

GOVP1199701909

제 2 차 년 도  
최 종 보 고 서

636,0821  
L 293호  
V.2

한우의 조기선발 및 친자확인을 위한 분자유전학적  
기법의 응용에 관한 연구

A Study on Application of Molecular Genetic Techniques  
for early Selection and Parentage Testing in Korean Cattle

연구기관

충남대학교 농업과학연구소

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한우의 조기선발 및 친자감별을 위한 분자유전학적 기법의 응용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1996년 12월 일

주관연구기관명 : 충남대학교 농업과학연구소  
총괄연구책임자 : 한 성 욱  
연 구 원 : 상 병 찬  
연 구 원 : 성 창 근  
연 구 원 : 이 창 수  
연 구 원 : 류 승 희  
연 구 원 : 이 상 훈  
연 구 원 : 김 진 호

협동연구기관명 : 축협중앙회 한우개량부  
협동연구책임자 : 신 형 두

# 요 약 문

## I. 제 목

한우의 조기선발 및 친자확인을 위한 분자유전학적 기법의 응용에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

한우는 우리나라의 대표적인 재래가축으로서 그 유전자원의 보존 및 유전능력의 향상은 우리나라 축산발전의 중요한 과제라고 생각된다.

한우의 유전자원 보존과 유전능력을 향상시키기 위해서는 순수한우의 혈통보존과 어린시기에 있어서의 효율적인 선발은 물론 정확한 혈통기록에 의한 유전능력의 평가는 선발효율을 보다 증대시켜 유전능력을 향상시키기 위한 필수적인 사항이다.

따라서 본 연구과제의 목적은 한우 사육농가나 사육기관에서 사육되는 한우의 조기선발시 선발의 효율성을 증대시키기 위한 방법을 모색하고, 종축에 대한 유전능력평가의 정확도를 보다 증대시키기 위하여 정확한 혈통확인 및 기록관리를 위한 개체 및 친자감별법과 순수한우의 유전자원 보존 및 개량을 위한 순수한우와 한우교잡종 차이에 대한 유전자 감식법을 연구개발하는데 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 내용 및 범위에 있어서 한우의 조기선발 보조수단의 개발은

한우 600두에 대한 혈액단백질의 유전자형 및 혈액형과 한우 200두에 대한  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG의 유전자형을 분석하고, 이들 개체에 대한 생시체중, 6개월령 체중 및 일당중체량을 측정하여, 이들 유전자형 및 혈액형과 산육형질간의 연관성이 높은 유전적 표지(genetic marker)를 한우의 조기선발시 선발 보조수단으로 이용하고자 하는데 있다.

한편 한우의 친자감별은 적혈구 항원인자에 의한 600두의 혈액형을 분석하여 친자감별을 실시하고, 또한 200두에 대한 BoLA-DRB3 DNA의 다형성을 분석하여 부, 모, 자에 대한 유전자 감식에 의한 친자감별을 실시하였다.

또한 한우와 한우교잡종간의 유전자감식은 순수한우의 보존 및 개량을 위한 순수한우와 한우교잡종간의 차이를 구명하기 위하여 한우, 한우교잡종, 샤로레종, 앵거스종으로 부터 DNA를 추출한 후, PCR을 이용한 RAPD기법에 의한 품종간의 DNA의 밴드양상을 비교분석하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

### 1. 연구개발 결과

한우의 조기선발 보조수단의 개발을 위한 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성에서 Tf D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 및 D<sub>2</sub>E 유전자형과 6개월령체중 및 일당중체량에서 우수한 것으로 나타나, 한우의 조기선발시 혈통, 생시체중 및 체형에 이들 유전자형을 갖는 개체를 선발하므로써 선발의 정확도를 보다 증대시킬 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 한우의 조기선발시 기존의 선발기준에 이들 유전자형을 선발보조수단으로 이용이 가능할 것으로 사료된다.

한편 한우의 친자감별법의 개발에 있어서 혈액형에 의한 친자감별은 높은

확률로의 친자감별이 가능하나, 분석방법이 다소 복잡한 것으로 사료되었으며, BoLA-DRB3 유전자감식에 의한 친자감별은 보다 간편하게 친자감별이 가능한 것으로 확인되었다.

또한 한우와 한우교잡종간 차이에 대한 유전자감식은 순수한우의 유전자감식 검출비율이 82%로 한우와 한우교잡종간 차이에 대한 유전자감식은 완벽한 판별은 되지않았으나, 높은 비율로서 판별이 가능하여 이들 방법을 좀 더 개발하면 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

## 2. 활용에 대한 건의 사항

가. 한우 혈액단백질의 유전자형에 의한 조기선발시 선발보조수단의 활용은 한우사육 및 검정기관에서 기존의 선발기준인 혈통, 생시체중 및 체형에 혈액단백질인 Tf의 유전자형을 선발보조수단으로 이용하므로서 선발효율을 보다 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

나. 한우의 정확한 유전능력평가를 위한 효율적인 혈통확인관리에 이용될 수 있는 혈액형 및 BoLA-DRB3 유전자감식에 의한 친자감별법의 활용은 종축개량기관이나 검정기관에서 친자감별기술을 이전하여 활용할시 정확한 혈통확인으로 보다 정확한 유전능력평가가 이루어져 선발효율을 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다.

다. 순수한우의 유전자원 보존과 개량을 위한 한우와 한우교잡종간 차이에 대한 유전자감식법의 개발은 순수한우의 유전자감식 검출율이 82.0%로 대체로 높은 편이나, 순수한우의 완전한 유전자감식 판별을 위하여 앞으로 이를 좀더 연구 보완후 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

여 백

## **SUMMARY**

### **A study on application of molecular genetic techniques for early selection and parentage testing in Korean cattle**

For the genetic resources conservation and improvement of genetic ability in Korean cattle, this study was carried out to find out the method of selection aid in early stage by the techniques of molecular genetics.

In addition, development of parentage testing for the clear evaluation of genetic ability from pedigree confirmation and recording management in Korean cattle and development of gene identification between Korean cattle and hybrid was also studied.

Those results are summarized as follows:

#### **1. Development of selection aid for early selection in Korean cattle**

In order to find out the method capable of high possibility of early selection in Korean cattle, blood proteins,  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin genotypes and blood types were analyzed by molecular genetics techniques in order to investigate the relationships with meat productivity and them.

Meat production traits are related significantly with transferrin(Tf) AD<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, and D<sub>2</sub>E genotypes which are belong to blood proteins.

It is concluded that if these genotypes are considered as a selection indicator with other factors with pedigree, initial body weight, and body types, meat productivity will be increased.

## **2. Development of parentage testing in Korean cattle**

For the clear evaluation of genetic ability from pedigree confirmation and recording management, the methods of parentage testing are studied by genetic analysis of BoLA-DRB3 exon2 and blood types.

Probability of parentage testing by blood factors of A, B, C, and S blood groups was 92.7%, suggestion that parentage testing is highly possible from blood type analysis.

In addition, parentage testing was possible with high probability by locus analysis of BoLA-DRB3 exon2 between parent and progeny.

If these all informations for the better selection are taken together, and considered for pedigree confirmation and recording management, meat productivity are thought to be increased.

## **3. Development of gene identification between Korean cattle and hybrid**

Genetic polymorphism was analyzed by RAPD(random amplified polymorphic DNAs) with Korean cattle, Korean cattle hybrid, charolais, and angus in order to find out the gene identification between Korean cattle and Korean cattle hybrid.

Random primer OPA-17 was very useful one to differentiate whether it is belong to pure Korean cattle or not, and gene identification ratio for pure Korean cattle was quite high to 82.0%. However, more study should be continued for the higher gene identification ratio in Korean cattle.

For the improvement of genetic ability in Korean cattle, if those results,



development of selection aid for early selection and study on parentage testing are employed in Korean cattle, it could be concluded that meat productivity in Korean cattle will be increased.

여 백

## Contents

<b>Chapter 1</b>	<b>Introduction</b> -----	15
<b>Chapter 2</b>	<b>Range and purpose of study</b> -----	17
1	Significance and purpose of study -----	17
2	Range and contents in each part of study -----	18
<b>Chapter 3</b>	<b>Development of selection aid early selection in Korean cattle</b> -----	21
1	Introduction -----	21
2	Methods and study contents -----	22
3	Results and discussion -----	30
4	Conclusion and summary -----	42
<b>Chapter 4</b>	<b>Development of parentage testing in Korean cattle</b> -----	47
1	Introduction -----	47
2	Methods and study contents -----	47
3	Results and discussion -----	54
4	Conclusion and summary -----	61
<b>Chapter 5</b>	<b>Development of gene identification between Korean cattle and hybrid</b> -----	63
1	Introduction -----	63

2	Methods and study contents -----	63
3	Results and discussion -----	67
4	Conclusion and summary -----	77
<b>Chapter 6 Total conclusion and summary -----</b>		<b>79</b>
1	Development of selection aid of early selection in Korean cattle -----	79
2	Development of parentage testing in Korean cattle ----	81
3	Development of gene identification between Korean cattle and hybrid -----	82
<b>Chapter 7 Application and product of study -----</b>		<b>83</b>
1	Expected product of study -----	83
2	Application way on expected product of study -----	84
<b>Chapter 8 References -----</b>		<b>85</b>

## 목 차

제 1 장 서론 -----	15
제 2 장 연구개발의 목적 및 범위 -----	17
제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성 -----	17
제 2 절 연구개발 분야별 내용 및 범위 -----	18
제 3 장 한우의 조기선발 보조수단의 개발 -----	21
제 1 절 서 설 -----	21
제 2 절 연구내용 및 방법 -----	22
제 3 절 결과 및 고찰 -----	30
제 4 절 결론 및 요약 -----	42
제 4 장 한우의 친자감별법 개발 -----	47
제 1 절 서 설 -----	47
제 2 절 연구내용 및 방법 -----	47
제 3 절 결과 및 고찰 -----	54
제 4 절 결론 및 요약 -----	61
제 5 장 한우와 한우교잡종 판별을 위한 유전자 감식법 개발-----	63
제 1 절 서 설 -----	63
제 2 절 연구내용 및 방법 -----	63

제 3 절 결과 및 고찰 -----	67
제 4 절 결론 및 요약 -----	77
제 6 장 종합결론 및 요약 -----	79
제 1 절 한우의 조기선발 보조수단의 개발 -----	79
제 2 절 한우의 친자감별법 개발 -----	81
제 3 절 한우와 한우교잡종 판별을 위한 유전자감식법 개발 ----	82
제 7 장 연구성과 및 활용계획 -----	83
제 1 절 기대되는 연구성과 -----	83
제 2 절 연구개발 성과에 대한 활용계획 -----	84
제 8 장 참고문헌 -----	85

## 제 1 장 서 론

최근 축산물 시장의 개방화로 국제 경쟁력 강화를 위한 축산물의 생산성 향상은 시급한 실정에 있으며, 특히 우리 나라의 주요 축종인 재래한우의 효율적인 선발과 능력개량을 위한 다각적인 연구와 노력이 절실히 요구되고 있다. 따라서 순수한우의 생산성 향상과 과학적인 유전능력 개량을 위하여서는 보다 효율적인 선발과 능력검정 및 혈통관리의 정확도를 제고하여 최신의 유전통계학적 기법에 의한 종축의 평가로 보다 유전능력이 우수한 종축을 선발 활용하여야 할 것이다.

한우 사육농가나 사육기관에서 한우에 대한 장래 생산성이 높은 소를 선발하고, 낮은 소를 도태하기 위하여서는 젖떼는 시기에 있어서의 조기선발은 필수적인 과정이다. 어린 가축에 있어서 선발의 기준은 혈통, 생시체중, 선발시점에 있어서의 체중과 외모를 들 수 있으며, 이러한 요소들은 장래의 생산성과 밀접한 연관성을 갖고 있어 효율적인 선발기준이 될 수 있다. 그러나 보다 효율적인 선발을 위해서는 산육형질과 연관성을 갖고 있는 요소를 기존의 조기 선발기준에 추가하므로써 보다 효율적인 선발로 생산성이 높은 소를 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 장래 생산능력이 저조한 소를 보다 효율적으로 조기에 도태할 수 있어 경영의 합리화를 도모할 수 있을 것으로 사료된다.

한편 유전능력이 우수한 종축을 선발하기 위한 능력검정 및 정확한 혈통관리기록 업무는 종축의 유전능력을 평가하는데 중요한 자료가 되고 있다. 특히 한우의 종모우를 평가하기 위하여서는 후대능력검정과 혈통기록은 필수적인 요소이다. 그러나 출산시 개체표식의 오류, 능력검정시에 개체표식의 탈락으로 인한 개체식별 및 친자감별이 어려운 경우와 유전능력분석 자료로 이용되는 농가사육 개체가 종축등록기관에 등록시 혈통을 확인하는 적절한 수단이 없이

단순히 기록에 의해서만 등록을 실시하여 혈통기록의 착오가 발생되어 유전능력분석의 효율성 및 정확도를 보다 감소시킬 수 있다. 따라서 정확한 혈통기록에 의한 유전능력 평가를 위하여 한우의 개체식별 및 친자감별기법의 개발이 시급히 요구되고 있다.

또한 우리나라에서 사육중인 재래한우는 오래전 육우 종모우의 혈액이 일부 한우에 혼입되어 외모적으로 식별이 불가능한 한우 교잡종이 순수 한우로 사육되고 있는 것으로 사료되는 바, 순수 한우의 유전자원 보존 및 개량을 위하여서는 이들의 식별을 위한 분자유전학적 판별방법의 개발이 시급히 요망된다.

따라서 본 연구과제의 목적은 한우 사육농가와 사육기관에서 한우의 조기 선발시에 기존의 선발기준인 혈통, 생시체중 및 체형을 보조하여 선발효율을 보다 증대시킬 수 있는 선발의 보조수단을 모색하고, 종축에 대한 유전능력평가의 정확도를 보다 제고시키기 위하여 정확한 혈통확인 및 기록관리를 위한 개체 및 친자감별방법과 순수 한우의 유전자원 보존 및 개량을 위한 순수한우와 한우교잡종의 판별을 위한 유전자감식법을 연구 개발하는데 있다.



## 제 2 장 연구개발의 목적과 내용 및 범위

### 제 1 절 연구 개발의 목적 및 중요성

한우는 우리나라의 대표적인 재래가축으로서 그 유전자원의 보존 및 유전능력의 향상은 우리나라 축산발전의 중요한 과제라고 생각된다. 한우의 유전능력을 보다 효율적으로 개량하기 위하여서는 효율적인 선발이 우선적인 과제라고 생각되며, 한우의 어린시기에 있어서의 선발시 기존의 선발기준에 한우의 산육능력과 연관성을 갖고 있는 유전적 표지(genetic marker)를 탐색하여, 이를 선발보조수단으로의 이용은 한우 조기선발시의 선발의 정확도를 보다 증대시켜 생산성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

한편 한우에 있어서 유전능력이 우수한 종축을 선발하기 위한 능력검정이나, 정확한 혈통관리 업무는 종축의 유전능력을 평가하는데 중요한 자료가 된다. 그러나 능력검정우나 혈통기록시의 오류에 의한 분석자료는 유전능력 평가의 정확도를 감소시켜 선발효율이 낮아져 생산성의 저하를 초래한다.

따라서 능력검정우의 정확한 혈통확인이나, 혈통기록우의 개체식별 및 친자감별에 의한 이들의 효율적인 혈통기록관리는 매우 중요하다고 생각된다.

또한 우리나라 재래한우는 고유한 풍미와 육질이 우수하여 재래한우에 대한 유전자원의 보존은 매우 중요한 과제라고 생각되나, 일부 재래한우에 오래 전 육우 혈액이 혼입되어 육안식별이 불가능한 한우교잡종이 순수한우로 사육되고 있는 바 순수한우의 판별법의 개발은 순수한우의 유전자원의 보존 및 개량을 위하여 중요한 과제라고 생각된다.

따라서 본 연구는 한우의 유전능력의 향상과 유전자원의 보존을 위해서 분자유전학적 기법을 응용하여 한우의 어린시기에 있어서의 선발에 보다 선발효

율을 증대시킬 수 있는 선발방법을 모색하고, 종축에 대한 유전능력평가의 정확도를 보다 증대시킬 수 있는 정확한 혈통관리를 위한 개체 및 친자감별방법의 개발과 순수한우의 유전자원 보존 및 개량을 위한 순수한우와 한우교잡종간의 차이점에 대한 유전자감식법을 연구개발하고자 수행하였다.

## 제 2 절 연구 분야별 내용 및 범위

### 1. 한우의 조기선발 보조수단의 개발

#### 가. 연구내용 및 범위

##### (1) 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

(가) 공시품종 및 두수 : 한우 600두

(나) 조사 및 분석 항목

- 조사항목 : 생시체중, 6개월령체중, 일당증체량
- 분석내용 : 혈액단백질의 유전자형 분석

(다) 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명을 위한 통계 분석

##### (2) 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성 구명

(가) 공시품종 및 두수 : 한우 600두

(나) 조사 및 분석항목

- 조사항목 : 생시체중, 6개월령체중, 일당증체량
- 분석내용 : 적혈구 항원에 의한 혈액형 분석

(다) 혈액형과 산육형질간의 연관성 구명을 위한 통계분석

##### (3) $\kappa$ -casein( $\kappa$ -CN) 과 $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG) 유전자형과 산육형질

## 간의 연관성 구명

(가) 공시품종 및 두수 : 한우 200두

(나) 조사 및 분석항목

- 조사항목 : 생시체중, 6개월령체중, 일당증체량
- 분석내용 :  $\kappa$ -CN과  $\beta$ -LG 유전자형 분석

(다)  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명을 위한 통계 분석

## 2. 한우의 친자감별법 개발

### 가. 연구내용 및 범위

(1) 한우의 혈액형에 의한 친자감별

(가) 공시품종 및 두수 : 한우 600두

(나) 분석내용 : 적혈구항원 혈액형 분석

(2) 한우의 유전자 감식에 의한 친자감별

(가) 공시품종 및 두수 : 한우 200두

(나) 분석내용 : BoLA-DRB3 exon2 유전자 분석

(3) 한우와 한우교잡종 차이에 대한 유전자 감식법 개발

(가) 공시품종 및 두수 : 한우, 한우교잡종, 샤로레종 및 앵거스종(200두)

(나) 분석내용 : RAPD(random amplified polymorphic DNAs)기법에 의한 한우와 한우교잡종간의 다형성 분석

여 백

## 제 3 장 한우의 조기선발 보조수단의 개발

### 제 1 절 서 설

분자생물학은 축산분야에 있어서 가축의 유전학적 해석과 유전능력 개량에 기여할 수 있는 보다 효율적인 도구로의 이용성이 다각적으로 모색되고 있다. 특히 최근에는 가축의 주요 경제형질과 관련을 갖고 있는 유전적 표지(genetic marker)의 탐색에 의하여 가축의 유전능력을 향상시키기 위한 선발 보조수단으로서의 이용에 대한 연구가 선진 외국에서는 활발히 진행되고 있다.

한우는 외국의 육우에 비하여 산육능력이 아주 낮아 산육능력의 향상이 아주 시급한 실정에 있으며, 한우의 선발에 있어서 장래 생산성이 높은 소를 선발하고, 낮은 소를 도태하기 위해서는 젖 떼는 시기에 있어서의 조기선발은 필수적인 과정이다. 어린 가축에 있어서 선발의 기준은 혈통, 생시체중, 선발시점에 있어서의 체중과 외모를 들수 있으며, 이러한 요소들은 장래의 생산성과 밀접한 연관을 갖고 있어 효율적인 선발기준이 될 수 있다. 그러나 보다 효율적인 선발을 위해서는 산육형질과 연관성을 갖고 있는 요소를 조기선발기준에 추가함으로써 보다 효율적인 선발로 생산성이 높은 소를 확보할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 한우의 조기선발시에 선발효율을 보다 증대시킬 수 있는 방법을 모색하기 위하여 한우의 혈액단백질의 유전자형 및  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자형, 그리고 혈액형과 산육형질간의 연관성을 구명하여 산육형질과 연관성이 높은 유전자형을 탐색하여 이들 유전적 표지를 선발 보조수단에 이용하고자 실시하였다.

## 제 2 절 재 료 및 방 법

### 1. 연구내용 및 공시재료

한우의 조기선발 보조수단을 개발하기 위한 연구내용별 공시재료는 표 3-1에 제시한 바와 같다.

표 3-1. 연구내용 및 공시재료

연구 내용	공 시 재 료
가. 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명	(1)공시품종 : 한우 (2)공시두수 : 600두
나. 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성 구명	(1)공시품종 : 한우 (2)공시두수 : 600두
다. $\kappa$ -casein 및 $\beta$ -lactoglobulin 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명	(1)공시품종 : 한우 (2)공시두수 : 200두

### 2. 연구 방법

#### 가. 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

##### (1) 혈액채취 및 체중측정

(가) 혈액채취 및 분리 : 한우의 경정맥에서 진공채혈관을 사용하여 약 10ml의 혈액을 채취하고, 3,000rpm으로 원심분리하여 혈청과 혈구를 분리하였으며, 시료는 -20℃ 냉동고에 보존하면서 용해하여 사용하였다.

(나) 체중측정 : 한우의 생시체중과 6개월체중을 측정함.

##### (2) 혈액 단백질의 유전적 다형분석

(가) 혈청단백질의 유전적 다형분석

혈청단백질인 albumin(Alb), post-albumin(pAlb), transferrin(Tf) 및 post-transferrin-2(pTf-2)의 유전적 다형분석은 Gahne 등(1977)과 Kraay(1982)의 방법을 약간 변형하여 실시하였으며, gel 제작용 완충액의 조성액과 용액별 조성비율은 표 3-2와 3-3에 나타낸 바와 같다.

표 3-2. Gel 제작용 완충액의 조성

Solutions	Compositions	Volumns
32% acrylamide (solution A)	Aacrylamide Bis-acrylamide dH <sub>2</sub> O	60g 1.5g 112ml
Tris-citrate buffer (solution B)	0.75M tris-solution 0.095M citric acid TEMED 2 mercaptoethanol	37.5ml 37.5ml 225 $\mu$ l 75 $\mu$ l
Ammonium persulphate (solution C)	Ammonium persulphate dH <sub>2</sub> O	0.26g 100ml

표 3-3. Gel 제작 용액별 조성비율

Acrylamide concentration(%)	Stock solution(ml)			dH <sub>2</sub> O(ml)	TEMED( $\mu$ l)
	A	B	C		
12	45	30	30	15	0
4	4	4	8	16	10
8	4	2	4	6	10

표 3-2와 3-3에서 보는 바와 같이 A, B, C용액과 증류수 및 TEMED를 혼

합하여 12%, 4% 및 8%의 세층으로 gel을 제작하였고, 전기영동의 전류는 60mA로 약 4시간 동안 전기영동을 하였으며, 겔의 염색 및 탈색은 영동 종료 후, 0.8% coomassie brilliant blue용액으로 20분간 염색한 후, 5% acetic acid로 탈색시켜 판독하였다.

#### (나) 혈청효소의 유전적 다형분석

혈청효소인 ceruloplasmin(Cp)과 amylase- I (Am-I)의 유전적 다형분석은 Kraay(1982)의 방법을 약간 변형하여 이용하였고, gel 조성용 완충액은 pH 7.5로 tris 1.69g, citric acid 0.84g에 증류수를 넣어 1,000ml로 만들었으며, 전극용 완충액은 pH 8.7로 boric acid 18.7g, sodium hydroxide 4.0g에 증류수를 넣어 1,000ml로 만들었다. Gel제작은 gel용 완충액에 전분을 넣어 만들었으며, 여과지에 혈장을 묻혀 10분간 200volt의 전압으로 영동하고 300volt 전압으로 전기영동한 후, gel을 0.5% O-tolidine 염색액에 넣어 incubator에서 12시간동안 반응한 후, 50% methanol용액으로 탈색하여 판독하였다.

#### (다) 혈구단백질의 유전적 다형분석

혈구단백질인 hemoglobin(Hb)의 분석은 Kraay(1982)의 방법을 약간 변형하여 이용하였고, gel 조성용 완충액은 tris, 20.2g, EDTA 2.2g을 증류수에 넣어 1000ml을 만들었으며, 전극용 완충액도 tris 20.0g, EDTA 2.2g을 증류수에 넣어 1000ml을 만들었다. Gel의 제작은 gel용 완충액에 전분을 넣어 만들었으며, 여과지에 50배 희석된 혈구를 묻혀 gel절단부위에 삽입후, 300volt로 45분간 전기영동한 후 직접판독하였다.

#### (3) 통계분석



혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명에 대한 분석은 다음과 같은 선형모형을 설정하여 Harvey(1975)의 최소자승법을 이용하여 통계분석을 하였다.

$$Y_{ijklmnopqr} = u + S_i + P_j + E_k + C_l + H_m + T_n + A_o + B_p + PT_q + PA_r + e_{ijklmnopqr}$$

$Y_{ijklmnopqr}$  = 각 개체의 관측치

$u$  = 전체 평균

$S_i$  =  $i$  번째 종모우의 효과

$P_j$  =  $j$  번째 산차의 효과

$E_k$  =  $k$  번째 성별의 효과

$C_l$  =  $l$  번째 분만 계절의 효과

$H_m$  =  $m$  번째 Hb좌위 유전자형의 효과

$T_n$  =  $n$  번째 Tf좌위 유전자형의 효과

$A_o$  =  $o$  번째  $A_{m-1}$ 좌위 유전자형의 효과

$B_p$  =  $p$  번째  $C_p$ 좌위 유전자형의 효과

$PT_q$  =  $q$  번째  $pTf-2$ 좌위 유전자형의 효과

$PA_r$  =  $r$  번째  $pAlb$ 좌위 유전자형의 효과

$e_{ijklmnopqr}$  = 각 개체에 대한 임의 오차,  $N(0, \sigma^2)$

#### 나. 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성 구명

##### (1) 혈액채취 및 체중측정

(가) 혈액채취 : 한우의 경정맥으로 부터 진공채혈관을 사용하여 약 10 ml의 혈액을 채취함.

(나) 체중측정 : 한우의 생시체중과 6개월령 체중을 측정함.

## (2) 혈액형의 분석

### (가) 적혈구 부유액의 제작

채취된 혈액을 1,500g로 5분간 원심분리하여 적혈구를 얻은 후, 생리식염수(0.89%, NaCl)를 사용하여 3-4회 원심세척하여 혈장성분을 완전히 제거한 적혈구는 생리식염수를 사용하여 1.5% 적혈구 부유액으로 만들어 4°C에서 냉장보관하여 사용하였다.

### (나) 표준항혈청

실험에 사용된 표준항혈청은 A, B, C, F, J, S 및 I System에 속하는 A1, A2, Z', B, G, H, Y2, A'2, B', E'2, E'3, I', J' ; C1, R1, R2, W, X1, X2 ; F, V, J, S, U1, U', U'' ; Z의 27종의 표준항혈청을 사용하였다.

### (다) 표준항혈청에 의한 적혈구 항원 혈액형분석

용혈반응에 사용되는 보체는 토끼혈청을 보체로 사용하기전 소 적혈구에 대한 비특이적 용혈소가 함유되어 있지 않은 것을 확인하기 위하여 혈구, 생리식염수 및 토끼혈청을 같이 넣어 반응시켰다.

용혈반응을 일으키지 않는 토끼혈청에 대하여 2진희석법(two fold dilution method)으로 보체의 역가를 측정하여 충분히 용혈반응을 일으킬 수 있을 정도로(역가;약4) 희석하여 사용하였다. 용혈반응은 96공의 U자형 microplate를 사용하여 관찰하였다. 각 표준항혈청을 검사할 적혈구 수에 맞추어 각 검사공에 30ul씩을 microplate자동분주기를 사용하여 분주하고, 대조로서 표준항혈청 대신 생리 식염수를 분주하였다. 여기에 1.5% 적혈구부유액을 각각 20ul씩 가하고 titer mixer로 혼합한 후, 약 15분간 정치시킨 다음 비특이적 용혈반응의 유무를 관찰하였다.

비특이적 용혈반응이 관찰되지 않은 공에 대하여 보체로서 신선한 토끼

혈청 30ul씩을 첨가하고 37℃ 항온기에 정치하였다. 용혈반응의 판독은 보체 첨가 후 1시간, 2시간 및 4시간의 3회에 걸쳐 실시하였으며, 용혈의 정도는 잔존혈구 비율에 따라 다음과 같이 육안으로 판정하였다. 즉 비용혈 : 0, 혼적정도의 용혈 : 1, 50%의 용혈 : 2, 75%의 용혈 : 3, 혼적정도의 혈구잔존 : 3+ 및 완전한 용혈 : 4의 7가지로 구분하였다.

### (3) 통계분석

혈액형과 산육형질간의 연관성 구명에 대한 분석은 선형모형을 설정하여 Harvey(1975)의 최소자승법을 이용하여 통계분석하였다.

다. 한우의  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

#### (1) 혈액채취 및 체중 측정

(가) 혈액채취 : 한우 경산우의 경정맥으로 부터 진공채혈관을 사용하여 약 10ml의 혈액을 채취함.

(나) 체중측정 : 경산우 자손의 생시체중과 6개월령 체중을 측정함.

#### (2) Genomic DNA의 추출

한우의 경정맥에서 채취된 혈액 10ml를 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 백혈구(buffy coat)를 얻었다. 순수 백혈구만을 얻기 위하여 500ul의  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (0.2M)을 가하여 잔여 적혈구 및 혈장을 제거하였으며, STE(0.1M NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 300ul를 가하여 백혈구를 용해하고, Proteinase-K(Promega, 10mg/ml)와 SDS(20%)를 각각 30ul씩 첨가하여 65℃의 water bath에서 2시간 30분 동안 정치시켜 단백질을 분해한 후, Molecular Cloning(A laboratory manual, Second Edition, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1989)의 방법을 이용하여 DNA추출하였다.

### (3) $\kappa$ -CN 과 $\beta$ -LG 유전자 분석

#### (가) Primer의 선정

$\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자좌의 증폭을 위해 사용된 primer는 표 3-4에 제시한 바와 같으며,  $\kappa$ -CN의 경우 530bp의 단편을 증폭시킬 수 있는 primer로 Denicourt 등(1990)에 의해 보고된 25개의 염기로 이루어진 primer를 이용하였고,  $\beta$ -LG의 경우는 262bp의 단편을 증폭시킬 수 있는 것으로 Medrano와 Aguilar-Cordova(1990)에 의해 보고된 25개의 염기로 이루어진 primer를 사용하였다.

표 3-4.  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전자좌위 증폭 primer

Primer	염기서열	단편길이
$\kappa$ -CN	5'-ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT GA(A/G) T-3' 5'-TTT ATT AAT AAG TCC ATG AAT CCT G-3'	530bp
$\beta$ -LG	5'-GTC CTT GTG CTG GAC ACC GAC TAC A-3' 5'-CAG GAC ACC GGC TCC AGG TAT ATG A-3'	262bp

#### (나) 유전자좌의 증폭

$\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자좌의 증폭반응을 위해 사용한 reaction mixture의 조성은 표 3-5에 나타난 바와 같으며,  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자좌위의 증폭을 위해 설정한 온도조건은 표 3-6과 같다.

표 3-5.  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자 증폭 반응을 위한 혼합물의 조성

혼합물	$\kappa$ -CN	$\beta$ -LG
10 X reaction buffer	2.5ul(1X)	2.5ul(1X)
dNTP	1.0ul(100uM)	0.8ul(80uM)
Primer 1	0.5ul(1uM)	0.3ul(0.6uM)
Primer 2	0.5ul(1uM)	0.3ul(0.6uM)
Taq DNA polymerase	0.4ul(2U)	0.3ul(1.5U)
dH <sub>2</sub> O	18.1ul	18.8ul
Genomic DNA	2.0ul	2.0ul
합계	25.0ul	25.0ul

(다) 제한효소의 처리

증폭된  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자좌의 다형성을 분석하기 위해 사용한 제한효소는 표 3-7에 제시한 바와 같으며,  $\kappa$ -CN의 경우 PCR증폭산물10ul에 0.3ul(10U)의 Taq I (Boehringer Mannheim, cat. #567 671; Denicourt 등, 1990) 과 1.7ul의 incubation buffer 및 3ul의 dH<sub>2</sub>O로 이루어진 혼합물 5ul를 가하여 65°C에서 2시간 동안 digestion하였다.

표 3-6.  $\kappa$ -CN 과  $\beta$ -LG 유전자 증폭 온도조건

반응과정	온도조건	
	$\kappa$ -CN	$\beta$ -LG
Denaturation	95°C - 5min	94°C - 5min
Denaturation	95°C - 30sec	94°C - 30sec
Annealing	53°C - 45sec	63°C - 30sec
Extension	73°C - 1min	72°C - 40sec
Extension	73°C - 10min	72°C - 10min

} 45 cycles
} 35 cycles

표 3-7. 제한효소에 의한  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG유전자의 digestion을 위한 혼합물의 조성

혼 합 물	$\kappa$ -CN	$\beta$ -LG
	Taq I	Hae III
Enzyme	0.3 ul	0.5 ul
Buffer	1.7 ul	1.5 ul
dH <sub>2</sub> O	3.0 ul	3.0 ul
PCR product	10.0 ul	10.0 ul
합 계	15.0 ul	15.0 ul

$\beta$ -LG는 증폭산물 10ul에 0.5ul(10U/ul)의 Hae III(Promega. cat/ #R6171; 정 등, 1994)와 1.5ul의 incubation buffer 및 3ul의 dH<sub>2</sub>O로 이루어진 혼합물 5ul를 가하여 37°C 에서 1시간 15분 동안 digestion하였다.

#### (라) 전기영동 및 판별

제한효소 처리 후 얻어진 제한효소 단편들(RFLPs)의 다형성을 확인하기 위해서 전기영동을 실시하였으며,  $\kappa$ -CN의 경우 3% agarose gel(1X TBE : tris-orate EDTA)상에서 100V로 약 50분간 영동하였고, 8% PAGE gel(1X TBE)에서 20mA로 약 1시간 30분동안 영동한 후, gel은 ethidium bromide로 염색하여 UV상에서 그 다형성을 확인하였다.

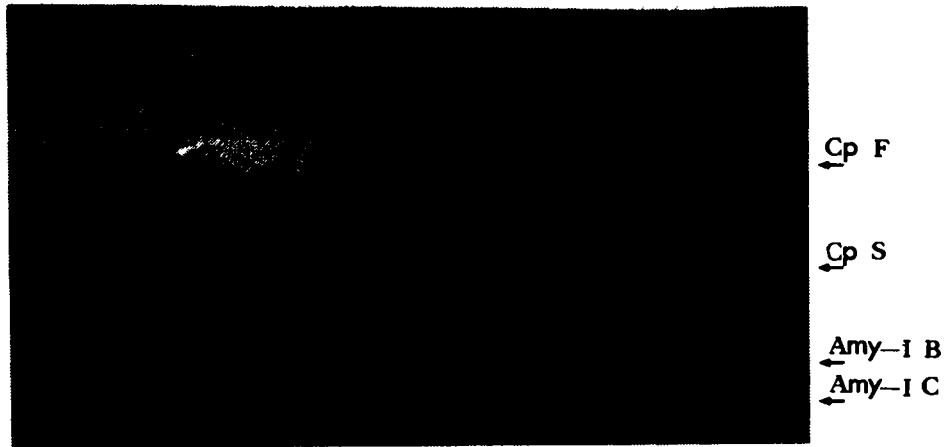
### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

##### 가. 혈액단백질의 전기 영동상과 유전자형 분포

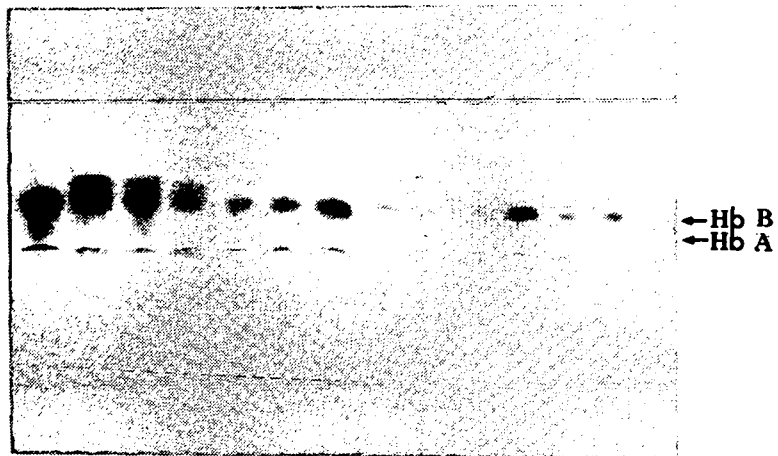
한우의 혈청단백질인 transferrin(Tf), post-transferrin-2(pTf-2),





Cp FS FF FS FF SS FF SS FS FF FS SS FF FF SS SS SS FF  
 Amy-I CC CC BC CC BB CC CC BC BC BC CC BB CC CC CC CC BB

그림 3-2. 한우의 혈청효소인 Cp와 Amy-I의 전기영동 양상



Hb AA AB AB AB AA AA AA AA AA AA AA AA AA AA

그림 3-3. 한우의 혈구단백질인 hemoglobin의 전기영동 양상



표 3-8. 한우 혈액단백질의 유전자형의 분포

혈액단백질	유전자형	출현두수 및 비율	
		두수	비율(%)
Hb	AA	491	76.5
	AB	136	21.2
	BB	15	2.3
Tf	AA	33	5.1
	AD <sub>1</sub>	80	12.5
	AD <sub>2</sub>	95	14.8
	AE	79	12.3
	D <sub>1</sub> D <sub>1</sub>	39	6.1
	D <sub>1</sub> D <sub>2</sub>	80	12.5
	D <sub>1</sub> E	80	12.5
	D <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	35	5.5
	D <sub>2</sub> E	89	13.9
	EE	32	5.0
Am-I	BB	71	11.1
	BC	267	41.6
	CC	304	47.4
Cp	AA	63	9.8
	AC	284	44.2
	CC	295	46.0
pTf-2	FF	265	41.3
	FS	319	49.7
	SS	58	9.0
pAlb	FF	244	38.0
	FS	283	44.1
	SS	115	17.9

Alb AA형만 확인되었다. 한편 pAlb의 유전적다형은 pAlb F와 S의 2종류의 대립유전자가 검출되어 pAlb FF, FS 및 SS의 3종류의 유전자형이 확인되었다.

또한 그림 3-2에서 보는 바와 같이 혈청효소의 유전적 다형분석 결과, Cp는 Cp

F와 S의 2개 대립유전자가 검출되었고, 유전자형은 Cp FF, FS 및 SS의 3종류가 확인되었으며, Am-I의 대립유전자는 Am-I B와 C가 검출되었고, 유전자형은 Am-I BB, BC 및 CC의 3종류가 확인되었다.

표 3-8에서 보는 바와 같이 혈액단백질들의 유전자형분포에 있어서 Tf의 유전자형의 분포는 Tf AD<sub>1</sub>, AD<sub>2</sub>, AE, D<sub>1</sub>D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>E 및 D<sub>2</sub>E형이 대체로 높은 빈도를 보였으며, pTf-2 및 pAlb의 유전자형 분포는 각각 pTf-2 SS 및 pAlb SS형이 대체로 낮은 빈도를 보인 반면에, Cp는 Cp FS 및 SS형이 높은 유전자형의 빈도를 보였고, Am-I 과 Hb의 유전자형은 Am-I BB 및 Hb BB형에서 낮은 빈도의 분포를 보였다.

#### 나. 혈액 단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성

한우의 혈액 단백질의 유전자형과 생시체중, 6개월체중 및 일당중체량과의 연관성을 분석한 결과는 표 3-9와 같다.

표 3-9에서 보는 바와 같이 Tf의 유전자형에 따른 산육형질의 연관성은 Tf D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 및 D<sub>2</sub>E 유전자형에서 6개월체중이 각각 123.333kg, 124.516kg 및 123.769kg과 일당중체량에서 각각 0.563, 0.566 및 0.567kg으로 다른 유전자형에 비하여 유의성있게 높은 6개월 체중과 일당 중체량을 보였다.

따라서 한우의 어린 시기에 있어서의 조기 선발시 선발기준인 혈통, 생시체중 및 체형과 더불어 혈청 단백질인 Tf D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 및 D<sub>2</sub>E 유전자형(유전적

표 3-9. 한우 혈액단백질의 유전자형과 산육형질의 최소자승 평균

혈액단백질	유전자형	체중(kg)		일당증체량 (kg)
		생시체중	6개월령 체중	
Hb	AA	21.865	115.117	0.518
	AB	22.169	117.649	0.530
	BB	21.502	122.519	0.561
Tf	AA	21.519	116.053	0.525
	AD <sub>1</sub>	21.755	111.687	0.499
	AD <sub>2</sub>	22.101*	117.979	0.532
	AE	21.997	117.708	0.531
	D <sub>1</sub> D <sub>1</sub>	21.147	112.501	0.507
	D <sub>1</sub> D <sub>2</sub>	21.855	123.333*	0.563*
	D <sub>1</sub> E	21.864	115.707	0.521
	D <sub>2</sub> D <sub>2</sub>	22.601*	124.516*	0.566*
	D <sub>2</sub> E	21.593	123.769*	0.567*
	EE	22.020	121.026	0.550
Am-I	BB	21.525	120.867	0.520
	BC	22.426*	116.882	0.543
	CC	21.739	117.532	0.546
Cp	AA	21.523	120.871	0.551
	AC	22.274*	116.882	0.525
	CC	21.739	117.532	0.532
pTf-2	FF	21.933	117.027	0.528
	FS	22.047	119.464	0.541
	SS	21.556	118.793	0.540
pAlb	FF	21.838	119.215	0.540
	FS	21.994	116.783	0.526
	SS	21.704	119.286	0.542

\* : P < 0.05

표지)을 갖는 개체를 선발시 선발 효율을 보다 증대시켜 산육성을 높일 수 있을 것으로 판단 되었다.

한편 다른 단백질의 유전자형에 있어서는 Cp의 FS형에서 생시체중과 유의적인 연관성을 갖고 있을 뿐 유전자형과 산육형질간에 유의적인 연관성은 보이지 않았다.

## 2. 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성 구명

### 가. 한우의 혈액형 분포

한우의 의한 A, C 및 S 혈액형계의 적혈구 항원 혈액형의 분포는 표 3-10에 나타낸 바와 같다.

표 3-10에서 보는 바와 같이 A 혈액형계에서는 A1 및 A1Z' 혈액형에서 각각 51.14 및 37.78%로 대체로 높은 빈도를 보였으며, C 혈액형계에서는 X1X2, X2 혈액형이 각각 12.14 및 19.27%로 나타났고, S 혈액형계에서는 S, U1 및 U' 혈액형이 각각 13.38, 10.77 및 17.75%로 대체로 높은 빈도 비율을 보였다.

### 나. 혈액형과 산육형질간의 연관성

한우의 혈액형과 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량간의 연관성을 분석한 결과는 표 3-11과 같다.

표 3-11에서 보는 바와 같이 A 와 C 혈액형계의 혈액형과 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량 간에는 유의적인 연관성이 없는 것으로 나타났으나, S 혈액형계의 혈액형과 산육형질과의 연관성은 S, U1, U' 및 SU' 혈액형에서 6개월령체중이 각각 125.551, 127.189, 128.282 및 128.685kg과 일당증체량에서 각각 0.571, 0.580, 0.584 및 0.588kg으로 다른 혈액형에 비하여 유의성 있게 높

표 3-10. 한우의 혈액형계와 혈액형 종류 및 분포

혈액형계	혈액형	혈액형 분포	
		두수	비율(%)
A system	Null	61	9.26
	A1	337	51.14
	A1Z'	249	37.78
	Z'	12	1.82
C system	Null	105	15.93
	C1C2X2	43	6.53
	C2X1X2	51	7.74
	C2X2	39	5.92
	R2WX2	19	2.88
	R2X1	11	1.67
	R2X2	18	2.73
	W	35	5.31
	W*	13	1.97
	WX2L'	29	4.40
	X1	51	7.74
	X1X2	80	12.14
	X1X2L'	15	2.28
	X2	127	19.27
	X2L'	23	3.49
S system	Null	134	20.33
	JU'	45	6.83
	S	75	11.38
	SU1	30	4.55
	SU1U''	32	4.86
	U1	71	10.77
	U1U'	26	3.95
	U1U''	23	3.49
	U1U''*	34	5.16
	U'	117	17.75
	SU'	34	5.16
	U'U''	38	5.77

표 3-11. 한우의 혈액형과 산육형질의 최소자승 평균

혈액형계	혈액형	체중(kg)		일당증체량 (kg)
		생시체중	6개월령체중	
A system	Null	22.823	120.388	0.542
	A1	22.364	119.907	0.541
	A1Z'	22.357	121.237	0.549
	Z'	22.696	119.406	0.537
C system	Null	22.349	127.355	0.577
	C1C2X2	22.213	118.135	0.532
	C2X1X2	22.511	120.050	0.577
	C2X2	21.872	122.792	0.553
	R2WX2	22.387	125.952	0.572
	R2X1	23.159	125.257	0.536
	R2X2	21.156	123.267	0.539
	W	22.341	127.643	0.568
	W*	22.958	124.660	0.510
	WX2L'	22.628	123.516	0.562
	X1	22.927	122.051	0.565
	X1X2	22.855	121.029	0.550
	X1X2L'	22.681	118.183	0.545
	X2	22.762	123.647	0.560
X2L'	21.634	121.867	0.556	
S system	Null	22.972	118.862	0.532
	JU'	21.683	115.005	0.518
	S	22.735*	125.551*	0.571*
	SU1	22.577	123.302	0.559
	SU1U''	22.735	127.189*	0.580*
	U1	22.434	127.894	0.585*
	U1U'	22.472	116.189	0.520
	U1U''	22.216	112.502	0.501
	U1U''*	23.111*	128.282*	0.584*
	U'	22.755*	121.750	0.549
	SU'	22.710	128.685*	0.588*
	U'U''	23.255*	117.146	0.521

\* : P < 0.05

은 산육성을 보였다.

따라서 한우의 어린 시기에 있어서의 조기 선발시 기존의 선발기준인 혈통, 생시체중 및 체형과 더불어 S 혈액형계의 S, U1, U' 및 SU' 혈액형의 유전적 표지를 보유한 개체를 선발시 선발 효율을 보다 증대 시킬수 있을 것으로 사료되었으나, 이 방법은 표준항혈청의 생산 및 혈액형의 판정에 복잡한 절차와 혈액형의 종류가 많아 이들에 의한 선발은 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

### 3. 한우의 $\kappa$ -CN 및 $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

#### 가. $\kappa$ -CN 및 $\beta$ -LG 유전자의 전기영동양상과 유전자형 분포

한우의 유즙 단백질에 관여하는  $\kappa$ -CN 유전자의 변이체의 전기영동상은 그림 3-4 와 같고, 이의 모식도는 그림 3-5와 같으며,  $\beta$ -LG 유전자의 변이체에 대한 전기영동양상과 모식도는 그림 3-6 및 3-7에 나타난 바와 같고, 유전자형의 분포는 표 3-12에 제시한 바와 같다.

그림 3-4에서 보여주는 바와 같이 genomic DNA를 제한 효소 Taq I 으

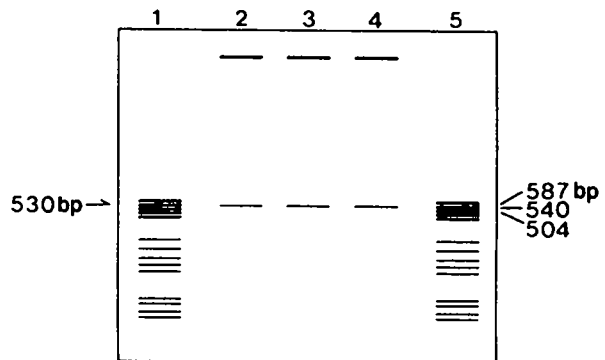
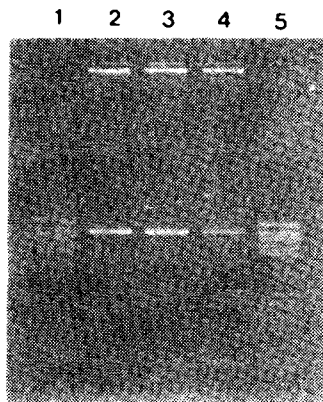


그림 3-4.  $\kappa$ -CN 유전자의 전기영동양상

그림 3-5.  $\kappa$ -CN 유전자의 전기영동양상 모식도

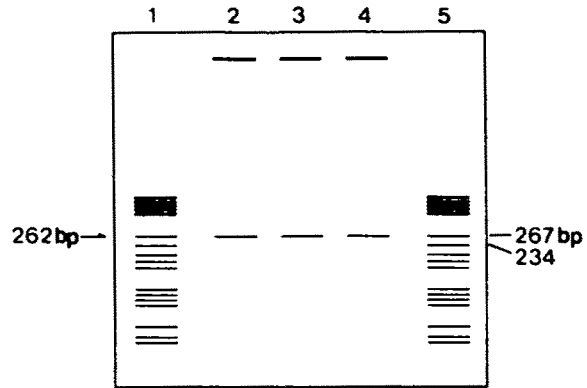
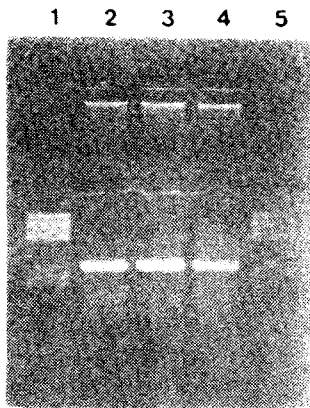


그림 3-6.  $\beta$ -LG 유전자의 전기 영동 양상

그림 3-7.  $\beta$ -LG 유전자의 전기 영동 양상 모식도

표 3-12.  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전자형의 분포

유단백질	유전자형	유전자형 분포	
		두수	비율(%)
$\kappa$ -CN	AA	117	46.2
	AB	99	39.1
	BB	37	14.6
$\beta$ -LG	AA	17	6.7
	AB	66	26.1
	BB	170	67.2

로 절단한 후 전기영동한 결과 Lane 2와 5는  $\kappa$ -CN AA 유전자형으로 530bp의 단편만을 나타내었고, Lane 4와 7은  $\kappa$ -CN BB형으로 344bp와 186bp의 두 단편이 나타났으며, Lane 3과 6에서는  $\kappa$ -CN AB형으로 530bp, 344bp 및



186bp의 3개의 단편이 나타났다.

한편 그림 3-6에 나타난 바와 같이 genomic DNA를 제한효소 Hae III로 절단한 후 전기 영동한 결과 Lane 2와 5는  $\beta$ -LG의 AA 유전자형으로 153bp와 109bp의 2개의 단편으로 나타났고, Lane 4와 7은  $\beta$ -LG BB 유전자형으로 109bp, 79bp 및 74bp의 3개의 절단된 단편을 보였으며, Lane 3과 6은  $\beta$ -LG AB 유전자형으로 153bp, 109bp, 79bp 및 74bp의 4개 단편으로 나타났다.

표 3-12에서 보는 바와 같이  $\kappa$ -CN의 유전자형은  $\kappa$ -CN AA, AB 및 BB 형으로 분류되었으며, 이들 유전자형의 분포는 각각 46.2, 39.1 및 14.6%이었고,  $\beta$ -LG의 유전자형 분포는  $\beta$ -LG AA, AB 및 BB 형에서 각각 6.7, 26.1 및 67.2%이었다.

#### 나. $\kappa$ -CN 및 $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성

한우의 유즙 단백질 지배 유전자인 경산우의  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG의 유전자형과 이들 새끼의 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량간의 연관성을 분석한 결과는 표 3-13과 같다.

표 3-13.  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전자형별 최소자승 평균

유단백질	유전자형	체중(kg)		일당증체량(kg)
		생시체중	6개월령체중	
$\kappa$ -CN	AA	22.568	126.318	0.576
	AB	23.104	130.611	0.597
	BB	21.848	128.847	0.588
$\beta$ -LG	AA	23.33	126.041	0.570
	AB	22.658	130.178	0.597
	BB	22.531	129.557	0.594

표 3-13에서 보는 바와 같이  $\kappa$ -CN의 유전자형과 산육형질간의 연관성에 있어서는  $\kappa$ -CN AB형에서 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량에서 각각 23.104, 130.611 및 0.597kg으로 다른 유전자형에 비해 높은 산육성을 나타냈으나 통계적인 유의성은 인정 되지 않았으며,  $\beta$ -LG의 유전자형과 산육형질간의 연관성에 있어서도  $\beta$ -LG AB형에서 6개월령체중과 일당증체량이 각각 130.178 및 0.597kg으로 다른 유전자형에 비하여 높았으나, 통계적인 유의성은 인정되지 않았다.

따라서 이들 유전자형에 의한 유전적 표지(genetic marker)를 한우의 조기선발 보조수단으로의 이용은 어려울 것으로 사료되나, 이는 조사두수가 적기 때문에 앞으로 조사두수를 더 증가하여 분석한 후 결론을 내려야 할 것으로 판단된다.

#### 제 4 절 결론 및 요약

본 연구는 한우의 조기선발시에 선발효율을 보다 증대시킬 수 있는 방안을 모색하기 위하여 한우의 혈액단백질의 유전자형,  $\kappa$ -CN과  $\beta$ -LG 유전자형 및 혈액형과 산육형질간의 연관성을 분석하였던 바, 결과 연구의 내용별 얻어진 결과는 다음과 같다.

##### 1. 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성

한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성을 구명하기 위하여 한우 642두에 대한 혈액단백질인 transferrin(Tf), post-transferrin-2(pTf-2), albumin(Alb), post-albumin(pAlb), ceruloplasmin(Cp), amylase-I(Am-I) 및 hemoglobin(Hb)의 유전적 다형을 분석하고, 한우의 생시체중, 6개월령체중 및

일당증체량을 측정하여 이들 유전자형과 산육형질간의 연관성을 분석하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 혈청단백질인 Tf은 Tf A, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> 및 E의 대립유전자가 검출되었으며, 유전자형에 있어서는 Tf AA, AD<sub>1</sub>, AD<sub>2</sub>, AE, D<sub>1</sub>D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>E, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>E 및 EE형이 확인되었고, pTf-2 및 pAlb는 F와 S의 대립유전자가 검출되었으며, 이들의 유전자형은 FF, FS 및 SS형으로 확인되었다.

나. 혈청효소인 Cp는 F와 S의 대립유전자가 검출되었고, 유전자형에 있어서는 FF, FS 및 SS형이 확인되었고, Am-I는 B와 C 대립유전자가 검출되었으며, 유전자형에 있어서는 Am-I BB, BC 및 CC형이 확인되었고, 혈구단백질인 Hb는 A와 B 대립유전자가 검출되었으며, 유전자형에 있어서는 Hb AA, AB 및 BB형이 있는 것으로 확인되었다.

다. 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성에 있어서는 Tf 유전자형들 중 Tf D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 및 D<sub>2</sub>E형이 6개월령체중에서 각각 123.333kg, 124.516kg 및 123.769kg과 일당증체량에서 각각 0.563, 0.566 및 0.567kg으로 유의성있게 높은 산육성을 보였으며, 다른 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간에는 유의성을 보이지 않았다.

라. 이상의 결과를 종합하여 볼때 한우의 어린시기에 있어서의 조기선발시 기존의 선발기준에 혈청단백질인 Tf D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 및 D<sub>2</sub>E 유전자형을 선발보조수단으로 활용시 선발효율을 보다 증대시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

## 2. 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성

한우의 적혈구항원 혈액형과 산육형질간의 연관성을 구명하기 위하여 한우의 A, C 및 S혈액형계의 혈액형과 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량과의 연관성을 분석하였는 바 얻어진 결과는 다음과 같다.

가. A혈액형계에서는 A1, A1Z' 및 Z'의 3종류의 혈액형이 검출되었으며, C혈액형계에서는 C1C2X2, C2X1X2, C2X2, R2WX2, R2X1, R2X2, W, W\*, WX2L', X1, X1X2, X1X2L', X2 및 X2L'의 14종류의 혈액형이 검출되었고, S혈액형계에서는 JU', S, SU1, SU1U'', U1, U1U', U1U'', U1U''\*, U', SU' 및 U'U''의 11종류의 혈액형이 확인되었다.

나. 혈액형과 산육형질간의 연관성에 있어서는 S혈액형계의 S, SU1U'', U1U''\*, 및 SU' 혈액형에서 6개월령체중이 각각 125.551, 127.189, 128.282 및 128.665kg과 일당증체량에서 각각 0.571, 0.580, 0.584 및 0.588kg으로 유의성있게 높은 산육성을 보였으나, 다른 혈액형계의 혈액형과 산육형질간에는 유의성을 나타내지 않았다.

다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 한우의 조기선발시 기존의 선발방법에 S혈액형계의 S, SU1U'', U1U''\* 및 SU'혈액형을 선발보조수단으로 활용시 선발효율을 증대시킬 수 있을 것으로 사료되었으나, 혈액형은 분석이 복잡하고 혈액형의 종류가 아주 많아 선발보조수단으로 이들 혈액형의 이용은 좀더 연구 검토되어야 할 것으로 사료된다.

### 3. $\kappa$ -CN 및 $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

한우의 유즙단백질과 밀접한 연관을 갖고 있는  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성을 구명하기 위하여 경산우 253두의  $\kappa$ -casein( $\kappa$ -CN) 및  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG) 유전자형을 분석하고, 이들 자손의 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량을 측정하여 이들 유전자형과 산육형질간의 연관성을 분석하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 유즙단백질인  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG은 각각 A와 B 대립유전자가 검출되었으며, 유전자형은  $\kappa$ -CN과  $\beta$ -LG에서 AA, AB 및 BB 유전자형이 확인되었다.

나.  $\kappa$ -CN AB형 및  $\beta$ -LG AB형에서 6개월체중이 각각 130.611 및 130.178kg과 일당증체량에서 각각 0.597 및 0.597kg으로 다른 유전자형에 비하여 다소 높은 산육성을 보였으나, 유의성은 보이지 않았다.

다.  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간에는 통계적 유의성이 인정되지 않아 이들 유전자형에 의한 한우의 조기선발 보조수단으로의 이용은 어려울 것으로 사료되나, 조사두수가 적기 때문에 앞으로 좀더 많은 두수의 유전자형과 산육형질간의 연관성을 분석하여, 이의 이용성 여부를 판단하여야 할 것으로 사료된다.

여 백

## 제 4 장 한우의 친자 감별법 개발

### 제 1 절 서 설

한우에 있어서 유전능력이 우수한 종축을 선발하기 위해서 능력검정 및 정확한 혈통관리 업무는 종축의 유전능력을 평가하는데 중요한 자료가 되고 있다. 특히 한우의 종모우를 평가하기 위해서는 후대능력검정 및 혈통기록은 필수적인 요소이다. 그러나 출산시 개체표식의 오류, 능력검정중 개체표식의 탈락으로 개체식별 및 친자감별이 어려운 경우와 유전능력 분석자료로 이용되는 농가의 사육개체가 종축등록기관에 등록시 혈통을 확인할 수 있는 적절한 수단이 없어 단순히 기록에 의해서만 등록을 실시할 경우 혈통기록의 착오가 발생되어 유전능력분석 결과의 정확도를 보다 감소시켜 효율적인 선발이 이루어 질 수 없다고 사료된다.

따라서 본 연구는 정확한 혈통확인 및 기록에 의한 유전능력 평가를 위하여 개체식별 및 친자감별이 시급히 요청되고 있어 혈액형이나 유전자감식에 의한 친자감별법을 개발하여 친자감별에 의한 유전능력 분석자료의 정확도를 증대시켜 보다 효율적인 선발업무를 기하고자 실시하였다.

### 제 2 절 연구내용 및 방법

#### 1. 연구내용 및 공시재료

본 연구의 연구내용별 공시품종 및 두수는 표 4-1에 제시한 바와 같다.

표 4-1. 연구내용 및 공시두수

연구 내용	공시 재료
가. 한우의 혈액형에 의한 친자감별	(1)공시품종 : 한우 (2)공시두수 : 600두
나. 한우의 유전자감식에 의한 친자감별	(1)공시품종 : 한우 (2)공시두수 : 200두

## 2. 연구방법

### 가. 한우의 혈액형에 의한 친자감별

(1) 혈액채취 : 한우의 경정맥으로부터 진공채혈관을 사용하여 약 10ml의 혈액을 채취함.

(2) 혈액형의 분석

(가) 적혈구 부유액의 제작

채취된 혈액을 1,500g로 5분간 원심분리하여 적혈구를 얻은 후, 생리식염수(0.89%, NaCl)를 사용하여 3-4회 원심세척하여 혈장성분을 완전히 제거한 후 적혈구를 생리식염수를 사용하여 1.5% 적혈구 부유액으로 만들어 4℃에서 냉장보관하여 사용하였다.

(나) 표준항혈청

실험에 사용된 표준항혈청은 A, B, C, F, J, S 및 I System에 속하는 A1, A2, Z', B, G, H, Y2, A'2, B', E'2, E'3, I', J' ; C1, R1, R2, W, X1, X2 ; F, V, J, S, U1, U', U'' ; Z의 27종의 표준항혈청을 사용하였다.

(다) 표준항혈청에 의한 적혈구항원 혈액형 분석

용혈반응에 사용되는 보체는 신선한 토끼혈청을 보체로 사용하기전 소 적혈구에 대한 비특이적 용혈소가 함유되어 있지 않은 것을 확인하기 위하여 혈구, 생리 식염수 및 토끼혈청을 같이 넣어 반응시켰다.



용혈반응을 일으키지 않는 토끼혈청에 대하여 2진회석법으로 보체의 역가를 측정하여 충분히 용혈반응을 일으킬 수 있을 정도로(역가,약4) 회석하여 사용하였다. 용혈반응은 96공의 U자형 microplate를 사용하여 관찰하였다. 각 표준항혈청을 검사할 적혈구 수에 맞추어 각 검사공에 30ul씩을 microplate 자동분주기를 사용하여 분주하고 대조로서 표준항혈청 대신 생리 식염수를 분주하였다. 여기에 각종의 1.5% 적혈구부유액을 각각 20ul씩 가하고 titer mixer로 혼합한 후 약 15분간 정치시킨 다음 비특이적 용혈반응의 유무를 관찰하였다.

비특이적 용혈반응이 관찰되지 않은 공에 대하여 보체로서 신선한 토끼혈청 30ul씩을 첨가하고 37℃ 항온기에 정치하였다. 용혈반응의 판독은 보체 첨가 후 1시간, 2시간 및 4시간의 3회에 걸쳐 실시하였으며 용혈의 정도는 잔존혈구 비율에 따라 다음과 같이 육안으로 판정하였다. 즉, 비용혈 : 0, 혼적정도의 용혈 : 1, 50%의 용혈 : 2, 75%의 용혈 : 3, 혼적정도의 혈구잔존 : 3+ 및 완전한 용혈 : 4의 7가지로 구분하였다.

### (3) 친자확인 방법

\* 친자확인의 원리 : 친자감별은 모든 자손은 부나 모가 갖고 있지 않은 어떠한 유전인자도 가질 수 없다는 유전적 원리에 의하여 이루어지므로 친자관계가 있는 자손의 모든 유전인자는 부나 모에 존재하여야함.

o 각 인자에 의한 친자오류 확인확률은 다음과 같이 계산하였다.

$$P = p(1-p)^2$$

예) 출현(빈도)확률이 0.4인 A 인자를 이용한 친자오류 확인확률은 다음과 같이 계산할 수 있다.

- 어떤개체와 혈연관계가 없이 친자확인에 공시되는 두 개체가 가질 수

있는 A인자의 출현 및 미출현의 경우에 따른 확률은 다음과 같다.

부	모	확률	진자판정
A	A	$0.4 \times 0.4 = 0.16$	진자
A	-	$0.4 \times 0.6 = 0.24$	진자
-	A	$0.6 \times 0.4 = 0.24$	진자
-	-	$0.6 \times 0.6 = 0.36$	진자부정

- 어떤개체에서 이 인자가 출현할 확률(0.4)과 진자부정으로 판정될 확률(0.36)을 곱하면 이 인자에 의한 진자오류확인 확률이 된다.

$$P_A = p(1-p)^2 = 0.4 \times 0.36 = 0.144$$

즉, 이 하나의 인자에 대한 표준항혈청만으로도 14.4%의 진자 오류를 밝혀낼 수 있다.

○ 여러개의 인자를 동시에 이용하였을 때의 진자오류확인 확률은 아래와 같이 계산되었다.

$$P = 1 - [1-p_1(1-p_1)^2] \times [1-p_2(1-p_2)^2] \dots \times [1-p_n(1-p_n)^2]$$

$p_n$  = n번째 인자의 출현빈도

예) 진자오류확인 확률이 0.1(A)과 0.2(B)인 두개의 인자를 동시에 사용한 진자오류확인 확률은 아래와 같다.

A	B	확률	진자판정
+	+	$0.1 \times 0.2 = 0.02$	진자부정
+	-	$0.1 \times 0.8 = 0.08$	진자부정
-	+	$0.9 \times 0.2 = 0.18$	진자부정
-	-	$0.9 \times 0.8 = 0.72$	진자

$$\begin{aligned}
P(A+B) &= 1 - [1-p(1-p_1)^2] \times [1-p(1-p_2)^2] \\
&= 1 - [1 - p_A] \times [1 - p_B] \\
&= 1 - (0.9 \times 0.8) = 0.28
\end{aligned}$$

- 예를 든 두개의 인자에 의하여 28%의 친자오류가 발견될 수 있다.

#### 나. 한우의 유전자 감식에 의한 친자감별

##### (1) 혈액 채취

한우의 경정맥으로부터 진공채혈관을 사용하여 약 10ml의 혈액을 채취하였다.

##### (2) Genomic DNA의 추출

약 10ml의 혈액으로부터 buffy coat를 분리한 후 Buffy coat 약 500 $\mu$ l를 0.2M NH<sub>4</sub>Cl을 사용하여 적혈구를 제거한 다음, STE용액을 사용하여 백혈구를 용해시켰다. Proteinase -K(10mg/ml) 25 $\mu$ l, SDS(20%) 25 $\mu$ l를 각 tube에 넣고, 37°C에서 overnight 시킨뒤, PCI(phenol : chloroform : isoamyl-alcohol = 25:24:1)용액과 chloroform 을 사용하여 DNA를 추출하였다.

##### (3) BoLA-DRB3 exon2 유전자 분석

###### (가) PCR에 의한 BoLA-DRB3 exon2의 증폭

HL030과 HL031은 각각 DRB3 exon2의 7개와 8개의 5' 과 3'의 염기 배열을 포함하고, 나머지는 intron의 염기서열이다. HL032는 전부 DRB3 exon2의 3' 염기 배열을 지니고 있으며, HL030과는 8개의 basepair가 중복된다. DRB3 exon2 부분의 증폭은 2단계(1단계 : HL030-HL031, 2단계 : HL030-HL032)로 실시하였으며, 증폭에 사용된 primer의 염기 배열은 표 4-2에 제시한 바와 같

다. 한편 BoLA-DRB3 exon2 유전자의 증폭을 위한 primer의 설계는 그림 4-1에 나타낸 바와 같다.

표 4-2. BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 증폭에 사용된 primer의 염기배열

Primer	염기서열	단편크기
HL030	5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3'	284bp
HL031	5'-TTT AAA TTC GCG CTC ACC-TCG CCG CT-3'	
HL032	5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3'	

중합 반응은 2 $\mu$ l DNA(20ng), 5 $\mu$ l 10X PCR buffer(final conc. 500mM KCl, 10mM Tris-HCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>), 100 $\mu$ M dNTP, 0.5 $\mu$ M primer, 1 Unit Taq polymerase의 조건에서 실시 하였으며, 혼합물의 조성 과 양 및 농도는 표 4-3에 제시한 바와 같다.

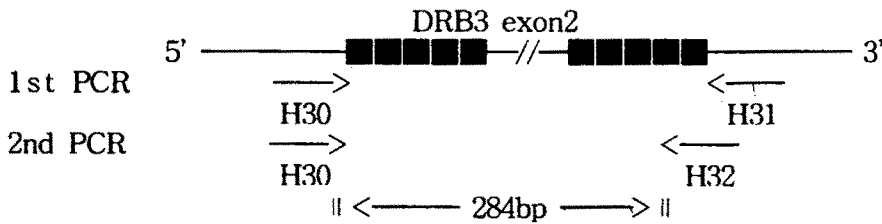


그림 4-1. BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 증폭을 위한 primer 디자인

Primer에 의하여 BoLA-DRB3 exon2 유전자를 증폭시키기 위한 온도조건은 표 4-4에 나타낸 바와 같다.

표 4-4에서 보는 바와 같이 온도 조건은 1단계 PCR에서는 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 10회 반복한 뒤 72 $^{\circ}$ C에서 4분간 신장

표 4-3. BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 증폭을 위한 혼합물의 조성

혼 합 물	혼합액의 양
10X reaction buffer	5.0 $\mu$ l(1X)
dNTP	2.0 $\mu$ l(100uM)
Primer 1	0.5 $\mu$ l(0.5uM)
Primer 2	0.5 $\mu$ l(0.5uM)
Taq DNA Polymerase	0.4 $\mu$ l(0.5uM)
dH <sub>2</sub> O	39.6 $\mu$ l
Genomic DNA	2.0 $\mu$ l(20ng)
합 계	50 $\mu$ l(for one)

표 4-4. BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 증폭을 위한 온도 조건

반 응 순 서	온 도 조 건	
	1st PCR	2nd PCR
Pre-denaturation		
Denaturation	94 $^{\circ}$ C - 1 min	94 $^{\circ}$ C - 2 min
Annealing	60 $^{\circ}$ C - 2 min	94 $^{\circ}$ C - 1 min
Extension	72 $^{\circ}$ C - 1 min	60 $^{\circ}$ C - 30sec
Elongation	72 $^{\circ}$ C - 4 min	72 $^{\circ}$ C - 5 min
Soak	4 $^{\circ}$ C	4 $^{\circ}$ C

(elongation)시켰으며, 2단계 PCR에서는 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 denature 시킨 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C에서 30초로 25회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 신장시켰다. 2단계 PCR에서는 1단계 PCR의 증폭산물 2 $\mu$ l를 주형 DNA로 사용하였다.

(나) 증폭 산물의 제한효소 처리

Sigurdardottir 등(1991)이 BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 14개 대립 유전자의 염기 배열을 분석 하여 이들 대립유전자를 모두 찾아낼 수 있는 세가지

제한 효소(Rsa I, Hae III 및 BstY I)를 사용 하였으며, 제한효소 절단시 혼합물의 조성은 표 4-5에 나타낸 바와 같다.

표 4-5. BoLA-DRB3 exon2 유전자좌 증폭산물의 제한효소 절단시 혼합물의 조성

혼 합 물	Rsa I	Hae III	BstY I
Enzyme	0.5ul	0.5ul	0.3ul
Buffer	1.5ul	1.5ul	1.7ul
dH <sub>2</sub> O	3.0ul	3.0ul	3.0ul
PCR product	10.0ul	10.0ul	10.0ul
합 계	15.0ul	15.0ul	15.0ul

제한효소 처리를 위한 혼합물은 Rsa I 과 Hae III의 경우 2단계 PCR 증폭 산물 10 $\mu$ l, 0.5 $\mu$ l(5unit)의 제한 효소, 1.5 $\mu$ l의 reaction buffer 및 3 $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O 로, BstY I는 증폭산물 10 $\mu$ l, 0.3 $\mu$ l(3unit)의 제한효소, 1.7 $\mu$ l의 reaction buffer 및 3 $\mu$ l의 dH<sub>2</sub>O로 설정하였으며, 반응 온도는 Rsa I 과 Hae III의 경우 37°C에 서 1시간 15분간 비등화 시켰고, BstY I 은 37°C에서 1시간 처리한 후, 85°C에 서 4분간 비등화 시켰다.

(다) 전기영동 및 판독

제한효소로 절단된 단편은 12% polyacrylamide gel 에서 25mA로 약 2시간 동안 전기영동한 후, ethidium bromide에 염색하여 자외선(UV)하에서 판독하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 혈액형에 의한 친자감별법 개발

(1) 적혈구 항원인자의 출현빈도 및 친자오류 확인

표준혈청을 사용하여 661두의 한우에서 혈액형검사를 실시하였던 바 각각의 적혈구 항원 인자의 출현빈도는 표 4-6과 같았다.

표 4-6. 각 혈액형 인자의 출현빈도 및 친자오류 확인확률

혈액형계	혈액인자	출현빈도	친자오류확인확률
A	A1	0.081	0.012
	A2	0.005	0.005
	Z'	0.393	0.145
B	B	0.051	0.046
	G1	0.467	0.133
	II	0.174	0.119
	Y2	0.433	0.139
	A'x	0.142	0.105
	B'	0.172	0.118
	E'2	0.044	0.040
	E'3	0.622	0.089
	I'	0.201	0.128
	J'	0.225	0.135
C	C1	0.126	0.096
	R1	0.088	0.073
	R2	0.116	0.091
	W	0.337	0.148
	X1	0.380	0.146
	X2	0.549	0.112
S	S	0.233	0.137
	U1	0.315	0.148
	U'	0.375	0.146
	U''	0.236	0.138
전체 친자오류확인확률			0.927

표 4-6에서 보는 바와 같이 A혈액형계에서는 Z' 혈액인자의 출현빈도가 0.393으로 가장 높은 빈도를 보였으며, B혈액형계에서는 G1, Y2, E'3 혈액인자의 출현빈도가 각각 0.467, 0.433 및 0.622로 다른 혈액인자에 비하여 높은 출현 빈도를 보였고, C혈액형계에서는 W, X1 및 X2 혈액인자의 출현빈도가 각각 0.337, 0.380, 0.549로 높게 나타났으며, S 혈액형계에서는 S, U1, U' 및 U'' 혈액인자의 출현빈도의 범위가 0.233~0.375로 대체로 비슷한 빈도를 보였다.

한편 이들 A, B, C 및 S 혈액형계의 혈액인자의 출현빈도에 의한 친자오류확률을 추정한 결과, 전체 친자오류확률은 92.7%로 아주 높은 확률을 보여 적혈구항원 혈액형 분석에 의한 친자감별은 높은 확률로서 가능성을 확인할 수 있었으며, 더 많은 종류의 혈액형계의 혈액형을 분석하면 더 높은 친자오류확률을 증대시킬 수 있을 것으로 판명되었다.

## (2) 혈액형에 의한 친자감별

실제 혈액형에 의한 친자확인을 하기 위하여 부(종모우 A)와 모(종빈우 B), 그리고 송아지의 A, B, C, F, L, S 및 Z 혈액형계의 혈액형을 분석한 결과는 표 4-7에 나타낸 바와 같다.

표 4-7 부모와 자손의 혈액형계별 혈액인자의 출현

혈액형계	A	B	C	F	L	S	Z
종모우 A	A1	G3E'3I'J'Q'G''	R1W	F	-	SU1	-
종빈우 B	A1	G3E'3P'G''	X1	F	L	U1U'	-
송아지 1	A1Z'	B0I1'O'Q'	R1W	FV	-	SU1U''	Z
송아지 2	A1	G3E'3I'J'P'	R1W	F	L	U1U'	-



표 4-7에서 보는 바와 같이 송아지 1은 부와 모에 나타나지 않는 Z', B, O1, O', V, U'', Z인자를 가지고 있기 때문에 친자가 아닌 것으로 판명되며, 송아지 2는 나타난 모든 혈액형이 부와 모에 모두 존재하기 때문에 친자로 판정할 수 있다.

## 2. 유전자 감식에 의한 친자감별법 개발

### 가. 친자감별을 위한 DNA다형성 탐색

한우의 친자감별을 위하여서는 많은 대립인자를 가진 DNA의 다형성이 검출되어야 친자감별이 가능하며 그 정확도를 보다 증대시킬 수 있다. 따라서 증폭된 BoLA-DRB3 exon2 유전자를 제한효소 Rsa I 으로 절단한 결과 그림 4-2와 같은 유전적 다형성을 보였다.

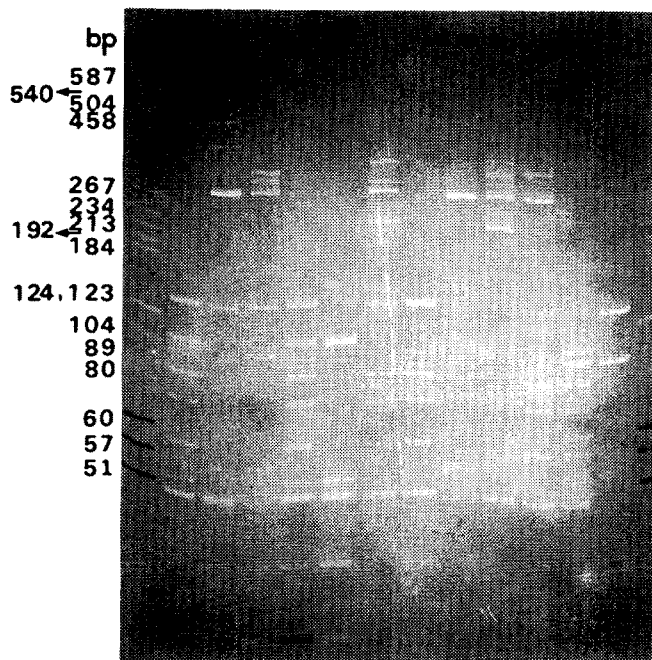


그림 4-2. 제한효소 Rsa I 에 의해 절단된  
BoLA-DRB3 exon2의 밴드양상

그림 4-2에서 나타난 M은 587bp ladder size marker이고, lane 1부터 8번까지는 한우개체의 밴드양상을 나타낸 것이다. 각 개체에 따른 밴드의 수는 차이가 있었으나, 약 50bp~590bp에서 42개의 유전적 다형이 검출되어 이들 대립유전자에 의하여 한우의 개체식별 및 친자감별이 가능할 것으로 판단되었다.

#### 나. 친자감별을 위한 부, 모, 자손의 유전적 다형성

친자감별의 기본원리는 멘델의 유전법칙에 따라 자손이 소유한 하나의 대립유전자는 그 자손의 부 또는 모 중 한편에 반드시 존재하여야 한다는 것이다. 즉 제한효소처리 결과, 나타나는 각각의 밴드도 대립유전자이므로 자손에게 나타나는 하나의 밴드는 부 또는 모의 밴드들 중에 반드시 존재하여야 한다.

한우의 친자감별을 위하여 부, 모 및 이들의 자손에 대한 증폭된 BoLA-DRB3 exon2 유전자좌를 제한효소인 Rsa I, Hae III 및 BstY I으로 절단한 후 12% polyacrylamide gel로 전기영동한 결과는 그림 4-3(Rsa I), 4-4(Hae III) 및 4-5(BstY I)의 (a)와 같으며, 이에 대한 모식도는 각각의 그림(b)에 나타낸 바와 같다.

그림 4-3에 나타난 바와 같이 S(lane 1, 4)는 부, D(lane 2, 5)는 모 그리고 F(lane 3, 6)는 자손을 나타내는 것이며, M은 587bp ladder size marker를 나타낸 것이다.

그림 4-3의 (a)에서 lane 1, 4의 부(S)와 lane 2, 5의 모(D)로부터 대립유전자를 물려받는 lane 3, 6의 자손(F)에 존재하는 대립유전자 밴드들은 부(S), 또는 모(D)에 모두 존재하여 제한효소 Rsa I의 처리결과는 두자손 모두 친자임을 판단할 수 있다.

그림 4-4에 나타난 바와 같이 lane 3, 6의 자손(F)에 존재하는 대립유전자

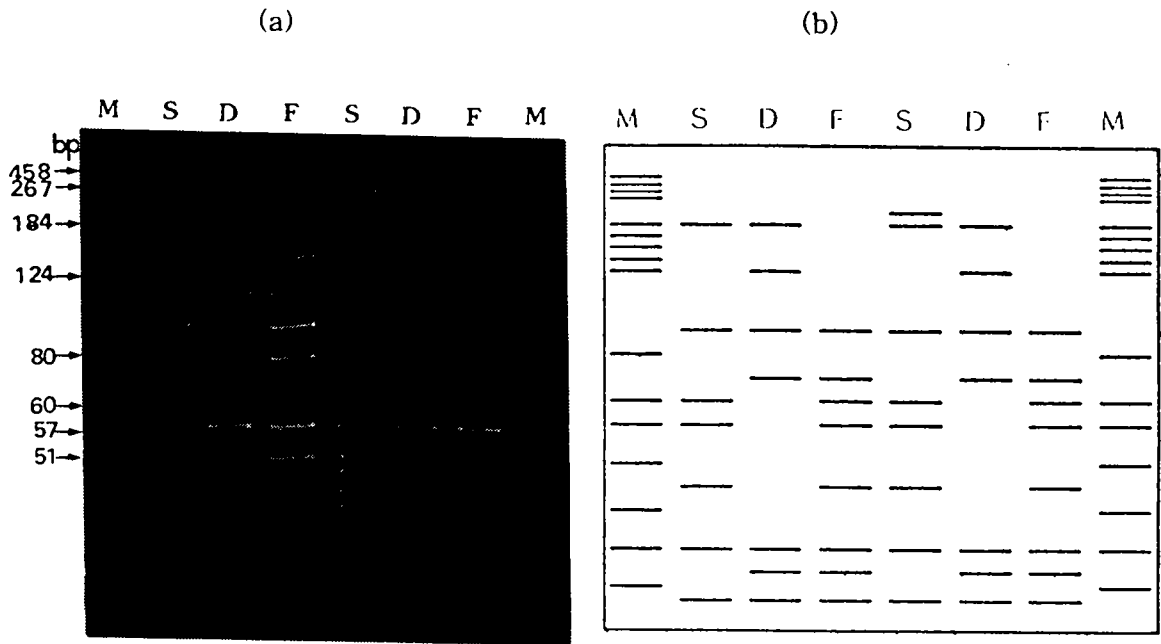


그림 4-3. 제한효소 Rsa I에 의해 절단된 BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 밴드양상

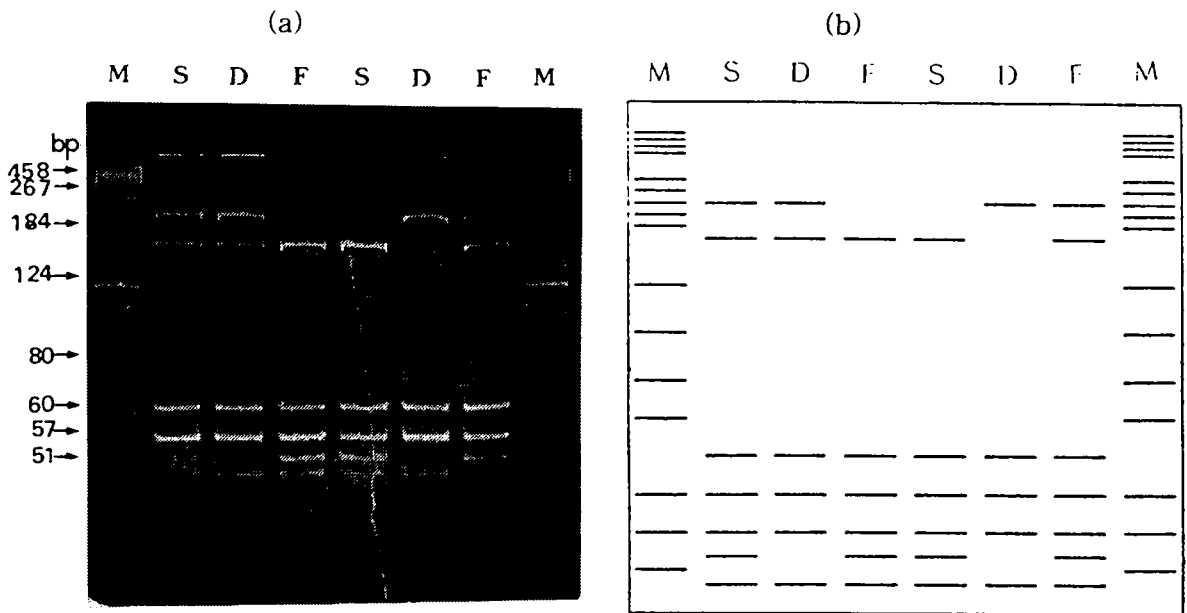


그림 4-4. 제한효소 Hae III에 의해 절단된 BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 밴드양상

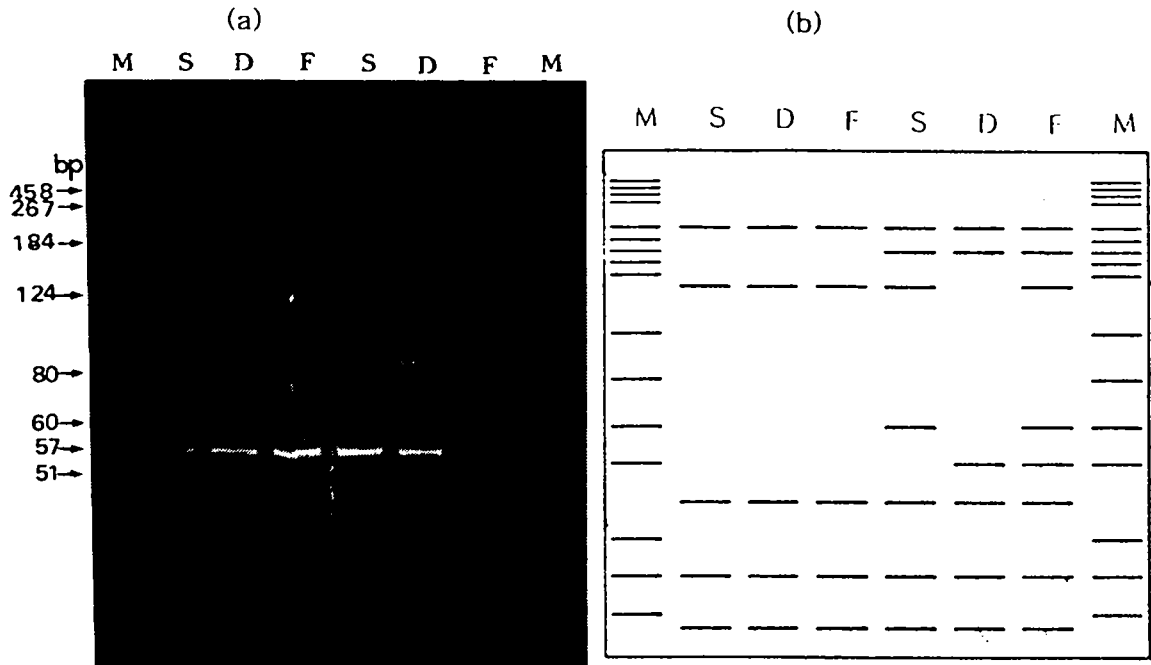


그림 4-5. 제한효소 BstY I 에 의해 절단된 BoLA-DRB3 exon2 유전자좌의 밴드양상

밴드들은 lane 1, 4에 나타난 부(S)와 lane 2, 5에 있는 모(D)에 나타난 밴드에 모두 존재하여 제한효소 Hae III에 의한 처리결과 두 자손 모두 친자임을 판단할 수 있었다.

또한 그림 4-5에서 보는 바와 같이 제한효소 BstY I의 처리 결과 lane 3, 6에 있는 자손(F)에 나타나는 대립유전자 밴드들은 lane 1, 4에 나타난 부(S)와 lane 2, 5에 있는 모(D)에 모두 존재하여 두 자손 모두 친자임을 확인할 수 있었다.

따라서 이상의 결과들을 종합하여 볼때 부와 모 그리고 자손들의 BoLA-DRB3 exon2 유전자를 제한효소 Rsa I, Hae III 및 BstY I의 처리하여 부모의 대립유전자와 자손의 대립유전자를 비교분석하므로써 친자여부를 쉽게 확인할 수 있었다.

## 제 4 절 결론 및 요약

본 연구는 한우의 정확한 유전능력 평가 및 교배계획을 위한 효율적인 혈통확인 및 기록관리에 활용이 가능한 한우의 친자감별법을 개발하기 위하여 한우의 적혈구 항원혈액형의 분석과 BoLA-DRB3 exon2 유전자 분석에 의한 친자감별을 실시하였던 바 연구내용별 얻어진 결과는 다음과 같다.

### 1. 적혈구 항원 혈액형에 의한 친자감별

혈액형에 의한 친자감별법을 탐색하기 위하여 부, 모, 자로부터 혈액을 채취하여 적혈구를 분리하고, 적혈구항원혈액형을 표준항혈청에 의해 분석하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 표준항혈청을 사용하여 한우의 혈액형을 분석하였던 바 A혈액형계는 A1, A2 및 Z'혈액인자로 분류되었고, B혈액형계는 B, G1, I1, Y2, A'x, B', E'2, E'3, I' 및 J' 혈액인자로 분류되었으며, C혈액형계는 C1, R1, R2, W, X1 및 X2 혈액인자로 분류되었고, S혈액형계는 S, U1, U' 및 U'' 혈액인자로 분류되었다.

나. A, B, C 및 S혈액형계의 혈액인자의 출현빈도를 고려하여 친자오류확인 확률을 추정하였던 바 92.7%로 아주 높은 친자오류확인이 가능하여 혈액형분석에 의해 높은 확률의 친자확인이 가능할 것으로 판단되었다.

다. 친자확인여부를 검증하기 위하여 부, 모와 자손들의 혈액형을 분석하여 혈액인자의 출현여부에 의하여 친자확인을 하였던 바 친자와 친자부정을 확인할 수 있었다.

라. 이상의 결과를 종합하여 볼때 한우의 A, B, C 및 S 혈액형계의 혈액인자에 의한 적혈구 항원혈액형에 의하여 친자오류확인 확률이 92.7%로, 더 많은 혈액형계의 부, 모, 자의 혈액형분석에 의하여 아주 높은 친자확인이 가능한 것으로 판명되었다.

## 2. BoLA-DRB3 exon2 유전자에 의한 친자감별

BoLA-DRB3 exon2 유전자에 의한 친자감별을 탐색하기 위하여 부와 모 그리고 자손으로부터 혈액을 채취하여, genomic DNA을 추출한 후, 제한효소로 절단하여 BoLA-DRB3 exon2 대립유전자를 분석하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. BoLA-DRB3 exon2의 구역을 HLO30, HLO31 및 HLO32 primer로 증폭한 후 제한효소로 절단하여 유전적 다형을 분석한 결과 42개의 DNA밴드가 검출되어 이들에 의해 친자감별이 가능한 것으로 판단되었다.

나. 친자확인 여부를 검정하기 위하여 부와 모, 그리고 자손들에 대한 BoLA-DRB3 exon2 구역을 3개의 primer로 증폭한 후, 제한효소 Rsa I, Hae III 및 BstY I으로 절단하여 이들의 대립유전자를 분석한 결과 친자 여부를 확인할 수 있었다.

다. 이상의 결과를 종합하여 볼때 BoLA-DRB3 exon2 유전자분석에 의하여 한우의 친자감별이 가능하며, 이방법은 혈액형에 의한 방법보다 간편하고 정확도를 증대시킬 수 있어 이 방법을 활용시 혈통관리의 효율성을 보다 증대시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

## 제 5 장 한우와 한우교잡종 판별을 위한 유전자

### 감식법 개발

#### 제 1 절 서 설

우리나라에서 오래전부터 사육되어온 한우는 대표적인 재래가축으로 순수한우에 대한 보존 및 능력개량은 중요한 과제라고 생각된다.

순수한우는 육우나 젖소에 비하여 육질이 우수할 뿐만 아니라, 한우 특유의 육미가 있어 소비자가 즐겨 요구하며, 고가로 판매되고 있다. 그러나 우리나라에서 사육중인 한우의 일부는 1970년대 육우종모우의 혈액이 일부 한우에 혼입되어 외모적으로는 식별이 불가능한 한우 교잡종이 순수한우로 사육되고 있는 것으로 사료되는 바 순수한우의 유전자원의 보존 및 개량을 위하여서는 이들의 식별을 위한 판별방법의 개발이 시급히 요청된다. 따라서 본 연구는 재래 순수한우의 유전자원의 보존과 개량을 위하여 유전자감식에 의한 순수한우와 한우교잡종간의 차이의 판별법을 탐색하고자 실시하였다.

#### 제 2 절 재료 및 방법

##### 1. 공시재료

본 연구에 공시된 품종은 축협중앙회 한우개량부에서 사육중인 한우 140두와 강화도 축협에서 사육중인 한우교잡종 45두, 농촌진흥청 축산기술연구소 대관령지소에서 사육중인 샤로레종과 앵거스종 각각 20두를 공시하였으며 품종별 두수는 표 5-1과 같다.

표 5-1. 공시품종 및 두수

품 종	두 수	비 고
한우종	140	축협중앙회 한우개량부
한우교잡종	45	강화도 축산협동조합
샤로레종	20	축산기술 연구소(대관령지소)
앵거스종	20	축산기술 연구소(대관령지소)
계	225	

## 2. 연구방법

### 가. 혈액채취 및 DNA 추출

#### (1) 혈액채취

한우, 한우교잡종, 샤로레종, 앵거스종의 경정맥으로 부터 진공 채혈관을 사용하여 약 10ml의 혈액을 채취함.

#### (2) Genomic DNA 추출

혈액으로부터 genomic DNA 분리는 Maiatis 등(1982)과 Gibco BRL manual의 방법에 따라 진공 채혈관에 채취된 혈액 10ml을 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 백혈구(buffy coat)를 얻은 후, PBS solution(NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)을 혼합하여 불순물을 제거하고, extraction solution(10mM Tris-Cl, 0.1M EDTA, 0.5% SDS, 20ug/ml Pancreatic RNase, proteinase K)으로 처리하여 세포를 용해시킨 후, phenol을 처리하여 단백질을 변성시키고, 100% ethanol을 처리하여 DNA를 침전시켰다. 그리고 70% ethanol을 이용하여 추출된 DNA를 세척하고 1×TE buffer로 DNA를 dilution한 후 약 18~24hr 정도 실온에 방치한 후, -20℃ 냉동고에 보관하면서 시료로 이용하였다.



나. 품종별 genomic DNA의 다형성 분석

본 연구에 사용된 random primer는 Operon Technologies, Inc.에서 제조된 110종류의 random primer 중에서 예비실험 결과 축우의 다형성 분석에 유용할 것으로 판단되는 5종류의 선발된 primer를 이용하였으며, 이들 primer별 핵산 서열은 표 5-2에 제시한 바와 같다.

표 5-2. 축우의 품종 판별에 유용한 random primer의 염기서열

Primer	염 기 서 열
Primer OPB-03	5'-CAT CCC CCT G-3'
Primer OPO-15	5'-TGG CGT CCT T-3'
Primer OPP-03	5'-CTG ATA CGC C-3'
Primer OPP-17	5'-TGA CCC GCC T-3'
Primer OPA-17	5'-GAC CGC TTG T-3'

(1) 유전자 좌위의 증폭

Genomic DNA의 유전자 좌위의 증폭반응을 위하여 사용된 reaction mixture의 조성은 표 5-3에 나타낸 바와 같으며, GeneAmp PCR System 2400(Perkin Elmer)을 이용하여 각각의 유전자 좌위를 증폭하였고, reaction mixture의 양은 genomic DNA를 포함하여 한 sample당 50ul로 적정하였다.

이 혼합액에는 100mM Tris-Cl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 100uM씩의 dATP, dCTP, dGTP와 dTTP(Promega Biotechnology, USA), 100pM primer, 50ng의 genomic DNA와 0.5 unit의 Tag DNA polymerase(Korea Biotech.. Inc.)가 포함되었다.

DNA의 증폭을 위한 온도조건은 표 5-4에 제시한 바와 같이 DNA Thermal Cycler(Perkin Elmer, Co.)를 이용하였으며, 변성반응은 95℃에서 30

초, primer 부착온도는 33°C에서 30초, primer extension은 72°C에서 30초 실시하였다. DNA 증폭을 위한 총 반응회수는 45cycles로 DNA Thermal Cycler에 programming하여 DNA를 증폭하였다.

표 5-3. 주형 DNA 증폭을 위한 반응 혼합물

혼합물	혼합액의 양
10×buffer	5.0 ul
dNTP	2.0 ul
Random primer	1.0 ul
Template DNA	1.0 ul
Taq DNA polymerase	1.0 ul
dH <sub>2</sub> O	40.0 ul
합 계	50.0 ul

표 5-4. 유전자 증폭을 위한 PCR 온도조건

반응과정	온도조건
Pre-denaturation	95°C × 5 min
Denaturation	95°C × 30sec
Annealing	33°C × 30sec
Primer extension	72°C × 30sec
Extension	72°C × 10min

45 cycles

(2) 전기영동 및 다형성 판독

축우의 품종간 유전적 다형성을 판독하기 위한 DNA 증폭산물은 1.5%

agarose gel에서 전기영동하였고, 전기영동의 운전조건은 120 voltage에서 약 1시간 30분간 실시하였으며, 전기영동이 완료된 gel은 20 $\mu$ g/ml EtBr(etidium bromide)로 1분간 염색한 후 증류수를 이용하여 약 60분간 탈색반응을 하였다. 탈색된 gel은 Polaroid 카메라가 장착된 UV상에서 Polaroid 667(Polaroid, USA)필름으로 사진을 현상하여 밴드 pattern을 관찰하였으며, DNA size marker로는 1Kb ladder(Gibco BRL, USA)를 이용하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. Genomic DNA의 전기영동 양상

소의 각 품종별 genomic DNA의 크기 및 순도를 측정하기 위하여 분리된 DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 UV상에서 사진을 촬영한 결과는 그림 5-1에 나타낸 바와 같다.

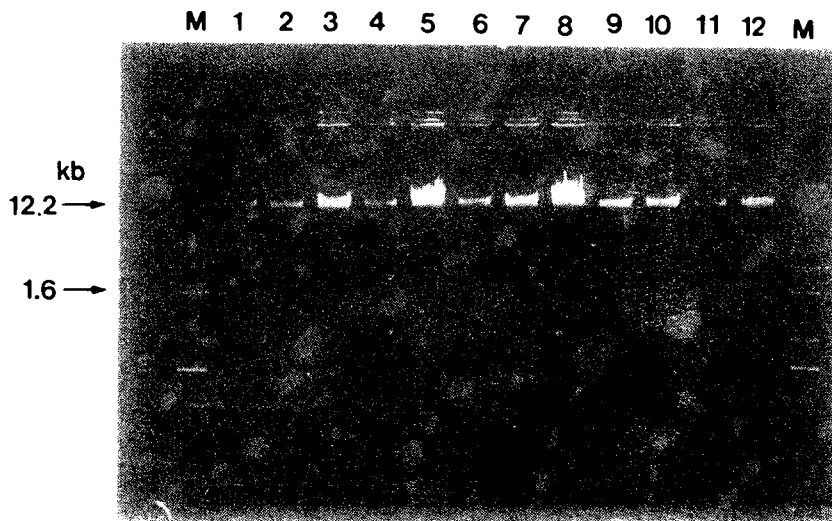


그림 5-1. 축우 genomic DNA의 전기영동양상

그림 5-1에 나타난 바와 같이 M은 1kb ladder size marker, lane 1~3는 앵거스종, lane 4~6은 한우종, lane 7~9는 샤로레종, 그리고 lane 10~12는 한우와 샤로레종간의 교잡종에 대한 genomic DNA의 양상으로 모든 축우품종중에서 12.2kb 이상의 크기를 가진 genomic DNA가 단일 밴드로 나타난 것으로 보아 추출된 genomic DNA는 아주 잘 분리된 것으로 판단되었다. 한편 정제된 DNA의 순도는 흡광도  $A_{260}$ 과  $A_{280}$ 의 비율로 측정된 결과, 그 비율이 1.75~2.10의 범위로서 순도는 비교적 양호한 결과를 나타내었다.

## 2. 축우 품종의 유전자 감식을 위한 유용 primer의 탐색

앵거스종과 한우, 샤로레종 및 한우와 샤로레종의 교잡종으로부터 정제된 genomic DNA를 template로 하고, OPB-3 random primer를 이용하여 RAPD(random amplified polymorphic DNAs)를 수행한 결과는 그림 5-2과 같

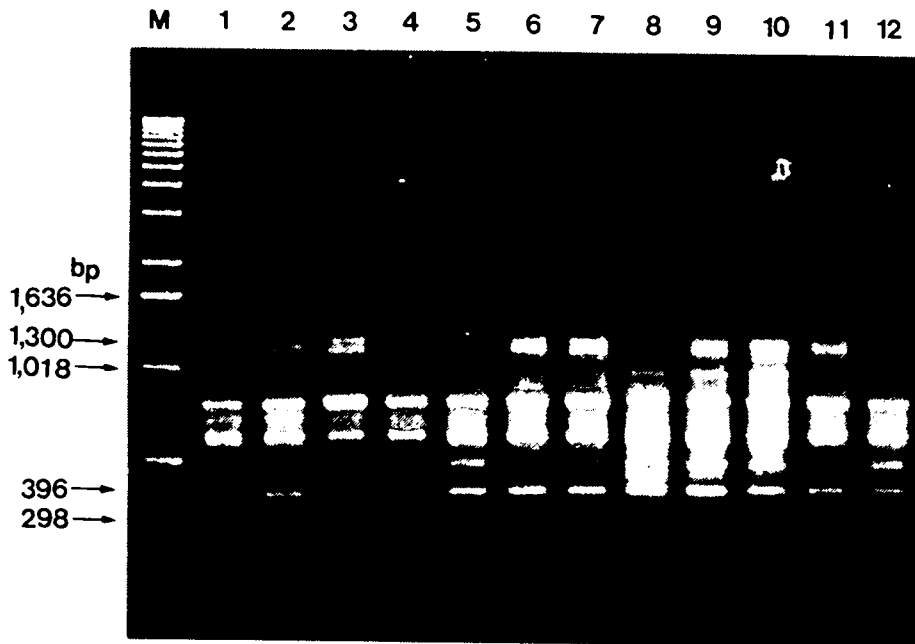


그림 5-2. Random primer OPB-3에 의한 축우 품종별 DNA 밴드양상

으며 M은 1kb ladder size marker, lane 1~3는 앵거스종, lane 4~6은 한우종, lane 7~9는 샤로레종, 그리고 lane 10~12는 한우와 샤로레종간의 교잡종에 대한 band 양상을 나타낸 것이다.

그림 5-2에서 나타난 바와 같이 random primer OPB-3를 이용하였을 때 각 품종간에 약 300bp~1300bp의 크기를 가진 밴드가 거의 동일하게 출현되었으나, 약1300bp에서 3두의 샤로레종 가운데 lane 8의 개체에서 다른 품종과는 달리 band가 출현되지 않았고, 또한 약 390bp에서도 이 개체만이 밴드가 형성되지 않는 다형성을 보였다.

각 품종의 genomic DNA를 template로 하고 random primer OPO-15를 이용하여 RAPD를 수행하였을 때에는 그림 5-3에 나타낸 바와 같은 전기영동



그림 5-3. Random primer OPO-15에 의한 축우 품종별 DNA 밴드 양상

양상을 보였으며, M은 1kb ladder size marker, lane 1~5는 앵거스종, lane 6~10은 한우 종, lane 11~14는 샤로레종, 그리고 lane 15~18은 한우와 샤로레 종간의 교잡종에 대한 band 양상을 나타낸 것이다.

그림 5-3에서 보는 바와 같이 증폭산물은 대략 298bp~1,636bp의 크기를 가졌으며, 각 품종간의 확연한 밴드차이는 나타나지 않았지만 약 1,636bp에서 앵거스종에서는 5개체 중 lane 4에서 오직 한개체만이 밴드가 나타난 반면, 한우종에서는 5개체 중 lane 7, 9, 10의 3개체에서 출현하였고, 샤로레종에서는 4개의 모든 개체에서 밴드가 나타났으며, 한우교잡종에서는 4개의 개체중 오직 lane 16의 개체에서만 밴드가 형성되었다.

또한 random primer OPP-3을 이용하여 RAPD를 수행하였을 때에는 그림 5-4에서 제시한 바와 같으며, M은 1kb ladder size marker, lane 1~5는 앵거

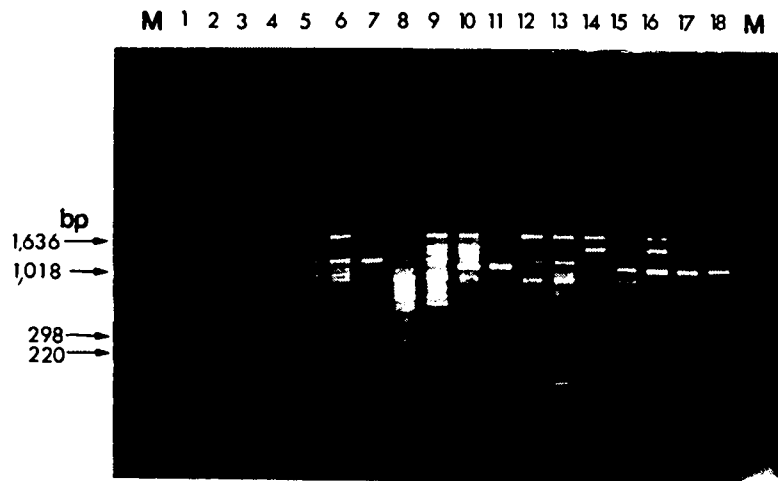


그림 5-4. Random primer OPP-3에 의한 축우 품종별 DNA 밴드 양상

스종, lane 6~10은 한우종, lane 11~14는 샤로레종, 그리고 lane 15~18는 한우와 샤로레종간의 교잡종에 대한 band pattern을 나타낸 것이다.

그림 5-4에서 보는 바와 같이 증폭산물의 크기는 대략 290bp~1600bp 이었으며 약 1,300bp에서 앵거스종에서는 모든 개체에서 밴드가 출현되었으나, 한우종에서는 lane 8의 개체와 교잡종의 lane 15, 18의 두 개체에서는 밴드가 형성되지 않았다. 또한 한우종 lane 8의 개체는 다른 품종에서의 밴드양상과는 달리 220bp에서도 밴드가 형성되었다. 또한 약 1000bp에서 앵거스종에서는 모든 개체에서 밴드가 형성되지 않았으나, 한우에서는 5개체중에서 lane 5, 10의 두개체에서, 샤로레종에서는 lane 11의 개체에서 band가 형성되었고, 한우교잡종에서는 4개체 모두에서 밴드가 형성되었으며 이는 random primer OPO-15를 이용하여 RAPD를 수행하였을 때보다 각 품종간 더 많은 유전적 다형성을 보였다.

또한 random primer OPP-17을 이용하여 RAPD를 수행한 경우에는 그림 5-5에서와 같으며, M은 1kb ladder size marker, lane 1~5는 앵거스종, lane 6~10은 한우종, lane 11~14는 샤로레종, 그리고 lane 15~18는 한우와 샤로레종간의 교잡종의 band pattern이다.

그림 5-5에서 보는 바와 같이 DNA 증폭산물의 크기는 대략 300bp~1000bp이었고 각 품종간의 밴드양상에 있어서는 확연한 밴드차이는 보이지 않았다. 그러나 약 390bp에서 앵거스종에서는 5개체 모두에서 밴드를 형성하였지만, 한우에서는 lane 7, 9의 두개체에서만 밴드가 형성되었고 샤로레종에서 lane 11의 개체에서, 교잡종에서는 lane 16, 18의 두개체에서 밴드가 형성되었으며 그외의 밴드는 거의 동일한 양상을 보였다.

한편, random primer OPA-17을 이용하여 RAPD를 수행하였을 경우는 그림 5-6에서 보는 바와 같으며, M은 1kb ladder size marker, lane 1~3는 앵거

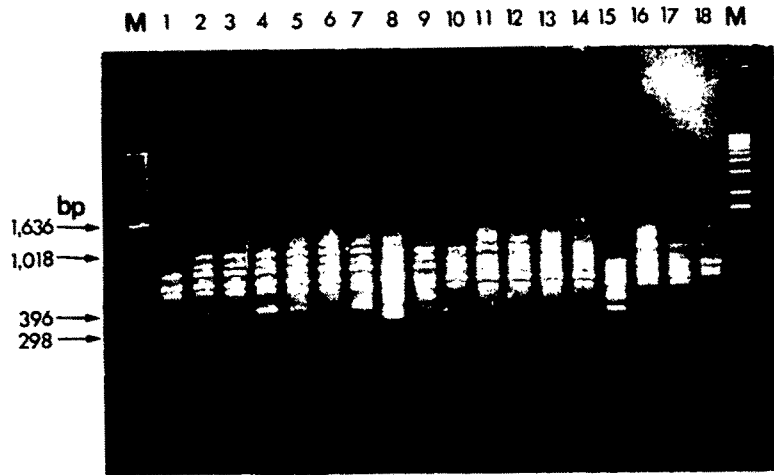


그림 5-5. Random primer OPP-17에 의한 축우 품종별 DNA 밴드 양상

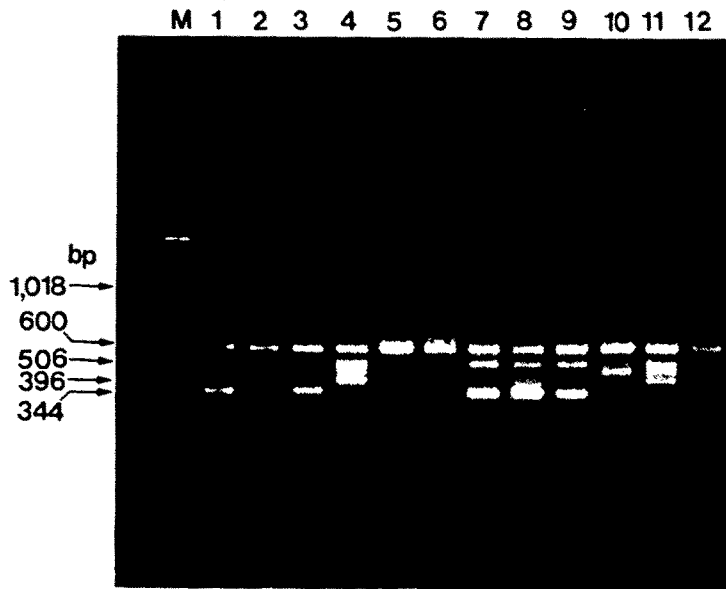


그림 5-6. Random primer OPA-17에 의한 축우 품종별 DNA 밴드 양상



스종, lane 4~6은 한우종, lane 7~9는 샤로레종, 그리고 lane 10~12는 한우교잡종에 대한 band pattern을 나타낸 것이다.

그림 5-6에서 보는 바와 같이 OPA-17을 이용하여 PCR을 실시한 결과 DNA의 증폭산물에서 검출된 band pattern에서 약 600bp와 500bp에서는 모든 품종이 같은 band pattern을 갖고 있으나 약 340bp에서 앵거스종과 샤로레종에서 band가 나타난 반면, 한우와 한우교잡종은 band가 검출되지 않았다. 340bp에서와 같은 밴드양상은 앵거스종과 샤로레종으로부터 한우와 한우교잡종을 판별하는데 유용한 표지인자로서 이용될 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

따라서 이상의 결과를 종합하여 볼 때 random primer OPB-3, OPO-15, OPP-3 및 OPP-17를 이용한 RAPD 수행결과에서는 전기영동상에 나타난 DNA의 증폭산물은 밴드수가 16개 미만으로 그 크기는 대부분 220bp에서 1,636bp사이 에 골고루 분포되어 각 품종간의 다양한 다형성은 보였으나, 품종간을 판별할 수 있는 확연한 band가 출현되지 않아 품종 구별에 있어 유용한 specific primer로의 이용으로서는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 그러나 random primer OPA-17은 앵거스종과 Chaloais종으로부터 한우와 한우교잡종을 판별할 수 있는 유용한 primer로서의 이용가능성을 제시해 주었다.

### 3. Random primer OPA-17의 부착온도에 따른 축우의 유전적 다형성

소의 품종판별에 가장 유용한 random primer로 판명된 OPA-17을 이용하여 primer 부착온도를 33.0℃부터 42.0℃까지 매 0.5℃씩 증가시켜 RAPD분석을 수행한 결과 primer 부착온도 증가에 따른 축우의 유전적 다형성은 primer 부착온도를 33.0℃로 하였을 때와 별 차이가 없었으나, 37.5℃로 증가하였을 때는 축우품종간에 다소 상이한 밴드양상을 보여 주었다.

그림 5-7은 primer 부착온도를 33.0℃로 하였을 때 축우품종들의 band 양상을 나타낸 것으로, M은 1kb ladder size marker이며, lane 1~3는 앵거스종, lane 4~6은 한우종, lane 7~9는 샤로레종, 그리고 lane 10~12는 한우교잡종에 대한 band patterns을 나타낸 것이다. 또한 그림 5-8은 primer 부착온도를 37.5℃로 하였을 때 축우품종들의 band 양상을 나타낸 것으로 M은 1kb ladder size marker, lane 1~4는 앵거스종, lane 5~8은 한우종, lane 9~12는 샤로레종, 그리고 lane 13~16는 한우와 샤로레종간의 교잡종에 대한 band pattern을 나타낸 것이다.

그림 5-7 및 5-8에 나타난 바와 같이 primer 부착온도를 33.0℃와 37.5℃로 하였을 때 DNA 증폭산물의 크기는 300~600bp 사이에 분포되어 있으나,

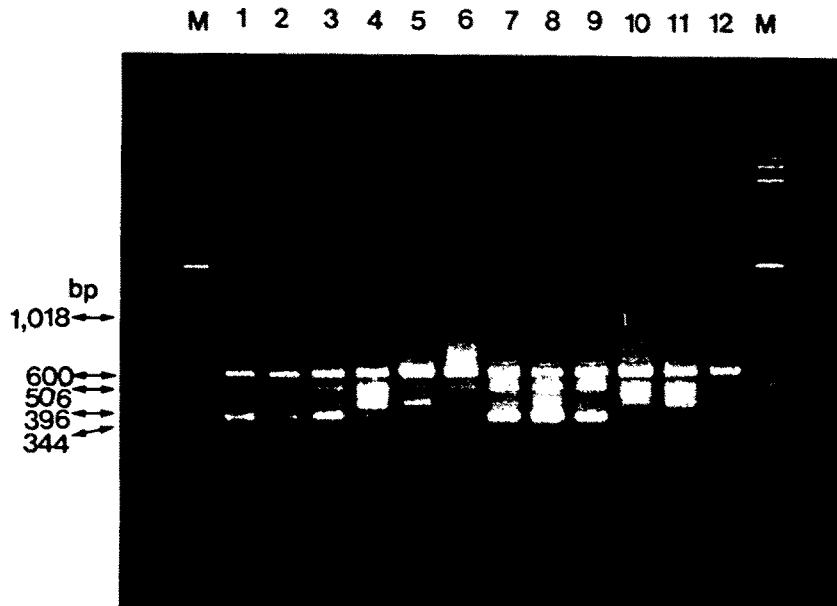


그림 5-7. Random primer 부착온도(33.0℃)의 RAPD밴드 양상



그림 5-8. Random primer 부착온도(37.5℃)의 RAPD 밴드 양상

품종간의 band의 유무는 다소 상이한 결과를 나타내었다. 이들 결과를 DNA 단편크기에 따라 품종 및 primer 부착온도별로 band의 유무를 표로 작성하면 표 5-5에 나타낸 바와 같다.

Primer 부착온도를 33.0℃와 37.5℃간에 band pattern차이는 한우에서 primer 부착온도를 33.0℃로 하였을 때 약 340bp에서 band가 출현되지 않았으나, 37.5℃에서는 band가 선명하게 나타났으며, 샤로레종에서는 primer 부착온도를 37.5℃로 하였을 때 340bp와 500bp에서 band가 나타나지 않았다.

이와 같은 결과는 primer 부착온도를 33.0℃와 37.5℃로 RAPD를 실시하였을 때에 다른 온도조건에 비하여 각 품종간의 template DNA에 가장 안정하게 primer가 부착되어 증폭되기 때문인 것으로 예측된다.

표 5-5. Random primer 부착온도에 따른 축우품종의 RAPD밴드 양상

품 종	앵거스종		한우		샤로레종		한우교잡종	
	33.0	37.5	33.0	37.5	33.0	37.5	33.0	37.5
Primer부착온도(℃)								
DNA단편길이(bp)								
600	○	○	○	○	○	○	○	○
500	○	○	○	○	○	×	○	○
340	○	○	×	○	○	×	×	×

\* ○ : 밴드 유, × : 밴드 무.

따라서 이들 결과를 종합하여 보면 축우의 유전적 다형성에 의한 품종의 판별은 primer 부착온도를 33.0℃로 RAPD를 수행하였을 때에는 340bp에서의 band 출현여부에 의하여 앵거스종과 샤로레종으로부터 한우와 한우교잡종에 대한 DNA수준에서의 판별이 가능하며, primer 부착온도를 37.5℃로 RAPD를 수행하였을 때에는 앵거스종과 한우종로부터 샤로레종과 한우교잡종을 340bp에서의 band 출현여부에 따라 분자유전수준에서의 판별이 가능한 것으로 사료되었으나, 축우품종판별을 위한 RAPD 밴드양상은 primer의 부착온도, 시료의 상태 및 외부환경요인에 아주 민감하게 작용하였는 바, random primer OPA-17을 이용하여 한우와 한우교잡종간 차이에 대한 유전자감식을 한 결과는 표 5-6과 같다.

표 5-6에서 나타난 바와같이 순수한우라고 판단되는 한우 140두를 조사하였던 바 한우 표지유전자가 출현된 두수는 113두로 82%의 검출비율을 보였고, 한우교잡종은 45두를 조사하였던 바 32두가 검출되어 검출비율은 71%를 보였다.

따라서 random primer OPA-17에 의한 한우와 한우교잡종의 유전자감식율은 높은 비율로서 검출이 가능하나 보다 높은 확률의 검출비율로 증대시키기 위

표 5-6. 한우와 한우교잡종 및 타 품종 판별 표지유전자의 검출비율

구 분	조사두수	검출유무(두)		검 출 비 율(%)
		유	무	
한우	140	113	27	82
한우교잡종	45	32	13	71
샤로레종	20	17	3	85
앵거스종	20	17	4	80

해서는 보다 많은 유용 primer의 탐색과 많은 표본에 대한 검출이 필요할 것으로 사료되었다.

#### 제 4 절 결론 및 요약

본 연구는 순수한우의 보존과 유전능력을 개량하는데 필요한 한우와 한우교잡종 차이에 대한 유전자감식방법을 탐색하기 위하여 한우, 한우교잡종, 샤로레종 및 앵거스종으로부터 혈액을 채취하여 genomic DNA를 추출한 후 RAPD(random amplified polymorphic DNAs)기법에 의한 유용 primer를 탐색하여 한우와 한우교잡종에 대한 유전자감식을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 한우와 타 품종간의 유전자감식에 의한 차이점을 탐색하기 위하여 random primer OPB-03, OPO-15, OPP-03, OPP-17 및 OPA-17을 이용하여 RAPD 분석을 한 결과, primer OPA-17이 한우와 다른 품종간 차이에 대한 유전자감식에 가장 유용한 primer로 판명되었다.
2. 한우와 타품종간의 차이에 대한 유전자 감식은 OPA-17에 의하여 primer부착온도를 33.0℃로 하여 RAPD를 실시하였을때 340bp에서 한우와 한우교잡

종에서는 밴드가 출현되지 않았으나, 샤로레종과 앵거스종에서는 밴드가 출현되었고, primer 부착온도를 37.5°C로 하였을 때는 340bp에서 한우와 앵거스종에서는 밴드가 출현하였으나, 샤로레종과 한우교잡종에서는 밴드가 출현되지 않았다.

3. 한우와 한우교잡종간의 차이에 대한 유전자감식 결과 순수한우의 유전자 감식을 위한 유전자 검출비율은 82.0%로 대체로 높은 수치를 보였다.
4. 이상의 결과를 종합하여 볼때 random primer OPA-17에 의하여 순수한우의 유전자감식 판별비율이 82.0%로 대체로 높은 편이나, 완전한 순수한우의 유전자감식 판별을 위하여서는 이에 대한 연구를 추가 보완하여야 할 것으로 사료되었다.

## 제 6 장 종합결론 및 요약

한우의 조기선발 및 친자확인을 위한 분자유전학기법의 응용에 관한 연구에 있어서 한우의 조기선발 보조수단의 개발, 한우의 친자감별법 개발 및 한우와 한우교잡종의 판별을 위한 유전자감식법 개발에 대한 세부과제별로 얻어진 결과들을 요약하면 다음과 같다.

### 제 1 절 한우의 조기선발 보조수단의 개발

한우의 조기선발시 선발효율을 보다 증대시킬 수 있는 방안을 모색하기 위하여 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명, 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성 구명과  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간이 연관성을 분석하였던 바, 연구내용별 결과를 요약하면 다음과 같다.

#### 1. 한우의 혈액단백질의 유전자형과 산육형질간의 연관성

한우 642두에 대한 혈액단백질인 transferrin(Tf), post-transferrin-2(pTf-2), albumin(Alb), post-albumin(pAlb), ceruloplasmin(Cp), amylase-I(Am-I) 및 hemoglobin(Hb)의 유전적 다형을 분석하고, 이들의 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량을 측정하여 이들 유전자형과 산육형질간의 연관성을 추정하였던 바, Tf D<sub>1</sub>D<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 및 D<sub>2</sub>E 유전자형과 6개월령체중 및 일당증체량간에 유의적인 연관성을 보여, 한우의 조기선발시 기존의 선발기준인 혈통, 생시체중, 6개월령체중 및 외모와 더불어 Tf유전자형을 선발보조수단으로 활용시 선발효율을 보다 증대시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

## 2. 한우의 혈액형과 산육형질간의 연관성

한우의 적혈구 항원혈액형과 산육형질간의 연관성을 구명하기 위하여 혈액으로부터 A, C 및 S 혈액형계의 혈액형과 생시체중, 6개월체중 및 일당증체량과의 연관성을 분석하였던 바, S 혈액형계의 S, SUIU", UIU"\* 및 SU' 혈액형에서 6개월령체중과 일당증체량간에 유의적인 연관성이 있는 것으로 추정되어 이들 혈액형을 한우의 조기선발시에 선발 보조수단으로 활용시 선발효율을 증대시킬 수 있을 것으로 사료되었으나, 혈액형의 분석은 복잡하고 혈액형의 종류가 아주 다양하여 선발보조수단으로 혈액형의 이용은 더 연구검토 되어야 할 것으로 판단되었다.

## 3. $\kappa$ -CN 및 $\beta$ -LG 유전자형과 산육형질간의 연관성 구명

한우의 유즙단백질인  $\kappa$ -casein( $\kappa$ -CN) 및  $\beta$ -lactoglobulin( $\beta$ -LG)의 유전자형과 산육형질간의 연관성을 구명하기 위하여 경산한우 253두의  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG의 유전자형을 분석하고, 이들 자손의 생시체중, 6개월령체중 및 일당증체량간의 연관성을 분석하였던 바,  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG AB 유전자형에서 6개월체중 및 일당증체량이 다른 유전자형에 비하여 높게 나타났으나, 통계적인 유의성은 인정되지 않아 이들 유전자형에 의한 한우의 조기선발 보조수단으로 이용은 어려울 것으로 사료되었으나, 조사두수가 적기 때문에 앞으로 좀더 많은 두수의 유전자형과 산육형질간의 연관성을 분석하여 이의 이용성 여부를 판단하여야 할 것으로 사료된다.

4. 이상의 결과를 종합하여 볼때 한우의 혈액단백질인 Tf의 유전자형을 한우의 조기선발시 기존의 선발기준에 이들 유전자형을 선발보조수단으로 활용시 에 선발효율이 더욱 증대될 것으로 기대되며,  $\kappa$ -CN 및  $\beta$ -LG 유전형을 한우조



기선발시 선발보조수단의 활용여부를 판단하기 위하여서는 보다 많은 조사두수의 유전자형을 분석하여 산육형질과의 연관성을 구명하여야 할 것으로 사료된다.

## 제 2 절 한우의 친자감별법 개발

한우의 정확한 유전능력평가를 위한 효율적인 혈통 및 기록관리에 활용이 가능한 한우의 친자감별법을 모색하기 위하여 한우의 적혈구 항원에 의한 부, 모와 자손의 혈액형을 분석하고, BoLA-DRB3 exon2 유전자의 다형을 분석하여 친자감별 가능 여부를 탐색하였던 바 연구내용별 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 적혈구 항원 혈액형에 의한 한우의 친자감별은 A, C 및 S 혈액형계의 혈액형에 의한 친자오류확인 확률을 추정하였던 바, 92.7%로 아주 높은 확률을 보였으며, 실제 A, C, S, F, L, S 및 Z혈액형계의 부모와 자손의 혈액형을 분석하여 친자여부를 확인하였던 바 친자확인이 가능하였다.
2. BoLA-DRB3 exon2 유전자 분석에 의한 친자감별을 위하여 부모와 자손으로부터 혈액을 채취하여 genomic DNA을 추출한 후, BoLA-DRB3 exon2 대립유전자를 분석한 결과, 아주 높은 확률로서 친자여부를 감별할 수 있었다.
3. 이상의 결과를 종합하여 볼때 BoLA-DRB3 exon2 대립유전자의 분석에 의한 친자감별은 혈액형에 의한 친자감별법 보다 간편하여 앞으로 이 방법을 친자확인에 활용시 보다 효율적인 혈통확인으로 유전능력평가의 정확도를

증대시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

### 제 3 절 한우와 한우교잡종의 판별을 위한 유전자 감식법 개발

순수한우의 보존 및 개량을 위한 한우와 한우교잡종의 유전자감식법을 개발하기 위하여 한우, 한우교잡종, 샤로레종 및 앵거스종으로부터 혈액을 채취하여 DNA를 추출한 후, random primer로 유전적 다형을 분석하였던 바, 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 한우와 타품종간의 차이에 대한 유전자 감식 방법을 모색하기 위하여 다형 분석에 유용한 것으로 판명된 primer OPB-03, OPO-15, OPP-03, OPP-17 및 OPA-17을 이용하여 RAPD분석을 실시한 결과, OPA-17이 한우와 다른 품종간의 차이점에 대한 유전자감식에 가장 유용한 primer로 판명되었다.
2. Primer OPA-17를 이용하여 RAPD를 실시하였을때 340bp에서의 band유무에 의하여 한우와 한우교잡종을 판별할 수 있었으며, 순수한우의 유전자감식을 위한 표지유전자 검출비율은 82.0%로 대체로 높은 수치를 보였다.
3. 이상의 결과를 종합하여 볼때 OPA-17 primer에 의하여 순수한우의 유전자감식판별 비율이 82.0%로 대체로 높은 편이나, 완전한 순수한우의 유전자감식 판별을 위하여서는 이에 대한 연구를 추가 보완하여야 할 것으로 사료되었다.

## 제 7 장 연구성과 및 활용계획

한우의 조기선발 및 친자확인을 위한 분자유전학적 기법의 응용에 관한 연구결과로 기대되는 성과와 연구개발 사업성과에 대한 활용계획을 요약하면 다음과 같다.

### 제 1 절 기대되는 연구성과

본 연구의 수행결과 한우의 유전자원의 보존 유전능력개량을 위하여 기대되는 성과를 요약하면 다음과 같다.

1. 한우의 조기선발시 기존의 선발기준인 혈통, 생시체중 및 외모와 더불어 혈액단백질인 transferrin(Tf) 유전자형을 추가하여 선발에 활용시 선발효율의 증대로 생산성을 보다 향상시켜 경영의 효율화를 기할 수 있음.
2. 한우의 출생시 개체표식의 오류 개체, 능력검정시에 개체표식탈락 개체, 농가사육개체의 종축등록기관에 등록하는 개체에 대한 친자확인으로 정확한 혈통확인 및 기록관리가 수행되어 종축의 유전능력평가의 정확도를 증대시켜 선발효율의 증대로 우리나라 한우의 생산성향상에 크게 기여할 수 있음.
3. 육안식별이 불가능한 순수한우와 한우교잡종의 판별은 순수한우의 유전자원 보존은 물론 개량에 기여할 수 있을 것이며, 순수한우와 육우품종간의 판별은 한우육과 수입육의 판별로 한우육과 수입육의 유통질서확립에 기여할 수 있음.

4. 한우개량에 대한 분자유전학적 기법의 기술축적으로 타가축에 대한 이의 접목 및 응용에 기여할 수 있음.

## 제 2 절 연구개발 성과에 대한 활용계획

본 연구 개발과 관련하여 연구과제별 개발 성과에 대한 활용계획을 요약하면 다음과 같다.

1. 한우의 조기선발 보조수단의 개발 연구 성과의 활용 계획은 한우의 조기선발에 있어서 기존의 선발기준인 혈통, 생시체중 및 외모와 더불어 혈액 단백질인 Tf 유전자형을 추가로 보조하여 선발에 활용할 수 있도록 축산업협동조합 중앙회 가축개량사업소와 협의하여 추진하고자 함.
2. 한우의 정확한 유전능력 평가를 위한 효율적인 혈통 관리에 활용이 가능한 친자 감별의 활용계획(실적)에 있어서는 혈액형에 의한 한우의 친자 감별은 축협중앙회 가축개량사업소에서 기히 실시중에 있으며, BoLA-DRB3 exon2 유전자감식에 의한 한우의 친자 감별법의 활용은 축산업협동조합 중앙회 가축개량사업소 및 한국종축개량협회와 협의하여 기술이전 후 활용할 수 있도록 적극 추진하고자 함.
3. 순수 한우의 보존 및 개량을 위하여 한우와 한우 교잡종의 판별을 위한 유전자 감식의 활용은 순수 한우의 유전자감식 판별비율이 82%로, 완전한 유전자 감식 판별을 위하여는 이에 대한 연구를 추가 보완된 후, 축산업협동조합 중앙회 가축개량사업소와 협의하여 활용을 적극 추진하고자 함.

## 제 8 장 참 고 문 헌

1. Denicourt, D., M. P. Sabour and A. J. McAllister. 1990. Detection of bovine  $\kappa$ -casein genomic variants by the polymerase chain reaction method. *Anim. Gene.* 21:215-216.
2. Gahne, B., R. K. Juneja and J. Grolmus. 1977. Horizontal polyacryamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle, *Anim. Blood Grps. Biochem. Gent.*, 8:127-137.
3. Guthrie P. A. I., C. W. Magill, R. A. Frederiksen, and G. N. Odvody. 1992. Random amplified polymorphic DNA marker -A system for identifying and differntiating isolates of *Colletortichum graminicola*. *Phytopath.* 82: 832-835.
4. Harvey. W.R. 1975. Leastsquries analysis of data with unequal subclass numbers. USDA Agricultural Research Service H-4.
5. Henry, A. Erlich. 1992. genetic Analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genetics*, 26: 475-506.
6. Maiatis, T., E. F. Fritsch and Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Horbor Laboratory. Cold Spring Horbor, N.Y.

7. Medrano, J. F. and E. Aguilar-Cordova. 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine  $\beta$ -lactoglobulin genetic sequence and identification of genetic variant by RFLP analysis. *Anim. Biotech.* 1:73-77.
8. Michelle, P. S., M. Haymes and W. Scott. 1992. Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.*, 20: 5493.
9. Norman A., T. white and W. E. Raincy. 1990. Application of PCR : organismal and population biology. *Bio Science*, 40: 174-182.
10. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-6535.
11. 이창수, 유영복, 오성종, 정태영, 유진창. 1994. DNA多形性 분석에 의한 韓牛고기와 수입쇠고기의 육질 판별. *농업과학논문집*, 36: 222-226.
12. 정의룡, 김우태, 한상기. 1995. RAPD-PCR기법을 이용한 젓소의 DNA다형 분석과 유전적 특성에 관한 연구. *한축지*, 37: 455-466.
13. 정의룡, 김우태, 한상기. 1994. PCR-RFLP기법을 이용한 젓소유전적 개량을 위한 선발 도구로서  $\beta$ -lactoglobulin좌위의 유전자형 분석. *한축지*. 36:606-612.