGCAGGGGCGCAGAATTAGTGTTCAAAATTTGGCCTGCTGAGTCCACAGAGAGG

```

Figure 1-18. Genomic DNA sequence of ADSF/resistin promoter in Korean Native Cattle. The nucleotide underlined are indicated exon 1.



Figure 1-19. Putative binding sites of several transcription factors at the bovine ADSF/resistin gene promoter.

The site of cis-acting elements are underlined with transcription factors. The tilted nucleotide letters on the bottom of the sequences are the exon 1 of ADSF/resistin.

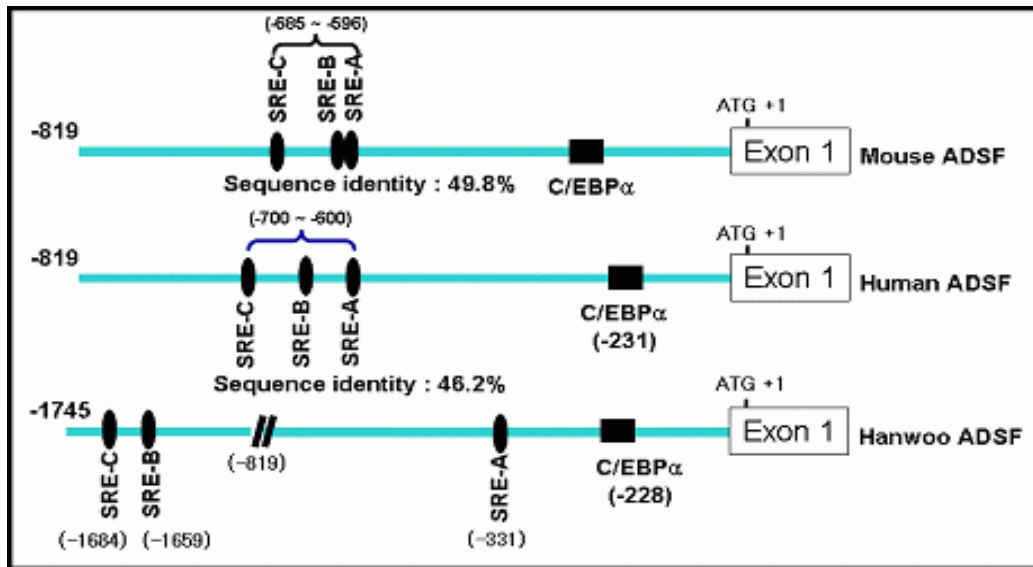




Figure 1-20. Schematic representation of the Hanwoo and human ADSF/resistin promoters. The putative SREs(black ellipses) and C/EBP $\alpha$ -binding site(black square) are indicated.(TESS:Transcription Element Search System)

Hereford	1	AGCATCTGCTGCTAATGCAAGTGACACAGGTTTATCCCTGGTCGGGA	50
Hanwoo	1	AGCATCTGCTGCTAATGCAAGTGACACAGGTTTATCCCTGGTCGGGA	50
Hereford	51	AGATCCACATGCCATGGAGCAGTGAAGTCCATGTCGCCAAGTACTGAA	100
Hanwoo	51	AGATCCACATGCCATGGAGCAGTGAAGTCCATGTCGCCAAGTACTGAA	100
Hereford	101	GCCACDGTGCCTAGAGCCCATGCTCCACAAGAGAAGCCACTGCAATGAGA	150
Hanwoo	101	GCCACDGTGCCTAGAGCCCATGCTCCACAAGAGAAGCCACTGCAATGAGA	150
Hereford	151	AGDCTACTCACCGCAACTGGAGAGTAGCCCCGCTCACCAAAACTAGAGA	200
Hanwoo	151	AGDCTACTCACCGCAACTGGAGAGTAGCCCCGCTCACCAAAACTAGAGA	200
Hereford	201	AAGCCTGTGTGCAGCAACAAGATCCCAATGCAGCC-AAAAAAAAAAAA	249
Hanwoo	201	AAGCCTGTGTGCAGCAACAAGATCCCAATGCAGCCAAAAAAAAAAAA	250
Hereford	250	ATTCAATTGAAAAGAAACATTTTTTTTAAAGGTGGAAACAACCTAACTGT	299
Hanwoo	251	ATTCTTTGAAAAAAAAACATTTTTTTTAAAGGGGAAACAACCTAACTGT	300
Hereford	300	CCATCAACAAATGGATGACACACAAATCCAGTGTGTACATAAAATTGAA	349
Hanwoo	301	CCATCAACAAAGGGATGACACACAAATCCAGGGGTACATAAAATTGAA	350
Hereford	350	TATTAGCCTGAAAAAGGAATGAGGTTTTGATCCATGCTACAACATGGATG	399
Hanwoo	351	TATTAGCCTGAAAAAGGAATGAGGTTTTGATCCATGCTACAACATGGATG	400
Hereford	400	AATGTTTTAAATGTTATGCTAGTGAAATAAGTCAGGCAAGAAAGGGTAACT	449
Hanwoo	401	AATGTTTTAAATGTTATGCTAGTGAAATAAGTCAGGCAAGAAAGGGTAACT	450
Hereford	450	ATCCTAGGATTCACCTTATTTGTGGTATAAATAGGCAAAATTCATAGGAAC	499
Hanwoo	451	ATCCTAGGATTCACCTTATTTGTGGTATAAATAGGCAAAATTCATAGGAAC	500
Hereford	500	AGAAAGTAGATTAGAGGTTACCAAGGACTTCAGGAAGAGGAAGTGGGAGT	549
Hanwoo	501	AGAAAGTAGATTAGAGGTTACCAAGGACTTCAGGAAGAGGAAGTGGGAGT	550
Hereford	550	TAGTGTTTTATGGGTAAAGTCAGTTCAGAAATGATTAAAAAAAAAATTGTGG	599
Hanwoo	551	TAGTGTTTTATGGGTAAAGTCAGTTCAGAAATGATTAAAAAAAAAATTGTGG	600
Hereford	600	AAATGGACAGAGGTGATGATTACACAACAACCGTGTGTGACTGAAATCAAG	649
Hanwoo	601	AAATGGACAGAGGTGATGATTACACAACAACCGTGTGTGACTGAAATCAAG	650
Hereford	650	CCACACTCCCTTTAAAGGCTCTGGGAAAGAAATCAGTTCTGGAGTCTCTCC	699
Hanwoo	651	CCACACTCCCTTTAAAGGCTCTGGGAAAGAAATCAGTTCTGGAGTCTCTCC	700
Hereford	700	AGCTTCTCGTGGCTGCTGGCATCCTTTTGTCTTTGGCCACAACAGTCCCG	749
Hanwoo	701	AGCTTCTCGTGGCTGCTGGCATCCTTTTGTCTTTGGCCACAACAGTCCCG	750
Hereford	750	TGTCTGCCTCGGTGGTTGCTCCATCTTAGTGCCGATGAACCGTACACTTG	799
Hanwoo	751	TGTCTGCCTCGGTGGTTGCTCCATCTTAGTGCCGATGAACCGTACACTTG	800

Figure 1-21. Comparison of the nucleotides between Hanwoo and Hereford ADSF/resistin promoters.

Hereford	800	AAAA TGGTACAT TTT ATGT AT GTGTGT TTT ACCACAGT ATTTAAAAAAT	849
Hanwoo	801	AAAA TGGTACAT TTT ATGT AT GTGTGT TTT ACCACAGT ATTTAAAAAAT	850
Hereford	850	CCATGTTGGAAAACAAAACAAACCAAAAACAATGTA AAAAACCATTCTTAGC	899
Hanwoo	851	CCATGTTGGAAAACAAAACAAACCAAAAACAATGTA AAAAACCATTCTTAGC	900
Hereford	900	TCATGGGTTGTACAAA AAT AGA TGGTGGGCAAA GCTCCCTGGTGGTCCAG	949
Hanwoo	901	TCATGGGTTGTACAAA AAT AGA TGGTGGGCAAA GCTCCCTGGTGGTCCAG	950
Hereford	950	TGATTAAGAGTCCGAGCTTCCA CTGCAGAGGGTACCGGTATTCCATCCCT	999
Hanwoo	951	TGATTAAGAGTCCGAGCTTCCA CTGCAGAGGGTACCGGTATTCCATCCCT	1000
Hereford	1000	GGT TGGGGA ACTA TGCCATACA TGA TGCATGGTGTAGDCAAAAAGAAAAA	1049
Hanwoo	1001	GGT TGGGGA ACTA TGCCATACA TGA TGCATGGTGTAGDCAAAAAGAAAAA	1050
Hereford	1050	GAAAGATGGTGGGCTAGATCTAGCCCATGGGCCATAGTTTGACAACTTCA	1099
Hanwoo	1051	GAAAGATGGTGGGCTAGATCTAGCCCATGGGCCATAGTTTGACAACTTCA	1100
Hereford	1100	GTTGTCCGTATTTCCTTTGAAGAAA TAAATCATGGT TTTATTTCTATTG	1149
Hanwoo	1101	GTTGTCCGTATTTCCTTTGAAGAAA TAAATCATGGT TTTATTTCTATTG	1150
Hereford	1150	TGATAGGCATTTGGGAATGAACATGGCA TGTAGT TCTTTT TTAAGAT	1199
Hanwoo	1151	TGATAGGCATTTGGGAATGAACATGGCA TGTAGT TCTTTT TTAAGAT	1200
Hereford	1200	TTATTTGTCTATTGGCTGGGCTGGGTCTTCATTGCTGCACTAGGACTTTC	1249
Hanwoo	1201	TTATTTGTCTATTGGCTGGGCTGGGTCTTCATTGCTGCACTAGGACTTTC	1250
Hereford	1250	TCTAGTTGCAGT GAGGTGGGAGTTACTTCTAGT TGCAGT GCTTGGGCTT	1299
Hanwoo	1251	TCTAGTTGCAGT GAGGTGGGAGTTACTTCTAGT TGCAGT GCTTGGGCTT	1300
Hereford	1300	CTCATTAGAGTGGCTTCTCGT TGGGAGCA CAGGCTCTAAGTTCGAGGGC	1349
Hanwoo	1301	CTCATTAGAGTGGCTTCTCGT TGGGAGCA CAGGCTCTAAGTTCGAGGGC	1350
Hereford	1350	TCAGTATTTGCAGAA TGTGAGT TCTGGGTTGTGGCACA CGGGCA GAGTT	1399
Hanwoo	1351	TCAGTATTTGCAGAA TGTGAGT TCTGGGTTGTGGCACA CGGGCA GAGTT	1400
Hereford	1400	GCTTTGAGGCATGTGGGATCTTCCA GGA CCA GCGATCGA TCTGGTGTCTC	1449
Hanwoo	1401	GCTTTGAGGCATGTGGGATCTTCCA GGA CCA GCGATCGA TCTGGTGTCTC	1450
Hereford	1450	CTGCATTGCAAGGCAGATCCTTAA CAAT TGGACCACCAGGGAAGGCCAGC	1499
Hanwoo	1451	CTGCATTGCAAGGCAGATCCTTAA CAAT TGGACCACCAGGGAAGGCCAGC	1500
Hereford	1500	ATGCAGT TCTTACACAAGGACA TGGCTCTGGTCA CBTGTGTGTGCCCTCC	1549
Hanwoo	1501	ATGCAGT TCTTACACAAGGACA TGGCTCTGGTCA CBTGTGTGTGCCCTCC	1550
Hereford	1550	CACCGCTCCACATAAGCTGGT TCTCTCTCTGCTCTTCTGACTATGGTTA	1599
Hanwoo	1551	CACCGCTCCACATAAGCTGGT TCTCTCTCTGCTCTTCTGACTATGGTTA	1600
Hereford	1600	TTCCACCAGGTA CTATCTTCCGGA CCA GDCGCCAGCCTAGATGAGGGCAG	1649
Hanwoo	1601	TTCCACCAGGTA CTATCTTCCGGA CCA GDCGCCAGCCTAGATGAGGGCAG	1650
Hereford	1650	GGAAAGGCTCTGGAAGGCGGAGTCTGTGGCATTA CTAGGTCCCTGGA CTCT	1699
Hanwoo	1651	GGAAAGGCTCTGGAAGGCGGAGTCTGTGGCATTA CTAGGTCCCTGGA CTCT	1700
Hereford	1700	ACCCCGGGGGCTTCTCTTAGCCCCGA TGTGGAAA GGGAGGCCCAAGAT	1749
Hanwoo	1701	ACCCCGGGGGCTTCTCTTAGCCCCGA TGTGGAAA GGGAGGCCCAAGAT	1745

Figure 1-21. Comparison of the nucleotides between Hanwoo and Hereford ADSF/resistin promoters(continued).



[My NCBI](#)  
[\[Sign In\]](#)  
[\[Register\]](#)

[PubMed](#) [Molecule](#) [Protein](#) [Genome](#) [Structure](#) [PMC](#) [Taxonomy](#) [OMM](#) [Books](#)

Search  for

[Limits](#) [Preview/Index](#) [History](#) [Clipboard](#) [Details](#)

Display  Show

Range: from  to   Reverse complemented strand Features:

[1: AY618903](#), [Reports](#) [Bos taurus resist...](#) [gi:109138555] [Links](#)

[Comment](#) [Features](#) [Sequence](#)

**LOCUS** AY618903 3017 bp DNA linear MAM 15-JUN-2006  
**DEFINITION** Bos taurus resistin (RETN) gene, complete cds.  
**ACCESSION** AY618903  
**VERSION** AY618903.3 GI:109138555  
**KEYWORDS** .  
**SOURCE** Bos taurus (cattle)  
**ORGANISM** [Bos taurus](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia;  
 Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 3017)  
**AUTHORS** Kang,H.K., Park,J.A., Seo,K.S., Kim,S.H., Choi,Y.J. and Moon,Y.S.  
**TITLE** Characteristics of structure and expression pattern of ADSP/resistin gene in Korean native cattle  
**JOURNAL** Asian-australas. J. Anim. Sci. 19, 329-334 (2006)

**REFERENCE** 2 (bases 1 to 3017)  
**AUTHORS** Moon,Y.S., Park,J.A. and Kang,H.K.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (06-MAY-2004) Animal Sciences & Biotechnology, Jinju National University, 150 Chilam-dong, Jinju, Kyungnam 660-758, Korea

**REFERENCE** 3 (bases 1 to 3017)  
**AUTHORS** Moon,Y.S., Park,J.A. and Kang,H.K.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (18-MAY-2006) Animal Sciences & Biotechnology, Jinju National University, 150 Chilam-dong, Jinju, Kyungnam 660-758, Korea

**REMARK** Sequence update by submitter

**REFERENCE** 4 (bases 1 to 3017)  
**AUTHORS** Kang,H.K., Park,J.A. and Moon,Y.S.  
**TITLE** Direct Submission  
**JOURNAL** Submitted (15-JUN-2006) Animal Sciences & Biotechnology, Jinju National University, 150 Chilam-dong, Jinju, Kyungnam 660-758, Korea

**REMARK** Sequence update by submitter

COMMENT On Jun 15, 2006 this sequence version replaced gi:[98975573](#).

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..3017 /organism="Bos taurus" /mol_type="genomic DNA" /db_xref="taxon: <a href="#">9913</a> " /note="breed: Hanwoo"
gene	1746..>3017 /gene="RETN"
mRNA	join(1746..1864,2028..2155,2507..2584,2884..>3017) /gene="RETN" /product="resistin"
5'UTR	join(1746..1864,2028..2037) /gene="RETN"
mRNA	join(<2038..2155,2507..2584,2884..>3017) /gene="RETN" /product="resistin"
CDS	join(2038..2155,2507..2584,2884..3017) /gene="RETN" /note="adipocyte specific secreted hormone; ADSF; Fizz3" /codon_start=1 /product="resistin" /protein_id="AA740142.2" /db_xref="GI:98975574" /translation="MKALSFLFIPVLGLLVCGQSLCPIDKAISEKIQEVTTSLVPGAVRIIGLDCRSVTSRGS�VTCPSGFAVTGCTCGSACGSWDVRAETTCHOQCAGMDNTGARCCRLHIQ"

ORIGIN

```

1 agcatctgcc tgctaattgca ggtgacacag gtttgatccc tggctggggga agatcccaca
61 tgccatggag cagtgaaagtc catgtgcccgc aagtactgaa gcccaactgc ctagagccca
121 tgctccacaa gagaagccac tgcaatgaga agcctactca ccgcaactgg agagtagccc
181 ccgctcaccia aaactagaga aagcctgtgt gcagcaacaa agatccaatg cagccaaaaa
241 aaaaaaaaaa attctttgaa aaaaaacatt ttttttaaaa gggggaaaca acctaaactgt
301 ccatcaacaa agggatgaca cacaaaatcc agggggtaca taaaattgaa tattaccctg
361 aaaaaggaat gaggttttga tccatgctac aacatgggatg aatgtttaaa tgttatgcta
421 gtgaaataag tcaggcacia aagggtaact atcctaggat tccacttatt tgtgttataa
481 ataggcaaat tcataggaac agaaaagtaga ttagagggtta ccagggactt caggaagagg
541 aagtgggagt tagtgtttat gggtaaagtc agtttagaat gattaaaaaa aaaattgtgg
601 aaatggacag aggtgatgat tacacaacac cgtgtgtgac tgaatcaag ccacactccc
661 tttaaaggct ctgggaaaga atcagttctg gagttcttcc agettctcgt ggctgctggc
721 atccttttgc ttttggccac aacagtcccg tgtctgctc ggtgggtgct ccatcttagt
781 gccgatgaac cgtacacttg aaaatggtag attttatggt atgtgtggtt taccacagta
841 tttaaaaaat ccatgttggg aacaaaaaca aacaaaaaca atgtaaaaac cattottagc
901 tcatgggttg tacaaaaata gatgggtgggc aaagtcctct ggtggtccag tgattaagag
961 tccgagcttc caetgcagag ggtacoggtg tccatccct ggttggggaa ctatgccata
1021 catgatgcat ggtgtagcca aaaagaaaaa gaaagatggt gggotagatc tagcccatgg
1081 gccatagttt gacaacttca gttgtccatt attcctttga agaaataaat catggtttta
1141 tttctatttg tgataggcat ttgggaatga acatggcatg tagttctttt ttttaaagat

```



```

1201 ttatttgtct attggetggg ctgggtcttc attgetgca taggaetttc tctagttgca
1261 gtgaggtggg agttactttc tagttgcagt gcttgggett ctcattagag tggettctcg
1321 ttgcggagca caggetctaa gttegagggc tcagtatttg cagaatgtga gttctggggg
1381 tgtggcacac gggcagagtt gctttgagge atgtgggatc ttcaggacc agcgatcgat
1441 ctgggtgtct ctgcattgca aggcagatcc ttaacaattg gaccaccagg gaagcccage
1501 atgcagttct tacacaagga catggetctg gtcacgtgtg tgtgeectec cacegetcca
1561 cataagctgg tttctctctc tgetctctcg actatggtta ttcaccagg tactatcttc
1621 eggaccagcc cccagcctag atgagggcag ggaaggetct ggaaggcga gtctgtggca
1681 ttaactagtc cctggactct acccggggg ctctctctta gccccggatg tggaaagggg
1741 ggcccgatgc caaggtgtct tagccaagac aggaagetgt acagcctggc agccttaaaa
1801 agggagcggg ggcaggggcg cagaattagt gttcaaaatt tggcctgctg agtccacaga
1861 gagggttaagt gacagetgct cctgectgta ggggcaaagc tgggtctcca gcccactct
1921 cagttgggac ccacagetcc caattecaca tgctctgtgg gtctgagctt ccccaggatg
1981 gggaggggta gaccagctg ggggtttctt ggttttttt cttgcagcac ctgcaggatg
2041 aaggetctct ccttctctt cateccagtc ctggggctgc tgggtgtgtg ccagtcctg
2101 tgccccatag ataaagccat cagtgagaag atccaggagg tcaccacctc cctaggtgag
2161 aaccctccca tccaacctca gccaggccct caggggcctc tctgattctt gacatggagc
2221 gaacatcagg ccagcccca ccccaacca atctcaacc caaacccaac ccaacgcca
2281 tctccactgg tttccacctc taactacagc tcaaaacct cctccctca aacgcccac
2341 tcaggacaga atccttgag gtggggagt cccacctac tgggccttc ccagggggt
2401 tttcttgacc ctctgccc atccaaaacca ccagggccta ggcagcatga gaagggggtt
2461 ggggcagctt ggtctcacag ttactttgca tcacccttc ccgcagtcc tggggcagta
2521 aggatcattg gcctggactg ccggagtgtc acctctaggg ggtccctggt caactgccc
2581 tcaggtaggt acagaactcc gttgtccagt ctcccggctc tattctcagc accccatacc
2641 ccctccact gtgttttagt tccattctc tagaaccac gagtcccagc ctetaatcc
2701 ttaatatcct ggtctgca ctcccgcctg tccctcccc caactcccag gcccatttc
2761 ctcaggacac tgggtgtccag gcccacagca tccctgccac ccacgetgcc agcccctgg
2821 aagcccaaac tcaaagcttc tggetcgggg tccaaaget ctctctctt ctecccctg
2881 caggtctcgc cgtcactggc tgcacgtgtg gctccgctg tggctcgtg gacgtaactg
2941 ctgagaccac gtgccactgc cagtgcgcag gcatggactg gactggagct cgtctctg
3001 gctgcatat ccagtag

```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#) | [NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

Figure 1-22. An update with Hanwoo ADSF/resistin gene promoter region to our previous record in AY618903 in GenBank.

10) 한우 조직별 ADSF/resistin 발현 양상

ADSF/resistin은 지방조직에서 특이적으로 분비되는 물질로 알려져 있으며 비만과 제 2형 당뇨병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Steppan, 2001). ADSF/resistin은 지방조직에서 특이적으로 분비된다고 알려져 있었으나 몇몇 연구자들에 의해 마우스

의 뇌와 뇌하수체에서도 발현 된다고 보고된바 있다(Morash 등, 2002). 랫드에서는 WAT와 BAT에서 발현이 가장 높고 다른 조직인 위, 회장, 결장 등에서도 발현된다고 보고하였다(Nogueiras 등, 2003).

한우의 여러 조직에서 어떠한 발현 양상이 나타나는지를 알아보기 위해 간, 근육(우둔, 등심), 지방(피하지방, 신장지방)에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. Figure1-23은 PCR을 실시한 결과로 그림에서 보는바와 같이 지방조직인 lane 2, 3번에서 ADSF/resistin이 특이적으로 발현되며 간과 근육에서는 전혀 발현되지 않는다는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과들은 랫드에서의 조직별 ADSF/resistin 발현 양상과 유사하나(Oliver 등, 2003) 본 실험에서는 지방전구세포(pre-adipocyte)를 이용한 발현 실험을 하지 못하였으므로 랫드에서의 발현 양상과 같다고는 결론 내릴 수 없다. 이러한 실험 결과로 보아 한우 ADSF/resistin은 지방조직에서 특이적으로 발현된다는 것을 확인할 수 있다. 하지만 조직의 다양성이 부족하기 때문에 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

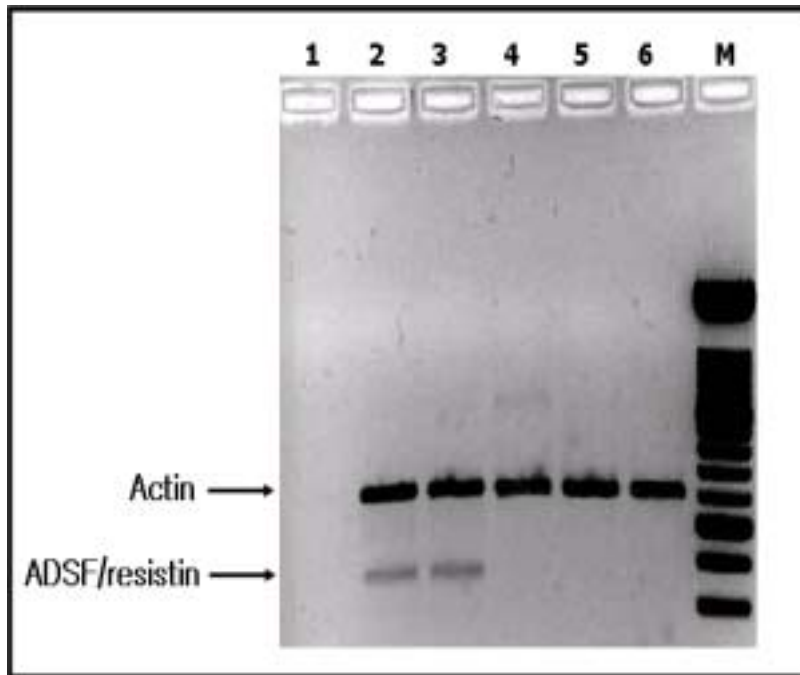


Figure 1-23. Tissue specific gene expression of ADSF/resistin by RT-PCR in Korean Native Cattle.

The PCR products(330bp) of RT-PCR for Hanwoo ADSF/resistin.

Lane 1: Negative control, Lane 2:

Subcutaneous fat, Lane 3: Perirenal fat, Lane 4: Rump, Lane 5: Sirloin, Lane 6: Liver, M: 100bp DNA Marker.

A 594bp fragment of bovine actin is used as an internal control.

#### 11) DNA polymorphism 탐색

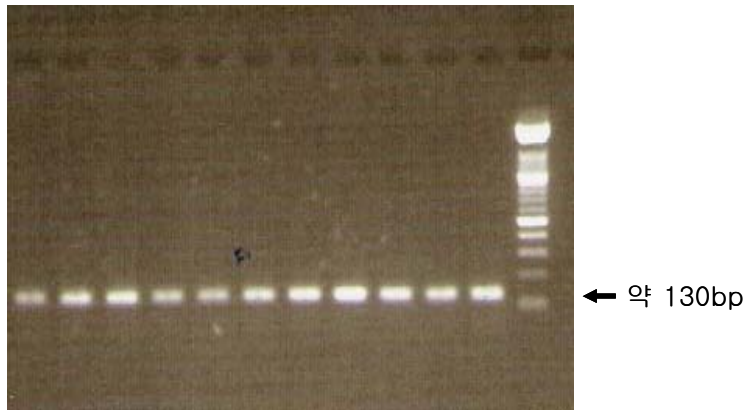
DNA의 다형현상을 탐색하기 위하여 축산연구소 35차 후대김정우 146두를 확보 하였으며 이들 중 혈액으로부터 genomic DNA를 추출한 것은 128두였다. 약 30여두로부터 exon부위를 PCR을 이용하여 증폭한 후 염기서열을 분석하여 polymorphism을 검색하였으나 이들 모두 정상적인 염기서열을 보유하고 있었다. 그러나 이들의 intron 2와 intron 3부위에서 DNA polymorphism이 있음을 확인한 후 나머지 개체들은 새로이 제작된 intron 증폭 primer를 이용하여 PCR을 실시하였으며 이들의 염기서열 분

석을 실시하였다. 일차적으로 genomic DNA가 확보된 모든 개체에 대하여 intron 3부위를 35차 후대 검정우를 중심으로 탐색하였으며 intron 2부위와 일부 intron3의 5' 부위는 26차 후대검정우를 대상으로 분석하였다. ADSF full sequence와 Intron 2, 3에서 확보된 DNA polymorphism 결과는 아래 Figure 1-24, 26, 27과 표 1-1, 1-2와 같다. 확보된 ADSF/resisti 유전자의 promoter 영역을 대상으로 DNA polymorphism을 탐색하였다. 대상 시료는 35차와 36차 후대검정우 약 180여 두를 대상으로 염기서열 분석을 실시하였다. 그러나 기대하였던 promoter 영역내에서 특이적 SNP를 발견하지 못하였다. 한우 ADSF/resistin의 promoter는 개체간에 DNA 염기서열이 잘 보존되어 있는 것으로 밝혀졌다.



Figure 1-24. ADSF/resistin Full Sequence 중 DNA polymorphism 확인부위  
 \*Red & underline = Exon ; Green= Intron DNA polymorphism확인 부위

### Intron 2



### Intron 3

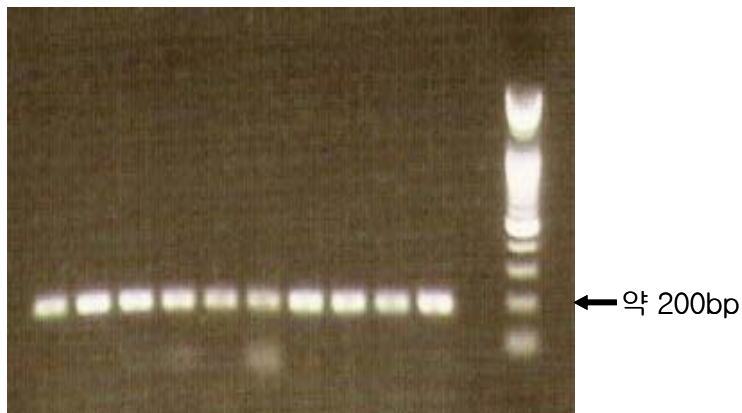


Figure 1-25. DNA polymorphism 탐색을 위한 Intron 2, Intron 3에서 PCR증폭 PCR에 의해 증폭된 intron2(130 bp), intron3(200 bp)을 화살표로 나타내었다.

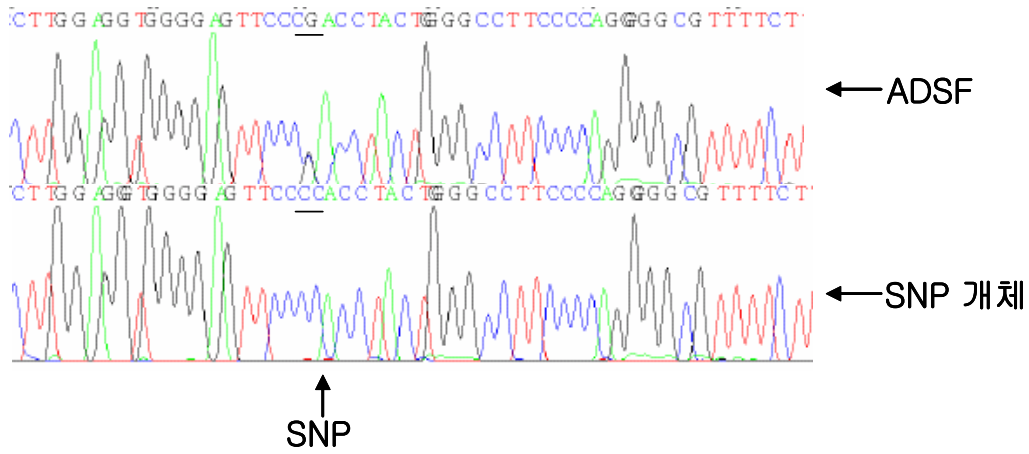
Intron2 Primer ; ADSF int2F(CCA CCT CTA ACT ACA GCT CAA)

ADSF int2R(TTG GAG ATG GGC AGA GGG TCA AG)

Intron3 Primer ; ADSF int3F1( TTC AGG TAG GTA CAG AAC TCC G)

ADSF int3R2( GCA ACC AGT GTC CTG AGG AAA TG)

### Intron 2



### Intron 3

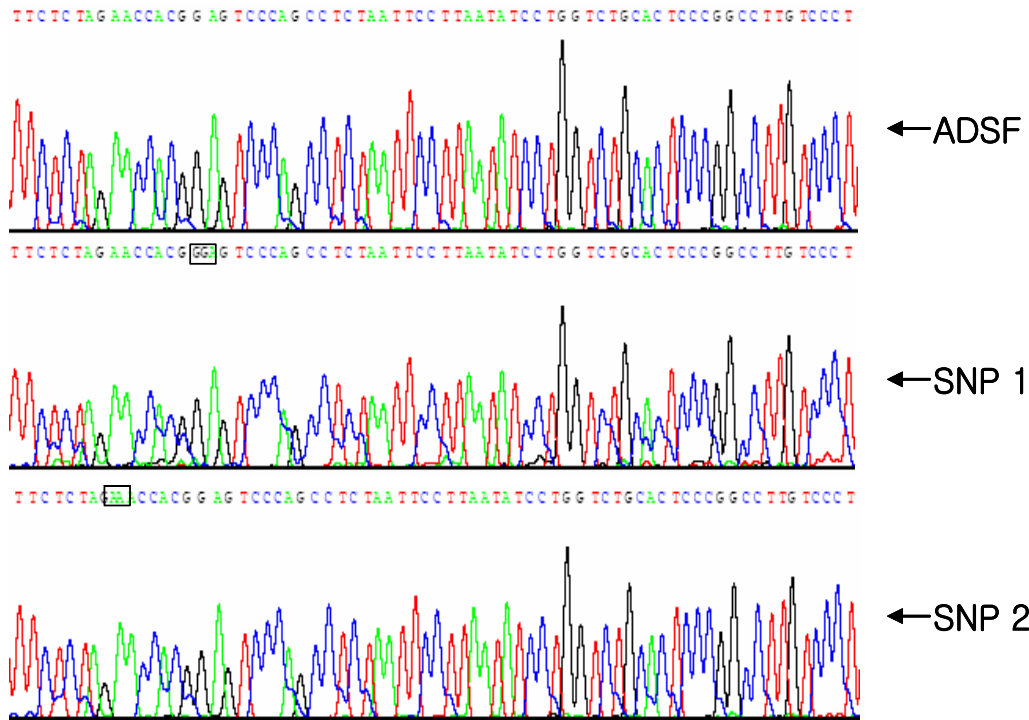


Figure 1-26. DNA 염기서열 분석에 의해 나타난 intron2 혹은 intron3 DNA polymorphism 의 예

SNP 부분을 line 혹은 box로 표시하였음.



Figure 1-27. Identification of DNA polymorphism in Hanwoo ADSF/resistin gene. Representative novel single nucleotide polymorphisms (SNP) are marked by arrows.

표1-1. 후대검정우(36차)의 ADSF/resistin 유전자의 intron2-3 부위의 SNP 분석 결과

변이부위	개체수	개체번호
621G ins	1	101
623A ins	1	73
C641G	1	116
641G ins	7	39.42.51.60.116.122.123
647G ins	5	39.42.46.51.53
649A ins	16	52.54.60.80.98.101.107.116.119.122.123.125.132.138.141.143
652G del	5	39.42.46.51.53
658T ins	1	107
660G ins	1	116
G849A	10	33.41.59.64.69.74.88.100.101.143,
1063A ins	1	109
1066T ins	1	109
C1099T	6	51.56.62.109.128.142
1179C del	1	10
1179AA ins	1	10
C1202A	1	148
1222T ins	1	10
A1224T	1	109
G1225A	1	148

표1-2. 중복음성 대상농장 한우의 ADSF/resistin 유전자 SNP분석 결과

변이	개체수	개체번호
G696A	6	1,29,35,43,49,57
G722A	2	29,49
G849A	10	4,21,25,27,29,33,34,39,50,53
C1179A	2	48,49
C1212A	1	39
G1225A	1	39

\*총57개체에서 혈액을 채취하고 그 중 genomic DNA추출 후 44개체로부터 PCR이 정상적으로 이루어진 후 DNA염기서열 분석을 통하여 SNP를 탐색하였다.

표1-3. 후대검정우(35차)의 ADSF/resistin 유전자의 intron2-3 부위의 SNP 분석 결과(58개체)

변이부위	개체수	개체번호
G849A	9	11.14.16.17.42.47.62.80.85

\*위의 SNP 분석은 36차SNP와 대상농장의 결과를 토대로 SNP G849A위만을 정리한 것임.

## 2. ADSF/resistin 유전자 발현양상과 한우경제형질 간의 연관관계 분석

### 가. 연구 방법

#### 1) 한우 조직의 확보

mRNA 혹은 genomic DNA를 확보할 목적으로 도살 혹은 biopsy로 확보한 조직은 부위별로 나누어 액체질소에서 급냉 후 -80C에서 분석 시 까지 보관하였다.

#### 2) 한우 후대검정우 시료 채취 및 유전능력 평가

한우 후대검정우와 대상 농장의 한우로부터 혈액을 채취하고 이로부터 DNA를 분리하였다. 또한 검정성적을 이용하여 유전능력평가를 실시하고 각 개체별 육중가를 추정하였다.



### 3) 시험축의 초음파 생체육질 측정

pie-200 기종을 이용하여 시험축 보정 후 측정부위에 오일 도포 후 최후 늑골부위에서 초음파 측정하며, 동일축에 대하여 2회를 측정하고 측정된 화상은 영상으로 저장하여 실험실에서 관련 프로그램을 이용하여 분석을 실시하였다.

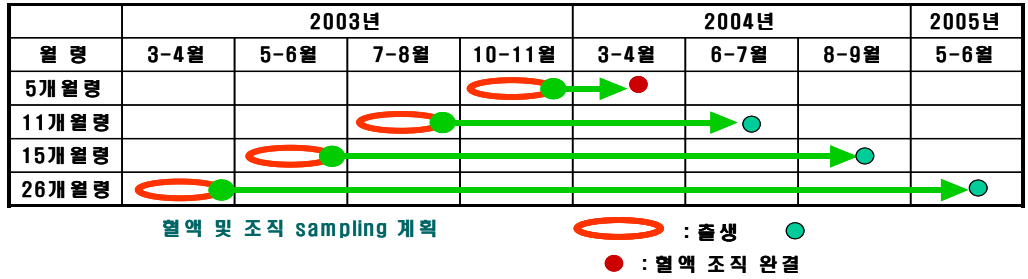
### 4) 경제형질과의 연관분석

주요 경제형질에 대하여 Animal Model을 이용하여 육중가를 산출하고 표현형가 및 육중가와 ADSF /resistin 간의 SAS 8.2 package를 이용하여 표현형 상관을 추정. 육중가는 MTDFREML Package를 이용하며 ADSF /resistin의 효과 추정은 SAS 8.12 - GLM procedure를 이용 분석을 실시하였다.

## 나. 연구 결과

### 1) 시험설계 및 혈통 등록

시험에 이용된 한우들을 보다 계획적으로 생산하기 위하여 Fig2-1과 같이 교배계획을 수립하고 육질과 육량에서 능력이 구별되는 KPN 369, 487, 348, 480, 330, 336, 448, 458, 387, 388번의 정액을 농협 가축개량사업소로부터 확보하여 가임 암소에 계획 교배를 실시하였다(Fig2-1). 또한 효율적인 시험축 관리를 위하여 총 236두의 보유축에 대한 혈통을 조사하여 축산연구소에서 개발한 한우관리 프로그램에 모두 전산 등록하였다(Fig 2-2).



- 05개월령 : 03년 09-10월 출생 10두 → 04년 3-4월 샘플링 완료
- 10-12개월령 : 03년 07-08월 출생 10두 → 04년 6-7월 샘플링
- 15-16개월령 : 03년 05-06월 출생 10두 → 04년 8-9월 샘플링
- 24-26개월령 : 03년 03-04월 출생 10두 → 05년 5-6월(도축) 샘플링
- 대상목장(음성) 협조 현황 (현재 총 40 두 확보)

Fig 2-1. 시험축에 대한 교배 계획

종가	수				암				합계			
	성	육	자	계	성	육	자	계	성	육	자	계
대상농장	1	0	22	23	1	0	212	213	2	0	234	236



Fig 2-2. 시험축에 대한 전산 입력

표2-1 빈우별 계획교배 결과 및 송아지 출생현황

번호	종빈우이표	종모우이표	교배일	예정분만일	성별	비고
1	136	KPN-289	2003-10-3	2004-7-14	♀	07월 15일
2	90	KPN-289	2003-10-4	2004-7-15	♂	07월 23일
3	31	KPN-289	2003-10-6	2004-1-17	♂	07월 30일
4	122	KPN-289	2003-10-7	2004-7-18		1월 23일 재교배
5	65	KPN-289	2003-10-7	2004-7-18		연속재발비육
6	175	KPN-289	2003-10-8	2004-7-19	♀	08월 03일
7	174	KPN-289	2003-10-8	2004-7-19		4월 21일 재교배
8	125	KPN-289	2003-10-8	2004-7-19		5월 04일 재교배
9	183	KPN-289	2003-10-9	2004-7-20	♂	08월 14일 A
10	144	KPN-289	2003-10-9	2004-7-20	♂	07월 19일
11	170	KPN-448	2003-10-17	2004-7-28		02월 20일 재교배
12	186	KPN-448	2003-10-18	2004-7-29	♀	07월 30일
13	100	KPN-448	2003-10-20	2004-7-31		11월 21일 재교배
14	151	KPN-448	2003-10-20	2004-7-31	♂	08월 14일 B
15	22	KPN-448	2003-10-21	2004-8-1	♀	
16	135	KPN-448	2003-10-21	2004-8-1	♂	08월 02일
17	19	KPN-448	2003-10-21	2004-8-1		04월 03일 재교배
18	171	KPN-448	2003-10-21	2004-8-1		12월 04일 재교배
19	130	KPN-448	2003-10-24	2004-8-4	♂	08월 18일 A
20	33	KPN-448	2003-10-24	2004-8-4		12월 07일 재교배
21	29	KPN-348	2003-10-27	2004-8-7		11월 5일 재교배
22	120	KPN-348	2003-10-27	2004-8-7		11월 24일 재교배
23	22	KPN-348	2003-10-27	2004-8-7	♀	08월 30일
24	24	KPN-348	2003-10-28	2004-8-8	♂	08월 30일
25	107	KPN-348	2003-10-29	2004-08-09	♂	08월 18일 B
26	124	KPN-348	2003-10-29	2004-08-09	♂	09월 02일
27	11	KPN-348	2003-10-30	2004-08-10	♂	09월 6일 A
28	6	KPN-348	2003-10-30	2004-08-10	♂	08월 25일
29	122	KPN-348	2003-10-31	2004-08-11		01월 25일 재교배
30	44	KPN-348	2003-10-31	2004-08-11	♂	09월 06일 B
31	153	KPN-393	2003-11-04	2004-08-15	♂	09월 02일
32	68	KPN-393	2003-11-05	2004-08-16		7월 02일 재교배
33	29	KPN-393	2003-11-05	2004-08-16		연속재발비육
34	35	KPN-393	2003-11-12	2004-08-23		12월 08일 재교배
35	46	KPN-334	2003-11-14	2004-08-25	♀	09월 14일
36	187	KPN-369	2003-11-15	2004-08-26		1월 30일 재교배
37	149	KPN-369	2003-11-15	2004-08-26	♂	9월 20일
38	125	KPN-369	2003-11-16	2004-08-27		1월 17일
39	011-999	KPN-369	2003-11-16	2004-08-27		12월 08일 재교배
40	152	KPN-354	2003-11-20	2004-08-31	♀	09월 14일

표2-1.계속

번호	종빈우 이표	종모우이표	교배일	예정분만일	성별	비고
41	1	KPN-354	2003-11-22	2004-09-02	♂	09월 06일
42	100	KPN-354	2003-11-21	2004-09-01		04월 06일 재교배
43	94	KPN-354	2003-11-23	2004-09-03		01월 04일 재교배
44	14	KPN-354	2003-11-23	2004-09-03	♂	09월 29일
45	120	KPN-273	2003-11-28	2004-09-08		01월 27일 재교배
46	171	KPN-273	2003-12-04	2004-09-14	♀	10월 05일
47	33	KPN-273	2003-12-07	2004-09-17		04월 21일 재교배
48	35	KPN-273	2003-12-08	2004-09-18		01월 5일 재교배
49	156	KPN-273	2003-12-09	2004-09-19	♀	10월 20일
50	무표	KPN-273	2003-12-11	2004-09-21	♀	10월 25일
51	73	KPN-334	2003-12-19	2004-09-29		04월 03일 재교배
52	7	KPN-334	2003-12-19	2004-09-29		재발비육
53	47	KPN-334	2003-12-21	2004-10-01		
54	77	KPN-354	2003-12-22	2004-10-02	♂	10월 11일
55	15	KPN-354	2003-12-23	2004-10-03		
56	110	KPN-354	2003-12-23	2004-10-03	♂	10월 11일
57	117	KPN-354	2003-12-24	2004-10-04	♂	10월 16일
58	50	KPN-354	2003-12-26	2004-10-06	♂	10월 31일
59	147	KPN-334	2003-12-27	2004-10-07	♂	10월 31일
60	71	KPN-334	2003-12-30	2004-10-10		04월 06일
61	94	KPN-273	2004-01-04	2004-10-15		02월 14일
62	무표	KPN-273	2004-01-05	2004-10-16		
63	35	KPN-393	2004-01-05	2004-10-16		
64	39	KPN-334	2004-01-05	2004-10-16		
65	89	KPN-334	2004-01-06	2004-10-17		분만우폐사
66	59	KPN-369	2004-01-16	2004-10-27		
67	132	KPN-393	2004-01-17	2004-10-28	♀	11월 05일
68	125	KPN-369	2004-01-17	2004-10-28		04월 12일
69	42	KPN-369	2004-01-17	2004-10-28		03월 29일
70	137	KPN-393	2004-01-22	2004-11-02		05월 04일

## 2) 초음파 측정 및 시료 채취

유전자 분석에 필요한 sample 채취하기 위하여 경동맥으로부터 혈액을 채취하고 biopsy 방법으로 지방을 채취하였다(Fig2-3). 채혈은 계획교배에 이용된 암소 29두와 계획 교배결과 태어난 자우 27두등 총 56두에 대하여 모두 실시하였으나 Biopsy는 폐사의 위험성으로 이하에 18개월 이상의 성우에 대해서만 실시하였다. biopsy 결과 개체 1두로부터 약 1.5g의 조직 시료를 생체에서 채취할 수 있었으며 채취된 시료는 액체 질소를 이용하여 급속 냉동한 후 냉동 보관하였다. 채혈된 혈액은 EDTA처리된 튜브에 담아 냉장 보관하였으며 모든 샘플은 제1세부과제 연구팀에 공유되었다.



### 실험 내용

- ◆ 대상: 570Kg 거세 한우
- ◆ 목적
  - 채취량 확인
  - 부위 선택
  - 피하 포함/비포함시의 효율성  
검정 및 상처 치료 효과 확인
- ◆ Sampling
  - 피하 비포함: 1.47 g
  - 피하 포함 : 0.92 g  
(지방 제외)
- ◆ 저장
  - 액체 질소로 급속 냉동 후
  - -80℃ 냉동 보관

Fig 2-3. Biopsy 수행 방법

시험축에 대한 경제 능력 조사를 위하여 초음파 육질진단 및 체중 측정을 실시하였다. 초음파 생체 육질 판정은 pie 200기종을 이용하여 등급판정 부위인 마지막 흉추와 제1요추 사이를 식용유로 도포한 후 측정하였으며 그림2-4와 같이 얻어진 화상을 표준 초음파 육질 등급 화상을 이용하여 육질 등급을 추정하였다. 등지방 두께와 배최장근 단면적은 화상 판독 프로그램을 이용하여 육안으로 경계선을 그리고 이를 이용하여 추정하였다. 초음파 육질 측정을 실시하면서 동시에 체중 측정도 실시하였다.

체중 측정은 우형기를 이용하여 절식 체중을 측정하였다.

표2-2. 초음파 육질진단 및 체중 측정

번호	관리번호	생체중	추정 도체중	등지방 두께	배최장근 단면적	육량 지수	육량 등급	근내 지방도	육질 등급	추정 등급
1	030305	700	406	15.9	92.8	63.78	B	71	1+	1+B
2	030306b	676	392.1	17	88.7	62.88	B	82	1++	1++B
3	030310	700	406	9.6	89.4	67.27	B	32	2	2B
4	030319	659	382.2	16.7	90.2	63.55	B	61	1+	1+B
5	030322	685	397.3	10	86.4	66.85	B	22	2	2B
6	030325	636	368.9	9.3	73.9	66.38	B	41	1	1B
7	030410	626	363.1	10	86.9	67.74	A	32	2	2A
8	030411a	650	377	11.9	82.7	65.71	B	53	1	1B
9	030411b	635	368.3	13.3	80.9	64.76	B	43	1	1B
10	030415	600	348	9.6	76.8	67.03	B	33	2	2B
11	030418	627	363.7	11.5	90	67.2	B	41	1	1B
12	030424	551	319.6	6.7	82.8	70.34	A	31	2	2A
13	030504	648	375.8	11.1	88.9	67	B	13	3	3B
14	030516	672	389.8	19.3	87	61.31	C	32	2	2C
15	030614	553	320.7	12.6	77.4	65.9	B	12	3	3B
16	030617a	546	316.7	8.2	79	68.98	A	13	3	3A
17	030617b	620	359.6	11.1	94.7	68.15	A	21	2	2A
18	030618	627	363.7	17.4	83.1	62.6	B	62	1+	1+B
19	030620	600	348	16.7	85.3	63.74	B	72	1+	1+B
20	030628	557	323.1	16.3	83.8	64.37	B	81	1++	1++B
21	030701	597	346.3	17.4	91.7	64.15	B	23	2	2B
22	030703	684	396.7	8.5	92.4	68.57	A	22	2	2A
23	030719	643	372.9	11.9	88.9	66.61	B	33	2	2B
24	030814	679	393.8	14.5	86.7	64.2	B	33	2	2B
25	030826	641	371.8	9.3	85.4	67.81	A	32	2	2A
26	030831	653	378.7	10.4	87.1	67.16	B	31	2	2B
27	030910	539	312.6	15.2	82	65.08	B	41	1	1B
28	030923	573	332.3	7.8	74.9	68.31	A	22	2	2A
29	031009	600	348	6.3	78.4	69.31	A	42	1	1A
30	031015	600	348	7.4	66.8	67.12	B	23	2	2B
31	031120	600	348	8.5	70.2	66.86	B	22	2	2B
32	031121	600	348	8.5	76.2	67.64	A	23	2	2A
33	031122	600	348	8.2	82.1	68.64	A	53	1	1A
34	031123	600	348	6.7	82.9	69.68	A	33	2	2A
35	031126	600	348	8.5	66.9	66.43	B	33	2	2B

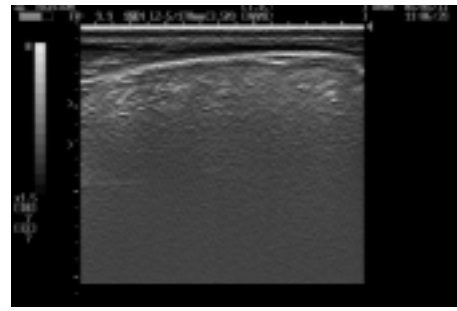
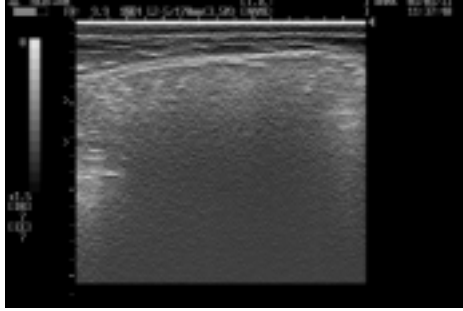


Fig 2-4. 초음파 생체육질 측정 화상

### 3) 후대검정우 대한 표현형 성적조사 및 혈액 채취

보다 정확한 검정 성적을 확보하고 가축의 유전 능력인 육종가와이 상관 관계를 추정하기 위하여 35차 후대검정우 146두와 36차 후대검정우 149두에 대하여 검정 성적을 조사하고 아울러 혈액 채취를 실시하였다. 검정 성적은 조사항목은 도살전 체중, 도체중, 도체장, 등지방두께, 배장근단면적, 육량지수, 근내지방도, 육색, 지방색, 조직감, 성숙도, 육질등급, 육량등급 및 경락단가 등 14개 항목에 대하여 실시하였으며 이중 주요 경제형질인 도체중, 등지방두께, 배장근 단면적 및 근내지방도에 대해서 유전능력평가를 실시하고 이를 ADSF/resistin 유전자와의 상관 관계를 조사하였다.

표2-3. 후보종모별 후대검정우 표현형 성적

후 보 종모우	두 수	체중							도체				
		W6	W12	W18	W24	ADG1	ADG2	ADG3	CW	DP	BF	EMA	MS
전체	146	164.1	286.1	426.7	581.7	0.720	0.810	0.764	321.9	58.7	0.89	74.0	1.54
		±24.4	±33.0	±43.4	±62.8	±0.088	±0.111	±0.091	±35.38	±2.46	±0.32	±7.61	±0.81
KPN478	8	169.1	295.6	443.6	607.8	0.752	0.855	0.802	341.6	60.2	1.20	75.6	1.63
		±30.3	±29.7	±34.5	±48.0	±0.062	±0.136	±0.075	±26.10	±1.08	±0.28	±4.85	±0.69
KPN479	9	169.6	297.3	443.4	592.0	0.750	0.808	0.772	328.4	59.1	0.96	75.6	1.89
		±15.6	±20.0	±28.3	±37.5	±0.055	±0.100	±0.063	±24.97	±1.17	±0.38	±5.54	±0.87
KPN483	9	155.0	276.9	416.4	569.0	0.716	0.800	0.757	316.7	59.0	1.08	69.6	1.56
		±13.9	±12.6	±22.4	±26.7	±0.069	±0.087	±0.064	±12.75	±1.15	±0.28	±6.38	±0.68
KPN493	3	130.6	246.9	373.8	524.7	0.666	0.761	0.720	294.0	58.0	0.57	73.7	2.33
		±21.4	±19.4	±24.6	±33.8	±0.025	±0.062	±0.039	±16.57	±1.18	±0.12	±5.79	±0.47
KPN494	8	155.3	286.3	446.3	608.3	0.797	0.882	0.828	323.9	59.4	0.86	78.8	1.88
		±29.2	±45.1	±68.2	±99.7	±0.127	±0.161	±0.142	±52.53	±1.12	±0.22	±10.5	±0.92
KPN495	2	145.8	240.2	377.5	488.3	0.635	0.680	0.626	263.0	57.0	0.60	63.5	1.00
		±1.2	±25.2	±55.5	±62.1	±0.155	±0.101	±0.116	±39.00	±1.04	±0.10	±5.50	±0.00
KPN496	10	181.6	306.8	442.4	609.0	0.714	0.828	0.781	338.6	58.7	0.77	76.3	1.60
		±25.2	±28.4	±38.0	±63.0	±0.073	±0.114	±0.096	±37.34	±1.61	±0.23	±4.10	±1.49
KPN500	4	151.1	257.7	399.6	546.8	0.681	0.792	0.723	302.0	58.3	0.83	77.5	2.00
		±14.5	±31.5	±60.4	±58.9	±0.146	±0.078	±0.095	±30.53	±1.43	±0.22	±8.38	±1.00
KPN502	7	143.8	275.0	406.0	559.7	0.718	0.780	0.760	308.4	58.5	0.80	73.0	1.71
		±21.1	±24.1	±20.8	±47.5	±0.050	±0.078	±0.051	±21.16	±1.15	±0.25	±4.66	±0.45
KPN511	21	178.4	305.3	445.4	611.3	0.732	0.838	0.792	338.0	57.6	0.92	77.4	1.19
		±20.6	±28.8	±42.3	±53.1	±0.081	±0.080	±0.074	±28.71	±1.67	±0.25	±6.42	±0.49
KPN512	7	150.8	258.1	406.8	552.9	0.701	0.808	0.735	316.4	61.8	1.03	71.1	2.00
		±10.8	±13.6	±30.3	±36.7	±0.073	±0.081	±0.052	±30.03	±7.41	±0.38	±4.09	±0.75
KPN513	6	151.3	268.6	407.9	519.4	0.703	0.687	0.673	277.7	56.1	0.77	67.3	1.17
		±26.0	±54.9	±50.2	±100.2	±0.075	±0.134	±0.136	±60.81	±0.95	±0.40	±13.3	±0.37
KPN514	2	143.1	285.5	407.8	580.8	0.725	0.809	0.800	297.5	59.0	1.15	68.5	1.00
		±21.1	±33.8	±57.1	±48.6	±0.098	±0.041	±0.050	±22.50	±0.80	±0.55	±2.50	±0.00
KPN515	11	157.6	282.4	428.7	586.3	0.743	0.833	0.784	320.1	59.1	0.77	73.6	1.09
		±19.7	±28.0	±49.1	±62.3	±0.105	±0.104	±0.089	±28.43	±1.64	±0.16	±4.60	±0.28
KPN516	15	169.9	284.8	418.8	577.6	0.682	0.802	0.745	320.7	57.6	0.74	74.9	1.27
		±25.8	±31.8	±40.5	±57.8	±0.079	±0.099	±0.082	±31.06	±1.50	±0.12	±7.76	±0.44
KPN518	5	166.2	290.2	439.0	583.8	0.748	0.804	0.763	316.6	58.2	0.88	67.4	1.20
		±13.7	±10.8	±21.2	±37.4	±0.055	±0.094	±0.062	±22.46	±1.43	±0.30	±3.88	±0.40
KPN519	4	168.5	286.8	415.9	570.1	0.678	0.776	0.734	309.3	58.8	0.78	66.0	1.00
		±7.0	±17.9	±21.8	±22.4	±0.075	±0.032	±0.052	±24.77	±1.79	±0.31	±4.24	±0.00
KPN521	15	169.9	288.7	425.5	580.8	0.700	0.800	0.751	332.0	59.9	0.97	75.5	2.13
		±18.8	±27.3	±23.6	±47.9	±0.067	±0.115	±0.079	±24.02	±1.81	±0.45	±7.05	±1.20



4) 후대 검정우 및 후보 종모우에 대한 유전능력 평가

표2-4에는 유전능력평가 결과 얻어진 육종을 일부 후대 검정우에 대하여 표시하였다. 육종가는 해당 형질에 영향을 미치는 유전자의 총화를 의미하므로 이를 한우에서 발견된 ADSF/resistin 유전자의 SNP와 비교하는 것은 매우 의미가 있는 일이다.

ADSF/resistin 유전자 다형성에 대한 한우 주요 경제형질의 표현형 및 육종가와 연관 관계 추정을 위하여 한우 후대검정우에 대한 유전능력 평가를 실시하였다. 유전능력은 Henderson이 제안한 BLUP-Animal Model에 의하여 실시하였으며 Boldman 등의 MTDFREML package를 이용하여 각 조사형질에 대한 육종가를 추정하였으며 육종가 추정에 이용된 모델은 다음과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + YS_i + L_j + D_{ijk} + A_{ijk} + e_{ijk}$$

여기서 Y는 관측치, u는 전체 평균, YS는 연도-계절효과('80~2002, 사사기, 방목기), L은 출생지역의 효과(가축개량사업소, 개량농가), D는 도축일령에 대한 co-variate, A는 Random Direct Additive Effects 그리고 e는 Random Error 이다.

표2-4. 후보종모우별 유전능력 추정치

종모우	도체중(cw)			배최장근단면적(lma)			근내지방도(ms)			등지방두께(bf)	
	BV	SBV	RTI	BV	SBV	RTI	BV	SBV	RTI	BV	RTI
KPN494	17.824	3.422	0.65	7.488	5.136	0.68	0.284	0.662	0.74	-0.013	0.71
KPN521	9.901	1.884	0.73	2.965	1.922	0.76	0.408	1.003	0.82	0.218	0.79
KPN479	10.305	1.963	0.68	4.119	2.742	0.71	0.228	0.509	0.77	0.171	0.73
KPN496	18.552	3.563	0.69	4.547	3.046	0.72	-0.284	-0.897	0.77	-0.144	0.74
KPN478	14.403	2.758	0.65	2.229	1.399	0.68	-0.251	-0.806	0.74	0.376	0.71
KPN511	18.379	3.529	0.77	4.779	3.211	0.80	-1.029	-2.942	0.85	0.172	0.82
KPN502	-6.337	-1.266	0.63	1.145	0.628	0.66	0.294	0.690	0.72	0.012	0.69
KPN512	-1.086	-0.247	0.62	-1.935	-1.570	0.65	0.373	0.907	0.71	0.166	0.68
KPN515	7.229	1.366	0.67	1.221	0.682	0.71	-0.770	-2.231	0.77	-0.049	0.74
KPN516	-0.047	-0.046	0.73	0.939	0.482	0.76	-0.826	-2.384	0.82	-0.047	0.79
KPN518	5.008	0.935	0.57	-2.609	-2.040	0.60	-0.604	-1.775	0.67	0.015	0.63
KPN483	-8.375	-1.662	0.66	-4.151	-3.136	0.69	-0.014	-0.156	0.75	0.267	0.72
KPN513	-21.725	-4.252	0.59	-4.464	-3.358	0.62	-0.332	-1.028	0.69	-0.034	0.66

## 5) SNP와의 연관성 추정

주요 경제형질에 대하여 BLUP-Animal Model을 이용하여 육종가를 추정하고 표현형가 및 육종가와 ADSF /resistin 간의 연관관계 추정을 위하여 아래와 같은 모델을 이용하여 SAS 9.1 package-GLM procedure를 이용 분산 분석을 실시하였으며 유사한 염기서열간의 관계도 동시에 규명하고자 분석된 염기서열에 대해 phylogenic tree를 작성하고 이를 그룹화 시켜 분석에 같이 활용하였다.

- 표현형 모델

$$Y_{ijk} = \mu + L_i + G_j + e_{ijk}$$

여기서 Y는 관측치,  $\mu$ 는 전체 평균, L은 검정지역의 효과(남원, 대관령), G는 SNP 다형성 그리고 e는 Random Error

- 육종가 모델

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

여기서 Y는 관측치,  $\mu$ 는 전체 평균, L은 검정지역의 효과(남원, 대관령), G는 SNP 다형성 그리고 e는 Random Error

35차 후대검정우에 대한 ADSF/resistin 유전자의 효과를 살펴보기 위하여 Intron 3 region에 대한 SNP를 발굴하고 이에 대한 유의성 검정을 실시하였다(표2-5). 조사된 8개 부위의 SNP와 group 효과에 대하여 890C del와 그룹에서는 등지방 두께에 대하여 유의적으로 나타났으며 894C del와 C894T는 도체중에 대하여 유의적인 효과가 있는 것으로 나타났다. 표현형과 육종가 간의 차이는 찾아볼 수 없었으며 SNP의 효과에 대해서는 변이가 생긴 개체의 도체중이 유의적으로 ( $P < 0.05$ ) 더 무거웠으며 등지방 두께가 더 두꺼웠음을 볼 수 있었다. Group 효과에 있어서는 Group 2의 등지방 두께가 가장 두꺼웠으나 Group 3과의 유의적인 차이는 없었으며 Group 1과는 유의적인 차이를 나타냈다( $P < 0.05$ ). 본 연구의 결과 ADSF/resistin 유전자는 지방 뿐 아니라 한우의 체중과도 연관이 있는 것으로 나타났다. 그러나 염기서열 분석 부위가 짧았으며 유전 양상에 대한 검증이 아직 완료되지 않아 더 많은 연구가 필요하다고 사료되었다 이에 따라 36차 후대검정우 시료에 대해서는 Intron 2와 3 지역에 대한 보다 넓게 염기서열을 분석하였으며 이에 대한 유의성 검정 결과는 표

6과 같다. 36차 후대검정우에서 발견된 6개의 SNP에 대한 빈도는 각각 8.2%, 5.9%, 18.8%, 5.9%, 11.8% 및 7% 였으며 899Cins의 경우 35차 후대검정우에서 16%가 발견되었으며 농가 시험축에서도 18%가 발견되어 유전표지인자로의 가능성을 가졌으나 반면에 각 형질에 대한 유의성은 나타내지 못했다. 36차 후대검정우에 대한 유의성 검정결과 649Ains에 대한 근내지방도의 효과가 있었으나 36차 검정우의 경우 전체 149두중 86개체만이 분석이 이용되어 변별력이 저하되는 것으로 사료되었다.

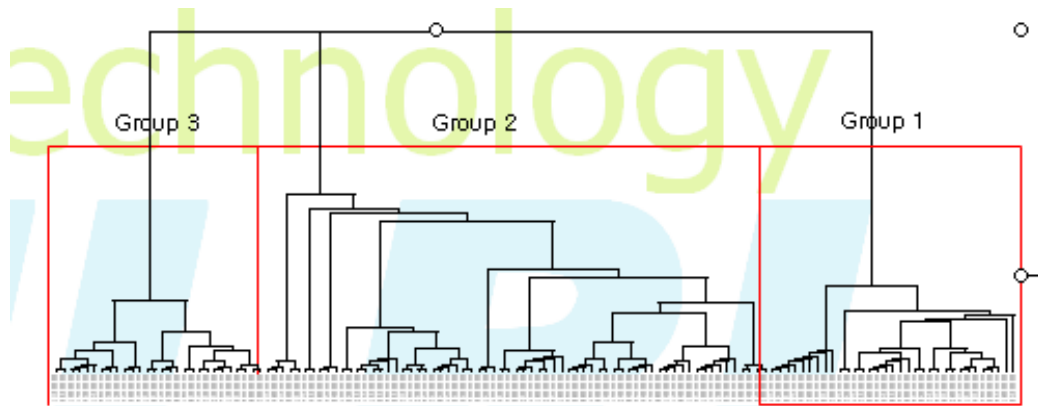


Fig 2-5. ADSF/resistin 유전자 염기서열에 대한 phylogenetic tree 및 그룹화

표2-5. 35차 후대검정우에서 조사된 형질에 대한 유의성 검정 결과

Traits	868C ins	890C del	894C del	C894T	899C ins	908T ins	919C ins	947C del	Group
P_CW	NS	NS	**	*	NS	NS	NS	NS	NS
P_EMS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P_MS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P_BF	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**
BV_CW	NS	NS	**	**	NS	NS	NS	NS	NS
BV_EMS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BV_MS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BV_BF	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**

\* P : Phenotypic, BV : Breeding Value, CW : Carcass Weight,  
 EMS : Eye Muscle Area, MS : Marbling Score, BF : Back-fat Thickness,  
 \* : P < 0.05, \*\* : P < 0.01

표2-6. 36차 후대검정우에서 조사된 형질에 대한 유의성 검정 결과

	641G ins	647G ins	649A ins	652G del	G849A	C1099T
LW_P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CW_P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DP_P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
EMA_P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BF_P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
MS_P	NS	NS	*	NS	NS	NS
MS_BV	NS	NS	*	NS	NS	NS
EMA_BV	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CW_BV	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BF_BV	NS	NS	NS	NS	NS	NS

### 6). computer simulation에 의한 유전표지인자로의 가능성 검토

발견된 유전 표지인자에 대한 이용성을 제고하기 위하여 computer simulation을 실시하였다. simulation은 호주 UNE 대학에서 개발된 genup 5.4 (Brian Kinghorn, 2006) package를 이용하였으며 simulation에 사용된 모수는 표2-7과 같다. 고려된 종모우는 총 8두이며 종모우당 250두의 종빈우를 10년간 교배하는 모델을 작성하였다. 종빈우와 종모우의 생존율은 95%로 가정하였으며 평균 이유율은 80%로 가정하였다. 가정한 유전표지인자(genetic marker)의 효과는 상가적으로 발현한다는 가정하에 10%로 빈도를 가질때와 20%의 빈도를 가질때를 고려하였으며 주유전자가 헤테로인 경우와 호모인 경우 각각 없는 경우, 0.1 및 0.2, 0.2 및 0.4, 0.48 및 0.8 그리고 1, 2 효과를 가질 때 10년간 표현형의 변화치를 고찰하였다. 본 simulation에서는 근내지방도에 대한 유전표지인자를 이용하고 다른 형질에는 고려하지 않았다.

그림 6.에는 유전표지인자(genetic marker)를 이용하여 선발한 경우와 일반 선발방식으로 선발한 결과를 표시하였다. 근내지방도의 유전력은 0.55로서 매우 높은 편이며 이에 따라 유전자의 효과가 낮은 경우에는 유전표지인자를 이용하여 선발한것과 일반적인 선발 방식과의 차이는 적은 것으로 나타났다. 그러나 유전자의 효과를 평균의 50% 이상으로 높여준 경우에는 효과가 높은 것으로 나타났다. 반면에 주 유전자의 빈도는 개량의 정도에 영향하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 형질의 유전력에 따라 유전표지인자의 이용 효과가 달라지는 것으로 사료되며 이에 따라 한우의 육질을 개량하기 위한 유전표지인자는 그 효과가 유전력을 상회하는 정도의 효과를 가질 때 유효한 것으로 사료된다. 그러나 2008년까지의 표현형 성적을 고려할 때 유전표지인자를 이용한 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 좋은 성적을 나타냈으며 2009년에

주유전자를 이용하지 않은 경우가 성적이 좋았던 이유는 유전적 부동(Genetic Drift)에 의한 영향으로 생각되었다. 그 증거로 2010년의 표현형 성적이 2009년과 별 차이를 나타내지 않았으며 이를 종합할 때 유전표지인자를 이용하는 것이 근내지방도의 개량을 위해 우수한 결과를 가지는 것으로 사료된다.

등지방두께의 경우 근내지방도에 대한 유전표지인자를 이용하여 선발한 경우 간접 선발의 효과를 가졌으나 배장근 단면적과 도체중에 대해서는 효과를 가지지 못했다.

표2-7. Computer Simulation에 이용된 모수

형질	표현형 평균	표준편차	유전력	MS	BF	EMA	CW
근내지방도(MS)	2.9	1.6	0.55		0.15	0.25	0.17
등지방두께(BF)	0.73	0.3	0.43	0.12		0.26	0.57
배장근단면적(EMA)	74.8	8.6	0.27	0.07	0.27		0.49
도체중(CW)	301.8	33.9	0.30	0.26	0.08	0.69	

\*상삼각 행렬은 유전 공분산, 하삼각 행렬은 표현형 공산임

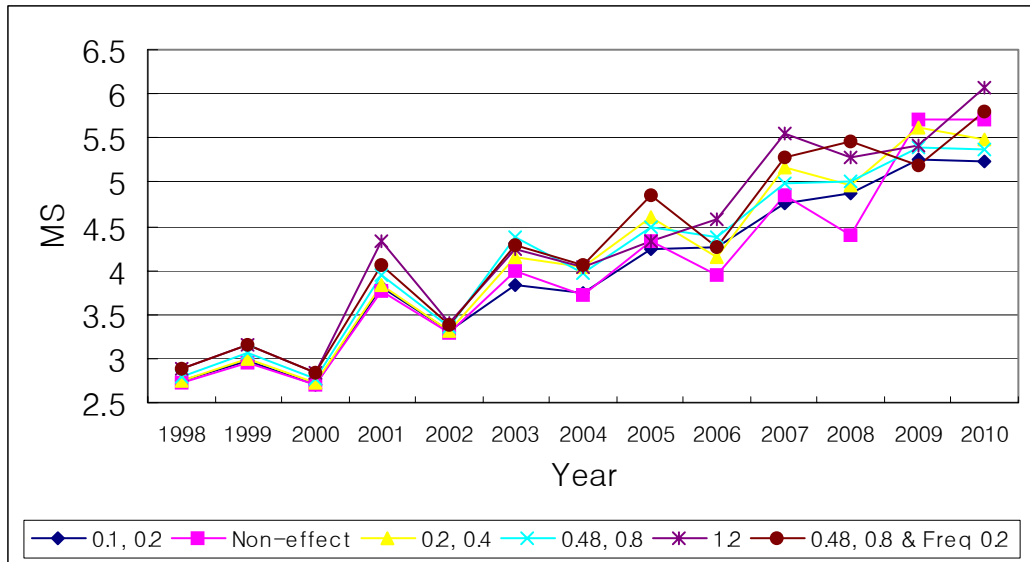


Fig 2-6. 근내지방도에 대한 유전표지인자의 효과

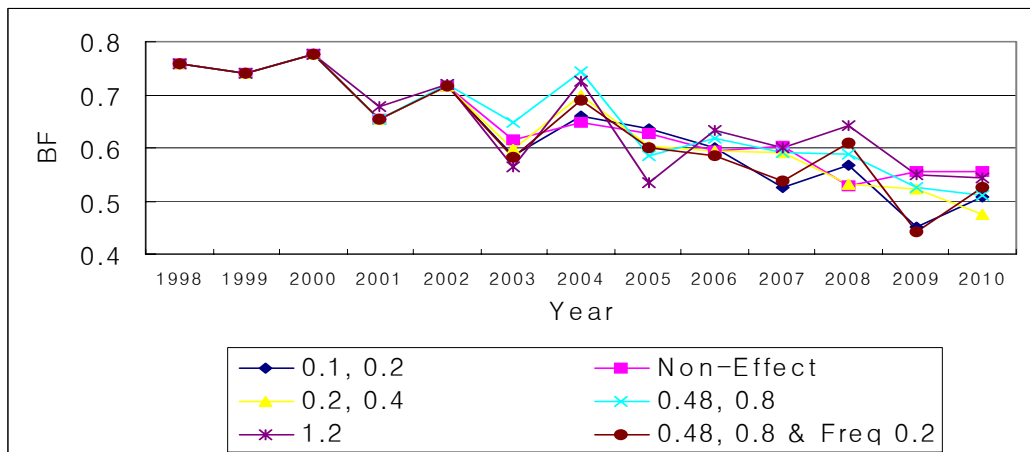


Fig 2-7. 등지방두께에 대한 간접 선발 효과

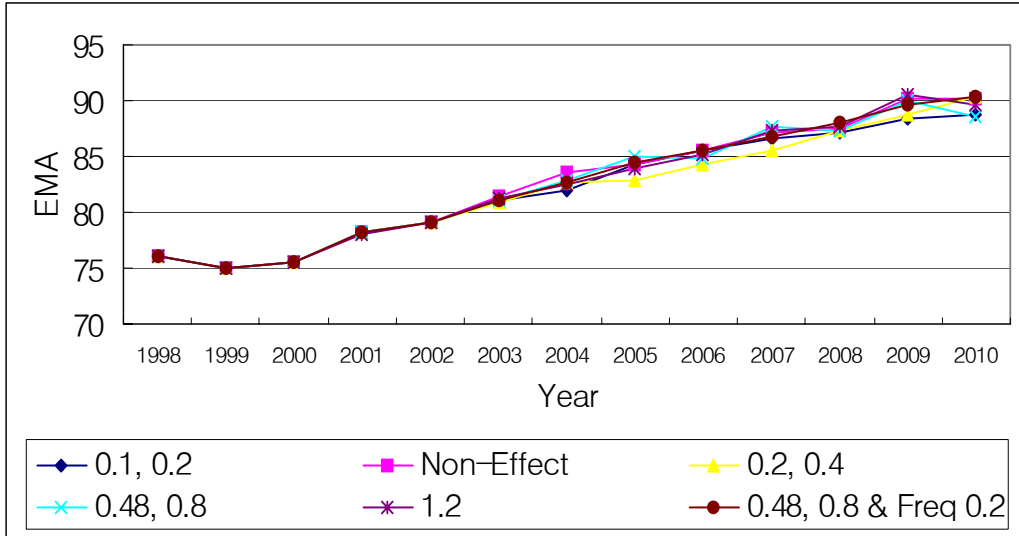


Fig2-8. 배장근 단면적에 대한 간접 선발 효과

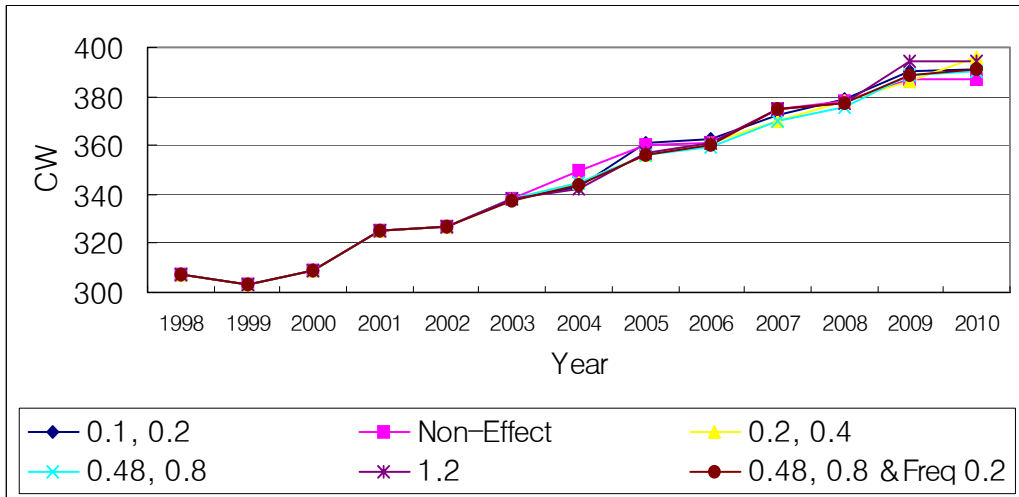


Fig 2-9. 도체중에 대한 간접 선발 효과

### 3. 한우 ADSF/resistin 단백질 대량생산을 위한 고효율 발현벡터 개발 및 단백질 특성규명

#### 가. 연구 방법

##### 1) ADSF/resistin 발현 벡터를 위한 primer제작

주관연구책임자로부터 공급받은 ADSF/resistin cDNA를 PCR 기법을 통해 pGEX2T 벡터에 클로닝 하였다. 이때 사용한 primer는 아래와 같다.

pGEX2T: forward primer 5'-GGAATTCCTGCAGGATGAAA-3' (EcoR I)  
reverse primer 5'-CGCGGATCCCTGGATATGCAG-3' (BamH I)

PCR cycle의 조건은 다음과 같이 실시하였다.

1st denaturation 94°C 2 min/ 2nd denaturation 94°C 1 min → annealing 50°C 1 min → elongation 72°C 30 sec: 30 cycles 반복/ final extension 72°C 5 min

##### 2) 원핵세포를 이용한 ADSF/resistin 발현벡터 구축 및 단백질 생산

PCR을 통해 ADSF/resistin 유전자를 확보한 다음, PCR 단편을 정제하여 EcoR I/BamH I으로 절편화된 pGEX2T 벡터에 T4 ligase를 사용하여 ligation하고, 이를 DH5α 박테리아에 transformation하여 생성된 colony를 선별하였다. ADSF/resistin이 장착된 plasmid를 제한효소로 절단하여 전기영동을 통해 확인한 후, 구축된 벡터의 염기서열도 확인하였다. 확인된 벡터를 가진 박테리아를 대량 생산하여 해당 plasmid를 증폭하였다. 증폭된 plasmid를 다시 BL21(DE3) 세포에 transformation하고 이를 배양하여 OD<sub>600</sub> 0.6~0.8이 될 때까지 배양한 후, 0.5M의 IPTG를 넣고 3시간동안 GST가 융합된 ADSF/resistin의 과발현을 유도하였다. 이러한 발현 단백질의 유도는 SDS-PAGE을 통해 관찰하였다.

##### 3) 진핵세포주를 위한 ADSF/resistin 발현벡터 구축

원핵세포주에서의 방법과 동일하게 ADSF/resistin cDNA를 PCR로 증폭한 후 EcoR I/BamH I으로 절편화된 pDNA3.1에 ligation하였다. 제한효소로 절단하여 벡터 구축 여부를 확인하고 염기서열을 분석하였다.

##### 4) 형질전환 세포주 구축 및 발현 확인

구축된 ADSF/resistin 벡터는 293 human kidney cells 혹은 3T3 L1 지방전구세포에 Exgen 500 (Fermentas Life Science)이나 electrophorator을 이용하여 transfection 시켰다. 즉, Transfection할 DNA 1µg을 150mM NaCl 용액 200µl에 희석하여 잘 혼



합한 후 Exgen 500 16.5 $\mu$ l를 첨가하고 상온에서 10분간 반응시켰다. 반응물을 세포가 배양되고 있는 60mm plate에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 36시간 배양한 후 western blotting을 통해 발현 여부를 확인하였다. 3T3 L1세포의 경우 electrophoration으로 ADSF/resistin 유전자를 주입하고 지방분화 여부를 조사하였다. Western blotting은 다음과 같이 실시하였다. 세포를 lysis하여 상층액의 단백질을 분리한 후 이를 정량하여 sample loading buffer와 함께 섞어 SDS-PAGE gel로 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질 gel을 nitrocellulose membrane으로 전이한 후 5%의 skim milk로 blocking 하였다. 이 후 PBS로 세척하고 해당 항체와 함께 실온에서 반응시켰다. Membrane을 다시 PBS로 세척하고, HRP-conjugated 된 2차 항체와 반응 시킨 다음, ECL kit로 단백질의 발현 여부를 관찰하였다.

#### 5) 발현된 ADSF/resistin 단백질 정제

발현된 ADSF/resistin 단백질은 glutathione S-transferase (GST)와 한우 ADSF/resistin의 접합단백질 (fusion protein)의 형태로서, 형질전환된 박테리아를 대량 배양한 후 초음파 파쇄기로 세포를 파괴하여 GST-ADSF/resistin 융합 단백질을 분리하였다. 추출한 단백질들을 glutathione Sepharose-4B beads와 실온에서 30분 반응시킨 후 세척하였다. 반응물을 단백질 전기영동과 silver staining으로 관찰한 다음, 34kDa에 해당하는 단백질을 gel-elution방법으로 정제하였다.

#### 6) ADSF/resistin에 대한 항혈청 생산

정제된 ADSF/resistin 단백질을 1 mg/ml 농도로 농축한 다음 PBS와 혼합하여 New Zealand White rabbit의 등에 주사하였다. 매 2주 간격으로 ADSF/resistin 단백질 용액을 주사하였다. 최초 항원 주사 후 7, 9, 11 주에 이정맥(ear vein)으로부터 5ml 혈액채취를 채취하여 항체의 역가를 ELISA방법으로 측정하였다. 3차 부스팅 후 1주일째에 heart puncture을 통해 대량의 항혈청을 채취하였다.

#### 7) 지방 전구 세포 3T3 L1의 배양

3T3L1을 10% fetal bovine serum이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 5%의 CO<sub>2</sub>와 37 $^{\circ}$ C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 100mm 세포배양 plate에 3T3L1 세포가 과밀할 때를 기준으로 이틀 후, 1 $\mu$ g/ml의 insulin, 1 $\mu$ M의 DEX와 0.5mM의 MIX 호르몬들을 처리하였다. 호르몬을 첨가하고 48시간이 지난 다음, 1 $\mu$ g/ml insulin과 10% fetal bovine serum이 함유된 DMEM 배지로 교체 하였다. 4일째부터 분화된 세포를 관찰할 수 있었으며, 8일째 대부분의 전구세포들이 지방세포로 분화됨을 지방구 생성을 통해 확인 할 수 있었다.

8) Oil-Red-O 염색을 통한 3T3L1의 지방 분화 분석

분화된 3T3L1 세포를 PBS로 세척하고 10% formalin으로 고정화시켰다. 0.5% Oil-Red-O를 세포에 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시키고, 현미경으로 염색된 지방세포를 관찰하였다.

나. 연구 결과

1) 한우ADSF/resistin 단백질 발현벡터 구축

한우 ADSF/resistin 단백질을 원핵세포에서 발현시키기 위해 pGEX2T 벡터에 클로닝하였다 (Figure3-1). pGEX2T 벡터는 일반적으로 원핵세포에서 안정적으로 단백질을 과발현하는 것으로 알려져 있으며 생성되는 단백질의 N-terminal에 GST가 tagging되어 발현한다. pGEX2T 벡터에 한우 ADSF/resistin 유전자를 클로닝하기 위해 제작한 primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 대략 330bp의 한우 ADSF/resistin 유전자를 확인할 수 있었다 (Fig3-2).

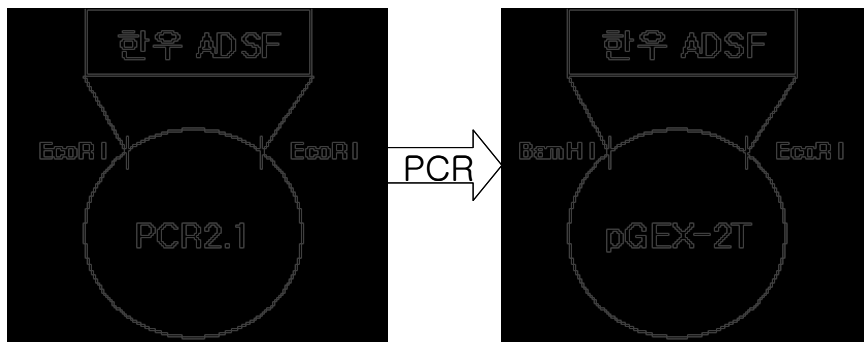


Fig3-1. PCR2.1 벡터에 삽입되어 있는 한우ADSF를 원핵세포발현 벡터 pGEX2T에 삽입하기 위한 모식도. 두 벡터간에 enzyme site만 바뀌어 있다.

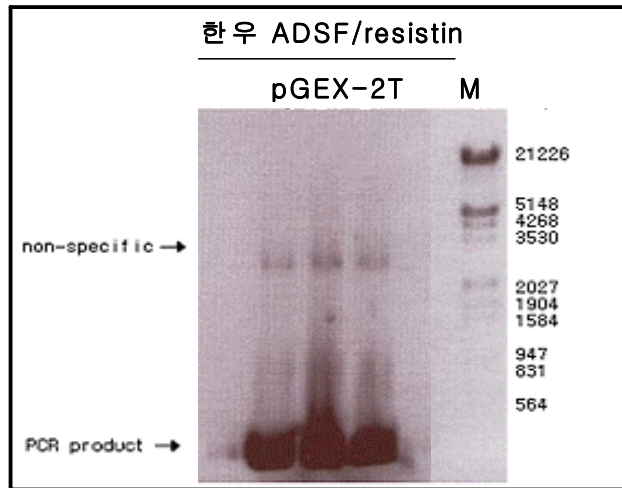


Fig3-2. PCR를 통해 증폭한 ADSF/resistin 유전자를 DNA 전기영동으로 확인.  
(한우ADSF size: 330bp)

증폭된 유전자에 EcoRI과 BamHI 제한 효소를 처리하여 동일한 제한효소로 절단되어 있는 pGEX2T 벡터와 ligation 시켰다. 이를 박테리아에 형질전환시켜 형성된 colony에서 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 EcoRI과 BamHI 제한 효소로 처리한 다음 전기영동을 실시하였다. 그 결과 정상적인 insert DNA가 삽입된 클론을 선발할 수 있었다 (Fig3-3). 확인된 클론은 DNA 염기서열 분석을 통해 실제로 한우 ADSF/resistin 유전자가 제대로 삽입되었는지를 재확인하였다. 동일한 방법으로 진핵세포 발현벡터인 pcDNA3.1-myc-His vector에도 클로닝 하였다. 진핵세포 주의 경우는 myc-tag된 벡터인 pcDNA3.1(BamH I/EcoR I)에 삽입하기 위해 PCR을 통해 증폭한 한우ADSF/resistin을 BamH I/EcoRI으로 절단하고 pcDNA3.1(BamH I/EcoR I)와 함께 4°C에서 overnight으로 ligation시켰다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 각각 5.4kb pcDNA3.1/ 와 330bp 한우ADSF가 관찰되었다. 구축된 벡터가 제대로 확립된 것인지를 확인하기 위해 염기서열을 분석하였다.

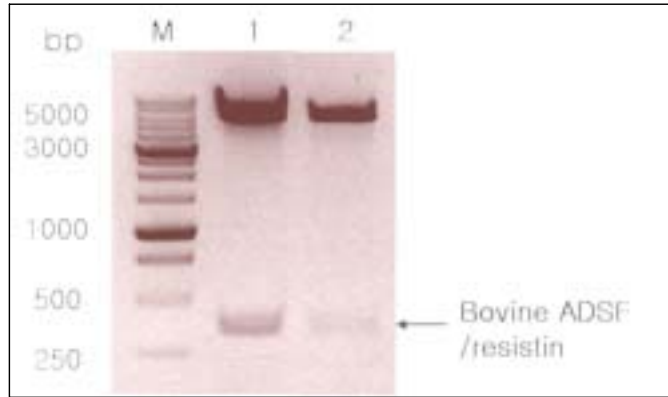


Fig3-3. 진핵 및 원핵세포주 발현벡터에 한우ADSF/resistin 클로닝.

1 : pcDNA3.1 / myc-His bovine ADSF (Enzyme site: BamHI / EcoRI).

2 : pGEX2T / bovine ADSF (Enzyme site: EcoRI / BamHI). 330bp size에서 bovine ADSF/resistin gene이 ligation되어 있는 것을 확인할 수 있다.

## 2) 한우ADSF/resistin 형질전환체를 이용한 단백질 생산

클로닝 된 벡터를 BL21 박테리아에 transformation시켜 생성된 colony를 배양한 다음, 0.5mM의 IPTG를 첨가하여 ADSF/resistin단백질의 과발현을 유도하였다. pGEX-2T 벡터만 가진 형질전환체에서는 IPTG 첨가시 GST 단백질(26kDa)이 강하게 과발현 되었으며, 한우 ADSF/resistin-GST fusion protein은 미약하지만, IPTG에 의해 세포내에서 과발현이 유도됨을 관찰할 수 있었다 (Fig3-4).

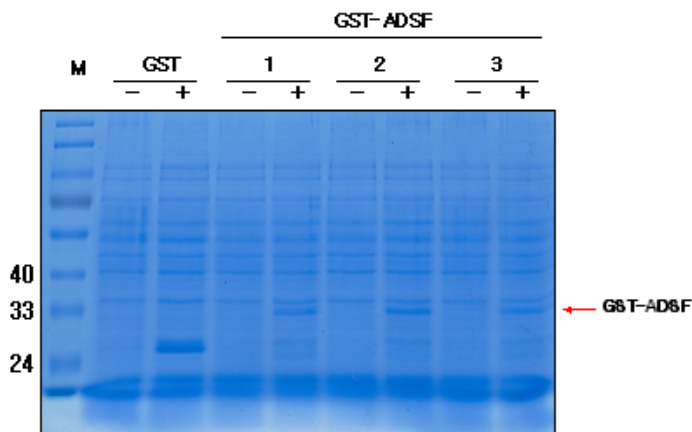


Fig3-4. 한우 ADSF/resistin의 과발현 유도. 한우 GST-ADSF/resistin 형질전환 박테리아에 IPTG를 첨가하여 과발현을 유도하였다.

과발현된 단백질의 수용성 여부를 조사하기 위해 세포를 파쇄 한 다음 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리한 다음 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과 과발현된 단백질들은 inclusion body를 형성하여 주로 침전물에 분포하였다 (Fig3-5). ADSF/resistin의 수용성을 증가시키기 위해 urea의 농도 (4M - 8M)를 달리하여 침전물에 처리하였으나 크게 수용성이 개선되지 않았다 (Fig3-6).

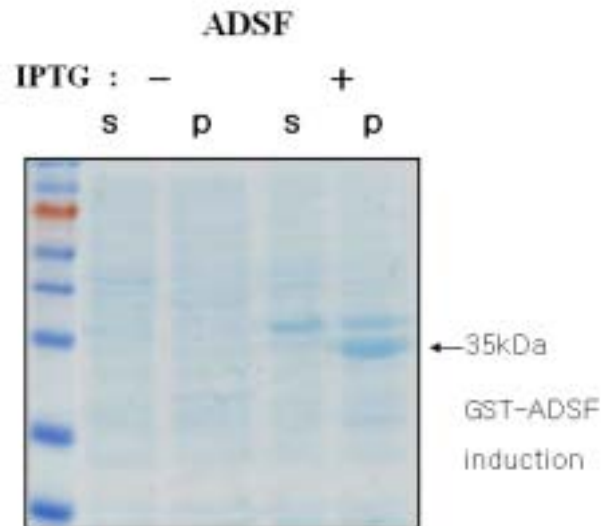


Fig3-5. 과발현된 한우 ADSF/resistin의 수용성 여부조사.

한우 GST-ADSF/resistin 형질전환 박테리아에 IPTG을 첨가하여 과발현을 유도하였다. 박테리아를 sonication한 다음, 원심분리하여 상층액과 침전물을 분리하였다. 35kDa의 크기에서 GST-ADSF가 과발현된 것을 확인 할 수 있다. (S: supernatant, P: pellet)

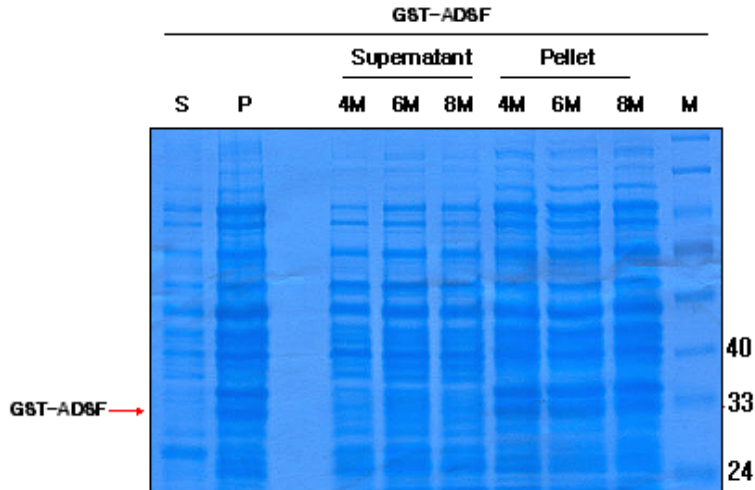


Fig3-6. 과발현된 단백질에 urea처리. 박테리아 침전물에 urea를 처리하여 수용성을 향상시켰으나, ADSF/resistin단백질의 수용성은 개선되지 않았다.

(S: supernatant, P: pellet, M: protein marker).

### 3) 한우ADSF/resistin 단백질에 대한 항체 생산

원핵세포에서 ADSF/resistin의 과발현이 유도되는 것을 확인하였으나 대부분의 단백질이 침전되었다. 그렇지만 항체 제작에 사용되는 단백질은 denature된 형태도 큰 문제가 없기 때문에 insoluble한 형태로 gel elution 과정을 통해 단백질을 정제하였다 (Fig3-7). 형질전환 박테리아를 5 리터로 대량 배양한 다음, 전기영동을 실시하여 GST-ADSF/resistin 단백질을 gel에서 추출하였다. 추출한 단백질의 농도 (0.07ug/ml)가 너무 낮아서 centricon을 사용하여 1mg/ml로 농축하였다. 농축한 단백질은 3번에 걸쳐 토끼에 주입하였다. 부스팅한 다음, 혈액을 채취하여 ELISA 실험을 한 결과 1:10,000에서 부터 특정 항원에 대해 반응을 나타내었다 (Fig 3-8).

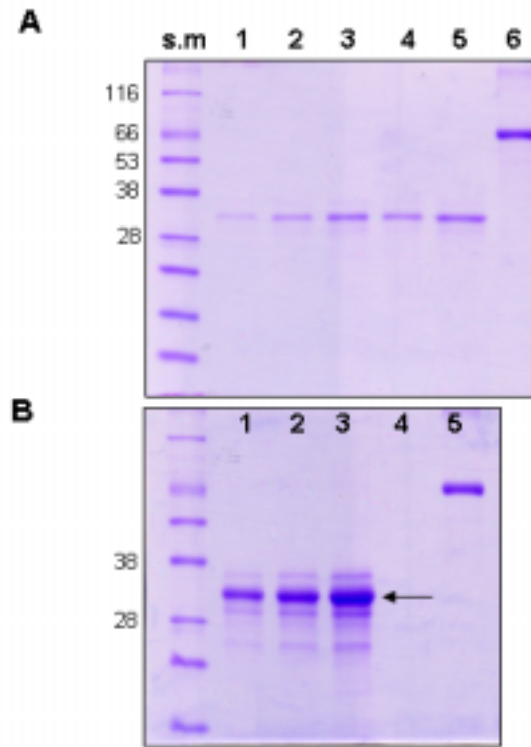


Fig3-7. GST-ADSF 단백질의 정제 및 농축. A) 정제한 ADSF 단백질들을 전기영동을 통해 확인하였다. lane 1-5: GST-ADSF 융합단백질. lane 6: BSA(2mg/ml) 0.5ul loading. s.m.:size marker. B) GST-ADSF을 농축한 다음 전기영동을 통해 확인하였다. lane 1-4: GST-ADSF 단백질. lane1: 0.5ul loading, lane2: 1ul loading, lane3: 2ul loading. lane4: flow-through (8ul loading). lane5: BSA 0.5ul loading. 화살표는 GST-ADSF을 나타냄.

ADSF rabbit.1

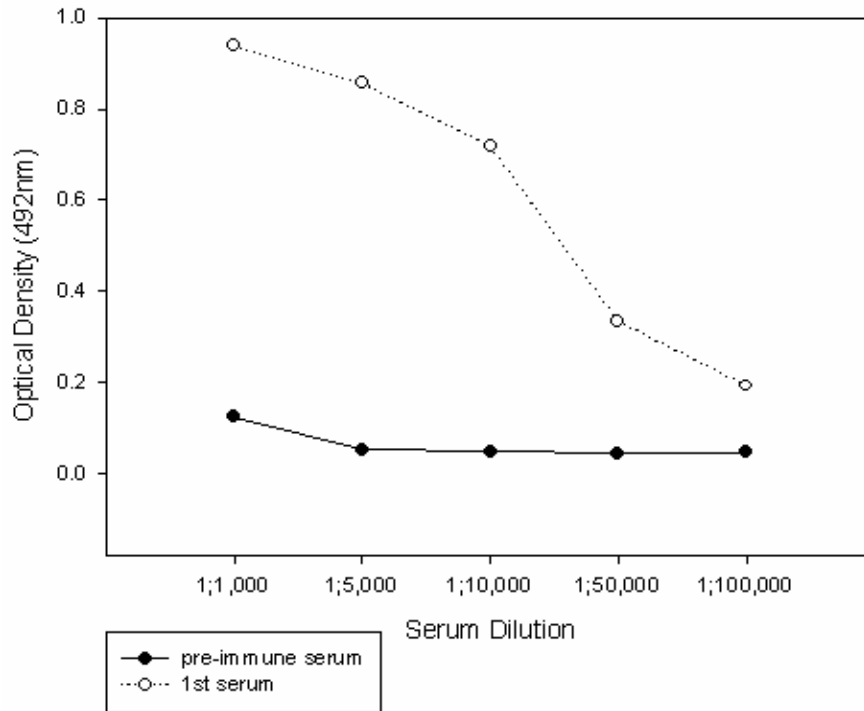


Fig3-8. ADSF/resistin 항체의 titer 측정. 부스팅한 다음 추출한 토끼 serum의 ELISA 결과. 1:10,000 비율에서 특정항원에 대해 특이적으로 반응이 나타남.

ELISA를 통해 특정항원에 대한 반응력을 조사한 다음 이를 토대로 실제 한우 ADSF/resistin 단백질을 인지하는지를 조사하기 위해 혈청을 1:2,000으로 희석하여 ADSF/resistin이 과발현되는 박테리아 추출물과 한우 등심조직에서 western blotting을 실시하였다 (Fig3-9).





Fig3-9. ADSF/resistin에 반응하는 혈청을 이용한 western blotting 결과.

그 결과 한우 조직과 혈액에서는 밴드가 관찰되지 않았지만, 박테리아 추출물에서는 GST-ADSF/resistin이 위치한 34kDa 부위의 단백질 밴드가 명확하게 관찰되었다. 그러나, ADSF/resistin이 과발현되지 않은 박테리아에서도 밴드가 감지되었다. 이는 34kDa 부위의 모든 박테리아 단백질을 elution하여 항체를 제작하는데 사용했기 때문으로 추정된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 다시 affinity-purified 항체를 생산하였다. 31kDa에서 관찰되는 밴드는 비특이적인 밴드로 생각된다.

#### 4) 한우ADSF/resistin 단백질에 대한 affinity-purified 항체 생산

ADSF/resistin에 대한 항체를 정제하기 위해 GST만이 과발현된 단백질과 반응시켜 GST 단백질을 인식하는 항체를 제거하였다. 이후 membrane depletion method을 이용하여 ADSF/resistin만을 인식하는 항체를 정제하였다. 이렇게 하여 생산된 affinity purified ADSF/resistin antibody를 이용하여 ADSF가 과발현되는 293 cells에서 단백질 발현을 조사하였다. 먼저, 구축된myc-tagged pcDNA3.1(-)-ADSF/resistin plasmid를 293 세포주에 transfection시켰다. 성공적으로 ADSF/resistin plasmid가 세포내로 주입되었다면 plasmid내에 myc 펩타이드가 장착되어 있기 때문에 myc 항체를 이용하여 ADSF/resistin의 발현 여부를 간접적으로 확인할 수 있다. 그 결과 벡터만 transfection했을 때는 ADSF/resistin 단백질 크기를 나타내는 13kDa 밴드가 관찰되지 않았지만, pcDNA3.1(-)-ADSF/resistin이 과발현되는 세포에서는 ADSF/resistin 밴드가 잘 감지됨을 확인할 수 있었다 (Fig3-10). 이후 affinity purified ADSF/resistin 항체를 이용하여 같은 샘플에서

ADSF/resistin 단백질의 발현 여부를 조사하였다. 그 결과 Fig3-10과 동일하게 13kDa에서 myc-tagged ADSF/resistin 단백질이 명확하게 관찰되었다 (Fig3-11).

이러한 결과는 정제된 ADSF/resistin 항체가 특이적으로 반응하고 있음을 의미한다. 55kDa에 보이는 밴드는 background로 추정된다.

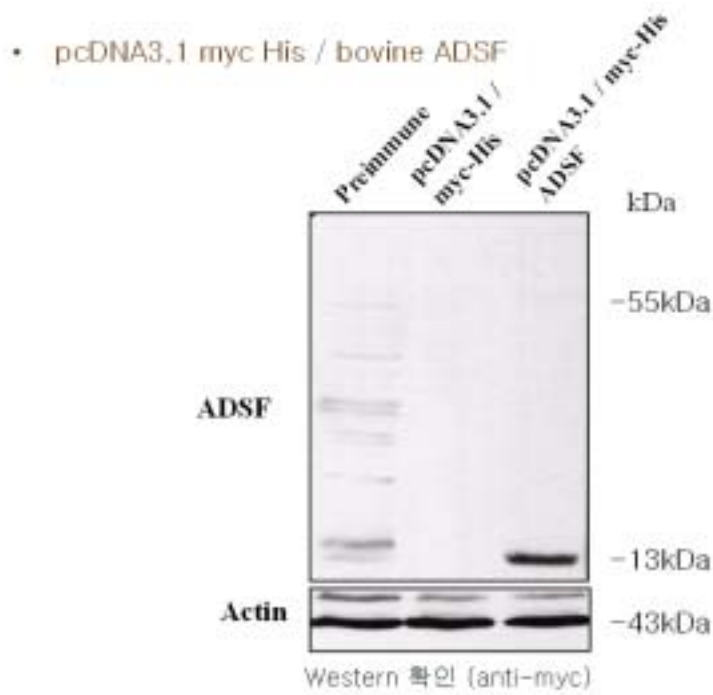


Fig3-10. 한우 ADSF/resistin 단백질의 발현 조사. 293 cells에 myc-tagged ADSF/resistin plasmid를 transfection 한 후 anti-myc 항체를 이용하여 western blot을 실시하였다. 13kDa에서 myc-tagged ADSF 단백질이 발현되고 있음을 관찰할 수 있다.

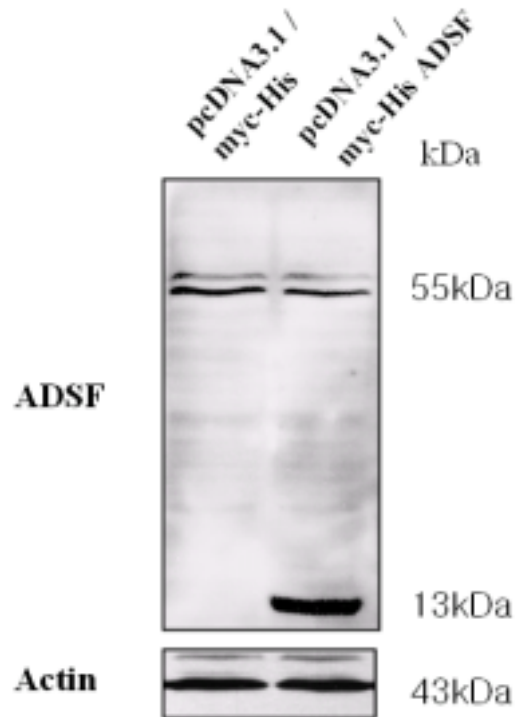


Fig3-11. 정제된 항체를 이용한 한우 ADSF/resistin 단백질의 발현 조사. 293 cells 에 ADSF/resistin plasmid를 transfection 한 후 정제된 anti-ADSF 항체를 이용하여 western blot을 실시하였다. anti-myc 항체를 이용하였을 때와 동일한 위치에서 밴드가 감지되었다.

##### 5) 지방세포분화와 관련한 한우ADSF/resistin 단백질의 기능규명

ADSF/resistin 유전자가 지방세포 분화에 어떠한 역할을 하는 지를 조사하기 위하여 지방 전구세포 3T3 L1에 한우ADSF/resistin을 과발현 시킨 다음, 지방세포 분화 여부를 조사하였다.

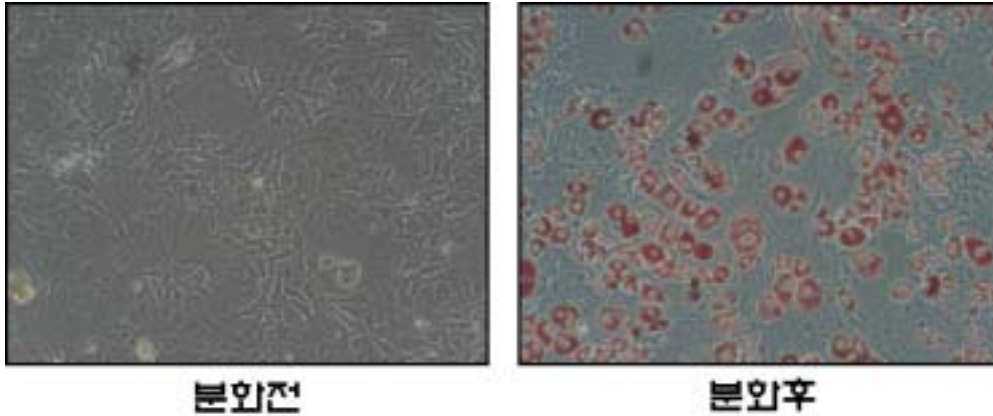


Fig3-12. 지방전구세포 3T3 L1의 분화 유도. (red cells: Oil-Red-O로 염색된 지방분화세포)

ADSF/resistin에 의한 지방 분화 관련성을 조사하기에 앞서 먼저 분화가 제대로 이루어졌는지를 확인할 수 있는 Oil-Red-O 염색액을 사용하여 지방세포의 적절한 분화 조건을 확립하였다 (Fig3-12). 먼저 ADSF/resistin 유전자가 꾸준히 과발현되는 stable 세포주를 구축하기 위해 plasmid vector와 retroviral vector를 3T3 L1 세포주에 주입한 다음 positive 세포주를 선발하였으나 지속적으로 ADSF/resistin이 발현되는 세포주가 선발되지 않았다. 이는 ADSF/resistin 유전자가 세포의 기본 대사에 중요한 작용을 하는 것으로 사료되어진다. 따라서 ADSF/resistin 유전자의 기능분석은 transiently transfection 방법을 이용하여 실시하였다.

pcDNA3.1(-)-ADSF/resistin plasmid의 transfection efficiency를 증가시키기 위해 electroporation 방법을 이용하여 지방전구세포인 3T3-L1 cells에 transfection 시켰다. 그 결과 ADSF/resistin이 과발현되는 세포에서는 지방세포의 분화가 상대적으로 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig3-13). 이러한 결과는 한우 ADSF/resistin 유전자가 지방세포의 분화를 억제하는 역할을 한다는 것을 의미한다.

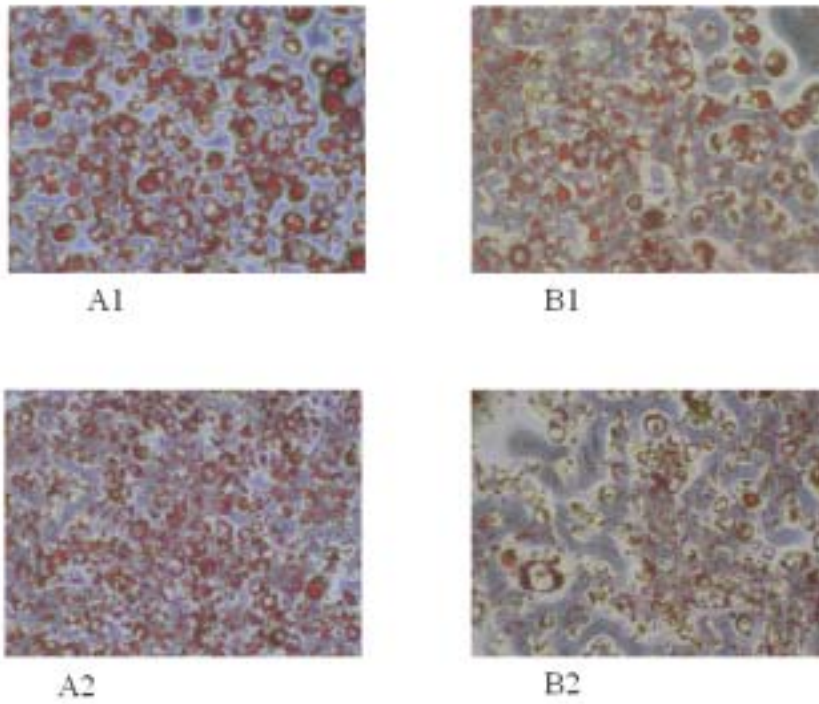


Fig3-13. 한우 ADF/resistin의 지방분화 관련성 조사. 3T3-L1 cells에 pcDNA3.1(-) vector 와 pcDNA3.1(-)-ADF를 electroporation한 다음, 지방분화를 유도하고 Oil Red O staining을 하여 지방세포 분화 정도를 관찰하였다. 그 결과 ADF/resistin이 transfection된 세포에서 지방 분화가 상대적으로 억제되었다. (A1 & A2 : 대조구, B1 & B2 : ADF 과발현 세포)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연구개발 목표의 달성도

구 분	연구개발 목표의 평가 착안점, 척도 및 달성도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도 (%)
1차년도 (2003-2004)	○ADSF/resistin의 cDNA 의 클로닝 및 염기서열 분석	40	100
	○ADSF/resistin 유전자 구조해석	30	100
	○원핵세포주에서 ADSF/resistin 발현백터구축	20	100
	○시험설계의 타당성	5	100
	○초음파정보와의 연계성	5	100
2차년도 (2004-2005)	○엑손과 인트론 DNA 다형분석	30	100
	○프로모터 탐색	10	100
	○유전양상의 파악여부	15	100
	○도축정보와의 연관성추정	15	100
	○원핵세포주에서 ADSF/resistin 단백질 생산	10	100
	○ADSF/resistin 단백질 정제 및 항혈청 제조	20	100
3차년도 (2005-2006)	○ 개체별 프로모터 염기서열 분석	20	100
	○ ADSF/resistin의 프로모터 DNA 다형분석	20	100
	○경제형질과의 연관성추정 -계획교배에 따른 유전자 다형양상 과 유전적상관분석	30	100
	○ADSF/resistin의 기능 조사	15	100
	○ADSF/resistin 단백질 발현 조사	15	100
최종평가	○한우 ADSF/resistin 유전자 cloning	20	100
	○한우 ADSF/resistin 다형양상과 유전적상관관계 검정	50	100
	○ADSF/resistin 특성 조사	30	100

## 제2절 관련분야에서의 기여도

한우 고급육 생산을 위한 사양기술, 육종기술 및 분자생물학적 접근 기술 등은 앞으로 지속적으로 이루어 질 것으로 사료된다. 본 과제에서는 2001년도에 발견된 지방세포 특이적 유전자를 한우에서 클로닝하고 이 유전자의 DNA다형현상이 한우 육질과 관련된 경제 형질과 어떤 상관 관계가 있는지 그리고 추후 기초 및 응용연구를 위하여 이 ADSF/resistin을 대량생산 할 수 있는 방안, 항체생성 방안 그리고 이 유전자의 특성 규명 등을 중점적 연구 대상으로 하여 실시하였다. 본 과제는 한우에서 최초로 이 유전자를 클로닝하여 NCBI genbank에 등록(accession number AY618903)하였으며, 최근에 promoter 부분까지 update 됨으로서 이 유전자를 이용한 타 연구자들의 한우 연구에 큰 기여를 할 것으로 기대된다. 즉, 이 유전자를 조절하기 위한 전사조절연구에는 반드시 promoter에 대한 정보가 필수인데 이를 손쉽게 genbank에서 확인하여 연구에 착수 할 수 있다. 이 번 연구의 핵심 부분인 DNA polymorphism과 한우의 경제형질의 연관 관계는 도체중, 등지방 두께, 근내지방도 등과 상관관계가 유의적으로 나타나는 것으로 보아 부분적으로 관련 분야 연구에 하나의 바이오마크로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이 유전자의 발현 및 단백질생산 시스템 구축과 항체생산, 그리고 이 유전자의 작용 특성 즉 지방세포 분화 억제 기능 등을 확인함으로써 관련 분야연구에 큰 기여를 할 것으로 사료된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 ADSF/resistin 유전자를 클로닝하였으며, 이 유전자의 효율적 발현 시스템 구축으로 단백질의 대량생산과 항체 생산 체계를 구축하였다. 무엇보다도 중요한 것은 본과제의 중요 부분중 하나인 ADSF/resistin polymorphism 과 한우 경제형질과의 상관관계 탐색에서 도체중, 등지방두께, 마블링등과 같은 형질과 유의성이 있는 것으로 밝혀졌다. 본 과제를 수행하면서 현재 2건의 SCI 논문에 관련 연구가 게재되었으며, 국내외 학술대회에서 11건의 논문을 발표하였다. 연구 기간 동안 지역신문과 방송에 4건 이상 홍보가 이루어 졌다. 또한 클로닝된 유전자는 미국 GenBank에 등록되었다. 본 연구를 수행하면서 얻은 연구성과를 바탕으로 타 연구에 활용 및 응용연구에 적용에 의해 3건의 과제가 선정되었다. 앞으로 본 연구결과를 더 분석하고 정리하여 1건의 국내논문과 1건의 국제논문을 발표할 예정이다. 또한 경제형질과 연관된 영역을 더 구체적으로 정리, 분석, 또는 필요한 경우 추가 연구를 통하여 이 유전자를 육질관련 바이오마크로 특허등록 할 예정이다.

연구성과:

1) 논문게재 2건, 제출예정 1건

Kim K. and Moon Y.S. 2003. Asian-Aust. J. Anim.Sci. Vol. 16(12): 1837-1841.

Kang, H.K., Ji A Park, Kang S. Seo, Sang H. Kim, Yun, J. Choi, and .Yang S. Moon. 2006. Asian-Aust. J. Anim.Sci.Vol. 19(3) 329-334.

Kim Sang H. et al., 2006. 한우 ADSF/resistin 단백질의 분리와 동정. J. of Biochemistry and Molecular Biology. (제출예정)

2) 한국동물자원과학회 발표 1건(2004년6월 24-25일):

국제학술학회발표 1건: 2004 AAAP 아시아 태평양축산학회, 말레이시아, 9월5일-9일

국제학술대회발표 1건: 2005 미국축산학회(ASAS Joint meeting, Ohio), 미국, 7월 24일-28일

한국동물자원과학회 2건 발표(2005년6월 23-24일, 전북대)

아시아 태평양 축산학회 4건 발표 예정 (2006년 9월 18일-9월 22일, 부산 벡스코)

3)한국지질.동맥경화학회(2003년 8월), 한국영양학회(2004년5월) 초청강연 2회

4)NCBI GenBank 한우 ADSF/resistin gene등록(accession number AY618903)

2006년 6월 한우 ADSF/resistin promoter추가로 AY618903의 update가 이루어짐.

5) ADSF/resistin gene polymorphism 과 경제형질과의 유의적인 상관관계확인

6) ADSF/resistin 단백질 발현 벡터구축 및 항체생산



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

-연구개발 과정중에 ADSF/resistin 유전자에 대한 지속적인 연구논문 발표(Kim et al, 2003; S대 et al., 2003)가 국내외적으로 이루어 지고 있으나 주로 사람과 실험동물을 대상으로 이루어 지고 있음. 그러나 가축을 대상으로 한 연구는 거의 없는 실정임.

Kim K. H., L. Zhao, Y. Moon, C. Kang and H. S. Sul. 2003. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor(ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. PNAS. 101(17):6780-6785.

Seo J. B., M. J. Noh, E. J. Yoo, S. Y. Park, J. Park, I. K. Lee, S. D. Park, J. B. Kim. 2003. Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein-alpha. Mol Endocrinol. 17(8):1522-33.

## 제 7 장 참고문헌

Ahima R. S. and J. S. Flier. 2000. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends Endocrinol Metab*, 11(8):327-332.

Banerjee R. R. and M. M. Lazar. 2001. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(28):25970-25973.

Beltowski J. 2003. Adiponectin and resistin—new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit*. 9(2):RA55-61.

Cao Z., R. M. Umek and S. L. McKnight. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*. 5(9):1538-1552.

Darlington G. J., S. E. Ross and O. A. MacDougald. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 273:30057-30060.

Degawa-Yamauchi M., J. E. Bovenkerk, B. E. Juliar, W. Watson, K. Kerr, R. Jones, Q. Zhu and R. V. Considine. 2003. Serum resistin(FIZZ3) protein is increased in obese human. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(11):5452-5455.

Fain J. N., A. K. Madan, M. L. Hiler, P. Cheema and S. W. Bahouth. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 145(5):2273-2282.

Gregoire F. M., C. M. Smas and H. S. Sul. 1998. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*. 78(3):783-809.

Hauner H. 2004. The new concept of adipose function. *Physiol Behav*. 83(4):653-658.

Kershaw E. E. and J. S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical Endocrinology & Metabolism*. 89(6):2548-2556.

Kim K. H., K. Lee, Y. S. Moon and H. S. Sul. 2001. A Cysteine-rich Adipose Tissue-specific Secretory Factor Inhibits Adipocyte Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(14):11252-11256.

Kim K. H., L. Zhao, Y. Moon, C. Kang and H. S. Sul. 2003. Dominant inhibitory adipocyte-specific secretory factor(ADSF)/resistin enhances adipogenesis and improves insulin sensitivity. *PNAS*. 101(17):6780-6785.

McTernan C. L., P. G. McTernan, A. L. Harte, P. L. Levick, A. H. Barnett and S. Kumar. 2002. resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *The Lancet*. 359(9300):46-47

Nogueiras R., R. Gallego, O. Gualillo, J. E. Caminos, T. Garcia-Caballero, F. F. Casanueva and C. Dieguez. 2003. Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett*. 548(1-3):21-27.

Oliver P., C. Pico, F. Serra and A. Palou. 2003. Resistin expression in different adipose tissue depots during rat development. *Mol Cell Biochem*. 252(1-2):397-400.

Patel L., A. C. Buckels, I. J. Kinghorn, P. R. Murdock, J. D. Holbrook, C. Plumpton, C. H. Macphee and S. A. Smith. 2003. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*. 300(2):472-476.

Rosen E. D., P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman and R. M. Mortensen. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *mol Cell*. 4(4):611-617.

Savage D. B., C. P. Sewter, E. S. Klenk, D. G. Segal, A. Vidal-Puig, R. V. Considine and S. O'Rahilly. 2001. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 50(10):2199-202.

Seo J. B., M. J. Noh, E. J. Yoo, S. Y. Park, J. Park, I. K. Lee, S. D. Park, J. B. Kim. 2003. Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein- $\alpha$ . *Mol Endocrinol.* 17(8):1522-33.

Steppan C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima and M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *nature.* 409(6818):307-312.

Steppan C. M. and M. A. Lazar. 2002. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism.* 13(1):18-23.

Sul H. S. 2004. Resistin/ADSF/FIZZ3 in obesity and diabetes. *TRENDS in Endocrinology and metabolism.* 15(6):247-249.

Way J. M., C. Z. Gorgun, Q. Tong, K. T. Uysal, K. K. Brown, W. W. Harrington, W. R. Oliver Jr, T. M. Willson, S. A. Kliewer and G. S. Hotamisligil. 2001. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem,* 276(28):25651-3.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.