

최 중
연구보고서

다유성(多乳性) 한우 생산을 위한 유량조절
유전인자의 탐색 및 활용에 관한 연구

Studies for genetic polymorphism of the milking-regulatory
candidate genes and its association with the traits
of milk production in Hanwoo cattles

건국대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “다유성(多乳性) 한우 생산을 위한 유량조절 유전인자의 탐색 및 활용에 관한 연구” 과제 최종보고서로 제출합니다.

2002년 10월 28일

주관연구기관명 : 건 국 대 학 교
총괄연구책임자 : 이 창 수
세부연구책임자 : 이 창 수
연 구 원 : 김언현, 김남국
김기현, 서영우, 조중호, 이휘철, 황수한

협동연구기관명 : 상 지 대 학 교
협동연구책임자 : 정 의 룡
연 구 원 : 이정구, 임태진

협동연구기관명 : 축산연 대관령지소
협동연구책임자 : 나 기 준
연 구 원 : 윤상기, 강우성
최재관, 전기준, 이창우

요 약 문

I. 제목

다유성(多乳性) 한우 생산을 위한 유량조절 유전인자의 탐색 및 활용에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

한우의 유생산 능력은 유선조직의 발달정도와 유선세포의 합성능 차이에 의해 결정되며, 이의 조절은 여러 호르몬 및 성장인자와 이들 인자에 대한 유선세포의 반응능력에 따라 좌우된다. 본 연구는 한우의 유선발달 및 유생산 조절에 관여하는 유전자들의 구조유전자와 조절영역을 담당하는 조절유전자들을 탐색하여 동정하고, 유즙생산에 관여하는 후보유전자들의 DNA 다형성을 분석하고 한우 산유관련 유용한 표지유전자를 개발하여 한우의 유생산 능력을 향상시키는데 활용하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

한우는 과거 역용 중심으로 사육되어 왔으나 농업기계화에 따른 역이용성의 후퇴, 쇠고기 소비량의 급증 등 시대적 요구의 변천에 따라 한우의 이용성 및 경제적 성격도 역용에서 육용으로 크게 전환되어 개량방향도 육용화 및 육질 고급화에 역점을 두고 있다. 한우는 체질이 강건하고 육질이 우수하여 고급육 생산을 위한 비육우로서 그 유전적 자질이 높게 평가되고 있으나 특히 암소의 포유능력 즉 산유능력이 매우 불량한 것이 오래전부터 한우개량에 문제점으로 지적되어져 왔다. 실제로 한우의 유즙 생산량은 송아지를 포유하기에도 절대 부족하여 송아

지의 정상적인 성장발육을 저해하는 가장 큰 원인으로 알려져 있다.

한우의 주요 경제형질로서 발육능력의 척도로 이용될 수 있는 체중, 증체량, 체위 및 산유능력 등을 고려할 수 있으나 이 가운데 한우의 산유능력은 송아지가 유전적으로 증체할 수 있는 잠재성을 충족시키지 못할 만큼 적은 양으로서 어미의 포유능력이 지극히 불량하여 송아지의 정상적인 성장과 발육에 커다란 지장을 초래하는 문제점으로 대두되고 있다. 그러나, 산유능력이 매우 열등한 한우에 있어 이유 전 발육능력이 최종 산유능력에 크게 영향을 미침에도 불구하고 송아지 이유시 체중에 절대적 영향력을 발휘하는 암소의 산유능력에 대한 개량은 거의 전무하였다고 볼 수 있다. 따라서 현재 종모우 위주의 산유능력 개량은 암소도 동시에 활용하므로써 개량효과를 극대화할 필요가 있다.

젖소에서 일반적으로 산유량에 대한 유전력은 평균 25%로 알려져 있으나 육우의 경우 최근의 자료에 의하면 평균 32%로 이보다 다소 높은 수준으로 보고되었다(Ensminger, 1987). 이는 산유량에 대한 적절한 선발이 주어졌을 때 육우의 산유능력을 개량할 수 있는 유전적 잠재가치가 충분히 있음을 의미한다고 볼 수 있다. 최근 분자유전학 및 유전자 분석기술의 급진적인 발전은 가축육종개량 연구에 직접적으로 활용할 수 있는 새로운 시대를 마련하였으며, 이를 통해 가축육종개량 연구가 진행되어야 할 것이다.

결론적으로 다유성 한우의 유증조절 유전인자를 탐색하여 개발된 DNA 표지유전자를 활용하게 되면 다유성 한우의 조기 진단 및 선발이 가능할 뿐만 아니라 선발시기 및 정확도에 큰 영향을 미침으로써 유전적 개량속도를 촉진시키고 유전적 개량량의 증가를 통해서 한우의 산유능력에 대한 개량 효율성을 극대화할 수 있어 부가가치가 높은 새로운 첨단 유전자육종기술이라고 평가할 수 있어 이에 대한 기술개발이 적극적으로 추진되어야 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 검정대상축 심사 및 선발

본 연구에서 고품질 고능력 한우개량을 위한 다유계통의 우량종빈우 선발을 위하여 축기연 대관령지소의 전체 한우 종빈우 집단(약 700두)을 대상으로 개체별로 혈통, 연령, 산차, 번식 및 건강상태 등을 기록과 개체심사를 통하여 조사하고

일차적으로 230두의 시험축을 선발하여 체중, 연령, 산차에 따라 시험축군을 분류 배치하였다.

2. 시험축 조성 및 산유능력 검정

조성된 시험축을 대상으로 전년도 산차에서 생산된 송아지의 60일령, 90일령 및 120일령의 이유시 체중에 대한 성적기록과 송아지 분만 후 1개월간의 비유초기 유량 예비조사를 통하여 산유량을 간접 추정하고 이 가운데 120두의 선발 후보축 개체들에 대한 분만 후부터 이유시까지 120일간의 실제 비유량을 측정하여 다유 및 저유성의 기초 계통축군을 조성하였다.

- 한우의 산유량 조사

한우는 육용우로서 젖소와는 달리 암소의 비유기관 및 유두가 매우 작고 비유량 또한 적기 때문에 개체별로 정확한 산유량을 측정하기가 기술적으로 대단히 어려워 산유능력 검정 및 산유량 기록확보에 많은 애로가 있는 것이 현실이다. 따라서, 본 연구에서는 한우의 정확한 비유량 추정을 위해서 최근 국내외에서 수행되고 있는 기존의 조사방법을 개선 보완한 포유전후 체중차와 기계착유의 장점을 살린 자연포유와 기계착유 병행법으로 한우 포유모우의 비유량을 조사하였다.

3. 유량조절 관련 유전자의 동정 및 분석

현재까지 유량조절에 관여하는 유전자로 알려진 유즙단백질 유전자(κ -casein, β -lactoglobulin, α -lactalbumin), 유선발달 및 비유호르몬 유전자(성장호르몬, prolactin), 비유관련호르몬 촉진인자 및 수용체 유전자(pituitary-specific transcription factor, growth hormone-releasing hormone) 그리고 insulin-like growth factor-I(IGF-I) 과 그 수용체(IGF-IR) 유전자의 구조 및 특성을 분석하고, 유전공학 기법을 이용하여 각 유전자내 새로운 돌연변이를 탐색하고, 분석된 다형현상과 산유형질 및 경제형질과의 관련성을 분석하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 다유계통 한우개량을 위한 한우선발 및 산유 유전능력 검정

본 연구는 축산기술 연구소 대관령 지소에서 1994년부터 2000년 사이에 조사된 산유량 조사자료 203개 기록을 이용하여 한우의 성장단계별 체중과 증체량의 유전적 특성을 파악하고 어미소의 산유능력과 송아지의 체중 및 성장률과의 유전적 관련성을 파악하기 위해 실시하였다. 연구에 필요한 유전(공)분산성분 추정에는 제한최대우도법(dfREML)을 이용하여 실시하였는데 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 분만 후 1, 2, 3, 4개월 산유량의 평균치는 각각 5.38, 5.31, 4.34 및 4.63kg였으며 이 들 산유량은 분만년도-계절에 의해 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

- 일일산유량의 유전력은 분만 후 기간이 경과함에 따라 높아지는 경향을 보였는데, 이것은 산유량측정 횟수가 누적됨에 따라 시험축들이 받는 산유량조사 스트레스가 줄어들고 시험축들이 산유량조사에 대해 적응되어 가가 때문인 것으로 사료된다.

- 분만 후 월별 산유량 및 평균 산유량간의 유전상관은 0.86~0.73의 범위로 매우 높게 추정되었고, 산유량과 이유시체중간 그리고 산유량과 6개월령 체중간의 유전상관계수는 각각 0.32 및 0.36 이었다. 산유량과 생시체중과의 표현형 상관계수보다는 산유량과 이유시 체중간의 표현형 상관계수가 작았으며 평균산유량과 이유후 체중인 6개월령 체중과의 표현형상관은 부의 상관을 보였다. 그리고 평균 산유량과 이유시까지 일당증체량 그리고 평균산유량과 6개월령 까지 일당증체량 간의 유전상관계수는 각각 0.34 및 0.36이었다.

- 이유시체중의 개량 및 다유성 한우생산을 위한 유량조절 유전인자의 탐색을 위한 한우 암소 산유능력검정은 산유량 측정방법을 본 연구에서 이용한 포유 및 기계착유방법 보다는 적은 인력으로 많은 두수를 측정 할 수 있는 포유전후 체중차를 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

나. 다유성 한우선발을 위한 DNA 표지인자 이용기술개발

본 연구는 DNA marker를 이용한 다유계통 한우선발 기술개발을 목적으로 RFLP, SSCP, VNTR 및 AFLP 기법을 이용하여 한우의 DNA marker를 검출하고 이들 polymorphic DNA marker와 송아지 이유시 체중 및 산유량간의 관련성을 분석하였다. 본 연구의 공시축은 축산기술 연구소 대관령지소의 1990년도부터 2000년도까지의 한우 암소집단을 대상으로 송아지 이유시 체중에 대한 육종가를 추정하여 다유성 개체 151두와 저유성 개체 140두의 총 291두를 각각 선발하였고, 산유능력 검정성적은 불완전한 착유로 인한 오류 등으로 판단되는 측정치를 제외한 총 165두의 암소를 이용하였다. 한우의 DNA 표지인자와 산유형질과의 관련성 분석은 선형모형의 최소자승법에 의한 분산분석을 SAS program을 이용하여 통계 검정하였다.

1) 한우에서 산유관련 후보유전자의 PCR-RFLP Marker와 산유형질간의 관련성 분석

가) 생리적/생화학적 및 생물학적으로 포유동물의 유즙 합성과 분비에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 것으로 그 기능이 잘 알려져 있는 총 10종류의 산유관련 후보유전자로서 κ -casein(κ -CN), β -lactoglobulin(β -LG), α -lactalbumin(α -LA), growth hormone(b GH), prolactin(b PRL), pituitary-specific transcription factor(PIT-1), ornithine decarboxylase(ODC), growth hormone receptor(GHR), growth hormone releasing hormone(GHRH) 및 mitochondrial DNA D-loop(mt DNA)를 대상으로 PCR-RFLP 방법을 이용하여 한우의 polymorphic DNA marker를 분석하였다. 각 후보유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 후 증폭산물을 특정 인지부위를 갖는 제한효소를 이용하여 절단하고 agarose 또는 polyacrylamide gel 전기영동법으로 각각 분석한 결

과 κ -CN, β -LG, α -LA, *bGH*, *bPRL*, *PIT-1*, *ODC*, *GHRH* 및 *GHR* 유전자 좌위는 각각 A와 B 두 개의 대립유전자에 의해 지배되어지는 AA, AB 및 BB 3 종류의 유전자형이 검출되었고 mt DNA는 A와 B 두 개의 RFLP type이 관찰되었다.

나) 다유성 및 저유성 한우 선발집단에서 이들 후보유전자 좌위의 유전자형 출현빈도 차이를 통계 검정한 결과 α -LA($P<0.05$), *PIT-1*($P<0.01$), *GHRH*($P<0.05$) 및 mt DNA의 *Hpa* II($P<0.001$) 제한효소 절단형에서 각각 유의차가 인정되었다. 즉, 다유 및 저유성 선발군간의 유전자형 출현율에서 다유성 선발군은 저유성 선발군과 비교하여 α -LA 유전자의 AA형과 mt DNA(*Hpa* II)의 A type이 각각 14.4%와 19.5% 정도 높은 출현빈도를 보인 반면 *PIT-1* 유전자의 AB형과 *GHRH* 유전자의 BB형은 각각 약 6.4%와 17.9% 낮은 값을 나타내어 두 선발집단간에 뚜렷한 차이가 인정되었다.

다) 한우의 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 RFLP marker간의 관련성 분석에 있어 다유성 선발군은 κ -CN 좌위($P<0.001$)와 mt DNA의 *Rsa* I 제한효소 절단형($P<0.01$)에서 이유시 체중에 대한 육종가에 각각 고도의 유의차가 인정되었고, *PIT-1* 좌위도 유의적($P<0.05$)인 차이가 있었으나 저유성 선발군은 α -LA 좌위만이 유의적($P<0.05$)인 차이를 나타냈다. 즉, 다유성 선발군에서 κ -CN 좌위의 BB형과 *PIT-1* 좌위의 AB 또는 BB 유전자형 및 mt DNA(*Rsa* I)의 A형은 다른 유전자형들에 비해 육종가 추정치가 높았으며, 저유성 선발군에 있어 α -LA 좌위의 BB 유전자형은 AA 또는 AB 유전자형 보다 육종가 값이 상대적으로 낮은 경향을 보였다. 한편, 전체 선발집단에서는 총 4종류의 유전자(κ -CN, *bGH*, *bPRL* 및 mt DNA(*Hpa* II)에서 각각 유의적인 차이가 인정되었는데, κ -CN 좌위의 BB형, *bGH* 좌위의 AA형, *bPRL* 좌위의 AB형 및 mt DNA(*Hpa* II)의 A형이 이유시 체중에 대한 육종가 값이 가장 높은 경향을 나타냈다.

라) 각 후보유전자의 유전자형이 송아지 분만 이후부터 120일까지의 각 산유량에 미치는 효과를 분석한 결과 κ -CN, β -LG, α -LA 및 *bPRL* 유전자 좌위는 산유량과 유의적인 연관성이 인정되었다. 즉, κ -CN 및 *bPRL* 좌위의 BB

유전자형은 산유량이 AA 또는 AB 유전자형에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높았고, β -LG 및 α -LA 좌위의 AA 유전자형은 AB와 BB 유전자형에 비하여 산유량이 유의적($P<0.05$)으로 높은 경향이였다.

2) 한우에서 산유관련 후보유전자의 PCR-SSCP marker의 검출 및 산유형질간의 관련성 분석

가) 산유관련 후보유전자들에 대한 SSCP marker로서 κ -CN, IGF-1, bGH 및 bPRL의 후보유전자와 mt DNA를 대상으로 이들 각 유전자에 특이적인 염기서열을 갖는 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 후 증폭산물을 96°C에서 5분간 열변성시킨 다음 12-15% 비변성 polyacrylamide gel로 DNA 단편을 각각 분리한 후 silver 염색법으로 SSCP 유전자형을 검출하였다. κ -CN과 IGF-1 좌위는 3개의 유전자형이 각각 확인되었고 bGH 및 bPRL 좌위는 총 6개의 유전자형이 각각 검출되었으며 mt DNA는 총 11개의 SSCP haplotype이 검출되었다. 다유성 및 저유성 선발집단간의 SSCP 유전자 출현빈도를 비교한 결과 bGH 좌위의 AB형과 bPRL 좌위의 BB형이 저유성 선발군에 비하여 각각 10.6%와 12.2% 정도 높아 유의적($P<0.05$)인 차이가 인정되었고 IGF-1 좌위의 AB형은 저유성 선발군의 AA 또는 BB형에 비하여 12.5% 높은 출현율을 나타내 고도의 유의차($P<0.01$)가 있음이 확인되었다.

나) 다유성 및 저유성 선발군의 SSCP 유전자형과 송아지 이유시 체중에 대한 육종가 추정치와의 관계에서 다유성 선발군은 κ -CN($P<0.01$) 및 bGH($P<0.05$) 좌위에서 통계적 유의성이 인정되어 κ -CN 좌위의 BB 유전자형과 bGH 좌위의 AA 또는 AB 유전자형을 보유하고 있는 개체가 송아지 이유시 체중에 대한 육종가가 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나 κ -CN, bGH 및 bPRL 좌위는 저유성 선발군에서 육종가와 유의적($P<0.05$)인 관련성이 인정되었고 전체 선발집단의 경우에는 κ -CN 및 IGF-1 두 좌위가 이유시 체중에 대한 육종가와 유의적($P<0.05$)인 차이가 관찰되었다. 즉, κ -CN 좌위의 BB형 및 IGF-1 좌위의 AB형은 다른 SSCP 유전자형에 비하여 육종가 값이 상대적으로 높은 경향을 나타냈다.

다) 각 후보유전자의 유전자형과 산유량과의 관련성을 분석한 결과 κ -CN 좌위는 총산유량에 유의적($P<0.05$)인 영향을 미쳤고 bPRL 좌위는 60일과 120일 유량, IGF-1 좌위는 30일 유량 그리고 mt DNA는 30일 유량과 총산유량에 유의적($P<0.05$)으로 높은 경향을 나타냈다. 즉, κ -CN 좌위의 BB형, bPRL 좌위의 AC형, IGF-1 좌위의 AA형 및 mt DNA의 B형은 이들 각 유전자 좌위의 다른 유전자형에 비하여 유량이 유의적으로 높았다.

3) 한우에서 VNTR marker와 산유형질간의 관련성 분석

가) 한우의 VNTR 좌위 분석은 2종류의 minisatellite(KBMS2와 BTGL1) 및 16종류의 microsatellite(BM1824, BM2113, SPS115, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ILST004, INRA011, BM4528, BM4311, UWCA, DU17S2 및 IGF-1) 좌위를 이용하였다. 각 유전자 좌위를 PCR로 증폭한 후 증폭산물을 DNA 단편을 비변성 polyacrylamide gel 전기영동법으로 분리하고 silver staining 하여 VNTR marker를 검출하였다.

나) KBMS2 및 BTGL1 minisatellite 좌위에서 각각 16개와 15개의 상이한 대립유전자가 확인되었고 선발집단간에 대립유전자 출현빈도를 비교한 결과 특히, BTGL1 좌위의 경우 다유성 선발군에 있어 381bp 대립유전자 빈도가 21.9%로 저유성 선발군의 12.1%에 비하여 약 10% 높은 출현율을 보인 반면 저유성 선발군은 320bp 대립유전자 빈도가 26.4%로 다유성의 10.6%에 비해 약 16% 정도 높은 수준의 출현빈도를 나타내어 두 선발집단간에 기대할 만한 차이를 보였다. KBMS2와 BTGL1 좌위에서 다유성 및 저유성 선발군의 이형접합성과 PIC 값을 계산한 결과 다유성 선발군은 0.861과 0.823였고 저유성 선발군은 0.883과 0.857로 두 선발집단간에 차이는 인정되지 않았다..

다) 총 16종류의 microsatellite 좌위를 이용하여 분석한 결과 각 좌위당 3종류에서 10종류의 대립유전자가 확인되었다. 한우의 두 선발축군에서 각 좌위의 대립유전자 빈도 분포를 비교한 결과 다유성 선발군은 SPS115 좌위의 244bp, ETH3 좌위의 121bp, TGLA122 좌위의 143bp, TGLA126 좌위의 113bp, UWCA46 좌위의 125bp, DU17S2 좌위의 193bp 및 IGF-1 좌위의 126bp 7종류의

대립유전자가 저유성 선발군의 대립유전자 빈도에 비해 각각 11.7%, 12.3%, 11.4%, 16.9%, 13.0%, 14.8% 및 17.5% 로 출현율이 높았으나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 평균 이형접합성과 PIC 값은 다유성 선발군이 각각 0.747와 0.729으로 저유성 선발군의 0.751와 0.733의 값과 매우 유사한 경향을 보였다.

라) KBMS2 및 BTGL1 두 좌위는 다유성 및 저유성 선발집단간에 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 유의성이 인정되지 않았다. 그러나, 전체 선발집단에서 KBMS2 좌위가 송아지 이유시 체중에 유의적($P<0.05$)인 영향을 미쳤고 또한, 산유량에 있어서도 90일, 120일 유량 및 총산유량에서 각각 유의적인 차이를 보여 360bp의 대립유전자를 가진 개체는 300bp의 대립유전자를 보유한 개체들에 비해 약 2.75, 3.21 및 353.77kg의 유량을 각각 더 많이 생산하였다.

마) Microsatellite marker를 이용하여 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 암소의 산유량과의 관련성을 분석한 결과 다유성 선발군은 BM1824, ETH10, TGLA227 및 DU17S2 4종류의 좌위에서 이유시 체중에 유의적($P<0.05$)인 영향을 미쳤으나 저유성 선발군은 TGLA122 및 TGLA126 두 좌위에서 유의차($P<0.05$)가 인정되었고 전체 선발집단을 분석했을 때 BM1824, SPS115, TGLA126 및 IGF-1 좌위가 이유시 체중에 유의적($P<0.05$)인 영향을 주었다. 또한, 산유량과의 관련성 분석에서 ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA227, ILST004, DU17S2 및 IGF-1 8개 좌위의 특정 대립유전자가 산유량과 밀접한 관련성이 있는 것으로 확인되었다. 특히, 이들 8개 microsatellite 좌위 가운데 ETH3 좌위의 121bp, TGLA122 좌위의 181bp 및 TGLA227 좌위의 89bp 대립유전자는 60일, 90일 120일 및 총산유량에서 각각 가장 높은 산유량을 기록하였고 IGF-1 좌위의 134bp 대립유전자는 120일 유량 및 총산유량에서 다른 대립유전자에 비하여 유량이 상대적으로 높은 경향을 나타냈다.

4) 한우에서 산유형질과 관련된 AFLP marker의 개발

가) 한우의 AFLP DNA marker 검출은 4bp와 6bp의 인지부위를 갖는 *Mse* I과 *Taq* I 그리고 *EcoR* I과 *Hind* III 4종류의 제한효소를 사용하여 이들 제한효소와 다양한 primer 조합형에 따른 AFLP 유전자 지문의 출현 양상을 비교하여 다유성 계통에 특이적인 DNA marker를 검색하였다.

나) 7종류의 primer 조합형(E32/H12, E38/H13, E45/H12, E33/T35 및 H12/M13)에서 선발계통간의 출현빈도에 차이를 보이는 특이적 DNA marker가 검출되었고 AFLP marker의 출현율을 비교한 결과 다유성 선발군에서 검출된 HSE31, HME51 및 HMH11 DNA marker는 각각 60.6%, 78.9% 및 85.9%로 저유성 선발군의 12.8%, 39.5%와 25.6%에 비해 높은 출현빈도를 보여 두 선발군간에 뚜렷한 차이($P < 0.05$)가 인정되었다.

다) AFLP marker를 이용하여 산유형질과의 관련성 분석에서 다유성 및 저유성 두 선발군은 송아지 이유시 체중의 육종가와 DNA marker간에 통계적 유의차가 인정되지 않았으나 전체 선발집단에 있어 HSE31, HME51 및 HMH11 3종류의 특이적 DNA marker는 none marker에 비하여 육종가 값이 높게 추정되어 고도의 유의차($P < 0.001$)가 인정되었다. 또한, 산유량과의 관련성 분석에서 다유성 선발군의 HME51 및 HSE31 marker는 120일 및 총산유량에서 각각 유의적($P < 0.05$)인 차이가 인정되었고 저유성 선발군의 HME51 marker는 총산유량과 유의성($P < 0.05$)이 인정되었다. 한편, 전체 선발집단의 경우 총 3종류의 DNA marker(HSE31, HME51 및 HMH11)가 산유량과 밀접한 관련성이 인정되었는데, HME51 및 HMH11 marker는 60일, 90일, 120일 및 총산유량 그리고 HSE31 marker는 분만 후 30일을 포함한 각 월령별 산유량에 각각 유의적인 영향을 미쳐 이들 DNA marker를 보유하고 있는 개체는 none marker에 비하여 산유량이 월등히 높은 경향을 나타냈다.

다. 유량조절 유전인자의 특성 및 활용 연구

유량조절에 영향을 미치는 유전자들을 선발하고, 선발된 각 유전자의 염기서열 및 구조적 특성 규명을 위해 연구가 수행되었다. 일반적으로 잘 알려진 유즙생산에 영향을 미치는 대표적인 호르몬으로 성장호르몬(GH)과 prolactin(PRL)을 들 수 있으며, 이들 유전자는 유선에 작용하여 유선의 발달 및 유즙생산에 중요 조절인자로서 작용한다. 또한 성장호르몬의 분비 및 기능을 중재하는 성장호르몬 분비자극 호르몬(GHRH)과 소마토메딘(somatomedins)을 선발하여 그 역할 규명에 대한 연구를 수행하였다.

1) 한우 유량조절 유전자 구조 동정 및 특성분석

한우 성장호르몬(GH)과 그 수용체(GH-R), IGF-I 과 그 수용체(IGF-I-R), 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 및 prolactin(PRL)과 그 수용체(PRL-R)를 대상으로 유전자 전사조절 영역의 염기서열 및 구조적 특성을 분석하기 위해 각 유전자들을 클로닝하여, 염기서열 분석을 실시하였다. 새롭게 동정된 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R, 671bp, Genbank Accession No. AF267729), IGF-I (4kb, Genbank Accession No. AF404761) 및 IGF-I 수용체(IGF-I-R, 1kb) 유전자 염기서열은 Genbank에 등록하였다.

2) 한우 유량조절 유전자 변이탐색

유량조절에 관련된 유전자들을 대상으로 새로운 유전자 변이 탐색을 위해 direct-sequencing 방법 및 SSCP(single strand conformational polymorphism), PASA(PCR amplification of specific allele), RFLP(restriction fragment length polymorphism)등의 기법을 활용하였다. 각 유전자내 새로운 돌연변이를 검색한 결과 성장호르몬(GH) 성장호르몬 분비자극 호르몬(GHRH-R) 유전자에서 새로운 점 돌연변이를 검출하였다. 성장호르몬(GH) 유전자의 경우 각 대립유전자에 대한 출현 빈도는 cytosine 염기가 0.821, thymine 염기가 0.179의 분포로 나타났으며, GHRH-R는 cytosine 염기가 0.51, thymine 염기가 0.49의 분포로 분석되었다.

3) 산유형질 및 경제형질 관련성 분석

새롭게 분석된 점 돌연변이를 대상으로 산유형질 및 경제형질과의 관련성 분석을 실시하였다. SAS의 일반선형모델에 의한 최소자승법을 이용하였으며, 분석한 결과 성장호르몬(GH)은 3개월령 체중 및 도체중에서 유의적인 차이($P<0.05$)를 나타냈다. 또한 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R)의 경우 3개월령 체중 및 근내지방도에서 유의적인 상관성($P<0.05$)을 나타내는 것으로 분석되었다.

2. 활용에 대한 건의

- 한우 암소의 주요 경제형질인 산유능력과 유의적으로 관련된 DNA 표지인자를 이용하여 산유능력이 우수한 다유성 계통 한우의 조기검색 및 선발 보조 도구로 활용할 수 있다.

- 전통적인 선발육종 체계와 병행하여 DNA marker를 지표로 하여 선발하는 MAS의 분자유종기술을 이용함으로써 신 육종기법이 접목된 고품질 고능력 한우 개량을 위한 새로운 육종전략 수립에 활용할 수 있다.

- 다유성 계통의 한우 생산기술은 발육성장과 기초체형이 매우 양호한 우량 송아지 및 장기비육에도 지속적인 증체효과를 얻을 수 있는 비육소 생산기술로 이용할 수 있다.

- 유전적으로 포유능력과 비유능력이 우수한 우량 종빈우 선발 및 핵군 구성에 이용할 수 있어 암수 동시 선발체계 및 개량기반 구축에 활용될 수 있다.

- 한우의 경제형질과 관련된 DNA marker 탐색 및 발굴을 통하여 비유형질 뿐만 아니라 한우의 산육형질(체중, 체위, 증체량, 육질 등)과 연관된 DNA 표지인자 탐색 및 개발에도 응용이 가능할 것으로 기대된다.

- 한우의 육질 판별을 위한 기초 자료로서 사용될 수 있으며, 실제 농가의 소득 증대를 위한 판별 DNA marker로 활용할 수 있다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Subject

Studies for genetic polymorphism of the milking-regulatory candidate genes and its association with the traits of milk production in Hanwoo cattles

II. Objectives and importance of the project

Recently, applications of molecular genetic and other biological approaches in animal breeding from early nineties have not only shortened the time required for the improvement of some economic traits but also enabled the improvement of quantitative traits. As such, identification of genetic and other biological markers associated with economic traits and the marker-assisted selection of breeding animals are expected to greatly contribute to the development of animal breeding industry.

Korean native cattles are known to have superior genes for meat qualities. However, Korean cows have low milk production ability resulting in inferior ability to produce meat. In addition, insufficient amount of milk leads low weaning weight of calves. Therefore, to improve calf growth and meat production ability in Korean cattle, it is important to increase milk production ability. Milk yield is an economically important trait in cattle industry because weaning weight of beef calves is influenced by milk production of dams more than by any other single factors. It is well known that the milk production of beef has large effects on calf growth.

The mammary gland influences milk production yield considerably, Numbers of hormones and growth factors are a major determinant of milk yield. Thus, understanding of the function that candidate genes for increase

milk production will lead to develop new genetic markers to enhance milk production yield in the Hanwoo. But many questions on the mechanisms that how these factor regulates milk production remain unanswered.

This study was conducted to identify candidate genes for milk production, to analyze the genetic polymorphism, to examine genetic patterns of the these genes, and finally to characterize the roles of these identified genetic polymorphism on the milk production and important economic traits in the Hanwoo.

III. Contents and ranges of the project

For the studies of milk yield and performance traits in Hanwoo, we are recorded milk production yield and weight of 2, 3, 4 month. The 1,736 records of Hanwoo calves collected for weaning weight and 203 records for milk yield from 1994 to 2000 in Daekwanryeong as a branch of National Livestock Research Institute(NLRI). Estimates of (co)variance components were obtained by derivative-free Restricted Maximum Likelihood(DF-REML). In order to investigate the genetic polymorphism of candidated genes for regulating milk production in Hanwoo, this study was tried by using molecular genetic techniques of restriction fragment length polymorphism(RFLP), single strand conformational polymorphism(SSCP), amplified fragment length polymorphism(AFLP) and other DNA techniques.

The present study was therefore undertaken with following objectives;

1. Selection and performance test of Hanwoo for the studies of milk production and economic traits.
2. Identification and characterization of candidate genes for regulating milk production in Hanwoo.
3. Associations between the identified genetic marker and the milk production and important economic traits.

IV. Research results and suggestions for application of results

1. Research results

1) Performance test of genetic milking ability and selection for improvement of high milk line in Hanwoo.

The objectives of this research were to improvement of milking ability in Hanwoo, and further to examine the relationship between milk yield and body weight of calves. A total of 1,736 records were used for weaning weight and 203 records for milk yield. the data for body weights were collected from 1990 to 2000 and the data for milk yield were collected from 1994 to 2000 in Daekwanryong branch National Livestock Research Institute(NLRI). Estimates of (co)variance components were obtained by derivative-free Restricted Maximum Likelihood(DF-REML).

The results are summarized as follows.

- The means for the milk yield were 5.38, 5.31, 4.34, 4.63kg at 1, 2, 3, 4month postpartum, respectively. The effects of calving year-season were significant for the milk yield of cow.
- Heritability estimates of direct genetic effects for milk yield were increased from 1st month to 4th month. This might be due to the stress of calves.
- The genetic correlation of average milk yield with milk yield at each month postpartum too high 0.86~0.73. and the genetic correlations of average milk yield with calf weight at weaning and 6 month of age were 0.32 and

0.36, respectively, and phenotypic correlation to weaning were decrease and negative correlation after the weaning. The genetic correlation of average milk yield with average daily gain from birth to weaning and to 6 month of age were 0.34 and 0.36, respectively.

- The genetic correlation between the ratio of milk persistency and average milk yield was 0.30, and the genetic correlation between the ratio of milk persistency and weaning weight was small.

2) Technical development of DNA markers for selection of high milk line in Hanwoo

The objectives of the present study were to analyze the DNA markers related milk production traits using RFLP(restriction fragment length polymorphism), SSCP(single strand conformation polymorphism), VNTR(variable numbers of tandem repeats) and AFLP (amplified fragment length polymorphism) techniques as genetic markers in Korean cattle. On the basis of these polymorphic DNA markers, the association between DNA markers and production traits such as breeding value for calf weaning weight, milk yield and body weight of Korean cows were analyzed. Total 291 Korean cows raised in Daekwanryeong branch of National Livestock Research Institute were selected for high(n=151) and low(n=140) milk groups by estimating breeding values for weaning weights of calves. Data included estimated breeding values(EBV) for the weaning weight of calves and milk yield of Korean cows. The results were summarized as follows:

①Associations between PCR-RFLP markers of candidate genes and milk production traits in Korean cattle

- A total of 10 candidate genes, κ -casein (κ -CN), β -lactoglobulin (β -LG), α -lactalbumin(α -LA), growth hormone(*bGH*), prolactin(*bPRL*), pituitary-specific transcription factor(*PIT-1*), ornithine decarboxylase(*ODC*), growth hormone releasing hormone(*GHRH*), growth hormone receptor(*GHR*), insulin-like growth factor-1 receptor(*IGF-1*) and mitochondrial DNA(mt DNA) related to milk production traits in bovine, were analyzed using PCR-RFLP methods. The amplified products were digested with specific restriction enzymes and separated on agarose or polyacrylamide gels. Three different genotypes(AA, AB and BB) with two codominant alleles(A and B) were observed in nine loci, whereas mt DNA RFLP showed two different genotypes(A and B).

- Gene frequencies of the alleles for high and low milk groups were calculated for the all loci. The allele frequencies between two selected groups were significantly different at α -LA ($P<0.05$), *PIT-1*($P<0.01$), *GHRH*($P<0.05$) and mt DNA-*Hpa* II($P<0.001$) loci.

- Significant differences were observed at κ -CN ($P<0.001$), *PIT-1*($P<0.05$), mt DNA-*Rsa* I ($P<0.01$) and α -LA($P<0.05$) loci for breeding values in high and low milk groups. In high milk group, cows with BB genotype for κ -CN, AB genotype for *PIT-1* and A genotype for mt DNA-*Rsa* I had higher breeding values for calf weaning weight than those of other genotypes, whereas cows with α -LA BB genotype had lower breeding value than those with AA or AB genotypes. However, the selected overall group showed significant differences in κ -CN($P<0.01$), *bGH*($P<0.05$), *bPRL*($P<0.05$) and *Hpa* II($P<0.05$) of mt DNA genes. κ -CN BB, *bGH* AA and mt DNA(*Hpa* II) A cows had higher breeding value for weaning weight than those of other genotypes.

- The κ -CN, β -LG, α -LA and *bPRL* loci had significant effects on milk yield. κ -CN and *bPRL* genotypes significantly influenced in milk yield

($P < 0.05$) with the highest milk yield obtained with the BB genotype. Also, AA genotype of β -LG and α -LA loci was associated with higher milk yield ($P < 0.05$). No significant effects on milk yield were observed with other loci.

②Associations between PCR-SSCP markers and milk production traits in Korean cattle

- For the analysis of SSCP markers, five candidate genes (κ -CN, IGF-1, *bGH*, *bPRL* and mt DNA) were amplified using the specific primers. The PCR products were denatured at 96°C for 5min, loaded on to 12-15% nondenaturing polyacrylamide gels and detected by silver staining. Three to six genotypes were identified in κ -CN, IGF-1, *bGH*, and *bPRL* loci, whereas mt DNA showed eleven different types (A to K). Significant frequency differences in SSCP genotypes of mt DNA were detected between high and low milk groups ($P < .01$). The high milk group showed significant differences in the SSCP genotypes of *bGH*, *bPRL* and mt DNA frequencies compared with those of low milk group.

- Significant differences among genotypes of κ -CN and *bGH* loci in high milk group were found for breeding values of calf weaning weight. Cows with BB (κ -CN, $P < .01$) and AA or AB (*bGH*, $P < .05$) genotypes had higher breeding values for calf weaning weight. Significant effects on breeding values in low milk group were found at κ -CN, *bGH* and *bPRL* loci ($P < .05$). Significant differences among genotypes were found for breeding values ($P < .05$) in κ -CN and IGF-1 loci of overall group. κ -CN BB and IGF-1 AB cows had higher breeding values than those with SSCP genotypes.

- Genotypes of κ -CN, *bPRL*, IGF-1 and mt DNA had significant ($P < .05$) effects on milk yield in high milk group. Cows with BB of κ -CN BB, AC

of bPRL, AA of IGF-1 and B of mt DNA genotypes had higher milk yield than other SSCP genotypes.

③ Associations between genetic markers and milk production traits in Korean cattle using minisatellite and microsatellite.

- Two minisatellites (KBMS2 and BTGL1) and sixteen microsatellites (BM1824, BM2113, SPS115, ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA126, TGLA227, ILST004, INRA011, BM4528, BM4311, UWCA, DU17S2 and IGF-1) were used to amplify genomic DNA segments by PCR, and the fragments were size-separated using non-denaturing polyacrylamide sequencing gels followed by silver staining.

- Sixteen and fifteen alleles were observed in KBMS2 and BTGL1 loci, respectively. Different allele frequencies, which were 381bp and 320bp, between high (21.9% and 12.1%) and low (10.6% and 26.4%) milk groups were detected at BTGL1 locus, whereas KBMS2 locus tended to similar between groups. The heterozygosity and PIC values of KBMS2 locus were estimated as 0.861 and 0.823 in high and 0.862 and 0.824 in low milk groups, respectively, and BTGL1 locus showed a little bit higher heterozygosity and PIC values than KBMS2 locus.

- Alleles with three to ten were identified in microsatellite loci. The allele frequencies of 244bp for SPS115, 120bp for ETH3, 143bp for TGLA122, 113bp for TGLA126, 125bp for UWCA46, 113bp for DU17S2 and 126bp for IGF-1 in high milk group differed slightly from those of low milk group. The heterozygosity and PIC values between high (0.747 and 0.729) and low (0.751 and 0.733) milk groups were estimated. Heterozygosity and PIC values in the selected overall groups were 0.749 and 0.731, respectively.

- For the analysis of the effects of minisatellite loci, KBMS2 locus showed significance ($P < .05$) for breeding value in overall group, milk yield for cows at 90 and 120 day, and total milk yield. Cows with 360bp allele of KBMS2 locus had higher milk yield than those of other alleles.

- In the relationships between microsatellite markers and milk production traits, a total of four (BM1824, ETH10, TGLA227 and DU17S2) and two (TGLA122 and TGLA126) microsatellite loci were significant ($P < .05$) for breeding value between groups, whereas four microsatellite loci (BM1824, SPS115, TGLA126 and IGF-1) in overall group showed significant differences ($P < .05$). ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA227, ILST004, DU17S2 and IGF-1 loci had significant effects on milk yields during milking periods. Especially, ETH10, TGLA122 and TGLA227 loci showed significant effects on milk yield during lactation periods.

④ Associations between AFLP markers and milk production traits in Korean cattle

- Genomic DNA was digested with particular combinations of restriction enzymes, which were 4 base (*Mse I* and *Taq I*) and 6 base (*EcoR I* and *Hind III*) recognition sites, ligated to restriction specific adapters and amplified using the selective primer combinations.

- Seven specific AFLP markers were detected using E32/H12, E38/H13, E45/H12, E33/T35 and H12/M13 primer combinations between selected groups, and designated as HSE31, HME32, HME38, HSE41, HME42, HME51 and HMH11, respectively. The frequencies of specific AFLP markers for HSE31, HME32, HME38, HSE41, HME42, HME51 and HMH11 were 60.6, 21.1, 25.3, 46.5, 26.8, 78.9 and 85.9% in high milk group and 12.8, 46.5, 60.5, 19.8, 66.3, 39.5 and 25.6% in low milk group, respectively. On the contrary, the frequencies of none AFLP markers were 39.4, 78.9, 74.6, 53.5, 73.2, 21.1

and 14.1% in high milk group and 87.2, 53.5, 39.5, 80.2, 33.7, 60.5 and 74.4% in low milk group, respectively.

- The effects of the seven AFLP markers on the breeding values for calf weaning weight, milk yield and body weight were examined in high and low milk of HSE31, HME38, HME51 and HMH11 had higher breeding value compared with cows with none marker in overall group, whereas cows with a none marker of HME38 had higher breeding value compared with cows with a specific marker. There was a highly significant difference ($P < .001$) for breeding value. At the effects on milk yield during milking periods, HSE31 and HME51 had a significance ($P < .05$) on total milk yield and milk yield during 120 day in high milk group, respectively. However, HSE31, HME42, HME51 and HMH11 markers in overall group showed significant effects on milk yield during the lactation periods.

3) Polymorphic studies to genes of lactating regulator for milk production in Hanwoo

The purpose of the study was to investigate association between milk production traits and genes for regulating milk production in the Korean native cattle(Hanwoo). In milk production traits, the growth hormone(GH) and the prolactin(PRL), which is known to mammary gland growth and milk production. Also, growth hormone releasing hormone(GHRH) and somatomedins play a major role in stimulating both synthesis and release of GH and its metabolism.

① Identification and characterization of genes for regulating milk production in Hanwoo

The following gene's molecular cloning and sequencing analysis were studied : growth hormone(GH), growth hormone-receptor(GH-R), insulin like growth factor- I (IGF- I) and insulin like growth factor- I -receptor(IGF- I -R), growth

hormone releasing hormone-receptor(GHRH-R) and prolactin(PRL). The new sequences were deposited in Genbank database ; growth hormone releasing hormone-receptor(GHRH-R, 671bp, Genbank Accession No. AF267729), insulin like growth factor- I (IGF- I , 4kb, Genbank Accession No. AF404761).

② Polymorphism analysis of genes for regulating milk production in Hanwoo

In order to investigate the genetic polymorphism of genes for regulating milk production in Hanwoo, this study tried DAN techniques of single strand conformational polymorphism(SSCP), PCR amplification of specific allele(PASA) and restriction fragment length polymorphism(RFLP). We obtained new polymorphism within growth hormone and growth hormone releasing hormone-receptor gene promoter region. The allele frequency of the growth hormone were calculated 0.821 and 0.179, in addition, the growth hormone releasing hormone-receptor were calculated 0.51 and 0.49 for cytosine and thymine, respectively.

③ Analysis of novel polymorphism and study of its effect on milk production and economic traits in Hanwoo

The General Liner Model(GLM) procedure of the SAS was used for statistical analysis. Two polymorphisms(growth hormone and growth hormone releasing hormone-receptor gene) may be associated($P < 0.05$) with weight of 3 month and carcass weight and marbling score.

2. Suggestions for application of results

From the results of this project, further investment is necessary for the industrial application of these results.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of project -----	32
Chapter 2. Current state of research in domestic and foreign country --	40
Chapter 3. Contents and Results -----	45
 Section 1. Performance test of genetic milking ability and selection for improvement of high milk line in Hanwoo.	
1. Material and Method -----	45
1) Performance and milk yield test of Hanwoo	
2) Method of analysis for selection and milk yield ability test	
3) Method of analysis for genetic ability test	
2. Results and Discussion -----	52
1) Test of milk yield ability and weight in cow	
2) Effect of general ability and environment of milk yield and weight	
3) Analysis of genetic ability for milk yield	
3. Conclusion -----	83

Section 2. Technical development of DNA markers for selection of high milk line in Hanwoo

1. Associations between PCR-RFLP markers of candidate genes and milk production traits in Korean cattle	
1) Introduction -----	84
2) Material and Method -----	56
3) Results and Discussion -----	91
① Analysis of allele frequencies and PCR-RFLP marker of candidate genes	
② Analysis of relationship between PCR-RFLP markers and quantitative traits	
2. Associations between PCR-SSCP markers and milk production traits in Korean cattle	
1) Introduction -----	138
2) Material and Method -----	139
3) Results and Discussion -----	143
① Analysis of SSCP marker	
② Analysis of genotypes and allele frequencies	
③ Analysis of SSCP marker in Mt DNA	
④ Association between PCR-SSCP marker and production traits	
3. Associations between genetic markers and milk production traits in Korean cattle using minisatellite and microsatellite	
1) Introduction -----	167
2) Material and Method -----	169
3) Results and discussion -----	175
① Polymorphism analysis fo Minisatellite locus	
② Analysis of relationship between VNTR markers and quantitative traits	
③ Analysis of genetic polymorphism within Microsatellite locus	
④ Analysis of relationship between Microsatellite marker and quantitative traits	

4. Associations between AFLP markers and milk production traits in Korean cattle	
1) Introduction -----	214
2) Material and Method -----	215
3) Results and Discussion -----	219
① Allele frequencies analysis of AFLP markers	
② Analysis of relationship between AFLP markers and milk production traits	

**Section 3. Polymorphic studies to genes of lactating regulator for
milk production in Hanwoo**

1. Growth hormone(GH), growth hormone-receptor(GH-R) and growth hormone releasing hormone-receptor(GHRH-R) gene	
1) Introduction -----	236
2) Results and Discussion -----	236
(1) Growth hormone(GH) gene	
a) Molecular cloning of GH gene promoter region	
b) Polymorphism analysis of GH gene promoter region	
(2) Growth hormone-receptor(GH-R) gene	
a) Molecular cloning of GH-R gene promoter region	
b) Polymorphism analysis of GH-R gene promoter region	
(3) Growth hormone releasing hormone-receptor(GHRH-R) gene	
a) Molecular cloning of GHRH-R gene promoter region	
b) Polymorphism analysis of GHRH-R gene promoter region	

2. Prolactin(PRL) and prolactin-receptor(PRL-R) gene	
1) Introduction -----	262
2) Results and Discussion -----	263
(1) Prolactin(PRL) gene	
Ⓐ Molecular cloning of PRL gene promoter region	
Ⓑ Polymorphism analysis of PRL gene promoter region	
(2) Prolactin-receptor(PRL-R) gene	
Ⓐ Molecular cloning of PRL-R gene promoter region	
3. Insulin like growth factor- I (IGF- I)	
and Insulin like growth factor- I -receptor(IGF- I -R) gene	
1) Introduction -----	273
2) Results and Discussion -----	274
(1) Insulin like growth factor- I (IGF- I) gene	
Ⓐ Molecular cloning of IGF- I gene promoter region	
Ⓑ Polymorphism analysis of IGF- I gene promoter region	
(2) Insulin like growth factor- I -receptor(IGF- I -R) gene	
Ⓐ Molecular cloning of IGF- I -R gene promoter region	
Chapter 4. Accomplishment of project and contribute to related matters --	285
Chapter 5. Program of results application -----	294
Chapter 6. Acquirement of scientific technique information -----	295
Chapter 7. Reference -----	298

목 차

제1장 연구개발과제의 개요 -----	32
제2장 국내외 기술개발 현황 -----	40
제3장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	45
제1절 다유계통 한우개량을 위한 한우 선발 및 산유 유전능력검정	
1. 실험 재료 및 방법 -----	45
가. 기초축군 및 산유능력 검정	
나. 시험축 조성 및 산유능력 검정 방법	
다. 산유 유전능력 분석방법	
2. 결과 및 고찰 -----	52
가. 한우암소의 산유능력 검정	
나. 한우 암소 산유량과 송아지 체중의 일반능력 및 환경효과	
다. 한우 산유량의 유전능력	
3. 결론 -----	83
제2절 다유성 한우선발을 위한 DNA 표지인자 이용기술 개발	
1. 한우에서 산유관련 후보유전자의 PCR-RFLP Marker와 산유형질간의 관련성 분석	
가. 서론 -----	84
나. 실험 재료 및 방법 -----	85
다. 결과 및 고찰 -----	91
1) 산유관련 후보유전자의 PCR-RFLP marker 및 유전자형 빈도 분석	
2) 산유관련 유전자의 PCR-RFLP marker과 생산형질간의 상관관계 분석	

2. 한우에서 산유관련 후보유전자의 PCR-SSCP marker의 검출 및 산유형질간의 관련성 분석	
가. 서론 -----	138
나. 실험 재료 및 방법 -----	139
다. 결과 및 고찰 -----	143
1) κ -CN, bGH, bPRL, IGF-1 좌위 및 mt DNA의 SSCP marker 분석	
2) κ -CN, bGH, bPRL 및 IGF-1 유전자의 유전자형 및 대립유전자 빈도 분석	
3) Mt DNA의 SSCP marker 분석	
3. 한우에서 VNTR marker와 산유형질간의 관련성 분석	
가. 서론 -----	167
나. 실험 재료 및 방법 -----	169
다. 결과 및 고찰 -----	175
1) Minisatellite 좌위의 유전적 다양성 분석	
2) VNTR 좌위의 DNA marker와 생산형질간의 상관관계 분석	
3) Microsatellite 좌위의 유전적 다양성 분석	
4) Microsatellite DNA marker를 이용한 생산형질간의 상관관계 분석	
4. 한우에서 산유형질과 관련된 AFLP marker의 개발	
가. 서론 -----	214
나. 실험 재료 및 방법 -----	215
다. 결과 및 고찰 -----	219
1) 선발계통간의 특이적 AFLP marker의 검출 및 출현빈도 분석	
2) 한우에서 AFLP marker와 생산형질간의 관련성 분석	

제3절 유량조절 유전인자의 특성 및 활용 연구

1. 한우 성장호르몬(GH), 성장호르몬 수용체(GH-R), 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자	
가. 서론 -----	236
나. 결과 및 고찰 -----	236
1) 한우 성장호르몬(GH) 유전자	
가) 성장호르몬(GH) 유전자 전사조절영역의 클로닝	
나) 한우 성장호르몬(GH) 유전자의 다형성 분석	
2) 성장호르몬 수용체(GH-R) 유전자	
가) 한우 성장호르몬 수용체(GH-R) 유전자 전사조절영역의 클로닝	
나) 한우 성장호르몬 수용체(GH-R) 유전자의 다형성 분석	
3) 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자	
가) 한우 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자 전사조절영역의 클로닝	
나) 한우 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자의 다형성 분석	
2. 한우 prolactin(PRL)과 그 수용체(PRL-R) 유전자	
가. 서론 -----	262
나. 결과 및 고찰 -----	263
1) 한우 prolactin 유전자	
가) 한우 prolactin(PRL) 유전자 전사조절영역의 클로닝	
나) 한우 prolactin(PRL) 유전자 전사조절영역의 다형성 분석	
2) 한우 prolactin 수용체(PRL-R) 유전자	
가) 한우 prolactin 수용체(PRL-R) 유전자 전사조절영역의 클로닝	

3. 한우 IGF- I 및 IGF- I 수용체(IGF- I -R) 유전자	
가. 서론 -----	273
나. 결과 및 고찰 -----	274
1) 한우 IGF- I 유전자	
가) 한우 IGF- I 유전자의 클로닝	
나) 한우 IGF- I 유전자의 다형성 분석	
2) 한우 IGF- I 수용체(IGF- I -R) 유전자	
가) 한우 IGF-1 수용체(IGF- I -R) 유전자 전사조절영역의 클로닝	
 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	285
 제5장 연구개발결과의 활용계획 -----	294
 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	295
 제7장 참고문헌 -----	298

제1장 연구개발과제의 개요

1. 연구배경

한우는 수천년간 우리 민족과 함께 동고동락하며 한국의 기후풍토와 사육환경 조건하에서 가장 이상적으로 순화적응해 온 고유한 동물 유전자원으로서 우리나라 농경문화와 식생활 문화에 크게 공헌해 온 시대적·역사적 산물이다. 그동안 한우는 쇠고기 생산의 주자원인 동시에 농가의 주요 소득원으로서 우리나라 축종과 축산업을 대표해 왔으나 최근 WTO 체제 출범으로 가속화되고 있는 쇠고기 수입개방과 산지한우 가격 하락으로 한우 생산기반이 취약한 농가의 경제적 어려움이 더욱 심화되고 있다. 이로 인해 한우 생산의욕 저하 및 사육기피 현상마저 만연되고 있는 현실을 주시할 때 우리나라 한우 사육농가를 보호하고 축산물 수입개방에 대응한 국내 한우산업의 안정적 발전을 위한 다각적인 대책과 방안이 시급히 추진되어야 한다. 한우는 과거 역용 중심으로 사육되어 왔으나 농업 기계화에 따른 역이용성의 후퇴, 쇠고기 소비량의 급증 등 시대적 요구의 변천에 따라 한우의 이용성 및 경제적 성격도 역용에서 육용으로 크게 전환되어 개량방향도 육용화 및 육질 고급화에 역점을 두고 있다. 즉, 비육우로서 자질을 살려 한우의 저경제적 유전형질을 제거하고 육종목표에 부합하는 경제형질과 생산능력을 개량함과 동시에 제일성을 높여 개량기반을 강화하여 산업적 측면에서 국제 경쟁력을 제고시킬 수 있는 방향으로 육종전략을 수립해 나가야 한다.

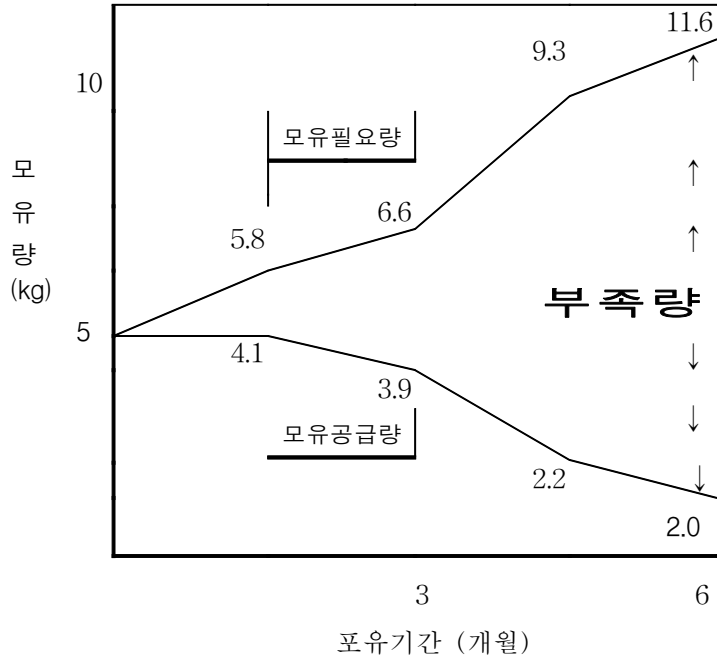
- 한우는 다른 육우에 비해 산유능력이 저조함

포유기간의 산유량 (산후 6개월간)		
구 분	한우	화우(일본)
총 산유량(kg)	630	870
1일 평균량(kg)	3.4	4.8

한우는 체질이 강건하고 육질이 우수하여 고급육 생산을 위한 비육우로서 그 유전적 자질이 높게 평가되고 있으나 특히 암소의 포유능력 즉 산유능력이 매우 불량한 것이 오래전부터 한우개량에 문제점으로 지적되어져 왔다. 실제로 한우의 유즙 생산량은 송아지를 포유하기에도 절대 부족하여 송아지의 정상적인 성장발육을 저해하는 가장 큰 원인으로 알려져 있다.

산유량은 송아지 체중에 큰 영향을 미침

한우는 젖이 부족하다



그러나, 육우에 있어 암소의 산유량은 다른 어떤 형질보다도 송아지의 이유시 체중에 지대한 영향을 미치고 있어(Butson과 Berg, 1984; Ensminger 등, 1987) 어미의 산유능력은 포유 송아지의 발육과 증체에 대단히 중요하다. 또한 송아지 이유시 체중은 출하시 체중과 밀접한 상관관계가 존재하기때문에 이유시 체중이 무거운 송아지는 출하시 체중도 무겁다. 따라서 송아지의 이유시 체중은 육우 생산성에 있어 순이익을 결정하는 가장 중요한 형질로 평가되고 있다(Ensminger, 1987). 한우에 있어서도 이유시 체중과 12개월령 및 18개월령 체중간에 正의 상관관계가 존재하는 것으로 보고되어져 있어 이유시 체중은 출하시 체중에 영향을 미치는 중요한 형질이라고 할 수 있다.

한우에도 산유능력이 우수한 개체가 있음

본 연구팀이 축산기술 연구소 대관령 지소에서 혈통이 명확한 한우암소 집단을 대상으로 3년간에 걸쳐 다유성 개체 30두를 선발하여 산유량 및 송아지의 증체율을 조사한 결과 비유기당 산유량은 유즙생산 능력이 불량한 개체는 약 300kg 정도로 매우 저조하였으나 산유능력이 우수한 개체는 약 1,000kg까지 우유를 생산하여 개체간의 유전적잠재능력에 따라서 엄청난 차이를 보였고 송아지의 6개월령 체중도 50kg까지 개체간에 차이가 발생함을 확인할 수 있었다.

한우개량사업에 산유형질은 선발대상에서 제외됨

또한, 한우개량사업은 당대검정과 후대검정을 통한 중모우 위주의 선발 및 교배체계를 통하여 진행되어 우량 중빈우군의 확보가 미흡하여 개량속도 및 효율성이 높지 않은 실정이다. 특히, 암소의 산유능력은 한우개량 및 송아지 성장발육에 극히 중요함에도 불구하고 지금까지 산유형질은 선발대상에서 배제되므로써 한우의 산유능력에 대한 유전적 개량은 전혀 이루어 지지 못하고 있다. 이처럼 한우의 개량사업은 주로 산유능력이 우수한 수소의 선발 위주로 추진되어 왔으나 보다 효율적인 추진과 개량효율을 극대화하기 위해서는 암·수소 동시 개량체제로 전환하여 암소의 산유능력을 동시에 개량할 필요가 있다(강 등, 1989, 이 등, 1994, 김 등, 1996, 정 등, 1996). 따라서, 한우의 주요 경제형질로서 이유시 체중에 커다란 영향을 미치는 암소의 산유능력을 획기적으로 증진시킬 수 있는 다유성(多乳性)한우 생산기술 개발은 송아지의 발육 불량 방지 및 우량 송아지 육성과 한우의 산유능력 향상을 위해서도 시급히 해결해야 할 주요 핵심과제라고 할 수 있다.

지금까지 한우와 같이 대가축에 있어 경제적으로 중요한 형질들에 대한 유전적 개량은 전통적인 선발이론과 교배체계에 전적으로 의존해 왔다. 그러나, 생물 통

계학적 방법을 이용한 전통적인 한우 육종방법은 오직 개체의 표현형 측정치에 만의존하여 선발함으로써 선발에 의한 개량효율이 저조하고 더구나 경제형질 발현에 관여하는 유전자에 의한 직접 선발은 불가능하였다. 특히, 한우에 있어 산육능력, 육질능력 및 산유능력 등 개량목표가 되는 주요 경제형질 등에 대한 유전적 개량은 후대검정 등으로 인해 평균 세대간격이 길고 선발강도 및 선발의 정확도가 낮기 때문에 개량 효율적인 측면에서 상당한 취약성을 내포하고 있고 많은 비용과 노력이 요구되고 있는 것이 사실이다. 더구나, 전통적인 선발기술의 효율성은 만약 대상 형질의 유전력이 낮거나 표현형 측정이 어려울 때 크게 감소한다. 따라서 전통적인 선발육종 방법이 안고 있는 여러가지 문제점과 제약성을 보완하고 해결해줄 수 있는 새로운 육종개량 방법의 개발에 대한 필요성이 강력히 요구될 수 밖에 없다.

첨단 기술에 의한 한우 산유능력 개량이 요구됨

최근에 세계각국이 생명공학 기술 및 분자유전학의 발달과 함께 이들 첨단기술을 이용한 새로운 육종기술을 개발하고 산업적으로 실용화하여 생산현장에 활용하는 등 자국의 동물 자원의 능력개량을 위하여 혁신적인 개량방안을 모색하고 있음을 주시할 때 우리도 우리나라 고유의 귀중한 동물유전자원인 한우의 개량효율과 그 성과를 획기적으로 향상시키기 위해서는 기존의 개량방법에 신육종기술의 개발과 도입이 적극적으로 추진되어야 할 필요성이 있다.

2. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

- 한우 산유량은 송아지 포유에도 부족함. 한우의 주요 경제형질로서 발육능력의 척도로 이용될 수 있는 체중, 증체량, 체위 및 산유능력 등을 고려할 수 있으나 이 가운데 한우의 산유능력은 송아지가 유전적으로 증체 할 수 있는 잠재성을 충족시키지 못할 만큼 적은 양으로서 어미의 포유능력이 지극히 불량하여

송아지의 정상적인 성장과 발육에 커다란 지장을 초래하는 문제점으로 오래 전부터 지적 되 오고 있다.

- 다른 육우 품종보다도 평균 산유량이 적음. 한우의 1일 평균 유량은 약 2.8~3.5Kg 의 수준(설과 이, 1994 ; 정 등, 1996)으로 이는 외국의 육우 품종에 있어 1일 평균 산유량인 약 5.0kg(Louisiana Agriculture, 1983)보다 낮은 수준이며, 성공적인 육우 경영을 위하여 육우 암소에게 필요한 산유량의 바람직한 목표는 일일 평균 9kg이라고 보고한 성적(Ensminger1987)과 비교하면 현재 한우의산유량은 매우 부족한 실정이고 이처럼 적은 양의 유량으로는 이유시(6개월령)까지 송아지 소요 에너지의 약 54.3%만 충족된다고 한다(강, 1991). 따라서 한우의 유량증진을 위한 기술개발이 반드시 이루어져야 할 필요가 있다.

- 산유량은 송아지의 이유시 체중에 큰 영향을 미침. 육우에서 산유능력과 관련하여 경제적으로 중요한 이유시 체중(weaning weight)은 암소의 산유량에 의해서 가장 큰 영향을 받기 때문에(Butson과 Berg, 1984; Ensminger, 1987) 송아지의 일일 평균 증체량 또는 이유시 체중에 밀접한 관계가 있는 육우의 산유량기준이 되는 중요한 경제형질이다(Charles 등, 1980).

- 한우의 산유능력은 선발대상에서 제외됨. 지난 10년간 한우의 육용화 및 고급육 생산을 위한 개량방법은 생물 통계육종학적 방법에 의해 주로 종모우의 선발과 이용에 집중되어 진행되어져 왔다. 그러나, 산유능력이 매우 열등한 한우에 있어 이유 전 발육능력이 최종 산유능력에 크게 영향을 미침에도 불구하고 송아지 이유시 체중에 절대적 영향력을 발휘하는 암소의 산유능력에 대한 개량은 거의 전무하였다고 볼 수 있다. 따라서 현재 종모우 위주의 산유능력 개량은 암소도 동시에 활용하므로써 개량효과를 극대화할 필요가 있다.

- 산유량의 유전력은 매우 높음. 젖소에서 일반적으로 산유량에 대한 유전력은 평균 25%로 알려져 있으나 육우의 경우 최근의 자료에 의하면 평균 32%로 이보다 다소 높은 수준으로 보고되었다(Ensminger, 1987). 이는 산유량에 대한 적절한 선발이 주어졌을 때 육우의 산유능력을 개량할 수 있는 유전적 잠재가치가 충분히 있음을 의미한다고 볼 수 있다.

- 표현형에 의존한 종래 육종법의 한계성. 전통적인 선발육종에 의해 한우의 산유능력을 유전적으로 개량하기 위한 접근방식은 많은 노력과 비용이 소요되고 오랜 기간을 필요로 하므로 기존의 전통적인 육종 방법을 탈피하여 보다 발전적이고 효과적이며 과학적인 첨단 생명공학기술을 통하여 시간과 비용을 크게 절약하는 신육종기술을 개발하여 이용하는 것이 한우의 산유능력에 대한 개량효율을 효과적으로 증진시키는 중요한 관건이 된다.

- 가축 육종개량에의 유전자 분석기법 도입. 최근 분자유전학 및 유전자 분석기술의 급진적인 발전은 가축육종개량 연구에 분자유전학적 기술과 정보를 직접 이용할 수 있는 새로운 시대를 열게되므로써 기존의 육종체계와 연계하고 병행하면 가축의 개량효과를 최대화할 수 있게 되었다.

- 다유성 한우생산에 첨단 육종기술의 접목. 결론적으로 다유성 한우의 유급 조절 유전인자를 탐색하여 개발된 DNA 표지유전자를 활용하게 되면 다유성 한우의 조기 진단 및 선발이 가능할 뿐만 아니라 선발시기 및 정확도에 큰 영향을 미침으로써 유전적 개량속도를 촉진시키고 유전적 개량량의 증가를 통해서 한우의 산유능력에 대한 개량 효율성을 극대화할 수 있어 부가가치가 높은 새로운 첨단 유전자육종기술이라고 평가할 수 있어 이에 대한 기술개발이 적극적으로 추진되어야 한다.

나. 경제·산업적 측면

- 농축산물의 생산기반은 유지되어야 함. WTO 체제 출범에도 불구하고 세계의 주요 선진국은 자국의 주요 농축산물의 생산기반 유지를 위해 안간힘을 쓰고 있다. 이 같은 의미에서 수입자유화 이후에도 일정규모 이상의 한우 생산기반유지가 반드시 필요하며 이의 달성을 위해서도 신기술 개발을 통한 고도의 기술 집약적 산업으로 발전시켜 안정성장을 도모하고 국제 경쟁력을 지속적으로 추진해 나가야 한다.

- 쇠고기 시장 자유화에 대한 근본대책과 유전형질 향상. 2001년 쇠고기 수입 전면 개방에 대비하고 경제·산업적 측면에서 한우 사육기반의 안정적 확보와

국제 경쟁력 제고를 위해서는 종모우의 산육능력 및 육질능력과 함께 암소의 비육능력에 대한 개량을 통해 송아지를 잘 포유할 수 있는 충분한 유량을 생산하는 다유성 계통의 우량 암소를 선발 육성하여 한우의 유전적 개량을 보다 효율적으로 추진해야 한다.

- 우량 송아지의 저렴한 생산비는 한우 경쟁력에 필수적임. 다유성 계통의 한우는 포유 송아지에게 충분한 모유를 공급하므로써 성장발육이 우수한 우량 송아지를 생산할 수 있어 송아지 생산비를 대폭 절감할 수 있음은 물론 출하체중이 큰 비육우를 만들고 고급육 생산에도 유리하여 궁극적으로 한우사육 농가소득 증대에 큰 도움을 줄 수 있다.

- 송아지 포유기간동안 보충 사료비 절감효과(약 4개월령 이유 기준)

항 목	금 액	산 출 근 거
대용유 구입비	60,000원	평균 30kg (생후 6주령까지 급여량) ×2,000원/kg = 60,000원
어린송아지 사료 구입비	35,000원	평균 100kg (생후 120일령까지 급여량) ×350원/kg = 35,000원
송아지 두당 보조사료비 총액	95,000원	대용유 구입비×어린 송아지 사료 구입비 = 95,000원 / 두
전국 연간 송아지 보조 사료비 총액	9백50억원	95,000원/두×1,339,000두(전국 가임암소두수, 96년 12월 기준)×75%(번식율)=9백50억/년

- 송아지 증산에 따른 경제성 분석

항 목	금 액	산 출 근 거
송아지 증산 수익	400억원	(송아지 폐사율 전국 평균 10% → 5%로 감소시킬 경우, 연간 송아지 생산을 백만두 기준) 50,000두/년×800,000원/두=400억/년

다유성 계통의 한우생산을 통하여 순수 모유 포유에 의한 송아지 육성시 연간 약 1천3백억원(사료비 절감 비용 약 9백억원+폐사율 감소에 따른 송아지 증산비용 약400억원)의 송아지 생산비용 절감 및 수익증대 효과를 기대할 수 있다.

- 경쟁력 강화는 신기술 개발과 직결. 한우의 비육사업 중 비육 밀소가 차지하는 경영 비율이 너무 높기 때문에 결국 쇠고기 생산비가 높아 국제 경쟁력을 약화시키는 문제점으로 지적되고 있다. 따라서, 먼저 성장발육 상태가 우량한 송아지를 가급적 저렴한 가격으로 생산할 수 있는 기술 개발이 중요한데 다육성 한우생산을 통하여 한우 송아지 생산비를 낮추고 비육을 위한 송아지의 적정 생산을 도모하는 것이 가장 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

- 한우는 수천년 동안 우리 민족과 더불어 살아온 우리나라 고유의 동물자원이므로 문화적·역사적 산물이다. 한우가 가지고 있는 우수성을 새로운 시대적 변화와 사회적요구에 적합한 한우로 계승발전시켜 세계적으로 우수한 한우로 개량할 필요가 있다.

- UR 협상과 WTO 체제 출범으로 쇠고기 수입개방이 확대되면서 국내 한우산업의 생산기반이 크게 위축되고 그 파장이 사회진반에 걸쳐 영향을 미칠수 있으므로 한우사육농가의 불안감 해소 및 영농의욕 고취를 위하여 첨단기술개발을 통한 한우산업의 안정화 및 경쟁력 확보방안이 시급히 마련되어야할 필요가 있다.

- 우리나라에서 한우와 쇠고기는 농가경제 및 국민 식생활에 중요한 역할을 담당하고 있음은 물론 사회적으로 국민정서와 불가분의 관계에 있으므로 21세기를 대비하여 신기술을 중심으로 한 기술집약화를 더욱 추진하여 기초식량을 생산하는 국가의 기간산업으로 육성발전 시켜야 한다.

제2장 국내외 기술개발 현황

1. 한우의 산유능력에 관한 연구

• 한우 산유량은 개체차이가 큼 (일평균: 1.6kg~6.2kg). 한우의 비유량은 타품종에 비하여 상대적으로 매우 적은 것으로 알려지고 있다. 한우의 산유능력은 최근에 정확한 착유방법의 개발에 의해 보고된 성적에 의하면 한우의 일일 산유량은 평균 3.4kg이고 한 비유기당 약 626kg을 생산하는 것으로 조사되었다(강등, 1989; 정 등, 1996). 그리고 특히 흥미로운 사실은 동일한 연령과 산차 그리고 사육환경에서도 한우의 일일 평균 산유량은 한 비유기당 180일 동안 최대 6.2kg, 최저 1.6kg 으로 개체차가 큰 것으로 나타났다. 그러나 이러한 한우의 산유량은 Hereford 중 581kg 과는 유사했으나 Angus 중 664kg, Charolais 중 784kg 보다는 낮았으며 일본 화우의 착유량 875kg 에 비해서는 매우 저조한 실정이다 (Melton 등 1967, 신화우백과 도벌, 1993).

• 송아지 포유에 필요한 산유량. 3개월령 이하의 송아지는 하루 약 22.7kg(50파운드)까지 우유를 섭취할 수 있어 어미소가 일일 평균 약 9kg(20파운드)의 유량을 생산해야 송아지의 충분한 발육을 기대할 수 있다고 한다(Ensminger, 1987). 따라서 이 목표에 도달하기 위해서는 한우의 산유능력을 현재 수준의 두배 이상 증진시켜야 송아지의 적절한 성장발육을 보장할 수 있는 것으로 판단된다.

2. 산유량과 송아지 성장발육에 관한 연구

• 송아지 증체량과 산유량의 높은 상관관계. 육우 송아지들은 대부분 출생후 처음 몇 개월 동안은 어미소의 젖으로부터 영양을 공급받는데 어미소의 산유량과 송아지의 일당 증체량은 상관관계가 높아서 0.75~0.91의 상관계수를 보이고 있다(Furr와 Nelson, 1964).

• 송아지 체중은 산유량에 의해 좌우. 외국의 연구기관에서 발표된 많은 자료에

따르면 육우 송아지에서 보이는 체중변이의 약 50~80%는 어미의 산유능력에 기인한다는 보고가 있다.

- 유즙은 효율적으로 송아지 증체로 전환 (체중 14kg 증가에 유량 1kg 증가). 미농무성 Arkansas 연구소의 시험성적에 의하면 일일 평균 유량이 4.5kg 더 높은 경우 8개월경 송아지 이유시 체중은 약 55kg 더 증체되었고 이를 경제적 가치로 환산해 볼 때 송아지 이유시 두당 약 72.6\$의 조수익 증대를 가져 온다.

<산유량이 송아지의 이유시 체중에 미치는 영향>

일일 산유량(kg)/두	송아지 이유시 체중
2.3kg →6.8kg (4.5kg 증가)	161kg →216kg (55kg 증가)
2.2kg→5.5kg (3.3kg 증가)	159kg→216kg (57kg 증가)

- 산유량은 이유후 증체량에도 영향. 육우의 산유량은 이유시 체중뿐만 아니라 이유후 증체에도 영향을 미치기 때문에 Hereford 종에서 어미소의 산유량은 송아지의 이유시 체중의 선별을 통하여 개량된다고 하였으며(Irgang 등1985) 은 육우에서 어미소의 산유량이 육우의 이유전 성장에 영향을 미치는 가장 중요한 요인이라고 하였다(Buddenberg 등 1986).

3. DNA 다형현상을 이용한 분자유종 기술개발 연구

- 종래의 육종 개량법. 가축을 중심으로한 동물자원의 육종개량은 양적유전학의 이론을 응용하여 지난 40여년 동안 괄목할 발전을 이룩하였고 특히, 통계학 및 컴퓨터의 발달은 가축의 유전적 개량속도를 더욱 촉진시켰다(Lee, 1991). 가축에서 경제적으로 중요한 양적형질에 대한 유전적 개량은 특히, 한우과 같이 대가축인 경우 세대간격이 길고 선별강도가 낮기 때문에 유전적 변화속도가 느리고 유전적 개량량의 폭도 크지 않다는 취약성을 안고 있어 확률론적 육종이론을 기초로한 전통적인 육종방법만으로는 가축의 유전능력을 획기적으로 향상시키는데 분명한 한계가 있다(Lin 등, 1992).

• DNA 다형현상의 육종개량에의 도입. 가축에서 최근 DNA 다형분석에 관한 연구가 활발히 추진되어 개체식별, 친자감별, 품종식별, 혈통 및 가계분석, 근친도 측정 그리고 유전질병의 분석과 진단 등에 귀중한 정보를 제공해 주고 동시에 유용 유전자원의 탐색, 보존 및 이용과 함께 품종 및 집단에 유전적 변이성을 조사하는 매우 효과적인 방법으로 평가되고 있다. 또한, 가축에서 DNA의 다형표지는 분자수준의 표지로서 유전자형에 의한 육종가 추정, 개체 능력의 조기검정, 항병성 그리고 하나 또는 몇 개의 유전자좌위에 의해 지배되는 경제적으로 관심 있는 표적형질(Target traits) 그리고 양적형질좌위(Quantitative trait loci; QTL) 또는 경제형질좌위(Economic trait loci, ETL)와 주유전자(Major gene)의 동정을 위해 요구되는 연관분석 및 유전자 지도작성에 이용되고 있다.

• 한우의 유전자 해석 연구. 국내에서도 유전자 연구의 중요성이 인식되어 쌀이나 인간 유전체의 연구사업이 활발히 진행되고 있다. 토종가축인 한우에 있어서도, 한우의 유전자 특성을 밝히고자 하는 노력들이 국내 연구자들 사이에 널리 확산되어 한우의 분자유종개량에 매우 고무적인 현상이라 하겠으나, 한우의 산유형질과 관련된 유전자 해석 연구는 극히 미약한 실정이다.

• 경제형질과 관련된 DNA 표지인자의 개발현황. 가축에서 경제적으로 중요한 형질들과 밀접하게 관련되어 있는 DNA 표지인자를 탐색하고 발굴하기 위한 연구가 세계적으로 활발히 진행되어 관련정보가 상당히 축적되어져 있다. 이 가운데 일부는 이미 산업적으로 실용화되어 생산현장에 실제 이용되고 있다. 지금까지 가축에서 여러 연구자들에 의하여 경제형질과 관련하여 개발된 DNA 표지인자들은 다음과 같다.

<가축의 경제형질과 관련된 DNA 표지인자>

축종	DNA 표지인자	경제형질	참고문헌
소	유즙단백질 유전자	산유량, 유조성분 함량,	Bovenhuis(1992,1994)
	성장호르몬 유전자	유지량, 산유형질, 증체율	Hoj(1993), Yao 등(1996),
	Prolactin 유전자	산유량	Cowan 등(1990, 1992)
	PIT-1 유전자	비유형질	Renaville 등(1996)
	Amylase-1 유전자	유지방 함량	Andersson-Ecklund (1993)
	BLAD, DUMPS 유전자	유전질병	Kehrli 등(1992)
돼지	Estrogen receptor 유전자	산자수	Rothschild 등(1994, 1996)
	PSS 유전자	스트레스 감수성, PSE육	Fujii 등(1991), Womack(1992)
	지방 유전인자	체지방	Andersson 등(1994)
	발육과 지방인자	체성장, 정육량	Rothschild 등(1995)
	MHC 유전자	면역성, 생산 및 번식능력	Rothschild 등(1990)
	PIT-1 유전자	생시체중, 등지방두께	Yu 등(1995)
	IGF-1 과 GH 유전자	성장과 도체형질	Casas-Carrillo 등(1994)
	Apo B 유전자	혈장 cholesterol 농도	Kaiser 등(1993)
닭	유전자 지문인자	성장과 생산형질	Lamont 등(1996)
	MHC 유전자	체중, 산란율, 항병성	Cahaner 등(1996)

3. 앞으로 전망

- 국민소득 증대와 식생활 개선으로 쇠고기 수요가 양적으로 급증할 뿐 만 아니라 최근에는 질적으로 우수한 고품질 쇠고기를 선호하는 경향을 보이고 있다.

- 수입개방에 대응하여 단기간내 한우의 유전적 능력을 향상시켜 국제 경쟁력을 확보하기 위해서는 전통적인 육종방법에만 의존해서는 소기의 목표를 조기에 달성할 수 없다.

- 축산 선진국들이 자국의 축산업을 보호하기 위하여 첨단 육종개량 기술 개발에 많은 연구와 투자를 적극적으로 전개하고 있음을 주시할 때 우리도 앞으로 기존의 육종방법과 병행하여 보다 획기적으로 개량속도를 촉진시키고 효율적인 개량이 가능한 신육종기술 개발이 추진되어야 하고 본 연구진에 의하여 관련 기술이 성공적으로 완성될 경우 한우 사육농가 및 국내 우육산업에 미치는 파급효과는 대단히 클 것으로 전망된다.

- 한우에서 첨단 분자육종기술을 이용하여 산유능력 증진을 위한 다유성 계통 한우의 조기선발기술이 확립될 경우 젓소, 돼지, 산양 등 타 포유동물의 산유능력 개량에 관련기법의 도입과 응용이 가능할 것으로 기대된다.

4. 기술도입의 타당성

한우는 우리나라 고유의 재래 유전자원이며 연구재료이다. 국내 한우산업 분야의 국제 경쟁력 강화가 절대 절명의 시급한 당면과제로 주목되고 있는 이 때 모든 관련 기술개발이 우리나라 연구진에 의해 자체적으로 이루어져야 한우산업의 국가 경쟁력 제고와 개방에 따른 대응전략을 구축할 수 있다. 국내에서도 이미 관련 기술이 상당한 수준까지 도달되어 있으므로 한우의 유전적 능력개량을 위해 첨단 분자육종 기술에 대한 기술개발 잠재력은 적정한 연구개발비와 연구기간이 보장된다면 충분하다고 평가할 수 있다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 다유계통 한우개량을 위한 한우선발 및 산유 유전능력 검정

1. 실험 재료 및 방법

가. 기초축군 및 산유능력 검정

1) 기초축군 및 산유능력 검정우

본 연구에서 고품질 고능력 한우개량을 위한 다유계통의 우량종빈우 선발을 위하여 축산연 대관령지소의 전체 한우 종빈우 집단(약 400두와 혈통 Animal 수는 3,296두, Sire 3,192, Dam 3,291)을 대상으로 개체별로 혈통, 연령, 산차, 번식 및 건강상태 등을 기록과 개체심사를 통하여 조사하였으며, 이유시체중으로 일차적인 선발을 하였고, 유량조사를 한 개체 중 203두(산유능력검정 '94년 이후)의 시험축의 성적을 이용하였다.

2) 시험축 조성 및 산유능력 검정

당해연도에 조성된 230두의 시험축을 대상으로 전년도 산차에서 생산된 송아지의 60일령, 90일령 및 120일령의 이유시 체중에 대한 성적기록과 송아지 분만 후 1개월간의 비유초기 유량 예비조사를 통하여 산유량을 간접 추정하고 이 가운데 120두의 선발 후보축 개체들에 대한 분만 후부터 이유시까지 120일간의 실제 비유량을 측정하여 다유 및 저유성의 기초 계통축군을 조성하였다.

3) 한우의 산유량 조사

한우는 육용우로서 젖소와는 달리 암소의 비유기관 및 유두가 매우 작고 비유량 또한 적기 때문에 개체별로 정확한 산유량을 측정하기가 기술적으로 대단히 어려워 산유능력 검정 및 산유량 기록확보에 많은 애로가 있는 것이 현실이다.

따라서, 본 연구에서는 한우의 정확한 비유량 추정을 위해서 최근 국내외에서 수행되고 있는 기존의 조사방법을 개선 보완한 포유전후 체중차와 기계착유의 장점을 살린 자연포유와 기계착유 병행법으로 한우 포유모우의 비유량을 조사하였다.

나. 시험축 조성 및 산유능력 검정 방법

1) 이유시체중에 대한 선발로 다유 및 저유성의 기초계통 축군을 조성.

2) 한우의 산유량 조사 방법 (포유 및 기계착유 병행 방식)

- 산유량 조사 횟수 : 분만 후 15일부터 2주 간격으로 총 8회를 실시
- 격리와 산유량 측정횟수 : 유량측정 전날 17시경 격리 후 21시경 포유를 시킨 후 측정일 9시경과 15시경 2회 착유하였다.
- 기계착유 조사방법 : 착유는 유두 4꼭지 중 좌우측 2꼭지는 송아지포유를 나머지 2꼭지는 기계착유를 하여 기계착유량의 2배를 하여 24시간으로 보정하였다. 포유와 기계착유는 회수에 따라 좌우측 교대하여 조사하였다.
- 조사 횟수별 방법 및 산유량 계산방법 : 처음 2회(분만 후 약 15일 및 4주 경과시)의 평균을 구하여 분만 후 1개월 산유량, 그 다음 2회(분만 후 약 6주 및 8주 경과시)의 평균을 구하여 분만 후 2개월 산유량, 그 다음 2회(분만 후 약 10주 및 12주 경과시)의 평균을 구하여 분만 후 3개월 산유량 그리고 제일 마지막 2회(분만 후 약 14주 및 18주 경과시)의 평균을 구하여 4개월령 산유량으로 하였다)

3) 한우의 산유량 조사의 문제점

가) 조사축의 스트레스

일반적으로 육우의 분만 후 포유횟수는 일일 7회 이상인 것을 산유량 조사를 위해 인위적으로 격리하고 포유간격을 하루 2~3회로 줄이므로 어미와 송아지 모두에게 많은 스트레스가 가해진다.

나) 조사대상 송아지 폐사 (설사 등)

인위적인 포유간격이 길어짐으로 포유시 과식성 설사 등으로 인하여 산유량조사 중에 송아지 폐사로 인한 자료생성이 어려웠다.

다) 기계착유로 인한 유두손상

산유능력 추정의 한계 : 산유곡선의 경우

라) 과도한 산유량 조사 소요 시간

격리시설의 1회 조사시 최대조사 두수는 6두이며 착유전일 오후 5시경 격리한 후 포유 습성을 고려한 야간 9시경 집단으로 포유(제로 포인트 개념)를 하는데 사료급여 및 포유기록 시간이 최소 30분이상 소요, 1회 착유(유두 4꼭지 중 2꼭지 기계착유, 2꼭지는 송아지 포유)에 소요되는 시간 두당 10~15분으로 두수에 따라 오전, 오후 각 1시간 30분에서 2시간씩 소요

4) 포유 및 기계착유 병행 방식의 대체 조사 방법

분만 후 90일령 포유전후 체중차 (2002년부터) 분만 후 90일령 weigh-suckle-weigh 방법(외국의 육우 산유량 조사의 대표적인 방법) 유량측정 전날 오후 격리 후 21시경 포유를 시킨 후 측정일 9시경과 오후 3시경 2회 송아지 포유전 후 체중 측정하여 유량을 측정하였다.



송아지 포유와 기계착유



산유량 조사축 격리시설



산유량 조사 및 송아지 포유장면

다. 산유유전능력 분석방법

1) 자료정리 및 산유량에 대한 어미소 연령의 보정 : 대관령축군 1997년 이후 산유능력 검정자료(혈통, 번식자료 보완 및 육종가추정), 암소의 연령을 2, 3, 4, 5, 6 및 7세 이상으로 구분한 후 월별 산유량 및 평균 산유량을 종속변수로 그리고 암소 연령을 고정효과로 하는 선형모형을 적용하여 120일간 평균 산유량에 대한 암소 연령의 효과를 최소자승 추정, 추정치들을 해당 형질에 합해주어서 암소 연령에 대한 보정을 실시하였다.

2) 산유량 분석모형

산유량에 영향을 미치는 고정효과에 대한 유의성 검정은 다음과 같은 선형모형을 적용하여 실시하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + YS_i + Sex_j + Sire_k + e_{ijkl}$$

여기서 Y_{ijkl} = 개별관측치

μ = 전체평균

YS_i = i 번째 송아지 분만 · 계절의 효과

Sex_j = j 번째 송아지 성의 효과

$Sire_k$ = k 번째 종모우의 효과

e_{ijkl} = 임의오차

본 연구에서 설정한 Linear model을 SAS @6.12 Package/PC를 이용하여 분석하였는데(SAS institute. 1990), SAS/GLM 분석결과에서 불균형된 자료에 적합한 TYPE III 제곱합을 이용하여 분산분석을 하였으며, 최소자승 평균치간의 유의성 검정을 위하여 다음과 같은 귀무가설을 유의수준 5%로 각각 검정하였다.

$$H_0 : LSM(i) = LSM(j)$$

여기서, $LSM(i(j))$: i(j)번째 효과의 최소자승 평균치 ($i \neq j$)이다.

3) 산유능력분석과 120일령 이유시체중 육종가 추정

가) 개체의 혈통정보를 이용하여 개체들 간의 혈연관계를 구하였고 환경효과를 고정효과로 처리하였으며 개체들 간의 혈연관계를 고려한 3개월령, 이유시(4개월령) 체중에 대하여 maternal additive effects를 임의변량으로 간주한 Animal Model로 설정하였으며, 육종가 추정은 MTDFREML program (Boldman 등, 1995)을 이용.

Mixed Model $y = X\beta + Z_d u_d + e$

여기서, $y = N \times 1$ 벡터의 관측치

β 는 X 에 대한 y 의 자료와 관련된 고정효과의 벡터이고,

u_d 는 상가적 개체유전 효과

e 는 잔차

X, Z_d 는 관측치 y 에 대한 고정효과와 임의효과에 대한 디자인행렬
(design matrix)

$$E \begin{bmatrix} u_d \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \end{bmatrix}$$

$$Var \begin{bmatrix} u_d \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_d^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

σ_d^2 = genetic variance,

σ_e^2 = error variance

나) 유전모수 추정 : 상가적 유전효과에 의한 유전력 $h_d^2 = \frac{\sigma_d^2}{\sigma_{ph}^2}$

다) 고정효과 및 육종가 추정 : β 와 u 는 유전모수 추정후 Henderson의 혼합모형 방정식의 유전모수를 추정치로 놓고 Gauss-Seidel의 iteration 방법으로 추정하였다.

4) 다유 및 저유 그룹 다중검정

산유능력분석 자료의 다유계통과 저유계통을 분리하기 위해 milk yield ability breeding value를 high, middle, low 그룹으로 나누어 Duncan 다중검정방법을 이용한 아래와 같은 모델을 사용하여 계통간 차이를 분석하였다.

$$y_{ij} = \mu + Group_i + e_{ij}$$

y_{ij} = i 번째 그룹(다유, 저유)

μ = 육종가 전체평균

$Group_i$ = 다유 및 저유계통 그룹

e_{ij} = 임의 오차

5) 산유능력 검정자료에 의한 비유곡선 추정

기계착유와 포유전후 체중차를 이용하여 비선형 회귀식인 Wood의 불완전 gamma 비유곡선 모형에 의한 비유곡선 함수의 추정은 비선형 회귀분석 절차인 PROC NLIN을 이용하였으며, 편도함수의 지정이 필요하지 않은 탐색 기법인 다변량정활반복법(multivariate secant iterative method)으로 DUD(Doesn't Use Derivative)방법을 사용.

$$Y_n = Ane^{-cn}$$

여기서

Y_n = 분만 후 n번째일 산유량

n = n번째 시간(일)

A, b, c = 비유곡선을 결정하는 매개 상수들

A = 분만직후 첫 유량

b = 비유곡선의 상향경사도를 표시하는 상수

c = 비유곡선의 하향경사도를 표시하는 상수

e = 자연로그(natural log)

2. 결과 및 고찰

가. 한우암송의 산유능력 검정

Table1. 은 산유능력 검정에 포함된 암소의 일일평균 산유량의 년도간의 최소자승평균으로 분만후 1, 2, 3, 4개월령 일일평균 산유량은 4.51, 4.39, 3.97, 3.63kg으로 년도간의 유의적인 차이를 보였다. Table2. 는 산차간의 최소자승평균으로 산차간의 유의적인 차이는 없었다.

Table3. 은 산유능력 검정에 포함된 송아지의 체중 평균의 년도간의 최소자승평균으로 생시가 24.36, 이유시(4개월령)82.31, 이유후(6개월령) 130.75kg으로 년도간의 유의적인 차이를 보였다. Table4. 는 산차간의 최소자승평균으로 산차간의 유의적인 차이는 없었다.

Fig1, 2, 3, 4는 Table 1, 2, 3, 4를 그래프로 그려 놓은 것이다. 산유량자료의 5, 6산차 암소의 4개월령 유량이 3개월령 유량에 비하여 높아진 것은 시험축두수가 적고 결축치의 영향이다.

Table 1. Mean and it's corresponding standard deviation(SD) of milk yield each year in Hanwoo (단위:kg).

year	Milk yield 1	Milk yield 2	Milk yield 3	Milk yield 4
1994	4.80±0.32	4.62±0.33	4.50±0.34	4.66±0.35
1995	6.01±0.27	5.34±0.31	4.97±0.33	4.97±0.40
1996	5.81±0.20	6.00±0.22	5.13±0.26	5.07±0.35
1997	4.20±0.25	4.08±0.26	3.34±0.29	3.06±0.30
1998	3.78±0.67	3.71±0.31	2.91±0.35	2.90±0.45
1999	3.99±0.23	3.55±0.26	3.34±0.31	3.55±0.33
2000	6.65±0.22	3.68±0.25	3.09±0.26	3.23±0.30

M1 (2, 3, 4, MBAR) : Average daily milk yield at 1st(2nd, 3rd, 4th, average from birth to 4)month

Table 2. Mean and it's corresponding standard deviation(SD) of milk yield by parity in Hanwoo (단위:kg).

Parity	Milk yield 1	Milk yield 2	Milk yield 3	Milk yield 4
1	4.48±0.22	4.23±0.24	3.74±0.28	3.27±0.30
2	4.51±0.15	4.36±0.17	3.97±0.18	3.80±0.21
3	4.53±0.18	4.42±0.20	4.38±0.22	3.89±0.24
4	4.64±0.24	4.14±0.27	3.83±0.29	3.53±0.32
5	4.80±0.42	4.70±0.45	3.52±0.52	4.25±0.70
6	4.68±0.36	4.70±0.42	3.95±0.45	4.78±0.54

Table 3. Mean and it's corresponding standard deviation(SD) of calf weight each year in Hanwoo (단위:kg).

year	birth weight	4month weight	6month weight
1994	26.06±0.86	82.75±4.21	118.93±5.79
1995	26.78±0.80	88.09±4.01	152.65±6.14
1996	24.57±0.58	77.29±3.14	125.06±4.66
1997	24.44±0.69	89.78±3.52	144.71±10.25
1998	23.68±0.80	82.42±5.23	135.13±8.45
1999	25.17±0.67	82.13±3.36	137.51±6.35
2000	22.76±0.65	92.63±3.24	139.00±8.44

Table 4. Mean and it's corresponding standard deviation(SD) of calf weight by parity in Hanwoo (단위:kg).

Parity	birth weight	4month weight	6month weight
1	24.95±0.63	73.85±3.35	127.02±3.80
2	24.22±0.43	77.71±2.37	123.66±4.54
3	24.65±0.52	86.65±2.63	139.80±4.89
4	24.32±0.69	84.71±3.52	132.50±6.69
5	26.89±1.18	95.34±6.09	150.57±9.12
6	23.65±1.08	91.82±5.55	143.30±8.24

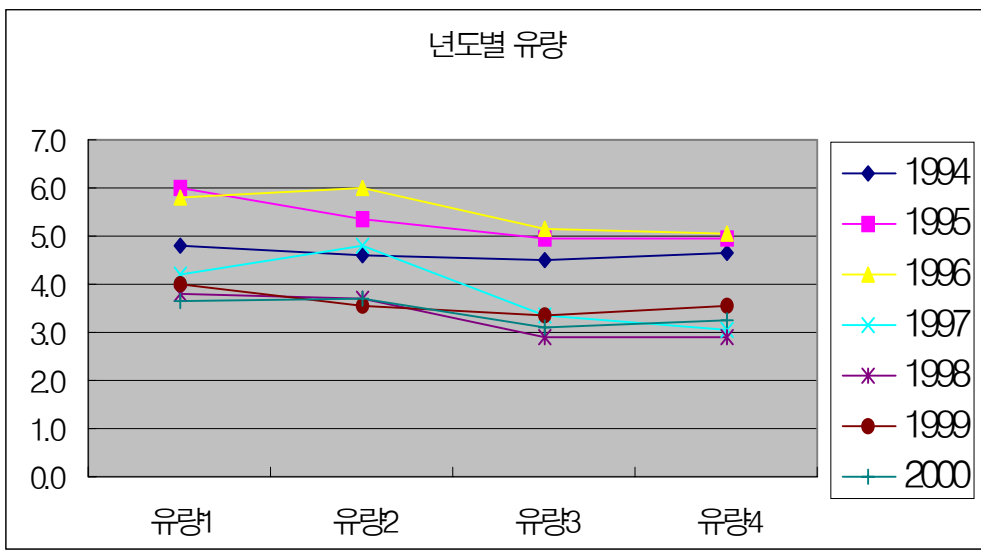


Figure 1. Mean of milk yield each year.

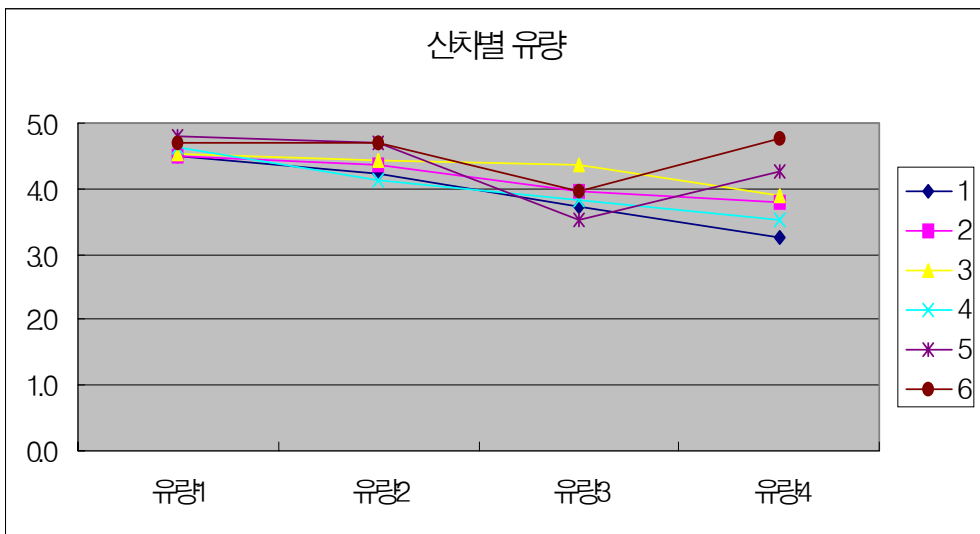


Figure 2. Mean of milk yield by parity.

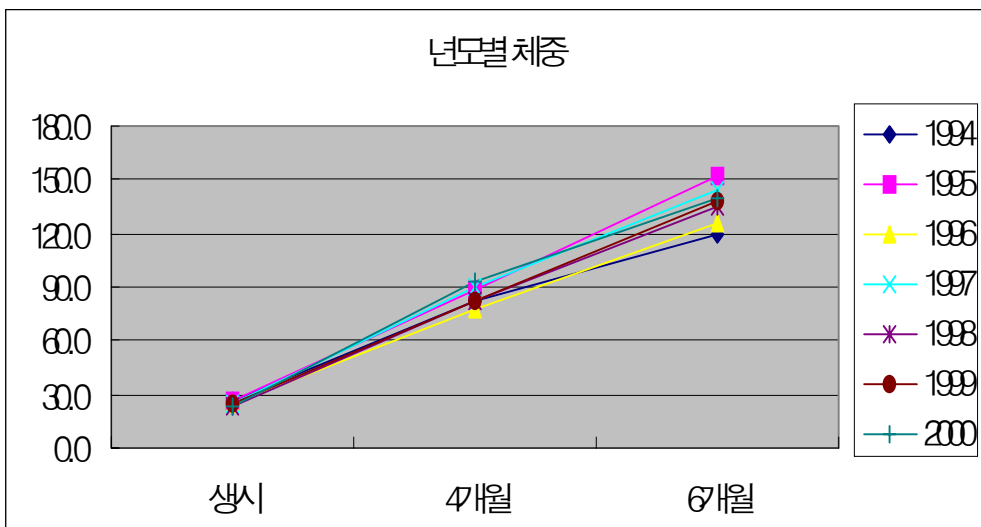


Figure 3. Mean of calf weight each year (단위:kg).

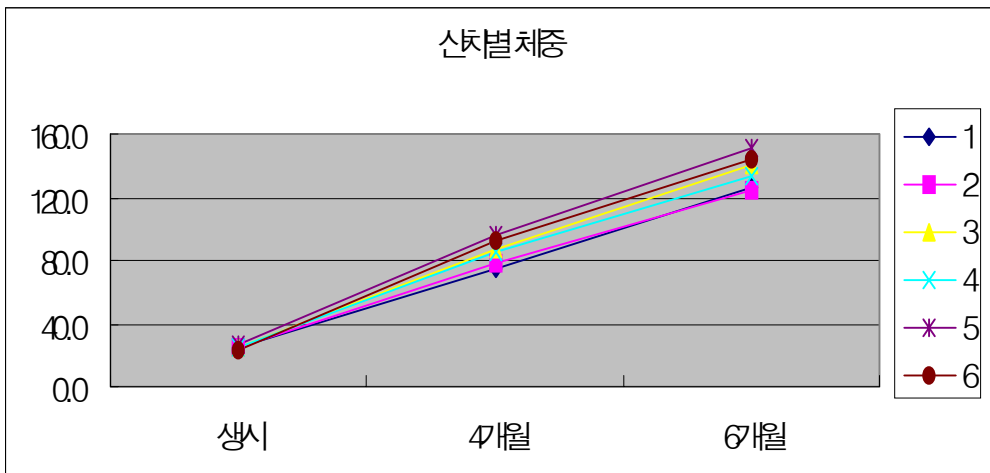


Figure 4. Mean of calf weight each parity.

2. 한우 암소 산유량과 송아지 체중의 일반능력 및 환경효과

1) 한우 암소 산유량과 송아지 체중 일반능력

본 연구에서 조사된 한우 암소의 산유량, 송아지의 체중 및 증체율이 Table 5에 표시되어 있다.

각 월별로 조사한 일일 산유량은 분만후 1개월 산유량이 5.385, 2개월 산유량이 5.311, 3개월 산유량이 4.345 그리고 4개월 산유량이 4.962 kg으로서 분만 후 1개월에 조사한 산유량이 제일 많았고 분만 후 3개월 산유량과 4개월 산유량 간에는 큰 차이가 없었다. 그리고 1, 2, 3, 4개월 유량이 모두 조사된 개체 131두에 대해서 구한 분만후 1, 2, 3, 4개월 산유량의 평균치(평균산유량)는 4.96kg이었다.

비유지속성을 평가하기 위해 산유량 감소율을 조사한 결과 1개월 산유량에 대한 2, 3, 4개월 산유량의 비율(MR2/1, MR3/1, MR4/1)은 각각 0.997, 0.813 및 0.869였고, 2개월 산유량에 대한 3, 4개월 산유량의 비율(MR3/2, MR4/2)은 각각 0.815와 0.862 그리고 3개월 산유량에 대한 4개월 산유량의 비율(MR4/3)은 1.066이었으며, 암소가 산유량 조사를 받는 동안 암소와 함께 사육된 송아지들의 생시, 3, 4 및 6개월령 평균 체중은 각각 25.30, 82.18, 93.63 및 147.37kg이었다.

MR3/2가 0.815로 MR2/1(0.997)이나 MR4/3(1.066)보다 현저히 작은 것은 분만 후 2개월과 3개월 사이에 어미의 산유량이 급속히 감소함을 나타내는 결과이며 분만 후 1개월 산유량이 다른 시기의 산유량에 비해 높은 것은 한우에서 비유최성기(peak)는 1개월 이전에 나타남을 시사하는 결과인데, 정(1995)은 1986년부터 1990년 사이에 분만 한 암소를 대상으로 조사한 결과 한우에서 최고 산유량 도달시기는 분만 후 18일경이었다고 한바 있고, 김(1978)은 비유곡선 방정식을 추정하고 추정된 방정식에 의해 계산된 최고 비유량은 분만 후 25일이며 그때의 비유량은 4.36kg이라고 한 바 있다.

포유 및 기계착유 병행법을 이용하여 한우의 유량을 조사한 연구결과를 살펴보면 최(1970)는 14두의 한우를 26주간 착유한 결과 일일 평균 산유량이 3.32kg이었음을, 송 등(1974)은 24두의 한우를 4개월간 착유한 결과 일일 평균 산유량은 분만 후 1개월이 3.65~4.03, 2개월이 3.16~3.90kg, 3개월이 1.76~2.21kg 그리고 4개월이 1.7

6~1.97kg 이었음을, 김 (1978)은 2산차인 18두의 한우를 4개월간 착유한 결과 분만 후 30일, 60 일 ,90, 및 120일의 일일 평균 산유량이 각각 3.78~3.97 3.37~4.07 및 2.67~3.02 및 1.76~1.97kg이었음을, 정(1995)은 102두의 한우 암소를 조사한 결과 분만 후 1, 2, 3, 4, 5, 6개월의 일일 산유량이 각각 4.73, 4.35, 3.70, 3.21, 2.70, 2.20 kg, 시험기간 180일 동안의 일일 평균 산유량이 3.49kg 그리고 시험기간 180일 동안의 총 산유량이 627.49kg 이었음을 보고한바 있다.

Table 5. mean and its corresponding standard deviation(SD) of milk yield, milk persistency, calf weight and calf age.

Trait	N	Mean	SD	CV
M1	188	5.385	1.324	24.58
M2	199	5.311	1.456	27.41
M3	173	4.345	1.462	33.64
M4	144	4.633	1.412	30.47
MBAR	131	4.962	1.167	23.51
MR2/1	183	0.997	0.206	20.66
MR3/1	160	0.813	0.208	25.58
MR4/1	131	0.869	0.213	24.51
MR3/2	171	0.815	0.183	22.45
MR4/2	140	0.862	0.168	19.48
MR4/3	135	1.066	0.211	19.79
CBW	202	25.297	3.357	13.27
C3W	142	82.179	14.885	18.11
C4W	186	93.631	17.417	18.60
C6W	146	147.371	21.667	14.70
CADG0-3	141	0.632	0.156	24.68
CADG0-4	185	0.569	0.140	24.60
CADG0-6	145	0.678	0.117	17.25
CADG3-4	125	0.554	0.251	45.30
CADG3-6	110	0.728	0.164	22.52
CADG4-6	140	0.864	0.254	29.39

M1(or 2, 3, 4, BAR) : Average daily milk yield at 1st(2, 3, 4, average from to 4 month) month postpartum, MR2(or 3, 4)/1(or 2, 3) : Ratio of average daily milk yield at 2 month(3, 4 month) over 1 month (or 2, 3 month) postpartum, CBW(or 3W, 4W, 6W) : Body weight of calf at birth(3, 4, 6 month), CADG0-3(or 0-4, 0-6, 3-4, 3-6, 4-6) : Average daily gains of calf from birth to 3 month(or form birth to 4, 6 month, from 3 month to 4, 6 month, form 4 to 6 month).

한편 외국 육우에서 산유량을 조사한 연구보고를 살펴보면, Neidhart 등(1979) 브라만종의 216일 산유량 1,340kg, 일일 평균 6.2kg을 보고한 바 있고, Meyer 등(1994)은 분만 후 4개월경 일일산유량을 포유전후 체중차를 이용하여 조사한 결과 헤어포드종은 평균이 3.611kg이고 표준편차가 1.573kg 그리고 변이계수가 43.6%였으며 Wakalup종은 평균이 4.9kg 표준편차가 1.891kg 그리고 변이계수가 38.6%이었음을 보고한 바 있으며, Melton 등(1967)은 샤로레, 앵거스, 헤어포드종의 175일 산유량은 헤어포드 581, 앵거스 664 샤로레 784kg이라고 보고하였는데 이를 일일 평균 산유량으로 환산하면 3.32, 3.79, 4.48kg이 된다. 그리고 Totusek 등(1973)은 앵거스, 쇼트혼, 헤어포드 순종 및 교잡종 암소의 112일간 일일 산유량은 순착유시 평균이 5.13kg, 표준편차가 1.54kg 그리고 변이계수가 30.1%이었으며 포유전후 체중차로 추정된 결과평균, 표준편차 및 변이계수가 각각 6.44kg, 1.27kg 및 19.7% 이었다고 보고하였는데, 본 연구에서 얻어진 분만후 4개월 산유량 4.63kg은 Meyer 등이 조사한 Hereford의 일일산유량 보다는 많고 wakalup 종의 일일산유량 4.9kg 보다는 다소 작은 편이었다. 그리고 본 연구의 4개월간의 평균유량 4.96kg은 Totusek 등(1973)이 교잡종집단에서 포유전후체중차를 이용하여 조사한 6.44kg보다는 작은 편이었다.

2) 산유량 및 송아지 체중에 미치는 환경효과

Table 6, 7에는 암소의 산유량과 비유지속성 그리고 송아지의 체중과 증체율에 영향을 미치는 고정효과의 영향을 알아보기 위하여 최소자승법을 이용하여 분산분석을 실시한 결과가 표시되어 있다. 분석에 포함된 고정효과는 송아지 분만년도-계절, 송아지의 성 및 종모우(암소의)였는데 분만년도-계절의 효과는 어미소의 산유량과 송아지의 체중 및 포유기(생시부터 4개월령까지)의 일당증체량에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며 송아지의 성은 암소의 산유능력에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고 종모우는 3개월 산유량, 평균 산유량, MR3/2 및 MR4s/2 등에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과에 근거하여 산유량과 비유지속성의 분산성분을 추정하기 위한 혼합모형에는 송아지 분만년도-계절만을 고정효과로 포함시켰으며 송아지의 체중이나 증체량의 분산성분을 추정하기 위한 혼합모형에는 송아지 분만년도-계절과 송아지의 성을 고정효과로 포함시켰다.

Table 6. Mean square (MS) and the corresponding degree of freedom(df) from ANOVA for milk yield from postpartum to weaning.

Source	<u>M1</u>		<u>M2</u>		<u>M3</u>		<u>M4</u>		<u>MBAR</u>	
	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS
CYS ¹	12	5.02**	12	9.76**	12	7.38**	10	5.98**	10	3.84**
CSEX ²	1	0.02	1	0.14	1	0.74	1	0.18	1	0.01
CSire ³	51	1.21	52	1.30	48	1.70*	44	1.67	42	1.11*
Error	123	1.12	133	1.21	111	1.09	88	1.16	77	0.60

M1(or 2, 3, 4, BAR) : Average daily milk yield at 1st(2, 3, 4, average from to 4 month) month postpartum, CYS¹ : Calving Year-season, CSEX² : Sex of calf, CSire³ : Sire of calf, **: p<0.01, *: p<0.05.

Table 7. Mean square (MS) and the corresponding degree of freedom(df) from ANOVA for milk persistency from postpartum to weaning.

Source	<u>MR2/1</u>		<u>MR3/1</u>		<u>MR4/1</u>		<u>MR3/2</u>		<u>MR4/2</u>		<u>MR4/3</u>	
	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS
CYS ¹	12	0.09**	12	0.10**	10	0.12**	12	0.07**	10	0.09**	10	0.15**
CSEX ²	1	0.01	1	0.01	1	0.00	1	0.00	1	0.00	1	0.00
CSire ³	51	0.03	47	0.04	42	0.04	48	0.03**	43	0.03**	42	0.04
Error	118	0.03	99	0.03	77	0.03	109	0.02	85	0.01	81	0.03

MR2(or 3, 4)/1(or 2, 3) : Ratio of average daily milk yield at 2 month(3, 4 month) over 1 month (or 2, 3 month) postpartum. CYS¹ : Calving Year-season, CSEX² : Sex of calf, CSire³ : Sire of calf, * p<.05 ** p<.01.

Table 8. mean square (MS) and the corresponding degree of freedom(df) from ANOVA for calf weights from postpartum to weaning.

Source	<u>CBW</u>		<u>C3W</u>		<u>C4W</u>		<u>C6W</u>	
	df	MS	df	MS	df	MS	df	MS
CYS ¹	10	32.07**	9	440.78**	10	748.31**	10	719.67*
CSEX ²	1	3.24	1	4308.86**	1	966.54*	1	7892.47**
CSire ³	21	15.11	18	94.49	21	220.30	21	264.47
Error	167	9.44	112	125.40	151	229.54	111	299.58

CYS¹ : Calving year season, CSEX² : Sex of calf, CSire³ : Sire of calf. *p<0.05
 ** p<.01.

Table 9. Mean square (MS) and the corresponding degree of freedom(df) from ANOVA for calf ADG from postpartum to weaning.

Source	<u>ADG0-3</u>		<u>ADG0-4</u>		<u>ADG0-6</u>	
	df	MS	df	MS	df	MS
CYS ¹	9	0.039**	10	0.037**	10	0.017
CSEX ²	1	0.462**	1	0.043	1	0.213**
CSire ³	18	0.012	21	0.015	21	0.008
Error	111	0.013	150	0.015	110	0.009

CYS¹ : Calving year season, CSEX² : Sex of calf, CSire³ : Sire of calf. * p<.05
 ** p<.01.

Source	<u>ADG3-4</u>		<u>ADG3-6</u>		<u>ADG4-6</u>	
	df	MS	df	MS	df	MS
CYS ¹	9	0.068	9	0.028	10	0.061
CSEX ²	1	1.090**	1	0.000	1	0.744**
CSire ³	18	0.030	18	0.032	21	0.072
Error	95	0.053	80	0.022	105	0.045

CYS¹ : Calving year season, CSEX² : Sex of calf, CSire³ : Sire of calf.

Table 10에는 산유량의 분만년도-계절별 최소자승 평균치가 표시되어 있다.

한우의 일일 산유량 및 평균 산유량의 분만년도-계절별 최소자승평균치는 1개월 산유량이 $4.53 \pm 0.37 \sim 6.87 \pm 0.19\text{kg}$, 2개월 산유량이 $4.40 \pm 0.21 \sim 7.35 \pm 0.20\text{kg}$, 3개월 산유량이 $3.21 \pm 0.21 \sim 6.14 \pm 0.25\text{kg}$, 4개월 산유량이 $3.25 \pm 0.28 \sim 5.86 \pm 0.25\text{kg}$, 그리고 4개월 평균 산유량이 $4.16 \pm 0.26 \sim 6.55 \pm 0.20\text{kg}$ 의 범위로 송 등(1974)이 보고한 1, 2, 3, 및 4개월의 평균 산유량 3.65~4.03, 3.18~3.90, 1.76~2.21, 및 1.76~1.97kg 보다 높게 나타났다. 본 연구에서 1996년 이전의 최소자승 평균치와 1997년 이후의 최소자승 평균치를 비교해보면 대체로 1996년 이전의 최소자승 평균치들이 더 큰 것으로 나타나고 있는데 이것은 1997년 이후부터는 자연포유와 기계착유를 병행하는 방법을 이용하여 산유량을 조사하였으나 1994년부터 1996년까지는 사전에 Oxytocin을 투여한 후 산유량을 조사하였기 때문에 나타나는 결과로 볼 수 있다. 착유방법에 따라 산유량이 차이가 나는 연구보고는 강 등(1989)이 한우를 대상으로 한 연구에서 보고한 바 있다.

1996년 가을철과 1998년 가을철에는 4개월 산유량이 측정되지 못했으며 따라서 평균 일일 산유량도 계산되지 않았는데 동일 분만년도내에서 봄철 분만우와 가을철 분만우의 산유량을 비교해보면 1998년도 출생한 그룹의 2개월 산유량과 1999년도 출생한 그룹의 1개월 산유량을 제외하고는 봄철 분만우들의 산유량이 가을철 분만우들의 산유량 보다 많은 경향을 보이고 있다. 이처럼 봄철 분만우들이 가을철 분만우들에 비해 산유량이 많은 이유는 봄철분만우의 경우에는 분만후 일조시간이 점점 길어지는 반면 가을철 분만우는 분만 후부터 일조시간이 점점 짧아진다는 점 그리고 봄철 분만은 3-5월에 집중된 관계로 분만 후 충분한 양의 청초를 공급받을 수 있으나 가을철 분만은 8-10월에 집중된 관계로 분만시 더위에 의한 스트레스가 봄철 분만우에 비해 크고 분만후 청초보다는 저장조사료에 의해 사육되는 기간이 길다는 점이 하나의 원인 일수 있다.

Table 10. Least square mean and standard error of milk yield by years(YR) and season(SN).

YR	SN	N	M1	N	M2	N	M3	N	M4	N	MBAR
1994	S ¹⁾	14	5.51±0.39	17	5.30±0.36	17	4.60±0.35	17	5.60±0.37	14	5.09±0.31
1995	S	10	6.29±0.49	11	6.23±0.47	12	5.80±0.43	10	5.47±0.51	8	5.06±0.45
1995	F ²⁾	9	6.24±0.47	9	5.06±0.48	8	4.44±0.47	2	4.65±0.93	2	6.34±0.68
1996	S	30	6.87±0.19	29	7.43±0.27	20	5.89±0.30	20	5.78±0.32	18	6.56±0.25
1996	F	7	6.87±0.26	11	5.23±0.43	10	3.46±0.45	-	-	-	-
1997	S	16	5.28±0.33	17	5.34±0.33	17	3.98±0.32	17	4.84±0.34	16	5.11±0.26
1997	F	13	4.94±0.39	18	4.67±0.34	14	3.98±0.40	16	3.03±0.40	11	4.53±0.35
1998	S	12	5.22±0.38	11	4.81±0.41	11	3.70±0.40	10	4.30±0.44	10	4.70±0.33
1998	F	8	4.74±0.47	8	4.93±0.48	5	2.58±0.55	-	-	-	-
1999	S	19	5.11±0.34	18	5.07±0.36	13	4.61±0.39	12	5.28±0.42	12	5.02±0.31
1999	F	14	5.16±0.35	14	4.48±0.36	10	3.56±0.43	9	3.93±0.48	9	4.32±0.35
2000	S	10	4.60±0.47	10	5.41±0.48	10	4.69±0.47	10	4.67±0.50	10	4.85±0.37
2000	F	26	4.81±0.33	26	4.51±0.34	21	3.34±0.35	21	3.72±0.40	21	4.24±0.29

M1(2, 3, 4, BAR) : Average daily milk yield at 1st(2nd, 3rd, 4th, average from to 4 month) month postpartum, S¹⁾ : Spring, F²⁾ : Fall, **: p<0.01, *: p<0.05.

3. 산유 유전능력 분석

1) 산유능력 유전모수 추정

Table 11은 산유량, 송아지의 체중 및 증체량에 대한 분산성분과 유전력 추정치가 표시되었는데 여기서 송아지의 체중과 증체량은 어미소의 형질로 보고 분석한 결과이다.

산유량은 분만 후 시간이 경과함에 따라 상가적 유전분산이 증가하고 반대로 오차 분산은 감소하는 경향이 나타나서 분만 후 1, 2, 3, 4개월 산유량의 유전력은 각각 0.02, 0.11, 0.16 및 0.42로 분만 후 월령의 경과와 더불어 증가하는 결과를 보였다. 그리고 1, 2, 3, 4개월 산유량을 평균하여 구한 평균산유량의 유전력은 0.28이었는데, 본 연구에서 분만 후 시간이 경과함에 따라 환경분산이 감소하는 이유는 분만 후 유량 측정횟수가 반복됨에 따라 시험축들이 산유량 조사에 대해 적응하면서 시험축이 받는 산유량 조사에 의한 스트레스가 감소하기 때문인 것으로 판단된다.

육우에서 산유량에 대한 유전력을 추정한 연구보고를 살펴보면 Mallinckrodt 등(1993)은 무각 헤어포드종이 0.001 그리고 심멘탈이 0.078이었음을, Meyer등(1994)은 Hereford종과 Wakalup종이 각각 0.122 및 0.080이었음을, Miller 와 Wilton(1999b)은 산유량을 송아지 형질로 간주하여 추정했을때 0.04, 그리고 어미소의 형질로 간주하여 추정했을때 0.35이었음을 보고한 바 있고, Dillard 등(1978)은 헤어포드종 암소에서 산유량에 대한 유전력은 0.45였음을 보고한 바 있는데 본 연구에서 추정된 산유량의 유전력 추정치들은 이들이 보고한 범위에 포함되는 것으로 판단된다.

Table 12는 평균 산유량과 월별 산유량간의 유전, 표현형 및 환경효과의 상관계수이다. 4개월까지 평균산유량과 1개월, 2개월, 3개월 및 4개월 산유량의 유전상관은 각각 0.73, 0.86, 0.86, 0.85로 분만 초기인 분만 후 1개월 산유량보다는 분만 중기 이후인 분만 후 2, 3, 4개월령 산유량 들이 평균산유량과의 유전 상관계수가 높은 편이었다.

Table 11. Parameter estimates for milk yield.

형질	유전분산(σ_d^2)	환경분산(σ_e^2)	표현형분산(σ_{ph}^2)	유전력(h_d^2)
M 1	0.018	1.128	1.146	0.02
M 2	0.137	1.099	1.236	0.11
M 3	0.203	1.087	1.290	0.16
M 4	0.579	0.793	1.372	0.42
MBAR	0.221	0.575	0.796	0.28

M1 (2, 3, 4, MBAR) : Average daily milk yield at 1st(2nd, 3rd, 4th, average from birth to 4)month.

Table 12. Genetic(r_d), phenotypic(r_{ph}) and environmental(r_e) correlation estimates between average daily milk yield (MBAR) and daily milk yield postpartum at one (M1), two (M2), three (M3) and four (M4) month later.

	M1	M2	M3	M4
유전 상관(r_d)	0.73	0.86	0.86	0.85
MBAR 표현형상관(r_{ph})	1.00	1.00	1.00	0.77
잔차 상관(r_e)	0.72	0.89	0.85	0.92

Table 13은 4개월까지 평균 산유량과 생시, 4, 6개월령 체중의 유전, 표현형 및 환경효과와의 상관계수이다. 유전상관 계수는 평균 산유량 과 생시체중이 0.12, 평균 산유량과 4개월령 체중이 0.32, 평균 산유량과 6개월령 체중이 0.36으로 이유시기를 전후한 4개월령이나 6개월령 체중들이 생시체중보다 산유량과의 유전상관이 높았으나 평균 산유량과의 표현형상관계수는 생시체중이 0.95, 4개월령 체중이 0.67, 6개월령 체중이 -.54로서 평균 산유량은 생시체중 보다 이유시 체중과의 표현형 상관이 낮았고 이유 후인 6개월령 체중과는 부의 상관을 나타내는 것으로 나타났다. 한편 Miller 와 Wilton(1999)은 어미소의 산유량과 어미소 형질로 간주하여 분석한 송아지의 이유시체중간 유전상관을 0.76으로 보고한바 있다.

Table 13. Genetic(r_d), phenotypic(r_{ph}) and environmental(r_e) correlation estimates between average daily milk yield (MBAR) and calf weight at birth(CBW), four (C4W) and 6 (C6W) month age.

	CBW	C4W	C6W
유전 상관(r_d)	0.12	0.32	0.36
MBAR 표현형상관(r_{ph})	0.95	0.67	-0.54
잔차 상관(r_e)	-0.17	0.19	1.00

2) 다유 및 저유계통 한우 선발

Table 14, 15는 산유량에 대한 육종가를 근거로 다유 및 저유 계통을 분리한 개체와 어미의 육종가 및 표현형 산유량이다. 분리된 집단은 산유능력 및 생시와 3개월령체중에서 high와 low그룹간에 유의적인 차를 보였으며 체중에 대한 차는 4개월령에서는 유의적인 차가 없었다.

3) 산유능력 검정에 의한 비유곡선 추정

- 자료 : 대관령축군의 1998년 이후 산유능력검정 자료 89두
- 기계착유 및 자연포유 병행법으로 추정된 산유량의 비유곡선식

Table 18은 2002년도에 분만한 암소의 분만후 90이령의 포유전후 체중차에 의한 산유량과 송아지의 생시 및 90일령체중을 암송의 연령별 그룹에 대한 평균으로 포유 및 기계착유 방법에 의한 산유량 조사의 3개월령 산유량 보다는 다소 높은 경향 이였으나 산유량조사에 의한 스트레스가 어미소 및 송아지에 작아 송아지 체중에 미치는 영향이 작고, 적은 노동력으로 많은 두수를 측정 할 수 있어 효율적이다.

Table 14. Animal and maternal list of high group line.

Animal	BV	Milk yield	maternal	BV	milk yield
9352	0.231	5.40	8664	0.061	-
93016	0.434	5.60	-	-	-
9464	0.393	5.80	9204	0.097	-
9548	0.397	5.15	9118	0.167	3.50
6346	0.247	4.47	8917	0.180	5.82
6364	0.214	4.66	8615	0.194	4.63
9216	0.209	3.35	7-4	0.095	-
9424	0.573	5.28	8921	0.221	-
9446	0.329	4.10	7-4	0.095	-
K-25	0.242	4.41	-	-	-
9804	0.341	4.93	93015	-	-

Table 15. Animal and maternal list of low group line.

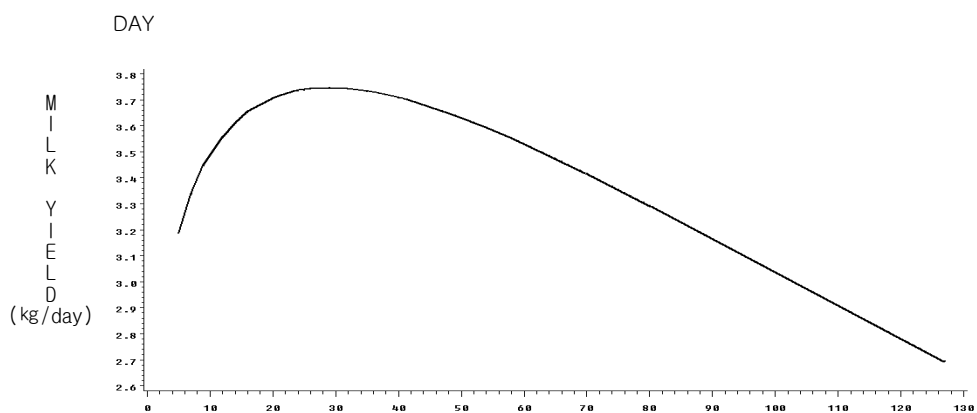
Animal	BV	Milk yield	maternal	BV	milk yield
9014	-0.710	2.95	7804	-0.322	-
9123	-0.221	4.28	8805	-0.064	-
9740	-0.668	2.35	9259	-0.935	1.24
9770	-0.278	2.40	4344	-0.389	1.97
7-9	-0.359	3.05	-	-	-
9325	-0.418	1.51	9116	-0.148	-
9528	-0.229	2.65	9237	0.007	5.37
6341	-0.595	1.40	9120	-0.377	3.38
6343	-0.317	1.95	8841	-0.209	3.89
9729	-0.246	1.90	8762	-0.247	4.91

Table 16. Multiple range test for milk yield of high and low milk yield group.

	n	dam- age	Milk yield BV	M1	M2	M3	M4	average milk yield
	n		89	89	87	75	62	62
high	11	4.55	0.33±0.11	467±0.57 ^a	463±0.91 ^a	466±0.88 ^a	436±1.10 ^a	460±0.54 ^a
middle	66	4.18	-0.02±0.11	372±0.78 ^b	350±0.93 ^b	317±0.94 ^b	293±0.76 ^b	345±0.59 ^b
low	12	4.92	-0.38±0.18	295±1.12 ^c	292±1.31 ^b	204±0.92 ^c	215±0.95 ^c	245±0.83 ^c
total	89	4.33	-0.02±0.22	374±0.92	356±1.08	322±1.17	306±1.08	349±0.88

Table 17. Multiple range test for calf weight of high and low milk yield group.

	n	dam- age	birth weight	3month weight	4month weight
n			89	79	79
high	11	4.55	26.18±2.32 ^a	90.22±15.61 ^a	90.23±15.61
middle	66	4.18	23.08±3.21 ^{ab}	84.26±15.42 ^a	84.26±15.43
low	12	4.92	25.08±5.35 ^b	69.15±26.35 ^b	69.15±26.35
Total mean	89	4.33	23.73±3.62	82.79±18.30	83.86±15.78



$$y_n = 2.4845n^{0.1734}e^{-0.0060n} \quad (R^2=0.89)$$

Figure 5. Lactation curve of Hanwoo from postpartum to 120day.

Table 18. Least square mean and standard error of milk yield and calf weight by cow age.

구분	N	CBW	C90W	milk yield 90day
~3세이하	14	22.50 ±0.91	73.85 ±3.68	4.05 ±0.39
3~8세	26	23.04 ±0.67	85.96 ±2.50	4.90 ±0.28
8세이상	20	24.15 ±0.76	90.76 ±2.85	4.66 ±0.32

* measurement of milk yield method by weigh-suckle-weigh (2002).

3. 결론

본 연구는 축산기술 연구소 대관령 지소에서 1994년부터 2000년 사이에 조사된 산유량 조사자료 203개 기록을 이용하여 한우의 성장단계별 체중과 증체량의 유전적 특성을 파악하고 어미소의 산유능력과 송아지의 체중 및 성장률과의 유전적 관련성을 파악하기 위해 실시하였다. 연구에 필요한 유전(공)분산성분 추정에는 제한최대우도법(dfREML)을 이용하여 실시하였는데 본 연구에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 분만 후 1, 2, 3, 4개월 산유량의 평균치는 각각 5.38, 5.31, 4.34 및 4.63kg였으며 이들 산유량은 분만년도-계절에 의해 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

2. 일일산유량의 유전력은 분만 후 기간이 경과함에 따라 높아지는 경향을 보였는데, 이것은 산유량측정 횟수가 누적됨에 따라 시험축들이 받는 산유량조사 스트레스가 줄어들고 시험축들이 산유량조사에 대해 적응되어 가가 때문인 것으로 사료된다.

3. 분만 후 월별 산유량 및 평균 산유량간의 유전상관은 0.86~0.73의 범위로 매우 높게 추정되었고, 산유량과 이유시체중간 그리고 산유량과 6개월령 체중간의 유전상관계수는 각각 0.32 및 0.36 이었다. 산유량과 생시체중과의 표현형 상관계수보다는 산유량과 이유시 체중간의 표현형 상관계수가 작았으며 평균산유량과 이유후 체중인 6개월령 체중과의 표현형상관은 부의 상관을 보였다. 그리고 평균 산유량과 이유시까지 일당증체량 그리고 평균산유량과 6개월령 까지 일당증체량 간의 유전상관계수는 각각 0.34 및 0.36이었다.

4. 이유시체중의 개량 및 다유성 한우생산을 위한 유량조절 유전인자의 탐색을 위해 한 한우 암소 산유능력검정은 산유량 측정방법을 본 연구에서 이용한 포유 및 기계착유방법 보다는 적은 인력으로 많은 두수 측정 할 수 있는 포유전후체중차를 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

제2절 다유성 한우선발을 위한 DNA 표지인자 이용기술 개발

1. 한우에서 산유관련 후보유전자의 PCR-RFLP Marker와 산유형질과의 관련성 분석

가. 서론

가축의 genome 분석을 통하여 생리적 및 생물학적 기능이 잘 알려져 있는 후보유전자를 이용하여 DNA 변이와 생산형질과의 연관성 분석에 관한 연구가 국내외적으로 상당히 진행되고 있다. 유즙합성 및 분비 등에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있는 후보유전자로서 소의 유즙단백질인 κ -casein(κ -CN), β -lactoglobulin(β -LG) 및 α -lactalbumin(α -LA) 등의 유전적 다형은 유생산량, 단백질 및 유지율과 등 비유형질들과 유의적으로 연관되어 있다는 사실이 많은 연구자들에 의해 검증됨에 따라 이미 낙농선진국에서는 이들 표지유전자의 DNA 진단기법을 개발하여 산업적으로 실용화해 고능력 젖소 선발에 적극적으로 활용하고 있는 추세이다. 또한, 포유동물의 뇌하수체 전엽에서 분비되는 성장호르몬(growth hormone ; bGH)과 prolactin (bPRL) 및 PIT-1 (pituitary-specific transcription factor) 그리고 비유관련 효소 유전자로서 ODC(ornithine decarboxylase)는 젖소의 체성장, 유선발달, 비유개시 및 유생산에 직접 영향을 미치는 것으로 알려져 있어 이들 유전자는 산유능력 등 생산형질에 있어 유전적 변이성과 양적형질간의 연관성 분석에 중요한 표적이 되고 있는 우수한 후보유전자들이다(Peel과 Bauman, 1987; Hallerman 등, 1987; Falaki 등, 1996; Yao 등, 1998). 이들 유전자들은 육우종에서도 비유형질(Schlee 등, 1994; Falaki 등 (1997), 생시체중(Rocha 등, 1991) 및 이유시 체중(Renaville 등, 1994)간의 관련성 분석에서도 밀접한 관계가 존재하는 것으로 보고되었다. 한편, prolactin과 상호작용하여 성장호르몬의 분비에 중요한 역할을 담당하는 성장호르몬 방출 호르몬으로서 GHRH(growth hormone releasing hormone)와 성장호르몬의 작용을 조절하여 동물의 유선발달 및 분화에 매개작용을 하는 호르몬 수용체 유전자로서 GHR(growth hormone receptor) 이들 두 유전자는 유선발달, 비유조절, 성장 및 체조성뿐만 아니라 번식형질에 관여하는 후보유전자로서 양적형질좌위와 DNA 표지좌위간의 연관성을 확인하는 수단으로 가축 선발육종에 가치가 인정됨

에 따라 그동안 이들 유전자의 RFLP가 보고되었다(Moody 등, 1995; Falaki 등, 1996; Moisis 등, 1998; Aggrey 등, 1999; Connor 등, 1999). 특히, 가축의 경제형질 및 양적형질에 영향을 미치는 핵외 세포질내 유전정보원으로 mt DNA(mitochondrial DNA)에 대한 활용성이 시도되고 있다(Boettcher 등, 1996; Gibson 등, 1997; Doering 등, 1998). 젓소의 경우 유량, 유조성분 등 유생산과 관련된 변이 가운데 약 2-10%가 모계효과에 기인하는 것으로 보고됨에 따라 (Freeman, 1990; Ron 등, 1992), Faust 등(1990)이 젓소에서 세포질내 유전효과에 따른 산유량과 유의적으로 관련되어 있음을 보고하였고, Ron 등(1993)도 Holstein종의 유량에 따라 high와 low group으로 분류한 암소 모계 선발군간에 염기서열을 비교하여 산유량에 따른 차이를 보고한 바 있다.

이와같이 이들 후보유전자들의 RFLP marker를 확인하여 생산형질과의 연관성을 확인하는 수단으로 응용성과 실용성에 대한 폭넓은 연구가 인정됨에 따라 국내의 경우도 한우와 Holstein 젓소를 대상으로 유즙단백질(김 등, 1997; 정 등, 1998, 1999; 조 등, 1998), 성장호르몬(정 등, 1996, 1998; 조 등, 1998) 및 prolactin(정 등, 1996, 1998) 그리고 mt DNA의 다형성(정 등, 1996, 이 등, 1998)과 염기서열 분석(정 등, 2002)이 보고된 바 있으나 현재까지 경제형질과의 연관성 분석에 관한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 우리나라 고유의 유전자원인 한우를 대상으로 생리적 및 생물학적 기능이 밝혀져 있는 총 10종류의 후보유전자를 선정하여 PCR-RFLP 분석방법으로 이들 유전자의 RFLP marker를 분석하고 한우의 유전적 다형성을 추정함과 동시에 한우의 생산형질에 유의적으로 영향을 미치는 RFLP marker를 구명하는데 있다.

나. 재료 및 방법

1) 공시축 및 검정자료

본 연구의 공시축은 강원도 평창군 도암면 대관령지역에 위치하고 있는 축산기술연구소 대관령지소에서 1990년도부터 2000년도까지 사육되고 있는 전체 한우 암소 집단을 대상으로 검정대상축 심사 및 선발은 개체별로 혈통, 연령, 산차, 번식 및 건강상태 등을 기록과 개체심사를 통하여 시험축을 선발한 후 체중, 연령, 산차에 따라 시험축군을 분류 배치하였다. 송아지 분만 후 4개월간의 체중 조사를 통하여 이유시체중에 대한 육종가(breeding value)를 추정하여 다유성 개

체(+4.0 이상) 151두와 저유성 개체(-4.0 이하) 140두의 총 291두를 각각 선발하였다. 또한, 선발군의 산유량은 자연포유와 기계착유를 병행하여 포유 모우의 유두를 각각 좌우로 나누어 송아지에게 포유시키고 두 유두에서 기계착유로 유량을 측정하였고 회차에 따라 좌우를 번갈아 가면서 착유하였다. 유량조사간격 및 기간은 공시축으로 선정된 임신우를 분만 15일째부터 2주간격으로 분만후 4개월령까지 8회에 걸쳐 실시하였고 유량조사는 조사전날 송아지를 어미소와 격리하여 일정한 간격으로 포유를 하고 유량조사일 오전 9시경과 오후 4시경 2회에 걸쳐 착유하였다. 그러나, 각 검정개체별 유량성적 자료는 다유성 및 저유성 선발집단 가운데 기록과정과 불완전한 착유로 인한 오류 등으로 판단되는 측정치는 분석에서 제외한 총 165두의 선발우만 분석에 이용하였다.

2) Genomic DNA의 분리 및 정제

각 검정대상 공시축으로부터 약 5ml의 혈액을 경정맥에서 채혈한 후 백혈구 세포로부터 Genomic DNA 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 보완 수정하여 다음과 같은 방법에 의해 실시하였다. 즉, heparin 또는 EDTA가 함유된 vacutainer에 혈액을 채혈한 후 15ml tube에 옮겨 2배 부피의 buffer I (10mM Tris, pH7.6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂)을 첨가하여 적혈구 세포가 완전히 용해되도록 혼합하고 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 백혈구만 모아 수집하였다. 상층액을 제거하고 pellet 상태로 된 백혈구에 buffer I을 다시 1ml 첨가하여 2ml tube로 옮긴 후 3,000rpm에서 약 5분간 원심분리하여 완전한 백혈구만 수집하였다. 백혈구로부터 DNA를 추출하기 위해 buffer II(10mM Tris, pH7.6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM EDTA, 0.5% SDS)를 0.8ml를 첨가하고 천천히 확산시켜 완전히 용해한 후 37°C incubator에서 30분간 반응하였다. 반응액에 proteinase K 20 μ l(20mg/ml)를 넣고 천천히 혼합한 후 다시 37°C에서 약 3시간 이상 반응시켜 단백질을 용해시켰다. 반응종료 후 단백질을 제거하기 위해 NaCl(7M)을 0.3ml 첨가하여 완전히 혼합한 다음 마지막으로 0.8ml의 chloroform : isoamyl alcohol(24:1)로 추출한 후 DNA가 함유된 액상을 다른 tube로 옮겼다. 액상으로부터 DNA를 회수하기 위해 2배의 cold ethanol을 첨가하여 원심분리한 다음 침전물을 70% ethanol로 세척하고 DNA를 건조시킨 후 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA)로 용해하였다. 추출한 DNA 농도는 Spectrophotometer로 260nm의 UV 흡착에 의해 측정하고 O.D 260nm/O.D 280nm의 비율로 DNA 순도를 결정하였다.

3) 후보 유전자의 RFLP DNA marker 분석

가) Primer 설계 및 합성

유즙 합성과 분비에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 산유관련 후보유전자로서 유단백질 유전자인 κ -casein(κ -CN), β -lactoglobulin(β -LG)과 α -lactalbumin(α -LA), 유선발달 및 비유축진 호르몬 유전자인 growth hormone(*bGH*), prolactin(*bPRL*), pituitary-specific transcription factor(*PIT-1*), 아미노산 탈탄산효소인 ornithine decarboxylase(*ODC*) 및 비유관련 호르몬 축진 인자 및 수용체 유전자인 growth hormone releasing hormone(*GHRH*)와 growth hormone receptor(*GHR*) 총 9개의 후보유전자와 모계유전효과를 갖는 mitochondrial DNA(mt DNA)의 D-loop 영역에 대한 각 검정 개체별 RFLP marker typing을 위해 본 연구에서 합성하여 이용한 각 primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

나) PCR 증폭 및 DNA 절단

PCR 증폭반응은 GeneAmp PCR System(Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 각 후보유전자들의 반응조건에 따라 PCR tube(0.5ml)에 약 20~50ng template DNA, primer 각 10 μ M, dNTP 200 μ M, 10X reaction buffer 그리고 Taq DNA polymerase 0.5~1.0 units를 첨가하여 최종 부피가 10 μ l가 되도록 조정하였다. PCR 증폭은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 후보유전자들의 중합반응 온도조건에 따라 annealing(56~66 $^{\circ}$ C) 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 30회 반복 수행한 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 함으로써 PCR 반응을 종료하였다.

증폭산물의 제한효소 처리는 PCR 종료 후 각 반응산물 5 μ l에 후보유전자의 특이적 절단부위를 인지하는 8종류의 각 제한효소(*Taq I*, *Hae III*, *Bsp1286I*, *Alu I*, *Rsa I*, *Msp I*, *Hinf I* 및 *Hpa II*) 5~10 units와 1 μ l의 1X buffer를 첨가하여 최종 부피가 10 μ l가 되도록 한 후 제한효소의 반응온도를 참조하여 37 $^{\circ}$ C와 67 $^{\circ}$ C에서 약 2~4 시간 반응시켜 절단한 후 67 $^{\circ}$ C에서 5분간 방치하여 제한효소 반응을 종료하였다.

Table 1. Primer sequences for the candidate genes

Candidate gene	Enzyme	Primer sequence(5' - 3')	Size (bp)	Chro.	Annealing (°C)	Reference
κ -CN	<i>Taq I</i>	GTGCTGAGTAGGTATCCTAG GTAGAGTGCAACAACACTGG	872	6	65	Pinder et al. 1991
β -LG	<i>Hae III</i>	GTCCTTGIGCTGGACCCGACTACA CAGGACACCGGCTCCTGGTATATGA	262	16	64	Ron et al. 1994
α -LA	<i>Bsp1286I</i>	GATCAGTCCTGGGTGGTCATT GGCTCCTCTGTCCATGGAATT	429	5	56	Voelker et al. 1997
bGH	<i>AluI</i>	GCTGCTCCTGAGGGCCCTTCG GCGGCGGCACTTCATGACCCT	223	19	60	Schlee et al. 1994
bPRL	<i>RsaI</i>	CGAGTCCTTATGAGCTTGATICTT GCCTCCAGAAGTCGTTTGTITTC	156	23	60	Mitra et al. 1995
GHR	<i>AluI</i>	TGCGTGCACAGCAGCTCAACC AGCAACCCCACTGCTGGGCAT	836	20	66	Aggrey et al. 1999
ODC	<i>Msp I</i>	ACCACAGGATATGCAGACTGG GCACCCATGTTCTCAAAAAGAGC	796	-	61	Yao et al. 1998
PIT-1	<i>Hinf I</i>	AAACCATCATCTCCCTTCTT AATGTACAATGTGCCTTCTGAG	451	1	56	Woollard et al. 1994
GHRH	<i>Hae III</i>	GTAAGGATGC(CT)(A/G)CTCTGGGT TGCTGCTCATGATGTCCTGGA	455	13	60	Moody et al. 1995
D-loop	<i>Hpa II</i>	TAGTGCTAATACCAACGGCC AGGCATTTTCAGTGCCTTGC	1142	mt DNA	58	Chung et al. 1996

다) 전기영동법에 의한 PCR-RFLP marker 검출

증폭산물을 각종 제한효소로 절단한 후 얻어진 DNA 단편을 분리하기 위해 TBE buffer(90mM Tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0)가 함유된 2~4% agarose gel 전기영동법으로 분리한 단편의 검출을 위해 ethidium bromide 용액(1.0 μ g/ml)으로 염색한 다음 UV Transluminater 상에서 발현된 DNA band를 확인하였다. 또한, silver stain 염색법으로 DNA를 검출하기 위해서는 먼저 glass plate의 각 단면을 glass coating 및 banding 용액을 이용하여 처리한 다음 Acrylamide gel을 고착시켰다. Acrylamide gel 전기영동을 수행하고 종료된 gel을 10% acetic acid 용액에 약 30분간 침전시켜 fixing한 후 3차 증류수로 2분간 3회 세척하였다. 세척된 gel을 staining solution(1.5g/1.5L silver nitrate, 2.25ml formaldehyde(37%))에 약 30분간 침전시켜 염색하고 3차 증류수를 이용하여 약 10초간 세척하여 이물질 및 잔액을 제거하였다. 마지막으로 DNA의 발현을 위해 developing solution(45g/1.5L sodium carbonate, 2.25ml formaldehyde(37%), 300 μ l sodium thiosulfate(10mg/ml)을 처리하여 DNA band를 발색시킨 후 10% acetic acid 용액에 약 10분간 침전시켜 반응을 중지한 다음 발현된 각 검정 개체별 DNA 유전자형을 판정하였다.

증폭산물을 각종 제한효소로 절단한 후 얻어진 DNA 단편을 분리하기 위해 TBE buffer(90mM Tris-borate, 2mM EDTA, pH 8.0)가 함유된 2~4% agarose gel로 전기영동한 다음 ethidium bromide 용액(1.0 μ g/ml)으로 염색하여 UV 상에 발현된 DNA band를 관찰하거나 또는 소량의 DNA 분석과 저분자량의 DNA 단편을 검출하기 위해 10% glycerol을 함유한 8~15% 비변성 polyacrylamide gel(49:1)을 이용하여 200~300V 정전압으로 약 3~5시간 전기영동을 실시한 후 silver staining법으로 발현된 각 검정 개체별 DNA 유전자형을 판정하였다.

4) 통계분석

가) 육종가 분석

본 연구에 사용된 유전능력 검정분석 자료는 축산기술연구소 대관령지소에서 송아지 이유시 체중에 대한 육종가(breeding value) 추정은 개체의 혈통정보를 이용하여 개체들간의 혈연관계를 구하였고 환경효과를 고정효과로 처리하였으며

개체들간의 혈연관계를 고려한 이유전 형질에 대하여 상가적 직접 유전효과 (additive direct effects)와 상가적 모체 유전효과(maternal additive effects)를 임의변량으로 간주한 개체모형(animal model)로 설정하였으며, 분산성분 추정은 MTDFREML(Multiple Trait Derivative Free REstricted Maximum Likelihood) program(Boldman 등, 1995) Package를 이용하여 다음과 같이 유전 모수를 추정하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + YS_i + P_j + S_k + M_l + e_{ijkl}$$

여기서, Y_{ijkl} = 관측치, μ = 전체평균, YS_i = 연도-계절효과, P_j = 산차효과, S_k = 송아지 성의 효과, M_l = 착유효과, e_{ijkl} = 임의효과이다.

나) 유전자 빈도의 추정

실험에 의해 확인된 총 10종류의 후보유전자 좌위의 유전적 다형성은 공우성 대립유전자에 의해 지배되어져 표현형으로부터 유전자형의 판별이 가능하므로 Pirchner(1983)의 유전자 빈도 추정방법에 따라 다음과 같이 계산하였다.

$$F(A) = F(AA) + 1/2F(AB)$$

$$F(B) = 1 - F(A)$$

여기서, $F(A)$ = A 유전자 빈도, $F(B)$ = B 유전자 빈도, $F(AA)$ = AA 유전자형 빈도수, $F(AB)$ = AB 유전자형 빈도수, N = 총 관측치의 수

다) 육종가 추정치와 RFLP marker간의 관련성 분석

$$Y_{ijklmnopqrs} = \mu + \kappa-CN_i + \beta-LG_j + \alpha-LA_k + bGH_l + bPRL_m + GHR_n \\ + PIT-I_o + ODC_p + GHRH_q + Mt_r + e_{ijklmnopqrs}$$

여기서, $Y_{ijklmnopqrs}$ = 관측치, μ = 전체평균, $\kappa-CN_i$ = i 번째 $\kappa-CN$ 의 RFLP형 효과, $\beta-LG_j$ = j 번째 $\beta-LG$ 의 RFLP형 효과, $\alpha-LA_k$ = k 번째 $\alpha-LA$ 의 RFLP 효과

과, $bGH_l = l$ 번째 bGH 의 RFLP형 효과, $bPRL_m = m$ 번째 $bPRL$ 의 RFLP형 효과, $GHR_n = n$ 번째 GHR 의 RFLP형 효과, $PIT-1_o = o$ 번째 $PIT-1$ 의 RFLP형 효과, $ODC_p = p$ 번째 ODC 의 RFLP형 효과, $GHRH_q = q$ 번째 $GHRH$ 의 RFLP형 효과, $Mt_r = r$ 번째 Mt DNA의 RFLP형 효과, $e_{ijklmnopqrs} =$ 임의효과

라) 한우 암소의 산유량과 RFLP marker간의 관련성 분석

한우 암소의 송아지 분만 후부터 이유시까지 120일간의 실제 비유량을 측정하여 다음과 같은 선형모형을 이용하여 최소자승법에 의한 SAS program의 GLM을 이용하여 다음과 같이 분석하였다.

$$Y_{ijklmnopqrst} = \mu + YS_i + P_j + \kappa-CN_k + \beta-LG_l + \alpha-LA_m + bGH_n + bPRL_o + GHR_p + PIT-1_q + ODC_r + GHRH_s + Mt_t + e_{ijklmnopqrst}$$

여기서, $Y_{ijklmnopqrst} =$ 관측치, $\mu =$ 전체평균, $YS_i = i$ 번째 연도-분만계절의 효과, $P_j = j$ 번째 산차의 효과, $\kappa-CN_k = k$ 번째 $\kappa-CN$ 의 RFLP형 효과, $\beta-LG_l = l$ 번째 $\beta-LG$ 의 RFLP형 효과, $\alpha-LA_m = m$ 번째 $\alpha-LA$ 의 RFLP 효과, $bGH_n = n$ 번째 bGH 의 RFLP형 효과, $bPRL_o = o$ 번째 $bPRL$ 의 RFLP형 효과, $GHR_p = p$ 번째 GHR 의 RFLP형 효과, $PIT-1_q = q$ 번째 $PIT-1$ 의 RFLP형 효과, $ODC_r = r$ 번째 ODC 의 RFLP형 효과, $GHRH_s = s$ 번째 $GHRH$ 의 RFLP형 효과, $Mt_t = t$ 번째 Mt DNA의 RFLP형 효과, $e_{ijklmnopqrst} =$ 임의효과

다. 결과 및 고찰

1) 산유관련 후보유전자의 PCR-RFLP marker 및 유전자형 빈도 분석

가) 유즙 단백질 유전자의 PCR-RFLP 유전자형 분석

$\kappa-CN$ 유전자의 RFLP는 관련 유전자의 제 4 exon에서 제 4 intron 사이에 포함된 10,592에서 11,466번째 염기서열 부위인 874bp 크기의 DNA 단편을 특정 염

기서열을 갖는 primer를 이용하여 증폭한 후 PCR 증폭산물을 *Taq I* 제한효소로 절단하고 2% agarose gel로 전기영동하여 검출한 RFLP 양상은 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 κ -CN 좌위를 *Taq I* 제한효소로 절단하였을 때 검출된 band의 크기와 수에 따라 AA형, AB형 및 BB형 3종류의 상이한 κ -CN 유전자형을 판정할 수 있었다. κ -CN의 AA형은 *Taq I* 제한효소의 인지부위가 존재하지 않아 증폭산물과 동일한 크기의 874bp 단일 band만이 검출되었고 BB형은 *Taq I* 제한효소에 의해 절단되어 558bp와 316bp 두 개의 절편이 생성되었으나 AB hetero형은 AA형과 BB형의 양쪽 band를 모두 공유하고 있는 형태로서 874bp, 558bp 및 316bp 3개의 단편이 모두 검출되었다. 이와같은 결과는 정 등(1998)이 한우에서 κ -CN 유전자 좌위를 *Taq I* 제한효소로 처리했을 때 A와 B 두개의 대립유전자에 의해 지배되는 AA, AB 및 BB 3종류의 유전자형 판정이 가능하다고 보고한 결과와 일치하였다. 여러 축우품종에서 κ -CN 좌위는 A, B, C, E, F 및 G 6종류의 유전자 변이체(Kaminski, 1996)가 존재한다고 알려져 있으나 한우의 경우 A와 B 두 개의 대립유전자만이 존재한다고 보고되어 있어(정 등, 1998) 본 연구에서도 추가적인 유전자형은 확인할 수 없었다.

κ -CN 유전자는 Eigel 등(1984)과 Alexander 등(1988)에 의해 아미노산 및 염기서열이 각각 명확히 밝혀짐에 따라 Leveziel 등(1988)이 처음으로 *Hind III* 제한효소를 이용하여 PCR-RFLP에 관한 연구가 보고된 이후 그동안 많은 연구자들에 의해 소에서 κ -CN 좌위의 유전자형을 분석하기 위하여 *Hind III* 이외에도 *Taq I*, *Hinf I*, *Pst I* 및 *Rsa I* 등 각각의 제한효소로 절단하여 인지부위에 따른 각 유전자형을 확인하였다(Ron 등, 1994; Sabour 등, 1996; Lama와 Zago, 1996; 정 등, 1995, 1998; Regitano 등, 1999). 이와같이 κ -CN 유전자에서 제한효소 절단에 의한 A와 B 두개의 대립유전자의 차이는 κ -CN의 아미노산을 결정하는 codon에서 A형은 136번과 148번 아미노산이 각각 Thr(ACC) 및 Asp(GAT)으로 구성되어져 있으나 B형의 경우 136번과 148번의 아미노산이 Ile(ATC)과 Ala(GCT)으로 각각 염기치환이 일어나 서로 다른 두 개의 대립유전자의 구별(Table. 2)이 가능하다(Gorodetsky와 Kaledin, 1987; Alexander 등, 1988; 정 등, 1998).

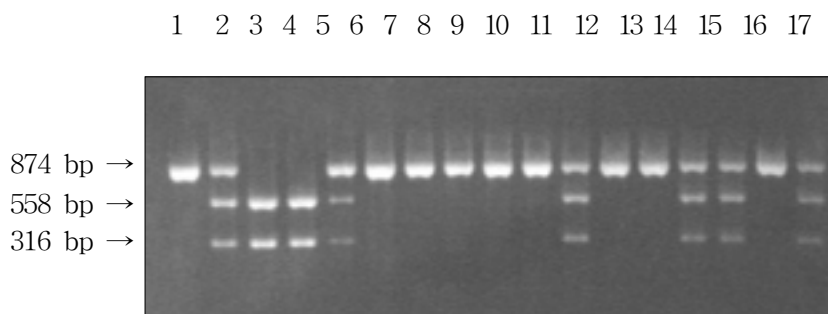


Fig. 1. DNA genotypes of κ -CN gene in 2% agarose gels following digestion with Taq I restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 1, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13 and 16 represent AA genotypes, lanes 2, 5, 11, 14, 15 and 17 represent AB genotypes, lanes 3 and 4 represent BB genotypes.

유청단백질인 β -LG의 RFLP 분석을 위해 제 4 exon과 제 4 intron 사이를 지정하는 367번부터 629번까지의 염기서열 부위인 262bp 크기의 단편을 PCR로 증폭한 후 증폭산물을 *Hae III* 제한효소를 처리하고 polyacrylamide gel 전기영동법으로 분리 검출한 RFLP 양상은 Fig. 3과 같다. Fig. 2의 DNA 전기영동상에서 보는 바와 같이 AA형은 153bp와 109bp 크기의 2개의 band가 확인되었고, BB형은 109bp, 74bp 및 79bp 3개 단편 그리고 AB형은 AA형과 BB형을 모두 공유하고 있는 153bp, 109bp, 79bp 및 74bp 4개의 band가 검출되어 정 등(1994, 1998)과 김 등(1997)이 보고한 결과와 일치된 3종류의 유전자형을 확인할 수 있었다. 지금까지 연구보고에 의하면 β -LG는 Aschaffenburg 등(1955)이 처음으로 A와 B 두 개의 유전적 변이체를 발견한 이후 A, B, C, D, E, F 및 G의 7종류의 변이체가 보고되어 있으나 본 연구에서는 A와 B 두 종류의 변이체 이외에 추가적인 변이체는 확인되지 않아 정 등(1995)의 보고와 일치된 결과를 얻었다. 이와같은 원인은 β -LG 유전자를 *Hae III*로 절단하였을 때 A와 B 대립유전자의 유전적 변이는 염기서열 153번째와 79번째에 존재하는 *Hae III* 제한효소의 인지부위에 따라 결정되며(Medrano와 Aguilas-Cordova, 1990), 또한 이외에도 젓소의 64번 Asp와 118번째 Val을 codon하는 염기배열인 GAT와 GTC 염기가 각각 Gly와 Ala으로 치환됨으로써 GGT와 GCC로 변환하여 A→G 및 T→C로 단일 염기치환이 발생됨에 따라(Medrano와 Aguilas-Cordova, 1990; Wilkins와 Kuys, 1992; Zhou 등, 1996) A와 B 두 대립유전자의 구별이 가능하게 된다.

한우의 α -LA 좌위의 DNA 다형성 검출은 5'-flanking 영역내 LA 전사 개시점인 -1951번째에서 -1523번째 염기서열 부위의 429bp 단편 증폭한 후 이들 증폭산물을 *BspI286I* 제한효소로 처리하여 각 개체별 유전자형을 검출하였다(Fig. 5). Fig. 3에서 보는 바와 같이 α -LA 유전자를 *BspI286I* 제한효소로 처리하였을 때 AA 유전자형은 PCR 증폭산물과 동일한 크기의 429bp 단일 band 만이 검출되었고 BB 유전자형은 429bp 단편이 제한효소에 의해 절단되어 260bp와 169bp 2개의 band를 생성하였다. 그리고 AB hetero형은 429bp, 260bp 및 169bp 3개의 단편으로 분리되어 젓소에서 확인된 유전자형과 일치된 결과를 얻었다(정 등, 1999). 특히, Holstein종 젓소에서 α -LA 유전자의 5'-flanking 영역은 2030개의 염기로 이루어져 있으나 이 영역내의 염기치환은 mRNA 전사 개시점(tsp) 부위의 +15 번, -1466 번 및 -1689 번째의 위치에서 발생하며 축우집단에서는 -1466 번째 염기를 제외한 나머지 두 염기부위에서 다형성이 확인되었다(Voelker 등, 1997). 특히, 한우는 α -LA 유전자의 -1689번째 염기서열에서 A→G으로 치환됨으로써 A와 B 대립유전자에 의해 지배되는 AA, AB 및 BB 3종류의 유전자형이 확인이 가능하였다.

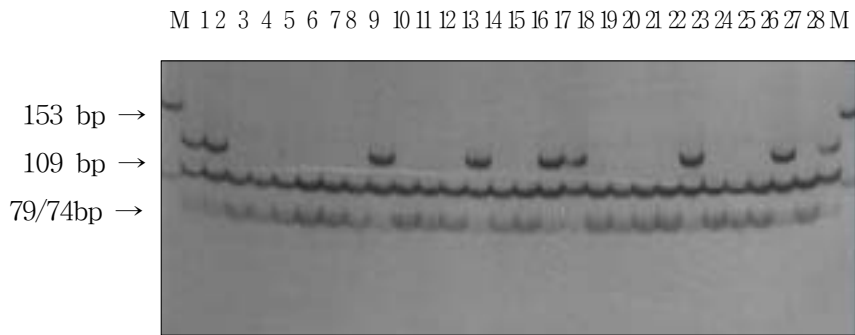


Fig. 2. DNA genotypes of β -LG gene in 15% polyacrylamide gels following digestion with *Hae III* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 1, 9, 13, 17 and 28 represent AA genotypes, lanes 2, 16, 22 and 26 represent AB genotypes, lanes 3~8, 10~12, 14, 15, 18~21, 23~25 and 27 represent BB genotypes.

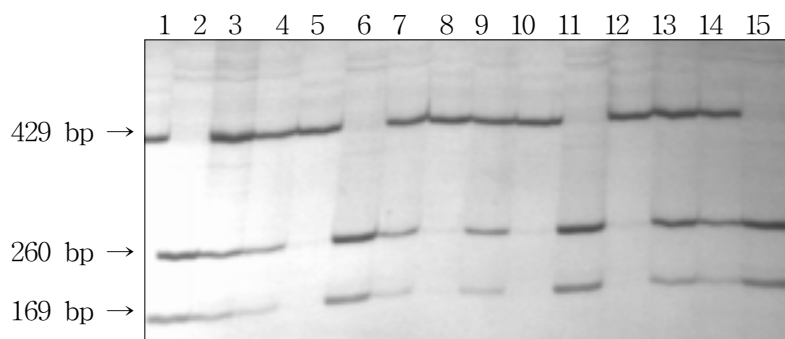


Fig. 3. DNA genotypes of α -LA gene in 15% polyacrylamide gels following digestion with *Bsp1286I* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 1, 5, 8, 10 and 12 represent AA genotypes, lanes 3, 4, 7, 9, 13 and 14 represent AB genotypes, lanes 2, 6, 11 and 15 represent BB genotypes.

한편, κ -CN, β -LG 및 α -LA 좌위의 유전자형 및 유전자 출현빈도를 각각 분석한 결과는 Table 2 및 3과 같다. κ -CN 좌위의 유전자형 출현빈도에서 다유성 선발군의 AA형이 57.62%로 저유성 선발군의 43.57%에 비하여 14.0% 높은 출현빈도를 보였고 반대로 AB형은 저유성 선발군의 53.57%에 비하여 약 17.8% 정도 낮은 값을 나타내어 두 선발집단간에 주목할만한 차이가 있었다. κ -CN 좌위의 A와 B 대립유전자 빈도는 다유성 및 저유성에서 0.755와 0.245 그리고 0.704와 0.296으로 각각 분석되어 A 유전자의 출현율이 월등히 우세하였으나 두 선발군간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다($x^2=1.052$, $df=1$, $P<.500$). 또한 두 선발집단의 평균 유전자 출현율은 각각 0.730(A)과 0.270(B)으로 한 등(1991)과 정 등(1998)이 0.63(A)과 0.37(B)로 각각 보고한 성적과 김 등(1997)이 0.65(A)과 0.35(B) 그리고 조 등(1998)이 0.61(A)과 0.38(B)으로 보고한 결과와 비교해 볼 때 선발이 안된 집단의 유전자 빈도와는 다소의 차이를 나타내었다. 외국종의 경우 A와 B 유전자 빈도는 Angus종과 Hereford종에서 0.71과 0.29 및 0.73과 0.26으로 각각 보고한 성적(Sorensen과 Muggli-Cockett, 1993)과 유사했으나 Regitano 등(1999)과 Kemenes 등(1999)이 Charolais종에서 0.54와 0.49 및 0.48과 0.52으로 각각 보고한 결과와는 커다란 차이를 보여 품종적 특징을 잘 반영해 주고 있음을 알 수 있었다.

β -LG 좌위의 유전자형 출현빈도에서 다유성 선발군의 BB형이 68.21%로 저유성의 72.14%에 비해 약 4% 정도 차이가 있었고 나머지 AA형과 AB형은 각각 5.96%와 25.83% 및 3.57%와 24.29%로 유사한 경향을 보여 유전자형 빈도에 차이는 인정되지 않았다. 다유성 및 저유성 두 선발군의 A와 B 유전자 빈도는 0.189와 0.811 및 0.157과 0.843으로 각각 출현하였고 전체 축군의 평균 유전자 빈도는 A형과 B형이 각각 0.174와 0.826으로 각각 분석되어 κ -CN 좌위와 마찬가지로 유의성은 인정되지 않았다($x^2=0.564$, $df=1$, $P<.50$). 한우에서 한 등(1991)과 정 등(1998)이 A와 B 유전자 빈도를 0.123과 0.877 및 0.153과 0.847로 각각 보고한 결과와 출현율이 비슷한 반면 김 등(1997)과 조 등(1998)이 보고한 결과와는 다소 근소한 차이가 인정되었다. 육우품종인 Angus와 Hereford 종 집단에서 Sorensen과 Muggli-Cockett(1993)는 0.33(A)과 0.67(B) 및 0.26(A)과 0.74(B)로 각각 보고하였고, Regitano 등(1999)은 Charolais종에서 0.54(A)와 0.46(B)으로 각각 보고한 결과와 비교해 볼 때 품종에 따라 높은 경향의 차이가 있음을 알 수 있었다.

한편, α -LA 좌위의 유전자형 출현빈도는 다유성 선발군의 AA형이 44.37%로 저유성 선발군의 30.0%에 비하여 약 14% 정도 높았고 저유성의 AB형은 64.29%로 다유성 선발개체의 49.67%보다 약 15% 정도 낮은 경향을 나타내어 두 선발 축간에 유의차가 인정되었다($\chi^2=3.907$, $df=1$, $P<.05$). α -LA 좌위의 A형과 B형 대립유전자 빈도는 다유성 선발군이 각각 0.692와 0.308 그리고 저유성 선발군은 0.621과 0.379로 각각 추정되어 Voelker 등(1997)이 Holstein종 젖소에서 0.633(A)과 0.367(B)로 각각 보고한 결과와, 정 등(1999)이 또한 국내 젖소품종에서 0.62(A)와 0.38(B)로 보고한 성적과 유사한 발현빈도를 보였다. 그러나 Bleck와 Bremel(1993)이 α -LA 유전자의 5'-flanking 영역에 포함된 +15번째 염기치환에 따른 다형성 분석에서 젖소의 대립유전자 빈도는 A형이 0.333 그리고 B형은 0.667로 보고하여 -1689번째의 다형성(A:0.630, B:0.370)과는 상당한 차이가 있음을 시사하였다.

Table 2. Genotype frequencies of milk protein genes for overall between two groups selected for high and low milk groups in Korean cattle.

Locus	Genotype	HG	LG	Overall
κ-CN	AA	87 ^a (57.62 [*])	61 ^a (43.57 [*])	148 ^a (50.86 [*])
	AB	54(35.76)	75(53.57)	129(44.67)
	BB	10(6.62)	4(2.86)	14(4.74)
β-LG	AA	9(5.96)	5(3.57)	14(4.77)
	AB	39(25.83)	34(24.29)	73(25.06)
	BB	103(68.21)	101(72.14)	204(70.18)
α-LA	AA	67(44.37)	42(30.00)	109(37.19)
	AB	75(49.67)	90(64.29)	165(56.98)
	BB	9(5.96)	8(5.71)	17(5.83)

^a Number of cows, ^{*} Numbers in parentheses represent percentage, HG; high milk group, LG; low milk group, κ-CN: κ-casein, β-LG: β-lactoglobulin, α-LA: α-lactalbumin.

Table 3. Comparisons of allele frequencies for overall and between high and low milk groups.

Locus	Allele	Overall	HG±SE	LG±SE	df	χ^2
κ-CN	A	0.730	0.755±0.025	0.704±0.027	1	1.052
	B	0.270	0.245±0.025	0.296±0.027		
β-LG	A	0.174	0.189±0.023	0.157±0.022	1	0.564
	B	0.826	0.811±0.023	0.843±0.022		
α-LA	A	0.658	0.692±0.027	0.621±0.029	1	3.907*
	B	0.342	0.308±0.027	0.379±0.029		

HG: high milk group, LG: low milk group, SE: standard error= $\sqrt{Pi(1-Pi)}/2N$.
κ-CN: κ-casein, β-LG: β-lactoglobulin, α-LA: α-lactalbumin, * P<0.05.

나) *bGH*, *bPRL*, *PIT-1* 및 *ODC* 유전자의 PCR-RFLP 분석

한우 암소 선발계통에 있어 *bGH*, *bPRL*, *PIT-1* 및 *ODC* 4종류 유전자의 다형성을 탐색하고 검정개체별 DNA 유전자형을 동정하기 위하여 PCR 기법을 이용하여 이들 유선발달 및 비유호르몬 유전자의 RFLP marker를 분석하였다. 먼저, *bGH* 유전자의 증폭을 위하여 127번 아미노산 주변 영역을 code하는 제 4 intron 과 제 5 exon 사이의 223bp 단편을 증폭한 후 PCR 증폭산물을 *Alu I* 제한효소로 반응시켜 얻은 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. *bGH* 좌위를 *Alu I* 제한효소로 처리했을 때 AA형(Leu/Leu)은 171bp와 52bp, BB(Val/Val)형은 223bp의 단일 band만이 검출되었으며 AB hetero형은 223bp, 171bp 및 52bp 3종류의 band가 모두 검출되었다. 이 같은 결과는 Mayr 등(1993), Lee 등(1995) 및 Schlee 등(1994)이 *bGH*의 127번 아미노산에 해당하는 위치에 *Alu I* 제한효소 인지부위의 차이에 의해 PCR 기법으로 RFLP를 검출한 보고와 일치하였다. 그러나, Hoj 등(1993)이 제 3 intron 영역내의 836번째 염기서열상에 *Msp I* 제한효소 인지 부위 변이에 따른 RFLP를 분석하고 3종류의 유전자형을 검출한 결과와는 차이가 있었다. *bGH* 좌위의 유전자형 차이는 염기배열에서 126번째 아미노산인 Glu(GAG)과 127번째 아미노산인 Leu(CTG)을 각각 codon하고 있는 부위 (GAGCTG)에 *Alu I* 제한효소 인지부위(AG/CT)가 존재하고 있으나 127번 아미노산에 Leu → Val으로 치환되면 염기서열이 GAG → GTG로 전환되어 *Alu I* 제한효소 인지부위에 따른 변이가 생성된다고 밝혀져 있다(Lucy 등, 1991; Seavey 등, 1971; Wallis 등, 1976; 정 등, 1996, 1998).

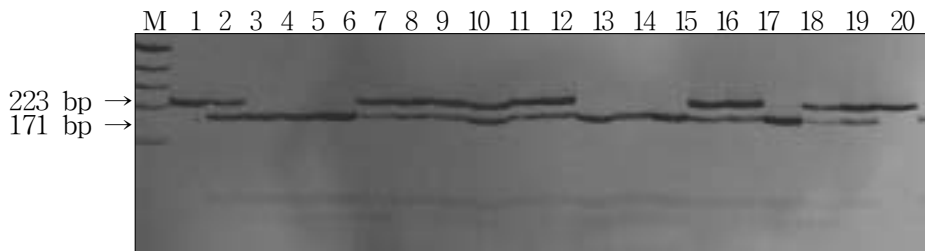


Fig. 4. DNA genotypes of *bGH* gene in 12% polyacrylamide gels following digestion with *Alu I* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lane 1 and 20 represent AA genotypes, lanes 2, 6, 7-11, 15, 16, 18 and 19 represent AB genotypes and lanes 3, 4, 5, 12, 13, 14 and 17 represents BB genotypes. M: Molecular size marker.

bPRL 유전자의 DNA 유전자형 분석은 103번째 아미노산의 주변 영역을 지정하는 156bp 크기의 DNA 단편을 *Rsa I* 제한효소로 처리하여 검출한 RFLP 양상은 Fig. 5과 같다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 제한효소의 인지부위의 존재여부에 따라 AA 유전자형은 *Rsa I* 제한효소 인지부위의 결여로 156bp의 단일 band만이 검출되었으나 BB형의 경우 82와 74bp 2개의 단편으로 분리되었으며 AB hetero형은 156bp, 82bp 및 74bp 3개의 단편을 모두 생성하여 정 등(1996)이 보고한 *bPRL*의 유전자형 검출 양상과 일치된 결과를 얻었다. Lewin 등(1992)에 의하면 *bPRL* 유전자의 polypeptide내 제 3 exon 영역에서 103번째 아미노산을 지정하는 부위에서 *Rsa I* 제한효소 인지부위의 변이에 따른 다형성을 보고하였다. 즉, 103번째 아미노산에 Valin(Val)을 codon하는 GTA와 104번째 Argine(Arg)의 CGG의 염기배열을 구성하고 있는 부위(GTACGG)에 *Rsa I* 제한효소 인지부위(GT/AC)가 존재하는데 이 codon의 A → G로 단일 염기 치환이 발생할 경우 이 부위의 염기서열은 GTG로 전환되며 그 결과 103번과 104번의 양쪽 아미노산 부위는 GTACGG에서 GTGCGG로 변화되어 *Rsa I* 제한효소 인지부위는 자연적으로 소실하게 된다. 그러나, 이때의 염기치환은 침묵 돌연변이(silent mutation)로서 *bPRL*의 아미노산 배열의 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있다(Sasavage 등, 1982).

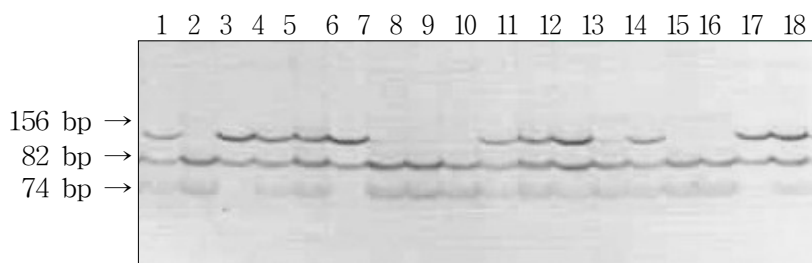


Fig. 5. DNA genotypes of *bPRL* gene in 12% polyacrylamide gels following digestion with *Rsa I* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 1, 3, 6 and 17 represent AA genotypes, lanes 4, 5, 11, 12, 14 and 18 represent AB genotypes and lanes 2, 7, 8, 9, 13, 15 and 16 represent BB genotypes.

한우의 PIT-1 유전자에 대한 DNA 다형성 분석을 위해 제 5 intron과 제 6 exon 영역을 포함하는 451bp 크기의 PCR 증폭산물을 *Hinf I* 제한효소로 처리하여 검출한 RFLP 양상은 Fig. 6에 제시한 바와 같다. PCR 증폭산물을 *Hinf I* 제한효소로 절단하였을 때 인지부위(G/ANTC)의 차이에 따라 AA, AB 및 BB 3 종류의 상이한 band 양상이 관찰되었다. 즉, PIT-1 좌위의 AA homo형은 *Hinf I* 제한효소 인지부위의 결여로 PCR 증폭산물과 동일한 크기의 451bp의 단일 band 그리고 BB homo형은 451bp의 단편이 절단된 244bp와 207bp 2개의 band가 생성되었고 AB hetero형은 451bp, 244bp 및 207bp 3종류의 band가 모두 확인되었다. 이러한 결과는 Woolland 등(1994)이 Holstein종 젖소에서 보고한 PIT-1 유전자의 *Hinf I* PCR-RFLP의 DNA band 양상과 일치하였다. Dierkers 등(1995)은 소의 PIT-1 유전자를 *Hinf I* 제한효소로 절단하였을 경우 exon 6 영역에서 1256번째 부위의 G 염기가 A로 치환됨으로써 A 대립유전자의 식별이 가능하다고 보고되어 있어 한우에서도 동일한 염기변이에 의한 각 검정개체별 유전자형 판정이 가능하였다.

ODC 유전자의 RFLP는 bovine ODC 유전자(GenBank U36394)의 exon 9번과 11번 영역을 포함하는 제 5413 - 6208번째 부위의 증폭산물(796bp)을 *Msp I* 제한효소로 절단한 후 전기영동한 결과는 Fig. 7과 같다. ODC 유전자를 *Msp I* 제한효소(C/CGG)로 절단하였을 때 AA형(-/-)은 *Msp I* 인지부위가 존재하지 않아 796bp의 단일 band만이 검출되었고 BB형(+/+)은 556bp 및 240bp 2개의 단편으로 분리되었다. 또한, AB형(+/-)은 AA형과 BB형의 DNA band를 모두 공유하는 796bp, 556bp 및 240bp 3개의 단편을 확인하였다.

이러한 결과는 ODC 유전자의 exon 9번 중간에 위치하고 있는 제 5654번 염기배열을 결정하는 codon에서 CCG → CCA로 단일 염기가 치환(G → A)됨으로써 *Msp I* 제한효소 인지부위가 소실되게 된다(Fig. 15). 그러나, Yao 등(1998)은 이때의 염기치환은 prolactin 유전자와 마찬가지로 침묵 돌연변이(silent mutation)로서 아미노산 배열의 변화에는 영향을 주지 않는다고 보고한 바 있다.

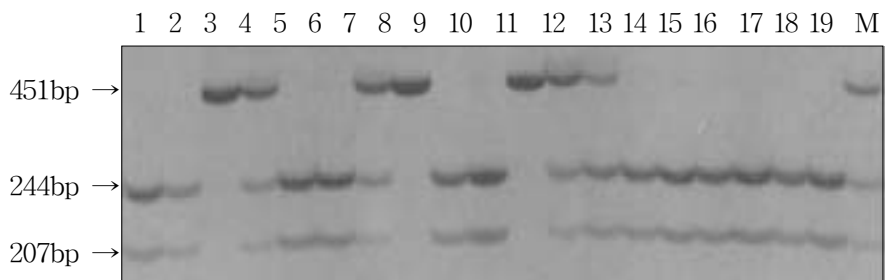


Fig. 6. DNA genotypes of PIT-1 gene in 12% polyacrylamide gels following digestion with *Hinf I* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 3, 8 and 11 represent AA genotypes, lanes 4, 7, 12 and 13 represent AB genotypes, lanes 1, 2, 5, 6, 9, 10 and 14~19 represent BB genotypes. M : molecular size marker.

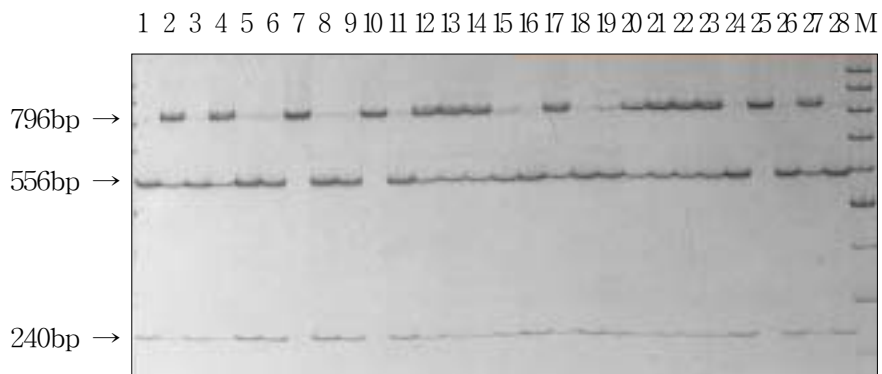


Fig. 7. DNA genotypes of ODC gene in 12% agarose gels following digestion with *Hae III* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 7, 10 and 25 represent AA genotypes, lanes 2, 4, 12, 13, 14, 17, 20, 20, 22, 23 and 27 represent AB genotypes, lanes 1, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 15, 16, 18, 24, 26 and 28 represent BB genotypes. M: molecular marker.

한편, *bGH bPRL*, *PIT-1* 및 *ODC* 좌위의 유전자형 및 대립유전자 출현빈도를 각각 비교하여 Table 4와 5에 제시하였다. *bGH* 좌위에서 다유성 선발군은 저유성 선발군에 비해 AA형의 출현율이 각각 74.17%와 52.86%로 21.3% 높은 반면에 AB형은 각각 21.85%와 43.57%로 약 22% 낮은 출현율을 보여 *bGH* 유전자형 분포간에 기대할 만한 차이가 확인되지 않았다(Table 4). 또한, *bGH* 좌위의 A와 B 대립유전자 빈도에 있어 다유성 집단은 각각 0.851과 0.149 및 저유성은 각각 0.746와 0.254로 추정되었고 출현빈도에 차이는 있으나 유의성은 인정되지 않았고, 두 선발축군의 전체 평균 출현빈도는 A와 B 대립유전자가 각각 0.800과 0.200으로 분석되었다. 이러한 결과는 정 등(1996)이 국내 Holstein종에서 A와 B 대립유전자 빈도를 0.74와 0.26으로 각각 보고한 결과와 본 연구의 저유성 선발군과는 상호 유사했으나 외국육우인 일본 흑모화우, Hereford 및 Aberdeen Angus 육우 품종의 A와 B 빈도를 0.44와 0.56, 0.80과 0.20 및 0.59와 0.41로 각각 추정된 성적(Chikuni 등, 1991)과 비교해 볼 때 Hereford 종과 다유성 한우 선발군과 비슷한 출현율을 보인 반면 일본화우 및 Aberdeen Angus종과는 상반된 결과를 보였다. 또한, Schlee 등(1994)이 Simmental 육우에서 A형과 B형의 빈도를 각각 0.71 및 0.29 그리고 Regitano 등(1999)이 Charolais종에서 A형은 0.74, B형이 0.26으로 본 성적과 어느정도 차이가 있었다.

*bPRL*의 유전자형은 다유성 선발군에서 AB형(42.38%)이 저유성 그룹(30.00%)에 비하여 약 12% 높은 출현율을 보인 반면 상대적으로 AA형(51.66%)은 저유성(62.86%)에 비하여 약 12% 정도 낮은 수준을 나타내었다. 그러나 두 선발집단의 A와 B 유전자 빈도에서 다유성 선발군과 저유성 선발군이 각각 0.729와 0.271 및 0.780과 0.220로 각각 분석되어 서로 유사한 경향을 나타내었다. 또한 두 선발집단의 평균 유전자형과 유전자 출현빈도는 각각 57.26%(AA), 36.19%(AB)와 6.55%(BB) 및 0.753(A) 및 0.247(B)로서 정 등(1998)이 한우 암소 집단에서 AA형, AB형 및 BB형의 출현율을 각각 51.0%, 33.5% 및 15.5% 그리고 A와 B 대립유전자 빈도를 0.678 및 0.322로 각각 발표한 성적과 다소의 차이를 나타내었다.

PIT-1 좌위의 유전자형 출현빈도를 비교한 결과에서 다유성 및 저유성 선발군의 AB형이 각각 54.30%와 60.71%로 가장 출현율이 높았고 다음으로 BB형이 각각 36.43%와 32.86% 였으며 AA형은 9.27%와 6.43%로 각각 출현하여 가장 저조하였다. *PIT-1* 좌위의 A와 B 대립유전자 빈도는 다유성 선발군이 각각 0.364와

0.636 그리고 저유성이 각각 0.368과 0.632로 두 선발군간에 유의적인 차이가 인정되었다. 따라서 이같은 결과로 볼 때 Renaville 등(1997)이 Holstein 종에서 AA형, AB형 및 BB형의 출현빈도를 각각 2.2%, 31.5% 및 66.3% 그리고 A와 B 유전자 빈도를 0.188과 0.812로 각각 보고한 성적과는 상이하였다. 또한, Moody 등(1995)이 주요 축우품종에서 A와 B 대립유전자 빈도를 추정할 바에 의하면 Angus 종 0.45와 0.55, Holstein 종 0.26과 0.74, Hereford 종 0.21과 0.79, Gelbvieh 종 0.18과 0.89 그리고 Brahman 종은 0.10과 0.90으로 각각 보고한 바 있으며, Dierkers 등(1998)도 Holstein 종모우에서 A와 B 대립유전자 빈도를 각각 0.68과 0.32으로 발표하여 각 품종의 유전적 특성에 따라 상당한 차이가 있었다.

한편, ODC 좌위의 AA, AB 및 BB 유전자형 출현빈도에 대하여 다유성 그룹은 7.28%, 27.15% 및 65.56%로 각각 추정되었고 저유성 선발군은 7.14%, 40.00% 및 52.86%으로 각각 나타나 다유성 선발군에서 BB형의 출현율이 저유성에 비하여 약 13%정도 더 높은 경향을 나타냈다. 또한, ODC 좌위의 대립유전자 빈도에 있어서도 다유성(A:0.209, B:0.791)와 저유성(A:0.271, B:0.729) 두 축군간에 다소의 차이가 있으나 유의차는 인정되지 않았다. Holstein 종에서 ODC 유전자 좌위의 유전자형 및 유전자 빈도에 관하여 Yao 등(1997)은 1950년도에서 1960년도까지의 종모우 72두와 1980년대의 종모우 65두를 각각 선정하여 AA형(-/-), AB형(+/-) 및 BB형(+/-)의 유전자형 출현빈도에 대해 각각 5.6%, 34.7% 및 59.7% 그리고 0%, 15.4% 및 84.6%의 출현율을 보였고 A와 B의 유전자 빈도는 0.771과 0.229 및 0.923과 0.077로 각각 보고한 바 있다.

Table 4. Genotype frequencies of RFLP markers for overall between two groups selected for high and low milk groups in Korean cattle.

Locus	Genotype	HG	LG	Overall
<i>bGH</i>	AA	112 ^a (74.17 [*])	74 ^a (52.86 [*])	186 ^a (65.52 [*])
	AB	33(21.85)	61(43.57)	94(32.71)
	BB	6(3.98)	5(3.57)	11(3.78)
<i>bPRL</i>	AA	78(51.66)	88(62.86)	166(57.26)
	AB	64(42.38)	42(30.00)	106(36.19)
	BB	9(5.96)	10(7.14)	19(6.55)
PIT-1	AA	14(9.27)	9(6.43)	23(7.85)
	AB	82(54.30)	85(60.71)	167(57.51)
	BB	55(36.43)	46(32.86)	101(34.64)
ODC	AA	11(7.28)	10(7.14)	21(7.21)
	AB	41(27.15)	56(40.00)	97(33.58)
	BB	99(65.56)	74(52.86)	173(59.21)

^a Number of cows, ^{*} Numbers in parentheses represent percentage, HG: high milk group, LG: low milk group, *bGH*: growth hormone, *bPRL*: prolactin, PIT-1: pituitary-specific transcription factor, ODC: ornithine decarboxylase.

Table. 5. Comparisons of allele frequencies for overall and between high and low milk groups in Korean cattle. HG: high milk group,

Locus	Allele	Overall	HG±SE	LG±SE	df	χ^2
<i>bGH</i>	A	0.800	0.851±0.020	0.746±0.026	1	0.006
	B	0.200	0.149±0.020	0.254±0.026		
<i>bPRL</i>	A	0.753	0.728±0.026	0.779±0.025	1	0.026
	B	0.247	0.272±0.026	0.221±0.025		
PIT-1	A	0.366	0.364±0.028	0.368±0.029	1	5.252*
	B	0.634	0.636±0.028	0.632±0.029		
ODC	A	0.239	0.209±0.023	0.271±0.027	1	0.404
	B	0.761	0.791±0.023	0.729±0.027		

LG: low milk group, SE: standard error. *bGH*: growth hormone, *bPRL*: prolactin, PIT-1: pituitary-specific transcription factor, ODC: ornithine decarboxylase. * P<.05

다) GHR 및 GHRH 유전자의 PCR-RFLP 분석

GHR 및 GHRH 후보유전자의 RFLP 분석은 PCR 증폭산물을 각각 *Alu I* 및 *Hinf I* 제한효소로 처리하고 PAGE법으로 검출한 RFLP 양상은 Fig. 8 및 9에 제시하였다. 한우에서 GHR 유전자의 5'-flanking 영역인 promoter와 exon 1 부위를 지정하고 있는 -1871번째에서 -1036번째 염기배열을 포함하고 있는 836bp 크기의 증폭산물을 *Alu I* 제한효소로 절단한 결과 인지부위에 따라 AA형(-/-)은 747bp, 75bp 및 14bp 3개의 단편 그리고 BB형(+/+)은 602bp, 145bp, 75bp 및 14bp 4개의 단편이 생성되었고 AB형(+/-)은 A와 B homo형의 양쪽 band를 모두 공유하고 있는 형태로서 747bp, 602bp, 145bp, 75bp 및 14bp 5개 절편이 분리되었다. 그러나 분자량이 작은 14bp의 단편은 가시적으로 확인되지 않았다. 이 같은 결과는 Holstein종에서 GHR 유전자를 *Alu I* 제한효소로 절단하였을 때 3종류의 유전자형을 확인한 Aggrey 등(1999)의 보고와 일치하였다. GHR 유전자를 *Alu I* 제한효소로 절단했을 때 발생하는 돌연변이는 -1182번째 염기서열을 지정하는 부위에서 AGC(Ser) → GGC(Gly)로 A 염기가 T 염기로 치환됨에 따라 각 검정개체의 유전자형 구별이 가능하였다(Fig. 18). 또한 이 영역 이외에도 -892번째와 -232번째의 염기서열에서 각각 C → T로 단일 염기치환이 보고되어 있다(Aggrey 등, 1999). Moisisio 등(1998)은 5품종의 Finnish 축우를 대상으로 GHR cDNA 염기배열과 GHR 유전자의 3' flanking 영역을 비교한 결과 총 3종류의 염기배열에 따른 변이를 검출하여 보고하였고 Ge 등(1999)은 PCR-DGGE 분석법으로 GHR 유전자의 exon 10번 영역에 대한 다형성을 확인한 바 있다.

한편, GHRH 유전자는 인간(Mayo 등, 1985) 및 생쥐(GenBank accession no. M31654)의 GHRH cDNA 염기서열간의 상동성 부분을 이용하여 제 3 exon 영역에서 455bp 크기의 단편을 증폭한 후 *Hae III* 제한효소로 처리하였다(Fig. 9) DNA 전기영동상에서 보는 바와 같이 제한효소의 인지부위 차이에 따라 2개의 대립유전자에 의해 지배되는 3 종류의 상이한 유전자형이 검출되었다. GHRH 유전자의 AA형은 317bp, 83bp 및 55bp 3개의 band가 생성되었고 BB형은 196bp, 121bp, 83bp 및 55bp 4종류의 band가 생성되었으며 AB hetero형은 317bp, 196bp, 121bp, 83bp 및 55bp 5종류의 band가 모두 검출되어 Moody 등(1995)이 GHRH 유전자를 *Hea III* 제한효소로 절단하였을 때 3종류의 유전자형을 확인하였다는 보고와 일치된 결과를 얻었다.

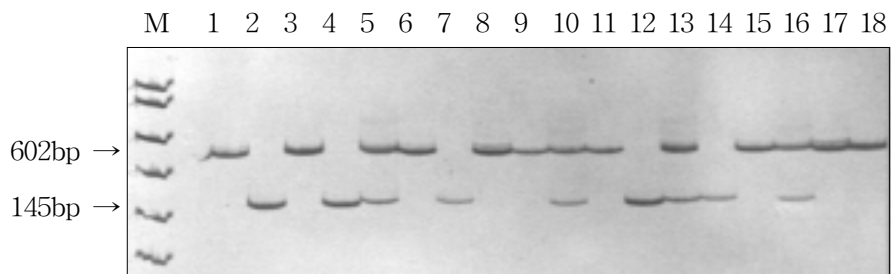


Fig. 8. DNA genotypes of GHR gene in 12% polyacrylamide gels following digestion with *Alu I* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 1, 3, 6, 8, 9, 11 and 15 represent AA genotypes, lanes 5, 10, 13 and 16 represent AB genotypes, lanes 2, 4, 7, 12 and 14 represent BB genotypes. M : molecular size marker(100bp DNA ladder).

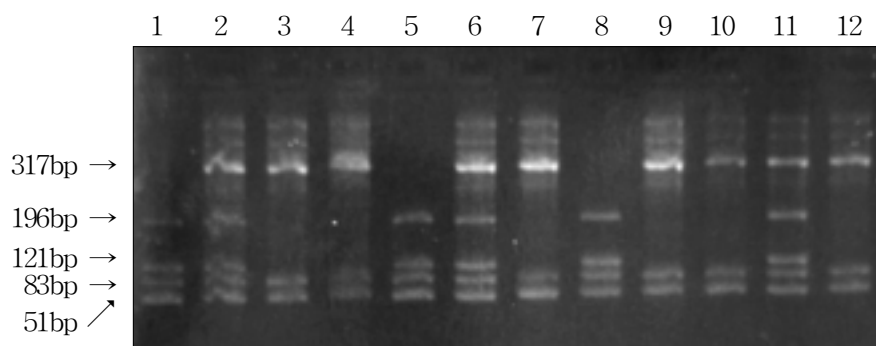


Fig. 9. DNA genotypes of GHRH gene in 4% agarose gels following digestion with *Hae III* restriction enzymes of PCR products for Korean cattle. In the gel, lanes 3, 4, 7, 9, 10 and 12 represent AA genotypes, lanes 2, 6 and 11 represent AB genotypes, lanes 1, 5 and 8 represent BB genotypes.

산유능력 검정성적에 의해 선발된 다유성 및 저유성 선발축군에서 GHR 및 GHRH 유전자의 유전자형 및 유전자 출현빈도를 각각 분석하였다(Table 6과 7). GHR 유전자의 유전자형 출현빈도는 다유성 및 저유성 선발개체에서 AA형이 각각 46.36%와 42.14%를 차지하여 유사한 출현율을 보인 반면 AB형은 저유성 선발군이 43.57%로 다유성의 33.77%에 비해 약 10% 정도 높았으나 BB형에서 두 선발축간에 유사한 경향의 출현빈도를 보였다. 또한 GHR 좌위의 A와 B 대립 유전자 빈도에 있어서도 다유성 선발군은 각각 0.632와 0.368였고 저유성 선발군은 각각 0.639과 0.361로 선발축간의 유전자 출현율도 매우 근사한 경향을 나타냈고 전체 평균 유전자 빈도는 A와 B형이 각각 0.636과 0.364로 분석되었고 통계적 유의성은 인정되지 않았다($x^2=2.664$, $df=1$, $P<.250$). 이 같은 결과는 Aggrey 등(1999)이 Holstein 종에서 AA형, AB형 및 BB형의 출현율을 각각 43.28%, 40.30% 및 16.42% 그리고 A와 B 유전자 출현빈도를 0.634와 0.366으로 각각 보고한 성적과 비교해 볼 때 상당히 유사한 결과를 보였다. 그러나, Moisio 등(1998)이 5종의 Finnish 축우품종에서 GHR 유전자의 3' flanking 영역에 포함되어 있는 GHR₃₁₁, GHR₃₂₀ 및 GHR₃₂₅ 염기배열의 변이에 따른 대립유전자를 분석한 성적에서 각각 0.13~0.66, 0.32~0.70 및 0.00~0.17로 품종에 따라 대립유전자 빈도에 상당한 차이가 있는 것으로 보고된 바 있다.

한편, GHRH의 유전자형 출현빈도는 다유성 선발집단의 AA형과 AB형이 각각 24.50%와 39.07%으로 저유성의 15.00%와 30.71%에 비하여 두 유전자형 모두 약 10% 정도 높았고 이와 반대로 저유성 선발군의 BB형(56.29%)은 다유성 선발계통(36.43%)에 비해 약 18% 정도 높은 출현빈도를 보여 유의적인 차이가 인정되었다. GHRH 유전자의 A와 B 대립유전자 빈도에서 다유성 선발계통은 각각 0.440와 0.560으로 저유성의 0.304와 0.696에 비하여 각각 약 14% 정도 차이를 보여 두 선발군간에 유의성($x^2=6.103$, $df=1<.025$)이 인정되었고 선발축 전체에 대한 평균 유전자 출현빈도는 A형과 B형이 0.375와 0.625로 각각 나타났다. 그러나 Moody 등(1995)이 Hereford와 Angus종의 A와 B 유전자 출현빈도를 분석한 결과 각각 0.07과 0.93 및 0.70과 0.30으로 나타나 한우와 상당한 차이가 있었다. 이와 관련하여 최근에 Connor 등(1999)은 염색체 4번에 위치하고 있는 GHRH-R 유전자의 PCR-RFLP 분석을 위해 *Eco57I* 제한효소로 절단하여 3종류의 상이한 유전자형을 확인한 바 있으나 대립유전자 출현빈도에서 *Bos indicus*종은 모두 A 대립유전자가 확인된 반면 Hereford종과 Angus종에서는 모두 B 대립유전자가 각각 검출되었음을 보고하였다.

Table 6. Genotype frequencies of GHR and GHRH genes for overall between two groups selected for high and low milk groups in Korean cattle.

Locus	Genotype	HG	LG	Overall
GHR	AA	70 ^a (46.36 [*])	59 ^a (42.14 [*])	129 ^a (44.33 [*])
	AB	51(33.77)	61(43.57)	112(38.49)
	BB	30(19.87)	20(14.29)	50(17.18)
GHRH	AA	37(24.50)	21(15.00)	58(19.93)
	AB	59(39.07)	43(30.71)	102(35.05)
	BB	55(36.43)	76(54.29)	131(45.02)

^a Number of cows, ^{*} Numbers in parentheses represent percentage, HG: high milk group, LG: low milk group, GHR: growth hormone receptor, GHRH: growth hormone releasing hormone.

Table 7. Comparisons of allele frequencies for overall and between High and low groups in Korean cattle.

Genes	Allele	Overall	HG±SE	LG±SE	df	χ^2
GHR	A	0.636	0.632±0.028	0.639±0.024	1	2.664
	B	0.364	0.368±0.028	0.361±0.024		
GHRH	A	0.375	0.440±0.029	0.304±0.027	1	6.103*
	B	0.625	0.560±0.029	0.696±0.027		

HG: high milk group, LG: low milk group, SE: standard error, GHR: growth hormone receptor, GHRH: growth hormone releasing hormone. * P<.05

라) 한우 mt DNA의 RFLP 분석

한우의 세포질내 유전정보원으로서 mt DNA의 유전적 다형현상을 분석하기 위하여 mt DNA의 D-loop 영역내 15601번에서 404번째 염기서열 부위의 1142bp 단편을 증폭한 후 *Hpa II*와 *Rsa I* 두종류의 제한효소로 각각 절단하고 2% agarose와 8% polyacrylamide gel 전기영동법으로 각각 검출한 RFLP형을 관찰하였다. 증폭산물을 제한효소로 절단한 후 분리된 mt DNA 단편의 크기는 GenBank(J01394)에 등록된 bovine mitochondrial DNA의 염기배열(Anderson 등, 1982)을 참고하여 추정하였다. *Hpa II* 제한효소로 처리한 다음 전기영동을 수행한 결과 Fig. 9에서 보는 바와 같이 A type의 경우 599bp, 332bp 및 230bp의 3개의 단편으로 분리된 반면 B type의 개체는 599bp, 313bp, 230bp 및 19bp의 4개 단편으로 분리되었으나 19bp의 단편은 크기가 작아 gel 상에서 확인이 불가능하였다. 이는 염기치환 등의 원인으로 제한효소 인지부위가 추가로 발생되어 나타난 것으로 *Hpa II* 제한효소 인지 염기서열인 362번째 부위를 인지하는 CCGT가 CCGG로 염기치환(T → G)됨으로서 새로운 절단부위가 형성된 경우로 해석할 수 있다. 또한, Fig. 10은 *Rsa I* 제한효소로 처리한 PCR 증폭산물을 전기영동했을 때 제한효소의 인지부위의 존재여부에 따라 *Hpa II* 제한효소와 마찬가지로 두종류의 상이한 RFLP 형이 관찰되었다. 즉, A 형은 649, 300, 66, 40, 35, 26, 19 및 7bp 8개 단편의 분리가 이론적으로 가능하나 실제적으로는 649, 300 및 66bp 3개의 단편이 가지적으로 검출되었다. 그러나 B 형의 경우 16086번째의 *Rsa I* 제한효소 인지부위인 GTAC의 염기서열의 변화로 26bp와 7bp 두개의 단편이 절단되지 않아 66bp의 단편보다 큰 분자량을 가진 99bp가 생성됨으로서 649, 300 및 99bp 3개의 단편이 확인되었다. 이러한 원인에 대해 Mannen 등(1997, 2000)은 일본 흑모화우를 대상으로 D-loop 영역내 염기서열의 차이를 분석한 결과에서 16086번째의 염기서열인 G → A로 그리고 16088번째의 A → G로 염기치환이 생겨 새로운 형태의 돌연변이를 확인한 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서 이러한 결과는 16086번째의 *Rsa I* 제한효소 인지부위인 GTAC의 염기서열로서 G → A로 단일 염기치환이 발생할 경우 이 부위의 염기서열은 ATAC로 전환되어 자연적으로 *Rsa I* 제한효소 인지부위가 소실하게 되어 발생한 결과와 일치하였다. 한편, mt DNA내 D-loop 영역을 PCR 기법으로 증폭하여 각종 제한효소로 절단한 보고에 의하면 Suzuki 등(1993)은 *Hpa II*, *Apa I*, *Ava II*,

BamH I, *BstX I* 및 *EcoN I* 제한효소에 의한 변이형을 검출하였고 정 등(1996)은 한우와 젖소에서 14종류의 제한효소로 처리한 결과 이 가운데 *Apa I*과 *Hpa II* 2종류의 제한효소에서 RFLP 다형성이 검출되었다. 이 등(1998)도 재래한우와 타품종과의 유전적 관계 분석에서 10종류의 제한효소 가운데 *Msp I*, *Hae III*, *Mbo I*, *Rsa I*, *Hinc II*, *BstX I*, *Ava II* 및 *Hsp92 II* 8종류의 제한효소에서 다형성을 관찰하였고 이 가운데 *Rsa I* 제한효소에서 3종류의 RFLP 형을 확인하였으나 본 연구에서는 2종류의 type만을 확인할 수 있었다.

다유성 및 저유성으로 선발 분류한 집단에서 RFLP 출현빈도는 *Hpa II* 제한효소 절단형의 경우 다유성 선발군은 A type이 61.59%로 저유성 선발군의 42.14%에 비하여 약 19.5% 정도 높은 출현율을 나타냈으나 이와 반대로 B type은 저유성 선발군이 57.86%로 다유성의 38.41%에 비해 약 19% 상당히 낮은 출현율을 나타냈다(Table 8). 따라서, 다유성과 저유성 두 그룹의 RFLP 유전자형 출현빈도에서 고도의 통계적 유의차($P < .001$)가 인정되었다. 한편, *Rsa I* 제한효소에서 다유성은 A와 B type의 출현빈도가 각각 81.46%와 18.54%였고 저유성은 각각 85.00%와 15.00%으로 두 선발군간에 출현빈도에는 차이가 인정되지 않았다. 정 등(1996)은 한우와 젖소에서 *Hpa II* 제한효소로 RFLP형의 출현빈도를 조사한 결과 젖소의 A형이 67.4%로 한우의 35%에 비해 약 두배 높은 출현율을 보였고 B 형의 출현율은 한우가 65%로 젖소의 32.6% 보다 훨씬 우세한 출현율이 나타났음을 보고한 바 있다. 또한, 이 등(1998)이 한우에서 *Rsa I* 제한효소로 절단할 경우 3종류의 다형성 가운데 A, B 및 C 형의 출현빈도를 60, 30 및 10%로 각각 보고한 바 있으며 이러한 성적은 본 연구에서 분석한 출현율과 어느 정도의 차이가 인정되었다.

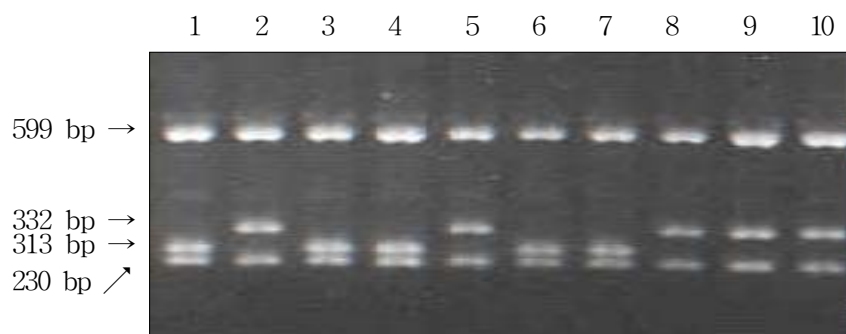


Fig. 9. RFLP patterns of bovine mt DNA D-loop region in 3% agarose gel following digestion with *Hpa II* restriction enzyme of PCR products(1142bp). In the gel, lanes 2, 5, 8, 9 and 10 represent A types, and lanes 1, 3, 4, 6 and 7 represent B types.

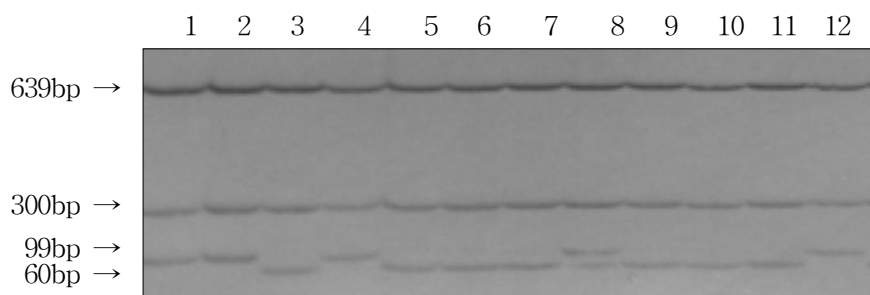


Fig. 10. RFLP patterns of bovine mt DNA D-loop region in 8% polyacrylamide gel following digestion with *Rsa I* restriction enzyme of PCR products(1142bp). In the gel, lanes 1, 2, 4, 8 and 12 represent A types, and lanes 3, 5, 6, 7, 9, 10 and 11 represent B types.

Table 8. Comparisons of allele frequencies of mt DNA for overall and between high and low milk groups in Korean cattle.

Enzyme	Type	Overall	HG	LG	df	χ^2
<i>Hpa II</i>	A	52.23*	93 ^a (61.59*)	59(42.14)	1	10.968***
	B	47.77	58(38.41)	81(57.86)		
<i>Rsa I</i>	A	83.16	123(81.46)	119(85.00)	1	0.159
	B	16.84	28(18.54)	21(15.00)		

^a Number of cows, * Numbers in parentheses represent percentage, HG: high milk group, LG: low milk group, *** P<.001.

2) 산유관련 유전자의 PCR-RFLP marker과 생산형질간의 상관관계 분석

가) 한우의 이유시 체중에 대한 육종가와 PCR-RFLP marker간의 관련성 분석

한우의 이유시 체중은 어미소의 비유능력, 아버소의 유전능력 및 송아지의 성장 잠재력을 나타내는 지표로서 이미 외국의 경우 오래전부터 육우 송아지의 이유시 체중에 대한 개량을 위하여 어미의 비유능력 개량에 힘써왔다. 먼저 어미소의 비유능력을 향상시키기 위해서는 송아지 이유시 체중의 육종가를 구하고 선발에 이용하는 방법이 한우의 비유량을 증대시키고 비유지속성을 높이기 위한 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다. 따라서 송아지 이유시 체중에 대한 육종가(breeding value)는 한우 종모우 또는 종빈우의 종축으로서의 가치를 나타내는 중요한 척도가 된다. 본 연구에서는 한우 산유능력 검정성적과 송아지 이유시 체중에 대한 육종가 추정치의 유전능력 평가에 기초하여 다유성 및 저유성 선발군으로 분류된 개체들을 대상으로 생산형질에 직접 또는 간접적으로 영향을 미치는 후보유전자(candidate gene)들에 대한 DNA 유전자형을 분석하고 각 후보유전자들과의 관련성을 분석하였다. 통계적 모형에 의해 추정된 각 후보유전자 좌위의 유전자형이 다유성 및 저유성 선발그룹간의 육종가 추정치에 영향을 미치는 효과에 대해 분산분석한 결과를 Table 9에 제시하였다. Table 9에서 보는 바와 같이 다유성 선발집단의 κ -CN 유전자 좌위와 mt DNA의 *Rsa I* 제한효소 절단형은 송아지 이유시 체중에 대한 육종가에 각각 고도의 유의차($P < .001$, $P < .01$)가 인정되었으며, PIT-1 좌위의 유전자형의 효과에 있어서도 유의적($P < .05$)인 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 그러나 저유성은 α -LA 좌위에서 통계적 유의성($P < .05$)이 인정되었지만 그 밖의 다른 유전자 좌위는 유의적인 관계가 관찰되지 않았다. 선발군 전체집단에 있어서 유전자 좌위와 육종가간의 효과를 분석한 결과에서는 κ -CN 좌위가 고도의 유의성($P < .01$)을 보였고 bGH, bPRL 및 mt DNA의 *Hpa II* 절단형에서 각각 육종가에 영향을 미쳤다($P < .05$). 총 10종류 후보유전자 좌위의 표지 유전자형과 송아지 이유시 체중에 대한 육종가간의 관련성을 분석한 결과는 Table 10과 같다. 즉, 한우 암소의 선발그룹들을 대상으로 검출된 각 유전자형과 육종가간의 관련성을 확인한 바 다유성 선발계통에 대한 유전자형과 육종가간의 차이는 총 3종류의 유전자에서 유의성이 인정되었는데, κ -CN의 BB형, PIT-1의 AB형 및 mt DNA의 *Rsa I* 절단형에서 A

형의 RFLP marker가 각각 15.95 ± 2.28 , 11.58 ± 1.40 및 11.46 ± 1.35 로 유의적 ($P < 0.05$)으로 높은 경향을 보였다. 그러나, 저유성으로 선발 분류된 개체들의 경우 α -LA 유전자의 BB형이 -15.18 ± 2.53 으로 다른 AA형과 AB형에 비하여 각각 4.73과 4.49 정도 낮아 유의적($P < 0.05$)인 영향을 미치는 것으로 분석되어 두 선발군간에 이들 특정 유전자의 유전자형에 따라 육종가에 커다란 차이를 나타냈다. 한편, 전체 선발군에서 유전자 좌위의 유전자형과 육종가간의 상관관계를 분석한 결과 총 3종류의 유전자에서 유의적인 차이가 인정되었다. 즉, κ -CN의 BB형, bGH의 AA형, bPRL 좌위의 AB형 및 mt DNA(*Hpa II*) 절단형의 A형이 각각 10.82 ± 3.28 , 7.48 ± 0.81 , 6.62 ± 0.03 및 5.90 ± 0.04 로 송아지 이유시 체중에 대한 육종가는 유전자 좌위의 유전자형간에 뚜렷한 차이를 보였으나 그 이외의 6종류 유전자에서는 각 유전자형의 출현빈도와 선발 개체들의 육종가 추정치에 따라 다소의 차이는 있었지만 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 Kasari(1999)가 Salers 암소들을 고능력우(4% 이상) 및 저능력우(-4% 이하) 두 선발군으로 구분하고 유단백질 유전자인 κ -CN, β -LG, β -CN 및 α s1-CN 좌위의 유전자형과 유량에 대한 EPD와 상관관계를 조사한 연구에서 두 선발군간에 유전자형의 출현빈도에 따라 차이는 있었으나 이들 유전자와 EPD 간에 유의성이 인정되지 않았음을 보고한 결과와 비교해 볼 때 상당한 차이를 보였다. Lucy 등(1993)에 의하면 Holstein 종 암소의 bGH 좌위에서 A 유전자의 동형접합체 개체가 유량에 대한 유전전달 능력 추정치가 높은 경향이었음을 보고한 결과와는 어느정도 일치된 경향을 보였다. 한편, Lee 등(1996)이 Holstein종 젖소의 305일 산유량에 대한 선발군과 대조군에서 추정 육종가(EBV)를 구하고 bGH 유전자의 유전자형과 EBV간의 연관성을 분석한 결과 대조군과는 관련성이 인정되지 않았으나 선발군의 경우 B형(Val)의 존재에 따라 유량감소와 밀접한 관계가 있음을 시사한 바 있다.

Table 9. Mean squares and significance of the source of variation of breeding value in PCR-RFLP genotypes of Korean cattle.

Source	df	HG		df	LG		df	Overall	
		MS	F		MS	F		MS	F
κ -CN	2	284.529	10.02***	2	6.781	0.27	2	756.669	5.54**
β -LG	2	57.574	2.03	2	4.575	0.18	2	31.479	0.23
α -LA	2	16.339	0.58	2	73.205	2.88*	2	38.860	0.28
bGH	2	5.830	0.21	2	10.005	0.39	2	452.193	3.31*
bPRL	2	34.291	1.21	2	4.627	0.18	2	533.047	3.90*
PIT-1	2	84.731	2.98*	2	1.336	0.05	2	62.363	0.46
ODC	2	1.085	0.04	2	21.215	0.83	2	253.172	1.85
GHR	2	3.877	0.14	2	5.284	0.21	2	127.912	0.94
GHRH	2	9.325	0.33	2	18.212	0.72	2	33.608	0.25
Mt DNA H^1)	1	6.910	0.24	1	4.624	0.18	1	595.773	4.36*
R^2)	1	178.683	6.29**	1	1.037	0.04	1	117.454	0.86
Error	131	28.389		120	25.416		271	136.689	

1) *Hpa II* enzyme, 2) *Rsa I* enzyme, κ -CN: κ -casein, β -LG: β -lactoglobulin, α -LA: α -lactalbumin, bGH: growth hormone, bPRL: prolactin, PIT-1: pituitary-specific transcription factor, ODC: ornithine decarboxylase, GHR: growth hormone receptor, GHRH: growth hormone releasing hormone, mt DNA: mitochondrial DNA, HG: high milk group, LG: low milk group, * P(<.05), ** P(<.01), *** P(<.001).

Table 10. Least square means and standard errors of breeding value by PCR-RFLP genotypes in Korean cattle.

Locus	Genotype	Breeding value			
		HG	LG	Overall	
κ -CN	AA	6.71±1.51 ^b	-12.71±1.63	1.69±1.06 ^b	
	AB	6.82±1.63 ^b	-12.74±1.64	-2.04±1.13 ^b	
	BB	15.95±2.28 ^a	-10.88±2.90	10.82±3.28 ^a	
β -LG	AA	7.26±2.39	-13.08±2.89	1.87±3.48	
	AB	10.69±1.62	-11.52±1.65	2.06±2.02	
	BB	11.53±1.55	-11.73±1.65	1.52±1.48	
α -LA	AA	9.57±1.56	-10.45±1.71 ^a	2.58±2.03	
	AB	10.55±1.62	-10.69±1.66 ^a	-0.58±1.54	
	BB	9.36±2.04	-15.18±2.53 ^b	0.77±3.35	
<i>b</i> GH	AA	9.56±1.32	-12.24±1.67	7.48±0.81 ^a	
	AB	10.25±1.63	-11.45±1.78	-2.15±1.35 ^b	
	BB	9.67±2.27	-12.64±2.76	2.28±2.41 ^b	
<i>b</i> PRL	AA	10.97±1.49	-12.50±1.76	-0.71±0.01 ^b	
	AB	10.26±1.44	-11.91±1.95	6.62±0.03 ^a	
	BB	8.26±2.22	-11.91±2.23	3.74±0.04 ^{ab}	
PIT-1	AA	7.22±2.27 ^b	-11.87±2.42	3.24±0.01	
	AB	11.58±1.40 ^a	-12.37±1.70	3.32±0.02	
	BB	10.68±1.52 ^a	-12.09±1.88	1.08±0.01	
ODC	AA	10.06±2.25	-13.07±2.42	-3.26±0.01	
	AB	9.59±1.59	-11.11±1.75	-2.87±0.02	
	BB	9.84±1.52	-12.15±1.75	0.28±0.01	
GHR	AA	9.56±1.58	-11.84±1.88	3.13±0.01	
	AB	10.11±1.67	-11.79±1.79	9.17±0.03	
	BB	9.80±1.73	-12.70±2.05	1.24±0.02	
GHRH	AA	10.08±1.79	-13.09±2.10	-3.06±0.04	
	AB	9.30±1.59	-11.70±1.80	-1.52±0.03	
	BB	10.10±1.62	-11.53±1.76	-0.59±0.02	
Mt	<i>Hpa II</i>	A	10.07±1.62	-12.31±1.80	5.90±0.04 ^a
		B	9.59±1.55	-11.91±1.81	-2.85±0.03 ^b
DNA	<i>Rsa I</i>	A	11.46±1.35 ^a	-12.24±1.73	-0.65±0.03
		B	8.19±1.90 ^b	-11.98±1.97	0.78±0.02

^{a, b} Superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$), HG; high milk group, LG; low milk group.

나) 한우에서 PCR-RFLP marker와 산유량간의 관련성 분석

육우의 산유량은 송아지 이유시 체중에 영향을 주는 가장 중요한 요인이며 암소 선발의 기준이 되는 중요한 형질로 알려져 있으나(Charles와 Anderson, 1980; Minick 등, 2001), 지금까지 한우의 산유량과 산유관련 유전자의 연관성에 관한 연구보고는 많지 않은 실정이다. 따라서, 본 연구는 비유형질과 밀접히 연관되어 있는 산유관련 후보유전자 가운데 어느 좌위의 유전자형이 한우 암소의 산유능력에 통계적으로 유의하게 영향을 미치는지 여부를 분석하였다.

산유관련 후보유전자 좌위가 한우의 산유량에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 총 10종류 표지좌위의 유전자형과 산유량에 영향을 미치는 환경요인으로서는 한우 암소의 분만년도와 계절의 상호작용 효과와 산차의 효과를 포함하여 분산분석을 통계 처리한 결과 Table 11에서 보는 바와 같이 분만년도와 계절의 상호작용 효과에 따른 어미소의 산유량은 통계적 유의차가 인정되지 않았으나 산차간에는 유의적($P < .05$)인 차이를 보였다. 최 등(1999)은 한우 암소와 이들이 생산한 송아지를 대상으로 어미소의 산유능력에 영향을 미치는 요인을 규명한 결과에 의하면 분만년도나 분만계절은 어미소의 산유량에 영향을 미치는 중요한 변이요인이라고 보고한 결과와는 상이한 차이를 나타내었다. 또한, 어미소의 산차가 산유량에 미치는 영향에 대해서 Lubritz 등(1989)은 어미소의 연령이나 산차는 산유량과 밀접한 관계가 있어 암소의 산유능력을 평가할 때 반드시 고려되어야 한다고 한 반면 Thrope 등(1993)은 유우와는 달리 육우에서 산차에 따른 산유량의 차이는 크지 않았음을 보고한 바 있다.

Table 11. Mean squares and significance of milk yield and total milk yield for PCR-RFLP markers according to milking periods in Korean cattle.

Source	df	30 day		60 day		90 day		120 day		Total milk yield	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
YS	36	3.550	1.20	3.528	1.05	4.412	1.05	4.302	1.00	62,721.589	1.25
P	3	3.445	1.16	4.681	1.39	15.867	3.79**	8.987	2.09	152,719.266	3.07*
κ -CN	2	7.452	2.52	2.737	0.81	2.217	0.53	0.313	0.07	162,430.499	3.24*
β -LG	2	13.230	3.28*	12.667	3.20*	1.345	0.32	1.051	0.24	163,201.305	3.24*
α -LA	2	9.200	3.11	6.598	1.96	4.877	1.17	0.823	0.19	181,643.552	3.43*
<i>b</i> GH	2	7.381	2.49	2.278	0.68	1.594	0.38	0.071	0.02	24,637.683	0.49
<i>b</i> PRL	2	1.532	0.52	2.921	0.87	13.314	3.29*	14.192	3.98*	183,650.063	3.67*
PIT-1	2	3.803	1.28	4.634	1.37	8.174	1.95	5.533	1.29	130,022.189	2.60
ODC	2	0.692	0.23	0.850	0.25	6.661	1.59	2.539	0.59	39,183.406	0.78
GHR	2	2.984	1.01	2.279	0.68	0.066	0.02	2.483	0.58	5029.801	0.10
GHRH	2	0.346	0.12	0.748	0.22	6.762	1.62	4.079	0.95	51,862.407	1.04
Mt <i>H</i> ¹	1	0.021	0.01	5.062	1.50	9.683	2.32	0.004	0.00	61,636.650	1.23
<i>R</i> ²	1	6.025	2.03	4.096	1.22	0.017	0.00	0.114	0.03	42,136.647	0.84
Error	97	2.961		3.371		4.182		4.296		50,034.516	

¹*Hpa* II enzyme, ²*Rsa* I enzyme, * P(<.05), ** P(<.01).

한편, 한우 암소에서 후보유전자들의 유전자형과 송아지 분만 이후부터 120일 까지의 산유량과의 효과를 구명하기 위하여 선형모형에 의한 최소자승법으로 분석한 결과는 Table 12에 제시한 바와 같다. 한우 암소의 β -LG 좌위는 송아지 분만후 30일 및 60일의 일일 산유량과 유전자형간에 뚜렷한 차이가 보여 AA 동형접합체의 유전자형은 AB 또는 BB 유전자형에 비해 유량이 각각 1.85kg과 2.12kg 및 2.53kg과 2.74kg이 유의적($P<.05$)으로 높은 경향이였다. 또한, *bPRL* 좌위의 유전자형과 90일과 120일의 일일 산유량간에 커다란 차이를 나타내 $BB>AB>AA$ 유전자형의 순으로 유량이 높은 경향($P<.05$)을 나타냈고. κ -CN, *bPRL*, β -LG 및 α -LA 좌위는 120일 동안 총 산유량에 각각 유의적($P<.05$)인 영향을 미치는 것으로 분석되었다. κ -CN과 *bPRL* 두 좌위에 있어 BB 유전자형의 총 산유량이 각각 $677.65\pm 116.25\text{kg}$ 과 $589.67\pm 120.98\text{kg}$ 으로 AA 유전자형에 비하여 약 200kg 및 165kg이 각각 높게 생산되었고 또한, β -LG 및 α -LA 좌위의 AA형은 BB 유전자형에 비해 총 산유량이 약 159kg 및 142kg 정도 높은 결과를 보였다.

최근 연구 보고에 의하면 유즙단백질 유전자인 κ -CN, β -LG 및 α -LA 좌위의 유전자형은 비유형질인 유생산량, 단백질량 및 유지율과 밀접한 연관성을 갖고 있어 이들의 유전적 다형성을 이용하여 통계적으로 비유형질에 유의하게 영향을 미치는지의 여부를 분석한 결과 유즙단백질 유전자의 유전자형이 이들 형질에 미치는 영향의 정도의 크기에 따라 많은 차이가 있음이 보고되었다 (Ng-Kwai-Hang 등, 1990; Ron 등, 1994; Etrmann과 Geldermann, 1997; Sabour 등, 1996; Ikonen 등, 2001).

Table 12. Least square means and standard errors of milk yields and total milk yields for RFLP markers according to milking periods in Korean cattle.

Locus	Genotype	Milk yield(kg)				Total milk yield(kg)	
		30 day	60 day	90 day	120 day		
κ -CN	AA(79*)	4.36±0.62	5.32±0.66	3.37±0.73	3.79±0.74	477.65±	80.91 ^b
	AB(72)	4.94±0.63	5.52±0.67	5.21±0.75	4.95±0.76	540.30±	82.47 ^{ab}
	BB(14)	3.85±0.89	4.47±0.95	5.89±1.06	4.96±1.07	677.65±	116.25 ^a
β -LG	AA(9)	5.84±0.83 ^a	6.86±0.89 ^a	4.75±0.99	4.77±1.00	737.34±	108.59 ^a
	AB(40)	3.99±0.71 ^b	4.33±0.76 ^b	4.91±0.84	5.14±0.85	378.89±	92.66 ^b
	BB(116)	3.72±0.61 ^b	4.12±0.65 ^b	4.81±0.73	4.81±0.74	422.25±	80.37 ^b
α -LA	AA(66)	4.90±0.65	5.47±0.69	5.36±0.77	4.71±0.78	611.24±	84.71 ^a
	AB(85)	4.03±0.66	4.67±0.71	4.68±0.79	4.80±0.80	568.53±	87.05 ^b
	BB(14)	5.22±0.79	5.17±0.85	4.43±0.94	5.20±0.96	568.71±	93.87 ^b
<i>b</i> GH	AA(102)	4.77±0.54	5.40±0.58	5.11±0.65	4.96±0.66	513.94±	71.24
	AB(49)	5.43±0.68	5.27±0.73	4.84±0.81	4.88±0.82	467.11±	89.52
	BB(14)	3.95±0.85	4.64±0.91	4.53±1.02	4.87±1.03	467.44±	111.63
<i>b</i> PRL	AA(62)	4.54±0.59	4.78±0.63	4.29±0.70 ^b	4.47±0.71 ^b	424.93±	76.82 ^b
	AB(92)	4.45±0.56	4.80±0.60	4.69±0.66 ^b	4.60±0.67 ^b	433.89±	73.27 ^b
	BB(11)	5.16±0.93	5.74±0.99	6.49±1.10 ^a	5.65±1.12 ^a	589.67±	120.98 ^a
PIT-1	AA(13)	4.72±0.92	5.23±0.99	5.25±1.10	5.38±1.11	480.82±	120.61
	AB(99)	5.03±0.55	5.39±0.58	4.97±0.65	4.99±0.66	541.47±	71.50
	BB(53)	4.40±0.60	4.70±0.64	4.24±0.71	4.34±0.72	426.19±	78.42
ODC	AA(15)	4.52±0.81	5.17±0.86	4.76±0.96	4.86±0.97	456.87±	105.69
	AB(56)	4.72±0.70	4.91±0.74	4.57±0.83	4.66±0.84	466.11±	91.19
	BB(94)	4.91±0.65	5.23±0.70	5.13±0.78	5.19±0.79	525.50±	85.60
GHR	AA(73)	4.75±0.62	4.97±0.66	4.68±0.74	4.96±0.75	480.42±	81.14
	AB(58)	4.39±0.67	4.89±0.72	4.81±0.80	5.18±0.81	470.33±	88.03
	BB(34)	5.02±0.71	5.46±0.76	4.98±0.85	4.57±0.86	497.74±	93.26

* Number of cows, ^{a, b} superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$), κ -CN: κ -casein, β -LG: β -lactoglobulin, α -LA: α -lactalbumin, *b*GH: growth hormone, *b*PRL: prolactin, PIT-1: pituitary-specific transcription factor, ODC: ornithine decarboxylase, GHR: growth hormone receptor.

Continued

Locus	Genotype	Milk yield(kg)				Total milk yield(kg)
		30 day	60 day	90 day	120 day	
GHRH	AA(29)	4.69±0.72	4.96±0.77	4.49±0.86	4.64±0.87	451.99±94.34
	AB(58)	4.82±0.64	5.27±0.68	5.29±0.76	5.28±0.77	525.43±83.47
	BB(78)	4.65±0.64	5.10±0.69	4.69±0.77	4.79±0.78	471.06±84.25
Mt DNA	<i>Hpa II</i> A(87)	4.70±0.64	5.33±0.68	5.14±0.76	4.90±0.77	508.08±83.83
	B(78)	4.73±0.65	4.88±0.69	4.51±0.77	4.91±0.78	457.57±84.54
DNA	<i>Rsa I</i> A(140)	5.08±0.55	5.41±0.59	4.80±0.66	4.95±0.66	513.31±72.24
	B(25)	4.35±0.77	4.81±0.82	4.84±0.92	4.85±0.93	452.35±90.64

GHRH: growth hormone releasing hormone, mt DNA: mitochondrial DNA,

특히, 유우의 경우 κ -CN 좌위에서 BB 유전자형을 가진 개체는 직접 유량에 미치는 영향이 AA 유전자형의 개체들에 비해 높아 유량이 더 많이 생산되는 것으로 보고되어져 있어(Gonyon 등, 1987; Ng-Kwai-Hang 등, 1984; Lin 등, 1992) 본 연구의 결과와 일치된 경향을 나타냈으나 반면에 Bovenhuis 등(1992)과 Gonyon 등(1987)은 κ -CN 좌위의 AA 유전자형이 BB 유전자형을 가진 개체들보다 상대적으로 유량이 더 높았음을 보고한 결과와 비교해 볼 때 한우의 산유량은 BB 유전자형을 가진 개체들의 기록이 높게 나타나 본 연구와 상반된 차이를 보였다. Gonyon 등(1987)과 Bovenhuis 등(1992)이 β -LG 좌위에서 AA 유전자형의 개체가 유량증가와 더 밀접한 관련성이 있음을 보고하였고, Bleck와 Bremel(1993)은 α -LA 유전자의 5'-flanking 영역내 +15 번째 염기서열에서 발생하는 단일 염기의 차이에 의해 A 대립유전자를 가진 암소의 산유량이 더 증가하였음을 보고한 이들의 연구와 부합된 결과를 얻었다. 또한, bPRL 좌위의 유전자형도 젖소 개량을 위한 유전적 표지인자로서 이미 산업적으로 실용화되어 종모우 선발에 부가적인 선발지표로 이용되고 있다(Barret, 1991; 정 등, 1996). Cowan 등(1990)이 최초로 고능력우 Holstein 종 가계에서 양적형질과 연관된 bPRL 좌위의 RFLP marker를 구명하고 보고한 바에 의하면 AA형이 BB형에 비해 성우등등 유량에 대한 PD 값이 283kg 정도 유의적으로 높은 것으로 추정하였고, 정 등(1996)도 국내 젖소에서 bPRL 유전자의 염기서열 변이에 따른 유전적 다형성과 경제형질인 유량과 유조성분율과의 연관성을 분석한 결과 AA 유전자형이 AB 또는 BB 유전자보다 유의적으로 높은 경향을 보였음을 보고하였으나 한우 암소는 AA 유전자형이 BB 유전자형에 비해 총 산유량이 약 265kg 높게 추정되어 품종의 유전자형 출현빈도와 일일 산유량에 따라 차이가 있음을 시사하였다. 그러나, 본 연구의 산유량 분석에서 유의성이 인정되지 않은 bGH, PIT-1, ODC, GHR, GHRH 및 mt DNA 6종류 유전자는 젖소의 유선발달, 비유개시 및 유생산에 직접 영향을 미치는 후보유전자로서 양적형질좌위와 DNA 표지좌위간의 연관성을 확인하는 수단으로 가축 선발육종에 가치가 인정되고 있어 향후 이들 유전자를 한우의 생산형질과 관련된 후보유전자로 이용하여 한우개량을 위한 유전적 표지의 선발도구로 이용할 경우 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 판단된다. 이와 같이 품종 또는 개체에 따른 유량의 차이는 첫째 유전적 배경, 개별 유전자의 표현형에 대한 기여도 및 통계적인 모형설정 등에 따라 분석결과에 유의적인 영향을 미칠수 있고, 둘째로는 변형유전자(modifier gene)가 존재할

경우 다른 유전자들과 상호 작용하여 그 효과가 상실되는 경우가 있으므로 (Wiener 등, 2000; Nature(review), 2001) 이를 보완할 수 있는 체계적인 연구가 필요한 실정이다. 한우 암소의 유생산량을 위한 보조수단으로 본 연구에서 확인된 κ -CN과 *b*PRL 좌위의 BB형과 β -LG 및 α -LA 좌위의 A 유전자 또는 AA 유전자형을 보유하는 암소를 선발하여 한우 집단내 이들 유전자 빈도를 증가시키는 것이 생산성 향상에 보다 바람직할 수 있을 것으로 기대된다.

다) 상가적 효과(additive effect) 및 우성효과(dominance effect) 분석

한우의 다유성 및 저유성 선발군을 대상으로 총 10종류 유전자 가운데 두 type의 RFLP형을 갖는 mt DNA를 제외한 나머지 9종류의 유전자에서 각 유전자형을 판정하고 각 검정개체별 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 분만후 월령별 산유량을 근거로 하여 상가적 효과(additive effect)와 비상가적 작용(non-additive)인 우성효과(dominance effect)가 이들 생산형질에 미치는 영향을 분석하였다. Table 13은 송아지 이유시 체중에 대한 육종가 추정의 유전능력 평가에 기초하여 다유성과 저유성 및 전체 선발축군에서 동형접합체를 갖는 개체들의 차이(AA-BB)를 나타내는 상가적 효과와 두 동형접합체 평균간의 차이(AB-(AA+BB)/2)를 나타내는 우성효과의 작용을 구한 결과로서 다유성 선발군의 상가적 효과에 있어 κ -CN, β -LG, α -LA, PIT-1 및 GHR 5종류 유전자 좌위는 -0.70, -0.58, -3.20, -2.75 및 -3.80으로 각각 나타나 이들 유전자형은 AA 유전자형에 비하여 BB 유전자형의 효과가 크게 작용하는 것으로 분석되었으며 이와 반대로 *b*GH, *b*PRL, ODC 및 GHRH 좌위는 5.37, 2.49, 2.19 및 2.18로 각각 확인되어 AA 동형접합성 유전자형의 효과가 더 큰 것으로 조사되었다. 그러나 저유성 선발군의 상가적 효과에서는 모든 좌위에서 양(+)의 값을 보여 AA 유전자형이 더 큰 효과를 미쳤다. 또한 전체집단을 대상으로 상가적 효과를 분석하였을 경우 *b*GH 및 β -LG 두 좌위만이 각각 3.35와 1.47로 분석되었고 나머지 좌위인 κ -CN은 -2.29, α -LA은 -7.33, *b*PRL은 -2.50, ODC는 -2.66, GHR은 -4.25 및 GHRH은 -2.36으로 *b*GH 및 β -LG 두 좌위에 비하여 상당히 낮게 분석되었다. 한편, 우성효과 분석에서 다유성 선발군은 GHR 좌위가 0.29 그리고 전체축군은 β -LG 좌위가 1.59로 추정되어 이형접합체의 효과가 크게 나타났고 저유성 선발군은 이형접합체가 바람직한 유전자형으로 추정되었다.

Table 13. Additive and dominance effects for breeding value and RFLP genotypes in Korean cattle.

Locus	Group	Additive effect ^a	Dominance effect ^b
κ-CN	HG	-0.70±2.21***	-2.44±2.76
	LG	19.44±2.76	30.45±3.17
	OV	-2.29±0.06***	-3.70±0.04
β-LG	HG	-0.58±0.51	-1.39±0.43
	LG	22.31±2.64	21.15±3.25*
	OV	1.47±0.32	1.59±0.41
α-LA	HG	-3.20±0.41	-4.32±0.74
	LG	18.21±2.14	2.17±0.14
	OV	-7.33±0.36	-2.28±0.23
bGH	HG	5.37±1.12	-2.28±0.51
	LG	16.71±2.36	13.92±3.35
	OV	3.35±0.77*	-5.15±0.45
bPRL	HG	2.49±0.25	-3.42±0.08
	LG	18.01±3.21	14.58±2.53
	OV	-2.50±0.42	-0.67±0.12*
PIT-1	HG	-2.75±0.33*	-1.86±0.57
	LG	20.05±3.25	18.18±4.25
	OV	-6.19±0.24	-1.18±0.25
ODC	HG	2.19±0.17	-4.21±0.36
	LG	14.08±1.22	15.86±4.12
	OV	-2.66±0.05	-0.77±0.06
GHR	HG	-3.80±0.70	0.29±0.64
	LG	21.86±2.36	20.06±3.42
	OV	-4.25±0.45	-0.17±0.63
GHRH	HG	2.18±0.64	-3.47±0.51
	LG	16.33±2.36	18.53±2.87
	OV	-2.36±0.64	-0.33±0.12

^a Estimated by subtracting the solution for BB genotype from that for AA genotype(AA-BB). ^b Estimated by subtracting the average of solution for homozygous genotypes from that for AB genotype(AB-(AA+BB)/2). HG: high milk group, LG: low milk group, OV: selected overall groups.

*P<.05, ***P<.001

또한, 한우의 분만후 30일, 60일, 90일 및 120일 동안의 일일 유량과 120일까지의 총산유량에 대한 각 유전자형의 유량 평균치를 이용하여 유전자 작용에 의한 상가적 및 우성효과를 각각 구하였다(Table 14). 한우 암소의 산유량에 있어 κ -CN 좌위는 총산유량에서 상가적 효과의 표현형 값이 -36.45로 나타났고 bPRL 좌위는 90일, 120일 및 총산유량의 표현형 값이 각각 -0.21, -0.68 및 -35.91로 추정되어 AA 동형접합체 유전자형보다는 BB 유전자형의 효과가 더 높게 추정되었고, β -LG 좌위는 30일, 60일 및 총산유량에서 각각 0.90, 0.30 및 16.75 그리고 α -LA 좌위의 총산유량은 20.21로 분석되어 AA 동형접합체 유전자형의 효과가 높은 것으로 분석되었다. 또한 월령별 산유량에 대한 우성효과를 분석했을 경우 통계분석에서 유량에 대한 유의성은 인정되지 않았으나 PIT-1 좌위와 GHR 좌위는 30일, 60일, 90일 및 120일 그리고 총산유량에서 -0.13, -1.30, -0.23, -0.24 및 -25.37 그리고 -0.20, -1.16, -0.16, -0.16 및 -11.90으로 각각 추정되어 동형접합체 유전자형의 효과가 산유량에 더 많은 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 따라서 이들 상가적 및 우성효과를 이용하여 우성작용을 갖는 바람직한 유전자형을 선발하여 한우 생산형질과 관련된 유전적 표지인자로 활용할 경우 한우의 유전적 자질을 보다 더 향상시킬 수 있으리라 판단된다.

최근에 와서 Ge 등(2001)은 Angus 육우를 대상으로 IGF-1 유전자의 염기서열 변이가 혈중 IGF-1 농도에 따라 high 및 low 선발계통으로 분류하고 성장형질과의 관련성을 분석한 결과에서 이들 IGF-1 농도의 평균치를 근거로 유전자형에 따른 상가적 및 우성효과를 각각 분석하고 유의성을 검정하였다. 또한, Drogemuller 등(2001)은 German 돼지 계통에서 산자수와의 관련성을 확인하기 위해 3종류의 후보유전자를 이용하여 연관성을 분석하고 이들 유전자의 상가적 효과와 우성효과를 추정하여 생산형질에 바람직한 유전자형을 확인하여 보고하였고, 이외에도 Wimmers 등(2002)도 돼지품종에서 AFLP 기법을 이용하여 도체형질과 관련된 QTL을 검출하기 위해 동형접합체와 이형접합체 유전자에 대한 이들 효과를 분석하여 보고한 바 있다. 본 연구의 결과는 Lin 등(1987)이 총 890두의 미경산우 집단에서 4종류 유단백질 좌위를 이용하여 성장과 번식형질간의 상관관계를 분석한 결과에서 이들 유전자 좌위는 총 표현형가 분산에 대한 상가적 효과보다 우성효과가 더 크게 영향을 미친다고 보고한 내용과 어느정도 일치된 경향을 보였다.

따라서, 상가적 및 우성효과는 가축의 경제형질에 영향을 미치는 주요 요인으

로 이들 유전자 작용에 따라 선발의 척도가 될 수 있으므로(Falconer, 1989) 개개의 유전자형을 확인하여 선발에 대한 강도를 높일수 있다. 특히, 경제적으로 중요한 양적형질에 영향을 미치는 우성 유전자 발현 정도가 상가적 유전자 작용을 갖는 개체들에 비하여 바람직한 효과를 가져다 줄 수 있으므로 이를 한우 선발을 위한 지표로 활용할 수 있으리라 사료된다.

Table 14. Additive and dominance effects of milk yield and total milk yield for RFLP genotypes according to milking periods in Korean cattle.

Gene	Additive effect ^a				
	30 day	60 day	90 day	120 day	Total
κ -CN	-0.40±0.21	1.01±0.42	-0.72±1.12	-0.84±1.54	-36.45±4.85*
β -LG	0.91±0.53*	0.30±0.75*	-0.01±0.32	-0.16±1.35	16.75±3.68*
α -LA	-0.02±0.47	1.34±0.55	-0.03±1.24	-0.02±2.35	20.21±4.23*
<i>b</i> GH	-0.30±0.35	-0.92±1.32	1.16±0.34	-0.25±1.78	30.42±3.64
<i>b</i> PRL	-1.79±0.22	0.39±0.31	-0.12±1.58*	-0.68±2.41*	-35.91±5.56*
PIT-1	2.43±0.27	-1.96±0.87	0.88±1.36	0.26±0.53	32.60±7.15
ODC	-0.46±1.80	0.91±0.52	1.62±0.49	-0.40±0.75	-31.89±3.65
GHR	-1.53±1.05	-1.37±1.35	1.15±0.45	0.41±0.68	-21.56±5.53
GHRH	-1.03±0.74	0.47±1.84	0.45±3.05	0.83±1.25	33.90±4.77
Gene	Dominance effect ^b				
κ -CN	-1.56±1.02	-0.40±0.53	-0.47±0.27	0.19±0.19	-42.33±8.47
β -LG	-1.94±0.76	-0.23±0.43	0.34±0.36	0.20±0.11	-19.66±7.65
α -LA	0.84±0.79	2.25±0.52	0.04±0.23	0.04±0.11	-25.97±6.58
<i>b</i> GH	0.19±0.85	1.39±0.74	-0.16±0.65	-0.16±0.25	-26.68±5.66
<i>b</i> PRL	0.36±0.59	1.03±0.43	-0.74±0.33	-0.74±0.28	-7.83±2.64
PIT-1	-0.13±0.75	-1.30±1.35	-0.23±0.89	-0.23±0.57	-25.37±4.35
ODC	0.01±0.37	0.27±0.45	-0.98±0.34	-0.98±0.25	-23.05±3.69
GHR	-0.20±0.65	-1.16±0.57	-0.16±0.31	-0.16±0.18	-11.90±2.67
GHRH	0.48±0.68	-1.14±0.53	-0.33±0.51	0.81±0.35	26.81±4.78

^a Estimated by subtracting the solution for BB genotype from that for AA genotype(AA-BB). ^b Estimated by subtracting the average of solution for homozygous genotypes from that for AB genotype(AB-(AA+BB)/2). *P<.05.

2. 한우에서 SSCP Marker와 생산형질과의 관련성 분석

가. 서론

Orita 등(1989)은 DNA의 물리적 성질을 이용한 새로운 다형 검출법으로 점 돌연변이(point mutation) 등의 단일 염기변이로 발생한 DNA 단일가닥의 형태 또는 구조변경에 의해 전기영동상의 이동능력 차이로 기인된 유전자 다형성을 검출하는 방법으로 SSCP(single strand conformation polymorphism) 기법을 개발하였다. 특히, PCR 원리를 이용한 SSCP 기법은 증폭산물의 길이에 따라 200bp 이하인 경우 거의 100%에 가까운 염기변이를 검출할 수 있고 200~400bp 단편은 약 80% 까지 변이의 확인이 가능하며 기존의 RFLP와 같이 Mendel의 유전양식을 따르기 때문에 고감도 DNA 다형성 검출법으로 잘 알려져 있다(Hayashi, 1991; Lessa와 Appelbaum, 1993; Blanche 등, 1997; Hennessy 등, 1998). 또한, SSCP marker는 유전자가 단백질로 발현되는 exon 부위에 일어난 변이를 쉽게 확인할 수 있어 인간의 경우 유전병 진단(Neiberger 등, 1993; Labrune 등, 1991)을 위한 돌연변이 검출에 많이 이용되었고 가축에서 경제형질과 관련성 있는 각종 후보유전자들을 대상으로 염기배열상의 변이를 확인하는 수단으로 가치가 인정되어 왔다(Yao 등, 1996; 정 등, 2001). 특히, 소의 경제형질과 관련된 후보유전자로서 유단백질 유전자인 κ -casein(Barroso 등, 1997, 1998)과 β -casein(Barroso 등, 1999); Prinzenberg 등, 1999), 유선발달 및 비유관련 유전자인 성장호르몬(Kirkpatrick, 1992; Yao 등, 1996; Lagziel 등, 1996; Lagziel와 Soller, 1999)과 IGF-1(Kirkpatrick, 1993; Ge 등, 1997) 및 육질과 관련된 유전자인 calpastatin(Chung 등, 1999), mitochondrial DNA의 D-loop 영역의 염기변이 분석(Mannen 등, 2000; 정 등, 2002), 모색발현에 관여하는 MC1R 유전자(정 등, 2000) 등에 대한 SSCP marker가 국내외적으로 확인된 바 있다. Yao 등(1996)과 Lagziel 등(1996)에 의하면 Holstein 종에서 성장호르몬 유전자의 SSCP marker는 한 비유기당 유량, 유지방 및 단백질 함량과 정의 상관관계를 나타내어 산유능력 개량을 위한 가능성을 시사하였다. 따라서, 향후 SSCP marker는 가축의 새로운 DNA 다형분석과 genome 해석에 상당히 기대가 되는 방법이라고 할 수 있다. 한편, 최근에 와서 단일 유전자의 치환(substitution), 삭제(deletion) 및 삽입(insertion) 등에 의한 염기배열상의 변이를 검출할 수 있는

새로운 방법으로 SNP(single nucleotide polymorphism)의 분석과 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. SNP는 microsatellite 좌위보다 훨씬 높은 다형성을 검출할 수 있어 향후 동물개량에 유용한 정보를 제공해 줄 수 있어 우수한 유전인자를 갖고 있는 개체를 조기에 효율적으로 선발 할 수 있는 MAS의 분자유종 기술 개발에 새로운 가능성을 제시해 주었다. Gross 등(1999)은 cytokine 유전자에서 총 31개의 SNP marker를 확인한 이후 leptin 유전자(Fitzsimmons와 Schmutz, 1999)와 κ -casein 유전자(Damiani 등, 2000) 그리고 transferrin 유전자(Brandon 등, 1999)에서 새로운 SNP를 확인하여 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 국내의 경우 각종 제한효소 절단형에 의한 RFLP 다형성이 다수 보고된 바 있으나 현재까지 SSCP 또는 SNP 검출법을 이용한 염기 변이체 분석은 극히 소수에 불과한 실정이며 특히 한우의 성장률, 비유능력 및 육질 등과 관련된 유전자의 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서, 본 연구는 PCR-SSCP 분석기술을 이용하여 한우의 생산형질과 관련된 후보유전자의 SSCP DNA marker를 분석하여 유전자형 출현빈도를 조사하고 염기배열상의 변이를 검출하여 한우의 유전적 다양성을 추정하고 동시에 SSCP marker를 이용하여 한우의 생산형질과 연관된 SSCP marker를 분석하기 위해 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 축산기술연구소 대관령지소에서 순수혈통이 유지관리되어 온 한우 암소집단 가운데 송아지 이유시체중에 대한 육종가(breeding value)를 추정하여 다유성 개체(+4.0 이상) 151두와 저유성 개체(-4.0 이하) 140두의 총 291두를 선발하였다. 선발군의 산유량은 송아지 분만후부터 120일까지의 일일 비유량을 측정하여 총 165두를 이용하였고 체중에 대한 송아지 분만 후 월령별 체중측정 자료는 축산연구소 대관령지소에서 측정한 생시, 3개월령, 6개월령 및 12개월령의 체중자료에 대한 보정기록 자료를 이용하였다.

2) Genomic DNA의 분리 및 정제

각 공시축으로부터 약 5-10ml의 혈액을 EDTA(10~20 IU/ml)가 함유된 tube에 채혈한 후 백혈구 세포로부터 genomic DNA 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 보완 수정하여 추출한 후 수집된 DNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA)에 용해하였고, DNA 농도는 spectrophometer로 260nm의 UV 흡착에 의해 측정하고 O.D 260nm/O.D 280nm의 비율로 DNA 순도를 결정하였다.

3) Primer 설계 및 합성

산유관련 후보유전자로서 유단백질 유전자인 κ -CN, 유선발달 및 비유축진 호르몬 유전자인 bGH, bPRL 및 비유관련 호르몬 수용체 유전자인 IGF-1 그리고 mt DNA의 D-loop 영역에 대한 각 검정 개체별 SSCP marker 분석을 위해 이용한 각 후보유전자의 염기배열 size와 염기변이가 높은 영역을 고려하여 Table 1에 제시한 바와 같이 각 primer를 설계 합성하였다.

4) PCR 기법에 의한 DNA 증폭

SSCP marker 분석을 위한 PCR 증폭반응은 GeneAmp PCR System (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건에서 실시하였다 (Table 1). 즉, κ -CN, bGH, bPRL, IGF-1 및 mt DNA에 대한 PCR 반응조건은 각 후보유전자의 조건에 따라 PCR tube(0.5ml)에 약 50~80ng의 template DNA와 primer 각 10~20 pM, dNTP 200 μ M, 1X PCR reaction buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.5mM MgCl₂, gelatin 0.001%) 및 Taq DNA polymerase 1.0 unit를 첨가하여 최종 부피가 10 μ l가 되도록 조정하였다. PCR 증폭은 처음 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 후보유전자들의 중합반응 온도조건에 따라 annealing(56~68 $^{\circ}$ C) 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 30회 반복 수행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 PCR 반응을 종료하였다.

Table 1. Primer sequences and conditions for the SSCP markers.

SSCP marker	Primer sequence(5' - 3')	Size (bp)	LC ¹⁾	A(°C) ²⁾	Gel (%)	Reference
<i>κ</i> -CN	TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG GGTTTGICTTCTTTGATGICTCCTTAG	453	4992- 5445	65	10	Barroso et al.1998
<i>b</i> GH	GGACAGAGATACTCCATCCAG AGATGCGAAGCAGCTCCAAGT	345	1380- 1724	64	12	Yao et al. 1996
<i>b</i> PRL	AGGTCAGAGAATTAAAGCT GGAAGTGACAGTGGTTTT	160	1208- 1368	56	12	Hart et al. 1993
IGF-1	ATTACAAAGCTGCCTGCCCC CACATCTGCTAATACACCTTACCCG	220	560- 780	60	10	Ge et al. 1997
mt DNA	ACCTACGCAAGGGGTAATGTACA CCGTTTTAGATGAGATGGCCCTG	355	15948- 16303	68	8	Chung et al. 2001

¹⁾ LC: location, ²⁾ annealing.

5) SSCP marker 분석

PCR 증폭이 완료된 후 각 검정 개체별 후보유전자의 증폭산물을 일차적으로 2% agarose gel로 전기영동하여 증폭여부를 확인하였다. 각 후보유전자의 SSCP marker를 검출하기 위하여 PCR 증폭산물 1 μ l에 10 μ l의 formamide dye(98% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol)를 첨가하여 혼합하였다. 먼저, 각 혼합액을 96 $^{\circ}$ C에서 7분간 변성시킨 후 즉시 ice에 7분간 보관하여 reannealing을 방지한 다음, 10% glycerol을 포함하는 8~12% 비변성 polyacrylamide gel(49:1)로 전기영동(10~12V/h)을 실시한 후 silver staining법으로 SSCP의 DNA band를 검출하였다.

6) SSCP marker의 염기서열 분석

산유관련 후보유전자(κ -CN, bGH, bPRL, IGF-1 및 mt DNA)의 SSCP 분석으로 검출된 각 유전자의 돌연변이에 따른 염기서열을 결정하기 위해 PCR 증폭산물을 purification kit로 추출한 다음 dye가 함유된 ABI PrismTM Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하여 제작회사의 protocol에 따라 실시한 후 DNA sequencer(ABI 370)를 이용하여 Capillary 방식으로 염기서열을 분석하였다.

7) 통계분석

가) 육종가 추정치와 SSCP marker간의 연관성 분석

$$Y_{ijklm} = \mu + CN_i + GH_j + PRL_k + IGF_l + Mt_m + e_{ijklm}$$

Y_{ijklm} = 관측치, μ = 전체평균, CN_i = i 번째 κ -CN의 SSCP 유전자형 효과, GH_j = j 번째 bGH의 SSCP 유전자형 효과, PRL_k = k 번째 bPRL의 SSCP 유전자형 효과, IGF_l = l 번째 IGF-1의 SSCP 유전자형 효과, Mt_m = m 번째 mt DNA의 SSCP type의 효과, e_{ijklm} = 임의효과

나) 한우 암소의 생산형질과 SSCP marker간의 연관성 분석

$$Y_{ijklmno} = \mu + YS_i + P_j + CN_k + GH_l + PRL_m + IGF_n + Mt_o + e_{ijklmno}$$

$Y_{ijklmno}$ = 관측치, μ = 전체평균, YS_i = i 번째 년도-분만계절의 효과, P_j = j 번째 산차효과, CN_k = k 번째 κ -CN의 SSCP 유전자형 효과, GH_l = l 번째 bGH 의 SSCP 유전자형 효과, PRL_m = m 번째 $bPRL$ 의 SSCP 유전자형 효과, IGF_n = n 번째 IGF-1의 SSCP 유전자형 효과, Mt_o = o 번째 mt DNA의 SSCP type의 효과, $e_{ijklmno}$ = 임의효과

다. 결과 및 고찰

1) κ -CN, bGH , $bPRL$, IGF-1 좌위 및 mt DNA의 SSCP marker 분석

유증단백질 후보유전자로서 κ -CN 좌위와 유선발달 및 비유호르몬 유전자로서 bGH , $bPRL$ 및 비유관련 호르몬 촉진인자인 IGF-1 좌위 그리고 mt DNA의 D-loop 영역을 대상으로 5종류 유전자의 SSCP marker와 염기변이에 따른 SNP 다형성을 각각 분석하였다.

가) κ -CN 유전자의 SSCP marker 분석

κ -CN 유전자의 SSCP 분석을 위해 exon 4번 영역인 4992-5445번째 염기배열을 갖는 453bp의 단편을 PCR로 증폭한 후 증폭산물을 변성시킨 다음 비변성 12% polyacrylamide gel로 검출한 한우의 SSCP band 양상은 Fig 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 453bp의 증폭산물을 전기영동 했을 때 염기변이로 발생된 DNA 단일가닥의 형태 또는 구조변경에 의한 이동도에 따라 A 및 B 두 개의 대립유전자를 확인하였다. 본 결과는 Barroso 등(1998)이 European 축우품종에서 κ -CN 유전자의 염기서열에 대한 차이를 검출하고자 SSCP 방법으로 분석한 결과 A, B, C 및 E 4종류의 변이체를 확인한 결과와 비교해 볼 때 한우에서는 A와 B 2종류의 변이체만이 확인되었고 나머지 변이체는 검출되지 않아 품종에 따라 차이가 있음을 확인하였다. 한우에서 SSCP fragment의 이동도에 따른 염기서열상의 차이를 확인하기 위

하여 κ -CN 유전자의 염기서열을 분석한 결과 B 대립유전자의 경우 exon 4번 영역인 5309번 염기서열에서 ACC(Thr) \rightarrow ATC(Ile) 및 5345번 염기서열에서 GAT(Asp) \rightarrow GCT(Ala)로 단일염기의 치환이 생겨 A 대립유전자와 구별이 가능한 것으로 해석되었다. 이러한 한우의 단일 염기서열상의 차이에 따른 SSCP 분석의 결과는 PCR-RFLP와 마찬가지로 제한효소의 인지부위에 따라 유전자형 판정이 가능하였으나 새로운 변이는 검출되지 않았다. 또한, 이외에도 κ -CN 유전자의 5406번(A \rightarrow G)과 5413번(A \rightarrow T)의 염기서열에도 단일염기 치환에 의한 염기변이가 밝혀져 있으나 (Alexander 등, 1988) 한우의 염기서열 분석에서는 이 부위에 돌연변이가 존재하지 않는 것으로 확인되어 정 등(1998)이 보고한 결과와 일치하였다. 한편, Prinzenberg 등(1999)은 서로 다른 17종의 European 품종에서 κ -CN 유전자의 SSCP 분석에 의한 대립유전자를 분석한 결과에서 기존에 알려진 A, B, C, E, F 및 G 6종류의 변이체(Kaminski, 1996; Prinzenberg 등, 1999) 이외에 H, I 및 A₁ 3종류의 새로운 다형성을 확인하여 보고한 바 있다.

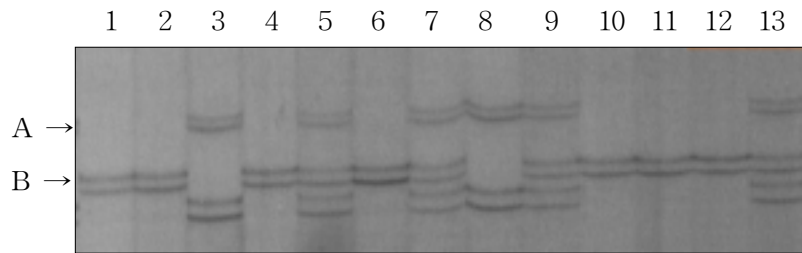


Fig. 1. PCR-SSCP analysis of κ -CN gene in Korean cattle. PCR amplified products(543bp) was denaturated at 96°C for 5 min, cooled in ice for 5 min, loaded on a nondenaturing 10% polyacrylamide gel and detected by silver staining. Genotypes determined by SSCP analysis are as follows; lanes 1, 2, 4, 6, 10, 11 and 12 represent AA genotype, lanes 5, 7, 9 and 13 represent AB genotype, lanes 3 and 8 represent BB genotype.

나) bGH 유전자의 SSCP marker 분석

소 성장호르몬(bGH) 유전자의 SSCP는 관련 유전자의 1380번째에서 1724번째 염기서열 부위를 포함하는 345bp의 증폭산물을 전기영동하여 염기변이에 의한 SSCP marker를 분석하였다(Fig. 2). SSCP 단편은 점 돌연변이에 의한 단일 염기치환에 따라 A, B 및 C 3종류의 대립유전자에 의해 지배되는 AA, BB, CC, AB, AC 및 BC 6종류의 상이한 유전자형이 관찰되었다. 이같은 결과는 Yao 등(1996)이 SSCP 기법으로 A, B 및 C형의 대립유전자를 검출하여 보고한 결과와 일치하였다. 한편, GeneBank(M57764)에 등록된 bGH 유전자의 염기서열을 기초로 하여 한우에서 염기구조 분석을 수행한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 한우에서 bGH 유전자를 SSCP 분석했을 때 DNA 단일가닥의 형태 또는 구조적 변경에 의한 전기영동상의 이동도 차이는 1547번과 1692번 염기서열에 단일 염기치환이 존재함으로써 형성되는 것으로 분석되었다. 즉, bGH 유전자의 염기변이는 1547번과 1692번 염기가 각각 C의 염기서열로 이루어져 있으나 한우에서는 A형이 C¹⁵⁴⁷... T¹⁶⁹² 및 B형은 T¹⁵⁴⁷... T¹⁶⁹² 그리고 C형이 C¹⁵⁴⁷... C¹⁶⁹²로 두 위치의 염기가 각 대립유전자에 따라 치환됨으로써 전기영동상의 이동도에 차이를 나타내게 된다. Yao 등(1996)은 Holstein 젖소에서 SSCP marker와 염기서열을 분석한 결과와 비교해 볼 때 본 연구에서와 마찬가지로 1547번과 1692번의 염기서열이 각각 C → T와 T → C로 치환되었음을 보고하였다. 한편, Lagziel 등(1996)도 Israeli Holstein 젖소에서 bGH 유전자와 유단백질 함량간의 연관성 분석을 위해 SSCP 기법을 이용하여 각 염기서열의 변이에 따른 SSCP 대립유전자를 검출하여 보고한 바 있으나 한우에서 확인된 동일한 부분의 영역(position 1401-1729)에서는 대립유전자가 확인되지 않았다. 그러나 Kirkpatrick(1992, 1994)은 bGH 유전자의 제 4 intron 영역내의 339bp 단편을 SSCP 분석하여 전기영동의 이동도에 따라 A, B 및 C 3종류의 대립유전자로 분류하고 이 영역에 염기서열에 따른 돌연변이가 존재함을 보고하였다.

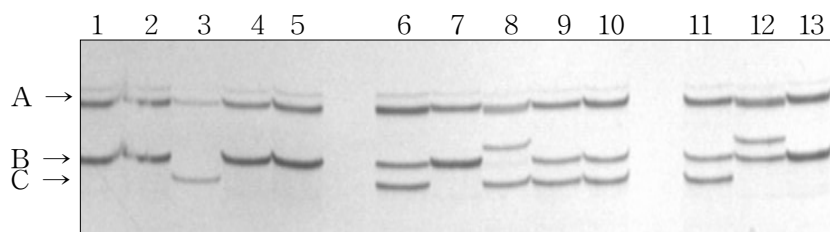


Fig. 2. PCR-SSCP analysis of *bGH* gene in Korean cattle. PCR amplified products(345bp) was denaturated at 96°C for 5 min, cooled in ice for 5 min, loaded on a nondenaturing 12% polyacrylamide gel and detected by silver staining. Genotypes determined by SSCP analysis are as follows; lane 12 represent AB genotype, lane 8 represent AC genotype, lanes 1, 2, 4, 5, 7 and 13 represents BB genotype, lane 3 represent CC genotype, lanes 6, 9, 10 and 11 represents BC genotype.

다) *bPRL* 유전자의 SSCP marker 분석

bPRL 유전자의 SSCP 분석을 위해 5'-flanking 영역(X16641)을 code하는 160bp 크기의 단편을 이용하여 각 검정개체별 SSCP marker를 분석한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 전기영동상의 이동도에 따라 *bGH* 유전자와 마찬가지로 A, B 및 C 3종류의 대립유전자와 AA, AB, AC, BB, BC 및 CC 6종류의 유전자형 판정이 가능하였다. 이 같은 결과는 Hart 등(1993)이 *bPRL* 유전자의 5'-flanking 영역에서 (dT-dG)와 (dA-dC)가 반복배열된 부위를 증폭한 후 *XbaI* 제한효소로 절단한 다음 SSCP로 분석한 결과 A, B, C 및 D 4종류의 대립유전자를 각각 확인하였으나 Holstein 종은 A를 제외한 B, C 및 D 3종류의 대립유전자만이 검출되어 본 연구와 유사한 결과를 얻었다. 또한, Zhang 등(1994)은 *bPRL* 유전자의 exon I에서 intron A 사이를 지정하는 857bp의 증폭산물을 SSCP 분석한 결과에서 2 종류의 대립유전자만이 확인되어 증폭산물의 분자량에 따라 200bp 이하인 경우 약 70~95% 그리고 400bp 이상인 경우는 약 50% 이하로 분리능력이 저하됨으로써 나타나는 차이로 해석된다.

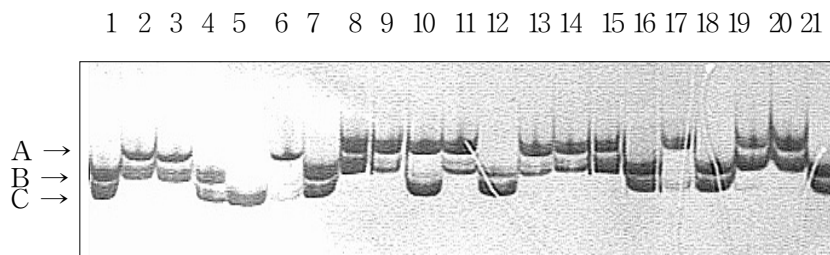


Fig. 3. PCR-SSCP analysis of *bPRL* gene in Korean cattle. PCR amplified products(160bp) was denaturated at 96°C for 5 min, cooled in ice for 5 min, loaded on a nondenaturing 12% polyacrylamide gel and detected by silver staining. Genotypes determined by SSCP analysis are as follows; lanes 2, 3, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 19 and 20 represent AB genotype, lanes 6 and 10 represent AC genotype, lanes 1, 4, 7, 12, 16, 18 and 21 represent BC genotype, and lane 5 represent BB genotype.

라) IGF-1 유전자의 SSCP marker 분석

한우에서 IGF-1 유전자의 SSCP marker 분석을 위해 5'-flanking 영역인 exon 1 부위를 지정하고 있는 560bp에서 780bp 사이의 220bp 단편을 변형시켜 10% polyacrylamide gel 전기영동법으로 분리한 다음 silver 염색법으로 IGF-1 유전자의 대립유전자들을 검출하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 IGF-1 유전자의 전기영동상의 이동도에 따라 A와 B 2종류의 대립유전자가 검출되었고 이들에 의해 지배되는 AA, AB 및 BB 3종류의 유전자형 판정이 각각 가능하였다. 이와 관련하여 Ge 등(1997)이 육우품종인 Angus 종에서 IGF-1 유전자를 SSCP 분석한 결과 A 및 B 두 개의 대립유전자가 확인되어 한우의 IGF-1 유전자와 일치되는 결과를 얻었다. Kirkpatrick(1993, 1994)은 또한 *Bos indicus* 계통의 reference family에서도 A와 B 2개의 대립유전자를 검출하여 보고한 바 있다. 한편, 한우에서 IGF-1 유전자의 SSCP 분석에 의한 염기서열상의 돌연변이를 확인하기 위해 GenBank(AF017143)에 등록된 IGF-1의 염기서열 정보를 이용하여 비교 분석한 결과 exon 1에서 198번째 염기서열 부위가 ACG로 이루어져 있으나 A형은 ACG(Val) → ATG(Leu)로 염기치환되어 A와 B 대립유전자의 구별이 가능한 것으로 해석되었다.

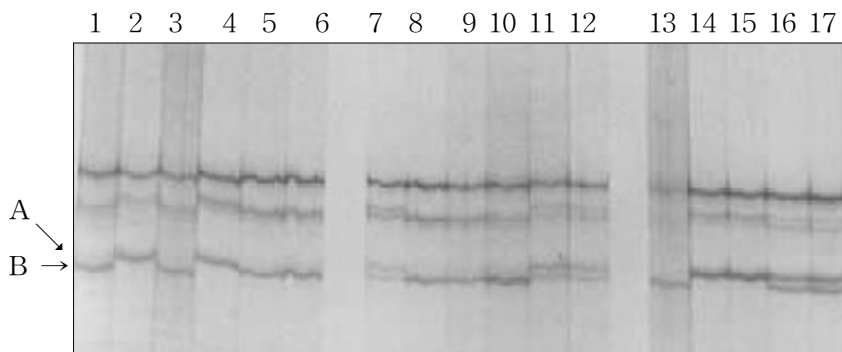


Fig. 4. PCR-SSCP analysis of IGF-1 gene in Korean cattle. PCR amplified products(220bp) was denaturated at 96°C for 5 min, cooled in ice for 5 min, loaded on a nondenaturing 10% polyacrylamide gel and detected by silver staining. Genotypes determined by SSCP analysis are as follows: lanes 2, 4, 14 and 15 represent AA genotypes, lanes 7, 11, 12, 16 and 17 represent AB genotypes, and lanes 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10 and 13 represent BB genotypes.

2) κ -CN, bGH, bPRL 및 IGF-1 유전자의 유전자형 및 대립유전자 빈도 분석

SSCP 분석기법을 이용하여 총 291두의 다유성 및 저유성 한우 선발집단에서 κ -CN, bGH, bPRL 및 IGF-1 좌위의 유전자형 및 유전자 출현빈도를 각각 분석 비교하였다(Table 2와 3). κ -CN 좌위에 있어 다유성 선발군의 AA형이 47.68%로 저유성(37.86%)에 비하여 약 10% 정도 높은 경향을 나타냈으나 이와 반대로 AB형은 다유성 및 저유성 선발군이 각각 41.72%와 54.28%로 약 12% 정도 낮은 빈도를 보였다(Table 2). 다유성과 저유성 선발계통에 있어서 A와 B 대립유전자 출현빈도는 각각 0.685와 0.315 및 0.650과 0.350으로 각각 나타나 A유전자가 과반수 이상의 높은 출현율을 나타내었다(Table 3). 한편, Prinzenberg 등(1999)이 German Angus, Holstein 및 Simmental 중에서 κ -CN 좌위의 A와 B 2종류의 대립유전자 빈도만을 보았을 때 0.65와 0.31, 0.64와 0.19 및 0.61과 0.35으로 각각 보고한 바 있으며 이와 같은 성적은 한우의 유전자 빈도와 비교할 때 품종에 따라 차이는 있으나 대체로 비슷한 경향을 보였다.

bGH 좌위의 SSCP 유전자형의 출현빈도에서 다유성 및 저유성 두 선발집단을 서로 비교하였을 때 다유성의 AB형(29.14%) 출현빈도가 저유성(18.57%)에 비해 약 11.0% 정도 높은 수준을 보였고 BB형은 저유성(35.00%)이 다유성(24.50%)에 비해 약 12.0% 높은 수준을 나타내어 두 선발집단간의 SSCP 유전자형 출현분포에 차이가 인정되었다(Table 2). 또한, 대립유전자 빈도에서 다유성으로 선발된 개체들은 저유성 선발집단에 비해 A형의 빈도가 약 6.0% 정도 높은 반면에 B형은 약 7.0% 낮아 두 선발집단간에 통계적 유의성($P < .05$)이 인정되었다. Kirkpatrick(1992)은 소 성장호르몬 유전자의 SSCP 분석에서 A, B 및 C 대립유전자 출현빈도를 0.19, 0.76 및 0.05로 각각 보고하여 한우와 차이가 있음을 시사하였다.

bPRL 유전자에 있어 한우의 유전자형 출현빈도는 다유성 선발군의 BB형이 저유성 선발군에 비해 약 12.0% 높은 경향을 나타내었고 유전자 빈도에서도 역시 B형이 약 8.0% 정도 높은 출현율을 보여 두 선발집단간의 유전자형 및 유전자 출현분포에 차이가 있었다. bPRL 유전자의 SSCP 분석에 관하여 Hart 등(1993)은 Holstein 중에서 B, C 및 D의 유전자 출현율을 각각 0.25, 0.69 및 0.06으로 보고하였고, Zang 등(1994)은 Hereford 중에서 A와 B의 빈도를 0.66 및 0.33으로 각각 추정하여 보고하였다.

다유 및 저유성 한우 선발군간의 IGF-1 유전자형 출현빈도에서 다유계통 선발

군은 AB형이 저유계통 선발군 보다 13.1% 높은 출현빈도를 보였고 반대로 BB 형은 저유성 선발군에 비하여 8.0% 낮은 값을 나타내었고, A와 B 유전자 빈도에 서 다유성 및 저유성 선발군이 각각 0.719와 0.281 및 0.707와 0.293으로 두 선발 집단간에 통계적 유의성($<.01$)이 인정되었다. 그리고 두집단에서 IGF-1의 평균 유전자 빈도는 0.713(A) 및 0.287(B)으로 Kirkpatrick(1993)이 A와 B 유전자 출현 빈도를 각각 0.52와 0.48 그리고 Ge 등(1997)과 Ge 등(2001)이 0.882와 0.263 및 0.639와 0.361로 각각 보고한 성적과 비교할 때 한우와 유전자 빈도에 높은 차이가 있었다.

Table 2. Genotype frequencies of SSCP marker of *bGH*, *bPRL* and *IGF-1* genes between two groups selected for high and low milk groups in Korean cattle.

Gene	Genotype	HG	LG	Overall
<i>κ</i> -CN	AA	72 ^a (47.68*)	53 ^a (37.86*)	125 ^a (42.96*)
	AB	63(41.72)	76(54.28)	139(47.77)
	BB	16(10.60)	11(7.86)	27(9.27)
<i>bGH</i>	AA	20(13.25)	17(12.14)	37(12.71)
	AB	44(29.14)	26(18.57)	70(24.06)
	AC	19(12.58)	23(16.43)	42(14.43)
	BB	37(24.50)	49(35.00)	86(29.55)
	BC	18(11.92)	20(14.29)	38(13.06)
	CC	13(8.61)	5(3.57)	18(6.19)
<i>bPRL</i>	AA	9(5.96)	11(7.86)	20(6.87)
	AB	58(38.41)	64(45.71)	122(41.92)
	AC	16(10.59)	12(8.57)	28(9.62)
	BB	41(27.15)	21(15.00)	62(21.31)
	BC	20(13.25)	20(14.29)	40(13.75)
	CC	7(4.64)	12(8.57)	19(6.53)
<i>IGF-1</i>	AA	84(55.63)	85(60.71)	169(58.08)
	AB	49(32.45)	28(20.00)	77(26.46)
	BB	18(11.92)	27(19.29)	47(15.46)

^a Number of cows, * Numbers in parentheses represent percentage, HG; high milk group, LG; low milk group.

Table 3. Comparisons of allele frequencies for overall and between high and low milk groups in Korean cattle.

Gene	Allele	Overall	HG±SE	LG±SE	df	χ^2
κ -CN	A	0.668	0.685±0.027	0.650±0.028	1	0.508
	B	0.332	0.315±0.027	0.350±0.028		
<i>b</i> GH	A	0.320	0.341±0.015	0.296±0.014	2	3.999*
	B	0.481	0.450±0.015	0.514±0.014		
	C	0.199	0.209±0.015	0.190±0.014		
<i>b</i> PRL	A	0.326	0.305±0.013	0.350±0.015	2	4.466*
	B	0.491	0.530±0.013	0.450±0.015		
	C	0.183	0.165±0.013	0.200±0.015		
IGF-1	A	0.713	0.719±0.037	0.707±0.038	1	9.134**
	B	0.287	0.281±0.037	0.293±0.038		

HG; high milk group, LG; low milk group, SE; standard error, * P<.05, ** P<.01.

3) Mt DNA의 SSCP marker 분석

한우의 세포질내 유전정보원으로서 mt DNA의 염기서열 변이성을 분석하기 위하여 mt DNA의 D-loop 영역내 15948번에서 16303번째 염기서열 부위의 344bp 증폭산물을 변성시켜 단일가닥으로 분리한 후 8% polyacrylamide gel 전기영동법으로 검출된 각 검정 개체별 SSCP type을 관찰하였다(Fig. 4). 한우의 mt DNA내 D-loop 영역의 염기치환에 따라 A에서 K까지 총 11종류의 SSCP type이 관찰되었고, 한우의 다유성 및 저유성 선발집단에서 각 SSCP type에 대한 출현빈도를 추정된 결과를 Table 4에 제시하였다. 다유성 선발군은 D형의 출현율이 28.5%로 저유성 선발군의 18.6%에 비해 약 10% 높았으나 이와 반대로 E형은 각각 25.0%와 11.3%로 약 14% 낮은 출현율을 보였다. 그리고 다유성 및 저유성 선발군에서 C형과 G형이 다른 type들에 비하여 각각 13.2%와 10.7% 및 18.5%와 20.7%로 비교적 출현율이 높은 경향을 보였으나 전체적으로 유사한 출현결과를 얻었다. 또한, 전체 한우집단을 대상으로 D-loop 영역내 각 type간의 출현빈도는 D형이 23.6%로 가장 높은 출현율을 보였고 다음으로 G형과 E형 및 C형이 각각 19.6%와 18.2% 및 12.0%의 출현율을 나타냈으며 그 밖의 type들은 1.4~6.2% 수준으로 출현율이 비교적 낮았다.

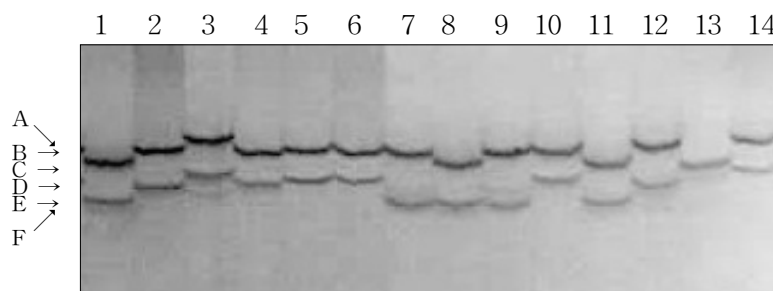


Fig. 7. PCR-SSCP analysis of mt DNA D-loop region in Korean cows. PCR amplified products(355bp) was denaturated at 96°C for 5 min, cooled in ice for 5 min, loaded on a nondenaturing 8% polyacrylamide gel and detected by silver staining.

Table 4. PCR-SSCP types and frequencies of mt DNA D-loop region for high and low milk groups in Korean cattle.

Type	High milk group	Low milk group	Overall
A	0.053*	0.043*	0.048*
B	0.073	0.050	0.062
C	0.132	0.107	0.120
D	0.285	0.186	0.236
E	0.113	0.250	0.182
F	0.053	0.043	0.048
G	0.185	0.207	0.196
H	0.040	0.029	0.035
I	0.013	0.014	0.014
J	0.026	0.014	0.020
K	0.027	0.057	0.042

* Numbers in parentheses represent percentage.

4) 한우에서 PCR-SSCP marker와 생산형질간의 관련성 분석

가) 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 SSCP marker간의 관련성 분석

송아지 이유시 체중에 대한 육종가를 기준으로 선발된 기초 계통축군을 대상으로 총 5종류의 후보유전자에서 검출된 각 SSCP marker가 한우 암소의 생산형질에 영향을 미치는 효과를 분산분석한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 SSCP 유전자형과 각 선발개체들의 육종가 추정치에 있어 다유성 선발군의 κ -CN 좌위는 고도의 유의성($P < .01$)이 인정되었고 *bGH* 좌위에서도 유의적($P < .05$)인 차이를 보였다. 저유성 선발군은 κ -CN, *bGH* 및 *bPRL* 3종류의 좌위에서 통계적 유의차($P < .05$)가 인정되었다. 그러나 전체 선발군의 경우에는 κ -CN 좌위 및 *IGF-1* 좌위에서 유의적($P < .05$)인 영향을 미치는 것으로 분석되어 각 선발군의 육종가와 유전자형에 따라 많은 영향이 있었다. Table 6은 다유성 및 저유성 선발군의 SSCP 유전자형별 육종가에 대한 최소자승평균치와 표준오차값을 나타낸 것으로 κ -CN 좌위의 BB homo형은 다유성 및 저유성 선발군에서 15.33 ± 1.41 과 -15.92 ± 1.74 로 각각 나타나 AA 또는 AB형에 비해 각각 3.44와 5.27 그리고 -4.87과 -4.21의 값이 높거나 낮아 두 선발계통간에 BB 유전자형이 각 선발개체들의 육종가에 유의적인 영향을 미치고 있음이 인정되었다. 또한, *bGH* 좌위는 A, B, C 3종류의 대립유전자에 의해 지배되는 총 6종류의 유전자형 가운데 다유성 선발군은 AA형과 AB형이 각각 11.23 ± 1.27 과 11.85 ± 0.90 로 가장 높았고 CC형은 8.32 ± 1.62 로 가장 낮게 추정된 반면 저유성 선발군은 CC형이 -17.38 ± 2.48 로 다른 5종류의 유전자형에 비해 상대적으로 매우 낮은 경향을 보여 이들 선발군내에서 추정된 육종가는 *bGH* 유전자의 유전자형에 따라 상이한 차이가 있음이 인정되었다. 그러나, *bPRL* 좌위는 저유성의 경우 BB형이 -14.11 ± 1.12 로 가장 낮게 분석되어 통계적 유의성이 인정되었으나 다유성 선발군은 *bPRL* 좌위의 육종가간에 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 한편, 전체 축군을 분석한 결과로써 κ -CN 좌위의 BB형은 4.19 ± 2.47 로 AB형의 -1.12 ± 1.16 에 비하여 3.07이 높았고 그리고 *IGF-1* 좌위의 AB형은 3.33 ± 1.38 로 BB형의 -1.24 ± 1.72 보다 2.09 높은 육종가를 나타내어 이들 두 좌위에 있어서 유의적인 차이가 있었다. 한편, 한우의 세포질내 유전정보원으로서 mt DNA의 SSCP 분석으로 검출된 A에서 K까지 총 11종류의 type을 이용하여 육종가를 통계 분석한 결과에서 다유

성 선발군의 J형이 14.01 ± 2.86 , 저유성 선발군의 E형이 -11.51 ± 1.06 그리고 전체 축군의 J형이 6.14 ± 4.81 로 나타나 각 type 간에 어느 정도의 분석치에 의한 차이는 있었으나 선발집단에 따른 유의성은 인정되지 않았다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 특히 흥미로운 분석 결과로서 κ -CN 좌위와 bPRL 좌위의 BB형이 선발계통에 따라 상대적으로 가장 높거나 낮은 육종가를 보였고 SSCP 유전자형 간에 유의적인 영향을 받는 것으로 나타나 향후 이들 두 좌위의 BB 유전자형을 가지고 있는 개체를 일차적 선발대상으로 고려하는 것이 한우 생산형질 증가에 효과가 있을 것으로 기대된다.

Table 5. Mean squares and significance for breeding value of high and low milk groups in Korean cattle.

Source	df	HG		df	LG		df	Overall	
		MS	F		MS	F		MS	F
κ -CN	2	184.764	5.67**	2	84.799	3.47*	2	474.144	3.10*
bGH	5	76.309	3.29*	5	74.832	3.76*	5	184.388	1.18
bPRL	5	32.496	1.00	5	79.247	3.32*	5	188.234	1.21
IGF-1	2	6.695	0.21	2	3.533	0.11	2	502.664	3.22*
Mt DNA	10	18.638	0.57	10	41.057	1.32	10	261.777	1.68
Error	126	32.604		114	31.216		114	155.903	

HG = high milk group, LG = low milk group.

* P<.05, ** P<.01

Table 6. Least square means and standard errors for breeding value(BV) of SSCP markers in Korean cattle.

Gene	Type	Breeding value(BV)		
		HG	LG	Overall
κ -CN	AA	11.89±0.69 ^b	-11.05±0.73 ^a	1.23±1.13 ^b
	AB	10.06±0.73 ^b	-11.71±0.73 ^a	-1.12±1.16 ^b
	BB	15.33±1.41 ^a	-15.92±1.74 ^b	4.19±2.47 ^a
<i>b</i> GH	AA	11.23±1.27 ^a	-10.02±1.34 ^a	1.69±2.10
	AB	11.85±0.90 ^a	-10.82±1.10 ^a	3.13±1.58
	AC	13.60±1.34 ^{ab}	-12.25±1.15 ^a	-0.91±1.99
	BB	10.97±0.94 ^{ab}	-10.59±0.83 ^a	-1.01±1.41
	BC	12.47±1.40 ^{ab}	-12.84±1.25 ^a	-0.87±2.10
	CC	8.32±1.62 ^b	-17.38±2.48 ^b	1.12±3.04
<i>b</i> PRL	AA	12.30±2.87	-9.87±1.46 ^a	2.57±2.98
	AB	10.25±0.74	-10.47±0.64 ^a	1.06±1.17
	AC	13.07±1.26	-8.89±1.45 ^a	0.84±2.51
	BB	11.74±0.96	-14.11±1.12 ^b	2.10±1.60
	BC	10.11±1.30	-11.06±1.21 ^a	-1.54±2.08
	CC	14.13±2.20	-12.71±1.43 ^a	2.01±3.00
IGF-1	AA	11.03±0.63	-10.56±0.55	0.15±0.93 ^b
	AB	9.90±0.82	-9.45±0.99	3.33±1.38 ^a
	BB	10.29±1.28	-9.58±0.96	-1.24±1.72 ^b
Mt DNA	A	10.80±2.02	-9.03±2.04	2.20±3.16
	B	10.23±1.66	-10.71±1.94	2.19±2.71
	C	10.58±1.28	-10.69±0.94	-2.34±1.68
	D	10.51±0.88	-8.61±0.98	3.27±1.42
	E	11.14±1.41	-11.51±1.06	-1.90±1.89
	F	11.77±2.04	-9.09±2.04	3.02±3.15
	G	9.31±1.10	-10.21±1.03	0.19±1.65
	H	8.93±2.37	-13.51±2.54	-0.16±3.78
	I	12.50±4.11	-13.64±3.58	-0.47±5.88
	J	14.01±2.86	-10.50±3.57	6.14±4.81
	K	12.73±2.88	-10.28±1.78	-2.52±3.41

1) HG; high milk group, LG; low milk group.

2) ^{a, b} Superscripts with different letters in the same column significantly differ(P < .05)

나) 한우 암소의 산유량과 SSCP marker간의 관련성 분석

육우에서 산유량은 경제적으로 중요한 이유시 체중 및 이유 후 증체량에 미치는 영향이 크기 때문에 육우의 산유량은 암소선발의 지표가 되는 중요한 경제형질로 알려져 있다(Charles 등, 1980; Diaz 등, 1992). 산유형질과 연관된 후보유전자로서 총 5종류의 유전자를 이용하여 SSCP marker를 분석하고 검출된 각 유전자형과 산유량과의 관련성을 분석하였다. 후보유전자의 SSCP marker 분석에 있어 κ -CN 유전자는 120일 동안 총산유량에 유의적인 영향을 미쳤고 bPRL 유전자는 60일과 120일 및 IGF-1 유전자는 30일 그리고 mt DNA는 30일과 총산유량에서 한우 암소의 산유량에 유의적인 영향을 주고 있음이 확인되었다(Table 7). 이러한 결과를 근거로 한우 암소의 30일, 60일, 90일, 120일 및 총 산유량에 영향을 미치는 각 후보유전자의 SSCP marker의 효과에 대한 최소자승평균값(LSM)과 표준오차(SE)의 값을 분석하였다(Table 8). 먼저 κ -CN 좌위에 있어 120일 동안의 총 산유량은 BB형이 $534.92 \pm 41.99\text{kg}$ 으로 AA 또는 AB형의 $359.09 \pm 21.41\text{kg}$ 과 $341.11 \pm 23.09\text{kg}$ 에 비하여 각각 175.83kg 과 193.81kg 이 더 생산되는 것으로 분석되어 유의성($P < .05$)이 인정되었으며, bPRL 좌위는 60일과 120일 동안의 유량에 있어 BB형이 $4.43 \pm 0.20\text{kg}$ 과 AC형이 $3.86 \pm 0.29\text{kg}$ 으로 각각 가장 많았으며 CC형은 각각 $3.80 \pm 0.48\text{kg}$ 과 $2.66 \pm 0.51\text{kg}$ 으로 가장 낮아 이들 유량과 유전자형의 효과에 유의성($P < .05$)이 존재하였다. Denny(1992)는 Holstein 젖소를 대상으로 κ -CN 좌위를 분석하고 유전자형과 산유량과의 관련성을 분석한 결과 B 대립유전자를 갖고 있는 개체는 A 대립유전자를 받은 개체보다 유량이 185kg 정도 더 높게 나타나 본 연구의 120일 동안의 총산유량에서 BB형이 AB형보다 193.81kg 차이를 보인 결과와 비교해 볼 때 매우 유사한 경향을 보였다. 또한, IGF-1 좌위의 경우 30일 동안의 유량분석에서 AA형을 가지고 있는 개체가 $4.88 \pm 0.15\text{kg}$ 으로 AB형과 BB형 보다 각각 약 2.8kg 정도 높게 생산되어 유의적인 차이가 있음이 확인된 반면 bGH 유전자와 산유량간의 관련성은 인정되지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 Ge 등(1997)은 Angus 종에서 비유에 영향을 주는 요인으로 혈청 IGF-1 농도에 따라 high 및 low group으로 분류하고 이들과의 관련성을 분석한 결과 BB 유전자형은 AA형을 가진 개체에 비해 이유후 초기 20일 동안 증체율이 높았음을 보고한 연구와 일치된 경향이었다. 그러나, Yao 등(1996)과 Lagziel 등(1996)은 Holstein 젖소에서 bGH 유전자의 SSCP marker

를 검출하고 산유형질과의 연관성을 분석한 보고에서 염기배열 변이에 따라 각각 유량 및 유단백질 함량간에 유의적인 영향이 있음을 보고한 결과와 차이가 있었다. 한편, mt DNA의 SSCP marker와 유량과의 상관관계 분석에서 30일과 총 산유량에 유의차가 인정되었다. 30일에 대한 유량 분석치는 B형이 $4.57 \pm 0.39 \text{kg}$ 으로 I형의 $2.76 \pm 0.82 \text{kg}$ 에 비해 1.81kg이 낮았고 총산유량에 있어서는 K형이 $521.11 \pm 60.43 \text{kg}$ 으로 가장 높았고 다음으로 B형이 $512.40 \pm 48.81 \text{kg}$ 의 순으로 유량이 높게 추정되었다. 이와 관련하여 mt DNA D-loop 영역의 염기배열 변이가 산유량 및 유조성분 등 경제형질과 관련되어 있고(Ron 등, 1993; Schutz 등, 1994; Boettcher 등, 1996) 도체형질에도 유의적인 영향을 미친다고 보고된 바 있어(Mannen 등, 1997) 한우에서 경제형질과 관련된 유전자로서 그 활용이 기대된다.

따라서, 이러한 결과를 종합해 볼 때 산유량과 관련된 우수한 유전자를 가진 개체를 선발하기 위해서는 κ -CN 좌위의 BB형, bPRL 좌위의 AC 또는 BB형, IGF-1 좌위의 AA형 그리고 mt DNA의 B형을 산유량 증가를 위한 유전적 표지인자로 활용하는 것이 바람직하다고 판단된다. 그러나 분석에 이용된 한우 암소의 산유량 자료가 선발 기초축에 의존되어 있고 비유기간 동안 여러 가지 환경요인들에 대한 효과가 배제되어 있어 실제 SSCP marker와 산유량간의 통계분석에 오차를 줄이기 위해서는 무엇보다 정확한 자료의 이용과 적합한 통계모형을 설정하여 분석할 필요가 있다.

Table 7. Mean squares and significance of milk yield and total milk yield for PCR-SSCP markers according to milking periods in Korean cattle.

Source	df	30 day		60 day		90 day		120 day		Total milk yield	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
YS	36	3.279	0.85	4.308	1.01	4.510	0.98	6.182	2.01***	74245.72	1.81**
P	3	8.516	2.70*	0.102	0.02	10.061	2.58*	12.166	3.95**	141034.881	3.43**
κ-CN	2	1.556	0.41	0.914	0.22	2.324	0.51	1.637	0.45	97,896.651	3.16*
bGH	5	1.728	0.45	1.629	0.38	1.311	0.29	1.152	0.32	26,130.786	0.56
bPRL	5	2.928	0.76	7.949	2.41*	1.979	0.43	8.394	2.94*	42,791.438	0.91
IGF-1	2	14.598	3.18*	5.339	1.26	7.782	1.70	3.111	0.86	92,848.166	1.98
Mt DNA	10	15.823	3.47*	1.473	0.35	1.665	0.36	2.422	0.67	94,047.429	2.02*
Error	102	3.154		3.566		3.897		3.018		41,120.670	

YS=Year and season of calving, P=parity of cow, * P<.05, ** P<.01, *** P<.001.

Table 8. Least square means and standard errors of milk yields and total milk yields for SSCP markers according to milking periods in Korean cattle.

Gene	Type	Milk yield(kg)				
		30 day	60 day	90 day	120 day	Total
κ-CN	AA	3.12±0.17	4.11±0.16	3.51±0.18	3.20±0.18	359.09±21.41 ^b
	AB	2.84±0.19	4.33±0.18	3.11±0.20	2.33±0.22	341.11±23.09 ^b
	BB	3.85±0.35	3.97±0.33	4.97±0.37	3.77±0.35	534.92±41.99 ^a
βGH	AA	3.75±0.30	3.97±0.32	3.84±0.35	3.75±0.35	448.96±39.66
	AB	4.07±0.20	4.12±0.21	3.67±0.23	3.15±0.22	398.19±25.67
	AC	4.11±0.26	4.46±0.30	3.73±0.33	3.29±0.32	424.97±36.68
	BB	3.93±0.21	4.37±0.23	3.87±0.25	3.39±0.24	410.07±28.42
	BC	3.93±0.35	3.94±0.31	3.77±0.34	2.97±0.34	442.77±38.55
	CC	3.84±0.37	3.68±0.35	3.04±0.38	3.21±0.38	350.84±43.08
βPRL	AA	3.87±0.43	3.49±0.45 ^{ab}	3.19±0.50	2.25±0.48 ^{ab}	324.26±55.78
	AB	3.51±0.21	3.86±0.19 ^{ab}	3.39±0.22	2.78±0.21 ^{ab}	391.12±24.15
	AC	4.28±0.25	4.29±0.27 ^{ab}	3.89±0.30	3.86±0.29 ^a	454.83±34.01
	BB	4.29±0.18	4.43±0.20 ^a	3.78±0.23	3.20±0.22 ^{ab}	427.60±25.40
	BC	3.93±0.21	4.28±0.28 ^{ab}	3.98±0.31	3.02±0.30 ^{ab}	362.89±35.12
	CC	4.24±0.53	3.80±0.48 ^b	3.33±0.53	2.66±0.51 ^b	413.46±59.65
IGF-1	AA	4.88±0.15 ^a	4.06±0.17	3.68±0.18	3.05±0.18	405.71±20.39
	AB	2.03±0.21 ^b	4.21±0.22	3.78±0.24	3.29±0.23	423.02±26.55
	BB	2.05±0.23 ^b	4.19±0.25	3.48±0.27	2.94±0.27	380.44±30.50
Mt DNA	A	3.94±0.44 ^{abc}	3.78±0.46	3.10±0.51	3.15±0.49	310.14±56.10 ^b
	B	4.57±0.39 ^a	4.73±0.39	4.13±0.44	3.54±0.43	512.40±48.81 ^a
	C	4.26±0.24 ^{ab}	4.46±0.25	3.90±0.27	3.17±0.26	414.64±30.35 ^{ab}
	D	3.77±0.21 ^{abc}	3.97±0.22	3.37±0.24	2.79±0.24	370.68±27.08 ^{ab}
	E	4.18±0.28 ^{ab}	4.19±0.29	3.70±0.32	2.87±0.31	411.76±35.69 ^{ab}
	F	3.15±0.44 ^{abc}	3.46±0.45	3.32±0.50	2.83±0.48	361.81±55.33 ^{ab}
	G	4.03±0.24 ^{ab}	4.21±0.25	3.79±0.28	3.46±0.27	439.50±30.94 ^{ab}
	H	4.10±0.52 ^{ab}	4.15±0.54	3.95±0.59	3.86±0.57	441.18±65.46 ^{ab}
	I	2.76±0.82 ^c	3.52±0.85	3.34±0.94	2.38±0.91	378.82±93.69 ^{ab}
	J	2.77±0.67 ^{bc}	3.58±0.69	2.97±0.76	2.53±0.74	292.71±84.44 ^b
K	4.16±0.48 ^{ab}	4.26±0.49	4.37±0.55	3.79±0.53	521.11±60.43 ^a	

^a and ^b Superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$)

3. 한우에서 VNTR marker와 산유질간의 관련성 분석

가. 서론

동물의 유전자 지도작성(genome mapping)의 목적은 경제형질의 발현에 관여하는 유전자들에 대한 염색체상의 위치, 순서 및 염기배열을 분석하여 genome의 기능을 파악하고 이들 유전자를 선발표지인자로 이용하여 경제적 이윤 및 산업적으로 활용하는데 있다(Elo 등, 1999; Grosz와 MacNeil, 2001). 특히 DNA 다형 해석정보를 이용한 유전자 지도작성은 동물의 경제형질에 관여하는 유전자와 인접한 염색체 영역에서 QTL과 밀접하게 연관된 표지인자(linked marker) 또는 기능체 유전자(functional genes)를 확인하여 이를 간접적인 DNA 표지인자로 이용할 수 있어 동물 육종개량 연구에 획기적으로 기여할 수 있는 효율적인 도구로서의 이용이 가능하여 졌다(Smith와 Smith, 1993; Dekkers와 Chakraborty, 2001). 지금까지 분자 유전학적 의미에서 동물 육종개량을 향상시키고자 경제형질과 밀접하게 연관된 염색체를 찾아 이를 선발지표로 이용하는 전체 genome 검색법(whole genome-scan approach; WGA)과 생물학적 또는 생리적 기능이 잘 알려져 있는 변이를 직접 검출하는 후보유전자 접근법(candidate gene approach; CGA)을 주로 이용하여 유전적 표지인자를 검출하고 BLUP와 같은 통계적 모형을 적용해 추정된 육종가를 유전적 모수로 하여 QTL을 분석함으로써 유전적 개량속도를 가속화시킬 수 있는 방안으로 제시되었다(Israel와 Weller, 1998; Elo 등, 1999; Schrooten 등, 2000).

VNTR(variable number of tandem repeats) 좌위는 각 염색체상의 중심체와 말단부위에 주로 산재하고 있으며 개체마다 반복수가 50~200bp 길이의 핵심서열(core sequence)로 이루어져 있어 고도의 DNA 다형성을 나타낸다는 사실이 Jefferys 등(1985)에 의해 인간의 genome에서 처음으로 발견된 이후 이들 반복배열의 유전적 특성에 따라 minisatellite와 microsatellite 두종류의 좌위로 분류하여 각종 동식물의 유전자 분석에 강력한 수단으로 널리 이용되어져 왔다. Minisatellite는 특정 유전자 영역내에 존재하는 일정 배열의 짧은 DNA가 10~60bp 길이로 반복된 염기배열 형태로서 microsatellite와 유사하나 반복배열의 수가 1~6bp 크기를 갖는다는 점에서 차이가 있다. 영국의 Jefferys 등(1995)과 Nakamura 등(1987)이 각종 minisatellite probe를 이용하여 반복배열수의 차이에

따른 단일좌위(single locus)와 복수좌위(multilocus) 다형성을 검출할 수 있는 분석기술을 개발함으로써 인간의 경우 부자확인 및 법의학 감정(Jefferys 등, 1985; Gill 등, 1985) 등에 활용되고 있다. 동물에서는 가계분석, 친자판정, 개체식별 및 각종 경제형질과 관련된 표지유전자의 식별에 매우 효과적인 방법으로 알려져 있으나(Georges 등, 1990; Trommelen 등, 1993; Hillel 등, 1993; Haberfeld 등, 1993; Sreekumar 등, 2001) PCR 기술의 개발로 genome의 특정 영역에 반복배열되어 있는 minisatellite 및 microsatellite 좌위를 직접 증폭하여 검출할 수 있는 새로운 가능성이 제시되었다(Horn 등, 1989; Litt와 Luty, 1989; Weber와 May, 1989; 정 등, 1997; 정 등, 2001).

지금까지 보고에 의하면 포유동물의 genome에는 약 20~30% 정도가 반복적인 DNA 염기배열로 구성되어져 있으며(Stallings 등, 1991), 가축의 경우 소는 약 15,000개(Steffen 등, 1993), 돼지는 65,000~100,000개(Wintero 등, 1992) 및 닭은 약 7,500개(Weintero 등, 1992) 내외가 존재하는 것으로 알려져 있으며 소의 경우 약 1,500여개의 microsatellite marker가 밝혀져 있다(Gellin 등, 2000). 이미 세계 각국의 연구자들은 1993년부터 ISAG(International Society for Animal Genetics)의 소분과 위원회 주관으로 microsatellite marker 분석을 통한 국제동정 비교시험을 위해 microsatellite 좌위를 선정하여 좌위별 대립유전자의 동정 및 국가간 유전정보의 교류 등의 목적으로 국제 표준화를 제시한 이후 1996년 5월 네덜란드 Utrecht에서 개최된 ECAA(European Concerted Action AIRE2066) 회의에서 23개의 microsatellite 좌위를 선정하여 제안하였다. 그 이후 1996년 프랑스 Tours에서 열린 ISAG 회의에서 7개의 marker를 추가로 선정하여 총 30개의 표준 microsatellite 좌위가 승인됨으로써 소의 유전적 다양성 분석에 널리 이용되고 있다.

따라서, minisatellite 및 microsatellite와 같은 VNTR 좌위는 동일종의 혈연관계가 가까운 가계나 계통간에도 높은 이형접합성(heterozygosity)을 보이므로 가계 내 연관분석에 매우 효과적으로 이용할 수 있으며(Barendse 등, 1994; Bishop 등, 1994; Georges 등, 1995; Ma 등, 1996) 동시에 가축의 친자감별 및 개체식별을 위한 새로운 DNA marker로서 그 실효성과 효율성이 높히 평가되고 있다(Mommens 등, 1995; Glowatzki-Mullis 등, 1995; Heyen 등, 1997). 지금까지 확인된 가축에서 수천 종류의 microsatellite marker를 이용하여 전체 genome 검색법을 통한 QTL 분석이 많이 이루어져 왔으나 소에서 작성된 QTL은 많지 않은

실정이며 특히 비유 및 발육형질과 연관된 QTL은 소수에 불과한 실정이다. Georges 등(1995)이 젓소에서 유량을 지배하는 QTL이 제 1, 6, 9, 10 및 20번 염색체에 존재하고 있음을 보고한 이후 여러 연구자들에 의해 산유량 및 유조성분 등 비유형질에 영향을 주는 QTL의 염색체상의 위치를 확인하여 보고하였다 (Spelman 등, 1996; Lipkin 등, 1998; Arranz 등, 1998; Velmala 등, 1999; Nadesalingam 등, 2001; Looft 등, 2001; Plante 등, 2001). 이와 관련하여 국내의 경우 정 등(1997)이 한우의 친자감별 및 가계분석을 위해 2종류의 microsatellite 좌위를 선정하여 보고하였고, 이 등(2000)은 홀스타인종과 한우 BoLA-DRB3의 microsatellite 좌위를 이용하여 다형성 및 경제형질의 연관성을 분석하여 보고하였고, 최근에 정 등(2001)은 한우를 대상으로 두 종류의 minisatellite 좌위를 사용하여 유전적 다형성 및 대립유전자 출현빈도와 친자감별 분석을 실시하여 보고한 바 있으나 아직까지 이에 관한 연구는 많지 않은 실정이다.

따라서, 우리나라 고유의 유전자원인 한우의 유전적 다양성 및 생산형질 관련 QTL 분석을 위해서는 이들 DNA marker를 이용한 다양한 접근방법이 개발되어 체계적인 연구가 이루어져야 한다. 이를 위해 본 연구의 목적은 한우에서 PCR 기법을 이용하여 minisatellite와 microsatellite 좌위와 같은 VNTR marker에 대한 대립유전자를 검출하고 이형접합성 및 PIC 값을 분석하여 한우의 유전적 다양성을 추정하였고 동시에 VNTR marker와 생산형질간의 연관성을 확인하기 위하여 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시재료

본 연구의 공시재료는 축산기술연구소 대관령지소의 한우 암소집단 가운데 송아지 이유시체중에 대한 육종가(breeding value)를 추정하여 고능력우 개체(+4.0 이상) 151두와 저능력우 개체(-4.0 이하) 140두의 총 291두를 선발하여 이용하였고, 선발군의 산유량은 송아지 분만후부터 120일까지의 일일 비유량을 측정하여 총 165두를 선발하여 이용하였다.

2) Genomic DNA의 분리 및 정제

각 공시축으로부터 약 5-10ml의 혈액을 EDTA(10~20 IU/ml)가 함유된 tube에 채혈한 후 백혈구 세포로부터 Genomic DNA 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 보완 수정하여 추출한 후 수집된 DNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA)에 용해하였고, DNA 농도는 spectrophometer로 260nm의 UV 흡착에 의해 측정하고 O.D 260nm/O.D 280nm의 비율로 DNA 순도를 결정하였다.

3) VNTR primer 설계 및 합성

Minisatellite 좌위의 PCR 증폭을 위한 BTG1 및 KMBS2 minisatellite primer는 각각 Nave 등(1997)과 Mannen 등(1997)이 보고한 두 종류의 좌위를 선정하여 Table 1과 같이 합성하였다. Microsatellite 좌위의 선정은 산유관련 후보유전자와 산유형질에 영향을 주는 QTL이 위치하고 있는 염색체를 중심으로 하여 ISAG(International Society for Animal Genetics)에서 추천한 microsatellite 좌위와 Genbank의 database에 등록된 bovine microsatellite 가운데 염색체상의 위치, 대립유전자의 수, 분자량 크기 등의 유전정보를 고려하여 대립유전자의 검출이 가능한 총 16개 microsatellite 좌위를 선정한 후 Table 1에 나타난 바와 같이 primer를 설계 합성하였다. 또한, 선발된 microsatellite 좌위에 대하여 PCR 반응중에 발생할 수 있는 slippage 현상으로 인한 extra band와 미세한 염기배열 차이에 따른 대립유전자 판정결과의 오류를 축소하여 효율적인 대립유전자 분석 결과를 얻기 위해 각 좌위의 대립유전자 크기 및 PCR 증폭조건을 참조하여 multiple loading이 가능하도록 각 primer의 5'말단에 3종류의 형광물질(6-Fam;blue, Hex;green, Ned;yellow)을 부착시켰다.

4) PCR 증폭 및 VNTR marker 검출

본 실험에서 선정한 minisatellite와 microsatellite 좌위를 증폭하기 위한 PCR 반응조건은 GeneAmp PCR System(Perkin-Elmer Cetus, USA)를 이용하여 Table 2와 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 두종류의 minisatellite 좌위의 반응

액은 template DNA 50ng, primer 각각 0.5 μ M, 1 X PCR buffer(50mM KCl, 10mM tris-HCl, pH 8.0, 1.5mM MgCl₂, gelatin 0.001%), dNTPs, 200 μ M 및 Taq DNA polymerase 1.0 unit를 첨가하여 최종 반응액을 총 10 μ l로 조정하였다. 또한, microsatellite 좌위는 primer(0.1~0.2 μ M)와 MgCl₂(1.0~2.0mM) 및 Taq DNA polymerase(0.5~1.5 units) 농도만 달리하여 위와 동일한 조건으로 혼합하였다. PCR 증폭은 각 minisatellite 및 microsatellite 좌위의 G+C 함량에 따른 annealing 온도를 참조하여 처음 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 pre-denaturation을 실시한 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 30~35회 실시하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 시킴으로서 DNA 증폭과정을 종료하였다. Minisatellite 좌위의 증폭산물은 12% polyacrylamide gel을 이용하여 20mA로 약 4시간 전기영동하여 분리한 다음 silver stain하여 발현된 DNA band를 검출하였고 DNA band의 size는 100bp DNA ladder marker로 추정하였다. 그리고 microsatellite 좌위의 증폭산물은 1차적으로 6% polyacrylamide gel(PAGE) 전기영동법으로 분리하여 silver staining 방법으로 DNA band를 검출하여 대립유전자의 증폭상태를 확인하였다. 또한, 대량의 시료를 정확하고 효율적으로 분석하기 위해 대립유전자의 size와 dye-primer를 참조하여 2종류 또는 3종류의 microsatellite 좌위를 1set으로 혼합한 multiple 방법으로 ABI Prism 310(Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용한 Genetic Analyzer의 capillary 분석방식에 따라 DNA sample과 TAMRA standard size marker(GeneScan-350 또는 500)를 loading 하였다. Genetic Analyzer 방법으로 각 primer에 labelling된 flurecent dye를 laser 흡광도에 따라 자료의 분석이 완료된 후 Genotyper program에서 primer와 non-specific DNA fragment를 signal로 검출하여 각 microsatellite DNA marker에 대한 peak의 강도와 size를 정리하여 정확한 대립유전자의 수와 출현빈도를 분석 판정하였다.

Table 1. Primer sequences used in minisatellite and microsatellite analysis.

Marker	Allele	Chro.	Primer sequence(5' - 3')	Min/Max (bp)	Reference
BTGL1*	15	17	GTTGGCAGGGAAATGTGTTAC GCTTCTCTGTACAAAGTCCC	470-1014	Kashi et al. 1997
KBMS2*	13	-	CAGGAGAACCCGCTTTCATCCTACTGC CTGCTCCTCCAGGCAACTCCAGCCCT	300-1174	Mannen et al.1997
BM1824	5	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG	178-190	Bishop et al.1994
INRA011	3	1	CGAGTTTCTTTCTCGTGGTAGGC GCTCGGCACATCTTCCTTAGCAAC	203-215	Barebdse et al.1994
ILSTS004	6	1	CTTAAAATCTGTCTTTCTTCC TAGTGTGTATTAGGTTTCTCC	90-106	Barebdse et al.1994
BM2113	7	2	GCTGCCTTCTACCAAATACCC CTTCTGAGAGAAGCAACACC	125-143	Bishop et al. 1994
UWCA46	6	4	CCATTTCTCTGTTGGTAACTGC CTCTCACAGGTGGGGTC	187-213	Sun et al. 1995
ETH10	5	5	GTCAGGACTGGCCCTGCTAACA CCTCCAGCCACTTCTCTTCTC	210-226	Toldo et al. 1993
IGF-1	3	5	CCCAATGGATTGATCCTCATGT GCTGTGTAGTTCCTGGGTT	126-130	Kirkpatrick. 1992
BM4311	7	6	TCCACTTCTTCCCTCATCTCC GAAGTATATGTGTGCCTGGCC	93-105	Bishop et al. 1994
BM4528	7	6	CAGAATCCATACACATGTCAACA AGGAACAGGTATAGGAATATTGGA	238-276	Bishop et al.1994
DU17S2	8	6	CCAACCTTACAGGAAATGTC ATTAGAGCTGGGGTAAGTG	121-137	Kaiser et al. 1993
ETH225	7	9	GATCACCTTGCCACTATTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	140-156	Toldo et al. 1993
SPS115	6	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG AACGAGTGCCTAGTTTGCTGTG	240-262	Toldo et al. 1993
TGLA227	9	18	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	78-104	Georges et al.1992
ETH3	5	19	GAACCTGCCTCTCCTGCATGG ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	117-129	Toldo et al.1993
TGLA126	5	20	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	109-127	Georges et al.1992
TGLA122	6	21	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	130-164	Georges et al.1992

* Minisatellite markers

Table 2. PCR reaction conditions for the analysis of the minisatellite and microsatellite markers.

Marker	dNTP (μ M)	Primer (μ M)	MgCl ₂ (mM)	Taq (units)	Annealing ($^{\circ}$ C)	Dye
BTGL1*	200	0.2	1.5	1.0	59	-
KBMS2*	200	0.2	1.5	1.0	72	-
BM1824	200	0.1	1.5	1.5	58	Fam
BM2113	200	0.1	1.5	1.5	58	Hex
SPS115	200	0.2	1.5	1.5	58	Tet
ETH3	200	0.2	1.5	1.0	65	Fam
ETH10	200	0.1	1.5	1.0	65	Hex
ETH225	200	0.2	1.5	1.0	65	Tet
TGLA122	200	0.1	2.0	1.5	55	Fam
TGLA126	200	0.2	2.0	1.5	55	Hex
TGLA227	200	0.1	2.0	1.5	55	Tet
ILST004	200	0.1	1.5	1.0	56	Fam
INRA011	200	0.2	1.5	1.0	56	Hex
BM4311	200	0.1	1.5	1.0	58	Fam
BM4528	200	0.2	1.5	1.0	58	Hex
UWCA46	200	0.2	1.5	1.5	58	Fam
DU17S2	200	0.2	1.5	1.5	58	Hex
IGF-1	200	0.1	1.5	1.5	60	Hex

* Minisatellite markers

5) VNTR marker의 통계분석

가) VNTR 좌위의 이형접합성 및 PIC 값 분석

VNTR 좌위인 minisatellite와 microsatellite DNA의 대립유전자 출현빈도를 추정하고 대립유전자 수와 출현빈도에 기초하여 heterozygosity(Het)(Nei와 Roychoudhury, 1974) 및 polymorphic information content(PIC) 값 (Botstein 등, 1980)을 다음의 공식에 의해 각각 추정했다.

$$Het = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

여기서, n : 대립유전자 수, P_i 와 P_j : i 번째와 j 번째 대립유전자 빈도

나) 육종가 추정치와 VNTR marker간의 관련성 분석

$$Y_{ij} = \mu + B_i + V_j + e_{ij}$$

Y_{ij} = 관측치, μ = 전체평균, B_i = i 번째 육종가, V_j = j 번째 VNTR marker의 효과, e_{ijklmn} = 임의효과

다) 한우 암소의 산유량과 VNTR marker간의 관련성 분석

$$Y_{ijk} = \mu + YS_i + P_j + V_k + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = 관측치, μ = 전체평균, YS_i = i 번째 년도-분만계절의 효과, P_j = j 번째 산차효과, V_k = k 번째 VNTR marker의 효과, e_{ijk} = 임의효과

다. 결과 및 고찰

1) Minisatellite 좌위의 유전적 다양성 분석

본 연구에서는 CCA 및 CCATCA 염기배열이 반복배열되어 있는 KBMS2 좌위와 minisatellite와 microsatellite 두 염기배열을 공통적으로 포함하고 있는 bovine BTGL1 좌위를 이용하여 한우 선발집단의 대립유전자를 검출하고 유전적 다형성 및 변이성을 분석하였다. 한우 집단에서 KBMS2과 BTGL1 두 종류의 좌위를 12% PAGE법으로 검출한 minisatellite pattern은 Fig. 1과 2에 각각 제시한 바와 같다. Fig. 1은 KBMS2 좌위를 분리한 결과로서 한우의 다유성 및 저유성 선발군에서 300bp에서 1174bp까지 총16종류의 상이한 대립유전자가 관찰되었고 각 선발집단의 대립유전자 빈도 및 이형접합성(Hz)과 다형정보량(PIC)값을 추정한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 다유성 및 저유성 두 선발집단의 대립유전자 출현빈도에서 794bp의 출현율이 각각 26.5%와 24.3%로 가장 높은 경향을 보였고 그 다음으로 479bp 대립유전자가 각각 19.9%와 22.2%의 출현율을 나타냈으나 나머지 14개 대립유전자는 1.4%에서 7.3% 수준으로 비교적 출현빈도가 낮았다. 또한 한우 선발집단내 KBMS2 좌위의 유전적 다형성 수준을 추정하기 위하여 이형접합성(Hz)와 PIC 값을 계산한 결과 다유성 선발군은 0.866과 0.821 그리고 저유성은 0.864와 0.845의 값을 보여 Bostein 등(1980)과 Steffen 등(1993)이 포유동물의 이상적인 PIC 값으로 제시한 0.80을 상회함으로써 한우 두 선발집단내 유전적 변이성이 비교적 높은 것으로 분석되었다. 그러나 두 선발집단에서 대립유전자의 출현빈도와 이형접합성 및 PIC 값을 비교할 경우 검출된 대립유전자의 빈도에 따라 다형성 및 변이성에 다소의 차이는 있었으나 전반적으로 매우 유사한 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Mannen 등(1997)이 일본 흑모화우를 대상으로 KBMS2 minisatellite 좌위를 분석한 결과 총 7종류의 대립유전자들이 479bp ~ 1174bp의 범위에서 관찰되었으며, 이 가운데 584bp와 794bp 대립유전자가 각각 43.8%와 37.9%로 가장 높은 출현율을 보인 반면 이형접합성은 약 66.7%로 보고한 결과와 비교할 때 한우집단과는 대립유전자 출현빈도와 이형접합성 수준에 많은 차이가 있음이 인정되었다.



Fig. 1. Alleles at KBMS2 minisatellite loci detected by PCR-based VNTR analysis. The PCR products were separated in 12% polyacrylamide gel with TBE buffer and stained with silver.

Table 3. Allele sizes, frequencies, heterozygosity and PIC of KBMS2 minisatellite locus in high and low milk groups.

Marker	Allele number	Estimated size(bp)	ARF ¹⁾	HG	LG
				Freq ²⁾ (%)	Freq(%)
KBMS2	1	300	0.014	0.013	0.014
	2	320	0.065	0.066	0.064
	3	330	0.018	0.013	0.022
	4	350	0.035	0.033	0.036
	5	360	0.017	0.020	0.014
	6	375	0.014	0.014	0.014
	7	385	0.097	0.093	0.100
	8	479	0.211	0.199	0.222
	9	500	0.014	0.013	0.014
	10	510	0.035	0.033	0.036
	11	529	0.045	0.040	0.050
	12	584	0.069	0.066	0.072
	13	719	0.065	0.073	0.057
	14	794	0.254	0.265	0.243
	15	974	0.024	0.026	0.021
	16	1174	0.027	0.033	0.021
HET ³⁾			0.861	0.861	0.862
PIC ⁴⁾			0.823	0.823	0.824

¹⁾ Average frequencies of alleles, ²⁾ Frequencies of selected groups, ³⁾ HET = heterozygosity, ⁴⁾ PIC = polymorphic information content

한편, Fig. 2는 BTGL1 minisatellite 좌위를 이용하여 한우의 유전적 다형성을 분석한 결과로서 294bp에서 440bp까지 총 15종류의 대립유전자가 확인되었다. 다유 및 저유성 선발집단에서 BTGL1 좌위의 대립유전자와 이형접합성 및 PIC 값을 추정된 결과 Table 4에 제시한 바 같이 다유성 선발군은 381bp 대립유전자가 21.9%로 저유성 선발군의 12.1%에 비하여 약 10% 높은 출현율을 보인 반면 저유성 선발군은 320bp 대립유전자 빈도가 26.4%로 다유성의 10.6%에 비해 약 16% 정도 높은 수준의 출현빈도를 나타내어 기대할 만한 차이가 인정되었다. 그러나 나머지 대립유전자들의 출현빈도는 비교적 유사하였고 다유성 및 저유성 두 선발집단의 이형접합성(Hz) 및 PIC 값은 각각 0.891와 0.875 및 0.868와 0.846로 다유성 선발계통이 저유성 보다 다소 높은 것으로 분석되었다. Nave 등(1997)은 Holstein 젖소에서 BTGL1 minisatellite 좌위로서 HJ 700 대립유전자를 분석하고 294bp~440bp 범위에서 총 22종류의 대립유전자를 검출하였으나 본 연구결과에서는 15종류의 대립유전자가 관찰되어 품종간 유전적 변이성에 상당한 차이가 있음을 시사하였다. 정 등(2001)은 한우의 유전적 다양성과 가계분석을 및 친자감별을 위해 BTGL1 좌위를 이용하여 총 15종류의 대립유전자를 확인하였고 이형접합성 및 PIC 값은 각각 0.877 및 0.828로 추정하여 보고하였다. 기타 McGregor 등(1996)과 Vanpijlen 등(1995)은 어류(*Merlangius merlangus L*)와 고래(*Balaenoptera acutorostrata*)에서 각각 minisatellite 좌위를 분석한 결과 총 24개와 50개의 대립유전자를 각각 검출하였고 이형접합성은 94%와 98%로 각각 보고하여 고도의 다형성이 존재함을 보고한 바 있다.

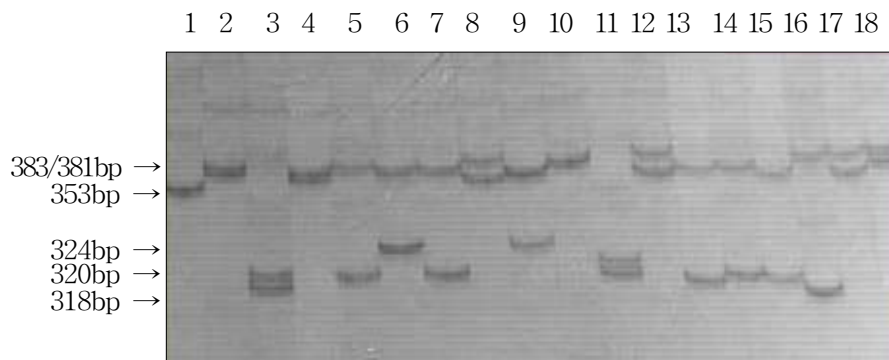


Fig. 2. Alleles at BTGL1 minisatellite loci detected by PCR-based VNTR analysis. The PCR products were separated in 12% polyacrylamide gel with TBE buffer and stained with silver.

Table 4. Allele sizes, frequencies, heterozygosity and PIC of BTGL1 minisatellite locus in high and low milk groups.

Locus	Allele number	Estimated size(bp)	ARF ¹⁾	HG	LG
				Freq ²⁾ (%)	Freq(%)
BTGL1	1	294	0.024	0.033	0.014
	2	310	0.028	0.026	0.029
	3	316	0.017	0.013	0.021
	4	318	0.124	0.126	0.121
	5	320	0.185	0.106	0.264
	6	324	0.059	0.067	0.050
	7	326	0.038	0.033	0.043
	8	331	0.093	0.099	0.086
	9	343	0.028	0.020	0.036
	10	345	0.014	0.013	0.014
	11	353	0.062	0.086	0.037
	12	381	0.170	0.219	0.121
	13	383	0.041	0.046	0.036
	14	420	0.055	0.053	0.057
	15	440	0.066	0.060	0.071
HET ³⁾			0.883	0.891	0.875
PIC ⁴⁾			0.857	0.868	0.846

¹⁾ Average frequencies of allele, ²⁾ Frequencies of selected group, ³⁾ HET : heterozygosity, ⁴⁾ PIC: polymorphic information content.

2) VNTR 좌위의 DNA marker와 생산형질간의 상관관계 분석

가) 이유시 체중에 대한 육종가와 minisatellite marker간의 관련성 분석

한우 암소의 산유능력과 이유시 체중에 대한 육종가를 평가하여 KBMS2와 BTGL1 두 종류의 minisatellite 대립유전자가 송아지 이유시 체중에 대한 육종가에 미치는 효과를 규명하기 위하여 분산분석에 의해 유의성을 검정하여 Table 5에 제시한 바와 같다. Table 5에 나타난 바와 같이 다유성 및 저유성 선발집단에 있어서 KBMS2 및 BTGL1 두 좌위의 육종가는 유의적인 관계가 관찰되지 않았고 전체축군의 경우 KBMS2 좌위와 육종가간에 유의적($P < .05$)인 차이를 나타내었다. KBMS2 및 BTGL1 좌위의 대립유전자와 육종가간의 상관관계를 분석한 결과 다유성 선발군에서 KBMS2 좌위의 육종가 값은 974bp와 330bp 두 개의 대립유전자가 각각 14.71 ± 2.95 와 13.25 ± 2.61 로 추정되어 가장 높은 경향을 나타낸 반면 385bp와 584bp의 대립유전자는 9.06 ± 1.55 와 9.51 ± 1.84 로 10.0 이하의 추정치를 나타내었고, 저유성은 974bp, 479bp, 510bp 및 330bp의 대립유전자가 각각 -12.12 ± 2.52 , -11.86 ± 0.93 , -11.63 ± 2.27 및 -11.08 ± 2.52 의 순으로 낮아 대립유전자의 출현율에 의해 다소의 차이가 존재하였지만 두 축군간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다(Table 6). 또한, 전체축군의 각 개체별 육종가를 산출하여 유의성을 검정한 결과 KBMS2 좌위의 대립유전자는 육종가 분석치에 유의적인 차이를 보여 375bp와 1174bp 두 개의 대립유전자가 각각 6.76 ± 6.93 과 4.48 ± 4.28 로 가장 높은 경향이었고 360bp 대립유전자는 -10.69 ± 8.51 로 다른 대립유전자에 비하여 상당히 낮은 값을 나타냈다. 한편, 다유성 선발군에 있어 BTGL1 좌위의 316bp, 318bp 및 420bp 대립유전자의 육종가 분석치는 각각 12.44 ± 4.17 , 12.09 ± 1.36 및 12.03 ± 2.12 로 높게 분석된 반면 저유성 선발군은 343bp, 383bp 및 318bp의 대립유전자가 각각 -12.86 ± 2.22 , -12.36 ± 2.22 및 -12.02 ± 1.34 로 다른 12종류 대립유전자의 평균치 보다 -2.75 정도 낮은 경향이었으나 이들간에 유의성은 인정되지 않았다. 그러나, 전체선발축군 개체들이 보유하고 있는 각각의 대립유전자와 한우 이유시 체중에 의한 육종가를 근거로 통계분석을 수행한 결과 294bp 및 353bp 대립유전자는 각각 4.71 ± 4.45 및 4.44 ± 2.78 로 다소 높은 경향을 보였으나 이 또한 유의적인 차이는 인정되지 않았다(Table 7).

Table 5. Mean squares and significance of breeding value for high and low milk groups in Korean cattle.

Source	df	'HG		df	LG		df	Overall	
		MS	F		MS	F		MS	F
KBMS2	15	269.227	0.64	15	24.877	1.04	15	24.877	1.93*
BTGL1	14	189.820	0.47	14	32.344	1.36	14	32.344	1.36
Error	122	139.902		111	23.847		262	23.847	

HG: high milk group, LG: low milk group, * P<.05

Table 6. Least square means and standard errors for breeding value of minisatellite markers in Korean cattle. HG; high milk group,

Marker	Allele number	Size(bp)	Breeding value		
			Overall	HG	LG
KBMS2	1	300	1.07±5.99 ^{ab}	12.38±4.09	-10.25±3.53
	2	320	-0.39±2.58 ^{ab}	12.38±1.84	-10.79±1.46
	3	330	2.33±4.02 ^{ab}	13.25±2.61	-11.08±2.52
	4	350	-1.16±3.49 ^{ab}	10.94±2.61	-9.50±1.91
	5	360	-10.69±8.51 ^b	11.05±3.11	-10.71±3.56
	6	375	6.76±6.93 ^a	12.54±4.09	-5.40±5.04
	7	385	-1.40±2.23 ^{ab}	9.06±1.55	-10.99±1.30
	8	479	-1.02±1.59 ^{ab}	10.15±1.09	-11.86±0.93
	9	500	1.78±5.99 ^{ab}	11.68±4.09	-8.12±3.53
	10	510	0.21±3.80 ^{ab}	12.49±2.59	-11.63±2.27
	11	529	2.11±3.61 ^{ab}	11.43±2.37	-9.32±2.25
	12	584	0.60±2.62 ^{ab}	9.51±1.84	-7.51±1.51
	13	719	1.73±2.76 ^{ab}	10.84±1.77	-10.88±1.77
	14	794	1.72±1.47 ^{ab}	9.75±0.92	-9.46±0.97
	15	974	0.98±4.29 ^{ab}	14.71±2.95	-12.12±2.52
	16	1174	4.48±4.28 ^a	11.26±2.60	-6.72±2.92
BTGL1	1	294	4.71±4.45	10.66±2.64	-9.79±3.51
	2	310	2.30±4.15	10.55±2.94	-5.87±2.46
	3	316	-1.46±5.26	12.44±4.17	-10.84±2.85
	4	318	1.92±2.06	12.09±1.36	-12.02±1.34
	5	320	-4.40±1.58	9.43±1.49	-9.74±0.79
	6	324	1.84±2.95	10.12±1.88	-11.71±2.02
	7	326	-0.60±3.54	8.28±2.62	-8.22±2.03
	8	331	1.07±2.28	10.74±1.51	-10.97±1.46
	9	343	-5.30±4.15	7.84±3.42	-12.86±2.22
	10	345	0.54±5.87	9.75±4.14	-8.44±3.51
	11	353	4.44±2.78	10.26±1.65	-11.03±2.22
	12	381	3.10±1.72	10.34±1.06	-11.89±1.25
	13	383	1.53±3.41	11.41±2.23	-12.36±2.22
	14	420	1.06±2.98	12.03±2.12	-9.94±1.76
	15	440	1.48±2.69	11.18±1.95	-7.50±1.59

LG; low milk group, superscripts with different letters in the same column significantly differ(P<.05)

나) 한우 암소의 산유량과 KBMS2 및 BTGL1 좌위간의 관련성 분석

다수의 대립유전자가 존재하고 있는 KBMS2 및 BTGL1 VNTR 좌위의 DNA marker를 이용하여 30일, 60일, 90일, 120일 및 총유량의 산유량 측정치와 각 대립유전자의 관련성을 확인하고자 먼저 SAS 프로그램을 이용한 통계 분석을 수행하였다. 먼저, 비유량에 대한 분산분석에서 년도-분만계절은 송아지 분만 후 30일, 60일, 90일 및 총 산유량에 유의적($P < .05$)인 영향을 나타내었고 120일동안 일일 산유량에 고도의 유의성($P < .001$)이 인정되었고 KBMS2 좌위는 90일, 120일 및 총 산유량과 유의적인 관련성이 있음이 확인되었으나 BTGL1 좌위는 아무런 영향을 미치지 않았다(Table 7). 즉, Table 8에 나타낸 바와 같이 KBMS2 좌위는 90일과 120일 및 총산유량에 있어 360bp의 대립유전자를 가진 개체는 각각 5.23 ± 1.44 , 4.89 ± 1.35 및 617.43 ± 78.05 kg을 생산하여 300bp의 대립유전자를 가지고 있는 개체에 비해 2.75, 3.21 및 353.77kg을 더 생산하여 월등히 높은 산유량을 나타내었다. BTGL1 좌위는 각 대립유전자와 산유량간에 유의적인 관련성은 인정되지 않았으나 총 산유량의 경우 316bp와 331bp의 DNA marker가 523.29 ± 80.48 kg과 523.01 ± 42.99 kg으로 각각 분석되어 가장 높게 나타났으며 이들 대립유전자간에 큰 차이는 없는 것으로 조사되었다.

Table 7. Mean squares and significance of milk yields and total milk yields for KBMS2 and BTGL1 minisatellites according to milking periods in Korean cattle.

Source	df	30 day		60 day		90 day		120 day		Total milk yield	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
YS	38	5.604	1.68*	5.388	1.48*	6.491	1.61*	7.838	2.49***	74,708.456	1.69*
P	3	5.420	1.62	3.115	0.86	5.087	1.26	7.158	2.27	72,882.490	1.65
KBMS2	15	1.729	0.52	2.399	0.66	7.388	1.83*	5.342	1.69*	77,584.098	1.76*
BTGL1	14	2.160	0.65	2.231	0.61	2.077	0.51	2.690	0.85	35,696.223	0.81
Error	95	3.345		3.632		4.034		3.154		44,122.046	

YS = Year and season of calving. P = Parity of cow. * P<.05,

*** P<.001.

Table 8. Least square means and standard errors of milk yields and total milk yields for KBMS2 and BTGL1 minisatellites according to milking periods in Korean cattle.

Marker	Allele size(bp)	Milk yield(kg)				
		30 day	60 day	90 day	120 day	Total
KBMS2	300	4.46±0.93	3.32±0.96	2.48±1.02 ^b	1.68±0.96 ^c	263.66±110.75 ^c
	320	4.72±0.40	4.77±0.41	4.30±0.44 ^{ab}	3.57±0.41 ^{abc}	446.26±47.51 ^{abc}
	330	5.26±0.62	5.02±0.63	4.68±0.68 ^{ab}	3.62±0.64 ^{abc}	485.08±73.76 ^{abc}
	350	5.27±0.54	4.67±0.55	4.41±0.59 ^{ab}	4.25±0.55 ^{abc}	496.21±64.31 ^{abc}
	360	4.28±1.31	4.87±1.35	5.23±1.44 ^a	4.89±1.35 ^a	617.43±78.05 ^a
	375	4.72±0.93	3.63±0.96	3.94±1.02 ^{ab}	2.32±0.96 ^{ab}	319.63±155.97 ^{abc}
	385	4.74±0.34	4.93±0.35	3.96±0.38 ^{ab}	3.47±0.35 ^{abc}	450.83±110.75 ^{abc}
	479	4.75±0.24	4.86±0.25	4.36±0.27 ^{ab}	3.77±0.25 ^{abc}	462.53±40.90 ^{abc}
	500	3.89±0.93	4.01±0.96	3.69±1.02 ^{ab}	3.20±0.96 ^{abc}	469.14±29.20 ^{abc}
	510	4.49±0.59	4.33±0.60	4.09±0.65 ^{ab}	3.42±0.60 ^{abc}	459.16±110.75 ^{abc}
	529	4.69±0.56	5.01±0.57	4.88±0.61 ^{ab}	3.61±0.57 ^{abc}	452.19±69.98 ^{abc}
	584	4.55±0.40	4.72±0.41	4.76±0.44 ^{ab}	4.00±0.41 ^{abc}	478.54±66.61 ^{abc}
	719	5.05±0.43	4.99±0.44	4.37±0.47 ^{ab}	3.72±0.44 ^{abc}	534.37±48.09 ^{abc}
	794	4.42±0.22	4.89±0.23	4.42±0.24 ^{ab}	2.68±0.23 ^{abc}	500.62±51.43 ^{abc}
	974	4.93±0.66	5.00±0.68	4.68±0.73 ^{ab}	3.79±0.68 ^{abc}	441.42±26.76 ^{abc}
	1174	5.06±0.66	5.24±0.67	4.89±0.72 ^{ab}	2.72±0.67 ^b	526.47±78.92 ^{ab}
BTGL1	294	4.48±0.66	5.32±0.67	4.49±0.72	4.41±0.68	446.26±78.90
	310	4.09±0.66	4.61±0.67	4.41±0.72	3.38±0.68	483.00±79.10
	316	4.82±0.83	4.70±0.85	3.89±0.91	3.74±0.86	523.29±80.48
	318	4.73±0.32	4.74±0.33	4.40±0.35	3.62±0.33	500.74±38.88
	320	4.66±0.24	4.56±0.25	4.07±0.27	3.59±0.25	461.07±29.62
	324	4.60±0.46	4.74±0.47	4.26±0.51	3.66±0.48	492.17±55.58
	326	4.76±0.56	5.68±0.57	5.05±0.61	4.40±0.58	515.80±66.86
	331	4.91±0.36	5.34±0.36	5.06±0.39	3.98±0.37	523.01±42.99
	343	4.18±0.66	4.83±0.67	4.80±0.72	3.97±0.68	494.04±78.81
	345	5.11±0.93	5.57±0.94	5.54±1.02	3.58±0.96	482.83±85.08
	353	4.50±0.45	4.47±0.46	4.40±0.49	3.89±0.46	471.12±53.95
	381	4.81±0.26	5.03±0.27	4.23±0.29	3.41±0.27	431.24±31.98
	383	5.10±0.54	4.39±0.55	4.05±0.59	3.45±0.56	387.41±64.52
	420	4.84±0.47	4.42±0.48	3.79±0.52	3.07±0.49	460.25±56.82
	440	4.30±0.42	4.50±0.43	4.28±0.46	3.82±0.44	433.27±50.94

HG = high milk group, LG = low milk group, ^{a, b} superscripts with different letters in the same column significantly differ (P < .05)

3) Microsatellite 좌위의 유전적 다양성 분석

다유 및 저유 두 선발집단에 대하여 genome내 전영역(Whole genome-scan approach)을 대상으로 유량 및 유조성분 함량과 연관된 QTL이 위치하고 있는 염색체 영역에서 총 16종류 microsatellite 좌위를 선정하여 분석하였다. 선발된 microsatellite 좌위의 효율적인 대립유전자 분석 결과를 얻기 위해 형광물질이 부착된 Dye-primer를 이용하여 증폭한 후 일부의 PCR 증폭산물을 6% polyacrylamide gel 전기영동법으로 분리하고 silver staining으로 DNA band를 검출하여 대립유전자의 증폭상태를 확인한 결과는 Fig. 3, 4, 5, 6 및 7에 각각 나타낸 바와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 PCR 증폭반응중에 enzyme slippage 현상에 의해서 일부 extra band가 존재하였으나 이는 dinucleotide repeat에 흔히 발생하는 현상으로 PCR 반응조건의 조절로 최소화시킬 수 있다. 그러나 typing에는 저해인자로 작용하지 않았다. 다음 과정으로 Automatic DNA sequencer를 이용하여 각 검정개체별 microsatellite 좌위의 대립유전자 빈도(Fq) 및 이형접합성(HET)과 다형정보량(PIC) 값을 각각 추정된 결과는 Table 9에 제시하였다. 총 16종류의 microsatellite 좌위를 이용하여 한우 선발집단에서 분석한 결과 3종류~10종류의 상이한 대립유전자가 확인되었고 이 가운데 TGLA122와 TGLA227 좌위에서 10종류와 9종류의 대립유전자가 각각 검출되어 가장 높았으며 INRA011과 IGF-1 좌위는 각각 3종류의 대립유전자가 확인되어 가장 낮은 분포를 보였다. 특히, 한우의 두 선발축군에서 각 좌위의 대립유전자 빈도 분포를 비교한 결과 다유성 선발군은 SPS115 좌위의 244bp, ETH3 좌위의 121bp, TGLA122 좌위의 143bp, TGLA126 좌위의 113bp, UWCA46 좌위의 125bp, DU17S2 좌위의 193bp 및 IGF-1 좌위의 126bp 7종류의 대립유전자가 저유성 선발군의 대립유전자 빈도에 비해 각각 11.7%, 12.3%, 11.4%, 16.9%, 13.0%, 14.8% 및 17.5%로 특정 allele이 높은 빈도로 존재하여 어느정도 차이가 인정되었다. 그러나, 저유성 선발군의 경우 TGLA122 좌위의 145bp, TGLA126 좌위의 115bp, UWCA46 좌위의 133bp, DU17S2 좌위의 201bp 및 IGF-1 좌위의 134bp 5종류의 대립유전자가 다유성 선발군의 출현율에 비해 각각 18.3%, 21.4% 16.5%, 20.8% 및 16.8%로 다소 높은 출현율을 보였고 그 외의 대립유전자들은 모두 10% 이하의 차이를 나타냈다(Table 9).

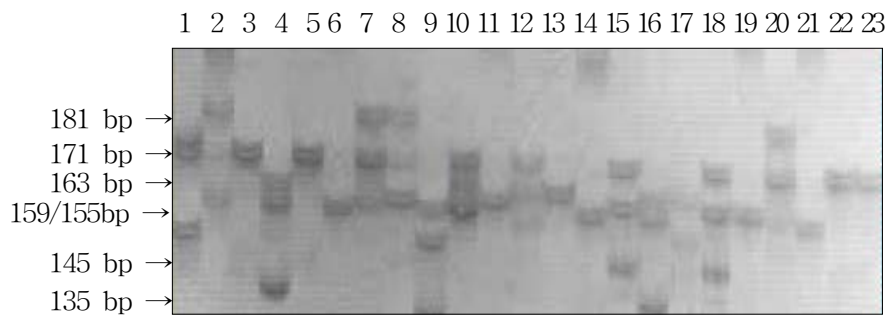


Fig. 3. Detection of microsatellite markers using TGLA 122 loci in Korean cattle. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and stained with silver. The genotypes for TGLA 122 are as follows; lane 1(143/171), lane 2(155/181), lanes 3, 5, 22 and 23(171/171), lanes 4 and 16(145/155), lanes 6, 14, 19 and 21(155/155), lanes 7 and 20(171/181), lanes 8, 10, 15 and 18(155/171), lanes 9 and 17(143/155), lanes 11 and 13(155/155) and lane 12(145/171).



Fig. 4. Detection of microsatellite markers using TGLA126 in Korean cattle. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and stained with silver. The genotypes for TGLA 126 are as follows ; lane 1(121/125), lanes 2, 6, 7, 12 and 14(119/119), lanes 3, 10, 16 and 17(119/123), lane 4(113/121), lane 5(113/113), lanes 8 and 9(123/123), lanes 11 and 15(113/115), and lane 13(115/119).

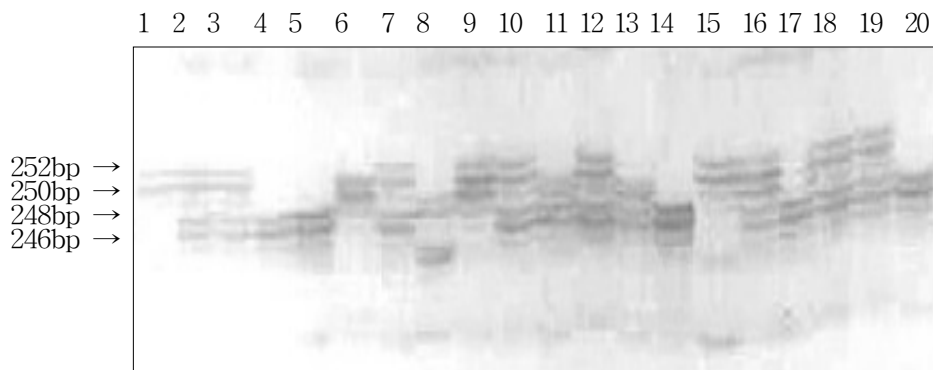


Fig. 5. Detection of microsatellite markers using ETH3 in Korean cattle. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and stained with silver. The genotypes for ETH3 are as follows ; lanes 1, 6 and 15(252/252), lanes 2, 3, 7, 10, 12, 16, 18 and 19(248/252), lanes 4, 5, 14, 17 and 20(248/248), lane 8(246/248), lane 9(250/252), lane 11(248/250), and lane 13(248/250).

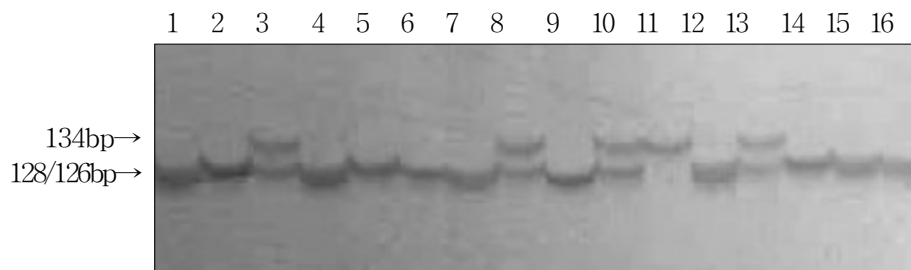


Fig. 6. Detection of microsatellite markers using IGF-1 in Korean cattle. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and stained with silver. The genotypes for IGF-1 are as follows; lanes 1, 4, 7, 9 and 12(126/126), lanes 2, 5, 6, 14, 15 and 16(128/128), lanes 3, 8, 10 and 13(128/134) and lane 11(134/134).



Fig. 7. Detection of microsatellite markers using SPS115 in Korean cattle. The PCR products were separated in 6% non-denaturing polyacrylamide gel and stained with silver. The genotypes for SPS115 are as follows; lanes 1 and 15(244/248), lanes 2 and 29(250/252), lanes 3, 4, 5, 7, 8, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 30 and 32(246/250), lanes 9 and 24(250/250), lanes 10 and 14(248/250), lanes 11 and 31(246/246), lanes 12 and 21(246/248), lanes 13, 19 and 27(244/252),

Table 9. Number of alleles and heterozygosity for 16 microsatellite loci in Korean cattle.

Locus	No. of alleles	Allele	Average	HG	LG
				F _q	F _q
BM1824	5	178	0.069	0.060	0.079
		182	0.426	0.437	0.414
		184	0.131	0.126	0.136
		188	0.058	0.066	0.050
		190	0.316	0.311	0.321
BM2113	7	125	0.089	0.086	0.093
		127	0.039	0.040	0.036
		131	0.192	0.185	0.200
		133	0.127	0.139	0.114
		136	0.127	0.126	0.129
		138	0.375	0.371	0.379
		147	0.052	0.053	0.050
SPS115	6	242	0.065	0.073	0.057
		244	0.089	0.146	0.028
		246	0.168	0.205	0.129
		248	0.251	0.212	0.293
		250	0.168	0.139	0.200
		252	0.258	0.225	0.293
ETH3	5	117	0.299	0.258	0.343
		119	0.265	0.325	0.200
		121	0.065	0.060	0.071
		125	0.251	0.245	0.257
		127	0.120	0.113	0.129
ETH10	7	211	0.162	0.159	0.164
		213	0.148	0.146	0.150
		215	0.144	0.152	0.136
		217	0.210	0.238	0.179
		219	0.144	0.126	0.164
		221	0.141	0.132	0.150
		223	0.051	0.046	0.057

Continued

Locus	No. of alleles	Allele	Average	HG	LG
				Fq	Fq
ETH225	7	140	0.031	0.026	0.036
		142	0.038	0.033	0.043
		144	0.402	0.424	0.379
		146	0.137	0.159	0.114
		148	0.313	0.278	0.350
		150	0.052	0.060	0.043
		154	0.027	0.020	0.036
TGLA122	10	135	0.058	0.053	0.064
		143	0.361	0.417	0.300
		145	0.320	0.232	0.414
		149	0.021	0.014	0.029
		151	0.065	0.086	0.043
		155	0.041	0.033	0.050
		159	0.017	0.013	0.021
		163	0.031	0.046	0.014
		171	0.065	0.086	0.043
		181	0.021	0.020	0.021
TGLA126	7	113	0.353	0.437	0.264
		115	0.247	0.146	0.357
		117	0.058	0.099	0.014
		119	0.052	0.053	0.050
		121	0.038	0.039	0.036
		123	0.093	0.086	0.100
		125	0.159	0.140	0.179
TGLA227	9	79	0.045	0.033	0.057
		81	0.031	0.020	0.043
		83	0.247	0.278	0.214
		87	0.076	0.086	0.064
		89	0.034	0.026	0.043
		93	0.107	0.113	0.100
		97	0.186	0.146	0.229
		101	0.179	0.212	0.143
		105	0.095	0.086	0.107

Continued

Locus	No. of alleles	Allele	Average	HG	LG
				Fq	Fq
ILST004	6	90	0.041	0.033	0.050
		94	0.045	0.053	0.036
		96	0.093	0.086	0.100
		98	0.241	0.252	0.229
		101	0.326	0.338	0.314
		103	0.254	0.238	0.271
INRA011	3	203	0.388	0.364	0.414
		205	0.461	0.451	0.472
		211	0.151	0.185	0.114
BM4528	6	244	0.082	0.066	0.100
		246	0.151	0.172	0.129
		256	0.058	0.060	0.057
		262	0.302	0.298	0.307
		270	0.223	0.212	0.236
		274	0.182	0.192	0.171
BM4311	6	94	0.247	0.232	0.264
		96	0.213	0.225	0.200
		98	0.052	0.060	0.043
		100	0.168	0.179	0.157
		102	0.113	0.099	0.129
		105	0.207	0.205	0.207
UWCA46	6	121	0.069	0.073	0.064
		125	0.282	0.344	0.214
		127	0.144	0.159	0.129
		131	0.072	0.060	0.086
		133	0.313	0.232	0.400
		137	0.120	0.132	0.107

Continued

Locus	No. of alleles	Allele	Average	HG	LG
				Fq	Fq
DUI7S2	8	187	0.069	0.086	0.050
		193	0.306	0.377	0.229
		197	0.058	0.053	0.064
		201	0.206	0.106	0.314
		203	0.062	0.060	0.064
		206	0.055	0.066	0.043
		211	0.179	0.172	0.186
		213	0.065	0.080	0.050
IGF-1	3	126	0.598	0.682	0.507
		128	0.192	0.185	0.200
		134	0.210	0.133	0.293

HG; high milk group, LG; low milk group, Fq; frequency.

선발집단내 microsatellite 좌위의 유전적 다형성 수준을 추정하기 위하여 이형 접합성(Hz)과 다형정보량(PIC) 값을 각각 계산하였다(Table 10). 두 선발군에서 HET와 PIC 값을 추정하여 비교한 결과 다유성 선발군은 ETH10 좌위가 각각 0.838과 0.835 그리고 저유성 선발군은 TGLA227 좌위에서 0.849와 0.846으로 가장 높았고 이와 반대로 IGF-1 좌위가 0.483과 0.470 및 0.617와 0.606으로 각각 가장 낮은 값을 나타내어 선발집단간에 microsatellite 좌위의 대립유전자 출현빈도에 따라 상당한 차이가 있음이 인정되었다. 그러나 두 선발계통에서 평균 HET와 PIC 값은 다유성 선발군이 각각 0.747와 0.729로 저유성 선발군에서 각각 분석된 0.751와 0.733의 값과 매우 근소한 수치를 나타냈다(Table 10). 총 16종류의 microsatellite 좌위에 대한 평균 HET와 PIC 값은 각각 0.749와 0.731로 그동안 각종 소 품종에서 보고된 microsatellite 좌위의 값과 비교해 볼 때 Heyen 등(1997)이 22개 좌위의 평균 PIC 값 0.59(0.12~0.88), Peelman 등(1998)의 21개 좌위의 평균 HET 값 0.65~0.71, Inoue-Murayama 등(1997)이 일본 화우 품종에서 23개 좌위의 평균 HET값 0.72(0.61~0.76) 그리고 Fiona 등(1998)은 5품종의 육우에서 11개 좌위의 평균 HET와 PIC값을 0.49와 0.44로 각각 보고한 결과와 유사하거나 보다 높은 수준을 나타내었다.

Table 10. Allele sizes, frequencies, heterozygosity and PIC of microsatellite locus in high and low milk groups.

Locus	Size range(bp)	No. of alleles	HG		LG		Overall	
			HET	PIC	HET	PIC	HET ¹	PIC ²
BM1824	178-190	5	0.688	0.556	0.698	0.581	0.693	0.569
BM2113	125-147	7	0.781	0.771	0.774	0.763	0.778	0.767
SPS115	242-252	6	0.816	0.813	0.768	0.763	0.792	0.788
ETH3	117-128	5	0.751	0.741	0.755	0.748	0.753	0.745
ETH10	211-223	7	0.838	0.835	0.847	0.845	0.843	0.840
ETH225	139-151	7	0.712	0.688	0.715	0.692	0.714	0.690
TGLA122	135-181	10	0.751	0.735	0.726	0.706	0.739	0.721
TGLA126	113-125	7	0.747	0.743	0.757	0.749	0.752	0.748
TGLA227	79-105	9	0.827	0.822	0.849	0.846	0.838	0.834
ILST004	90-103	6	0.754	0.746	0.762	0.755	0.758	0.751
INRA011	203-211	3	0.630	0.603	0.593	0.556	0.612	0.580
BM4311	94-105	6	0.808	0.805	0.804	0.801	0.806	0.803
BM4528	244-274	6	0.792	0.786	0.791	0.784	0.792	0.785
UWCA46	121-137	6	0.776	0.767	0.755	0.741	0.766	0.754
DU17S2	187-213	8	0.793	0.784	0.799	0.792	0.796	0.788
IGF-1	126-134	3	0.483	0.470	0.617	0.606	0.550	0.538
Total	-	101	11.947	11.665	12.01	11.728	11.982	11.701
Means	-	6.3	0.747	0.729	0.751	0.733	0.749	0.731

HET = heterozygosity, PIC = polymorphic information content, HET¹ and PIC² = overall, HG = high milk group, LG = low milk group.

4) Microsatellite DNA marker를 이용한 생산형질간의 상관관계 분석

가) 이유시 체중에 대한 육종가와 minisatellite marker간의 관련성 분석

한우의 다유성 및 저유성 그리고 두 선발축 전체에 대하여 16종류의 microsatellite 좌위를 포함한 총 101개의 DNA marker 가운데 각 검정개체들의 육종가와 대립유전자 빈도의 차이에 따라 육종가 값에 차이는 있으나 어떤 좌위의 대립유전자가 실제 한우의 육종가에 영향을 미치는지 확인하기 위해서 Table 11에 제시한 바와 같이 두 선발축간에 통계적 모형을 설정하여 분산분석에 의한 유의성을 검정하였다. 그 결과 다유성 선발군은 BM1824, ETH10, TGLA227 및 DU17S2 4종류의 좌위에서 유의성($P < .05$)이 인정된 반면 저유성의 TGLA122 및 TGLA126 두 좌위는 송아지 이유시 체중에 근거한 육종가에 유의적($P < .05$)인 영향을 미쳤다. 선발군 전체를 분석했을 때 BM1824, SPS115, TGLA126 및 IGF-1 4 종류의 좌위가 육종가에 유의적인 영향을 준 것으로 분석되었다. Table 12는 총 11개 특정 염색체상의 16종류의 microsatellite 좌위 가운데 다유성과 저유성 및 전체 선발군에 따른 최소자승평균치와 표준편차를 분석한 결과로서 BM1824, SPS115, ETH10, TGLA122, TGLA126, TGLA227, DU17S2 및 IGF-1 8종류의 좌위에서 유의성이 관찰되었다. 즉, BM1824 좌위는 다유성 선발군과 전체축군에 있어 188bp 대립유전자가 각각 17.03 ± 1.80 과 6.01 ± 2.92 로 178bp의 9.92 ± 1.87 과 -1.27 ± 2.73 보다 7.11 및 7.28이 각각 높게 분석되었고 SPS115 좌위는 전체축군에서 244bp 대립유전자의 육종가 값이 8.03 ± 2.26 으로 252bp의 -2.23 ± 1.36 에 비해 10.7 정도 월등히 높게 나타났다. 또한 다유성 선발군에서 ETH10 좌위의 7개 대립유전자 가운데 219bp의 대립유전자를 보유하고 있는 개체가 11.45 ± 1.57 로 유의적으로 높았고 저유성 선발군의 경우 TGLA122 좌위의 149bp 대립유전자가 -16.53 ± 2.98 로 다른 대립유전자에 비해 약 -3.0에서 -9.0 정도 육종가에 유의적인 차이를 보였다. TGLA126과 TGLA227 좌위는 저유성 및 다유성 그리고 선발군 전체에서 각각 유의성이 인정되었다. 즉, TGLA126 좌위는 저능력우 및 전체 집단에서 119bp 및 117bp의 대립유전자가 -13.94 ± 2.32 와 5.30 ± 3.14 로 각각 매우 저조하거나 상대적으로 높은 추정치를 나타내어 분석 대상군에 따라 상당한 차이가 인정되었다. 한편, DU17S2 좌위의 201bp, 187bp 및 197bp 3개의 대립유전자가 13.27 ± 1.81 , 12.23 ± 2.03 및 12.05 ± 2.22 로 각각 분석되

어 유의적으로 높은 수준을 나타내었고 IGF-1 좌위를 분석했을 때 전체집단에서 126bp의 대립유전자가 128bp와 134bp 보다 약 6.5와 10.5 정도 높아 유의적인 연관성이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 한우 송아지 이유시 체중에 대한 육종가 추정치는 특정 microsatellite 좌위의 대립유전자와 밀접한 관련이 있는 것으로 조사되었으나 먼저 이들과의 연관성 분석을 위해서는 한우의 이유시 체중에 대한 정확한 측정자료가 필요하고 체중에 영향을 미치는 환경적 요인을 고려하여 최적의 통계모형을 설정한 후 추가로 분석할 필요가 있다.

Microsatellite 또는 STR(short tandem repeats) marker는 종내 또는 개체에 따라 특이적인 다양성과 공유성을 나타내어 인간을 비롯한 많은 동식물 등에서 유전적 다양성 분석에 에 관한 연구가 이루어져 왔고 유전자 지도작성에 유용한 도구로 사용되어지고 있다. 그러나 축우 genome내에 존재하고 있는 microsatellite 좌위에 관한 연구는 주로 종내 또는 종간의 유전적 다양성과 혈연관계 및 연관분석 그리고 품종진화와 계통분류 등에 대한 연구가 진행되어 왔고 최근에 와서 가축의 생산형질과 연관된 QTL 분석에 그 실효성과 효율성이 높이 평가되면서 이에 관한 연구와 관심이 집중되고 있는 추세이다(Georges 등, 1995; Heyen 등, 1997; Ashwell 등, 1998; Grosz과 MacNeil, 2001). 그러나 아직 국내의 경우 한우의 유전적 구성 및 다양성과 경제형질과의 연관성을 분석하기 위한 연구(정 등, 1997; 이 등, 2000; 김 등, 2001)가 시도되고 있으나 아직 뚜렷한 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 이와같은 추세를 감안할 때 우리나라 고유의 재래가축인 한우의 다양성과 유전적 구성 및 경제형질과의 연관성에 관한 연구는 차후 한우의 유전적 순수성과 유전능력 개량효과를 배가시키는데 반드시 필요하다.

Table 11. Mean squares and significance for breeding value of microsatellite markers in Korean cattle.

Source	df	HG		df	LG		df	Overall	
		MS	F		MS	F		MS	F
BM1824	4	138.060	2.60*	4	12.735	0.53	4	360.110	2.75*
BM2113	6	11.052	0.31	6	10.088	0.42	6	38.596	0.30
SPS115	5	42.697	1.20	5	26.304	1.10	5	311.244	2.39*
ETH3	4	10.076	0.28	4	9.171	0.38	4	91.259	0.70
ETH10	6	100.926	2.84*	6	44.431	1.86	6	29.478	0.23
ETH225	6	19.893	0.56	6	12.543	0.53	6	36.668	0.28
TGLA122	9	46.278	1.30	9	56.044	2.35*	9	79.043	0.61
TGLA126	6	21.611	0.61	6	49.532	2.34*	6	470.896	3.72*
TGLA227	8	81.924	2.31*	8	12.139	0.51	8	26.910	0.21
ILST004	5	2.830	0.08	5	39.519	1.66	5	29.016	0.22
INRA011	2	23.572	0.66	2	4.456	0.19	2	54.765	0.42
BM4528	5	20.738	0.58	5	28.279	1.19	5	150.645	1.16
BM4311	5	23.823	0.67	5	51.305	2.15	5	100.785	0.77
UWCA	5	23.474	0.66	5	29.943	1.26	5	174.801	1.34
DU17S2	7	88.879	2.51*	7	20.975	0.88	7	160.486	1.23
IGF-1	2	0.217	0.01	2	7.555	0.32	2	515.184	3.96*
Error	66	35.466		55	23.852		206	130.395	

HG; high milk group, LG; low milk group, * P<.05.

Table 12. Least square means and standard errors for breeding value of microsatellite markers in Korean cattle.

Marker	Allele	Breeding value		
		Overall	HG	LG
BM1824	178	-1.27±2.73 ^b	9.92±1.87 ^b	-9.65±1.56
	182	0.89±1.27 ^{ab}	11.48±0.76 ^{ab}	-11.19±0.87
	184	0.21±2.09 ^{ab}	10.48±1.36 ^{ab}	-9.29±1.28
	188	6.01±2.92 ^a	17.03±1.80 ^a	-9.28±2.02
	190	0.05±1.38 ^{ab}	11.10±0.88 ^{ab}	-9.79±0.88
BM2113	125	0.25±2.40	8.90±1.55	-8.45±1.44
	127	1.34±3.63	13.70±2.31	-11.06±2.32
	131	0.09±1.76	10.00±1.12	-9.35±1.13
	133	2.98±2.12	12.63±1.30	-8.77±1.35
	136	1.24±2.05	12.56±1.32	-11.00±1.27
	138	0.48±1.35	10.72±0.83	-10.29±0.88
	147	1.84±3.12	11.31±2.02	-9.97±1.94
SPS115	242	0.73±2.64 ^{bc}	10.16±1.73	-12.04±1.75
	244	8.03±2.26 ^a	11.41±1.23	-11.79±2.48
	246	4.05±1.69 ^{ab}	10.50±1.05	-8.39±1.23
	248	-0.58±1.34 ^{bc}	10.65±1.00	-9.58±0.77
	250	-1.50±1.67 ^{bc}	11.37±1.29	-10.56±0.95
	252	-2.23±1.36 ^c	9.49±1.01	-11.20±0.79
ETH3	117	-1.54±1.57	9.89±1.12	-9.51±0.93
	119	2.93±1.67	9.77±1.15	-8.93±1.07
	121	-1.27±3.05	8.48±2.20	-10.00±1.92
	125	-0.61±1.78	9.96±1.30	-10.62±1.06
	127	-0.24±2.32	8.49±1.68	-8.22±1.38
ETH10	211	-0.03±2.07	8.02±1.47 ^{ab}	-7.70±1.23
	213	-0.01±2.12	9.20±1.57 ^{ab}	-9.61±1.24
	215	1.66±2.19	10.23±1.46 ^{ab}	-8.28±1.39
	217	0.11±1.86	9.13±1.21 ^{ab}	-11.56±1.21
	219	-0.25±2.09	11.45±1.57 ^a	-9.66±1.16
	221	0.30±2.23	10.29±1.61 ^{ab}	-8.94±1.32
	223	-2.81±3.28	6.92±2.43 ^b	-10.43±1.87

HG; high milk group, LG; low milk group, superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$).

Continued

Marker	Allele	Breeding value		
		Overall	HG	LG
ETH225	140	-2.08±4.08	9.32±2.96	-10.67±2.39
	142	-1.21±3.77	7.99±2.81	-6.98±2.12
	144	0.18±1.24	10.70±0.88	-10.10±0.76
	146	0.18±2.05	8.04±1.29	-10.55±1.45
	148	-0.36±1.38	10.53±0.93	-11.07±0.84
	150	4.89±3.28	10.76±2.07	-6.86±2.50
	154	-2.64±4.32	7.89±3.47	-9.95±2.32
TGLA12 2	135	0.47±3.32	11.48±2.68	-8.73±2.16 ^a
	143	0.68±1.95	9.89±1.44	-7.49±1.34 ^a
	145	-2.65±1.93	8.42±1.57	-9.86±1.20 ^a
	149	-4.08±5.07	15.12±3.85	-16.53±2.98 ^b
	151	2.07±3.11	9.87±1.97	-9.33±2.52 ^{ab}
	155	-4.51±3.78	9.98±3.09	-11.23±2.36 ^{ab}
	159	-4.32±4.92	13.17±3.87	-13.05±2.92 ^{ab}
	163	-0.49±4.15	7.94±2.70	-13.28±3.58 ^{ab}
	171	3.60±3.23	11.69±2.09	-8.23±2.56 ^a
181	1.50±4.46	13.15±3.29	-9.58±2.87 ^a	
TGLA12 6	113	1.83±1.90 ^{ab}	10.75±1.36	-10.88±1.28 ^{ab}
	115	-4.03±2.20 ^b	13.75±1.79	-11.15±1.36 ^{ab}
	117	5.30±3.14 ^a	12.10±1.95	-7.89±2.89 ^a
	119	-3.68±3.49 ^b	9.95±2.57	-13.94±2.32 ^b
	121	-1.15±4.16 ^{ab}	10.01±3.09	-8.75±2.73 ^a
	123	-1.47±2.80 ^{ab}	11.28±2.18	-13.18±1.72 ^{ab}
	125	-2.20±2.30 ^{ab}	9.67±1.79	-9.33±1.35 ^a

HG; high milk group, LG; low milk group, superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$).

Continued

Marker	Allele	Breeding value		
		Overall	HG	LG
TGLA227	79	-0.03±3.59	8.07±3.07 ^b	-9.56±2.12
	81	-1.14±4.32	20.76±3.57 ^a	-13.18±2.63
	83	1.50±2.09	10.87±1.56 ^b	-8.73±1.44
	87	1.90±3.04	10.78±1.95 ^b	-10.13±2.22
	89	-3.01±3.93	7.74±3.05 ^b	-12.22±2.45
	93	-1.49±2.81	9.24±2.05 ^b	-10.03±1.87
	97	-3.62±2.37	9.65±1.81 ^b	-12.26±1.44
	101	0.54±2.31	9.67±1.74 ^b	-8.54±1.56
	105	-1.60±2.88	12.85±2.27 ^b	-11.94±1.87
ILST004	90	-3.06±3.98	8.56±3.03	-11.07±2.62
	94	1.40±3.55	10.42±2.35	-9.65±3.46
	96	-0.45±4.40	11.89±1.91	-10.74±2.49
	98	1.88±3.48	9.44±1.36	-10.20±1.94
	101	-1.57±3.57	10.36±1.17	-9.57±2.15
	103	0.14±3.70	9.29±1.28	-10.00±2.08
INRA011	203	-1.15±3.34	10.18±1.15	-8.56±1.94
	205	-0.07±3.42	10.02±1.21	-10.07±1.99
	211	0.39±3.77	9.78±1.63	-11.99±2.50
BM4528	244	-0.54±3.51	8.54±2.19	-8.32±2.24
	246	0.35±3.37	10.04±1.55	-9.97±2.19
	256	2.16±4.51	9.06±2.39	-10.97±3.04
	262	0.85±3.68	10.64±1.20	-10.29±2.14
	270	-3.59±3.87	10.22±1.62	-10.96±2.13
	274	-0.88±3.66	11.46±1.40	-10.71±2.37
	94	0.08±4.25	10.22±1.44	-10.94±2.05
BM4311	96	2.52±3.48	9.70±1.45	-9.94±1.99
	98	0.98±3.68	11.31±2.27	-10.02±3.27
	100	-2.37±4.13	9.93±1.64	-9.65±2.29
	102	-2.88±3.36	8.76±1.88	-9.89±2.32
	105	0.01±3.91	10.05±1.52	-10.79±2.08

HG; high milk group, LG; low milk group, superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$).

Continued

Marker	Allele	Breeding value		
		Overall	HG	LG
UWCA46	121	0.09±4.25	9.99±2.10	-10.02±2.86
	125	2.53±3.49	10.52±1.21	-10.64±2.12
	127	0.99±3.68	10.88±1.47	-10.17±2.36
	131	-2.37±4.13	11.07±2.46	-10.28±2.43
	133	-2.88±3.36	8.98±1.33	-10.03±1.91
	137	0.01±3.91	8.52±1.72	-10.10±2.54
DU17S2	187	2.96±4.26	12.23±2.03 ^a	-12.41±3.17
	193	0.25±3.56	9.91±1.29 ^b	-9.15±2.23
	197	0.24±4.36	12.05±2.22 ^a	-10.64±2.82
	201	-3.83±3.74	13.27±1.81 ^a	-9.06±2.25
	203	-0.47±4.37	7.85±2.32 ^b	-9.50±2.75
	206	-1.22±3.88	8.39±2.24 ^b	-10.14±2.43
	211	-1.33±3.72	8.13±1.53 ^b	-9.69±2.41
213	1.20±4.32	8.13±1.99 ^b	-11.04±3.14	
IGF-1	126	7.62±1.57 ^a	10.74±1.14	-10.31±1.49
	128	1.17±2.00 ^b	10.12±1.55	-11.50±1.30
	134	-3.86±1.92 ^b	9.12±1.63	-7.39±6.82

HG; high milk group, LG; low milk group, superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$).

나) 한우에서 microsatellite marker와 산유량간의 관련성 분석

한우 암소의 산유량에 영향을 미치는 고정효과의 영향을 확인하기 위하여 최소자승법을 이용하여 분산분석을 실시한 결과를 Table 13에 제시하였다. 분석에 포함된 고정효과로서 송아지 분만년도-계절, 산차를 환경요인으로 처리한 결과 이들 요인들은 산유량에 아무런 영향을 미치지 않았다.

16종류의 microsatellite 좌위가 한우 암소의 산유량에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 이들 좌위의 대립유전자와 30일, 60일, 90일, 120일 및 총산유량과의 연관성을 통계 분석하였다. Table 14에서 보는 바와 같이 총 16개 좌위 가운데 ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA227, ILST004, DU17S2 및 IGF-1 8개 microsatellite 좌위에서 특정 대립유전자와 월별 산유량간에 유의적인 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 즉, 분만후 30일동안의 일일 산유량에 있어 유의적인 차이를 보이는 microsatellite 좌위로는 ETH3 좌위의 121bp 및 ETH225 좌위의 146bp 대립유전자가 각각 $5.52 \pm 0.78\text{kg}$ 및 $5.27 \pm 0.67\text{kg}$ 으로 가장 높았고 127bp 및 154bp 대립유전자는 각각 $4.69 \pm 0.67\text{kg}$ 및 $3.41 \pm 0.95\text{kg}$ 으로 가장 낮게 생산되었다. 60일 동안의 일일 산유량과 관련된 좌위와 대립유전자는 ETH10의 223bp와 TGLA122 좌위의 163bp와 181bp, TGLA227 좌위의 89bp와 101bp 및 ILST004 좌위의 90bp 대립유전자가 각각 215bp, 135bp, 81bp 및 94bp의 대립유전자에 비해 약 2.2kg, 2.1kg, 1.7kg 및 1.8kg이 각각 높게 추정되었다. 또한, 90일 및 120일의 산유량에서는 ETH10의 223bp와 TGLA122 좌위의 181bp, TGLA227 좌위의 89bp, DU17S2 좌위의 197bp 및 IGF-1 좌위의 134bp 6종류의 대립유전자가 215bp, 135bp, 81bp, 211bp 및 126bp의 대립유전자 보다 약 2.0kg과 2.5kg, 1.9kg과 2.0kg, 1.0kg과 2.6kg, 2.3kg 및 4.9kg이 높게 나타나 대립유전자에 따라 상당한 차이가 있었다. 한편, 120일동안의 총산유량을 기준으로 분석하였을 경우 ETH10의 223bp와 ETH225 좌위의 142bp와 146bp, TGLA122 좌위의 181bp, TGLA227 좌위의 89bp 및 IGF-1 좌위의 134bp 6종류 대립유전자가 215bp, 154bp, 135bp, 81bp 및 126bp의 대립유전자에 비하여 각각 303.3kg, 269.1kg과 252.4kg, 211.3kg, 89.6kg 및 152.8kg이 높았다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 특히 흥미로운 특징은 ETH10, TGLA122 및 TGLA227 3종류 좌위는 송아지 분만후 60일에서 120일까지 지속적으로 비유량에 영향을 주었고 또한 이들 DNA marker와 함께 IGF-1 좌위도 120일 유량과 총산유량에 대립유전자에 따라 유분비량에 상당한 차이가 인정되어 이들 4종류의 microsatellite 좌위는 한우의 산유량과 관련된 새로운 유전 정보원으로서 그 활용이 기대된다.

Table 13. Mean squares and significance of milk yield and total milk yield for microsatellite markers according to milking periods in Korean cattle.

Source	df	30 day		60 day		90 day		120 day		Total milk yield	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
YS											
P	36	5.692	1.70	6.441	1.66	6.820	1.36	6.084	1.75	63,893.274	1.15
BM1824	3	4.453	1.33	4.113	1.06	7.657	1.52	8.818	2.54	31,597.825	0.57
BM2113	4	4.252	1.27	3.599	0.93	5.690	1.13	5.296	1.53	53,143.371	0.96
SPS115	6	3.877	1.16	1.813	0.47	1.473	0.29	2.449	0.71	41,131.643	0.74
ETH3	5	7.098	2.12	6.827	1.76	4.832	0.96	3.757	1.08	20,960.022	0.38
ETH10	4	9.010	2.69*	6.311	1.62	6.010	1.19	6.929	2.00	90,235.570	1.63
ETH10	6	7.213	2.16	10.020	2.58*	12.621	2.51*	10.537	3.04*	134,757.292	2.53*
ETH225	6	9.126	2.73*	9.244	2.38	8.623	1.71	7.241	2.09	154,320.862	2.78*
TGLA122	9	5.235	1.56	11.540	2.96*	12.567	2.51*	11.806	3.40**	153,514.564	2.78*
TGLA126	6	5.960	1.78	7.549	1.94	6.222	1.24	2.808	0.81	47,151.672	0.85
TGLA227	8	4.421	1.32	10.314	2.64*	11.890	2.36*	8.609	2.49*	139,241.967	2.51*
ILST004	5	7.355	2.20	10.622	2.73*	11.707	2.33	7.250	2.09	67,908.018	1.23
INRA011	2	4.681	1.40	3.108	0.80	1.790	0.36	4.880	1.41	24,278.561	0.44
BM4528	5	6.634	1.98	8.870	2.28	8.040	1.60	3.098	0.89	79,147.900	1.43
BM4311	5	1.786	0.53	1.664	0.43	1.031	0.21	2.668	0.77	29,277.741	0.53
UWCA	5	1.788	0.53	4.041	1.04	4.926	0.98	4.711	1.36	102,102.142	1.84
DUI7S2	7	7.044	2.11	6.903	1.78	8.772	1.74	8.918	2.57*	69,302.765	1.25
DUI7S2	2	2.948	0.88	1.064	0.27	5.292	1.05	11.968	3.43*	213,389.065	3.85*
IGF-1											
Error	41	3.347		3.889		5.032		3.471		55,403.413	

YS=year and season of calving, P=parity of cow, * P<.05.

Table 14. Least square means and standard errors of milk yields and total milk yields for microsatellite markers according to milking periods in Korean cattle.

Marker	Allele	Milk yield				
		30 day	60 day	90 day	120 day	Total
BM1824	178	5.13±0.77	5.35±0.80	4.16±0.87	3.31±0.81	517.90±93.05
	182	4.75±0.61	4.83±0.63	4.24±0.69	3.19±0.64	513.68±74.17
	184	5.04±0.69	5.20±0.71	4.44±0.78	3.31±0.72	551.49±83.19
	188	5.08±0.77	5.87±0.80	5.56±0.87	3.49±0.80	578.33±92.89
	190	5.21±0.64	5.49±0.66	4.91±0.73	3.35±0.67	561.38±77.71
BM2113	125	4.88±0.42	5.02±0.42	4.15±0.46	3.63±0.43	451.72±49.73
	127	4.54±0.19	4.49±0.20	3.98±0.21	3.63±0.20	441.89±23.23
	131	4.57±0.32	4.77±0.32	4.14±0.34	3.82±0.32	486.37±37.72
	133	4.28±0.45	4.74±0.45	4.64±0.49	3.46±0.46	478.18±53.19
	136	4.95±0.21	5.10±0.21	4.56±0.23	3.78±0.22	483.88±25.24
	138	5.04±0.45	4.64±0.35	3.11±0.37	2.75±0.28	385.69±27.40
	147	3.89±0.28	5.01±0.31	4.43±0.30	3.32±0.27	393.00±36.56
SPS115	242	4.66±0.37	4.88±0.37	3.75±0.40	3.20±0.38	417.14±43.74
	244	4.53±0.56	4.49±0.56	3.66±0.61	3.13±0.57	410.35±66.09
	246	4.99±0.27	5.03±0.27	4.64±0.29	4.17±0.28	398.14±32.19
	248	4.60±0.33	5.04±0.33	4.84±0.35	3.91±0.33	390.76±38.76
	250	4.20±0.31	4.20±0.32	4.12±0.34	3.54±0.32	348.23±37.32
	252	5.01±0.48	5.31±0.49	4.70±0.52	4.26±0.49	409.69±56.89
ETH3	117	4.80±0.64 ^b	5.27±0.66	4.50±0.72	3.29±0.67	503.62±77.16
	119	5.10±0.65 ^{ab}	5.43±0.68	4.78±0.74	3.29±0.68	559.08±78.91
	121	5.52±0.78 ^a	5.44±0.80	4.71±0.88	3.71±0.81	586.75±93.61
	125	5.09±0.66 ^{ab}	5.35±0.69	4.65±0.75	3.16±0.69	535.80±80.18
	127	4.69±0.67 ^b	5.25±0.69	4.66±0.76	3.19±0.70	537.53±81.17

^{a, b} Superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$).

Continued

Marker	Allele	Milk yield				
		30 day	60 day	90 day	120 day	Total
ETH10	211	4.11±0.68	5.26±0.70 ^{ab}	4.59±0.76 ^{ab}	2.15±0.71 ^b	515.48±81.62 ^{ab}
	213	4.03±0.66	5.27±0.68 ^{ab}	4.83±0.74 ^{ab}	3.35±0.69 ^{ab}	557.14±79.19 ^{ab}
	215	3.90±0.66	4.13±0.68 ^b	3.66±0.75 ^b	2.18±0.69 ^b	366.94±79.78 ^b
	217	3.96±0.67	4.96±0.69 ^{ab}	4.12±0.76 ^{ab}	3.01±0.70 ^{ab}	495.74±81.18 ^{ab}
	219	3.75±0.69	4.79±0.71 ^{ab}	4.33±0.77 ^{ab}	3.50±0.72 ^{ab}	546.63±82.84 ^{ab}
	221	4.75±0.68	5.19±0.70 ^{ab}	4.64±0.76 ^{ab}	3.17±0.71 ^{ab}	559.74±81.66 ^{ab}
	223	4.79±0.83	6.33±0.86 ^a	5.46±0.94 ^a	4.66±0.87 ^a	670.21±98.22 ^a
	ETH225	140	5.29±0.89 ^{ab}	5.65±0.92	5.02±1.01	3.44±0.93
142		5.69±0.87 ^{ab}	5.86±0.90	5.19±0.98	3.77±0.91	620.45±104.94 ^a
144		5.18±0.63 ^{ab}	5.57±0.66	4.75±0.72	3.33±0.66	536.83±76.58 ^{ab}
146		5.27±0.67 ^a	5.72±0.70	5.12±0.76	3.97±0.70	585.06±81.25 ^a
148		5.16±0.62 ^{ab}	5.48±0.64	4.74±0.70	3.33±0.65	528.79±75.36 ^{ab}
150		5.30±0.79 ^a	5.20±0.82	4.69±0.90	3.31±0.83	603.72±95.74 ^a
154		3.41±0.95 ^b	3.95±0.98	3.12±1.07	2.18±0.99	351.37±114.44 ^b
TGLA122		135	4.82±0.81	4.33±0.83 ^b	3.74±0.91 ^b	2.46±0.84 ^b
	143	4.74±0.64	4.80±0.66 ^{ab}	4.11±0.72 ^{ab}	2.77±0.66 ^{ab}	446.30±76.71 ^b
	145	4.64±0.64	4.83±0.67 ^{ab}	4.43±0.73 ^{ab}	3.07±0.67 ^{ab}	514.54±77.77 ^{ab}
	149	4.85±1.06	5.77±1.10 ^{ab}	4.34±1.20 ^{ab}	4.08±1.11 ^{ab}	629.14±128.07 ^{ab}
	151	5.33±0.75	5.29±0.77 ^{ab}	4.72±0.84 ^{ab}	3.31±0.78 ^{ab}	546.99±90.17 ^{ab}
	155	4.06±0.82	5.41±0.85 ^{ab}	4.36±0.92 ^{ab}	3.08±0.86 ^{ab}	498.40±98.68 ^{ab}
	159	6.03±0.95	5.83±0.98 ^{ab}	4.70±1.07 ^{ab}	2.89±0.99 ^{ab}	543.38±114.08 ^{ab}
	163	5.46±0.89	6.41±0.91 ^a	5.10±1.00 ^{ab}	4.32±0.93 ^b	600.59±106.70 ^{ab}
	171	4.49±0.71	4.46±0.73 ^{ab}	4.13±0.80 ^{ab}	2.94±0.74 ^{ab}	500.93±85.55 ^{ab}
	181	6.01±0.96	6.35±0.99 ^a	5.69±1.08 ^a	4.38±1.00 ^a	657.58±115.11 ^a
TGLA126	113	5.19±0.64	5.50±0.66	4.96±0.73	3.57±0.67	564.29±77.68
	115	5.01±0.65	5.40±0.67	4.94±0.73	3.73±0.67	562.04±77.94
	117	4.79±0.77	4.76±0.79	3.84±0.87	3.28±0.80	493.62±92.54
	119	6.00±0.79	6.11±0.81	5.35±0.89	3.65±0.82	595.05±94.87
	121	4.62±0.86	5.33±0.89	4.24±0.97	2.80±0.90	520.71±103.67
	123	4.70±0.74	4.89±0.76	4.42±0.83	2.89±0.77	522.81±89.23
	125	4.97±0.64	5.44±0.66	4.88±0.72	3.41±0.66	553.37±76.79

^{a, b} Superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$),

Continued

Marker	Allele	Milk yield				
		30	60	90	120	Total
TGLA227	79	4.88±0.80 ^{ab}	4.86±0.83 ^{ab}	4.90±0.90 ^{ab}	3.18±0.84 ^{ab}	494.18±96.50 ^{ab}
	81	4.63±0.91 ^b	4.93±0.94 ^b	4.01±1.02 ^b	2.08±0.95 ^b	499.49±109.28 ^b
	83	5.28±0.65 ^{ab}	5.46±0.67 ^{ab}	4.66±0.73 ^{ab}	3.55±0.68 ^{ab}	548.98±78.25 ^{ab}
	87	5.74±0.75 ^a	5.91±0.78 ^{ab}	4.96±0.85 ^{ab}	3.58±0.79 ^{ab}	621.15±90.99 ^{ab}
	89	4.83±0.87 ^a	5.60±0.90 ^a	4.99±0.98 ^a	4.71±0.91 ^a	589.06±104.73 ^a
	93	5.44±0.72 ^a	5.69±0.75 ^{ab}	5.01±0.82 ^{ab}	3.51±0.75 ^{ab}	555.09±87.14 ^{ab}
	97	4.93±0.65 ^{ab}	5.33±0.67 ^{ab}	4.52±0.73 ^{ab}	3.22±0.68 ^{ab}	536.31±78.28 ^{ab}
	101	5.39±0.66 ^a	5.74±0.68 ^a	4.74±0.74 ^{ab}	3.35±0.69 ^{ab}	545.56±79.29 ^{ab}
	105	4.24±0.70 ^{ab}	4.60±0.73 ^{ab}	4.15±0.79 ^{ab}	2.80±0.74 ^{ab}	511.18±84.94 ^{ab}
ILST004	90	5.89±0.80	6.39±0.82 ^a	5.55±0.90	3.83±0.83	600.47±96.08
	94	5.12±0.84	4.61±0.86 ^b	4.08±0.94	2.76±0.87	496.98±100.69
	96	4.61±0.72	5.21±0.75 ^{ab}	4.48±0.82	3.42±0.75	535.65±87.15
	98	4.78±0.66	5.42±0.68 ^{ab}	4.81±0.74	3.41±0.69	537.61±79.58
	101	4.85±0.65	5.09±0.67 ^{ab}	4.33±0.73	3.14±0.68	528.40±78.28
	103	4.98±0.66	5.37±0.68 ^{ab}	4.71±0.75	3.43±0.69	568.22±79.82
INRA011	203	5.56±0.64	5.54±0.66	5.01±0.73	5.15±0.67	537.27±77.59
	205	5.11±0.64	5.35±0.66	4.67±0.72	4.63±0.67	477.68±77.34
	211	5.23±0.70	5.48±0.72	5.07±0.79	5.26±0.73	540.69±84.37
BM4528	244	4.99±0.67	4.89±0.70	4.37±0.76	3.35±0.70	541.76±81.44
	246	4.76±0.69	5.07±0.71	4.30±0.78	2.89±0.72	505.27±83.00
	256	5.26±0.81	5.71±0.83	4.95±0.91	3.33±0.84	585.50±97.30
	262	5.13±0.65	5.57±0.67	4.91±0.73	3.33±0.67	533.06±77.98
	270	5.20±0.66	5.61±0.68	4.97±0.75	3.61±0.69	585.11±80.01
	274	4.91±0.66	5.24±0.69	4.47±0.75	3.47±0.69	516.64±80.27

^{a, b} Superscripts with different letters in the same column significantly differ ($P < .05$),

Continued

Marker	Allele	Milk yield				
		30	60	90	120	Total
BM4311	94	4.75±0.66	5.09±0.68	4.32±0.74	3.11±0.69	494.89±79.50
	96	5.35±0.63	5.51±0.65	4.79±0.71	3.58±0.66	540.58±76.22
	98	4.82±0.79	4.95±0.81	4.15±0.89	2.81±0.82	525.63±94.71
	100	5.03±0.68	5.55±0.71	4.94±0.77	3.58±0.71	564.22±82.57
	102	5.17±0.70	5.40±0.72	5.01±0.79	3.64±0.73	576.58±84.19
	105	5.13±0.68	5.59±0.71	4.77±0.77	3.27±0.72	565.43±82.69
UWCA46	121	5.07±0.77	5.23±0.80	4.41±0.87	2.90±0.81	512.56±93.39
	125	4.50±0.64	5.04±0.66	4.63±0.72	3.08±0.67	526.57±77.48
	127	5.10±0.70	5.38±0.72	4.61±0.79	3.41±0.73	535.60±84.22
	131	5.41±0.68	5.45±0.70	4.54±0.77	3.51±0.71	517.86±82.34
	133	5.16±0.66	5.38±0.68	4.79±0.74	3.80±0.69	588.59±79.40
	137	5.00±0.72	5.61±0.74	4.99±0.81	3.29±0.75	586.15±86.90
DU17S2	187	5.15±0.76	5.77±0.79	5.21±0.86	3.62±0.80 ^{ab}	601.79±91.93
	193	5.31±0.62	5.66±0.64	4.76±0.70	3.52±0.65 ^{ab}	562.52±75.21
	197	5.46±0.79	5.31±0.81	4.61±0.89	4.97±0.82 ^a	544.27±94.83
	201	4.85±0.67	5.19±0.69	4.45±0.75	3.22±0.70 ^{ab}	500.42±80.72
	203	4.42±0.77	5.20±0.79	4.73±0.86	2.92±0.80 ^{ab}	516.53±92.41
	206	5.50±0.79	5.53±0.82	4.78±0.90	3.35±0.83 ^{ab}	587.26±95.74
	211	4.50±0.66	4.72±0.69	4.04±0.75	2.66±0.69 ^b	512.12±80.08
	213	5.14±0.77	5.40±0.80	4.71±0.87	3.39±0.81 ^{ab}	531.51±93.48
IGF-1	126	4.68±0.81	5.12±0.84	4.46±0.92	1.99±0.87 ^b	561.30±97.75 ^{ab}
	128	4.83±0.84	4.89±0.87	4.03±0.95	2.12±0.86 ^b	533.12±100.91 ^b
	134	5.04±0.82	5.10±0.85	4.48±0.93	6.91±1.85 ^a	685.92±99.20 ^a

^{a, b} Superscripts with different letters in the same column significantly differ (P < .05),

DNA 표지인자를 가축육종계획에 이용하기 위해서는 관심의 대상이 되는 유전자의 다형적 표지인자를 탐색하여 염색체상에 QTL의 위치(10~20cM)를 확인하고 이들 DNA 표지인자와 QTL간의 연관성 분석을 위해 1~2cM 단위로 설정하여 QTL의 존재여부를 검정하는 과정을 반복하게 된다(Parmentier 등, 1999). QTL 위치의 존재여부 및 정확성은 표지인자의 밀도(marker density), 이형접합성(heterozygosity) 및 실험설계(experimental design) 등 많은 요인들에 의해 영향을 받으므로 통계적 방법으로 정해진 LOD 값과 임계수준(threshold)에 의해 검정통계량(F-statistics)을 계산하여 QTL의 존재를 예측하게 된다(Lightfoot, 2001). 이와같은 방법을 이용하여 Georges 등(1995)이 젓소에서 유량을 지배하는 QTL이 제 1, 6, 9, 10 및 20번 염색체에 존재하고 있음을 발표한 이후 여러 연구자들에 의해 산유량 및 유조성분에 영향을 주는 QTL의 염색체상의 위치를 확인하여 보고하였다(Spelman 등, 1996; Lipkin 등, 1998; Arranz 등, 1998; Velmala 등, 1999; Nadesalingam 등, 2001; Looft 등, 2001; Plante 등, 2001). Zhang 등(1998)은 유량, 유단백질 및 유지방과 밀접히 연관된 QTL이 제 3, 9, 17, 20 및 23번 염색체에 위치하고 있음을 보고하였고, Plante 등(2001)은 총 69개의 microsatellite 좌위를 이용하여 총 676cM을 검색한 결과 제 3, 5, 9, 10, 15, 17, 20, 23 및 26번 염색체가 산유형질에 영향을 주는 QTL로 보고하였다. 또한, Coppieters 등(1998)과 Ron 등(1998)은 유량과 유조성분에 영향을 주는 QTL이 제 14번 염색체의 중심체 말단에 위치한다고 하였고, Nadesalingam 등(2001)은 산유량에 대한 QTL 위치를 검색한 결과 제 1번 및 6번 염색체가 유량과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. 또한, 27번 염색체상의 BM203 microsatellite 좌위와 근접한 영역에서도 유량과 연관된 QTL이 존재하는 것으로 밝혀졌다(Ashwell 등, 1998). 본 연구에서 산유관련 후보유전자들이 위치하고 있는 11개 염색체상의 16종류의 microsatellite 좌위를 이용하여 이들 좌위의 대립유전자와 산유량간의 상관관계 분석을 통하여 ETH3, ETH10, ETH225, TGLA122, TGLA227, ILST004, DU17S2 및 IGF-1 8개 좌위의 특정 대립유전자형이 비유량과 유의적인 영향을 미치고 있음을 확인하였다. 특히 이들 좌위는 1, 5, 6, 9, 18, 19 및 21번 염색체상에 위치하고 있어 이들 연구자들이 보고한 염색체와 비교해 볼 때 대부분이 부합되는 경향이였다. 특히, 염색체 1, 5, 18 및 21번에 각각 존재하고 있는 ILST004, IGF-1, TGLA227 및 TGLA122 4개 좌위는 Georges 등(1995)과 Davis 등(1998) 및 Nadesalingam 등(2001)이 보고한 염색체상의 동일

한 영역에 위치하고 있어 한우의 산유량을 증가시키기 위해서는 이들 특정 염색체에 존재하고 있는 microsatellite 좌위를 선정하여 집단내 바람직한 대립유전자형 빈도를 증가시키는 방향으로 육종계획을 수립하는 것이 한우의 산유능력 향상에 보다 바람직할 것으로 사료된다.

4. 한우에서 산유형질과 관련된 AFLP Marker의 개발

가. 서론

1980년대 중반에 개발된 PCR 기술은 DNA 수준에서 RFLP(restriction fragment length polymorphism), RAPD(random amplified polymorphism DNA) 및 microsatellite 등과 같은 다양한 분석기법의 개발을 통하여 DNA 다형현상 분석에 획기적인 변화와 발달을 가져왔다(Davis와 DeNise, 1998). 특히, PCR 기술을 이용한 분석방법으로서 RAPD와 DAF 기법은 임의의 primer를 사용하여 DNA를 증폭시켜 유전적 표지인자를 찾는 방법으로 특정 유전자의 정보없이도 DNA 다형성을 검출할 수 있어 그동안 각종 동물의 유전적 특성과 품종식별 및 품종간 근연관계 분석 등의 유전분석에 폭넓게 응용되어져 왔다. 그러나 이들 방법은 신속성과 간편성에도 불구하고 PCR 증폭조건에 대한 민감성 및 재현성 그리고 검출변이의 한계성으로 신뢰도가 낮다는 단점이 지적되어 왔다.

최근 몇 년 동안 동물 genome 분석 기술의 급속한 발달과 동물의 유전자 지도작성을 위한 project가 유럽연합체(EU) 또는 유럽경제공동체(EEC) 그리고 미국의 농무성(UADA-ARS) 등을 중심으로한 각 선진국의 상호 협력체제가 구축되면서 대단위 규모의 국제 공동 연구사업이 체계적으로 추진되고 있다. 그동안 각종 동물의 genome 분석이 진행됨에 따라 다수의 QTL과 연관된 유전자 지도가 파악되어 이들간의 비교유전자 지도작성(comparative mapping)을 통하여 여러형질에 관여하는 주요 유용유전자를 밝혀내는데 커다란 도움을 주고 있다. 특히, 1995년도에 Vos 등이 개발한 AFLP(amplification fragment length polymorphism) 기법은 기존의 RFLP와 RAPD 기법의 장점만을 조합하여 개발된 새로운 유전자 지문(DNA fingerprinting) 분석법으로 경제형질과 관련된 유전자를 탐색하는데 매우 유용하게 이용되고 있다. AFLP 기법은 genomic DNA를 두 종류의 제한효소로 절단한 다음 절단부위의 양쪽 말단에 이중가닥의 DNA adapter로 연결한 후 PCR 기법으로 selective nucleotide primer를 이용하여 DNA 단편을 특이적으로 증폭시켜 검출하는 방법으로 각종 제한효소와 primer 조합형에 따라 무한정한 좌위를 검출할 수 있고 고도의 다형성 및 변이성을 확인할 수 있다(Knorr 등, 1999). 특히, AFLP 기법의 주요 장점은 genome에 산재되어 있는 다수의 DNA 영역을 대상으로 특정 염기서열에 사전 정보없이도 동시

에 검색할 수 있고 고도의 다형적 DNA marker를 검출할 수 있어 각종 동식물의 genome 분석 및 경제형질과 관련된 QTL mapping에 그 활용과 이용이 급격히 증가하고 있는 추세이다(Ajmone-Marsan 등,1997; Blears 등, 1998; Knorr 등, 1999; Herbergs 등, 1999; Mueller와 Wolfenbarger, 1999). 그동안 AFLP에 관한 연구는 주로 식물이나 미생물을 대상으로 유전적 변이성 분석, 계통분류적 유연관계, 집단구조 및 분화 그리고 유전적 연관지도 작성등에 폭넓게 응용되어 왔으며(Aart 등, 1998; Hansen 등, 1999; Remington 등, 1999), 동물의 경우도 Ajmone-Marsan 등(1997)이 Holstein 종에서 AFLP 기법을 이용하여 유전자지문양상과 AFLP marker의 재현성 및 Mendel의 유전양식을 분석하고 동물에서의 이용 가능성을 제시한 이후 AFLP marker는 축우 품종의 유전적 다양성과 근연관계 분석(Basedow 등, 1998; Nijman 등, 1999; 정 등, 2000), 닭의 연관지도 작성(Knorr 등, 1999; Herbergs 등, 1999) 및 돼지의 genome 분석(Plastow 등, 1998; Siggens 등, 1999; 정 등, 2002) 등에 관한 연구가 보고되었다. 국내에서도 여 등(2000)은 재래돼지 가계집단에서 AFLP marker를 분석하고 재래돼지 개량에 유용한 DNA marker의 활용 가능성을 시사한 바 있으며, 정 등(2000, 2001)은 한우와 재래돼지에서 AFLP 분석을 통하여 품종 집단내 유전적 다양성과 품종 특이적인 AFLP marker를 탐색하고 타 품종과의 유전적 근연관계를 분석하여 보고한 바 있다.

본 연구에서는 한우 genome 분석을 위해 새로운 유전자 지문분석법인 AFLP 기법을 이용하여 한우의 유전적 변이성을 분석하고 선발집단간에 특이적인 AFLP marker 탐색 및 생산형질과 관련성을 분석하고자 수행하였다.

나. 재료 및 방법

1) 공시재료

본 연구에 사용된 공시재료는 축산기술연구소 대관령지소에서 사육되고 있는 한우 종빈우를 대상으로 개체별로 체중, 연령, 산차, 비유량에 따라 시험축군을 조성하였고 송아지 이유시체중(120일령)에 대한 육종가(breeding value)를 추정하여 고능력우 개체(+8.0 이상) 71두와 저능력우 개체(-8.0 이하) 86두의 총 157두를 선발하였으며 이들 선발된 기초 계통축군을 대상으로 송아지 분만시부터 이

유시까지 120일간의 산유량에 대한 성적을 분석자료로 이용하였다. 혈액 시료는 어미소의 미정맥 또는 경정맥으로부터 10ml 주사기를 사용하여 약 5ml의 혈액을 EDTA(10~20 IU/ml)가 함유된 tube에 채혈하여 사용하였다.

2) AFLP 기법을 이용한 DNA marker 검출 방법

가) Genomic DNA의 분리 및 정제

혈액 약 5ml로 부터 경정맥에서 채혈한 후 백혈구 세포로부터 Genomic DNA 추출 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 보완 수정하여 추출한 후 수집된 DNA는 TE buffer(10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA)에 용해하였고, DNA 농도는 spectrophometer로 260nm의 UV 흡착에 의해 측정하고 O.D 260nm/O.D 280nm의 비율로 DNA 순도를 결정하였다.

나) DNA 절단 및 adapter ligation

AFLP기법을 이용한 genomic DNA의 절단은 Ajmone-Marsan 등(1997)과 Janssen 등(1996)이 보고한 다형율과 유전정보를 참고하여 4bp와 6bp의 인지부위를 갖는 4종류의 제한효소와 ligation을 위한 adaptor를 선정한 후 제한효소 절단 부위의 염기서열을 포함하는 총 14종류의 two selective primer를 Table 1과 같이 설계하여 합성하였다. 즉, genomic DNA 500ng을 *EcoR I*, *Taq I*, *Hind III* 및 *Mse I* 4종류의 제한효소를 각각 2종류씩 조합하고 각 제한효소를 5 units를 첨가하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 조정한 후 각 제한효소의 반응온도에 따라 37 $^{\circ}$ C와 65 $^{\circ}$ C에서 3시간이상 반응시켜 이중 절단하였다. 절단된 반응액에서 10 μ l를 취하여 각 제한효소 절단부위별 양쪽 말단에 각각 5~7pmol의 double strand adapter, 1mM ATP 및 1 unit의 T4 DNA ligase를 첨가하여 최종 부피가 50 μ l가 되도록 조정후 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 ligation 시켰다. Ligation 종료 후 TE buffer를 첨가하여 10 : 1 비율로 희석하여 사용하였다.

Table 1. Adapters and selective primer sequences used in AFLP analysis.

Adapters(5' to 3')	Primer sequences(5' to 3')
<i>EcoRI</i> -adapter	E01 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
For strand : CTCGTAGACTGCGTACC	E32 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA C-3'
Rev strand : ATTGGTACGCAGTCTAC	E35 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC A-3'
	E38 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAC T-3'
	E39 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG A-3'
	E45 : 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAG G-3'
<i>Taq I</i> -adapter	
For strand : GACGATGAGTCCTGAC	T01 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AA-3'
Rev strand : CGGTCAGGACTCAT	T32 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAA C-3'
	T35 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAC A-3'
	T38 : 5'-GAT GAG TCC TGA CCG AAC T-3'
<i>Hind III</i> -adapter	
For strand : GACGATGAGTCCTGAC	H01 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TT-3'
Rev strand : CTGACGCATGGTCGA	H11 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TTA C-3'
	H12 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TTA G-3'
	H13 : 5'-GAC TGC GTA CCA GCT TTC T-3'
<i>MseI</i> -adapter	
For strand : GACGATGAGTCCTGAG	M01 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
Rev strand : TACTCAGGACTCAT	M11 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA G-3'
	M12 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
	M13 : 5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA T-3'

다) PCR 증폭조건 및 전기영동

1차 PCR 증폭 반응은 GeneAmp PCR System(Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5ml-tube에 DNA 희석액 5 μ l, 제한효소별 one selective primer 각 75ng, dNTP 각 200 μ M, 10 \times PCR buffer 그리고 Taq DNA polymerase 1 unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 μ l로 조정하였다. PCR 반응은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열을 실시한 다음 denaturation(94 $^{\circ}$ C/1분), annealing(56 $^{\circ}$ C/1분), extention(72 $^{\circ}$ C/1분)의 cycle을 총 30회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extention 시킨 후 종료하였다. 2차 PCR 증폭반응은 1차 증폭산물 희석액(1:100) 2 μ l에 two selective primer 각 10~30ng을 첨가하여 다음과 같은 조건하에서 수행하였다. 반응조건은 touchdown PCR법을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 56 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C(회당 1 $^{\circ}$ C씩 감소)에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 9회 실시한 후 annealing 온도를 56 $^{\circ}$ C에서 1분으로 고정하여 총 24회를 반복 수행하였다. PCR 증폭산물은 6%의 denaturing polyacrylamide gel(19:1) 전기영동법으로 1,800~2,000 volt에서 약 1.5~2시간 동안 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음 silver 염색하여 DNA band를 검출하였다.

3) 통계분석

가) 한우 암소의 유전능력 평가에 근거한 육종가 성적과 AFLP marker간의 관련성 분석

$$Y_{ijklmno} = \mu + H1_i + H2_j + H3_k + H4_l + H5_m + H6_n + H7_o + e_{ijklmno}$$

$Y_{ijklmno}$ = 관측치, μ = 전체평균, $H1_i$ = i 번째 AFLP marker의 효과, $H1_j$ = j 번째 AFLP marker의 효과, $H1_k$ = k 번째 AFLP marker의 효과, $H1_l$ = l 번째 AFLP marker의 효과, $H1_m$ = m 번째 AFLP marker의 효과, $H1_n$ = n 번째 AFLP marker의 효과, $H1_o$ = o 번째 AFLP marker의 효과, $e_{ijklmno}$ = 임의효과

나) 한우 암소의 산유량과 AFLP marker간의 연관성 분석

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + YS_i + PI_j + H1_k + H2_l + H3_m + H4_n + H5_o + H6_p + H7_q + e_{ijklmnopq}$$

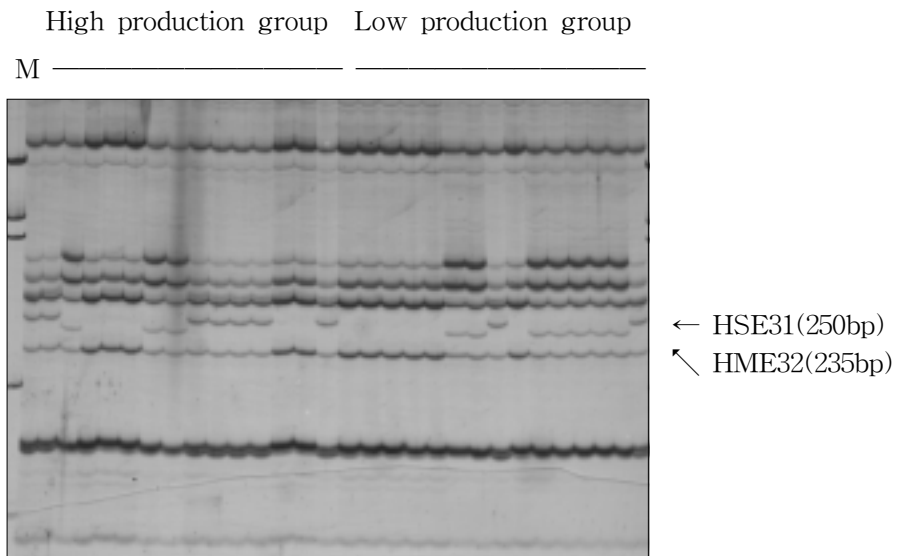
$Y_{ijklmnopq}$ = 관측치, μ = 전체평균, YS_i = I번째 년도-분만계절의 효과, PI_j = j번째 산차효과, $H1_k$ = k번째 AFLP marker의 효과, $H1_l$ = l번째 AFLP marker의 효과, $H1_m$ = m번째 AFLP marker의 효과, $H1_n$ = n번째 AFLP marker의 효과, $H1_o$ = o번째 AFLP marker의 효과, $H1_p$ = p번째 AFLP marker의 효과, $H1_q$ = q번째 AFLP marker의 효과, $e_{ijklmnopq}$ = 임의효과

다. 결과 및 고찰

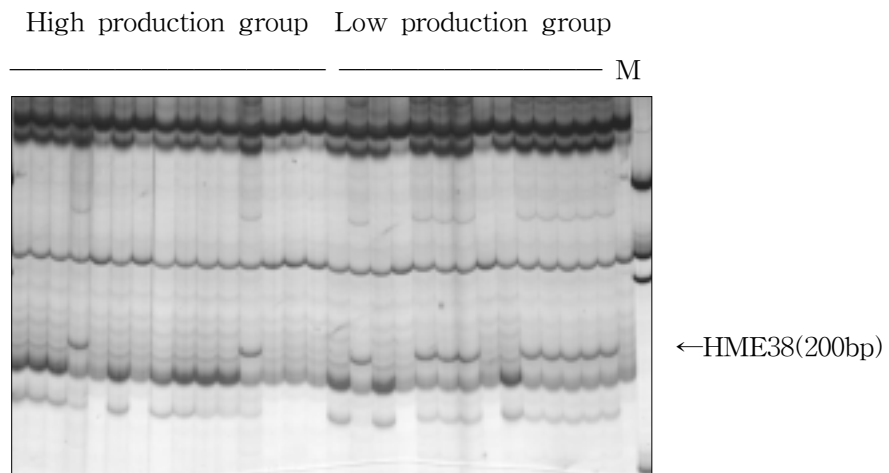
1) 선발계통간의 특이적 AFLP marker의 검출 및 출현빈도 분석

한우의 이유시 체중에 대한 육종가 추정의 유전능력 평가에 기초하여 다유 및 저유계통으로 선발 분류된 집단에서 최상위 71두와 최하위 86 두를 대상으로 각각 4bp와 6bp의 인지부위를 갖는 *Mse I*과 *Taq I* 그리고 *EcoR I*과 *Hind III* 4종류의 제한효소를 각각 조합하여 절단한 후 14종류의 two selective primer 조합형으로 증폭하여 이들 제한효소와 primer 조합형에 따른 AFLP 유전자 지문 (AFLP fingerprinting)의 출현 양상을 분석하여 선발계통의 특이적 DNA marker(specific DNA marker)를 검색하였다. 한우 선발계통간의 특이적 AFLP marker를 검색한 결과 Fig. 1, 2 및 3에서 각각 보는 바와 같이 2종류의 primer 조합형에서 선발계통간의 출현빈도에 차이를 보이는 DNA marker를 확인하였고 이들 primer 조합형에 따라 검출된 특이적 DNA marker를 HSE31, HME32, HME38, HSE41, HME42, HME51 및 HME11로 각각 표기하여 나타내었다. 먼저 E32/H12 primer 조합형에서 약 250bp(HSE31)와 235bp(HME32)의 크기를 갖는 다유성 및 저유성 선발군의 개체 특이적인 2개의 AFLP marker가 확인되었고, E38/H13 primer 조합형은 약 200bp(HME38) 크기의 band가 저유성 선발군에서 대체로 출현율이 높은 경향이었고 이와 반면에 다유성 선발군은 상대적으로 낮은 출현 양상을 보였다(Fig. 1). 또한, E45/H12 primer 조합형의 경우

610bp(HMP61)와 590bp(HMP62) 크기의 band는 다유성 및 저유성 두 선발균을 포함한 개체들에서 약 20bp 간격으로 band의 출현 유무에 따라 선발계통 특이적인 DNA marker로 확인되었다(Fig. 2). 한편, E33/T35와 H12/M13 primer 조합형에서 두 선발계통간에 개체 특이적 양상을 가진 단일 DNA marker가 550bp(HMP51) 및 710bp(HMH11)에서 각각 검출되었다(Fig. 2-3).

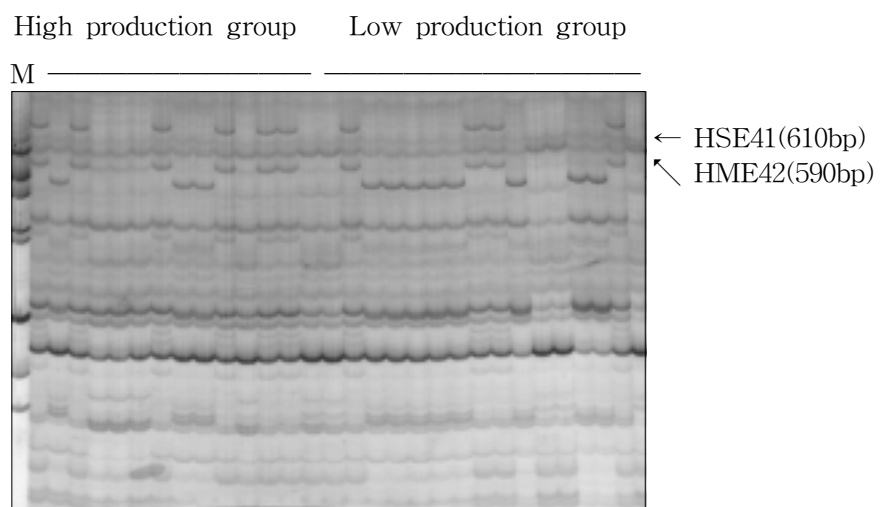


(A)

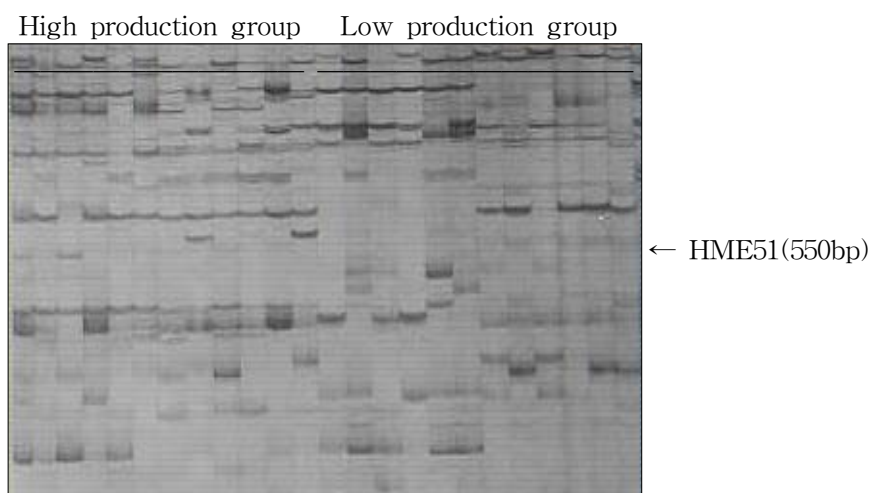


(B)

Fig. 1. AFLP fingerprints using a primer combination E32/H12(A) and E38/H13 in high and groups selected for milk yield. The arrows indicate the specific AFLP bands between high and low milk groups.



(A)



(B)

Fig. 2. AFLP fingerprints using a primer combination E45/H12(A) and E33/T35 in high and groups selected for milk yield. The arrows indicate the specific AFLP bands between high and low milk groups.

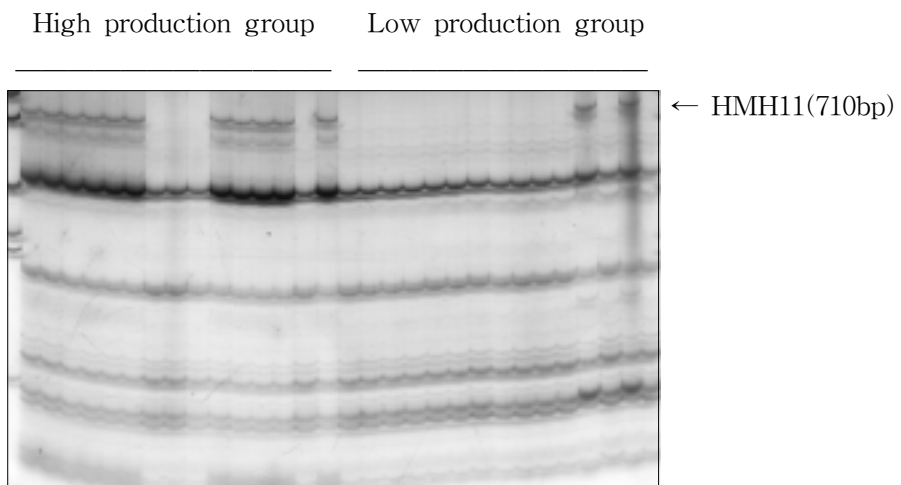


Fig. 3. AFLP fingerprints using a primer combination H12/M13 in high and low production groups selected for milk yield. The arrows indicate the specific AFLP bands between high and low milk groups.

따라서 다유성 및 저유성 선발군에서 검출된 개체 특이적 AFLP marker를 이용하여 두 선발계통간의 출현율을 분석하였다. Table 2는 선발계통간의 특이적 차이를 보이는 AFLP DNA marker의 출현율을 비교한 결과로서 5종류의 primer 조합형에서 선발계통간의 출현빈도에 차이를 보이는 1종류에서 2종류의 특이적 DNA marker가 검출되었고 다유성 선발군에서 검출된 HSE31, HME51 및 HMH11 DNA marker는 각각 60.6%, 78.9% 및 85.9%로 저유성 선발군의 12.8%, 39.5%와 25.6%에 비해 높은 출현빈도를 보였다. 이와 반면에, 저유성 선발군의 경우 HME38와 HME42 2 종류의 특이적 DNA marker 출현율이 각각 60.5%와 66.3%로 다유성 선발군의 25.3%와 26.8%에 비해 매우 높은 차이를 보여 두 선발집단간에 상당한 차이가 인정되었다. Ajmone-Marsan 등(1997)의 보고에 의하면 식물의 AFLP 분석은 *EcoR I*과 *Mse I* 두 제한효소를 이용하여 왔으나 동물의 경우 이들 제한효소는 다수의 AFLP band를 검출할 수 있는 반면 상대적으로 다형성 및 변이성에 대한 효율성이 낮기 때문에 *EcoR I* 또는 *Taq I* 제한효소를 사용하는 것이 가장 바람직한 다형적 AFLP band를 생성한다고 하였고 Knorr 등(2001)도 닭의 genome 분석에서 *Taq I* 제한효소 절단부위와 가까운 위치에 존재하고 염기가 가장 이상적인 다형성을 나타냈음을 보고한 바 있어 본 연구에서 검출된 AFLP marker의 대부분이 *EcoR I* 제한효소인 점을 감안할 때 *EcoR I* 제한효소와 primer 조합형으로 선발집단간의 AFLP 다형분석에 이용하는 것이 가장 이상적인 결과를 얻을 수 있으리라 판단된다.

Table 2. Frequencies of specific AFLP markers between two groups selected for high and low milk groups using five primer combinations.

Primer combination	AFLP marker	HG		LG	
		Markers	None	Markers	None
E32/H12	HSE31	43 ^a (60.6 [*])	28(39.4)	11(12.8)	75(87.2)
	HME32	15(21.1)	56(78.9)	40(46.5)	46(53.5)
E38/H13	HME38	21(25.3)	50(74.6)	52(60.5)	34(39.5)
E45/H12	HSE41	33(46.5)	38(53.5)	17(19.8)	69(80.2)
	HME42	19(26.8)	52(73.2)	57(66.3)	29(33.7)
E33/T35	HME51	56(78.9)	15(21.1)	34(39.5)	52(60.5)
H12/M13	HMH11	61(85.9)	10(14.1)	22(25.6)	64(74.4)

^a Numbers of cows, ^{*} Numbers in parentheses represent percentage, HG : high milk group, LG : low milk group

2) 한우에서 AFLP marker와 생산형질간의 관련성 분석

가) 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 AFLP marker간의 관련성 분석

제한효소와 primer 조합형에 따른 선발계통간의 특이적 AFLP DNA marker와 각 검정개체들의 이유시 체중에 대한 육종가 추정을 통한 유전능력 평가에 근거하여 다유성 및 저유성 선발군에 대한 관련성을 분석하였다. 선발계통에서 검출된 특이적 DNA marker가 실제 육종가 추정치에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 통계 분석한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 두 선발그룹에 대한 육종가와 DNA marker간에는 통계적 유의차가 나지 않아 유의적인 상관관계가 존재하지 않는 것으로 분석되었다. 그러나 전체축군에 있어 선발계통의 특이적 DNA marker가 송아지 이유시 체중에 미치는 효과를 분석한 결과 HSE31, HME51 및 HMH11 3종류의 AFLP DNA marker가 고도로 유의적($P < .001$)인 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 한우 송아지 이유시 체중과 특이적 DNA marker를 갖는 전체 개체들을 대상으로 최소자승평균치(LSM)와 표준오차(SE)를 분석했을 때 HSE31 및 HME51 그리고 HMH11 3종류의 특이적 DNA marker는 none marker에 비해 육종가 값이 4.18, 7.90 및 9.78로 유의적으로 높았으나 반면에 HME38의 none marker는 특이적 DNA marker 보다 약 4.51 정도 높게 나타나 유의적인 차이가 인정되었다(Table 4). 따라서 한우의 이유시 체중에 대한 육종가를 근거로 AFLP marker를 분석하여 비교했을 때 송아지 이유시 체중을 개량하기 위해서는 계통 특이적인 DNA marker를 갖고 있는 개체의 비율을 증가 시킴으로서 개량 효율성을 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Mean squares and significance of the source of variation for estimated breeding value by AFLP analysis in high and low milk groups.

Source	df	HG		df	LG		df	Overall	
		MS	F		MS	F		MS	F
HSE31	1	53.99	1.60	1	25.33	1.12	1	874.26	10.95***
HME32	1	0.01	0.00	1	0.02	0.00	1	39.72	0.50
HME38	1	1.11	0.03	1	1.68	0.07	1	556.35	3.97
HSE41	1	5.53	0.16	1	0.20	0.01	1	121.28	1.52
HME42	1	14.85	0.44	1	1.03	0.05	1	32.74	0.41
HME51	1	0.41	0.01	1	0.31	0.01	1	1,875.67	23.49***
HMH11	1	57.99	1.72	1	14.74	0.65	1	2,589.09	32.42***
Error	64	33.68		79	22.68		150	79.86	

HG: high milk group, LG: low milk group, *** P<.001.

Table 4. Least square means and standard errors for breeding value of specific AFLP markers in Korean cattle. HG: high milk group,

Primer combination	AFLP marker	Breeding value					
		Overall		HG		LG	
		Marker	None	Marker	None	Marker	None
E32/H12	HSE31	1.67±1.47 ^a	-3.85±1.02 ^b	11.68±1.55	9.81±1.59	-10.44±1.62	-12.17±0.85
	HME32	-1.72±1.56 ^b	-0.45±0.98 ^a	10.76±1.95	10.73±1.38	-11.32±1.35	-11.28±1.03
E38/H13	HME38	-3.35±1.46	1.17±1.06	10.56±2.04	10.93±1.32	-11.13±1.24	-11.48±1.15
E45/H12	HWE41	0.06±1.62 ^a	-2.24±0.95 ^b	11.13±1.95	10.36±1.36	-11.23±1.56	-11.38±0.86
	HME42	-1.68±1.50 ^b	-0.49±1.12 ^a	11.53±2.14	9.96±1.44	-11.18±1.19	-11.43±1.14
E33/T35	HME51	2.86±1.29 ^a	-5.04±1.21 ^b	10.86±1.60	10.63±1.84	-11.23±1.28	-11.37±1.03
H12/M13	HMH11	3.80±1.25 ^a	-5.98±1.30 ^b	12.17±1.32	9.33±2.11	-11.84±1.35	-10.77±1.03

LG; low milk group. ^a, ^b superscripts with different letters in the same column significantly differ (P<.05).

나) 한우 암소의 산유량과 AFLP marker간의 연관성 분석

다유성 및 저유성으로 분류된 선발계통을 대상으로 한우 암소의 실제 산유량과 특이적 DNA marker의 존재 여부에 대한 분산분석과 최소자승평균치 및 표준오차의 값을 분석하였다. Table 5는 한우의 산유량에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 암소의 분만년도-계절 및 산차의 효과 그리고 총 7종류 선발계통 특이적 AFLP marker를 고정효과로 처리하여 유의성을 검정한 결과로서 다유성 선발군의 HSE31과 HME51 marker는 총산유량과 120일의 산유량에 유의적 ($P < .05$)인 영향을 미쳤으나 분만년도-계절 및 산차간에는 유의성이 인정되지 않았다. 또한, 저유성의 경우 분만년도-계절효과 및 HME51 specific marker는 총산유량과 유의적 ($P < .05$)인 차이가 인정되었다. 한편, 선발군 전체를 포함한 분석에서 HSE31 marker는 분만 후 30일, 90일 및 총 산유량에 고도의 유의적 ($P < .01$)인 차이를 보였고 60일과 120일 동안의 일일 산유량도 통계적 유의성 ($P < .05$)이 인정되었으며, HME51 및 HME11 두 종류의 specific marker는 60일, 90일, 120일 및 총산유량에서 각각 5%에서 1% 범위의 통계적 유의성이 관찰되었다. 이 밖에 HSE41 및 HME42 marker의 60일과 30일에서도 각각 유의적 ($P < .05$)인 영향을 미치는 것으로 분석되었다.

Table 5. Mean squares and significance of milk yield and total milk yield for specific AFLP markers according to milking periods in Korean cattle.

High milk group											
Source	df	30 day		60 day		90 day		120 day		Total milk	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
YS	30	1.674	1.11	1.305	0.53	2.206	0.79	2.776	0.84	0.944	0.46
P	3	2.395	1.59	2.235	0.90	1.281	0.46	0.170	0.05	0.995	0.49
HSE31	1	1.848	1.23	2.549	1.03	3.215	1.16	0.517	0.16	8.602	4.14*
HME32	1	0.020	0.01	1.940	0.78	3.418	1.23	2.746	0.83	1.274	0.63
HME38	1	0.200	0.13	0.013	0.01	0.826	0.30	0.099	0.03	0.186	0.09
HSE41	1	0.196	0.13	7.371	2.98	2.210	0.80	0.475	0.14	0.583	0.29
HME42	1	0.047	0.03	0.051	0.02	2.453	0.88	0.330	0.10	0.000	0.00
HME51	1	0.007	0.01	0.735	0.30	4.083	1.47	14.746	4.45*	0.731	0.36
HMH11	1	0.199	0.13	0.932	0.38	0.276	0.10	2.627	0.79	0.145	0.07
Error	31	1.504		2.473		2.779		3.313		2.034	
Low milk group											
YS	30	2.593	0.77	2.538	1.02	1.790	0.67	1.736	1.40	1.333	2.11*
P	3	2.546	0.76	2.226	0.90	0.112	0.04	0.834	0.67	0.769	1.22
HSE31	1	2.048	0.61	1.119	0.45	0.029	0.01	4.319	3.48	0.112	0.18
HME32	1	3.080	0.92	0.201	0.08	0.323	0.12	0.429	0.35	0.222	0.35
HME38	1	0.193	0.06	0.073	0.03	0.112	0.04	0.017	0.01	0.910	1.44
HSE41	1	6.341	1.89	1.118	0.45	1.231	0.46	0.198	0.16	0.199	0.32
HME42	1	0.706	0.21	0.443	0.18	1.143	0.43	0.670	0.54	0.347	0.55
HME51	1	0.095	0.03	7.076	2.85	1.398	0.52	2.054	1.66	2.600	4.10*
HMH11	1	0.946	0.28	4.490	1.81	1.068	0.40	1.106	0.89	0.005	0.01
Error	46	3.358		2.479		2.669		1.240		0.633	
Selected overall group											
YS	30	2.836	1.18	2.655	0.95	3.340	1.08	3.238	1.10	2.546	0.95
P	3	1.531	0.64	2.310	0.83	4.514	1.45	4.895	1.67	5.168	1.92
HSE31	1	17.075	7.09**	11.184	4.00*	24.156	7.78**	12.386	4.22*	23.700	8.82**
HME32	1	7.998	3.33	1.194	0.43	0.105	0.03	0.319	0.11	0.238	0.09
HME38	1	6.033	2.51	3.645	1.30	4.844	1.56	2.723	0.93	4.424	1.65
HSE41	1	7.956	3.31	11.194	4.00*	5.691	1.83	4.311	1.47	5.262	1.96
HME42	1	12.780	5.40*	1.774	0.63	4.791	1.54	1.155	0.39	0.078	0.03
HME51	1	8.149	3.39	11.927	4.27*	21.192	6.82**	28.684	9.78**	22.292	8.30**
HMH11	1	9.835	4.09	16.332	5.84**	33.295	10.72***	52.583	17.94***	76.515	28.49***
Error	117	2.405		2.796		3.107		2.932		2.686	

YS=Year and season of calving, P=parity of cow, * P<.05, ** P<.01, *** P<.001.

한우의 다유성 및 저유성 선발군의 각 검정개체로 부터 검출된 선발계통 특이적인 AFLP marker와 산유량과의 상관관계를 분석하여 비교하였다(Table 6). 다유성 선발군에서 특이적으로 높은 출현빈도를 나타낸 HSE31의 specific marker는 총 산유량에 대한 분석치가 $667.48 \pm 60.87\text{kg}$ 으로 none marker의 $422.75 \pm 55.98\text{kg}$ 에 비하여 약 245kg 정도 더 높게 생산되어 기대할 만한 차이가 인정되었고 HME51은 90일의 유량이 $3.85 \pm 0.78\text{kg}$ 으로 none marker의 $2.06 \pm 0.65\text{kg}$ 보다 1.8kg이 더 높은 것으로 분석되었다. 또한, 저유성 선발군의 HME51은 120일 동안의 총산유량에서 marker의 출현 유무에 따라 뚜렷한 차이를 보여 none marker의 $298.55 \pm 29.44\text{kg}$ 은 specific marker의 $442.82 \pm 26.74\text{kg}$ 에 비하여 약 144kg이 낮게 생산되어 이들 두 그룹에서 검출된 특이적 DNA marker의 존재여부에 따라 한우의 산유량과 밀접한 상관관계가 존재함을 확인할 수 있었다.

한편, 한우 암소의 특이적 DNA marker를 가진 개체의 발생빈도는 계통 및 개체의 유전적 차이에 따라 공통적으로 발생하기도 하나 비특이적 marker(none marker)가 검출될 수 있으므로 이들 총 7종류의 AFLP marker와 각 일령별 및 총 산유량과의 연관성을 분석하기 위하여 전체 축군을 대상으로 통계 분석에 따른 최소자승평균치(LSM)와 표준오차(SE)의 값을 각각 구하였다(Table 7). Table 10에서 보는 바와 같이 개체간에 변이가 특이적인 AFLP marker의 존재 여부에 따라 일일 유량 및 총 산유량간의 차이는 총 4종류의 AFLP marker에서 유의적인 차이가 인정되었다. E32/H12 primer 조합형에서 확인된 HSE31 marker의 비특이적(none) 양상을 갖는 개체들은 specific marker를 가진 개체들에 비하여 30일, 60일, 90일 및 120일 동안의 일일 산유량이 각각 0.31kg, 1.34kg, 1.14kg 및 1.24kg 더 높은 경향을 보였고 총 산유량에서도 101.28kg이 더 많이 생산되어 뚜렷한 차이가 존재하여 유의성이 인정되었다. 또한, E33/T35 primer 조합형에서 확인된 HSE51의 특이적 DNA marker는 60일 산유량이 비특이적 marker에 비하여 약 1.7kg이 높은 경향을 보인 반면에 비특이적 marker는 90일, 120일 및 총산유량에서 각각 1.68, 0.92 및 98.52kg이 specific marker 보다 더 높아 유의적인 관계가 관찰되었고, H12/M13 primer 조합형을 이용하여 검출된 HME51의 비특이적 marker는 60일, 90일 및 120일의 유량이 specific marker를 갖는 개체에 비하여 2.3kg, 0.88kg 및 1.16kg이 더 높았고 총산유량도 157.32kg 정도 유량이 높아 기대할 만한 차이가 인정되었다. 따라서 이러한 결과를 종합

해 볼 때 다유성 선발군에서 높은 출현빈도를 보인 HSE31 및 HME51의 특이적 AFLP marker는 유량에 대한 최소자승평균치에서 비특이적 marker 보다 산유량이 높게 분석되었으나 이와 반면에 두 선발집단 전체를 대상으로 분석하였을 경우 HSE31, HME51 및 HMH11은 비특이적 marker를 가진 개체의 유량이 더 높은 경향을 보였고 HSE41과 HME42는 특이적 marker를 가진 개체들의 산유량이 더 높게 나타나 선발집단의 산유량 및 출현빈도에 따라 대조적인 차이를 보였다.

Table 6. Least square means and standard errors of milk yields and total milk yields for specific AFLP markers according to milking periods between high and low milk groups in Korean cattle.

AM	GP	SM	Milk yield(kg)				
			30 day	60 day	90 day	120 day	Total
HSE31	HG	M	4.88±1.04	6.19±0.64	5.86±0.72	4.63±0.78	667.48±60.87 ^a
		N	3.51±0.87	5.67±0.59	4.36±0.66	3.19±0.72	422.75±55.98 ^b
	LG	M	4.37±0.44	4.55±0.40	3.47±0.39	3.39±0.33	529.55±24.99
		N	4.08±0.46	3.91±0.43	3.47±0.41	2.46±0.35	481.82±26.39
HME32	HG	M	3.26±2.04	6.23±0.64	4.96±0.72	3.65±0.78	483.82±60.87
		N	4.13±1.73	6.62±0.54	6.26±0.61	3.16±0.66	506.15±51.64
	LG	M	4.64±0.57	4.57±0.52	3.63±0.51	3.20±0.43	330.64±32.43
		N	3.81±0.38	3.89±0.35	3.31±0.34	2.65±0.29	310.73±21.96
HME38	HG	M	3.18±1.05	5.42±0.64	4.14±0.72	3.95±0.78	497.23±61.05
		N	4.21±0.73	4.44±0.54	3.08±0.61	3.87±0.66	492.74±51.60
	LG	M	3.83±0.59	4.07±0.55	3.33±0.53	2.89±0.45	340.11±33.78
		N	4.62±0.37	4.39±0.34	3.61±0.33	2.96±0.28	301.26±21.34
HSE41	HG	M	4.48±1.18	4.07±0.68	3.13±0.77	2.10±0.84	483.04±65.02
		N	3.91±0.74	5.78±0.54	4.09±0.61	3.72±0.66	506.92±51.81
	LG	M	3.79±0.55	4.22±0.51	3.29±0.49	2.78±0.42	336.40±31.67
		N	4.65±0.39	4.24±0.36	3.65±0.35	3.08±0.29	304.97±22.27
HME42	HG	M	3.64±0.97	4.42±0.62	2.30±0.69	2.08±0.75	498.03±58.67
		N	5.75±0.78	4.44±0.56	3.92±0.62	2.74±0.68	491.94±53.11
	LG	M	4.37±0.61	4.68±0.56	3.70±0.55	3.35±0.46	332.90±34.92
		N	4.07±0.40	3.78±0.37	3.24±0.36	2.50±0.31	308.47±23.19
HME51	HG	M	5.43±1.03	5.53±0.64	3.22±0.71	3.85±0.78 ^a	504.45±60.59
		N	6.96±0.70	3.33±0.53	3.00±0.60	2.06±0.65 ^b	485.52±50.89
	LG	M	3.98±0.47	4.47±0.43	3.57±0.42	3.01±0.35	442.82±26.74 ^a
		N	4.47±0.51	4.00±0.47	3.37±0.46	2.85±0.39	298.55±29.44 ^b
HMH1 1	HG	M	3.86±0.43	6.52±0.45	4.81±0.50	3.56±0.55	729.37±42.75
		N	5.96±0.69	5.06±0.34	4.17±0.38	2.57±0.42	698.67±32.72
	LG	M	4.49±0.38	4.45±0.35	3.54±0.34	3.09±0.29	330.55±21.79
		N	3.96±0.60	4.01±0.55	3.39±0.53	2.76±0.45	310.82±34.05

AM; AFLP marker, GP; group, SM; specific AFLP marker, M; specific marker, N; none marker, HG; high milk group, LG; low milk group, ^{a, b} superscripts with different letters in the same column significantly differ (P < .05).

Table 7. Least square means and standard errors of milk yields and total milk yields for specific AFLP markers according to milking periods in Korean cattle.

AM	SM	Milk yield(kg)				
		30 day	60 day	90 day	120 day	Total
HSE31	M	4.99±0.26 ^b	4.26±0.28 ^b	4.58±0.30 ^b	3.31±0.29 ^b	498.21±30.11 ^b
	N	5.30±0.19 ^a	5.60±0.20 ^a	5.72±0.21 ^a	4.55±0.21 ^a	599.49±21.51 ^a
HME32	M	4.41±0.28	5.57±0.30	4.14±0.32	4.52±0.31	571.81±31.78
	N	4.87±0.18	5.29±0.19	3.85±0.20	4.34±0.20	525.89±20.37
HME38	M	5.37±0.27	5.61±0.29	5.27±0.31	4.75±0.30	597.61±30.89
	N	4.92±0.18	5.25±0.19	4.73±0.21	4.11±0.20	540.09±21.01
HSE41	M	4.94±0.30	5.20±0.32 ^a	4.77±0.34	4.29±0.33	533.76±34.00
	N	3.34±0.17	3.66±0.18 ^b	5.23±0.19	4.57±0.19	563.94±19.29
HME42	M	5.82±0.27 ^a	4.87±0.29	5.32±0.31	4.75±0.31	589.41±31.40
	N	4.27±0.20 ^b	4.19±0.21	4.67±0.23	4.11±0.22	518.29±22.82
HME51	M	4.90±0.23	5.89±0.25 ^a	3.66±0.27 ^b	3.97±0.26 ^b	499.59±26.91 ^b
	N	3.38±0.21	4.17±0.23 ^b	5.34±0.24 ^a	4.89±0.24 ^a	598.11±24.58 ^a
HMH11	M	4.91±0.22	4.48±0.24 ^b	4.56±0.26 ^b	3.85±0.25 ^b	470.19±25.91 ^b
	N	5.08±0.23	6.78±0.24 ^a	5.44±0.26 ^a	5.01±0.26 ^a	627.51±26.40 ^a

AM; AFLP marker, GP; group, SM; specific AFLP marker, M; specific marker, N; none marker, HG; high milk group, LG; low milk group, ^{a, b} superscripts with different letters in the same column significantly differ (P < .05).

그 동안 한우의 경제형질 및 유전분석에 이용된 DNA marker는 주로 전통적인 유전자지문 분석법(DNA fingerprinting)과 PCR 기법을 이용한 RFLP 또는 microsatellite 좌위 등을 이용하여 분석이 이루어져 왔으나 이들 방법은 분석의 난이도와 신뢰성 및 개발 가능성의 한계 등으로 최근에 와서는 AFLP 기법을 이용한 경제형질과 관련된 DNA marker 개발에 관한 연구가 주목을 받고 있다. 특히, AFLP 기법은 genome에 산재되어 있는 다수의 DNA 영역을 대상으로 특정 염기서열에 대한 사전 정보없이도 동시에 검색할 수 있고 고도의 다형적 marker를 검출할 수 있어 각종 동식물의 genome 분석 및 경제형질과 관련된 QTL mapping에 매우 강력한 도구로 인정되고 있다(Mueller와 Wolfenbarger, 1999; Wimmers 등, 2002). 동물에서 AFLP 기법을 이용하여 QTL과 밀접히 관련된 DNA marker를 검출하기 위해서는 먼저 유전적 배경이 서로 다른 집단간에 교잡으로 생성된 F1 세대와 이들간의 교배를 통하여 생산된 원집단(resource populations)를 구축하여 주요 경제형질과 연관된 DNA marker를 규명하고 positional cloning과 염기변이성을 확인한 후 이들 AFLP marker의 QTL 검정을 통해 개체를 직접 선발하여 표지유전자 선발법(MAS)으로 이용하는 과정이 필요하다(Knorr 등, 2001).

Ajmone-Marsan 등(1997)이 AFLP 기법을 이용하여 Holstein종 젖소의 유전자 지문 양상과 AFLP marker의 재현성 및 Mendel의 유전양식을 분석하고 동물에서의 이용 가능성을 제시한 이후 축우 품종의 유전적 다양성과 근연관계 분석(Basedow 등, 1998; Nijman 등, 1999) 및 닭의 연관지도 작성(Knorr 등, 1999; Herbergs 등, 1999)에 관한 연구가 보고되었다. 또한, 돼지 품종을 대상으로 암·수의 구별이 가능한 성 특이적인 AFLP marker가 개발되었고(Ovilo 등, 2000) AFLP marker는 돼지의 도체형질에 영향을 미치는 QTL과 밀접한 관계가 존재하는 것으로 보고되어져 있다(Wimmers, 2002). 이외에도 Groenen 등(2000)에 의하면 닭의 genome mapping 구축에 이용된 DNA marker 가운데 AFLP marker가 차지하고 있는 비율이 약 29% 이상이 표지인자로 개발되어져 있음을 보고한 바 있다. 국내에서도 그동안 여 등(2000)이 재래돼지 개량을 위해 AFLP marker를 분석하고 활용 가능성을 시사한 바 있으며, 정 등(2000, 2001)은 한우와 재래돼지에서 각각 AFLP 분석을 통하여 AFLP marker를 탐색하고 타 품종과의 유전적 근연관계를 분석하여 보고한 바 있으나 경제형질과 연관된 DNA marker 개발은 사실상 미흡한 편이므로 우리나라 고유의 유전자원인 한우의 능력개량을 효율적으로 추진하기 위한 다각적인 연구가 추진되어야 할 필요가 있다고 사료된다.

3절. 유량조절 유전인자의 특성 및 활용 연구

1. 한우 성장호르몬(GH), 성장호르몬 수용체(GH-R), 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자

가. 서론

성장호르몬(growth hormone, GH)은 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되어 있으며, 생체내에서 직접적으로도 작용하며 IGF-1 (insulin like growth factor-1, somatomedin-C)을 2nd messenger로 이용하여 간접적으로 영향을 미친다. 성장호르몬은 여러 작용을 가지지만 또한, 유즙생산에 많은 영향을 미친다. 성장호르몬은 유선의 발달을 자극하며, 지방의 산화를 증가시켜 지방을 분해하여 유리지방산과 glycogen을 만들어낸다. 이런 산물이 유즙증가에 이용되고, 성장호르몬의 2nd messenger인 IGF-1이 증가하게 되면 insulin의 저항성이 증가하여 혈중내 혈당이 올라가게 되어 이런 당들이 유즙생산을 하는데 쓰인다 (Bjorn Richelsen 1997; Terry 등 1998). 이러한, 성장호르몬 발현을 조절하는 전사조절영역의 특징과 다형성을 알아보기 위하여 한우 성장호르몬 및 그 수용체 유전자의 전사조절영역을 클로닝 하였다. 클로닝된 전사조절영역을 기초로 하여 유전자 단편을 제작하였고, 제작된 유전자 단편을 이용하여 염기서열을 분석하여 다형성을 연구하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 한우 성장호르몬(GH)

가) 성장호르몬(GH) 유전자 전사조절영역의 클로닝

한우에 있어서 성장 호르몬의 발현량에 영향을 미치는 전사조절부위를 클로닝하여 그 구조 및 특성을 밝히기 위한 첫 단계로서 기존에 보고된 성장호르몬의

수하였다. 회수된 DNA를 제한효소 *EcoR* I 으로 절단한 후 DNA 운반체(pUC18)에 연결하여 재조합 DNA를 제작하였다. 이 재조합 DNA를 대장균에 형질전환시켜 배지에서 배양시킨후 대장균에서 증폭된 재조합 DNA를 제한효소 *EcoR* I 으로 처리하여 삽입된 DNA의 크기가 삽입전의 크기와 동일함을 확인할 수 있었다 (Figure 2).



Figure 1. PCR analysis of Hanwoo growth hormone gene. M : Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder, Lane 1 : PCR products.

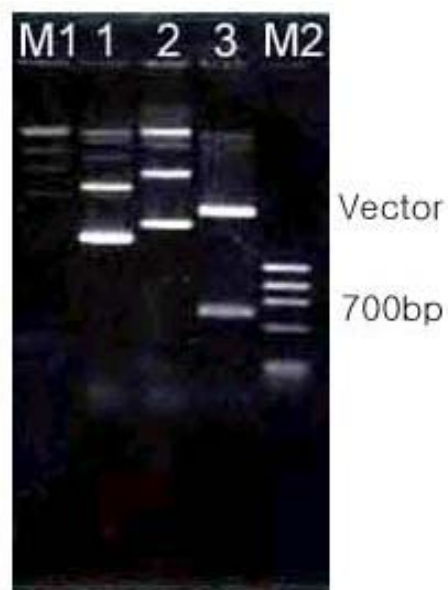


Figure 2. Subcloning of Hanwoo growth hormone(GH) gene. PCR product of GH gene were separated from 1.0% agarose gel and ligated to pUC18 vector. Subcloned DNA was digested with *EcoR* I and electrophoresed in 1.0% agarose gel. Lane M1 : DNA size marker of the λ *Hind*III ladder. Lane 1 : pUC18 vector. Lane 2 : subcloned recombinant DNA. Lane 3 : subcloned DNA digested with *EcoR* I. Lane M2 : Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder.

나) 한우 성장호르몬(GH) 유전자의 다형성 분석

한우 성장호르몬 전사조절영역의 염기서열을 기초로 한우 품종과 외래소 품종간의 염기서열을 비교 분석한 결과 전사조절영역 내 점 돌연변이가 검출되었다. 이를 제한효소인 *Dra* I 을 이용한 제한효소 절편 다형성(restriction fragment length polymorphism : RFLP) 기법을 이용하여 한우 78개체 및 홀스타인 58개체를 포함하여 외래 품종 총 94개체를 비교분석 하였다(Figure 4). 외래품종의 경우에는 GH 전사조절영역의 특정부위에서 thymine염기가 발견되지 않았으며, 한우에서만 특이적으로 cytosine염기(A allele)가 thymine염기(B allele)로 치환된 것을 확인 할 수 있었다. 각 대립유전자에 대한 빈도는 cytosine염기가 0.821, thymine염기가 0.179의 분포로 분석되었다(Table 1).

유전자 다형성과 각 형질과의 관련성을 분석하기 위해 축산기술연구소 한우 유전능력 평가 보고서를 기초로 실시하였다. 모든 개체의 출생 연도, 지역, 성의 차이 및 도살 월령의 차이 등은 통계적 방법에 의해 모두 보정 되었다. 두 가지 유전자형과 각 도체형질에 대한 유전자 효과는 SAS 일반선형모델에 의한 최소자승법으로 분석하였고, 분석모델은 다음과 같다.

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

여기서, Y_{ij} : 측정치, μ : 전체평균, g_i : GH 유전자형, e_{ij} : 오차

SAS 일반선형모델을 이용하여 분석한 결과 BB 유전자형이 AA 유전자형이나 AB 유전자형 보다 3개월령 체중과 도체중에서 각각 3.1, 9.1kg 더 높은 것으로 나타났다(Table 2, 3).

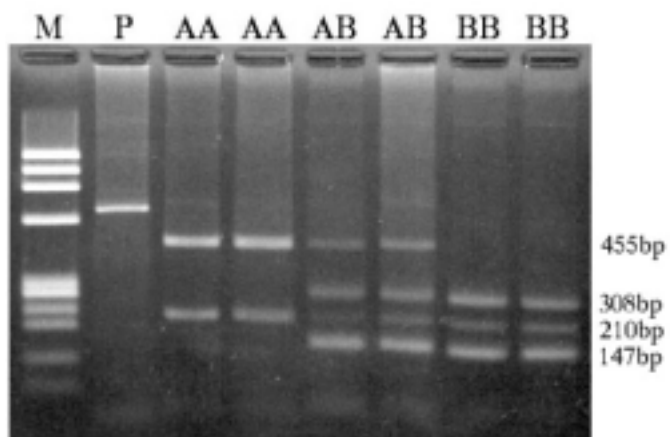


Figure 4. Genetic variants in bovine GH promoter region following PCR-RFLP analysis using *Dra* I restriction enzyme consisted of three genotypes (AA, AB and BB). M : Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder. P : undigested PCR product.

Table 1. Allele frequency of the *Dra*I PCR-RFLP identified at the bovine GH promoter region.

Breed	No. of animal	Genotype			Allele Frequency	
		AA	AB	BB	A	B
HanWoo	78	57	14	7	0.821	0.179
Holstein	58	58	0	0	1.00	0
Angus	7	7	0	0	1.00	0
Hereford	6	6	0	0	1.00	0
Brown Swiss	8	8	0	0	1.00	0
Charolais	10	10	0	0	1.00	0
Simmenthal	5	5	0	0	1.00	0

Table 2. Means of estimated breeding value(EBV) for growth and carcass traits of 78 Korean native cattle(Hanwoo).

Traits ^a	Mean	SD	Minimum	Maximum
W0(kg)	0.158	1.012	-1.900	2.480
W3(kg)	1.666	3.571	-7.465	11.311
W6(kg)	1.154	9.529	-24.947	31.779
W12(kg)	8.224	13.198	-19.480	45.670
W18(kg)	8.623	12.354	-16.790	64.850
CW(kg)	2.921	8.969	-12.559	25.029
LMA(cm ²)	0.326	1.323	-2.648	5.780
BF(cm)	0.282	1.159	-5.370	3.760
MS(score) ^b	0.207	0.491	-0.538	2.013

^aW0 : brith weight, W3 : weight at 3 month, W6 : weight at 6 month, W12 : weight at 12 month, W18 : weight at 18 month, CW : carcass weight, LMA : longissimus muscle area, BF : backfat thickness, MS : marbling score.

^bMarbling is scored on a scale from 1 to 5 with 5 being associated with the most marbling.

Table 3. Least squares means(LSM) and standard error(\pm SE) of genotype effects for GH gene promoter *Dra*I on estimated breeding value(EBV) for growth and carcass traits of 78 Korean native cattle(Hanwoo).

Traits ^a	Genotype			<i>P</i> ^c
	AA(14) ^d	AB(57)	BB(7)	
W0(kg)	0.229 \pm 0.134	-0.011 \pm 0.272	-0.080 \pm 0.385	NS ^e
W3(kg)	1.875 \pm 0.456 ^f	-0.302 \pm 0.921 ^f	3.901 \pm 1.302 ^g	0.025
W6(kg)	0.728 \pm 1.271	1.279 \pm 2.565	4.367 \pm 3.627	NS
W12(kg)	6.659 \pm 1.734	11.555 \pm 3.499	14.304 \pm 4.948	NS
W18(kg)	7.168 \pm 1.626	12.503 \pm 3.281	12.706 \pm 4.640	NS
CW(kg)	2.611 \pm 1.153 ^f	0.371 \pm 2.328 ^f	10.551 \pm 3.292 ^g	0.041
LMA(cm ²)	0.194 \pm 0.175	0.710 \pm 0.353	0.637 \pm 0.499	NS
BF(cm)	0.214 \pm 0.154	0.320 \pm 0.311	0.760 \pm 0.439	NS
MS(score) ^b	0.205 \pm 0.067	0.209 \pm 1.133	0.223 \pm 0.188	NS

^aW0 : brith weight, W3 : weight at 3 month, W6 : weight at 6 month, W12 : weight at 12 month, W18 : weight at 18 month, CW : carcass weight, LMA : longissimus muscle area, BF : backfat thickness, MS : marbling score.

^bMarbling is scored on a scale from 1 to 5 with 5 being associated with the most marbling. ^c*P* : Probability of *F*-test for genotype effect. ^dNo. of animal.

^eNo significance ($P>0.05$), ^{f,g}Column means with different superscripts differ($P<0.05$).

2) 성장호르몬 수용체(GH-R) 유전자

성장호르몬은 유즙생산과 유선조직의 성장에 관여하는 호르몬이다. 성장호르몬은 성장호르몬 수용체와 결합하여 2nd messenger인 IGF-1을 이용하거나, 직접적으로 세포의 성장과 분화를 촉진한다(Isaksson 등 1981). 성장호르몬 수용체는 성장호르몬과 결합하여 dimer를 형성한다. 일단 dimer를 형성하게 되면, JAK tyrosine kinase와 MAP kinase계를 이용하여 성장호르몬의 작용을 일으킨다. JAK tyrosine kinase는 분자내의 두 개의 kinase구조를 지니고 있다는 사실로 말미암아 그리스 신전의 입구와 출구를 동시에 응시하는 양면신 야누스(Janus)에서 이름을 따서 protein kinase이다. ligand가 수용체에 결합하여 활성화된 JAK는 SH 구조를 갖는 STAT(Signal transducers and activators of transcription)로 충칭되는 시그널 전달성 전사인자군의 tyrosine 잔기를 인산화한다. 인산화되어 활성화된 STAT는 응답성 엘리먼트와 결합해 유전자 발현을 촉진한다. MAPK(mitogen-activated protein kinase)는 증식인자 및 발암 promoter의 자극에 의해 활성화되며 세포내의 다양한 기질을 인산화하는 kinase 사실이 발견되었다. MAPK는 여러 가지 전사인자의 serine, threonin 잔기를 인산화해 유전자 발현을 촉진한다(Kichibee Otsuka 등 1997).

성장호르몬은 이와같이 성장호르몬 수용체와 결합하여 여러 가지 생체내 작용을 한다. 이에 우리는 성장호르몬 수용체의 전사조절영역(802bp)을 클로닝하여 전사조절영역내에 결합할 수 있는 전사조절인자를 조사함과 동시에 다른 소품종과의 유사성을 조사하였다.

가) 한우 성장호르몬 수용체(GH-R) 유전자 전사조절영역의 클로닝

(1) Primer 설계 및 제작

성장호르몬 수용체의 클로닝에 사용된 primer는 기존에 보고된 bovine의 염기서열을 기본으로하여 GenBank에서 상동성 분석을 통해 종마다 상동성이 매우 높은 부분에서 전사조절영역을 증폭하기 위해 primer를 고안했으며, PCR 증폭산물의 클로닝을 위해 각 primer의 5'말단부위에 *EcoRI*제한효소 부분을 삽입하여 primer를 합성하였다.

GHR upper primer 5'-GGAATTCGAGCTGTAGGAGTTGCTTG-3'

EcoR I

GHR lower primer 5'-GGAATTCATGTATGGAAGCAGACCGC-3'

EcoR I

위와 같이 설계된 2종류의 DNA primer를 이용하여 한우 genomic DNA로부터 DNA 단편을 PCR법에 의해 증폭시켰다. 증폭된 DNA 산물의 크기는 예상하였던 크기의 위치에서 밴드로서 확인되었다(Figure 5).

(2) 한우 성장호르몬 수용체(GH-R)유전자 전사조절영역의 subcloning

PCR을 수행한 결과 예상된 길이(성장호르몬 수용체: 802bp)의 증폭산물을 얻을 수 있었다. PCR증폭산물을 1% agarose gel에 전기영동 한 후 gel로부터 DNA를 추출하여 제한효소 *EcoR* I으로 처리한 후 탈 인산화된 pUC18 vector와 16°C에서 18시간 이상 ligation하여 재조합 plasmid를 제작하였다(Figure 6). 제작된 재조합 plasmid DNA는 염기서열 결정법에 의해 염기서열을 결정하였다(Figure 7).



Figure 5. PCR analysis of products of Hanwoo growth hormone receptor gene. M : Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder, Lane 1 : PCR products.

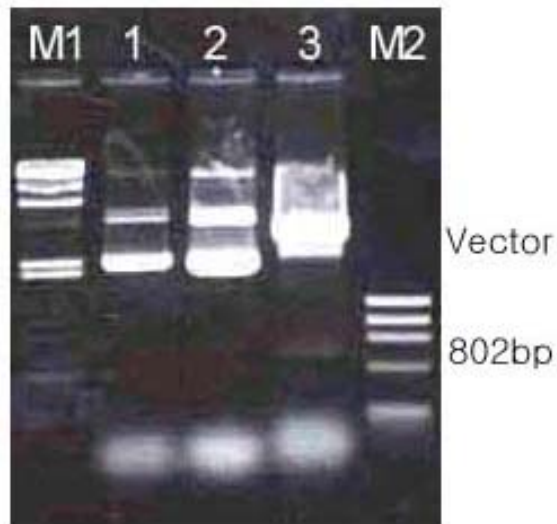


Figure 6. Subcloning of Hanwoo growth hormone receptor(GHR) gene. PCR product of GHR gene were separated from 1.0% agarose gel and ligated to pUC18 vector. Subcloned DNA was digested with *E.coR* I and electrophoresed in 1.0% agarose gel. Lane M1 : DNA size marker of the λ *Hind*III ladder. Lane 1 : pUC18 vector. Lane 2 : subcloned recombinant DNA. Lane 3 : subcloned DNA digested with *E.coR* I. Lane M2 : Φ \times 174 DNA *Hae*III digested ladder.

나) 한우 성장호르몬 수용체(GH-R) 유전자의 다형성 분석

한우에서 성장호르몬 수용체의 전사조절영역의 염기서열을 분석하고 Holstein에서 보고된 염기서열과 비교한 결과, 전사조절영역내 특이적으로 존재하는 TG서열 반복수의 차이가 나타났다. Holstein품종에서 Genbank에 보고한 TG반복수는 20회인데 반하여, 한우에서 클로닝한 성장호르몬 수용체의 TG서열은 17회로 분석되었다. 이에, 소 품종내에서 성장호르몬 수용체의 전사조절영역내 존재하는 TG반복서열의 다형성을 분석하기 위해 MS-typing의 실시를 계획하고, 기존에 보고된 Holstein품종과 한우에서 클로닝한 염기서열 정보를 이용하여 TG반복서열의 인접 위치에서 primer를 설계하였다.

GHR-MS forward 5'-GGTTCGTTATGTGAGGCAATGC-3'

GHR-MS reverse 5'-TTTCTTGGTCACCGCTTGGCAGTA-3'

위 합성된 primer를 이용하여 한우 및 외래소 품종에서 다형성을 검토한 결과 특이적 다형현상은 검출되지 않았다(Figure 8).

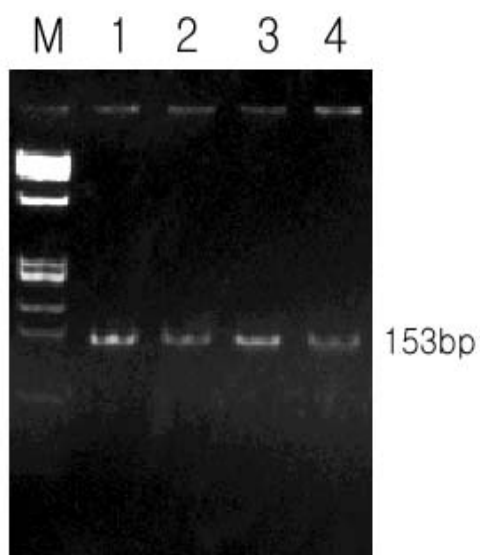


Figure 8. PCR product of GH-R gene were separated from 1.0% agarose gel. M : Φ ×174 DNA *Hae*III digested ladder. Lane 1 : Hanwoo, Lane 2 : Holstein, Lane 3 : Angers, Lane 4 : Charolais.

3) 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자

가) 한우 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자 전사조절영역의 클로닝

(1) Primer 설계 및 제작

소 품종에서 GHRH-R 유전자의 전사조절영역에 대한 염기서열은 현재까지 보고되지 않았으므로, 다형 현상을 분석하기 위해서는 우선적으로, 상위영역에 위치한 전사조절영역의 클로닝이 요구되었다. 한우의 GHRH-R 전사조절영역의 클로닝은 기지영역으로부터 미지영역을 클로닝할 수 있는 LA-PCR기법을 도입하여 실시하였다. 클로닝을 위한 primer는 기존에 보고된 소의 cDNA 염기서열을 다른 종과 상동성을 비교하여 설계하였다.

Primers

C1 primer : 5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3'

C2 primer : 5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'

GHRHR-SR1 : 5'-TGC TGT CCA TGG TGG GAG CTC-3'

GHRHR-SR2 : 5'-GAG CTC GGC GAC AGC TGC CT-3'

(2) 한우 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자 전사조절영역의 subcloning

미 보고된 소의 성장호르몬 분비 호르몬 수용체(GHRH-R)의 전사조절영역을 클로닝하기 위하여, 제놈 DNA를 제한효소에 의한 소화한 후 cassette DNA를 결합한 후 주형으로 이용하는 LA-PCR기법을 선별하여 실시하고 671bp의 증폭 산물을 획득하였다. 증폭된 PCR산물은 클로닝이 용이하도록 pGem T-easy vector에 삽입한 후 형질전환을 유도하였다. 클로닝된 균주로부터 재조합 DNA의 추출은 Wizard SV DNA purification kit를 사용하여 정제한 후 염기서열을 분석하였다(Figure 9).

한우에서 클로닝된 성장호르몬 분비 호르몬 수용체의 전사조절영역은 수 차례 염기서열 재 분석을 실시한 후 671bp의 염기서열을 Genbank에 등록하였다 (Genbank Accession No. AF 267729). 염기서열이 분석된 한우 성장호르몬 수용체 전사조절영역내의 전사조절단백질들이 결합 가능한 영역을 분석한 결과, 다수 위치에 전사조절인자의 결합 가능부위가 존재하였다. 특히, 성장호르몬 수용체의 발현에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 Pit-1 전사조절인자의 결합부위 (516bp~522bp)와, RNA polymerase II를 결합시켜 전사를 유도하는 결정적인 cis-element인 TATA box영역(331bp~345bp)이 전사조절영역내에 존재하는 것으로 분석결과 나타났다. 이 외에도 GATA-1을 비롯하여 MZF-1, AP-1 등의 전사조절인자의 결합가능위치가 분석되었다(Figure 10).

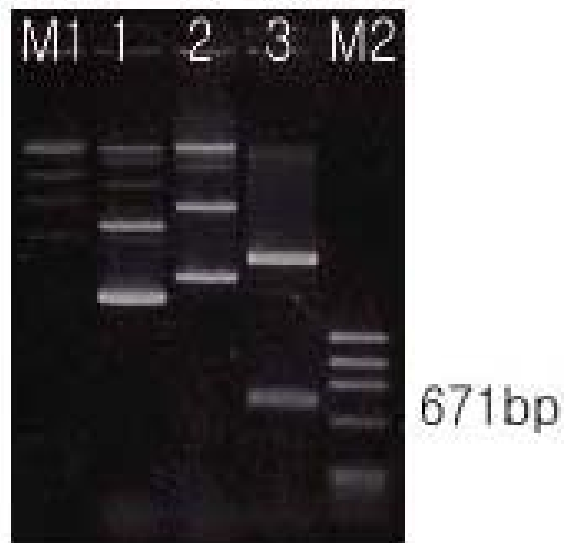


Figure 9. Subcloning of promoter region for bovine growth hormone-releasing hormone receptor(GHRH-R) gene. PCR products of GHRH-R gene were ligated to pGem T-easy vector(Promega) and digested with *EcoRI*. Each samples were electrophoresed in 1% agarose gel. M1 : λ phage DNA, *HindIII* digested. Lane 1 : pGem T-easy vector only. Lane 2 : recombinant DNA. Lane 3 : *EcoRI* digested recombinant DNA. M2 : ϕ 174 DNA *HaeIII* digested ladder.

1 TCCCTTCAGACTTCACCTCGCCATCCATGACTGGTATCCTTGCTGGGAACAAAGACAAGGT
 61 TTTGCTGAAACTATTATCTTCACGACCAGCCGATGGGGATGCATAGGGACTTATGATTGT
 GATA-1 **MZF-1**
 121 GCGTCCTTTTCTAAGATTCTGTTGTCCAGACTCTACTGACACCCTATCCACTTCTGCTG
 181 GGTCCCCAGGGCTCCGAACTCATCCTTCAGCCCGGTGGATGAGGCTGAGATCACAACTAA
 MZF-1
 241 ACTGGGGTCCCCGAGTGTGGACTCAGGCCTTCTTTGCTGAGTCTCCTTCATTTGGGGGGC
 301 CTCAGAGGGCTGGGCTCAGAGAAGAAAATTATATAAAGAATAGTGACCTACTGGGGCAAG
 TATA box
 361 AGGTGTCTCGCAGCTGCCATTTGTCTGTGACCTTGGTAATGTTAGGACAGACATGGGCAG
 AP-4
 421 ACTTACAGACGAAGTCAAGCCCTTCCCGCCAGGAATGCAGAGTCTACCTGAGGCTGTG
 481 GCGGAGCTGGGCATGGTGTCTGAAATCCTGGTGAATATTCAGTGGGTTCTGTCCCCTTC
 Pit-1
 541 ACTAGCTCCTGTCTATGCAAACAGCCACCTGGGAAGGAGAAGCAGAGGGTGTGCTGGCAG
 601 CGGTGACAACAGGGGACAGTGAAGGAACGCAGGGTCACCGAGGCTGACCCAGGCAGCTG
 661 TCGCCGAGCTC

Figure 10. Nucleotide sequence of putative promoter region for Hanwoo growth hormone releasing hormone receptor(GHRH-R). Potential transcriptional regulatory sequences identified by a computer-assisted analysis are underlined.

나) 한우 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R) 유전자의 다형성 분석

성장호르몬(GH)의 분비를 조절하는 GH분비자극호르몬(GHRH)은 시상하부에서 발견되며, GHRH수용체(GHRH-R)는 뇌하수체에서 발견되며 Pit-1이라는 전사조절인자에 의해 조절 받는다. 이러한 GHRH-R의 발현량이 감소하면 성장이 저해된다는 것이 실험을 통해 보고된바 있다.

한우로부터 LA-PCR기법을 이용하여 GHRH-R 유전자의 전사조절영역(-678~-7)을 클로닝하여 염기서열을 Genebank에 등록하였고(AF267729), 이를 기초로 하여 한우 및 외래 품종간의 염기서열 비교분석을 실시하였다. 총 30개체의 염기서열을 비교 분석한 결과 전사조절영역 내 thymine염기(A allele)가 cytosine염기(B allele)로 치환된 새로운 점 돌연변이를 발견하였다. GHRH-R 전사조절영역의 특정한 위치를 분석하기 위해 제한효소인 *BspHI* 을 이용한 제한효소 절편 다형성(restriction fragment length polymorphism : RFLP) 기법을 이용하였다. 한우 77개체 및 홀스타인 10개체를 분석한 결과 한우에서만 cytosine염기로 치환된 것을 발견하였다. 한우의 경우 각 대립유전자에 대한 빈도는 cytosine염기가 0.51, thymine염기가 0.49의 분포로 분석되었다(Figure 11).

유전자 다형성과 각 형질과의 관련성을 분석하기 위해 축산기술연구소 한우 유전능력 평가 보고서를 기초로 실시하였다. 모든 개체의 출생 연도, 지역, 성의 차이 및 도살 월령의 차이 등은 통계적 방법에 의해 모두 보정 되었다. 두 가지 유전자형과 각 도체형질에 대한 유전자 효과는 SAS 일반선형모델에 의한 최소자승법으로 분석하였고, 분석모델은 다음과 같다.

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

여기서, Y_{ij} : 측정치, μ : 전체평균, g_i : GHRH-R 유전자형, e_{ij} : 오차

SAS 일반선형모델을 이용하여 분석한 결과 BB 유전자형이 AA 유전자형이나 AB 유전자형 보다 3개월령 체중과 근내지방도에서 더 높은 것으로 나타났다(Table 4, 5). 쇠고기 육질 측면의 특성 중 근내지방도(marbling), 육색(meat color), 지방색(fat color), 조직감(meat texture)등이 있다. 이러한 특성 중 근내지방도가 가장 높게 평가되고 있으며, 한우의 육질 등급판정에 중요한 요인으로 작용된다. 위 GHRH-R 유전자의 다형현상을 이용하여 근내지방도가 높은 집단과 낮은 집단간의 구별이 가능할 것으로 생각되어지며, 이를 활용하기 위한 차기 연구 수행이 필요할 것으로 생각된다.

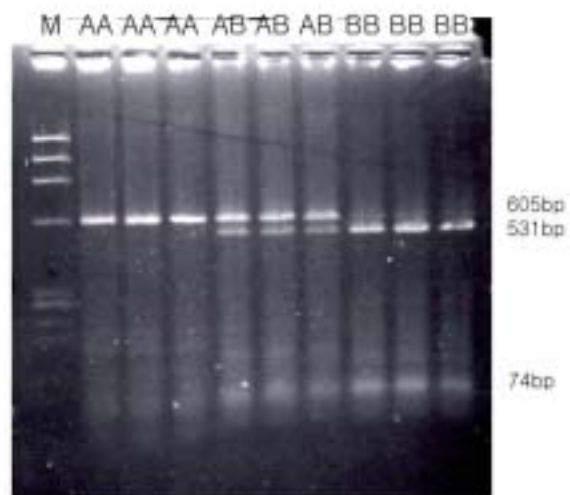


Figure 11. Genetic variants in bovine GHRH-R promoter region following PCR-RFLP analysis using *BspHI* restriction enzyme consisted of three genotypes (AA, AB and BB). M : Φ 174 DNA *HaeIII* digested ladder.

Table 4. Means of estimated breeding value(EBV) for growth and carcass traits of 77 Korean native cattle(Hanwoo).

Traits ^a	Mean	SD	Minimum	Maximum
W0(kg)	0.239	0.948	-1.630	2.480
W3(kg)	1.094	3.500	-7.465	11.311
W6(kg)	2.164	9.097	-24.350	31.779
W12(kg)	8.184	11.955	-25.610	38.320
W18(kg)	7.719	11.600	-24.820	37.591
CW(kg)	2.850	7.659	-10.796	25.029
LMA(cm ²)	0.447	1.486	-2.648	5.780
BF(cm)	0.446	1.559	-5.370	6.530
MS(score) ^b	0.155	0.399	-0.538	1.464

^aW0 : birth weight, W3 : weight at 3 month, W6 : weight at 6 month, W12 : weight at 12 month, W18 : weight at 18 month, CW : carcass weight, LMA : longissimus muscle area, BF : backfat thickness, MS : marbling score.

^bMarbling is scored on a scale from 1 to 5 with 5 being associated with the most marbling.

Table 5. Least squares means(LSM) and standard error(\pm SE) of genotype effects for GHRH-R gene promoter *Bsp*HI on estimated breeding value(EBV) for growth and carcass traits of 77 Korean native cattle(Hanwoo).

Traits ^a	Genotype			P ^c
	AA(24) ^d	AB(32)	BB(21)	
W0(kg)	0.542 \pm 0.191	0.134 \pm 0.165	0.053 \pm 0.205	NS ^e
W3(kg)	0.465 \pm 0.692 ^f	0.462 \pm 0.599 ^f	2.776 \pm 0.739 ^g	0.033
W6(kg)	2.915 \pm 1.834	-0.084 \pm 1.589	4.732 \pm 1.961	NS
W12(kg)	9.886 \pm 2.458	6.754 \pm 2.163	8.354 \pm 2.628	NS
W18(kg)	9.774 \pm 2.381	6.430 \pm 2.062	7.319 \pm 2.546	NS
CW(kg)	3.124 \pm 1.618	2.976 \pm 1.393	2.365 \pm 1.693	NS
LMA(cm ²)	0.553 \pm 0.314	0.386 \pm 0.270	0.424 \pm 0.329	NS
BF(cm)	0.717 \pm 0.325	0.501 \pm 0.280	0.070 \pm 0.340	NS
MS(score) ^b	0.056 \pm 0.079 ^f	0.084 \pm 0.069 ^f	0.369 \pm 0.083 ^g	0.013

^aW0 : birth weight, W3 : weight at 3 month, W6 : weight at 6 month, W12 : weight at 12 month, W18 : weight at 18 month, CW : carcass weight, LMA : longissimus muscle area, BF : backfat thickness, MS : marbling score.

^bMarbling is scored on a scale from 1 to 5 with 5 being associated with the most marbling. ^cP : Probability of *F*-test for genotype effect. ^dNo. of animal.

^eNo significance ($P>0.05$), ^{f,g}Column means with different superscripts differ($P<0.05$).

2. 한우 prolactin(PRL)과 그 수용체(PRL-R) 유전자

가. 서론

다양한 종의 척추동물에서 85가지 이상의 기능을 가지는 prolactin은 1928년 rabbit에서 비유의 원인이라는 것에 기초하여 발견되었다(Stricher P. 등 1928). 1932년 sheep pituitary에서 정제하여 prolactin이라 명명하였으며(Riddle O. 등 1932), 1971년 human에서 정제하여 growth hormone(GH)과 구별하였다(Lewis UJ. 등 1971; Hwang P. 등 1972). 1980년대 초에 cDNA와 유전자가 클로닝되고 염기서열이 밝혀짐으로써, GH와 chorionic somatomammotropin(CS) 유전자를 포함하는 multigenic family의 member로 밝혀졌다(Cooke NE. 등 1980; 1982). Prolactin cDNA는 human, rat을 비롯한 대부분의 종에서 분리되었으며, 모두 염기서열이 결정되었다. 결정된 염기서열의 구조는 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되었으며, human에서 이 유전자는 lymphocyte와 pituitary에서 특이적으로 발현되는 서로 다른 promoter와 exon I을 가진다는 것이 특징이다. 또한 bovine에서는 조직 특이적으로 발현되는 5' 영역은 보고되지 않았으나 exon I과 promoter가 보고되었고(Camper, S.A. 등 1984), 이후 promoter를 포함하여 그 상류의 전체 조절 부위(2.2Kb)가 보고되었다.(Wolf J.B. 등 1990)

그러므로 우리는 Genbank상의 Blast program을 이용한 상동성 분석을 통해 보고된 5' 전사조절영역 전체와 promoter, exon I을 포함하여 첫 번째 intron 부위를 포함하도록 2개의 primer를 작성하여 한우 간 조직에서 추출한 제놈 DNA를 이용하여 DNA 단편을 PCR 증폭하였으며, promoter와 exon I 부위만을 포함하는 2개의 internal primer를 같은 방법으로 재 작성하여 PRL 유전자임을 PCR방법을 통해 확인하여 그 염기서열을 분석하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 한우 prolactin 유전자

가) 한우 prolactin(PRL) 유전자 전사조절영역의 클로닝

(1) Primer 설계 및 제작

한우 prolactin 유전자 promoter 클로닝에 사용된 primer는 기존에 보고된 bovine prolactin 5'-영역의 상류 부위와 exon1의 염기서열을 모두 포함하는 첫 번째 intron상에서 약 2.4kb를 증폭하기 위해 각 34mer의 primer를 고안했으며, 이 증폭 산물이 한우 prolactin 유전자임을 확인하기 위해 중간부분에 2개의 internal primer(17mer)를 같은 방법으로 제작하였고 증폭산물의 예상되는 크기는 약 490bp이다.

PRL1 Forward primer:5'-ATAGGCAGTGACATATGAGAAAGACAGATAAGAC-3'

PRL2 Reverse primer:5'-GCTAGTTCTTCTAAACTCTGTAATCCTGAAACCT-3'

PRL3 Internal Forward primer : 5'-CTTGACTTCAGCCAGCA-3'

PRL4 Internal Reverse primer : 5'-TTTGCTGTCCATGGTGG-3'

(2) 한우 prolactin(PRL) 유전자 전사조절영역의 subcloning

한우의 간조직 20mg을 선발하여 추출한 제놈 DNA를 0.8% 아가로스 젤에서 확인하였다. 추출한 제놈 DNA를 주형으로 PRL forward primer와 reverse primer를 이용하여 PCR 증폭반응을 수행한 결과 약 2.4Kb의 한우 PRL 유전자의 전사조절영역의 단편을 증폭할 수 있었다. 또한 이 증폭산물이 PRL 유전자임을 확인하기 위하여 internal forward primer와 internal reverse primer를 1차 PCR 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행한 결과 예상되는 크기인 490bp의 단

편을 증폭할 수 있었다(Figure 12). 이러한 결과로 우리가 증폭한 1차 PCR 증폭산물이 PRL 유전자의 5'-전사조절영역임을 확인할 수 있었다. 우리는 또한 증폭한 1, 2차 PCR 증폭산물을 아가로스 젤로부터 회수하여 각각 Easy T-Vector (Promega)와 PT7 Blue T-Vector(Novagen)에 클로닝하였다(Figure 13).

나) 한우 prolactin(PRL) 유전자 전사조절영역의 다형성 분석

한우 prolactin 전사조절영역의 염기서열을 바탕으로 2개의 특이적 DNA primer를 제작하여 511bp 크기의 DNA단편을 한우집단으로부터 증폭하여 염기변이를 검색하였다. 분석시료는 다유성 및 저유성 한우집단에서 각 20개체씩 선발하여 총 40개체로부터 PRL 전사조절영역을 증폭하여 전 염기서열을 결정해서, 그 상동성을 비교분석 하였다. 분석결과 40개체에서 PRL 전사조절영역의 염기서열이 모두 동일하다는 것이 밝혀졌다. 이 결과는 기존에 보고된 다른 소품종(Holstein)의 염기서열과도 100%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다. 즉 PRL 유전자의 exon1(826bp) 일부와 전사개시점으로 부터 상류영역인 397bp내에서는 선발집단간 뿐만아니라 분석된 한우개체간에도 어떠한 염기변이도 관찰되지 않았다. 즉 PRL 전사조절영역의 염기서열은 조사된 다른 유전자와는 달리 소품종간 혹은 같은 소품종내에 매우 잘 보존되어 있음을 알 수 있다.

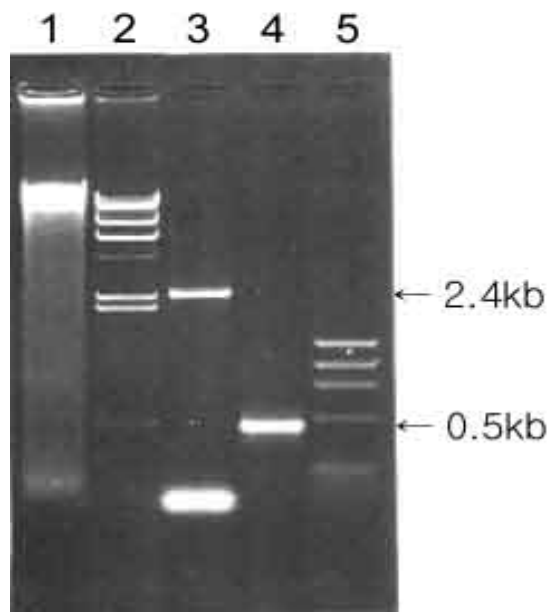


Figure 12. Hanwoo liver genomic DNA and PCR products of prolactin 5'-regulatory region. Lane 1 : Genomic DNA isolated from Hanwoo liver. Lane 2 : DNA size marker of λ *Hind* III. Lane 3 : PRL PCR products. Lane 4 : 2nd PCR products by using internal primers.

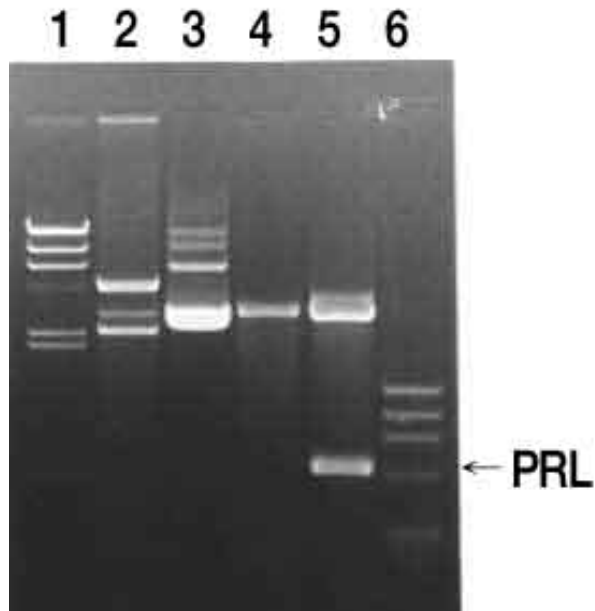


Figure 13. Subcloning of Hanwoo prolactin 5'-regulatory region. PRL PCR products ligated to pT7 Blue T-vector. Lane 1 : DNA size marker of λ /*Hind* III. Lane 2 : pT7 Blue T-vector. Lane 3 : Subcloned recombinant DNA. Lane 4 : pT7 Blue T-vector digested with *Eco*R I and *Pst* I. Lane 5 : Subcloned DNA digested with *Eco*R I and *Pst* I.

2) 한우 prolactin 수용체(PRL-R) 유전자

Prolactin 수용체(PRL-R)는 세포막에 존재하는 cytokine receptor superfamily에 속하여(Kelly 등, 1991) prolactin의 효과를 그 목적세포에 전달하는 기능을 수행한다. PRL-R는 다양한 종에서 클로닝되었고(Boutin 등 1988, 1989, Davis, Linzer 1989, Shirota 등 1990, Moore, Oka 1993), PRL-R의 cytoplasmic domain의 길이에 차이에 의한 최소 2가지의 cDNA가 밝혀졌다. Long Form의 PRL-R은 prolactin의 유선조직에서 유즙 단백질의 발현을 자극하는 기능을 중개하는 것으로 보고되었다(Rui 등 1992). 그러나 Short Form의 PRL-R의 생리적 기능은 아직 명확하지 않다.

1988년 prolactin 수용체(PRL-R) cDNA가 처음 클로닝(Boutin 등 1988)된 이후 전사조절영역의 클로닝은 1996년 rat에서 계놈상의 전사조절영역이 단백질 번역개시 부위로부터 약 60kb 이상의 거대한 크기를 가지며, 세 개의 부분으로 나뉘어 조직 특이적으로 복잡하게 발현되는 것으로 처음 밝혀졌다(Zhangzhi 등 1996). 또한 1999년 human에서도 2개의 type의 exon1과 전사조절영역을 포함하는 전체 계놈 유전자가 클로닝 되어 보고되었다(Zhangzhi 등, 1999). 이렇게 계놈 상에서 전사조절영역의 클로닝은 단지 rat과 human에서만 수행되었고 다른 종에서의 연구는 거의 없었으며, 소의 경우에는 1992년 성장호르몬 수용체와 prolactin 수용체를 구별하기 위해 처음 cDNA를 클로닝(Patricia 등 1992)한 이래, long form과 short form을 구별 짓는 영역의 클로닝(C. Bignon 등 1997)이 수행되었을 뿐 전사조절영역에 대한 클로닝은 단백질 번역개시에서 상류부위는 단지 87bp만이 밝혀진 것 이외에는 전사조절영역에 대한 어떤 연구도 보고되지 않았다. 이렇게 PRL-R 유전자의 5'-영역에 대한 정보가 부족하고 그 크기 또한 rat나 human에 의거해 매우 커다란 크기로 이루어져 있으리라 예상되므로 우선 한우에서 조직 특이적으로 발현되는 PRL-R mRNA의 5'-말단을 밝히고, PRL-R 유전자의 5' 영역의 계놈 구조를 밝히는데 주력하였다. 이렇게 밝혀진 5'-말단의 염기서열과 계놈 구조를 기초로 한우 PRL-R 유전자의 발현을 조절하는 promoter를 포함하는 전사조절 영역의 염기서열을 밝히는 것을 목적으로 이 연구를 수행하였다.

가) 한우 prolactin 수용체(PRL-R) 유전자 전사조절영역의 클로닝

(1) 한우 PRL-R cDNA의 5'-말단 단편의 클로닝

한우의 간, 난소와 유선조직 0.5g을 선발하여 Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform 법을 이용하여 추출한 Total RNA를 formaldehyde-아가로스 겔에서 전기 영동한 결과 28S와 18S ribosomal RNA 밴드를 확인 할 수 있었다(Figuer 14). 추출한 Total RNA를 Oligo dT Cellulose Column을 통해 Poly(A)⁺ mRNA를 분리하였고 RACE-PCR 방법에 의해 3개의 Reverse와 2개의 Forward Primer를 사용하여 296bp의 재조합된 cDNA 단편을 증폭하였다(Figure 15). 이렇게 증폭한 한우 5'-말단 단편을 아가로스 겔로부터 회수하여 PT7-Blue T-Vector (Novagen)에 클로닝하였다(Figure 16).

(2) 한우 PRL-R cDNA의 5'-말단의 염기서열 결정

클로닝한 PRLR cDNA의 5'-말단을 포함하는 RACE PCR 증폭단편을 Big dye kit와 자동염기서열 분석기(Perkin-Elmer)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 이렇게 결정한 염기서열을 Genbank의 Blast Program을 이용하여 다른 종의 5' 영역과 DNA 상동성을 분석하였다. 그 결과 약 62bp의 새로운 염기서열을 얻을 수 있었으며 이 새로운 염기서열은 red deer의 5' 영역의 염기서열과 80%의 상동성을 나타내었다(Figure 17).

Prolactin 수용체의 전사조절영역은 인간과 쥐에서 적어도 60kb이상의 크기로서 exon1이 세부분으로 분리되어 각각에 promoter가 있어서 조직에 따라 발현양상이 달라진다. 하지만 소에 있어서는 단지 cDNA 염기서열이 일부 밝혀져 있을 뿐이다. 그 동안 클로닝된 유전자 영역은 기존에 보고되지 않았던 intron3 영역을 포함한 567bp외에 cDNA의 5' 비번역부위로서 62bp가 새로이 클로닝되어 염기서열이 밝혀졌다. 그러나 전사조절영역의 클로닝은 다른 종에서 보고된 염기서열을 기초로 제작된 PCR primer에 의한 실험과 소의 cDNA 염기서열에 의한 게놈 library의 실험이 여러 차례 시도되었으나 전사조절영역의 결과를 얻을 수 없었다.

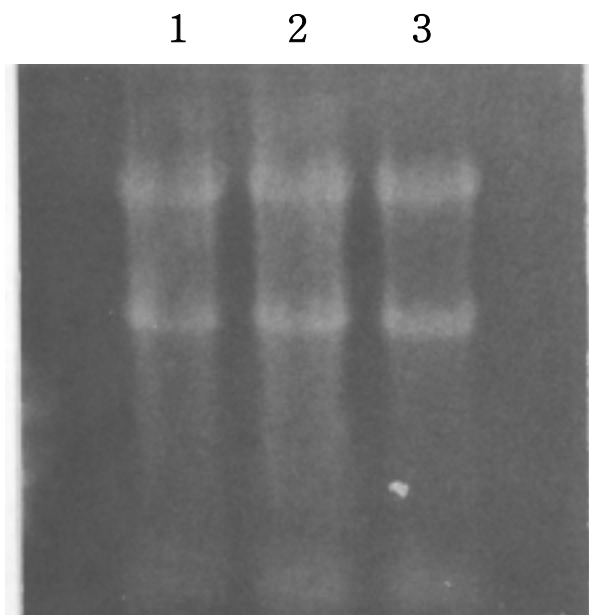


Figure 14. Electrophoresis of RNA isolated from Hanwoo liver(lane1), ovary(lane2) and mammary tissue(lane3). RNA preparations(20 μ g) were electrophoresed in formaldehyde-agarose gel(1.0%).

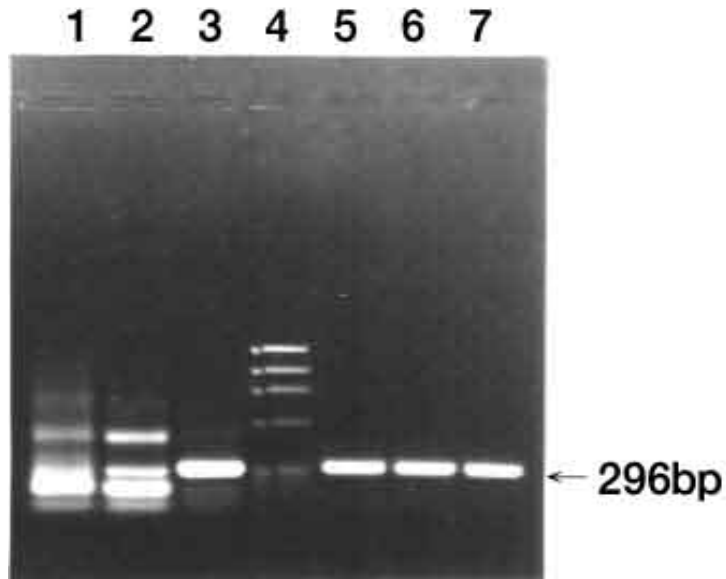


Figure 15. PCR products of Hanwoo prolactin receptor cDNA 5'-end. Lane 1 : PRLR PCR products of PRLR gene from Hanwoo liver synthesized by AMV RT. Lane 2 : PRLR PCR products from Hanwoo mammary gland synthesized by AMV RT. Lane 3 : PRLR PCR products from Hanwoo ovary synthesized by AMV RT. Lane 4 : Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder. Lane 5 : PRLR PCR products from Hanwoo liver synthesized by Tth polymerase. Lane 6 : PRLR PCR products from Hanwoo ovary synthesized by Tth polymerase. Lane 7 : PRLR PCR products from Hanwoo mammary gland synthesized by Tth polymerase.



Figure 16. Subcloning of Hanwoo prolactin receptor cDNA 5'-end. PCR products of PRLR gene ligated to pT7 Blue T-vector. Lane 1 : DNA size marker of λ /*Hind* III. Lane 2 : pT7 Blue T-vector. Lane 3 : Subcloned recombinant DNA. Lane 4 : Subcloned DNA digested with *EcoR*I and *Pst*I. Lane 5 : Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder.

1 TCCTGCTACTTTAGCAAGAAGCACACCTCCAGAGTAGGAGCCAGGCGATA
 51 GACAACAGGAAGGCCAGCTAAAGAACGCTTCTATTCATGGAGGCAAATG
 101 CTGAGGATACTTTCCAAGTGAACCCTGAGTGAACCTCTAATATATTTATT
 111 TCCTGTGGAAAGAGGAAGGAGCCAACATGAAGGAAAATGCA

```

HW   1 agagtaggagccaggcgatagacaacaggaaggcc-cagctaaagaacgcttctattcat
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CE  43 agagtgggagccaggtgacagacgacaggaaggccacagctaaagaacgcttctgttcat
HW  60 ggaggcaaatgctgaggatactttccaagtgaaccctgagtgaacctctaataatattat
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CE 103 ggaagcaaatgctgaggatgctttccacatgaaccctgagtgagcctgtgata----tat
HW 120 ttcctgtgaaagaggaaggagccaacatgaaggaaaatg 159
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
CE 159 ttcctgtgaaagaggaaggagccaacatgaaggaaaatg 198
  
```

Figure 17. DNA sequence of Hanwoo Prolactin receptor cDNA 5'-end. New exon is represented Black box. Sequences are aligned with the published C. elaphus sequences.

3. 한우 IGF- I 및 IGF- I 수용체(IGF- I -R) 유전자

가. 서론

IGF-I(Insulin like growth factor-I)은 7.5kDa의 분자량을 갖는 70개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 호르몬으로서, 뇌하수체 전엽(anterior pituitary)에서 생산되는 성장호르몬(growth hormone, GH)의 자극에 의해 주로 간 조직에서 생산된 후 표적조직으로 이동하여 수용체와 결합하여 기능을 수행한다. 인간의 IGF-I 유전자는 12번째 염색체의 long arm에 70kb에 걸쳐 존재하며 6개의 exon과 5개의 intron으로 구성된다. 특히, IGF-I의 전사조절영역은 다수의 전사개시점(transcription initiation site)을 포함하며 조직 특이적인 발현(tissue specific expression)의 특징을 나타낸다.

마우스에서 연구된 바에 의하면, IGF-I mRNA는 생후, 간을 제외한 거의 모든 조직에서 발현 양이 감소하지만, 간에서의 mRNA양은 출생 후 모든 조직 중에서 가장 높은 수준으로 발현되고 이에 따라 혈중 IGF-I의 농도도 함께 증가한다. IGF-I은 모든 세포의 발달단계에서 성장과 분화에 중요한 역할을 담당하며 특히, 출생 후 장기간의 성장에 대한 GH의 작용을 중재하여 다양한 조직에서의 특이적 분화작용을 수행함이 연구되었다. De Boer G 등(1991)은 Holstein품종에 외인성 성장호르몬(bST)를 투여한 결과 혈중 IGF-I의 농도가 급격히 증가함을 보고하였다.

IGF-I의 생물학적인 기능은 주 수용체인 IGF-I 수용체(Insulin-like growth factor-I receptor)를 통한 세포내로의 신호도입에 의해 이루어지는데, IGF-I 수용체는 IGF-I이나 insulin뿐 아니라 IGF-II와도 결합하여 기능을 수행할 수 있는 펩타이드 수용체로서, ligand의 신호를 세포내로 도입하는 tyrosine-kinase 활성을 갖는 막관통 단백질(transmembrane protein)이다(Robert F. Krywicki 등 1992).

지금까지 염소나 양과 같은 다른 반추위동물에서는 IGF-1의 전 전사조절영역이 클로닝되어 염기서열이 보고되었으나 소에서는 부분적으로 클로닝 되었을 뿐 다수의 전사개시부위(exonW, exonI, exonIA)를 모두 포함하는 영역은 보고가 되지 않았다. 한우 IGF-1 유전자의 다수 전사개시부위를 포함한 전 전사조절영역을

클로닝하기 위해 우선 exonI 상류에 위치한 1189bp를 클로닝하여 염기서열을 분석하였고, 이를 바탕으로 하류에 해당하는 전사조절영역을 LA-PCR법으로 2892bp 단편을 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 이로 인하여 한우로부터 여러 전사개시부위를 포함한 IGF-1 전사조절영역(약 4kb)의 구조가 밝혀졌다.

나. 결과 및 고찰

1) 한우 IGF- I 유전자

가) 한우 IGF- I 유전자의 클로닝

(1) Primer 설계 및 제작

IGF-I은 긴 전사조절영역내에 다수의 전사 개시점을 포함하는 것으로 보고되었기 때문에 이들 영역을 모두 포함하는 유전자 단편을 클로닝하는 것이 요구됐다. 이 영역을 클로닝하기 위해 반추위동물 중 염기서열이 보고된 양과 염소의 유전정보를 이용하여, 전사조절영역을 약 4kb로 예상하고 2영역으로 분할한 후 클로닝을 실시하였다. 먼저, 가장 앞쪽에 위치한 전사조절 영역에 해당하는 약 1.2kb의 영역의 DNA를 클로닝하기 위해 종간의 상동성을 이용하여 primer를 설계하였으며, IGF-I의 exon1의 상류에서 exon2에 이르는 약 2.8kb 크기의 유전자 단편의 증폭을 위한 primer는 Genbank에 보고된 염소와 양의 염기서열을 이용하여 설계하였다.

1.2kb PCR primers,

IF-1 (Forward) : 5'-AAGGAATCCCTCTCATGACACA-3'

IF-2 (Reverse) : 5'-TGAGAATTCAATGGAAGACAGCG-3'

2.8kb PCR primers,

IF-3 (Forward) : 5'-CCAGGTTCTAGGAAATGAGATCATTTCCCCT-3'

IF-4 (Reverse) : 5'-GGAATATCAATTGGTTCCAGATGTCTGGGT-3'

(2) 한우 IGF- I 유전자의 subcloning

LA-PCR기법을 실시하여 증폭된 PCR산물을 T-vector에 삽입한 후 XL-1 Blue 균주에 형질전환 시켜 클로닝하였다(Figure 18). 클로닝된 재조합 DNA는 염기서열 분석반응을 실시한 후 Genbank에 보고된 다른 반추위동물과 상동성을 비교하여 IGF-I 전사조절영역임을 확인하고, 유전자 배열을 분석하여 전사조절영역내의 각 exon의 위치 및 구조를 분석하였으며(Figure 19), 새롭게 밝혀진 염기서열은 Genbank에 등록하였다(AF 404761).

나) 한우 IGF- I 유전자의 다형성 분석

기존의 실험을 통해 새롭게 얻어진 IGF-1 전사조절영역(약 4kb, AF404761)의 염기서열을 바탕으로 각 개체간 비교분석을 위하여 Exon I 및 Exon IA를 포함하는 영역을 각각 약 450~550bp로 분할하여 primer를 제작하였다(Figure 20). 한우 및 외래소 품종 총 60개체를 선발하여 각 단편을 증폭한 후 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 비교분석 한 결과 새로운 점 돌연변이는 관찰되지 않았다. ExonIA 및 exonI의 상류영역은 다형성 분석결과 모든 개체에서 모두 동일한 염기서열로 보존이 잘 되어 있었으며, Genbank상에 등록된 *Bos indicus* 품종의 염기서열과 한우 전사조절영역을 비교한 결과 한우 및 외래소의 분석된 개체모두가 동일한 염기서열을 가지고 있다는 것이 확인되었다.

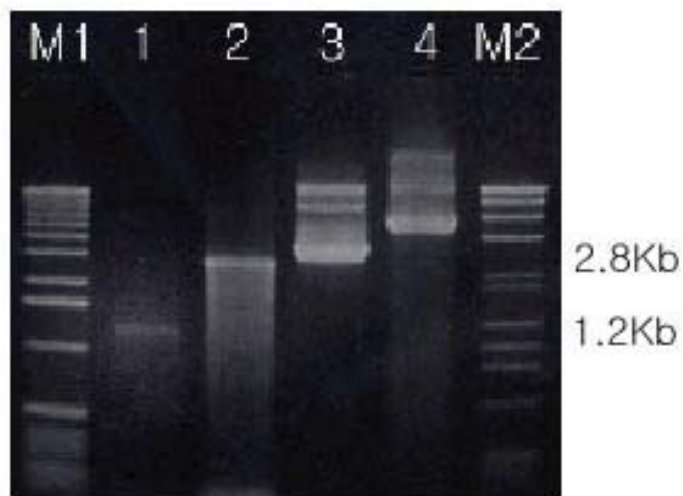


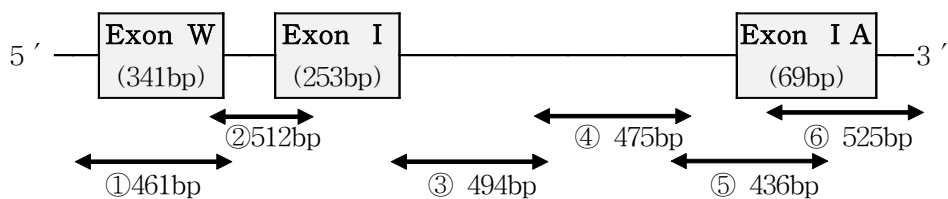
Figure 18.

Subcloning of promoter region for Hanwoo IGF-I gene. Each PCR products were ligated to pGem T-easy vector(Promega) and electrophoresed in 1% agarose gel. M1; 1kb ladder(Gibco BRL), Lane 1; 1.2kb PCR products. Lane 2; 2.8kb LA-PCR products. Lane 3; 1.2kb PCR products ligated recombinant DNA. Lane4; 2.8kb PCR products ligated recombinant DNA. M2; λ -phage DNA, *Hind*III digested and Φ 174 DNA *Hae*III digested ladder.

1 CCCTCTCTGACACACGCTCCTCCCCATCCTGGATCCTCAGTAGTTTCACTTCCCTGTC
61 TTTCCAGAGAGAGTGTGCACTTTTTCATATTTTTAAAAGCACACATCCCACCACATGACAG
121 TGCTGTTTTCTCTCTGTCTCTGCCACTTGGTTGAAAGCCCCCTGTGATGTGTGTAAGTGG
181 GCACACAGTAGGAACGTACTCACTGAATGCTGAATATAGTGCATTGAAACGGCATCACTT
241 CTCATGTCTAAGTGGCTTTCTCAAAGGTACACACTGCCCCACGTTTAATCACAGAGAAG
301 GCTTGAGTAAACTCAACCCCTTTTCAAACCAATCAGGTTTTCTTTGAGGGCACCCACC
361 TCTGCAAACAACCTCCTGGCCATGGCCATAAAGACCCAGAGAAGAGTTTCAAGCAAACCT
421 TTGTTTTTAGTGAAGTGTGAGGATCACTGTGTCCCCTGAGAATCAAGAGGGGAGAAATAC
481 AACATCCAGGCTATTCCCACCATTCAGAAAACCATGGCCCAATAACCCAGGAAAAGT
541 GGGATGTCTAACCTGGGCTTTTGAATCTTATTTTCATAATCCACTTTCTTATCTCCTCCT
601 TCACAAAAGTATGAGAAATTGGTACAACCTATCGACAAAAGATCACAACCTGATCCTC
661 AATGCAAAGGCAAGTATACATTATAAATAGCAAAACAGCTGGCTTGGACCATGTTGCTGG
721 CCACTCATCCAGCTGAGAGATTTGAATGACATCATAACCCCTTGAGAGGGTATTGCTAGCC
781 AGCTGGTGTATTTAGAATACACAAAATGGGGGAAAGAAAATGCACTCATGTGCACACA
841 CACACAAATACACACACACACACACACAGGTTCAAGTTATGCAGAAAAATATGAACAA
901 TGA AAAAATCATTTGCCCTCAGATGCCCTTCCCCTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGG
961 GGGCCAAGCAGCAGAGTAGAAGGAAGGAAGAAAAGATTTGATTTTATTTTTTCAGTTGG
1021 CTTTACAGCTCAGCAAATCTTTGCCCTGTCGTGGGCAAAAAGCATGAGACAGTGTCTGT
1081 AGGGGAGCCAATTACAAAGCTGCCTGCCCTTTCCAGGTTCTAGGAAATGAGATCATTCC
1141 CCTCACTTGGCAACCAGGACGAGGGGTCATCCCAGCGCTGTCTTCCATTCCAGTTCTAG
1201 GAAATGAGATCATTCCCCTCACTTGGCAACCAGGACGAGGGGTCATCCCAGCGCTGTCTT
1261 CCATTCTAGTTTACCCAGTCGTTTGAGGGTTAAAATCATAGAGTAGGCTTGTAGATGGTC
1321 TTTTTTTCATTTCTGTTTTTTAAATTTTGTGTTGGCTCTGGAATATAAAATGCTCGCC
1381 CATCCTCTACGAATATTCTTTTCATACGGGTAAGGTGTATTAGCAGATGTGTGTCTTC
1441 ACGCCCGGTAGAAAGTTAATCAGAGGACAGCATCAGTATTTAATGTCTGCTCCTCTTGT
1501 CACTAACACACATCCTTTTAAAGGAAAAAATGCTTCTGTGCTCTAGTTTTAAATGCAA
1561 AGGTATGATGTTATTTGTCACCATGCCCAAAAAGTCCTTACTCGATAACTTTGCCAGAAG
1621 AAGGAGAGAGAGAGAAGGCAAGCCGATAACTTTGCCAGAAGAGAGAGAGAGAGAAGGC
1681 AAGCGTTCCCCAGCTGTTTCTGTCTACAGTGTCTGTGTTTTGTAGATAAATGTGAGGA
1741 TTTTCTCTAAATCCCTCTTCTGTTTGCTAAATCTCACTGCTACTGCTAAATTCAGAGCAG
1801 ATAGAGCCTGCGCAATGGAATAAAGTCCCTCAAATGAAATGTGACATTGCTCTCAACAT
1861 CTCCCATCTCCCTGGATTTCTTTTTGCCTCATTATTCCTGCTAACCAATTCATTTCCAGA
1921 CTTTGCACCTCAGAAGCAATGGGAAAAATCAGCAGTCTTCAACCCAATTTTAAAGTGC
1981 TGCTTTTGTGATTTCTGAAGGTAATATTTCTTACTCTTTGAAGTCATTGGGGAAATTT
2041 CTTTAAATCTGCTTAGAAATGTGTGACTGTTTGTCTTTCTTCACTTTAGAAATTTTCAAT
2101 GTTTCGGCACTGGGAGTTATTTATAAATGCTGAATATGCAATTCTGTGGGATCTGAAAA

2161 AATAGCTCCGGGAGATAAAATGCCTTTGCACAGATATCTGTATGAGTAAAACTATTGCAA
 2221 GGTACTTATGCTAAATCCTCCACTTCTTCAGGGCTTGAGTGGTGCATTATAGAAGATTCC
 2281 CTTTTCTTCAGGGCTTGAGTGGTGTGATTATAGAAGATTCTTTAAATCCTGTCTATGGT
 2341 TAAGGGCTATAGGGCATGGATATGAACCTTTGGATTTTTTTTGCAGGTGCAGATGTTTTA
 2401 TTTTTAAGACCATGTTTCATGTGTATGTAGGACTGTGTGTGGTTGTGTGTGTGTGTGTG
 2461 TGTGTAACCTGCCAGGACTTTTGATTACAAGGCATGCCACATACAAAGAGTTACGTTTTA
 2521 AATGATATTAAGCTTTTAAATATGATCTTTGGAGCTAAGGTCCCGGAACCTCTCTGCACTT
 2581 ATGCCCAGAGAGTCAAAGTTAGAGTGAAGTTTCATTTTCATCTTCTGAAAAAGAACTCCTT
 2641 AAGAAGCTCCTGCTGACCTTGCATATTCGGATAATTTAAACAAATGCACACTGTATATGGA
 2701 AAGCGGAACCTTCTAGCAACTGCTATTCCAAGTTTTTTCTTTTGAAGAGGACTCTCAGGG
 2761 GCGAAGTTTGGACTGGGGTTTTGTGTTGTAACGCGGATTTTGTATTTGGGATTGTAAA
 2821 GTCTCTTTAGGTAATTTGGCTAGCGTTGCAATGCACTGAATTGTAAAGTCTCTTTAGG
 2881 TAAATTTGGCTAGCGTTGCAATGCACTGACTTCGCCTTTCCAATAACTGGCCCTAGTTC
 2941 AAGTTTCCATTCTCAGCAAATTATATCTTTCAAGACTTGATTTTTCCAATTTGCAAGCA
 3001 TTTTTAAGCTGCTGCTACTGGCTCCCGATGCAATTGCCTGTGGGCTCAATTCATGATAC
 3061 GTCCCTACCGCTTAGTCCAGCACTCGTTTGCCGCTTTCAACTACTCCACCACTACGACTT
 3121 TTCTTAGTCAAGTCAGTGGCTTAGGAGTTAAGAATACATCCTTGTCCGGGCACCTGATCCT
 3181 GCCGCCCTTGAGATGACAAGATGCACACTGGCTACCTTGCTTTTAAAAGAAATGAAGTCA
 3241 GTATACACATATGCTATATGGTCTGACAGCTGGGGATTTTGCTTCCCAACTTAGACTATC
 3301 CAAAAGGGGCTGTGTGGTGTATCTCTGCATTAATTACAGGTTTGGAAAACCTCAAATG
 3361 AACTTTCCATGCTGTGTATGCTGAACCTTTTCAGAAGTAGAGCTAGCTAGCCATAAGTTGT
 3421 TGCTTTTTCTGTACTTGGAGCAGGAAGTGGTTTCAGGGAGCTACGTGGTTCTTTCAAAT
 3481 GTAATTCATGAGTAAAGGTGTCTGCCAGGCACAGCTCACAAGCTGATAGGAAGCTACGT
 3541 GGTTCTTTCAAATGTAATTCATGAGTAAAGGTGTCTGCCAGGCAGAGCTCACAAGCTGA
 3601 TTGTAAGTGTGAGTCTCAAGATATTTCCAAGTGTGAGTCAAGGGAAAGAGGGCACAGGG
 3661 GAGGACTGGAGTTTCGGCCCTGTCCAGGACGGGCTACAATAGGCACACGATGGAATCG
 3721 GTGGCTTGATTGGGAAGAGAAGATTGACTCAAATCCCAGCCGTGCAATTTGTTTATTGTC
 3781 TGAATGGACAAAAGGCAGTTACCCAGGCTCATAGCATACCTGCCTGGGTGTCCAAATGTA
 3841 ACTAGATGCTTTTCAAACCCACCCACAAAGCAGCACATGTTTTAAGTCTCAGTTTTT
 3901 CTATTCACATCAGTCTCATAATACCCACCCTGACCTGCTGTAAAAGATCTGGAACAAACA
 3961 AAAATGGTTACACCTACAGTGAGTATTTCTTGACTATTGCCCTCAAATTTTGTGGGCA
 4021 TTTTTATTATAACCCAGACATCTGGAACCAATTGATATTCC

Figure 19. Nucleotide sequence of cloned promoter region for Hanwoo IGF-I gene. This region contained three exons and multiple transcription initiation sites.



- ① IGF1-1F : 5' -CACCTCTGCAAACAACCTTCC-3'
 IGF1-1R : 5' -ATAACACCAGCTGGCTAGCA-3'
- ② IGF1-2F : 5' -CATAGAGTAGGCTTGAGATGG-3'
 IGF1-2R : 5' -CATTGCGCAGGCTCTATCTG-3'
- ③ IGF1-3F : 5' -AGCTGTTTCCTGTCTACAGT-3'
 IGF1-3R : 5' -AGGCATTTATCTCCCGGAGC-3'
- ④ IGF1-4F : 5' -ATTGTTTCGGCACTGGGAGT-3'
 IGF1-4R : 5' -AGAGTTCCGGGACCTTAGCT-3'
- ⑤ IGF1-5F : 5' -TGGCTAGCGTTGTCAATGCA-3'
 IGF1-5R : 5' -CCAGCTGTCAGACCATATAG-3'
- ⑥ IGF1-6F : 5' -ACAAGATGCACACTGGCTAC-3'
 IGF1-6R : 5' -CGATTTCCATCGTGTGCCTA-3'

Figure 20. Scheme of IGF-I promoter region and primer location for polymorphism analysis. Italic numbers represented exon/intron size of Hanwoo IGF-I promoter region, and gothic numbers represented the amplified DNA size by PCR amplification. Primers for polymorphism analysis were designed in promoter region of Hanwoo IGF-I gene containing multiple transcription initiation sites of exon I and exon IA.

2) 한우 IGF- I 수용체(IGF- I -R) 유전자

인간에서 연구된 바에 의하면, IGF-I 수용체의 유전자는 유전체내 100kb에 21개의 exon과 20개의 intron으로 구성된다(Laura Sepp-Lorenzino 1998).

IGF-I 수용체의 전사조절영역의 유전정보는 인간과 쥐에서만 보고가 되었을 뿐 다른 어떤 종에서도 보고된 바가 없다(Haim Werner 등 1990; David W Cooke 등 1991).

IGF-I 수용체의 전사조절영역은 70%이상의 높은 GC염기 함량을 가지며, TATA나 CCAAT과 같은 전사조절인자 결합부위가 존재하지 않는다. 전사는 "initiator"라 불리는 염기서열로부터 시작되어 약 1kb의 5' UTR(untranslated region)를 포함하여 일어난다. IGF-I 수용체 전사조절영역과 5' UTR내에는 Sp1, E2F를 비롯하여 EGR(early growth response)과 같은 전사조절인자의 결합부위가 다수 분포한다. 특히, Sp1은 IGF-I 수용체 유전자의 발현에 있어 결정적인 역할을 수행이 증명되었다. LeRoith D 등은 Sp1이 발현되지 않는 세포에 IGF-I 수용체의 전사조절영역을 결합시킨 reporter 유전자를 형질도입(transfection)시켜 활성을 측정할 결과 발현이 전무하였다(LeRoith D 등 1995). 인간과 쥐에서 cDNA단편을 probe DNA로 Northern blot analysis을 실시하여 IGF-I 수용체의 주 전사체(transcripts)가 약 11kb로 크기로 전사됨을 증명하였다(Ullrich A 등 1986). IGF-I 수용체는 배아기의 8세포기에서 처음 발현되어 출생 전까지 거의 모든 조직에서 높은 수준의 발현을 보이다가 출생 후 급격하게 감소되는데, 이러한 발현양상은 반대로 출생 후 급격하게 증가되는 혈중 IGF-I의 양과 관련이 있다.(Haim Werner 등 1989).

IGF-I 수용체는 구조적으로 insulin 수용체와 매우 유사하며 50%이상의 아미노산서열에서의 높은 상동성으로 인해, 고농도로 존재시 혹은 병인(disease)과 같은 특이조건하에서 insulin이나 IGF-I이 서로 다른 수용체와 결합하여 상호간의 생체 내 작용을 보완하여 단기간의 대사효과와 장기간의 성장촉진 작용을 모두 수행함이 증명되었다(Robert F. Krywicki 등 1992). IGF-I 수용체는 단일 전사체로 전사되어 1367개의 아미노산으로 번역된 후 가수분해되고 다시 이황화결합(disulfide bond)에 의해 연결되어 $\alpha_2\beta_2$ 의 4량체 구조를 형성한다. α -구조체는 세포외로 표출된 영역으로서 ligand의 결합부위가 존재하며, β -구조체는 소수성 잔기를 포함하는 막관통부위를 포함하는 영역으로 외부 자극에 의한 신호를 세

포내의 단백질로 전달하는 기능을 수행한다. IGF-I의 신호전달은 insulin 수용체와 유사하게 이루어지는데, 먼저 ligand가 수용체의 α -구조체에 결합하게 되면 두 개의 세포막관통 펩타이드인 β -구조체간의 serine과 threonine잔기 간의 교차에 의한 인산화(phosphorylation)에 의해 활성화된다. 활성화된 IGF-I 수용체의 인산화와 탈인산화(dephosphorylation)에 의한 세포질 단백질의 활성화 경로는 주로 두 갈래로 나누어 설명된다. 첫 번째 경로는 IRS-1(insulin receptor substrate-1)을 경유하는 경로로서, 활성화된 IGF-I 수용체의 tyrosine잔기가 세포질 단백질인 IRS-1의 tyrosine잔기를 인산화하여 활성화시킨 후 PI-3 kinase(phosphatidylinositol-3 kinase)와 Syp를 활성화시킨다. 또한 활성화된 IRS-1이 Grb2, Sos와 순차적으로 결합하여 구조체(complex)를 형성한 후 Ras를 활성화시킨다. 활성화된 Ras의 신호는 Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow MAP kinase를 거쳐 핵 내로 신호가 전달된다. 다른 경로는, Shc 단백질을 경유하는 경로로서 인산화된 Shc 단백질이 Grb2, Sos와 순차적으로 결합하여 Ras를 활성화시켜 Raf \rightarrow MEK \rightarrow MAP kinase의 순차적인 활성화를 유도한다. MAP kinase의 활성화에 의해 핵내로 신호가 전달되어 세포의 성장 및 분화에 대한 ligand의 작용을 수행한다(Laura Sepp-Lorenzino 1998).

유선조직에서 IGF-I의 작용은 유선상피세포의 성장에 직접적으로 관여하여 유선의 성장 및 분화, 유단백질(milk protein) 합성의 증가와 밀접한 연관이 있는 것으로 연구되고 있다. 그러나, IGF-I의 주 결합 수용체인 IGF-IR은 유선 상피세포내에 존재하는 것은 면역방사선 기법에 의한 실험결과 증명되었으나 유선에서의 작용 및 유즙 생산에서의 역할 등은 아직까지도 연구 중에 있다.

가) 한우 IGF-1 수용체(IGF- I -R) 유전자 전사조절영역의 클로닝

(1) Primer 설계 및 제작

IGF-I 수용체의 전사조절영역 및 5' UTR은 오직 인간과 쥐에서만 보고가 되었을 뿐 소를 포함하여 다른 종에서는 보고된 바가 없다. 특히, 전사조절영역은 보고된 사람과 쥐간의 염기서열간의 상동성이 미비하여 전사조절영역을 클로닝하기에 이용할 수 있는 유전정보가 미비하였다. 이에 전사개시점 하류에 위치한 1kb에 이르는 긴 5' UTR을 먼저 클로닝하여 염기서열을 결정한 후 전사조절영

역을 클로닝하기 위한 실험계획은 구상하였다. 전사개시부위의 하류에 위치한 약 1kb의 5' UTR을 클로닝하기 위해 보고된 종간의 염기서열간의 상동성을 조사하고 한 쌍의 primer를 설계하였다. 하류쪽의 reverse primer는 신호서열(signal peptide)내에서 보고된 각 종의 cDNA염기서열을 기초로 설계하였으며, 상류의 forward primer는 인간과 쥐의 염기서열을 이용하여 설계하였다.

IGF-R Forward : 5'-TGAGGCTGAGGTTCTTGTTTACCAGCA-3'

IGF-R Reverse : 5'-ACCCTCCTCCGGAGCCAGACTTCATTCC-3'

(2) 한우 IGF-1 수용체(IGF- I -R) 유전자 전사조절영역의 subcloning

한우의 IGF-1-R 유전자 전사조절영역의 클로닝을 위하여 LA-PCR GC buffer system을 도입하고 PCR을 실시하여 약 1kb의 증폭산물을 획득하였다. 증폭된 PCR산물은 T-vector와 결합하여 삽입하여 재조합 DNA를 제작하였다(Figure 21). 재조합 DNA는 염기서열을 결정하고 분석된 염기서열의 특징을 분석하였다. 염기서열 결정을 실시한 결과 969bp의 염기가 클로닝되었다. 969bp의 염기를 보고된 인간과 쥐의 염기서열과 상동성을 비교한 결과 각각 67%, 65%의 상동성이 존재하였다. 소의 IGF-I 수용체의 5' UTR영역내의 GC함량은 약 73%로 대단히 높게 나타났으며, IGF-I 유전자의 전사조절에 있어 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 Sp1전사조절인자의 결합부위가 네 위치에서 분석되었다. 또한, 소의 IGF-I 전사조절영역내에는 인간의 5' UTR에서 보고된 open reading frame이 존재하는 것으로 나타났다(Figure 22). 다양한 분석 기법을 이용하여 수 차례 다형성 분석을 시도하였으나 결과를 얻을 수 없었다. 이는 IGF- I -R 유전자의 전사조절영역내 높은 GC함량으로 인한 것으로 생각되어지며, 차후 전사조절영역내 높은 GC함량이 전사조절에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 좋은 자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

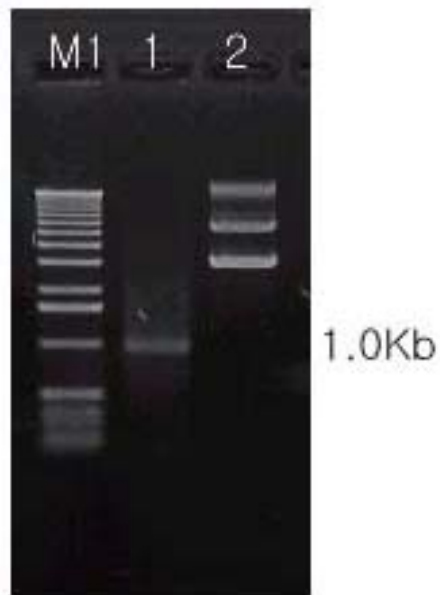


Figure 21. Subcloning of 5' untranslated region for Hanwoo IGF-I receptor gene. LA-PCR products were ligated pGem T-easy vector(Promega) and electrophoresed in 1% agarose gel. M1; 1kb ladder(Gibco BRL). Lane 1; LA-PCR products. Lane 2; recombinant DNA.

1 CACTAGTGATTTGAGGCTGAGGTTCTTGTTTACCAGCATTAACTCCGCTGAGCGGAAAAA
 60 AAAAAAAGAAAAAAGGGGGGGGAACAACCCGAGGAGGAGCGAGCGCACCAGGCGA
 120 ACTCGAGAGGCGGGCAGGGAGGGGACGCCACCGGCGAGCCTGGCCCCGGCGCGCCCGT
 180 GCCTGGAGCTTGCCGATCCCCGGTCTCCACGCCCTCCCGCGGAGGGGAGCTCCAC
 240 GGCGCCCGCGGCTTTGACCTTCAGCGAGCCGAGCCCCGCGCCGAGCCGGCGCGGGC
 300 GGGGGCCGCGCGGGGCGGGCGGGGAGCGCAGAGCGCGGCCGGCCCGTTCGCTTTGTGT
 360 GTGTCTGGATTGGGAAGGAGCTCGCGCGGCGGGCGGCGGAGCGGAGCCCGCGGAG
 420 GAGGAGCAGCAGGAGGAGGAGGGAGGAGGAGGAGGAGGGAGCGGCTCATTCA
 480 TTCCTCCGATTCTGCCCCGGCCGGCCTCCCCGCGACCCGGGCTCTGGGGCCGTGCT
 540 GCGAACTGCGTCGCGCCCTCCCGCCGCGGAGGCTTGGGCGTGGGCGCCCTCCCTCTCTG
 600 TCTGGGGTCGGGTTTGTTCCTTCGCCAAGACGGATCCGGGCTTGGCCCCCTTCTCTC
 660 GCAGTTTTCTCCCTCTGCCTCTCTGGGTTTGAATGGAGGCCGACGACGCAGACAG
 720 CCCGCCCCGGCGCGCCCCGGTCCCGACTCCGCGAGCGCTGGGCGCGGCTGCCGGCG
 780 CTGAGGCGCGCCGCCACCGCCCGCCCGTCCGCGCTCCCGCGACCCCGGCCG
 840 GCGCCGCTCGGGAAGTGTGTCGCTTCGCTCTGTTTTTGGAGGTGGGGGACGAAG
 900 ACTCGGAGACTTTTTCTTTCTCCTCCACCACCCCCCTTTTTTTTTTTTGGAGAAA
 960 GGGGAATTTGGTCCCAATAAAAGGAATG

Figure 22. Nucleotide sequence of the 5'-untranslated regions of the Hanwoo IGF-I receptor gene. The ATG codon which initiates translation of the preproreceptor is at the end of the sequence shown in the figure (underlined and in boldface). Potential Sp1 binding sites are underlined. The open reading frame in the 5'-untranslated region is underlined with a dashed line (nucleotides 697 to 782).

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	연구개발목표	연구 개발의 내용 및 범위
1차년도 (1997)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우 암소 기초 집단형성 및 시험축 선발(축산연) ○ 산유능력 검정에 의한 다유성 및 저유성 한우의 계통 분류(축산연) ○ 산유관련 유전자의 DNA 다형성 탐색 및 분석조건 확립(상지대) ○ 산유관련 유전자 정보분석 및 활용(건국대) 	<p style="text-align: center;">< 연구개발 내용 ></p> <ul style="list-style-type: none"> - 검정대상 한우 집단 확보 및 구축 (연차 및 세대별 선발계통 준비) - 한우 시험축의 유량측정 및 능력기록 분석 - 한우 유성분 분석 (지방, 단백질, 유당, SNF, TS) - 다유성 및 저유성 계통 분류 - 산유관련 유전자의 다형분석: 유즙단백질 유전자(κ-CN, β-LG, α-LA) 유선발달 및 비유호르몬 유전자(bGH, bPRL) 비유관련 호르몬 촉진인자 및 수용체 유전자 (PIT-1, IGF-1, GHRH) - 유전자 은행 이용 산유관련 유전자 검색 - DNA 결합인자의 설계 및 제작 - DNA 결합인자의 한우 게놈 DNA와 결합성 분석

구 분	연구개발목표	연구 개발 의 내 용 및 범 위
2차년도 (1998)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 한우암소 기초집단 조성, 한우 시험축의 산유 유전능력 검정 및 시험축 선발 (축산연) ○ 다유성 및 저유성 선발 한우 집단의 DNA 다형성 분석 및 표지인자 탐색 (상지대) ○ 한우 유선성장인자 및 비유 호르몬의 유전자 분리 및 구조분석 (건국대) 	<p>< 연구개발 내용 ></p> <ul style="list-style-type: none"> - 검정대상 한우집단 확보 및 구축 - 2차년도 한우시험축의 산유능력 검정 - 산유능력과 이유시 체중기록의 통계분석 - 다유성 및 저유성 한우의 선발 - 2차년도 선발축군의 혈액시료 채취, genomic DNA 분리 및 시료 확보 - 2차년도 선발집단의 산유관련 후보유전자의 DNA 다형성분석: 유즙단백질 유전자(κ-CN, β-LG, α-LA), 유선발달 및 비유호르몬 유전자(bGH, bPRL), 비유 관련 호르몬 촉진인자 및 수용체(PIT-1, GHRH, IGF-1) - 한우 성장호르몬 조절유전자의 구조변이의 분석 - 한우 prolactin 조절유전자의 분리 및 구조분석 - 한우조직의 mRNA 추출 및 cDNA library 제작 - 한우 prolactin 수용체(PRLP)의 cDNA 클로닝 - PRLP 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

구 분	연구개발목표	연구 개발 의 내 용 및 범 위
3차년도 (1999)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다유계통한우 개량을 위한 한우선발 및 산유 유전능력 검정 (축산연) ○ 다유성 및 저유성 선발 한우집단의 DNA 다형성 분석 및 표지인자 탐색 (상지대) ○ 한우유선성장인자 및 비유호르몬의 유전자 분리 및 구조분석 (건국대) 	<p>< 연구개발 내용 ></p> <ul style="list-style-type: none"> - 검정대상 한우집단 확보 및 구축 - 3차년도 한우시험축의 산유능력 검정 - 산유능력과 이유시 체중 기록의 통계분석 - 다유성 및 저유성 한우의 선발 - 3차년도 선발집단의 혈액시료 채취 및 genomic DNA 분리 - 3차년도 선발집단의 산유관련 후보유전자의 DNA 다형성 분석 : 유즙단백질 유전자(κ-CN, β-LG, α-LA), 유선발달 및 비유호르몬 유전자 (bGH, bPRL, GHR), 비유관련 호르몬촉진인자 및 수용체(PIT-1, GHRH, IGF-1) - Microsatellite 및 AFLP 표지인자 탐색 - 한우 prolactin수용체의 유전자 클로닝, 염기결정 - 한우 IGF수용체 유전자의 클로닝, 염기결정 - 수용체유전자의 전사조절부위 구조분석

구 분	연구개발목표	연구 개발 의 내 용 및 범 위
4차년도 (2000)	<p>○ 다유계통 한우 개량을 위한 한우선발 및 산유 유전능력 검정(축산연)</p> <p>○ 다유성 및 저유성 선발 한우 집단의 DNA 다형성 분석 및 표지인자 탐색(상지대)</p> <p>○ 한우 유선성장인자 및 비유호로몬의 유전자 분리 및 구조 분석(건국대)</p>	<p>< 연구개발 내용 ></p> <p>○ 검정대상 한우집단 확보 및 구축 : 대관령암소집단 200두 중 30두 검정</p> <p>○ 한우 시험축의 산유능력 검정 : 산유검정 30두</p> <p>○ 산유능력기록의 통계분석 : 잔차분석을 이용한 산유유전 능력 추정 (2001년 예정두수 포함 80두)</p> <p>○ 다유성 및 저유성 한우의 분류 : Multiple-Trait Individual Animal Model</p> <p>○ 4차년도 선발집단의 산유관련유전자의 다형분석 - bGH와 bPRL : RFLP 및 SSCP marker 분석 - κ-CN, β-LG, α-LA, PIT-1, GHR 및 GHRH 유전자 : RFLP marker 분석 - IGF-1 : SSCP 및 Microsatellite marker 분석 - mt DNA(D-loop) 유전자 : RFLP marker 분석</p> <p>○ 후보유전자 위치특정염색체 영역주변의 Microsatellite marker 분석 : 대립유전자 빈도, 이형접합성 및 PIC값 산출</p> <p>○ AFLP 기법을 이용한 다유성 및 저유성 선발계통의 특이적 유전자 검색 : 선발집단을 대상으로 검정개체를 확대하여 탐색</p> <p>○ 다유 및 저유 선발집단간의 산유관련 후보유전자 및 microsatellite 좌위별 대립유전자 및 유전자형 출현빈도 비교 통계분석</p> <p>○ 후보유전자의 DNA 표지인자와 산유능력 및 송아지 이유시 체중 검정 성적과의 연관성 통계 분석</p> <p>○ 한우 선발집단간 유량조절유전자 염기서열 비교분석 및 새로운 염기변이 탐색 : 한우 GH-R, GHRH-R, PRL, PRL-R 전사조절영역</p> <p>○ 한우 선발집단간 유량조절유전자의 염기변이 PASA분석과 산유형질과의 연관성 분석 : GH, IGF- I 전사조절영역</p>

구 분	연구개발목표	연구 개발 의 내 용 및 범 위
5차년도 (2001)	<p>○ 다유계통 한우 개량을 위한 한우 선발 및 산유 유전 능력 검정(축산연)</p> <p>○ 다유성 한우선발을 위한 DNA 표지인자의 이용기술 개발 (상지대)</p> <p>○ 유량조절 유전인자의 특성 및 활용연구 (건국대)</p>	<p>< 연구개발 내용 ></p> <p>○ 한우암소 집단 산유능력과 이우시 체중의 유전능력 분석 - 대관령 한우 암소 산유능력 검정자료 분석(2003두) - 산유량과 이우시체중의 유전능력 분석</p> <p>○ 한우 다유 및 저유계통 한우 분류</p> <p>○ 산유관련 후보유전자의 DNA 다형분석 - bGH와 bPRL 유전자 : RFLP 및 SSCP marker 분석 - κ-CSN β-LG α-LA, HT-1, GHR 및 GHRH : RFLP 분석 - IGF-1 유전자 : SSCP 및 Microsatellite marker 분석 - mt DNA(D-loop) 유전자 : RFLP 및 SSCP marker 분석</p> <p>○ Microsatellite marker 분석 : 유량 및 유조성분 QTL이 위치한 염색체영역의 MS 분석</p> <p>○ AFLP법에 의한 다유 선발계통의 특이적 DNA marker 검색</p> <p>○ 다유 및 저유 선발집단간의 산유관련 후보유전자 및 microsatellite 좌위별 대립유전자 및 유전자형 출현빈도 비교 통계분석</p> <p>○ 후보유전자의 DNA 표지인자와 산유능력 및 송아지 이우시 체중 검정 성적과의 연관성 통계처리 분석</p> <p>○ DNA 표지인자를 이용한 다유성 한우 조기 선발 체계 수립</p> <p>○ 한우 선발집단간 유량조절유전자 염기변이 분석 - 분석법 : PASA법, SSCP법 - 새로이 탐색된 DNA표지인자 : GH(2개), GH-R(1개), IGF-1(1군데) - 분석시료 : 다유 및 저유성 한우 선발군, 비한우 품종 - PRLR 조절유전자 클로닝 및 분석</p> <p>○ 산유능력 형질과 유전변이 출현빈도간의 연관성 통계분석</p> <p>○ 다유성 한우선발에의 후보DNA표지인자의 이용성 검토</p>

2. 연구개발목표의 달성도

본 협동연구과제의 연구개발목표는 1차년도에서 5차년도까지 년차별로 산유능력검정을 통하여 분류 선발한 다유성 및 저유성 한우집단의 각종 DNA 다형성을 분석하고 산유형질관련 DNA 표지인자를 탐색 개발하는데 있다. 이 목표를 달성하기 위하여 년차별로 산유관련 후보유전자로서 κ -CN, β -LG, α -LA, bGH, bPRL, PIT-1, ODH, GHRH, GHR 및 mt DNA 유전자들에 대한 RFLP marker와 IGF-1, bGH, bPRL, κ -CN 및 mt DNA 유전자들에 대한 SSCP marker를 각각 typing 하였다. 또한, 산유형질관련 QTL이 위치하고 있는 것으로 보고되어진 염색체를 대상으로 이들 염색체 영역에 존재하는 microsatellite 및 minisatellite 그리고 새로운 유전자 지문분석 기법으로서 AFLP를 typing 하였다. 이 가운데 ODH 유전자와 mt DNA 2종류의 후보유전자, KBMS2와 BTGL1 2종류의 minisatellite 좌위 그리고 AFLP 유전자지문은 당초 연구개발 내용에는 포함되어 있지 않았으나 연구수행 과정에서 필요성이 인정되어 추가적으로 분석 대상에 포함하여 연구를 수행하였다. 이상과 같이 10종류 후보유전자의 RFLP marker, 5종류 후보유전자의 SSCP marker, 16종류의 microsatellite marker와 2종류의 minisatellite marker 그리고 AFLP 유전자 지문분석을 통하여 검출한 다양한 DNA marker를 송아지 이유시 체중 및 산유량과의 관련성을 통계분석한 결과 일부 유전자 marker에서 유의적인 관련성이 인정되어 산유량과 관련된 DNA marker로서 다유계통 한우선발에 이용 가능성을 확인함으로써 본 협동과제의 연구개발목표를 기대 이상으로 달성하였다.

또한, 새롭게 성장호르몬 분비자극 호르몬 수용체(GHRH-R), insulin like growth factor- I (IGF- I) 및 insulin like growth factor- I -receptor(IGF- I -R) 유전자의 전사조절 영역의 염기서열을 밝혔으며, 새로운 점 돌연변이 2곳을 발견하고, 이들이 각각 체중 및 근내지방도와 유의적인 상관관계를 가지는 것으로 분석되어 앞으로 한우 육질 개선을 위한 중요한 기초자료로서 이용이 가능할 것으로

로 생각된다. 다만, 한우의 실제 산유량 측정이 현실적으로나 기술적으로 매우 어려워 충분한 두수의 다유성 개체를 선발하는데 많은 어려움이 있었으므로 앞으로 본 연구성과를 실용화하여 현장에 적용하기 위해서는 계속하여 다수의 암소에 대한 정밀한 산유능력 검정을 통하여 보다 더 많은 두수의 다유성 한우자원을 선발 확보하고 본 연구에서 탐색 개발한 각종 DNA marker와의 관련성을 검증해야할 필요가 있다.

3. 관련분야의 기술발전예의 기여도

본 연구에서 분석한 산유관련 후보유전자 DNA marker 가운데 α -LA, PIT-1, ODH, GHRH 및 GHR 후보유전자들의 RFLP marker 그리고 IGF-1, bGH, bPRL, κ -CN 및 mt DNA 후보유전자들에 대한 SSCP marker typing을 본 연구에서 처음으로 수행함으로써 이들 후보유전자의 RFLP와 SSCP marker의 DNA genotyping 분석기술을 확립하였다. 또한, microsatellite 좌위와 함께 새로운 minisatellite 좌위를 탐색하여 DNA 다형성을 발굴하였고 나아가 최근에 개발된 새로운 유전자지문 분석기술로서 AFLP 기법을 한우에 적용함으로써 한우는 물론 각종 동물자원의 DNA polymorphism과 polymorphic DNA marker 분석기술 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 새롭게 밝혀진 점 돌연변이에 대한 차후 연구가 지속적으로 진행되어야 하며, 선행된 실험을 통한 한우 육질 개선을 위한 기본자료로서 이용이 가능하다. 그리고 본 연구에서 개발한 각종 형태의 polymorphic DNA marker는 한우의 QTL과 유전체(genome)분석은 물론 각종 경제형질에 영향을 미치는 QTL mapping 및 QTL과 연관된 DNA marker 탐색 및 개발에 매우 유용한 표지인자로서 활용할 수 있어 MAS(marker-assisted selection)의 첨단 분자육종 및 우수 유전자 선발 기술개발에 기여할 수 있을 것이다.

4. 논문 발표 및 활용실적

1. 논문 발표

- 다유성 한우생산을 위한 유량조절 유전인자의 탐색 및 활용방안 - 다유성 한우선발을 위한 DNA 표지인자 이용기술 개발, 축산기술연구소, 1998. 6.
- Factors affecting cow's milk yield and calf growth performance in Korean Cattle. 1999 축산분야종합학술발표.
- 한우에 있어서 어미소의 비유능력과 송아지의 성장에 미치는 요인. 1999. 동물유전육종학회지.
- PCR-SSCP marker typing of bGH, bPRL and IGF-1 genes in Korean cattle selected for high milk production. 1999. 제 8차 축산분야종합학술대회, 축산분야학회협의회, P99042.
- Association between SSCP markers of GH, PRL and IGF-1 genes and milk production in Korean cattle. 2000. 제 9차 축산분야종합학술대회, 축산분야학회협의회, A20001.
- 한우에서 산유관련 후보유전자의 PCR-RFLP marker와 산유형질과의 관련성 분석. 2000. 제 9차 축산분야종합학술대회, 축산분야학회협의회, PA20019.
- PCR-RFLP 기법을 이용한 다유계통 한우의 mitochondrial DNA 분석. 2000. 제 9차 축산분야종합학술대회, 축산분야학회협의회, PA20022.
- 잔차분석을 통한 한우 산유 유전 능력 추정. 2000 축산분야종합학술발표.
- 최재관, 전기준, 임석기, 윤상기, 김종복, 이창우. 한우의 산유량과 이유시체중의 유전모수 추정. 2001 축산분야종합학술발표.

- Association between RFLP and SSCP markers of mitochondrial DNA and milk production in Korean cattle. 2001. 한국동물자원과학회 학술발표회, A21012.
- Analysis of microsatellite markers associated with milk production in Korean cattle 2001. 한국동물자원과학회 학술발표회, PA21021.
- Association between PCR-RFLP markers of bGH, bPRL and bGHR genes and milk production in Korean cattle 2001. 한국동물자원과학회 학술발표회, PA21023.
- 한우에서 microsatellite DNA marker와 산유량과의 관련성 분석. 2002. 한국동물자원과학회 학술발표회. PA22044
- Environmental effects and Genetic parameters of daily milk yield and body weight from birth to 4 months of age in Hanwoo(Korean cattle, *Bos taurus coreanae*). 2002 축산분야종합학술발표.
- Associations between PCR-RFLP markers of candidate genes and milk production traits in Korean cattle. 2002. 한국동물자원과학회 학술발표회. PA22049
- Trends in Heritability of Daily Milk Yield by Periods in Korean Cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences(2002).

2. 활용실적

- 영농활용 자료

-다유계통의 우량한우암소 선발 요령

한우의 비유량 증진을 위해서는 비유량과 유전상관이 높은 이유시체중에 의한 간접선발로 가능함. 비유량과 이유시(120일령)체중과의 유전상관(0.32), 표현형상관(0.67)

가. 자신의 유전능력평가가 안된 경우

- 분만한 송아지 체중(90, 120일령)과 어미의 연령에 따른 보정계수 활용
- 어미년령에 따른 송아지 체중의 보정계수

어미년령	암송아지 체중		수송아지 체중	
	3개월령	4개월령	3개월령	4개월령
2~3세이하	15.2	18.2	17.6	17.1
3~4세이하	12.0	13.0	15.6	13.1
4~5세이하	6.2	6.5	8.3	7.0
5~6세이하	4.5	3.9	5.0	5.0

- 같은 일령의 측정된 체중에 보정계수를 합하여 체중비교
- 분만 연도 및 계절이 같고, 동일한 다유계통 종모우(이유시체중 육종가) 정액 사용
- ※ 한우송아지체중(90, 120일령)은 분만연도 및 계절, 송아지 성, 쌍태여부, 종모우에 따라 고도의 유의차가 있으므로 환경요인을 같게 만들어 주어야 송아지의 어미소의 능력을 비교할 수 있음.

나. 한우암소의 유전능력 평가가 가능한 농가

- 한우 유전능력평가지 이유시체중에 대한 육종가가 높은 개체

제5장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

한우의 산유량 및 산유능력에 대한 간접 선발지표로서 송아지 이유시 체중에 대한 육종가와 각종 polymorphic DNA marker간의 유의적인 관련성을 분석하여 기대할 만한 결과를 얻었다. 그러나, 한우의 산유능력을 개량하기 위한 분자유종표지로서 산유형질과 연관된 DNA marker를 산업적으로 실용화하여 향후 MAS의 분자선발육종기술로 활용하기 위해서는 앞으로 더 많은 연구가 계속 추진되어야 할 필요가 있다. 즉, 산유형질에 대한 한우 reference family를 구축하고 이들 가계집단을 대상으로 산유형질 연관 QTL을 mapping하고 나아가 QTL과 연관된 DNA marker를 발굴하기 위한 추가적인 연구가 요구된다. 또한, 다유성 및 저유성으로 수 세대에 걸친 선발을 통하여 산유능력에 대한 계통을 조성하고 이들 두 선발계통간에 특이적으로 관련된 DNA marker 탐색을 위한 연구가 추진되어져 보다 신뢰성 있는 검증작업을 통한 산유능력이 우수한 다유계통의 한우 조기선발을 위한 분자유종 표지인자로 활용되어야 한다.

한우 개량의 중심은 한우의 체형 개량이 중심이 되어왔다. 본 연구 또한 한우의 산유형질 개량을 위한 목표를 지니고 진행되었다. 현재 소비자의 선호도가 바뀌면서 육질에 대한 관심이 높아지고 있다. 육질을 구별하는 중요한 요인들은 근육의 조직감, 연도, 근내지방도 등을 들 수 있다. 이 중에서도 육질의 질감 및 맛을 결정하는 가장 중요한 요인으로 근내지방도를 꼽을 수 있다. 본 실험을 통해 근내지방도와 유의적인 상관관계를 보이는 점 돌연변이를 탐색하였으나, 정확한 육질 관련성을 분석하기 위해 대량분석이 필요하다. 또한 점 돌연변이가 전사조절 영역 내 존재하고 있으며, 이러한 돌연변이가 유전자 전사에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 한우의 육종 개량을 위한 활용이 가능한 DNA marker로서 개발이 가능할 것으로 생각된다.

2. 타 연구에의 응용

본 연구를 통하여 한우에서 검출한 각종 polymorphic DNA marker는 한우와 기타 가축에서 산유형질을 포함하여 증체율, 육량, 육질, 항병성 및 번식형질 등 주요 경제형질에 연관된 DNA marker 개발에 직접 이용할 수 있고 또한, 젖소에서 특히, 산유량 및 유조성분 등 산유관련 형질에 영향을 미치는 DNA marker 탐색 및 발굴에 매우 유용한 유전적 표지인자로 응용할 수 있다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 육우의 산유능력 평가

가. 육우에서 산유량의 측정방법

- 포유전후체중차이법 : 가장 보편적으로 사용되는 방법으로 송아지의 포유 전 체중과 포유 후 체중차이를 이용하여 산유량을 추정,
- Oxytocin을 주사 후 송아지포유를 하면서 손 또는 기계 착유를 병행,
- 유두에 케눌러관을 삽입하여 측정,

나. 육우에서 산유량 측정방법별 정확도

Beal 등(1990)은 기계착유와 송아지 포유전후 체중차에 의한 유량측정의 반복력은 기계착유가 0.97로 포유전후차이법(0.35) 보다 높았다고 보고하였다. 그리고 Mallinckrodt 등(1993)은 헤어포드와 심멘탈에서 분만후부터 205일령까지의 산유량이 $1,084 \pm 28$, $1,434 \pm 61$ kg 이라고 보고하였고, Meyer 등(1994)은 Polled Hereford와 Wokalups에서 1일 평균 산유량이 각각 3.61 ± 1.57 , 4.90 ± 1.89 kg, 이유시체중이 255.4 ± 39.0 , 286.0 ± 40.9 kg 이라고 보고하였으며, Beal 등(1990)은 어미의 66일, 123일, 179일령 산유량과 송아지의 이유전 증체량간의 상관계수를 0.70~0.75로 보고하였다.

다. 육우의 산유능력에 미치는 어미의 연령 연구

어미소의 연령은 체중의 변화, 골반 등을 비롯한 각종 신체기관의 발달과 관련이 있으므로 송아지의 성장에 미치는 중요한 요인중의 하나로 Elzo 등(1987)은 Simmental에서 송아지의 성별, 어미의 Simmental 혈액비율별 그룹별로 어미 연령에 대한 효과를 추정하였으며, Mallinckrodt 등(1993)은 Polled Hereford와 Simmental에서의 분만후 205일까지의 유량이 각각 $1,084 \pm 28$, $1,434 \pm 61$ kg 이었으며, 어미의 연령 및 연도에 따라 유의적인 차이가 있었고 205일령 총 유량에 대한 이유시체중의 회귀계수는 Hereford와 Simmental에서 각각 0.0228 ± 0.0106 , 및 0.0344 ± 0.0138 (kg/kg), 일일평균산유량에 대한 이유시체중의 회귀계수는 각각 4.67 ± 2.17 , 7.05 ± 2.82 (kg/kg)이였음을 보고하였다. Kress 등(1996)은 Hereford, Tarentaise, Hereford×Tarentaise 집단에서 1일 평균 산유량은 어미의 연령에 따라 비유초기에 $7.8 \pm 0.27 \sim 11.3 \pm 0.36$ kg/d, 그리고 비유후기가 $7.5 \pm 0.36 \sim 10.6 \pm 0.45$ kg/d의 범위였음을 보고하였고, Clutter 등(1987)은 육우에서 어미소의 연령그룹별, 유생산능력에 대한 이유전후의 송아지 성장에 어미년령그룹 4, 5에서 205일령 총 유량이 $1,556 \pm 47$, $1,552 \pm 50$ 으로 2세의 $1,172 \pm 45$, 3세 $1,400 \pm 38$ 보다 유의성은 높았으며 유량이 높은 집단과 낮은 집단간의 205일령 체중차가 16.9 ± 1.7 , 높은 집단과 중간 집단의 차가 8.2 ± 1.7 , 중간과 낮은 집단간의 차가 9.0 ± 1.7 이었다고 보고하였다.

라. 육우의 산유량 유전모수 추정에 대한 연구

Mallinckrodt 등(1993)은 포유전후 체중차에 의해 조사한 산유량의 유전력은 무각 헤어포드종이 0.001 그리고 심멘탈이 0.078이었고 반복력은 무각 헤어포드 종이 0.67 심멘탈 종이 0.53이었으며 무각 헤어포드 종에서 205일 산유량과 생시체중의 표현형 상관계수는 .241 그리고 205일 산유량과 이유시체중간의 표현형 상관계수는 .395이었고 심멘탈종에서는 205일 산유량과 생시체중의 표현형 상관계수가 -.05 그리고 205일 산유량과 이유시 체중간의 표현형 상관계수가 0.355였음을 보고하였다. Meyer등(1994) Hereford, Wakalup종 집단의 포유전후 체중차로 조사한 산유량자료에서 송아지의 포유기 증체율과 이유시 체중을 어미소의 형질로 보고 실시한 단형질 분석결과 산유량, 포유기 일당증체량 및 이유시 체중

의 유전력은 Hereford 종에서 각각 .122, .248, 및 0.239였으며 Wokalup종 집단에서는 각각 .080, 0.149 및 0.164였음을 보고한 바 있으며 Miller 와 Wilton(1999b)은 옥시토신 투여 후 기계착유를 통해 조사한 산유량과 송아지 발육성적을 분석하여 어미소의 산유량에 대한 유전력은 0.35였음을 보고하였고 그 외 Dillard 등 (1978)은 헤어포드 암소의 산유량에 대한 유전력은 0.45였음을 보고 하였다.

2. 산유능력 관련 DNA marker 연구

최근에 Georges 등(Genome Research, 2001)은 젖소 BTA14 염색체의 centometric 말단 영역의 3 cM 간격내에서 유량과 유조성분에 큰 효과를 갖는 QTL을 positional cloning하고 이 구간을 포함하는 BAC contig에서 Diacyl Glycerol Acyl Transferase 1(DGAT1) 이라고 부르는 강력한 후보유전자를 검출하였다. 그리고, DGAT1 유전자의 SNP 분석을 통하여 K232A 염기치환 (missense 돌연변이)이 유량 및 유조성분과 강하게 연관되어 있다는 사실을 보고하였다. 이러한 연구결과는 세계 최초로 소에서 유량 및 유성분 관련 QTL의 positional cloning과 이 구간에서 검출한 후보유전자의 DNA 다형분석으로 산유형질에 커다란 영향을 미치는 DNA marker를 개발함으로써 고능력 젖소 선발을 위한 MAS의 분자유종기술의 산업적 실용화를 이룩하였는데 커다란 의미를 부여할 수 있다.

Butyrophilin(BTN)은 유선상피세포로부터 유지방구막과 관련되어 분비되는 immunoglobulin의 type I membrane 단백질로 알려져 있고 이 단백질의 합성을 지배하는 BTN 유전자의 특정한 대립유전자가 특히, 젖소에서 유지율과 유의적으로 관련되어 있음이 최근에 보고되어져 이 BTN 유전자가 또 다른 산유형질관련 후보유전자로 주목받고 있다(International Conference on Animal Genetics, ISAG, 2002).

제7장 참고문헌

Asimov, G. J. and Krouze, N. K. 1937. The lactogenic preparations from the anterior pituitary and the increase of milk yield in cows. *J. Dairy Sci.* 20: 289.

Barroso, A., Dunner, S. and J. Canon. 1999. Technical note: use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine beta-casein variants A1, A2, A3, and B. *J Anim Sci.* 77:2629.

Bair, L. G., L. L. Wilson and J. H. Ziegler. 1972. Effects of calf sex and age of dam on pre- and post-weaning performance of calves from an Angus-Holstein crossbred herd. *J. Anim. Sci.* 35:1155-1159.

Beal, W. E., D. R. Notter and R. M. Akers. 1990. Techniques for estimation of milk yield in beef cows and relationships of milk yield to calf weight gain and postpartum reproduction. *J. Anim. Sci.* 68:937-943.

Beef Improvement Federation. 1996. Guidelines for uniform beef improvement programs(7th Ed.). Beef Improvement Federation, Colby, KS.

Bignon C., Binart N., Ormandy C., Schuler L.A., Kelly P.A. and Djiane J., 1997, Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents, *J. Mol. Endocrinol.* 19 (2), 109-120

Blin N., and D.W. Stafford., 1976, A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res.* 3:2303-2308.

Boutin J-M., Edery M., Shirota M., Jolicoeur C., Lesueur L., Ali S., Gould D., Djiane J., and Kelly PA., 1989, Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in Human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology.* 3:1455-1461

Boutin J-M, Jolicoeur C. Okamura H., Bancille D, Dusanter-Fourt I, Djiane J., and Kelly PA., 1988, Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family, *Cell.* 53:69-77

Camper,S.A., Luck,D.N., Yao,Y., Woychik,R.P., Goodwin,R.G., Lyons,R.H. Jr.

and Rottman, F.M., 1984, Characterization of the bovine prolactin gene, DNA 3 (3), 237-249

C Bignon, N. Binart, C. Ormandy, L. A. Schuler, P. A. Kelly, and J. Djiane, 1997, Long and Short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents, J. Mol. Endocrinol. 19:109-120

Chomczynski P., and N. Sacchi., 1986, Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, Anal. Biochem. 162:156-159.

Cooke N.E., Baxter J.D., 1982, Structural analysis of the prolactin gene suggests a separate origin for its 5'-end. Nature 297:603-606

Cooke N.E., Coit D., Weiner R.I., et al, 1980, Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. J. Biol Chem 255:6502-6510

C.T. Roberts Jr., S.R. Lacky, W.L. Lowe Jr., and D. LeRoith, 1987, Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:1154-1159

Davis JA., Linzer DIH., 1989, Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver, Molecular Endocrinology. 3:674-680

Dieffenbach.C.W., Dveksler.G.S. 1995. PCR Primer:A Laboratory Manual. CSHL Press.

E.R. Froesch, C. Schmidt, J. Schwander, and J. Zapf, 1985, Annu. Rev. Physiol.. 47:443-467

E. Schoenle, J. Zapf, R.E. Humble, and E.R. Froesch, 1982, Nature 296:252-253

Forsyth IA., 1989, Growth factor in Mammary gland function, J. Reprod Fert 85, 759-770

Henderson, C. R. 1985. Best linear unbiased prediction of nonadditive genetic merits in noninbred populations. J. Anim. Sci. 60:111-117.

Hirooka, H., and A. F. Groen. 1999. Effects of production circumstances on expected responses for growth and carcass traits to selection of bulls in Japan. *J. Anim. Sci.* 77:1135-1143

Hwang P. Guvda H. Friesen H, 1972, Purification of human prolactin. *J.Biol Chem* 247:1955-1958

J. Baker, J.-P. Liu, E.J. Robertson, and A. Efstratiadis, 1993, *Cell* 75:73-82

J.-P. Thissen, J.-M. Ketelslegers, and L.E. Underwood, 1994, *Endocrine Rev.* 15:80-101,

Kelly PA., Djiane J., Postel-Vinay M-C, and Edery M, 1991, The Prolactin/Growth hormone receptor family. *Endocrine Reviews.* 12:235-251

Kim, J. B., and C. Lee. 2000. Historical look at the genetic improvement in korean cattle. *Asian-Aus. J. Anim. Sci.* 13:1467-1481.

Lee C.Y., 1992, Expression of porcine messenger ribonucleic acids encoding proteins of the insulin-like growth factor system in multiple tissues during fetal and postnatal development and in mammary glands during pregnancy: relationships to serum levels of IGFs and IGF-binding proteins and roles for IGFs and estrogen in mammary development. PhD Dissertation, University of Florida

Lewis U.J., Singh R.N.P., Seaver B.K., 1971, Human prolactin: Isolation and some properties. *Biochem Biophys Res Commun* 44:1169-1176

Lien S., Karlsten A., Klemetsdal G., Vage D.I., Olsaker I., Klungland H., Aasland M., Heringstad B., Ruane J. and Gomez-Raya L., 2000, A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate, Direct Submission

MacNeil, M. D., J. J. Urick and G. Decoudu. 2000. Characteristics of Line 1 Hereford females resulting from selection by independent culling levels for below-average birth weight and high yearling weight or by mass selection for high yearling weight. *J. Anim. Sci.* 78:2292-2298.

Mallinckrodt, C. H., R. M. Bourdon, B. L. Golden, R. R. Schalles and K. G.

Odde. 1993. Relationship of maternal milk expected progeny differences to actual milk yield and calf weaning weight. *J. Anim. Sci.* 71:355-362.

Matusik, R. J. and Rosen, J. M., 1980, Prolactin regulation of casein gene expression: Possible mediators. *Endocrinology* 106, 252-259

M.C. Dickson, J.C. Saunders, and R.S. Gilmour, 1991, *J. Mol. Endocrinol.* 6:17-31

Meyer, K., K. Hammond., M. J. Mackinnon and P. F. Pornell. 1991. Estimates of contrivances between reproduction and growth in Australian beef cattle. *J. Anim. Sci.* 69:3533-3543.

M. Jansen, F.M.A. Van Schaik, A.T. Ricker, B. Bullock, D.E. Woods, K.H. Gabby, A.L. Nussbaum, J.S. Sussenbach, and J.L. Van den Brande, 1983, *Nature* 306:609-611

M.L. Adamo, M.A. Bach, C.T. Roberts, Jr., and D. LeRoith, 1991, In "Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects." ed. by D. LeRoith, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp, 271-303.

Moore RC., Oka T., 1993, Cloning and Sequencing of the cDNA encoding the murine mammary gland long-form prolactin receptor, *Gene* 134:263-265

Patricia Scott, Mark A., Kessler, and Linda A. Schuler, 1992, Molecular cloning of the bovine prolactin receptor and distribution of prolactin and growth hormone receptor transcripts in fetal and utero-placental tissue, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 89:47-58

Parmentier, I., Portetelle, D., Gengler, N., Prandi, A., Bertozzi, C., Vleurick, L., Gilson, R. and R. Renaville. 1999. Candidate gene markers associated with somatotrophic axis and milk selection. *Domest Anim Endocrinol.* 17:139.

Quaas, R. L., and E. J. Pollak. 1980. Mixed model methodology for farm and ranch beef cattle testing programs. *J. Anim. Sci.* 51:1277-1287.

Regitano, L. C. A., Azevedo, J. L., Vencovsky, R., Packer, I. U., Barbosa, P. F., Rosa, A. J. M., Silva, N. A., Etcheagaray, M. A. L. and L. L. Coutinho. 1999. Selection for breed-specific growth hormone and IGF-1 alleles in a

synthetic beef cattle cross, *Canchim. Genetics and Molecular Biology.* 22:531.

Riddle O., Bates RW., Dykshorn SW., 1932, A new hormone of the anterior pituitary., *Proc Soc Exp Biol Med* 29:1212-1215

Ron, M., Yoffe, O. and Weller, J. I. 1993. Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Anim Genet.* 24:183.

Rui H., Djeu JY., Evans GA., Kelly PA., and Farrat WL., 1992, Prolactin receptor triggering, *J. Biol. Chem.* 267:24076-24081

Schlee, P., Graml, R., Rottmann, O. and Pirchner, F. 1994. Influence of growth hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* 111 : 253.

Satoshi M., Gen-ichi Y., Hideyuki A., Yoshiaki Y., Hiroshi S., and Tohru K., 1995, Dynamic aspects in the Expression of the Insulin-like Growth Factor- I Gene: Diversity in Transcription and Post- transcription, *Biosci. Biothech. Biochem.* 59(1):87-92

Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning; A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Schrooten, C., Bovenhuis, H. and Coppieters, W. 2000. Whole genome scan to detect quantitative trait for conformation and functional traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:795.

Shirota M., Banville D., Ali S., Jolicoeur C., Boutin J-M., Edery M., Djiane J., and Kelly PA., 1990, Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver, *Molecular Endocrinology.* 4:1136-1143

Snelling, W. M., M. D. MacNeil., D. D. Kress, D. C. Anderson and M. W. Tess. 1996. Factors influencing genetic evaluations of linebred Hereford cattle in diverse environments. *J. Anim. Sci.* 74:1499~1510.

Stricher P., Gructet R., 1928, Action lobe anterieur de l'hypophyse sur la

montee luttuse, Compt Rend Soc Biol 99:1978-1980.

Terada, N., Wakimoto, H. and Oka, T., 1988, Regulation of milk protein synthesis by progesterone in cultured mouse mammary gland, J. Steroid Biochem. 29. 99-104

V.K.M. Han, P.K.Lund, D.C.Lee, and A.J.D'Ercole, J.Clin, Endocrinol. Metab., 6, 422-429, 1988.

Van Vleck, L. D., and L. V. Cundiff. 1998. Sex effects on breed of sire differences for birth, weaning, and yearling weights. J. Anim. Sci. 76:1528-1534.

Velmala, R. J., Vilkki, H. J., Elo, K. T., de Koning, D. J. and Maki-Tanila, A. V. 1999. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. Anim Genet. 30:136.

Vos, P., Hogers, R. and Bleeker, M. 1995. AFLP : a new concept for DNA fingerprinting. Nucl. Acids. Res. 23:4407.

Wolf, J.B., David, V.A. and Deutch, A.H., 1990, Identification of a distal regulatory element in the 5' flanking region of the bovine prolactin gene, Nucleic Acids Res. 18 (16), 4905-4912

Zhangzhi Hu, Li Zhuang, and Maria L. Dufau, 1996, Multiple and Tissue-specific Promoter control of Gonadal and Non-gonadal Prolactin Receptor Gene Expression. J. Biol. Chem. 271(17):10242-10246

Zhangzhi Hu, Li Zhuang, Jianping Meng, Mark L. and Maria L. Dufau, 1999, The Human Prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: The generic promoter hP_{III} and a Novel Human Promoter hP_N, J. Clin. Endocrinology & Metabolism. 84(3):1153-1156

정의룡, 김우태, 1997, 젖소에서 Prolactin 유전자의 DNA 다형현상에 관한 연구, Koreana J. Dairy Sci. 19(2):105-112

육종룡 외 5인, 1988, 한우, 향문사

이창수, 오홍록, 1995, PCR법을 이용한 쇠고기의 성관별과 근육부위별 한우와 젓소의 DNA 다형성 분석, Korean J. Food SCI. ANI. Res. 15(1):26-30

이창수, 유영복, 나기준, 조병대, 최병규, 1994, 핵산 분석법에 의한 한우의 판별, 한국 축산학회지. 36:369

이창수, 유영복, 오성종, 정태영, 류진창, 1994, DNA 다형성 분석에 의한 한우고기와 수입 쇠고기의 육질판별, 농업과학논문집. 36:222

정의룡, 김동균. 1999. PCR-RFLP 기법을 이용한 국내 젓소집단의 α -lactalbumin 유전자의 DNA 유전자형 분석. 낙농학회지. 21:89.

정의룡, 김우태, 김연수, 이정구, 한상기. 2001. AFLP marker를 이용한 한국 재래돼지의 유전적 다양성 및 품종식별. 동물자원지. 43:777.

정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 2000. AFLP marker를 이용한 한우의 유전자 지문 분석. 동물자원지. 42:391.

정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 2001. VNTR marker를 이용한 한우의 유전적 다양성 및 친자감별. 동물자원지. 43:35.

전기준, 최재관, 임석기, 윤상보, 윤상기, 이창우, 김종복. 1999. 한우 비거세우의 산육능력과 도체형질에 대한 환경요인의 효과. Animal Genetics and Breeding 3:15-24.

정창화, 김내수, 강수원, 나승환, 정연후. 1996. 한우의 산유량에 관한 생물 통계학적 연구. 한축지. 38:545-554.

최연호, 이학교, 박병호, 나승환. 1998. 한우의 초기 사육 환경과 이유전 산육 능력. Animal Genetics and Breeding 2:135-140.

최재관, 전기준, 임석기, 윤상보, 윤상기, 이창우, 김종복. 1999. 한우에 있어서 어미소의 비유능력과 송아지의 성장에 미치는 요인. Animal Genetics and Breeding 3:7-14.

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 아니 됩니다.