

최 중
연구보고서

Butyrophilin과 Signal transducers and activators
of transcription 5a (STAT5a) 유전자를 이용한
젖소 개량에 관한 연구

Studies on the Genetic Improvement of Dairy
Cattle using Butyrophilin and Signal transducers
and activators of transcription 5a genes

건국대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Butyrophilin과 Signal transducers and activators of transcription 5a (STAT5a) 유전자를 이용한 젓소 개량에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 30 일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 이 광 전

세부연구책임자 : 이 창 수

연 구 원 : 양 영 목

연 구 원 : 조 광 현

연 구 원 : 김 정 언

연 구 원 : 조 주 현

연 구 원 : 장 길 원

연 구 원 : 정 연 희

연 구 원 : 박 혜 란

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구책임자 : 이 채 영

요 약 문

I. 제 목

Butyrophilin(BTN) 과 Signal transducers and activators of transcription 5a (STAT5a) 유전자를 이용한 젓소 개량에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

젓소개량의 세계적 추세는 생명공학의 기법을 개발 및 활용하는 데 있으므로, 우리나라의 젓소개량 목표도 이러한 방향으로 추진되어야 할 것이다. 우리나라 젓소들에 대한 유전능력평가의 신뢰도가 낮은 문제를 해결하기 위해서는, 후보유전자(Candidate gene)를 이용한 QTL(Quantitative trait loci : QTL) 분석, BTN과 STAT5a의 구조변이 및 발현양상 구명, 그리고 QTL 지도작성들이 필요하다. 이러한 기술개발 완성은 우리나라 젓소개량에 획기적인 기여를 하게 될 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. BTN과 STAT5a 유전자들에 대한 유전적 다형성분석

홀스타인 종모우 98두로부터 정액을 채취하여, PCR과 SSCP방법에 의하여 Genotyping을 하여, Genetic polymorphisms를 구명함.

2. BTN과 STAT5a 등에 대한 Primers 제작

BTN3과 BTN4는 ACAA → TCGA, GATC → AATC로 치환되는 부위를 증폭할 수 있는 Primer를 제작. 또한 STAT5a인 경우 SH2 영역 중 15번 Intron에서 16번 Exon 사이를 증폭할 수 있는 Primer를 제작.

3. BTN과 STAT5a 유전자들과 젓소의 생산형질들과의 연관관계 분석

유량, 유지방, 유단백질, 그리고 무지고형분들과 BTN과 STAT5a 유전자 사이에는 여러 가지 연관관계를 나타냈으나, 앞으로 표본 수를 더 추가할 경우, 더 확실한 결과가 나타날 것이다.

4. BTN Promoter 영역의 클로닝

한국 재래 흑염소의 제놈 DNA에서 클로닝한 exon1 과 intron1을 포함하는 약 4Kb 영역 내에서 약 500bp가 증폭될 수 있도록 5개 영역으로 분류하여 염기서열을 분석함.

5. Competitive RT-PC를 통한 BTN유전자의 발현량 분석

발현 확인된 BTN mRNA를 Competitive RT-PCR을 통해 정량 분석하였고 또한 서로 다른 Competitor와 반응 비교를 하였다.

6. STAT5a의 cDNA 클로닝 및 PMX-STAT5a 발현 벡터 구축

STAT5a 유전자를 PMX expression에 삽입하여 PMX STAT5a vector를 구축하였다.

7. DFO(desferrioxamine) 처리에 의한 STAT5a 활성변화

DFO도 STAT5a의 인산화를 유도하여 STAT5a 단백질 합성에 기여함을 구명함.

8. Hypoxia조건하에서의 STAT5a의 활성변화

Normoxia(20% O₂) 조건에서 보다는 Hypoxia(2% O₂)조건에서 STAT5a단백질 합성이 더 많이 이루어졌음.

9. STAT5a 단백질과 β -casein promoter와의 결합 활성

10. Granddaughter design 하에서의 QTL mapping

IV. 연구개발 결과

1. BTN과 STAT5a 유전자들에 대한 유전적 다형성 분석 Workflow 확립

BTN1, BTN2, BTN3, BTN4 중 BTN2가 Genetic marker로서의 가치가 가장 높았다. STAT5a의 SSCP결과 A allele, B allele, 그리고 Hetero 형이 발견되었다.

2. BTN과 STAT5a에 Genotyping

BTN1에서는 AA형과 AB형, BTN2에서는 AA, AB, BB, BTN3에서는 AA형과 AB형, 그리고 BTN4에서는 AA형과 AB형만이 발견되었다. 한편, SSCP에 의한 STAT5a에서는 AA, AB, BB형 등이 발견되었다.

3. BTN과 STAT5a유전자들의 연관분석

BTN2인 경우 AA형이 생산형질과 높은 연관관계를 나타내어 Genetic marker로서의 이용 가능성을 제시함.

4. BTN Promoter 영역의 클로닝

BTN Promoter 영역 내에는 TATA, CCAAT box, 그리고 Initiator 염기서열은 존재하지 않았다.

5. BTN 유전자의 발현량 분석

유선과 근육조직에서만 BTN mRNA 발현을 확인하였다.

6. PMX-STAT5a 발현 vector 구축

EcoRI와 NotI 제한효소로 처리하여 PMX-STAT5a vector를 구축.

7. DFO에 의한 STAT5a 활성변화

DFO 농도별로 세포에 노출시켰을 때, 단백질 합성의 증가를 발견.

8. Hypoxia조건하에서의 STAT5a의 활성변화

Normoxia(20% O₂) 보다는 Hypoxia(2% O₂)때에 STAT5a단백질 합성량이 증가하였다.

9. β-casein promoter와의 결합 합성

DEO처리군과 Hypoxia(2% O₂)조건에서, STAT5a는 β-casein promoter와 더 강력하게 결합하였다.

10. Granddaughter design 하에서의 QTL mapping

유전율이 높을수록 QTL 식별의 정확도가 증가되었다.

SUMMARY

There is great interest in gaining better knowledge of the molecular architecture of quantitative traits in dairy cattle. This could indeed lead to new insights in the genetic developments of dairy cattle and is expected to generate new opportunities for more effective marker assisted breeding. Bovine BTN(Butyrophilin) and STAT5a(Signal transducers and activators of transcription) using 98 Holstein bull's frozen semen offered the basic information for QTL analysis. Heterozygosity value of BTN2 were highest among BTN1, BTN3, and BTN4. The polymorphism of STAT5a were found such as TG repeats 10(110bp), 11(112bp), and 12(114bp). BTN2 suggested the possibility that it might be used as a genetic marker. The expression analysis of BTN mRNA in mouse mammary gland was found. BTN mRNA quantification by competitive RT-PCR was determined. DFO or hypoxia induces tyrosine phosphorylation of STAT5a DNA binding activity to the GAS element in mammary epithelia cells. The STAT5a may act as a mediator in hypoxia-mediated gene expression. A higher level of heritability led to more significant likelihood ratios and more accurate estimates of QTL effects and enhanced the ability to identify QTLs.

CONTENTS

Chapter1. Outline of the research project	8
1. Introduction	8
2. Necessity of research project	12
3. Contents or range of the research project	14
Chapter2. Current status of technical developments at home and abroad ...	16
Chapter3. Research topics and results	18
1. Quantitative traits loci (QTL) detection and mapping	18
2. Expression characteristics of mammary gland	53
3. Simulations of marker assisted selection (MAS)	91
Chapter 4. Goal achievement and impacts on related fields	106
1. Yearly research goals	106
2. Yearly research achievements	108
3. Expected effects on the related field	111
Chapter 5. Application scheme of research projects	112
Chapter 6. References	114

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 1절	서론	8
제 2절	연구개발의 필요성	12
제 3절	연구개발 내용 및 범위	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1절	Quantitative traits loci (QTL) detection and map 작성	18
제 2절	유선발현 유전자의 특성 연구	53
제 3절	Marker assisted selection (MAS) 개발	91
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	106
제 1절	연도별 연구 목표 및 착안점	106
제 2절	연구목표의 달성도	108
제 3절	관련분야에 대한 기대 효과	111
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	112
제 6 장	참고문헌	114

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 서론

오늘날 젓소 등을 포함한 거의 모든 가축을 개량하는데 분자유전학적 기법을 도입하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 형질과 연관된 표지인자의 개발 및 표지인자에 근거한 선발방법(marker assisted selection : MAS)의 개발 및 활용성에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나 국내에서 이러한 분자유전학적 분석은 젓소 개량에 있어서 매우 중요한 개량형질, 즉 유 생산형질과 같은 양적형질유전좌위(quantitative trait loci : QTL)의 유전자형 분석에만 치우쳐 왔다. 유전자형의 분석은 젓소집단의 좌위별 대립유전자의 분포가 어떻게 이루어지고 있는 가를 규명한다는 면에서 중요하지만, 각 유전좌위의 대립유전자 분포가 과연 젓소 개량에 어떤 영향을 미칠 만큼의 효과에 대하여서는 그리 많은 연구결과가 보고되지는 않았다. 그러나 Lee 등(1996)은 국내 젓소 후보종모우의 유단백질 유전좌위 분석의 결과가 각 유전자형에 따라 예측유전능력(predicted transmitting ability : PTA)값에 뚜렷한 차이를 나타내고 있다고 보고하였고, 이와 조(1997)는 모의실험을 통하여 좌위와의 연관분석 시 조환율에 따른 적절한 표본의 크기를 제시함으로써 유전적 표지를 이용한 양적형질유전좌위(quantitative trait loci : QTL)분석의 가능성을 입증하였다.

형질을 조절하는 유전자를 확인하기 위한 방법은 크게 두 가지를 이용하고 있는데, 후보유전자(candidate gene)들을 분석하는 방법과 양적형질 유전좌위에 대한 연관분석(linkage analysis) 방법이 있다. 후보유전자는 특정한 형질에 대하여 생리적, 생물학적 효과에 영향을 미치는 유전자를 선정한다. 후보유전자 분석은 두 단계로 진행되는데, 먼저 유전자에서 다형성을 밝혀낼 수 있는 부위를 증폭 할 수 있는 primer를 제작하여 다형성 있는 부위의 유전자형 분석을 하는 것이고, 그 다음은 적절한 집단에 대하여 association test를 수행하여 그 결과들을 증명하는 것이다. 그래서 실제로 이 후보유전자들이 어떤 기능을 하는 유전자와 연관 불균형을 갖는가를 알아봄으로써 QTL을 확인하게 된다고 하였다(Rothschild와 Soller, 1997). 후보유전자를 이용하는 방법은 단일세대의 연구로써 표현형 기록이 유지되는 어떤 집단에서도 이용이 가능하고, 계획된

기준집단의 조성을 필요로 하지 않기 때문에 이를 위한 시간과 비용을 줄일 수 있다는 장점을 가진다. 또한 후보유전자 분석의 단위가 전체 genome이 아닌 하나의 유전자이므로 조작이 편리하고, 하나의 가계집단을 대상으로 하여 유전자 재조합에 의한 영향을 받지 않으므로 후보유전자의 효과는 여러 세대에 걸쳐 안정하며, MAS로서의 적용이 용이하다고 보고하였다(Rothschild 등, 1996; Rothschild와 Soller, 1997; Rothschild 등, 2000). 그러나 젓소에서의 이러한 후보유전자는 지금까지 극히 일부분만 알려져 있어 후보유전자를 이용한 QTL 검색 방법이 그리 쉽지만은 않은 실정이었다.

표지인자에 대한 연관지도 작성을 통해서 QTL을 확인하는 방법은 후보유전자 연구보다 더 많은 다형성을 가진 표지인자로 작성된 연관지도를 이용하여 QTL을 탐색하는 방법이다. 이 방법은 염색체에 전체적으로 산재하고있는 초위성체(microsatellite) 표지인자를 이용하여 작성된 고밀도의 연관지도를 통해 탐색된 QTL로써, Rothschild와 Soller(1997)는 여러 세대로 구성된 큰 기준집단으로부터 얻어진 QTL이기 때문에 MAS로써의 적용에 있어 후보유전자를 이용한 방법보다 충분히 자세한 정보를 제공할 수 있다고 하였다.

그렇지만 젓소 개량에 있어서 분자유전학적 방법을 사용하는데 있어 뚜렷한 성과나 결과가 아직 나타나지 않은 것은 연구의 투자나 연구 개발연구가 아직은 기초수준에 머물러 있기도 하겠지만, 분자유전학적 방법이 궁극적인 젓소개량이라는 목표에 쉽게 접근할 수 있는 후보유전자좌위 선정의 미비와 유전자형 분석에 집단적인 탐색이 아직은 부족하기 때문일 것이다. 따라서 젓소 개량에서의 후보유전자들을 이용한 연구는 그 후보유전자들의 선정에서부터 신중을 기울여야 하며, 탐색된 유전자형은 충분히 집단을 설명할 수 있어야 할 것이다.

1. Bovine butyrophilin (BTN)

최근 bovine butyrophilin (BTN)은 유지방구 막단백질의 총 무게 중 약 40%를 차지하고 있으며, 비유시에만 유선에서 발현된다고 보고되고 있다(Mather 등, 1993; Banghart 등, 1998; Davey 등, 1999). 또한 Taylor 등(1996)은 BTN은 인간과 젓소의 주 조직 적합성 복합체(Major Histocompatibility Complex : MHC)와 같은 염색체에 존재하며 immunoglobulin super family (IgSF)와 유사한 염기배열을 가지고 있어 IgSF로서 면역기능(immunologic function)을 가질 가능성이 있다고 보고하였다. MHC 유전자는 class I 과 class II로 나뉘는데 오래 전부터 가장 많은 다형성을 가지고 있

는 class II의 DRB3 유전자에 대한 연구가 진행되어왔다. BoLA (bovine lymphocyte antigen) system은 소의 MHC이다. 이러한 BoLA 관련 자료들은 Roslin Institute의 ISAG (International Society for Animal Genetics) BoLA Nomenclature Committee (<http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/>) 에서 제공하고 있다. 또한 immunoglobulin superfamily에 속해 있으며 구조적으로 CD80과 CD86과 유사성을 갖는 butyrophilin 유단백질의 전사조절 영역의 특징을 연구하기 위해 지금까지 보고된 적 없는 한국 재래 흑염소 품종에서 butyrophilin 전사조절 영역을 클로닝하여 염기서열을 결정하였으며 전사 조절 영역내의 조절인자들에 대해 분석하였다. 또한, 임신 말기에서 비유기에 이르기까지 butyrophilin 유전자의 발현 양상을 확인하고 임신 유지 호르몬에 의한 butyrophilin 유전자의 발현변화를 확인하기 위해 임신기간중 난소 제거시술을 시행하여 competitive RT-PCR을 통해 정량 분석을 수행하였다.

2. Signal transducers and activators of transcription 5a (STAT5a)

포유동물은 신생자를 양육하는데 필요한 유선조직을 가지고 있다. 유선조직에서 합성되는 유즙은 여러 호르몬(estrogen, progesterone)의 상호작용에 의해 합성되는 것으로 보고되어 있으나, 합성유도에 관한 분자기작에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 단지 prolactin 분비에 의하여 유선세포내의 유즙합성에 관련된 효소가 활성화됨에 따라 유즙의 합성이 개시된다는 보고가 있다. 유즙 생산에 대한 유전적, 생리적 발현 과정의 구명은 유선조직의 발달에 의한 유선세포의 유즙합성 능력의 향상에 영향을 미칠 수 있을 것이다. 유즙합성은 유선발달과 유즙생산 조절에 관여하는 여러 유전자의 전사조절영역에 대한 호르몬 및 성장인자의 영향에 의한 것이다. 최근에 밝혀진 STAT5a의 전사조절인자는 우유단백질의 주요한 구성성분인 beta-casein 유전자의 promoter와 mammary epithelial cells에 대한 prolactin의 조절자로서 알려지고 있다. 따라서 본 연구는 유선 내에서 비유의 조성과 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 STAT5a의 tyrosin 인산화 과정과 그로 인한 세포핵 내의 beta-casein 유전자의 promoter에 결합하는 데에 영향을 미치는 인자를 탐색하였다. 또한, 이러한 인자들에 의해 발현, 분비되어지는 유단백질의 발현연구를 위해 구조적으로 면역글로블린에 포함되는 butyrophilin(BTN) 유전자의 전사조절 영역의 클로닝과 발현량 변화에 관한 분석을 통하여 유즙 합성에 대한 유전적, 생리적 발현 과정을 연구하였다. 모유에 포함되어 있는 단백질 중에 특히 초유에 함유되어 분비되는 면역글로블린들은 신생아의 면역증진을 도우며 특정한 기간에 제한적으로 발현되어지

는 특징을 갖고 있으며, 이러한 특징은 제한적인 발현을 유도하는 전사조절 인자나 발현을 자극하는 생체내 여러 신호자극에 의한 것으로 사료된다. 이와 같은 이유에서 STAT5a의 전사조절인자와 butyrophilin의 전사조절 영역의 주요 전사조절 인자를 밝혀낸다면 인위적인 유선발달과 비유개시의 조절이 가능해지고 신생자의 면역 증진으로 우량젖소의 개량이 가능하며 이로 인한 낙농가의 경제적 향상과 양질의 우유 생산이 가능 할 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 유선 내에 전사조절인자 STAT5a 단백질의 발현 조절에 관여하는 것으로 알려진 prolactin cytokine(IL2,IL family), growth hormone (Schmitt-Ney *et al.*, 1992) 등의 인자들에 의한 조절효과가 아닌 desferrioxamine나 hypoxia에 의한 STAT5a 단백질의 활성화와 tyrosine 인산화 과정, 그리고 이 전사조절 인자와 beta-casein promoter 유전자와의 결합활성에 어떤 영향을 미치는지를 구명하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

젖소에서의 유량과 유조성분 등은 대표적인 Quantitative trait loci (QTL) 형질들이다. 그러나, 이들 QTL에 대한 표현형은 언제나 환경효과와 혼합되어 있기 때문에, 경제적으로 중요한 형질들에 영향을 미치는 QTL들을 검색하고 이용하는 문제는 이제 모든 나라의 젖소 개량에 있어서 초미의 관심사가 되었다. 특히, 낮은 신뢰도 문제를 고민하고 있는 우리 나라 젖소 후대검정 체계에 본 연구결과를 활용할 경우, 젖소 개량의 획기적인 발전이 가능할 것이다.

1. 기술적 측면

- Bovine Butyrophilin (BTN) 유전자와 Signal transducers and activators transcription (STAT) 5a 유전자들의 Genetic markers로서의 이용가치 구명이 필요하다.

- Bovine BTN 유전자에 대한 mutation sites 식별.
- 우유성분에 대한 유전적, 생리적 expression 과정의 구명이 필요하다.
- 유선내의 Transgenes 발현에 대한 구명.
- 한국적 여건에 적합한 MAS (Marker Assisted Selection) 개발이 필요하다.

- 우리 나라 젖소의 유량에 대한 연간 유전적 개량량은 이론적 가능치 2%의 1/3에 불과하다는 연구결과(이 등, 1995b)는 젖소개량 기술의 낙후성을 입증하고 있으며, 따라서 새로운 젖소개량기술의 필요성이 제기되고 있는 실정이다.

- 우리 나라 후대검정 보증종모우들에 대한 유전능력 평가의 신뢰도가 낮은 이유는 후보종모우 당 딸소의 수가 부족하기 때문이며, 이를 해결하기 위해서는 DNA수준에서의 정보도 이용해야 신뢰도 향상이 가능하다.

- 젖소의 생산형질에 대한 유전적 또는 생리적 특성을 구명하기 위해서는 candidate genes들을 이용한 새로운 젖소개량 체계의 확립이 필요하다.

- 젖소개량의 세계적 추세는 생명공학의 기법을 활용하고 있으므로, 우리 나라도 이에 대한 대비와 대응이 필요한 실정이다.

- 현재 전 세계 낙농 선진국 19개국(한국제외)들간에 이루어지고 있는 Interbulls 유전능력 평가제도의 시행에 따라, 우리 나라 젖소개량의 국제경쟁력 제고가 절실한 실정이다.

- Marker Assisted Selection (MAS) 을 기존의 선발모형에 접목한 보다 합리적인 모형을 정립하여 MAS를 이용한 모형의 우수성을 증명하는 것이 필요하다.
- QTL의 모수추정방법에 있어서 보다 합리적인 방법을 선택하기 위해 깃스샘플링을 이용한 모수추정방법의 개발이 필수적이다.
- MAS 모델과 모수추정의 타당성 및 장점규명을 위한 시뮬레이션 연구

2. 경제·산업적 측면

- 낙농은 우리 나라 축산 총 생산액의 16.8% (농림부, 1996)를 차지하며 산업적 비중이 매우 크다.
- 젖소 개량은 낙농생산 효율을 효율적으로 개선시킬 수 있는 가장 기본적인 도구이다.
- 1987년부터 시작된 우리 나라 젖소의 후대검정 체계에 생명공학 기법을 접목시키면, 젖소 개량속도를 30%이상 증가시킬 수 있다(Kashi 등, 1990).
- 위생적이면서도 양질의 우유를 생산하기 위해서는, 분자수준에서의 유전형태의 구명이 절대로 필요하다.
- 정액과 수정란 등 유전자원의 수입이 개방되고 있는 시점에서, 우리 나라 고유의 유전자원 창출이 초미의 과제로 제기되고 있는 실정이다.
- 한국형 MAS (Marker Assisted Selection) 선발체계를 실용화하는 것이 필요하다.

3. 사회·문화적 측면

- 우유는 이미 우리 식생활의 일부이며, 따라서 우유에 관한 문제는 비단 낙농가만의 문제가 아니라, 국민 정서나 사회적 문제로 제기되고 있는 실정이다.
- 우리 나라의 낙농규모(약 56만두)를 감안할 때, 우수한 유전자원 창출행위는 유구한 민족문화의 자긍심과 연결되어 있는 문제이다.
- 위생적이면서도 양질의 우유를 생산하는 것은 사회적 요구이며, 동시에 우리 나라 낙농발전의 척도와 연결되어 있으므로, 첨단기법을 이용한 젖소개량은 시대적 요구이기도하다.

제 3 절 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (’00.7.31 ~ '01.7.30)	○ QTL detection and map 작성 (건국대)	○ 젓소의 가계선정 ○ PCR-RFLP 산물의 분석 ○ Bovine BTN과 STAT5a 유전자들에 대한 Genetic polymorphism 구명 ○ Bovine BTN 유전자에 대한 mutation sites 구명 ○ 생산형질(유량, 유지방, 유단백, 무지고형분)과 체세포수에 대한 Genotyping ○ Young bulls들의 딸소들에 대한 생산 기록 조사
	○ 유선발현 유전자의 특성 연구 (건국대)	○ 젓소와 한우의 유선발현 BTN의 전사조절 영역 단리 및 염기서열 결정 ○ 유선기능 분화의 필수적 전사인자 STAT5a cDNA cloning과 염기결정
	○ MAS 개발 (한림대)	○ MAS 모형의 선택 ○ MAS 모형의 평가를 위한 시뮬레이션 디자인

2. 2차년도 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 ('01.7.31 ~ '02.7.30)	○ QTL detection and map 작성 (건국대)	○ BTN, STAT5a genes들의 mutation site 검색을 위한 sequencing ○ BTN, STAT5a genes과 생산형질들에 대한 연관분석 ○ Bovine BTN과 STAT5a 유전자들에 대한 QTL분석
	○ 유선발현 유전자의 특성 연구 (건국대)	○ 유선발현 BTN 전사조절영역의 구조변이 탐색 ○ 유선 전사조절인자 STAT5a 발현양상 구명
	○ MAS 개발 (한림대)	○ QTL의 parameter 추정방법 개발 ○ QTL의 Breeding value 추정 ○ 모델과 모수추정의 타당성 및 장점 규명을 위한 시뮬레이션 연구

3. 3차년도 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 ('02.7.31 ~ '03.7.30)	○ QTL detection and map 작성 (건국대)	○ Genomic mapping ○ Bovine BTN과 STAT5a 유전자들에 대한 QTL mapping
	○ 유선발현 유전자의 특성 연구 (건국대)	○ 유선발현 BTN 전사조절 영역의 기능해석 ○ 유선 전사조절인자 STAT5a의 전사조절 분석
	○ MAS 개발 (한림대)	○ 모델과 모수추정의 타당성 및 장점 규명을 위한 시뮬레이션 연구 ○ 한국형 MAS scheme의 개발 및 실제데이터에의 적용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 현황

BTN 유전자와 STAT5a 유전자에 대한 국내의 연구는 전무한 상태이며, 다만 이 등(1995a, 1996a, 1996b, 1997, 1998)이 PCR-RFLP를 이용한 우유단백질의 유전적 Polymorphism에 관한 연구, Semen typing에 의한 Young bull의 Genetic marker에 관한 연구, 그리고 연관과 가계분석에 관한 연구 등이 한국축산학회지와 WCGALP(호주) 등에 발표되고 있는 실정이다.

한편 국외에서는 BTN 유전자는 MHC와 연관되어 있을 것이라는 보고(Taylor et al., 1996a)와 BTN 유전자는 우유 속 지방구와 연관이 되어 있는 주 단백질이라는 (Mather & Jack, 1993) 연구 결과 등이 보고되고 있다. 또한 Davey, H. W(1997) 등은 BTN 유전자의 Sequence를 발표하면서, 유전적 polymorphism 연구에 이용될 수 있을 것이라는 가능성을 제시하였다.

그리고 STAT(Signal transducers and activators of transcription)5a 유전자의 활성화는 유선상피세포의 분화에 필수적이며, 동시에 이 유전자는 mammapoieses와 유당생성 시 신호체계에 주된 중계자라는 연구결과들이 보고되고 있다(Liu 등, 1996, 1997). Prolactin은 유선발달이나 유량발생에 중심적 역할을 하는 것으로 알려지고 있을 뿐만 아니라 prolactin의 receptor와 결합하여, STAT 단백질을 phosphorylation 시키거나 또는 활성화 시키도록 하며, 반대로 STAT 단백질은 특정 유전자의 발현을 증진시킨다(Liu 등, 1997)고 보고되어지고 있다. 임신기간 중 유선조직에서의 두 가지 STAT 단백질, 즉 STAT5a와 STAT5b의 활동양식을 살펴 볼 때, 상피세포의 분화와 유단백질 발현에 transcription factors들의 적극적인 역할이 있음을 시사하고 있다.

선진국에서는 분석방법과 모수추정, 모형정립을 위한 이론 및 응용연구가 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구와 관련한 방법들도 granddaughter design이 아닌 다른 데이터를 위해서는 다수의 연구들이 최근에 수행되어 오고 있으나, 국내에서는 관련된 연구들이 한림대 통계유전학연구실 정도에서만 이루어질 정도로 미미하게 이루어지고 있다. 본 연구를 수행함으로써 국내에서도 분석방법과 모수추정, 모형정립을 위한 이론 및 응용 연구수준을 국제적으로 끌어올리는 기회를 만들 수 있을 것이다.

2. 문제점

- 만일 QTL이 marker locus에 위치해 있지 않은 경우, QTL의 표현적 효과는 심각하게 과소평가 되는 경우가 있다.
- 만일 QTL이 marker locus에 위치해 있지 않은 경우, 보다 많은 후손의 수가 필요하다.
- MAS(Marker Assisted Selection) 방법을 전통적인 선택개량 방법에 적용할 경우, 30%이상의 선발반응이 나타난다고 연구 보고되고 (Kashi등, 1990) 있으나, 우리나라에서는 QTL detection이나 이용에 관한 연구가 수행되고 있지 못한 실정이다.
- Gene expression 이나 cloning 은 QTL 연구에 있어서 기본이라 할 수 있으나, 선택개량과의 학제간 연구는 전무한 상태이었다.

3. 앞으로의 전망

- Candidate genes들의 Genetic markers로서의 이용가능성이 높아진다.
- 젓소의 Genome 분석에 기초가 된다.
- 젓소의 생산형질과 질병형질들에 대한 QTL(Qunatitative Traits Loci) mapping이 가능해 진다.
- 젓소에 대한 실용적인 MAS(Marker Assisted Selection) 방법개발이 가능해진다.
- 유선발달과 비유개시의 분자기작의 구명으로 인한 인위적 조절이 가능해진다.

4. 기술도입의 타당성

- 유전자원 창출에 대한 국가간 기술이전은 기본적으로 원만한 교류가 이루어 질 수 없는 실정이다.
- 선진 낙농국가들은 자국의 기후풍토와 사육여건에 적합한 개량목표와 전략이 수립되고 수행되고 있는 실정이므로, 기술도입에 전적으로 의존하는 것은 불가능한 상태이다.
- 국제공동연구를 통하여, 기초 기술의 일부를 서로 교환 할 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Quantitative traits loci (QTL) detection and map 작성

1. 연구개발수행 내용

가. 공시재료

본 연구에 사용된 공시재료로는 농협 젃소개량부에서 확보하고 있는 국내산과 외국산 Holstein 보증종모우 19두 및 후보종모우 77두(외국산 후보우 46두, 국내산 후보우 31두)의 동결정액을 이용하였다(부표 참조).

나. 연구방법

1) 동결정액에서의 DNA 추출

국내산 및 외국산 젃소 후보종모우들의 동결정액에서의 DNA추출은 이 등 (1995a, 1995b)의 방법을 이용하였는데, straw 하나를 녹여, 1ml의 PBS-2% sarkosyl solution이 들어있는 1.5 ml 원심분리 tube에 넣고 충분히 흔든 후, 5,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 침전된 pellet을 완전히 부순 다음, 0.5 ml extracted solution (10 mM Tris, pH8.0, 10 mM EDTA, pH8.0, 100 mM NaCl, 2% SDS, 20 µg/ml Proteinase K, 39 mM DTT)을 첨가하여 37°C~42°C에서 하루 동안 정치시킨다. 그 후 혈액에서의 genomic DNA추출 방법과 동일한 방법으로 phenol처리 후 PCIA (Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1) 처리를 2회 반복한 다음, CIA (Chloroform : Isoamyl Alcohol = 24 : 1) 처리를 한다. 이렇게 처리된 부유액중 상층 액만을 다시 1.5 ml 원심분리 tube에 옮긴 다음, 3 M Sodium-acetate와 100% Ethanol을 첨가하여 응결된 DNA pellet을 얻게 되면 70% ethanol로 세척한다. 이렇게 추출된 DNA는 CentraEvaporator(한국생공)를 이용하여 진공-냉동 건조한 다음, 건조된 DNA

를 멸균된 3차 증류수 0.5 ml 첨가하여 -70℃에 보관하였다.

2) DNA 정량 측정

추출된 DNA는 TKO 100 fluorometer (Hoefer Scientific Inc.)로 정량 측정한 후, 25 ng/μl로 희석하여 보관하고, 먼저 agarose gel로 전기영동을 실시하여 PCR 증폭 시 template로 준비하였다.

3) 유전좌위에 대한 primer 선정

가) 후보유전자(Candidate gene)

Davey 등(1997)이 밝힌 BTN 염기배열에서 BTN1은 7번 exon중에서 651번째 염기인 A (Adenine)이 G (Guanine)으로 치환되는 부위를 증폭 할 수 있는 한 쌍의 primer를 선정하였고, BTN2는 2번 intron중에서 1038번째 염기인 G (Guanine)이 T (Thymine)으로 치환되는 부위를 증폭하기 위한 primer를 선정하였다(Figure 1). BTN3와 BTN4는 Seyfert와 Luethen (1998)에 의해 보고된 염기배열을 기초로 2번 exon에서 3번 exon, 5번 exon에서 6번 exon중에 각각 **ACAA** → **TCGA**, **GATC** → **AATC**로 치환되는 부위를 증폭 할 수 있는 primer를 제작하여 증폭에 사용하였다 (Figure 2).

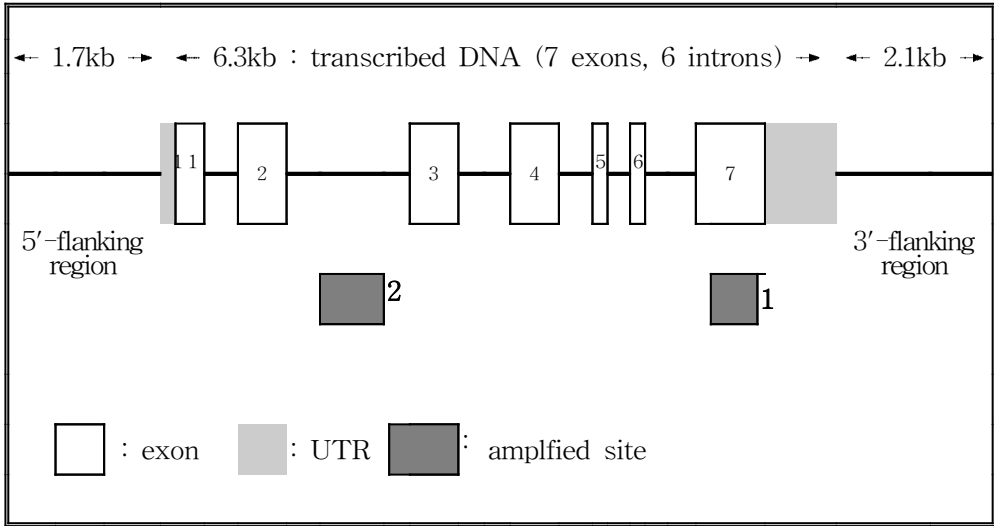


Figure 1. BTN gene structure and amplified region (GeneBank Accession No. : AF005497).

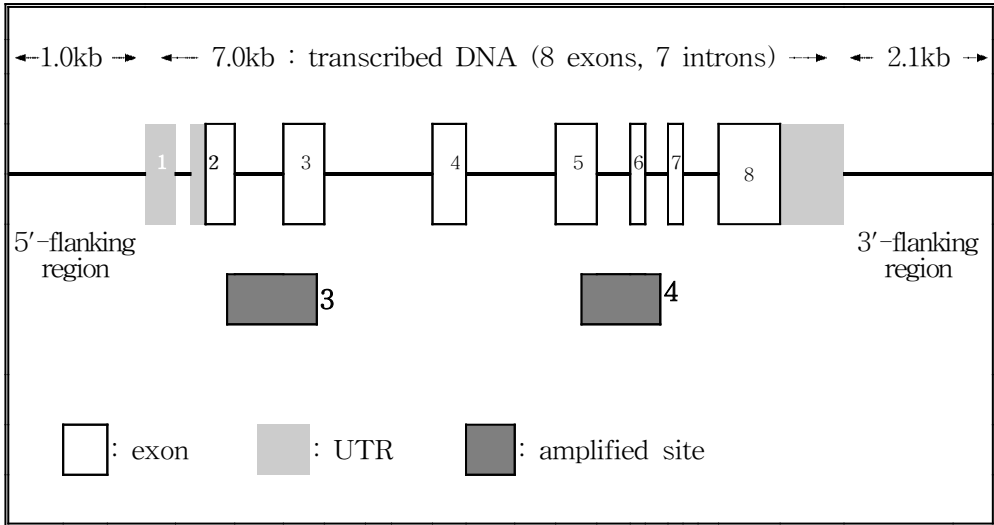


Figure 2. BTN gene structure and amplified region (GeneBank Accession No. : Z93323).

나) Signal transducers and activators of transcription 5a (STAT5a)

STAT5a 유전자 증폭을 위해 Seyfert 등(2000)의 결과에 근거하여 SH2 영역 중 15번 intron에서 16번 exon 사이를 증폭 할 수 있는 primer를 제작하여 이용하였다 (Figure 3).

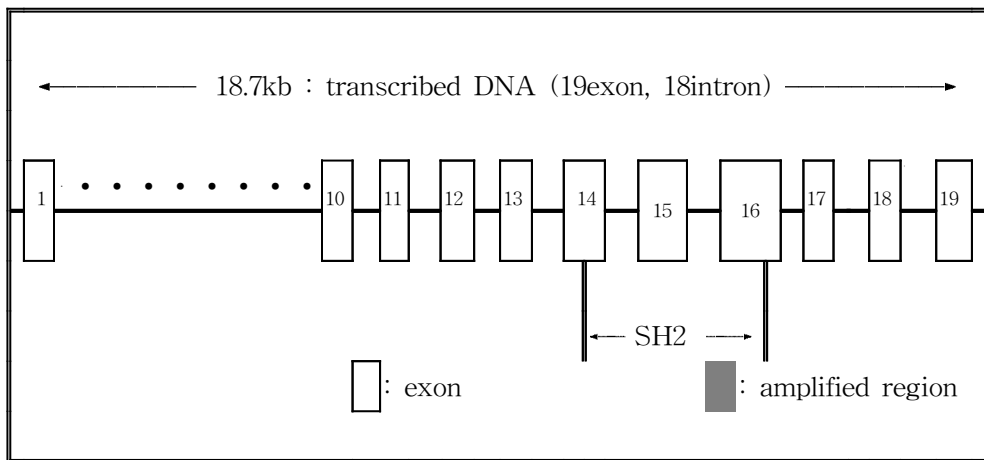


Figure 3. STAT5a gene structure and amplified region (GeneBank Accession No. AJ242522: exons 1-4, AJ237937: exons 5-19).

또한 STAT5a microsatellite 분석을 위한 primers는 McCracken 등(1997)이 보고한 TG 염기가 반복이 되는 부위((TG)_n, Accession No. U96644)를 증폭할 수 있는 primer를 이용하였으며, forward primer에는 합성시 형광물질(Fam)을 붙여 분석에 이용하였다.

다) Prolactin (PRL)

Prolactin의 경우 전체 229개 amino acid 중 exon 3번에 해당하는 132번째 코

돈(codon)인 GTG(Valin)의 3번째 염기 G (Guanine)이 T (Thymine)로 silent mutation 을 탐색하기 위한 primer를 제작하여 PCR 수행에 이용하였다.

라) Major Histocompatibility Complex (MHC : BoLA-DRB3)

BoLA-DRB3의 증폭은 고도의 다형성이 있다고 보고되어진 2번 exon 부위를 증폭 할 수 있는 primer를 제작하여 PCR 증폭에 이용하였으며, 각 유전좌위의 증폭에 이용된 primer의 염기배열과 이들 primer를 이용하여 증폭시켜 얻을 수 있는 증폭 절편의 예상 크기는 Table 1에 제시하였다.

Table 1. List of PCR primers used in this study and the expected fragment sizes (bp) of each locus

Loci	Primer sequence	Expected fragment size (bp)
BTN1	5'-TGG AGC TCT ATG GAA ATG GG-3'	501
	5'-CTA CCC AAC AGG AAG AAA CAG-3'	
BTN2	5'-GAT CCC TCA TGC CTG GAA TAT G-3'	568
	5'-GTT GCC CTT GAC CTT TAG TGG A-3'	
BTN3	5'-CTG AAG TTC CCG ACA AAC TCG-3'	576
	5'-CTC TGC ATC TTC ACC CAC CAC-3'	
BTN4	5'-CTT CTT CCC AAG GCT GAC-3'	683
	5'-CTT ACT GAG CTC TTC CAG G-3'	
STAT5a	5'-CTT GGG AGA ACC TAA CAT CAC T-3'	379
	5'-AGA CCT CAT CCT TGG GCC-3'	
STAT5a MS	5'-TCT CCT TTC CTG GAT CTT TCT CAC-3'	114
	5'-GGG AGA GAA GAA AAG GGA AAA GAT T-3'	
Prolactin	5'-CGA GTC CTT ATG AGC TTG ATT CTT-3'	156
	5'-GCC TTC CAG AAG TCG TTT GTT TTC-3'	
BoLA-DRB3	5'-ACT CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3'	302
	5'-TTT AAA TTC GCG CTC ACC TCG CCG CT-3'	

BTN : Butyrophilin, STAT5a : Signal Transducers and Activators of Transcription 5a, STAT5a MS : STAT5a microsatellite, BoLA DRB3 : Bovine Lymphocyte Antigen-DRB3.

4) PCR 증폭 및 제한효소 처리

본 연구의 PCR 증폭에는 PTC-100, PTC-200 thermal cycler (MJ Research, INC., USA)를 이용하였으며, 각 좌위들의 반응 총액은 50 μ l로 하였고, STAT5a microsatllite 증폭시 반응 총액은 20 μ l로 하였다. 중합효소로는 TaKaRa Ex TaqTM을 사용하였고, 주형 DNA (template DNA)는 각 좌위에 따라 50~100 ng을 사용하였고, STAT 5a microsatellite 증폭시에는 5 ng를 사용하였다. 반응조성액은 1X buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)에 primer 농도는 50 pmole,

microsatellite 좌위에서는 5 pmole의 각각의 primer를 첨가하였고, dNTP는 0.25 mM, 그리고 Taq 중합효소는 1 unit, microsatellite 좌위에서는 0.5 unit를 첨가하였다. PCR 수행 cycle은 94°C에서 pre-denaturation 5분을 수행하고, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 실행하였으며, 각 좌위별 조건은 Table 6에서 보는 바와 같다. 이 PCR 증폭 산물들은 제한효소 처리를 하기 전까지 4°C에서 보관 한 후 이용하였다. 각 좌위들에 대한 분석에 사용된 제한효소들을 Table 2에 제시하였다.

Table 2. PCR conditions and used endonucleases of each locus

Loci	PCR condition (30~35 cycles)			Restriction enzyme
	Denaturation	Annealing	Extension	
BTN 1	94°C/60sec	60°C/60sec	72°C/40sec	<i>Hae</i> III
BTN 2	94°C/60sec	52°C/60sec	72°C/60sec	<i>Alu</i> I
BTN 3	94°C/60sec	61°C/60sec	72°C/60sec	<i>Taq</i> I
BTN 4	94°C/60sec	59°C/60sec	72°C/60sec	<i>Mbo</i> I
STAT5a	94°C/30sec	60°C/40sec	72°C/60sec	-
STAT5a	94°C/15sec	63°C/15sec	72°C/5sec	-
Microsatellite				
Prolactin	94°C/60sec	63°C/60sec	72°C/40sec	<i>Rsa</i> I
BoLA-DRB3	94°C/60sec	60°C/120sec	72°C/60sec	<i>Rsa</i> I, <i>Bst</i> X2 I, <i>Hae</i> III

BTN : Butyrophilin, STAT5a : Signal Transducers and Activators of Transcription 5a, BoLA DRB3 : Bovine Lymphocyte Antigen-DRB3.

각 유전자좌위의 유전자형 확인을 위한 PCR 증폭산물에 대한 제한효소 처리는 위의 Table 6에서 나타난 제한효소들의 적정 온도, *Hae* III, *Alu* I, *Taq* I, *Mbo* I, 그리고 *Rsa* I는 37°C, *Bst*X2 I은 60°C에서 각각 10 unit를 사용하여 3시간 동안 항온 수조(water bath)에서 실행하였다.

STAT5a의 경우 제한효소의 인지부위가 없어 single strand conformation polymorphisms (SSCP)법을 이용하여 유전자형을 분석하였다.

5) 유전자형 분석을 위한 전기영동 검색

PCR 증폭산물은 각각의 제한효소 처리를 한 후 유전자형 분석을 위하여

agarose gel에 전기영동을 실시하였다. 이 때 전기영동 완충용액으로는 0.5X TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 이용하였다. 사용된 agarose gel의 농도는 3% Nusieve 3 : 1 gel을 이용하였으며, SSCP 분석을 위해 6.5% polyacryamide gel을 이용하였다. 또한 microsatellite 분석에서는 증폭된 PCR 산물을 적정량의 deionized water로 희석하고 DNA : formamide : size standard (Genescan-350 TAMRA)를 1 : 12 : 0.5 μ l 비율로 혼합하여 95°C 이상에서 3분간 denaturation 시키고, ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Co., USA)로 분석하였다. 전기영동시 Performance Optimized Polymer (POP) 4 (PE Applied Biosystems)와 10X buffer (with EDTA)를 1X로 희석하여 사용하였고, 반응시간은 22분으로 하였다. 유전자형은 Genotyper software version 2.5 (Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 분석하였고, GeneScan™-350 TAMRA™ size standard를 기준으로 분석하였다.

다. 통계적 방법

1) 각 좌위좌위 간 독립성 검정

각 좌위들의 유전자형 빈도와 유전자 빈도를 계산 한 후, 좌위들간의 연관분석을 실시하여 각 좌위가 연관관계가 없이 독립적으로 나타나는지, 어떤 좌위에 따라 관계를 가지고 나타나는지를 SAS (version 8.1)의 χ^2 -test를 이용하여 분석하였다.

2) Polymorphisms Information Content (PIC)의 산출

예측되는 각 유전자좌내 PIC 값의 산출은 Botstein 등(1980)의 방법을 이용하여 산출하였다.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

위에서,

p_i = I번째 좌위의 대립유전자 빈도수

p_j = j번째(=i+1) 좌위의 대립유전자 빈도수

n = 각 좌위의 총수

3) Heterozygosity의 산출

예측되는 heterozygosity의 산출은 Hubert 등(1992)의 방법을 이용하였다.

$$\text{Heterozygosity} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

위에서,

p_i = i 번째 대립유전자 좌위의 빈도수

4) 생산형질에 대한 유전자 효과의 추정

생산형질에 대한 각 유전좌위의 유전자 효과의 추정을 위한 모델식은 다음과 같다.

$$Y = \mu + \text{HYS} + G + E$$

위에서,

Y = 각 개체의 생산형질의 예측유전능력

μ = 전체 평균

HYS = Herd-Year-Season 효과

G = 각 개체의 유전좌위의 유전자형의 효과

E = 임의오차(residual error)

2. 결과 및 고찰

가. 유전적 다형성 확인

1) Butyrophilin (BTN)

보증종모우 19두 및 후보종모우 77두에 존재하고 있는 BTN 유전자의 점 돌연변이(point mutation) 발생 4가지 부위에 대한 PCR 증폭 및 제한효소를 처리 한 결과는 Figure 4과 같다.



Figure 4. Restriction fragments length polymorphism of four BTN loci in candidate young bulls (M : pBR322 HaeIII marker, Lane 1 : AA, Lane 2 : AB type of BTN1, Lane 3 : AA, Lane 4 : AB, Lane5 : BB type of BTN2, Lane 6 : AA, Lane 7 : AB type of BTN3, Lane 8 : AA, Lane 9 : AB type of BTN4).

7번 exon내에 위치하는 BTN1의 PCR 증폭산물(501 bp)을 *Hae* III 제한효소에 반응시키면 316, 162, 13, 그리고 10 bp의 제한절편이 나타나는데, 651번째 염기인 A (Adenine)이 G (Guanine)으로 치환되어 217번째 코돈(codon)인 AAG (lysine)이 AGG (arginine)으로 바뀌어 *Hae* III 제한효소 인식부위(GG↓CC)가 생기게 되는데, 변이가 일어나 *Hae* III 제한효소로 절단되게 되면 280 bp의 절편을 가지게 된다. BTN2의 경우 2번 intron 부위 중 1,038번째 염기인 G이 T으로 치환되어 AGCT 염기배열이 ATCT로 변하게 되면, *Alu* I 제한효소 인식부위(AG↓CT)가 없어져 절편이 나타나지 않아 568 bp (B allele)가 나타나고, 염기배열에 변이가 발생하지 않으면 *Alu* I에 의해 305, 263 bp가 나타난다. Seyfert와 Luethen(1998)은 5'-RACE (rapid amplification cDNA ends) 실험을 통하여 새로운 1번 exon 부위를 보고하였다. 이 보고는 Davey 등(1997)이 밝힌 구조(Genbank Accession No. AF005497)와 서로 exon의 수가 다르지만 거의 비슷한 염기배열과 같은 경향의 발현 패턴을 가진다고 하였다. Seyfert와 Luethen(1998)가 보고한 구조에서 증폭한 BTN3과 4중에서 BTN3은 2,074~2,077번째 염기인 ACAA에서 2,074번째 염기인 A이 T으로, 2,076번째 염기인 A이 G으로 치환되어 TCGA로 변하면서 *Taq* I 제한효소의 인식부위(T↓CGA)에서 절단되어져 332와

244 bp의 절편이 나타난다. BTN4에서는 5,495~5,498번째 염기인 GATC에서 5,495번째 염기인 G이 A으로 치환되어 AATC로 변하면서 *Mbo* I 제한효소의 인지부위(↓GATC)가 없어져 573, 110 bp의 절편을 나타낸다. 본 연구에서 이용한 보증 및 후보종모우 전체 96두에 대한 유전자형과 각 유전자형에 대한 제한절편 크기를 Table 3에 제시하였다.

Table 3. Genotypes and restricted fragment sizes (bp) of each BTN locus in Holstein dairy cattle

Loci	Genotypes	Fragment size (bp)
Butyrophilin 1	AA	316, 162, 13, 10
	AB	316, 280, 162, 36, 13, 10
	BB	280, 162, 36, 13, 10
Butyrophilin 2	AA	305, 263
	AB	568, 305, 263
	BB	568
Butyrophilin 3	AA	576
	AB	576, 332, 244
	BB	332, 244
Butyrophilin 4	AA	291, 282, 110
	AB	573, 291, 282, 110
	BB	573, 110

BTN1, 3, 그리고 4에서는 AA형과 AB형의 두가지 유전자형을 확인하였고, BTN2에서는 AA, AB, 그리고 BB형을 확인하였다. 특히 BTN 2의 BB형의 경우 전체 11두 중 보증종모우 H-931 구스타프에서만 나타났고, 나머지 10두는 모두 후보종모우에서 나타났다. 전체 96두에 대한 유전자형 빈도와 유전자 빈도는 Table 4에 제시하였다.

Table 4. Genotypes and gene frequencies of each BTN locus in proven and candidate young bulls

Loci	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
Butyrophilin 1	AA	78 (81.25)	A = 0.906
	AB	18 (18.75)	B = 0.094
Butyrophilin 2	AA	21 (21.88)	A = 0.552
	AB	64 (66.67)	B = 0.448
	BB	11 (11.46)	
Butyrophilin 3	AA	61 (63.54)	A = 0.818
	AB	35 (36.46)	B = 0.182
Butyrophilin 4	AA	76 (79.17)	A = 0.896
	AB	20 (20.83)	B = 0.104
Total		96 (100.00)	1.000

Table 4에서 보는 바와 같이 BTN1의 A와 B의 유전자 빈도는 각각 0.906과 0.094의 빈도를 나타내었다. 이 결과는 Taylor 등(1996)이 보고한 0.875와 0.125, Davey 등(1997)이 보고한 0.85와 0.15보다는 낮게 나타났다. AA, AB, 그리고 AB형의 유전자형이 나타난 BTN2의 경우 유전자형 빈도는 각각 21, 64, 그리고 11두로 나타났으며, A와 B의 유전자 빈도는 0.552과 0.448로 두 유전자의 빈도가 비슷하게 나타났다. 그러나 BTN3과 4에 있어서 A와 B의 유전자 빈도는 BTN1의 경우와 비슷하게 각각 0.818, 0.182(BTN3)과 0.896, 0.104(BTN4)로 B 대립유전자의 빈도가 낮게 나타났다.

2) Prolactin (PRL)

Prolactin (PRL)은 BTN, MHC 유전자와 같이 소의 23번째 염색체에 존재하며 유즙 분비와 유선세포의 발육에 중요한 역할을 하는 호르몬이며, 최근에는 BoLA-DYA와의 연관 연구가 병행되고 있다(Park 등, 1995). Prolactin의 경우 exon 3번에서 다형성 연구가 많이 진행되어 왔는데, 이는 전체 229개 amino acid 중 132번째 코돈인 GTG (valin) 의 3번째 염기 G이 T으로 돌연변이를 일으켜 GTA로 되는 부위를 *Rsa* I 제한효소 인식 부위인 GT↓AC를 절단한 절편을 확인하였다(Figure 5).

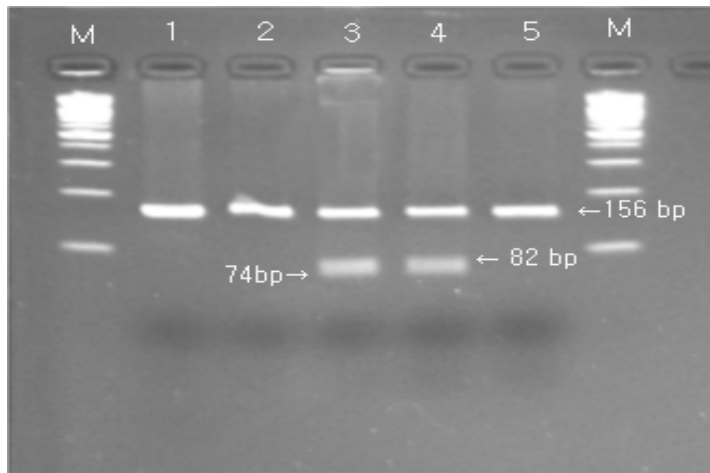


Figure 5. Agarose gel contained that PRL locus of candidate young bulls digested with *Rsa* I (M : 100 bp ladder, lane 1, 2 : AA type, lane 3, 4 : AB type, lane 5 : PCR product).

Figure 5에서 나타낸 것과 같이 PCR 증폭산물(156 bp)을 제한효소로 처리하면 A 대립유전자는 *Rsa* I 제한효소 부위가 없어 156 bp를 나타내고, B 대립유전자의 경우 제한효소 인지부위(GT↓AC)에서 절단되어 82와 74 bp의 두 밴드로 나타나게 된다.

전체 96두 중에서 AB형을 나타낸 21두 중 보증종모우 H-177 칼리스트, H-197 브루터스, H-923 벤커, 그리고 H-947 루카스 네 두만이 AB형을 나타내었고 후보종모우 17두에서 AB형을 나타내었다. 그러나 보증종모우들과 후보종모우 전체에서 BB형은 나타나지 않았다. 전체 96두에 대한 유전자형 빈도와 유전자 빈도를 Table 5에 제시하였다.

Table 5. Genotypes and gene frequencies of prolactin locus proven and candidate

young bulls

Locus	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
Prolactin	AA	75 (78.12)	A = 0.891
	AB	21 (21.88)	B = 0.109
Total		96 (100.00)	1.000

Table 5에서 보는 바와 같이 AA, AB 유전자형의 빈도는 0.7812, 0.2188로 Chung 등(1996)이 보고한 0.621, 0.218, 그리고 BB형의 0.161의 결과와 비교하여 볼 때 비슷하게 나타났으나, 유전자 빈도는 A와 B 유전자가 각각 0.891과 0.109로 나타나 Chung 등 (1996)이 보고한 0.730과 0.270의 결과와 차이를 보였다.

3) Signal Transducers and Activators of Transcription 5a (STAT5a)

STAT5a 유전자는 소의 19번 염색체 상에 위치해 있으며, prolactin에 의해 활성화되는 전사조절인자로서 유선 내에서 확인되어졌다. 유선 내에서의 STAT5a의 역할은 처음으로 STAT5a knock-out mice에서 분석되어졌다. Mouse에서의 gene-targeting에 의해 가능하다고 보고된 기능은 유선발달, lactation, 유단백 유전자들의 활성화, 그리고 T-cell 성장의 부분적 제한작용으로 알려져 있다(Takeda and Akira, 2000). 본 연구에서 유전자형 분석에 이용된 부위에는 제한효소 인지부위가 없기 때문에 유전자형을 분석하기 위해 single strand conformation polymorphisms (SSCP)법을 이용하였다. Restriction fragment length polymorphisms (RFLP)는 Bostein (1980)에 의해 처음 소개된 방법으로 유전자내 제한효소의 인지부위에 인식되는 점 돌연변이 (point mutation)에 의해 다형성이 생성된다. 이 방법은 제한효소 인지부위 이외의 영역에 대해서는 다형성을 관찰하기 어렵다. 이를 보완하기 위해 Orita 등(1989)에 의해 소개된 방법이 SSCP이다. SSCP는 DNA의 특정부분을 PCR방법으로 증폭하고 변성시켜 단일가닥으로 분리한 다음 중성 polyacrylamide gel에 전기영동 함으로써 단일가닥의 염기변화에 따른 입체구조의 차이를 전기영동시 이동속도의 차이로 다형성을 확인하는 방법으로 RFLP 분석시 확인할 수 없는 다형성도 확인이 가능하다(Dean 등, 1990). STAT5a의 SSCP 결과를 Figure 6에 나타내었다.

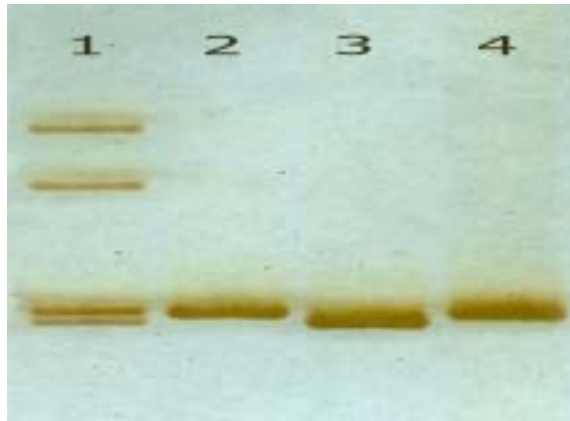


Figure 6. Polyacrylamide gel electrophoresis showing SSCP of STAT5a gene (Lane 1 : H-195 (AB), lane 2 : H-196 (AA), lane 3 : H-921 (BB), Lane 4 : H-030 (AA type)).

Figure 6에서 보는 바와 같이 전체 96두 중에서 A allele과 B allele, 그리고 A, B 두 가지 allele를 가진 hetero형이 검색되었다. 보증 종모우 19두 중에서 H-265 씨에라, H-267 징글, 그리고 H-941 팩터 세 두에서 hetero형이 확인되었고, 나머지 16두에서는 A allele가 검색되었다. 보증종모우 에서는 나타나지 않은 B allele는 후보 종모우 중에서 HK-118 대하와 H-921에서만 B allele가 검색되었다. STAT5a의 유전자형 빈도와 유전자 빈도를 조사한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 A allele의 유전자 빈도가 0.8802, B allele의 유전자 빈도가 0.1198로서 Antoniou 등(1999)이 보고한 A allele의 빈도 0.78~0.94와 유사한 양상을 보였다.

Table 6. Genotypes and gene frequencies of bovine STAT5a by SSCP

Locus	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
STAT5a	AA	75 (78.13)	A = 0.880 B = 0.120
	AB	19 (19.79)	
	BB	2 (2.08)	
Total		96 (100.00)	1.000

STAT5a : Signal Transducers and Activations of Transcription 5a.

STAT5a microsatellite 좌위는 ovine과 homology 분석에 의해 95%의 homology 를 보인다고 보고된 1716~1881bp 부위를 이용하였다. 이 부위는 intron 부위로 (TG)₁₂ 반복 서열이 존재하는데(McCracken 등, 1997), 전체 114 bp를 증폭하여 반복 서열의 양상을 확인하였다.

Microsatellite 분석에서는 forward primer에 fluorescent dye를 붙여 증폭 한 후, ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 22분동안 전기영동 한 후, 유전자형은 Genotyper software version 2.5 (Perkin-Elmer Co., USA)를 이용하여 분석하였다. 분석한 결과를 Figure 7에 나타내었다.

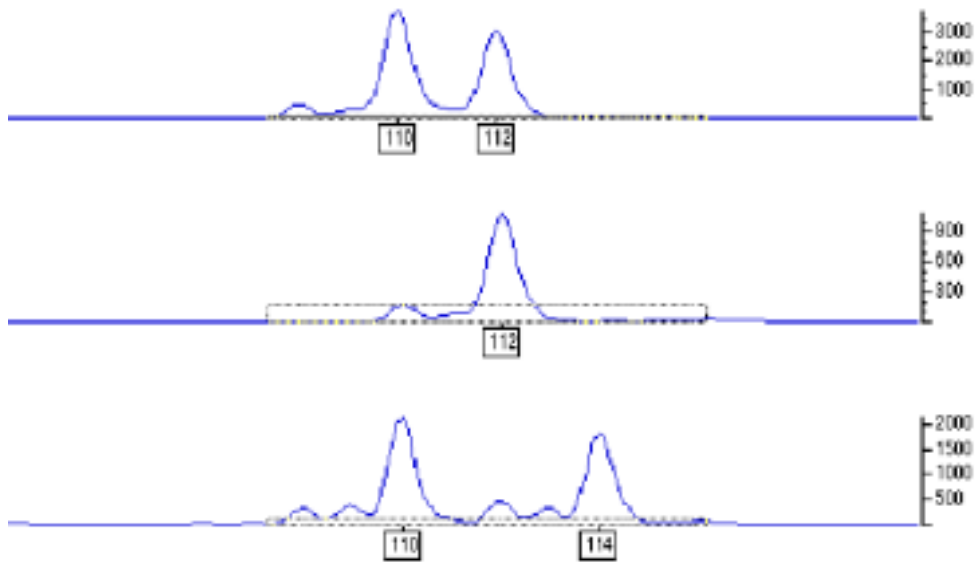


Figure 7. Electropherogram of STAT 5a fragment (Fam), run on ABI prism 310 genetic analyzer.

STAT5a microsatellite 좌위 분석 결과, 보증종모우에서 $(TG)_{12}$ 로 나타나는 114 bp 절편을 가지는 개체는 검색되지 않았으며, $(TG)_{10}$ 을 가진 H-191 리빌 한 두가 110 bp 절편을 가지는 것으로 나타났다. 또한 보증 종모우 중 110 bp 절편을 가지는 H-191 리빌을 포함한 5두(H-266 알렉스, H-268 마이다스, H-269 니콜라스, H-923 벤커, 112 bp)를 제외한 14두에서 모두 hetero 형을 나타내었다.

후보종모우의 경우 보증종모우에서 나타나지 않았던 114 bp 절편을 가지는 (TG) 염기가 12번 반복되는 개체가 2두(H-184 할리웃, H-924 화이어) 검색되었다. 후보종모우들의 (TG) 반복 서열의 양상이 보증종모우들과 비슷한 hetero 형을 가지고 있었으나, (TG) 염기배열이 11번 반복되어 나타나는 112 bp 증폭 절편들을 가진 개체들이 특히 많이 검색되었다.

Table 7. Genotypes and gene frequencies of bovine STAT5a microsatellite locus

Locus	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
Signal transducers and activations of transcription 5a	110/110	7 (7.29)	110 = 0.245 112 = 0.641 114 = 0.115
	110/112	29 (30.21)	
	110/114	4 (4.17)	
	112/112	40 (41.67)	
	112/114	14 (14.58)	
	114/114	2 (2.08)	
Total		96 (100.00)	1.000

위의 Table 7은 STAT5a microsatellite 좌위들의 검색된 각각의 유전자형 및 대립유전자의 빈도를 나타내었다. 유전자형 빈도에서 보면, 112 대립 유전자를 가지는 110/112 hetero 형과 112 homo 형이 많이 검색되었음을 알 수 있다. 따라서 유전자 빈도에서도 112 bp 대립 유전자의 빈도가 0.641로서 가장 높게 나왔고, 110 bp 대립 유전자의 빈도와 114 bp 대립 유전자는 각각 0.245와 0.115로 나타났다. 이는 McCracken 등(1997)이 Holstein에서 보고한 결과인 0.13, 0.82 그리고 0.05보다는 110 대립 유전자와 114 bp 대립 유전자의 빈도가 월등히 높게 나왔으며, 반대로 112 bp 대립 유전자의 빈도는 낮게 나와 조금 다른 차이를 보여주고 있다.

4) Bovine lymphocyte antigens (BoLA)

젖소 연구에 있어서 유단백질 유전좌위와 함께 질병형질의 연구의 한 부분으로 1980년대 이후 꾸준히 관심의 대상이 되어오고, 또한 연구의 대상이 되어왔던 유전자들 중에서 bovine lymphocyte antigens (BoLA) 유전자를 빼놓을 수 없다. BoLA 좌위들 중에서도 특히 가장 많은 다형성을 가지고 있는 DRB3 (β -chain을 가지고 있는 DR 부위) 2번째 exon부분에 대한 연구가 활발히 진행되어왔고 질병형질 뿐만이 아니라 생산형질과의 관계를 구명하기 위한 연구도 많이 수행되었다. 최근 Garcia-Briones 등 (2001)이 보고한 바에 따르면 BoLA-DRB3 2번째 exon 부위의 다형성에 따른 구제역 (foot-and-mouth disease)의 virus에 대한 저항성의 연구에서 DRB3 유전자가 어느 정

도 관련성이 있다고 하였다. 이중 DRB3.2*1, 3, 그리고 7 유전자를 가지고 있는 개체들의 virus 저항성 수준이 높게 보고하였고, DRB3.2*12, 그리고 18 유전자를 가지고 있는 개체들은 낮게 보고하였다. 또한 면역관련 형질(immunological traits)들과의 관련성에 관한 연구에서 IgG2와 IgM의 감소와 증가에 관계한다는 보고(Dietz 등, 1997a, 1997b)도 있다. 생산형질과의 연관관계에 대한 보고도 많이 발표되고 있는데, Starkenburg 등(1997)은 BoLA-DRB3 haplotype과 유생산량과 유의차가 있음을 보고하였고, Dietz 등(1997b)은 체세포 수(somatic cell counts)와 관련성이 있음을 보고하였다.

이들 모든 연구에서 보듯이 BoLA-DRB 좌위에 대한 연구는 비록 MHC system으로서 질병에 관여하는 유전자이면서, 또한 생산형질에도 관여하는 것으로, 경제성에 직접적으로 영향을 미치는 생산형질 뿐만 아니라 간접적으로 영향을 미치는 질병형질에 대한 연구도 앞으로 많이 진행되어야 할 것으로 본다. 특히 몇 해 전 국내 농가들에게 엄청난 경제적 피해를 입혔던 구제역의 경우에서 보듯이 구제역 virus에 대한 저항성 연구는 국내에서도 필요하다고 사료된다.

본 연구에서 이용된 국내 보증종모우 및 후보종모우에 대한 BoLA-DRB3의 2번째 exon부위에 대한 다형성 검색을 위한 PCR-RFLP를 수행한 결과를 Figure 7에 나타내었다.

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M2

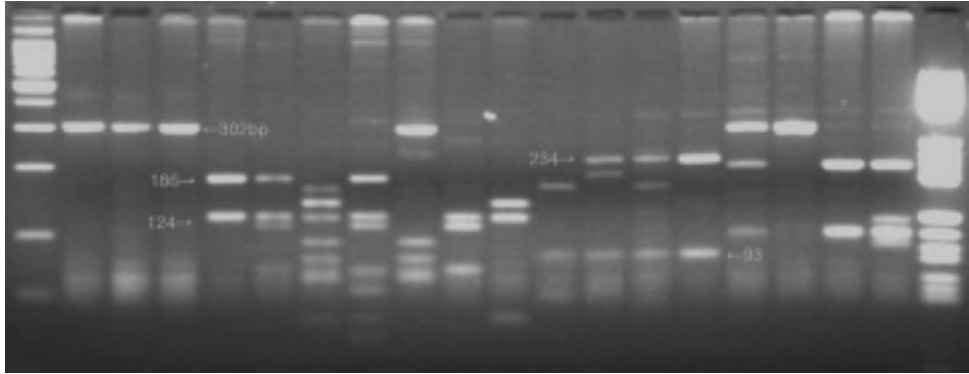


Figure 8. Results of PCR products (lane 1~3) and fragments digested by *Rsa* I (lane 4~10), *Hae* III (lane 11~14) and *BstX2* I (lane 15~18) restriction enzyme in candidate young bulls (lane 4 : OO, lane 5 : LU, 7 : LM, 8 : OV, 9 : MM, 10 : FU, 11 : AA, 12 : BD, 13 : AB, 14 : BB, 15 : AB, 16 : BB, 17 : AA, 18 : AE).

전체 96두에서 *Hae* III 제한 효소를 처리한 후 절편을 확인 한 결과 AA, AB, AD, BB, BD, 그리고 BE형이 각각 33두, 29, 5, 10, 18, 그리고 1두가 검색되었다. 후보종모우 중에서 HK-036 철쭉만이 BE형을 나타내었다. 그리고 *Rsa* I 제한 효소를 처리한 결과는 FU, IG, LM, LU, MM, OO, 그리고 OV형의 7가지의 type이 각각 7, 29, 19, 9, 7, 7, 그리고 18두가 검색되었다. 또한 *BstY* I 인지 부위의 반응은 *BstY* I (*Bacillus stearothermophilus* Y) 제한효소와 인지부위는 같지만 추출 균주가 다른 (isoschizomer) *BstX2* I (*Bacillus stearothermophilus* X2) 제한 효소를 처리했을 때, AA, AB, AE, BB, BD, BE, 그리고 EE형의 7가지 유전자형이 검색되었는데, 후보 종모우의 H-926 풀카는 EE형을, H-948 제주도가 BD형, HK-030 무궁화가 AE, 그리고 HK-034 원추리가 BE형을 나타내어 전체 종모우 중에서 후보종모우에서만 E 대립 유전자가 검색되었다. BoLA-DRB3 2번째 exon 부위의 PCR-RFLP를 이용한 다형성 검색 결과 각 유전자형 빈도와 유전자 빈도를 Table 8, 9, 10에 제시하였다.

Table 8. Genotypes and gene frequencies of BoLA-DRB3 using *Rsa* I restriction

enzyme

Restriction enzyme	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
<i>Rsa</i> I	FU	7 (7.29)	F = 0.037
	IG	29 (30.21)	G = 0.151
	LM	19 (19.79)	I = 0.151
	LU	9 (9.38)	L = 0.146
	MM	7 (7.29)	M = 0.172
	OO	7 (7.29)	O = 0.167
	OV	18 (18.75)	U = 0.083
Total		96 (100.00)	1.000

7가지의 유전자형에 대한 8가지의 대립 유전자의 빈도에서 F 대립 유전자의 빈도가 0.037로 가장 낮았고, M 대립 유전자의 빈도가 0.172로 가장 높게 나타났다.

Table 9. Genotypes and gene frequencies of BoLA-DRB3 using *Hae* III restriction

enzyme			
Restriction enzyme	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
<i>Hae</i> III	AA	33 (34.38)	
	AB	29 (30.21)	A = 0.521
	AD	5 (5.21)	B = 0.354
	BB	10 (10.42)	D = 0.120
	BD	18 (18.75)	E = 0.005
	BE	1 (1.04)	
Total		96 (100.00)	1.000

BoLA-DRB3 exon 2를 증폭하여 *Hae* III 제한효소를 처리한 결과 6가지의 유전자형을 볼 수 있었으며, 전체 96두에서 A 대립 유전자의 빈도가 0.521으로 가장 많았으며, 전체적으로 A와 B 대립 유전자의 빈도가 0.875 정도로 D와 E의 유전자 빈도는 낮게 나타났다.

Table 10. Genotypes and gene frequencies of BoLA-DRB3 using *Bst*X2 I

restriction enzyme

Restriction enzyme	Genotype	Genotype frequency (%)	Gene frequency
<i>BstX2</i> I	AA	5 (5.21)	A = 0.234 B = 0.740 D = 0.005 E = 0.021
	AB	34 (35.42)	
	AE	1 (1.04)	
	BB	53 (55.21)	
	BD	1 (1.04)	
	BE	1 (1.04)	
	EE	1 (1.04)	
Total		96 (100.00)	1.000

Table 10에서 보듯이 *BstX2* I 제한효소 처리 결과 B 대립 유전자가 0.740으로 가장 많은 빈도로 나타났고, D 대립유전자는 0.005로 상당히 낮게 나타났다. 전체 96 두에 대한 각 유전좌위들에 대한 유전자형은 부표에 제시하였다.

나. 각 좌위간 독립성 검정(χ^2 -test)

BTN 유전좌위, STAT5a 유전좌위 및 BoLA-DRB3 allele들에 대한 독립성 유무를 위해 독립성 검정(χ^2 -test)를 실시한 결과는 Table 11에서 보는 바와 같다.

Table 11. Chi-square values and probabilities among each locus

χ^2 (Prob)	BTN1	BTN2	BTN3	BTN4	STAT 5a	STAT 5a MS	PRL	DRB3- <i>Rsa</i> I	DRB3- <i>Hae</i> III	DRB3- <i>BstX2</i> I
BTN1		2.106 (0.349)	1.754 (0.185)	43.556 (.0001)	0.528 (0.768)	3.660 (0.600)	6.203 (0.013)	10.213 (0.116)	7.896 (0.162)	6.255 (0.395)
BTN2			1.650 (0.438)	4.894 (0.087)	1.573 (0.814)	10.607 (0.212)	1.603 (0.449)	12.307 (0.421)	7.935 (0.635)	30.805 (0.002)
BTN3				0.023 (0.879)	0.378 (0.828)	7.623 (0.178)	0.722 (0.396)	0.852 (0.991)	10.841 (0.055)	5.273 (0.510)
BTN4					0.538 (0.764)	4.726 (0.450)	4.211 (0.040)	7.850 (0.250)	5.511 (0.357)	9.678 (0.139)
STAT 5a						6.953 (0.731)	0.595 (0.743)	20.268 (0.062)	18.799 (0.043)	3.011 (0.996)
STAT 5a MS							3.309 (0.653)	34.226 (0.272)	41.853 (0.019)	12.203 (0.998)
PRL								16.038 (0.014)	1.296 (0.935)	5.444 (0.488)
DRB3- <i>Rsa</i> I									23.480 (0.795)	49.679 (0.064)
DRB3- <i>Hae</i> III										25.238 (0.713)
DRB3- <i>BstX2</i> 1										

BTN : Bovine butyrophilin, STAT 5a : Signal transducers and activators of transcription 5a, MS : microsatellite, PRL : Prolactin, DRB3-*Rsa* I : Restricted by *Rsa* I restriction enzyme of bovine lymphocyte antigens-DRB3, DRB3-*Hae* III : Restricted by *Hae* III restriction enzyme of bovine lymphocyte antigens-DRB3, DRB3-*BstX2* I : Restricted by *BstX2* I restriction enzyme of bovine lymphocyte antigens-DRB3.

Table 11에 나타난 바와 같이 각 좌위간 χ^2 -test(독립성 검정) 결과 대부분 유전

좌위 간 서로 독립적으로 발현되는 것으로 나타났다. 그러나 BTN1과 BTN4의 경우 고도의 유의수준($p < 0.01$)에서 두 좌위간 독립적이지 못하고 서로 연관되어 있으며, BTN2와 BoLA-DRB3 좌위중 *Bst*X2 I 제한효소로 절단한 대립 유전자의 발생 양상이 고도의 유의수준($p < 0.01$)에서 연관되어 나타났다. 특히 BTN1의 경우 7번 exon 부위에서 651번째 염기인 A이 G으로 치환되어 217번째 코돈인 AAG (lysine)이 AGG (arginine)으로 바뀌어 단백질 합성에 영향을 미칠 것으로 보이는데, BTN4와 PRL과 유의수준($p < 0.01, 0.05$)에서 관련이 있음을 보였다. PRL은 BTN1과 4 뿐만 아니라 BoLA-DRB3 좌위중 *Rsa* III 제한효소로 절단하여 확인한 대립 유전자의 발생 양상과도 관련이 있었다($p < 0.05$). BoLA-DRB3 좌위 중 *Hae* III 제한효소로 절단하여 확인한 대립 유전자의 발생 양상은 SSCP법을 이용하여 확인한 STAT5a 유전자의 SH2 domain 부위의 대립유전자와 STAT5a microsatellite 좌위의 대립유전자 발현양상과 유의수준($p < 0.05$)에서 연관성이 있음을 알 수 있었다.

다. Heterozygosity와 PIC 산출

다형성(polymorphisms)은 유전자 변이 연구의 기본이 되는데, 특히 유전자 또는 유전좌위의 다형성을 조사하기 위한 기본적인 도구로 heterozygosity value와 polymorphism information content (PIC) value를 이용한다. Heterozygosity value는 표지인자에 대한 heterozygous의 표본 내에서의 개체가 차지하는 비율(Wier, 1996)을 나타내며, PIC value는 임의 교배 집단에서 대립 유전자 빈도로부터 유도되어지는 기대되는 heterozygosity의 예측값이다(Barends 와 Fries, 1999). PIC value가 0.5보다 클 경우 고도의 유전정보를 포함한다(highly informative)고 하고, 0.25~0.5 사이의 값을 가지면 어느 정도의 유전자 정보(reasonable informative)를, 0.25보다 작을 경우 미약한 유전자 정보(slightly informative)를 가지고 있는 좌위라고 할 수 있으며, PIC value가 1에 가까울수록 바람직하다고 볼 수 있다(Bostein 등, 1980).

Table 12. Heterozygosity and PIC value of each locus

Loci	Gene type	Gene frequency	PIC	Heterozygosity
Butyrophilin 1	A	0.906	0.155	0.170
	B	0.094		
Butyrophilin 2	A	0.552	0.372	0.495
	B	0.448		
Butyrophilin 3	A	0.818	0.254	0.298
	B	0.182		
Butyrophilin 4	A	0.896	0.169	0.187
	B	0.104		
Prolactin	A	0.891	0.176	0.1950
	B	0.109		
STAT5a	A	0.880	0.189	0.211
	B	0.120		
STAT5a MS	110	0.245	0.457	0.517
	112	0.641		
	114	0.115		

(Continued)

Loci	Gene type	Gene frequency	PIC	Heterozygosity
DRB3- <i>Rsa</i> I	F	0.037	0.853	0.859
	G	0.151		
	I	0.151		
	L	0.146		
	M	0.172		
	O	0.167		
	U	0.082		
	V	0.094		
DRB3- <i>Hae</i> III	A	0.521	0.517	0.589
	B	0.354		
	D	0.120		
	E	0.005		
DRB3- <i>BstX2</i> I	A	0.234	0.338	0.398
	B	0.740		
	D	0.005		
	E	0.021		

BTN : Bovine butyrophilin, STAT 5a : Signal transducers and activators of transcription 5a, MS : microsatellite, PRL : Prolactin, DRB3-*Rsa* I : Restricted by *Rsa* I restriction enzyme of bovine lymphocyte antigens-DRB3, DRB3-*Hae* III : Restricted by *Hae* III restriction enzyme of bovine lymphocyte antigens-DRB3, DRB3-*BstX2* I : Restricted by *BstX2* I restriction enzyme of bovine lymphocyte antigens-DRB3

각 좌위들의 유전자형 빈도와 유전자 빈도를 이용한 PIC값과 heterozygosity값을 산출한 결과 BTN 좌위 내에서 2와 3의 좌위가 높게 나왔으며, 특히 BTN 2의 경우 다른 좌위와 비교하여 상당한 수준의 유전자 정보를 가지고 있음을 알 수 있었다. PRL의 PIC value와 heterozygosity value도 낮게 나왔다. 그러나 STAT5a microsatellite 좌위의 PIC value와 heterozygosity value는 0.457과 0.517로 높게 나왔다. 이는 장(1997)이 보고한 적은 수의 유전자형일수록, 유전자의 빈도가 한쪽으로 치우칠수록 PIC값이 작게 나온다는 것과 일치하였다. BoLA-DRB3 좌위에서의 제한효소에 따른 대립유전자의 빈도로 산출한 PIC value와 heterozygosity value는 *Rsa* I, *Hae* III, 그리고

*Bst*X2 I 에서 각각 0.853, 0.517, 0.338(PIC value), 그리고 0.859, 0.589, 0.398(heterozygosity value)로 *Rsa* I 제한효소 인지부위에 따른 다형성을 나타내는 대립 유전자들의 값이 높게 나타났다. 위에서 보는 바와 같이 *BTN*, *STAT5a*, 그리고 *BoLA-DRB3* 유전좌위들의 PIC value와 heterozygosity value의 정도를 보았을 때, 보다 더 깊은 연구가 수행될 때, 이들 유전자들의 집단에 대한 효과를 설명할 수 있을 것이라 사료된다. 따라서 앞으로 이들 후보 유전좌위에 대한 연구의 가치가 충분히 있음을 나타낸다고 할 수 있겠다.

라. 유전자형과 생산형질과의 관계 분석

다형성 분석에 이용된 보증종모우 및 후보종모우 96두에 대한 생산형질 분석은 2002년 축산기술연구소에서 발행된 젓소 후대검정사업 보고서(2002. 7.)에서 보고한 305일 생산형질, 성년형 생산형질 및 생산형질에 대한 PTA값을 이용하였다. 젓소의 능력을 보다 정확하게 평가하기 위해 산유능력검정에 의한 각 개체의 생산기록이 정확하여야 한다. 그러나 개체마다 비유기간, 1일 착유회수 등에 차이가 있기 때문에 통계적으로 보정을 한 다음, 이에 근거하여 종축의 가치를 비교하게 된다. 305일 생산형질의 경우 비유기간은 젓소가 분만하면서부터 시작하여 다음 분만 약 2개월 전부터 건유가 시작되는데 건유 개시까지의 실제 착유가 실시되는 기간으로 305일을 기준으로 정한 후, 생산량을 305일 까지 착유 할 경우의 예측치를 산출하여 개체간의 능력을 비교한다. 또한 젓소의 비유량은 연령에 따라서도 차이가 있는데 2~3세의 비유량은 6~7세 된 개체들의 비유량에 비해 상당히 떨어지는 경향이 있으며, 9세를 넘으면 점차 비유량이 감소하게 된다. 따라서 6~7세를 성년이라 가정하여 이 시점을 기준으로 나이에 따라 적절한 가중치를 두어 보정을 하여 산출한 비유능력을 성년형 생산형질이라고 한다.

본 연구에서 전체 96두 중 후대검정 기록이 있는 92두를 분석에 이용하였다. 305일과 성년형 생산형질에 대한 분석 결과는 Table 13~17에 나타내었다(부록 참조).

Table 13. 305-day production traits (Mean \pm STD) of each genotype and probability

of each BTN locus in proven and candidate young bulls

Genotype	BTN1		Prob.	BTN2			Prob.
	AA	AB		AA	AB	BB	
Milk305	7038.92 ±661.15	7295.51 ±597.19	0.1363	7323.51 ±645.68	7062.98 ±670.93	6807.99 ±445.64	0.0945
FAT305	261.40 ± 29.41	268.48 ± 29.46	0.3620	268.13 ± 29.29	263.27 ± 30.47	250.36 ± 20.91	0.2697
PROT305	225.78 ± 21.37	232.92 ± 18.78	0.1971	235.30 ± 23.38	225.94 ± 20.77	219.29 ± 13.13	0.0915
SNF305	613.95 ± 57.53	636.12 ± 48.55	0.1351	635.35 ± 57.10	616.22 ± 58.46	598.74 ± 33.84	0.1990
Genotype	BTN3		Prob.	BTN4		Prob.	
	AA	AB		AA	AB		
Milk305	6961.98 ±610.76	7316.45 ±676.18	0.0119	7050.40 ±658.98	7237.92 ±629.36	0.2679	
FAT305	258.00 ± 27.09	271.33 ± 31.80	0.0363	261.65 ± 29.32	267.14 ± 30.10	0.4713	
PROT305	222.95 ± 17.67	234.73 ± 24.41	0.0091	225.91 ± 21.54	232.04 ± 18.43	0.2591	
SNF305	605.44 ± 49.15	641.24 ± 61.61	0.0030	614.67 ± 57.20	632.20 ± 51.92	0.2288	

BTN : butyrophilin, Milk305 : 305-day milk yield, FAT305 : 305-day fat yield, PROT305 : 305-day protein yield, SNF305 : 305-day SNF yield, Prob. : probability.

Table 13에서 305일 생산형질에 대한 분석 결과 모두 BTN3의 유전자형에서 유의차를 보였으며, AB형은 유량, 유지량, 유단백량, 그리고 무지고형분량의 평균값이 각각 7316.45, 271.33, 234.73, 그리고 641.24로 AA형의 평균값(6961.98, 258.00, 222.95, 그리고 605.44)보다 높게 나타났다. 그러나 다른 유전자형에서는 생산형질과 유의차를 보이지 않았다(Table 23 ~ 28). 유의차를 보이지는 않았지만 BTN2의 경우 다른 좌위와는 다르게 B 대립유전자를 지닌 AB와 BB형 보다 AA형의 생산형질의 평균값이 높게 나왔다. 따라서 후보종모우 선발 시, 또는 후보종모우에서 보증종모우 선발 시에 유전적으로 더 우수한 개체를 이용하기 위한 지표로서 이용이 가능 할 것이라 사료된다.

Table 14. 305-day production traits (Mean ± STD) of each genotype and probability

of each BTN locus in proven bulls

Genotype	BTN1		Prob.	BTN2		Prob.
	AA	AB		AA	AB	
Milk305	7556.47 ±408.99	7666.82 ±419.36	0.6133	7458.30 ±296.77	7641.61 ±417.43	0.4114
FAT305	285.90 ± 18.82	288.28 ± 19.10	0.8118	271.53 ± 10.51	290.87 ± 17.93	0.1307
PROT305	240.39 ± 14.12	245.60 ± 15.14	0.4960	233.63 ± 11.50	244.32 ± 14.27	0.3100
SNF305	659.41 ± 37.24	667.42 ± 43.25	0.6963	643.20 ± 19.44	667.27 ± 40.09	0.4432

Genotype	BTN3		Prob.	BTN4		Prob.
	AA	AB		AA	AB	
Milk305	7294.28 ±202.62	7797.32 ±382.54	0.0036	7556.47 ±408.99	7666.82 ±419.36	0.6133
FAT305	273.09 ± 12.68	296.30 ± 15.74	0.0031	285.90 ± 18.82	288.28 ± 19.10	0.8118
PROT305	231.89 ± 6.98	248.95 ± 13.85	0.0054	240.39 ± 14.12	245.60 ± 15.14	0.4960
SNF305	633.24 ± 20.26	682.08 ± 34.39	0.0023	659.41 ± 37.24	667.42 ± 43.25	0.6963

BTN : butyrophilin, Milk305 : 305-day milk yield, FAT305 : 305-day fat yield, PROT305 : 305-day protein yield, SNF305 : 305-day SNF yield, Prob. : probability.

전체 92두 중 보증종모우 19두에 대한 305일 생산형질과의 관계를 분석한 결과 전체 92두에서 나타난 바와 같이 BTN3의 유전자형에서 고도의 유의차($p < 0.01$)를 보였으며, BTN1과 4의 경우 평균값과 확률값이 동일하게 나왔는데, 이는 보증종모우 19두에서 각 개체의 BTN1과 4의 유전자형이 동일하게 나타났기 때문이다. 또한 BTN1, 2, 3, 그리고 4에서 AB형의 생산형질이 AA형 보다 더 높게 나타났다(Table 14).

Table 15. 305-day production traits (Mean ± STD) of each genotype and probability

of each BTN locus in candidate young bulls

Genotype	BTN1		Prob.	BTN2			Prob.
	AA	AB		AA	AB	BB	
Milk305	6918.16 ±652.38	7152.70 ±605.87	0.2384	7299.72 ±692.86	6874.29 ±630.86	6776.22 ±456.43	0.0404
FAT305	255.68 ± 28.58	260.87 ± 29.70	0.5574	267.53 ± 31.66	254.27 ± 28.31	248.77 ± 21.32	0.1725
PROT305	222.37 ± 21.43	228.05 ± 18.18	0.3781	235.59 ± 25.14	219.94 ± 19.04	218.44 ± 13.52	0.0199
SNF305	603.34 ± 56.43	624.08 ± 46.37	0.2207	633.96 ± 61.73	599.57 ± 53.90	595.60 ± 33.95	0.0673
Genotype	BTN3		Prob.	BTN4		Prob.	
	AA	AB		AA	AB		
Milk305	6909.86 ±637.59	7076.01 ±667.35	0.3171	6930.31 ±651.99	7084.74 ±631.11	0.4256	
FAT305	255.64 ± 28.04	258.85 ± 30.56	0.6637	255.89 ± 28.50	259.59 ± 30.16	0.6632	
PROT305	221.55 ± 18.45	227.62 ± 25.64	0.2573	222.47 ± 21.65	227.20 ± 17.44	0.4505	
SNF305	601.08 ± 51.01	620.83 ± 62.55	0.1612	604.05 ± 56.16	619.62 ± 50.09	0.3449	

BTN : butyrophilin, Milk305 : 305-day milk yield, FAT305 : 305-day fat yield, PROT305 : 305-day protein yield, SNF305 : 305-day solid-non-fat yield.

Table 15는 후보종모우 73두에 대한 결과로써 후보종모우에서는 보증종모우와는 달리 BTN2와 305일 유량, 유단백량에서 유의차를 보였다. 또한 BTN2에서 전체 92두에서의 결과와 같이 AA형이 B 대립유전자를 가진 AB, BB형보다 높은 값을 나타내었다. 이 결과는 보증종모우와 상반된 결과로 전체 92두 중 73두인 후보종모우와 19두인 보증종모우와의 개체 수의 차이로 인한 결과로 보인다. 따라서 앞으로 BTN 유전자에 대한 보다 더 많은 개체들의 유전자형 분석이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

성년형 유량과 유지방량에 대한 분석 결과, 305일 생산형질에 대한 분석결과와 같이 유량과 유지방량 모두 BTN3의 유전자형에서 유의차를 보였으며, AB형은 유량과 유지방량의 평균값이 각각 7973.37과 301.66으로 AA형의 평균값 7578.18과 287.37 보다 높게 나타났다. 그러나 다른 유전자위에서는 유의차를 보이지 않았다. 유의차를 보

이지는 않았지만 BTN2의 경우 다른 좌위와는 다르게 B 대립유전자를 지닌 AB와 BB형 보다 AA형의 생산형질의 평균값이 높게 나왔다.

성년형 생산형질의 결과는 305일 생산형질과의 분석 결과와 비슷한 양상을 나타내었는데, 이는 성년형으로 보정 하더라도 305일 착유일수가 기준이 되기 때문일 것으로 보인다. 따라서 앞으로의 연구에 있어서 유전자형과 생산형질과의 관계를 분석하는데 305일 생산형질을 이용하는 것으로도 유전자형의 효과를 설명하기에는 충분할 것으로 보인다.

Table 16. Genotypic differences of BTN, STAT5a, and PRL for production traits

Genotype	BTN1		BTN2		
	AA	AB	AA	AB	BB
PTA Milk	32.30	110.43	154.19	23.56	-12.96
PTA FAT	0.36	1.07	2.07	0.27	- 1.10
PTA PROT	1.93	4.76	5.40	1.77	1.15
PTA SNF	5.16	11.38	12.91	4.97	2.33

Genotype	BTN3		BTN4	
	AA	AB	AA	AB
PTA Milk	24.83	88.28	40.39	75.25
PTA FAT	0.21	1.02	0.25	1.47
PTA PROT	1.72	3.83	2.26	3.33
PTA SNF	3.81	10.97	5.84	8.46

Genotype	STAT5a		PRL	
	AA	AB	AA	AB
PTA Milk	30.39	110.71	47.90	46.51
PTA FAT	-0.40	3.81	0.50	0.48
PTA PROT	2.25	3.26	2.18	3.50
PTA SNF	5.12	11.04	6.40	6.30

Genotype	STAT5a microsatellite					
	110/110	110/112	110/114	112/112	112/114	114/114
PTA Milk	-25.59	78.80	116.55	17.86	59.19	228.10
PTA FAT	- 3.51	3.03	3.78	-0.99	1.09	3.00
PTA PROT	- 0.61	2.51	5.25	2.29	2.95	7.70
PTA SNF	- 3.34	8.23	23.58	3.81	9.50	7.95

BTN : butyrophilin, Milk305 : 305-day milk yield, FAT305 : 305-day fat yield, PROT305 : 305-day protein yield, SNF305 : 305-day solid-non-fat yield.

Table 17. Genotypic differences of BoLA-DRB3 for production traits

Genotype	BoLA-DRB3- <i>Rsa</i> I						
	FU	IG	LM	LU	MM	OO	OV
PTA Milk	8.84	-27.70	88.21	186.66	-33.97	198.74	41.92
PTA FAT	-2.70	-1.79	1.60	4.47	-3.97	6.16	1.91
PTA PROT	1.76	0.34	2.85	8.08	-2.11	7.79	2.68
PTA SNF	6.76	0.18	9.82	20.90	-6.39	15.93	6.44

Genotype	BoLA-DRB3- <i>Hae</i> III					BoLA-DRB3- <i>BstX2</i> I		
	AA	AB	AD	BB	BD	AA	AB	BB
PTA Milk	28.38	83.69	107.46	-61.24	81.62	33.00	32.24	51.47
PTA FAT	0.90	-0.03	3.14	-2.84	2.37	-4.12	-0.95	1.31
PTA PROT	0.71	4.93	7.06	-0.73	2.62	0.32	2.21	2.78
PTA SNF	2.72	9.59	17.40	-3.53	9.00	3.06	5.94	6.43

BTN : butyrophilin, Milk305 : 305-day milk yield, FAT305 : 305-day fat yield, PROT305 : 305-day protein yield, SNF305 : 305-day solid-non-fat yield.

생산형질의 예측유전능력에 대한 유전자형의 효과를 분석한 결과를 Table 16과 17에 제시하였다. BTN1, 3, 그리고 4의 경우 AA형을 가진 개체들 보다 AB형을 가진 개체들의 후대 유전능력이 월등히 크게 나타났으나, BTN2에서는 AA형이 크게 나타났다. 또한 STAT5a의 경우 AB형과 114/114 대립유전자에 대한 효과가 크게 나타났음을 볼 수 있었다. BoLA-DRB3의 경우 *Rsa* I 제한효소 처리 결과, OO형, *Hae* III 처리 결과, AD형, 그리고 *BstX2* I 처리 결과, BB형에서 높게 나왔다. 특히 *Hae* III 처리 결과 A 유전자를 가진 개체들이 B 유전자를 가진 개체들 보다 높게 나타났다.

유량에 있어서는 BTN 2의 유전자형이 유의수준($p < 0.05$)에서 뚜렷한 차이를 보였고, 305일 생산형질과 성년형 생산형질에서 유의차를 보였던 BTN 3 유전좌위의 경우, PTA값에 있어서는 낮은 유의수준($p < 0.10$)으로 무지고형분에서 차이를 보였을 뿐 유의차를 보이지 않았다.

305일 생산형질과 성년형 생산형질의 경우 보정계수를 통한 능력치로서 유전자형

과 생산형질과의 연관성을 실질적인 기록에 가깝게 해석을 한다는 측면에서 유전자의 효과를 생각해 볼 수 있으며, 예측유전능력(predicted transmitting ability : PTA) 값은 후대에 전달 될 수 있는 능력의 관점에서 볼 때의 생산형질과의 관계로서 유전자의 우수성 및 열등성에 대한 효과에 대해서 생각해 볼 수 있다.

본 연구의 분석에 이용된 전체 종모우 92두에서 BTN1, 3, 그리고 4에서 B 대립유전자, BTN2에서 A 대립유전자를 가진 개체들의 생산량이 높게 나타난 점을 볼 때, 앞으로 후보종모우 및 보증종모우 선발시 고려해 볼 필요가 있을 것으로 보인다. 하지만 92두의 표본 크기가 너무 작기 때문에 신뢰도를 더 높이고, 보다 정확한 판단을 하기 위해서는 BTN과 STAT5a 유전자에 대한 연구가 보다 더 많은 개체들에서 앞으로 꾸준히 수행되어야 할 것으로 보인다. 또한 본 연구에서는 뚜렷한 관계를 나타내지 않았지만 BoLA-DRB3 좌위들에 대하여 Starkenburg 등(1997)의 BoLA-DRB3 haplotype과 milk yield와 유의 차가 있다는 보고와, Dietz 등(1997b)은 somatic cell counts와 연관관계가 있다는 보고도 있어 앞으로 BoLA-DRB3 좌위에 대한 연구도 계속 진행되어야 한다고 사료된다.

이와 같이 한국내 보증종모우 19두 및 후보종모우 77두에 대하여 butyrophilin과 signal transducers and activators of transcription 5a 유전자와 같은 후보 유전자와 bovine lymphocyte antigen-DRB3 유전자에 대한 검색을 실시하였고, 그들의 유전자형에 대한 생산형질과의 관계를 조사하였다. 본 연구의 결과 국내 보증종모우 및 후보종모우의 후보 유전좌위에 대한 다형성을 분석 하였으며, 이들 유전좌위와 생산형질과 관련성 분석(association test)을 통한 국내 종모우들의 분포 및 특성을 확인하였다. 이 결과 앞으로 후보 유전자들에 대한 보다 더 세밀하고 폭넓은 분석과 더 많은 생산형질과의 연관 분석을 가축개량에 적용하면 개체 선발 및 개량에 있어서 충분한 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 연구가 보다 더 효율적으로 이루어지기 위해 혈통 및 가계의 정립과 생산형질 및 질병형질에 대한 정확한 기록, 유지, 및 관리가 이루어진다면, 고능력 유전자원의 조기 식별 및 우수 유전자원의 보존을 통한 보다 더 효과적이고 효율적인 가축 개량의 지표로서 충분히 이용될 수 있을 것이라고 사료된다.

제 2 절 유선발현 유전자의 특성 연구

1. 실험 방법

가. 유전자의 단리 및 구조해석

젖소, 한우, 생쥐의 조직과 혈액으로부터 mRNA와 genomic DNA를 준비하여 유전 특이적 발현 유전자의 단리는 염기서열을 바탕으로 primer를 제작하여 PCR증폭을 통해서나 cDNA probe를 이용하여 실시한다. DNA 염기서열은 autosequencer를 이용하여 결정하며 구조변이 해석은 품종 및 개체간 직접적인 염기서열 결정과 점돌연변이 검색방법을 통하여 실시한다.

나. 유전자 산물의 기능해석

mRNA 전사산물의 해석은 Northern blotting법으로 실시하며, 양적발현은 RNase protection assay법 등으로 분석한다. 또한 유전자의 전사량은 nuclear run-off assay법으로 조사한다.

다. 전사조절영역의 기능해석

특정 염기서열을 인식해서 결합하는 단백질과 두가닥 DNA의 보합체는 gel shift법으로 검출한다. 핵단백질은 유선조직으로부터 우선 유선상피세포를 collagen 효소처리 등으로 분리하여 Dounce homogenizer와 투석을 통하여 핵추출액을 준비한다.

2. 결과 및 고찰

가. 한국 재래흑염소 butyrophilin promoter 영역의 클로닝과 다형성 분석

유용한 butyrophilin promoter를 확보하고 이용하기 위하여, 염기서열이 보고되지 않은 한국 재래 흑염소(*Capra hircus L.*)의 butyrophilin promoter영역의 클로닝은 인간과 염소와 같은 반추위 동물인 소의 염기서열 상동성을 조사하고 exon2에서 reverse방향 primer를 설계하고, forward방향 primer는 소의 butyrophilin promoter 영역 내에서 설계하였다. 이들 한 쌍의 primer로 PCR을 수행하여 단일 밴드의 PCR산물(Figure 1)을 획득한 후 pGem T-easy vector에 subcloning하여 염기서열 결정반응에 의해 약 4kb의 전사조절영역의 염기서열을 분석하였다(Figure 2). 클로닝한 흑염소의 염기서열과

GenBank에 등재된 소의 butyrophilin 염기서열을 비교한 결과 5' flanking region에서 91%, exon 1부위에서 93%, intron 1영역에서 92%의 높은 상동 성으로 염기서열이 잘 보존이 되어 있었다. 소의 butyrophilin과 인간, 마우스, 기니아피그 BTN간의 아미노산 수준에서 서열의 유사성은 84%, 71%, 74%로 매우 유사하였다.

현재 소, 인간, 마우스의 butyrophilin 유전자의 전 염기서열이 밝혀졌으며, 기니아피그의 cDNA 전 염기서열과 돼지의 cDNA 일부가 클로닝되었다. butyrophilin 전사조절영역 내의 조절인자 결합부위는 Genomatix web상의 프로그램을 이용하여 분석하였으며 butyrophilin 유전자의 발현을 유도할 것으로 예상되어지는 결합부위는 web상에서 제공하는 통계적 수치와 결합부위의 상동성 정도를 분석하여 결정하였다. 분석된 결과에 의하면, butyrophilin의 promoter 영역 내에는 TATA나 CCAAT box, Initiator 염기서열은 존재하지 않으며, 번역개시점을 포함하는 GACAUGG 염기서열은 모든 신호에 대해 번역 효율을 적어도 10배 증가시키는 것으로 알려져 있다. 보고된 인간, 마우스, 소의 promoter 영역간의 상동성은 거의 나타나지 않았으며 STAT를 비롯하여 C/EBP, NF-1 등의 전사조절인자 결합부위가 존재하는 것으로 나타났다. 한국 재래 흑염소의 butyrophilin 유전자의 전사조절 영역 내 전사조절 단백질의 결합가능 부위를 분석한 결과 다양한 위치에 전사조절 인자의 결합 가능부위가 존재하였다.(Figure 2) 유즙 분비와 관련된 유전자의 전사조절 영역에서 주로 발견되는 STAT을 비롯하여 HNF, AP-1, C/EBP, GATA-1 등의 다수의 전사조절 인자의 결합부위를 확인하였으며 구조상 면역글로불린에 속해 있는 것으로 알 수 있듯이 면역관련 전사조절 인자들의 결합부위를 확인 할 수 있었다. 그리고 다수의 interferon 조절인자 결합부위를 찾을 수 있었으며 면역과 관련된 T세포와 B세포의 전사조절을 돕는 인자들의 결합부위도 찾을 수 있었다. 이밖에도 근육조직 특이적으로 발현되어지는 유전자의 전사조절 영역에서 확인할 수 있는 전사조절 인자들의 결합부위도 확인할 수 있었다(Table 1과 2).

유단백질의 전사조절 영역 내에서의 변이를 확인하기 위한 다형성 분석은 흑염소의 체놈 DNA에서 클로닝한 exon1과 intron 1을 포함하는 약 4kb영역 내에서 약 500bp가 증폭될 수 있도록 5개 영역으로 분류하여 다수 개체를 증폭한 후 염기서열을 분석하였다(Fig. 3). 이렇게 분석된 각 개체의 염기서열은 개체간 비교를 실시하여 다형성 위치를 검색하였으나 개체간의 다형성은 확인할 수 없었다.



Figure 1. Subcloning of promoter region containing exon 1 and intron 1 for butyrophilin gene of *Capra hircus L.* LA-PCR products were ligated to pGem T-easy vector and electrophoresis in 0.8% agarose gel. M1; 1kb ladder, lane 1; LA-PCR products. lane 2; recombinant DNA, M2; λ phage *Hind* III-digested.DNA,

-3477 AGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCG

-3421 GCCGCGAATTCAGTAGTATTAATTCAGAGATCCTGTCCAGTGTGTCGGTTTCTATCGA
SORY/HMGIY.01 RBIT/BRIGHT.01

-3361 AATGACTCAGATATTATCCAACCAGAACCTTGGCTGCCACATAATAGCTTGAGTTCTATG

-3301 TACCATTGCTGCTATTTCCCTGGCTCCTTTCCTTCAGTCTAGTTCTCTTAGGTGAAAAAT
ETSF/ETS2.01 IRFF

-3241 AAAAGTTCTTCCCCTCCCCTTTTCCCAAATTATCATTAGATATTTTGACAATGCAGAG
/IRF7.01 MAZF/MAX.01

-3181 AAGGGAGAGAAGTCTAATCAGGATGAATTAAGGAGAGGGAAACATTATCAGTGATATTTG
RBIT/BRIGHT IRFF/IRF2.01 HMTB/MTBF.01

-3121 TGACAGTTAAGCACAAACGAAAGCTGAAAATGAGGCAGGTACATCTCAAAGTACGAAAGC

-3061 CAAGGACTGGTTGGTGTGATTTAAGCTGCAAATTTACTTCTGTCTATGTCTGATAAG
TBPF/ATATA.01 GATA

-3001 GGTCAGAGAGTATGAACTCAAAGAGCTCAGTTTAGGAGGGGAATAGAGACTTGAAACAA
LEFF/LDF1.02

-2941 AAGACAAAAATAAATGCATGTGCGTCTCAGAGTAGGCTTCAGGTCACGTTCTGAGAGCA
RORA/SRY LEFF/LEF1.01

-2881 AAGAGGGACCAGGAAGTTGCCATGTGCATAGGATAAATCTGGCACATCTCCTGGAGAGT
ETSF/ETS1.01

-2821 CTATTTTCAGTTGGAAGGGGTAAAACTAGTCAGAGTCACATTTCTTTTGAAATTTACAG

-2761 TTAATGCAGTAAAAATGTTTTAATTTGCCTTAAATGTTATAGATAAGACTGAAGACTTTAG
RBIT/BRIGHT GATA

-2701 AAGTGTTTCTCATGTGAGCTAGCCAGTGTGGGAGACTAGGGAGAAAAAGCGAAGAGAAA
IRFF/IRF2.01

-2641 GGAAGCAGGAAGGCCACTAATTCTTACAGCATTTTCTTGACCAGATTAAGGTGCTTGAAC

-2581 TGGATGCTGGGGTCACTAAGCAGTCATGTAGACATTTTAAAGCAAAAAGTGACAAGATTG

-2521 GATTTGTAAGTGAAGAAATTCATTCTCCTGGCACTCAGGCATATCCACTGAAGCAAAATATC
HMTB/MTBF.01

-2461 TTTTTTTTTCTTTTCTCTGTTTTAAGCAGTTCTCTTTTCGTGGTCTTGATCACAGTCTCA

-2401 ATTAAAAGGCAAAAGCAAAATGAGTGGTGAAGGGTTTTTGCCACAAATAAATACAGAGC
RBIT/BRIGHT

-2341 TGATGTTTTCAACTTTTTTAAAAAATTCACACATATTGATTAAAAAAAAAAAGCACCAGA
OCT-1 MEF2/MMEF2.01

-2281 CTCTGTCAAAAAGGCAATTACTTGAAAAGTTACTTCCAGAAATATATTTAAAAATATATA
TALE/TGIF.01 SATB/SATB1.01

-2221 ATATGAAAATGACCAACATAAATCATATAAATGCATAATAAAGTAATAATTTGGTCA
TCTF/TCTF1.01 EREF/ER.01

-2161 GTGTCATCTAGCCATTAGTGATGATGAGGAAGAATAGACCTCAGTGTGGTGAAGGA

-2101 CATTTCGCTGATGGTGTGATTGGACTGACATTCAGGAAGAAGCTTTGACAATATGTTC
ETSF/ERS2.01 : STAT/STAT.01

-2041 ATACCCTTTGGCCTTAAAGACGGGATTCTGGGAATTCAGCAGAAAGTATCAGTAAGT
IKRS/IK2.01

-1981 TAACAAAGATGTGGGCAAAGACTTGTGTATAAACTGCACTATTTATAACAGGCAAAAAAC
LEFF/LEF1.01

-1921 CCAAGATGTGCCATGATCTCAGAAACCTTCAATATGATAAAAATATAGCTATTAACAATGT
-1861 TTCAATTACGTAAAAGCCTTAGTCGCTCAGTCATGTCTGACTCTTTGTGACCCAATGGAC
-1801 TGTAGCCTGCCAGGCTCCCTGTCCATGTGATTCTCCAGGCAAGAATACTGGAGTGGGTA
-1741 GCCATTCCCTTTTCCAAGGGATCTTCCCAACCAGGGAATGAACCCTGATCTCTTGCAAT
IKRS/IK2.01 TEAF/TEF1.01

-1681 GCAAGCAAATCTTTATGGTCTGTGCCACCAGGAAGCCCAATATATACAAATTATATA
ETSF/CETS1P54.01 OCT-1

-1621 AATCATCAGTTCTATTACTGGAGGCTATCATTACTTGCTGACTACCTTAAAAAATACATA
APIF/API.02

-1561 TCTTTAAAAATGTTTTCTGTAACAATAAGGGTTTAACCCAAAACAGGGAGTTGTAGGCCT
MEF2/MEF2.05 : TBP/TF.02

-1501 CATAAATTGCTTTTAGGGAGGTAGCTTTCAGAGAGGCAACTCTGGGCCTTGAAAACTGA
SF1F/FTF.01

-1441 ATCATACCCATGCATTCTCAGCCTATCTTTAGTTTTTAGCTCATATAAATAAATAAGAA
GATA/LMO2COM.02 SATB/SATB1.01

-1381 TAACAACCTCCCTCTTCTAAATCCCTATTATATGCTAAGCACTGCTGCTGCTACTGCTG
OCT-1

-1321 CTAAGTTGCTTCAGCCGTGTCACCACTCTGTGCGACCCATAGACGGCAGCCACCAGGCT
-1261 CCTCCGTCCCTGGGACTCTCCAGGCAAGAACACTGGAGTGGGTGCCATTTCTTCTCCA
NFKB/NFKAPPAB.02 ETF/PU1.01

-1201 ATGCATGAAAGTGAAGAGTGAAGTAAAGTTGCTCAGTCGTGCCACTTTAACGACCC
IRFF/IRF2.01

-1141 CATGGACTACAGCCTATCAGGCTCCTCCACCCATGGGATTTCCAGGCAAGAATACTGGA
NOLF/OLF1.01 NFKB/NFKAPPAB65.01

-1081 GTGGGTCGCCATTGCCTTCTTAATCTCATTTAATCCTTGCACTACTCCAAAGAAGGT
-1021 ATTATTAACAATATTTCCATTTAGAGATTAAAAAAGTGAGGCTTGGAGATGGCCCAAGG
YY1F/YY1.01

-961 CTTTGCATCTTATTTTGTGTTTTCTTTAATCTCTTTCTTTTTCCCTCTGTCCCTTCT
IRFF/IRF3.01

-901 GTAAACAGGTTATCAATGCATAGCCTAATTTCTAAGCTGAAGACCACAAATCCACAGACC
-841 CTTCTCTCTCTGGAACCTTTTCCCCCAAAGTAAATACATCAGGGATGAGGAGGGAGTGT
-781 GTTGAGCGGAAGGGTGGGAGGAGCAGGCTTCTCTGAGAGTACTCCCCCTTCTTCTC
EGRF/WT1.01 ETF/ELK1.01

-721 CTTTAAGTTTTGCCAATGGGGCCACAACCAGCTTTCTCATTTGGTAGCAGAAGCTTGTTG
-661 GTGCCTTTTCTTCCAACATCAGAGGTCAGTATCTGGAACTGTTCTCACCCCTGAGAGAGC
AP4R/TH1E47.01

-601 CAGCAGCCAGAGTCATTTTCTTTCCCGGGCTCCTTCCTCCCTAGTCCCAGGCCCTCTA
IRFF/IRF3.01

-541 CTCTTCAAGCCCTTTAGCTCCCTTCAGTCCCCTTTCTTGTTCTGTCTCCTCCAGCCTT
-481 CTTCTTTCTGTCTCTGCTTATTTCCCTGATCTCCATCTTCTCCATCACTGTATCTT
ETSF/ETS2.01 **ETSF/ETS1.01**

-421 TATTATCACTGCTAAAAGCAGATGTCAAATTATTGTATTTGAAAGAAGAGATCTTTTTGA
GATA/GATA3.01 **TALE/TGIF.01**

-361 CACAGTAGTTCTAAGACTGTCTATTTATAATACATGAAACCCATAAAATGGGTACTATAC
MEF2/MEF2.01 **SRFF/SRF.03**

-301 ATCACAAATTGCCTTCTCTTAAGACTCTCTTAGGGGTTTAGGGCCAATTTGCTGGTTTGTA
-241 CCGACAAGATTGACTAACCTTAGGGTGTAGGTGGGATGGCAGCCAGAACTGAAAGTCTA
-181 CCCTTGGCAGAAGGCAAGGAGGAAGCTTAAGGTGCAAATGATGCTTTCCAAGCTGAAAAG
ETSF/PU1.01

-121 AACTGCTGGGAGGGCACAGGAGCATGGTGTCTCAACAACCTTAGTTATTGCCTATTCTT
-61 TCATCTCTCCTAGGCTGACAAACTGAGCCCACCAGCATCTTGCTGCCAGAAAGGTTGG
GATA/GATA3.02

1 ATGGCAGTCTTTCCAAATTCCTGCCGCCTGGGGTGTCTGCTCATTTCATTCTCCTCCAG
HMTB/MTBF.01 **OCT-1**

61 CTACCCAAGCTGGATTCTGGTAGGTCCAGAAACCATCAGACTTGTTCCTCCAAAACCTTT
121 TAGGCTGGCAGGGGTTGGCAGGCTAGACTAGGAAATAAGTAGGAAGAGGGTTTCAGCTG
SMAD/SMAD4.01 **ETSF/PU1.01**

181 AGTAGAGAAGGAGCCACGAATTATCTTTCCGGTGGAACTTGTGTTCAATGATGCTCCTGCC
ETSF/ELK1.02

241TTTTCTTAGGATAATTTCTACCTACAAGCTTGAAATTTCTCAGTAATTTAAGCAATC
SORY/HMGIY.01

301 CCATTTGGTTGCTTTCAGGACTTTCCCAAGGGCCAGATGGATTCCCTGGAGCTGTAGT
361 GGGAGAGTGCCCTTCAGTGGGATCCTCCTGTATCAGTTCTCAATCCCACCTCCACAT
421 TCCGTCCGACCTCTTGGTGTGTTGATAGCTCCCTTTGACGTGATCGACCCAGGA

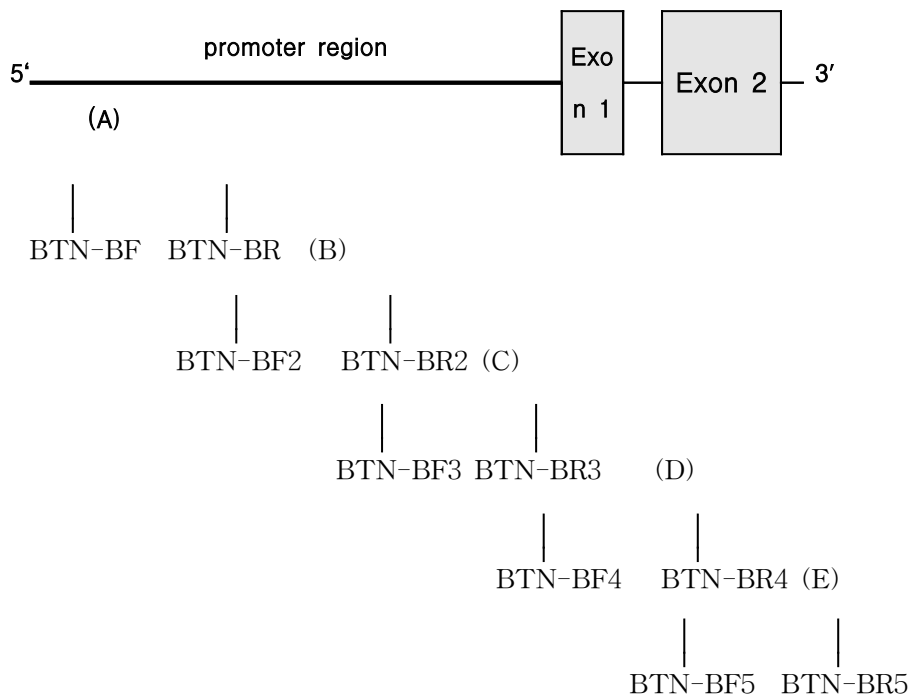
Figure 2. Annotated sequence of the goat butyrophilin gene. Putative 5' flanking region of goat butyrophilin gene was analyzed for promoter elements with the MetInspector software in Genomatix web site. Potential transcriptional regulatory sequences are underlined. Numbers to the left of the DNA sequence indicate the nucleotide position with respect to the A of the ATG initiation Met codon, labeled +1.

Table 1. Occurrence of putative transcription factor binding in the regulatory region of goat butyrophilin.

Matrix/Family	Further information	Matrix/family	Further information
ANEF2.01/MEF2	Myocyte enhancer factor	API.01/APIF	API binding site
Aareb6.04/areb	Atp1 regulatory element binding factor 6	ATF6.02/CREB	Activating transcription factor6 member of b-zip family by ER stress
BRIGHT.01/RBIT	B-cell regulator of IgH transcription	BRN2.01/BRNF	POU factor Brn-2 (N-OCT3)
CDX2.01/CDXF	Cdx-2 mammalian caudal related intestinal transcr. Factor	ELK1.01/ETSF	Elk-1
ER/EREF	Estrogen receptor	ETS1.01/ETSF	c-Ets-1 binding site
GATA1.03/GATA	GATA binding factor 1	FIF.01/SFIF	Alpha(1)-fetoprotein transcription factor liver receptor homologuse
GFI1.01/GFI1	Growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional represser	HMG1Y/SORY	HMG1(Y) high-mobility group protein architectural transcription factor organizing the framework of a nuclear protein - DNA transcriptional complex
IRF7.01/IRFF	interferon regulatory factor.7	IRF3.01/IRFF	interferon regulatory factor 3
IRF2.01/IRFF	interferon regulatory factor.2	IRF3.01/IRFF	interferon regulatory factor 3
IK2.01/IKRS	Ikaros2 potential regulatory of lymphocyte differentiation	TCF1.01/LEFF	Involved in the Wnt signal transduction pathway
LEF1.02/LEFF	Involved in the Wnt signal transduction pathway	MAZ.02/MAZF	Myc associated zinc finger protein 1
MTBF.01/HMTB	muscle specific MT binding site	MEF3.01/MEF3	MEF3-binding site present in skeletal muscle specific transcriptional enhancer
NFAT.01/NFAT	Nuclear factor of activated T-cell	NFKAPPAB.02/NFKB	NF-KappaB
NFKAPPAB65.02/NFKB	NF-Kappa (P65)	NFY.02/ECAT	Nuclear factor Y (Y -box binding factor)
NFY.03/ECAT	Nuclear factor Y (Y -box binding factor)	OCT1.06/OCT	Octamer binding factor
RSRF4.01/MEF2	Related to serum response factor	PUI.01/ETSF	PUI(pu120) Ets-like transcription factor identified in lymphoid B-cell
RBPJK.01/RBPF	Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	STAT.01/STAT	Signal transducers and activators of transcription
STAB1.01/STAB	Special-AT rich sequence binding protein predominanty expression in thyrocytes binds to matrix attachment region	TATA.02/TBPF	mammalian C-type LTR TATA-box
		RH1E47.01 /AP4R	thing1/E47 heterodimer TH1.bHLH r member specific wxpression in a variety of embryonic tissu

Table 2. Occurrence of putative transcription factor binding in goatbutyrophilin promoter region

Family	Description	Family	Description
AREB	Atp regulatory element binding	APIF	APIand related factor
CDXF	Vertebrate candal related homeodomain	AP4R	AP4 and related protein
HMTB	Human muscle specific MT binding site	BRNF	Brn POU domain factor
IKRS	ikaros zinc fniger family	CREB	camp-responsive element binding protein
MAZF	Myc associate zinc finger	ECAT	enhancer CCAAT binding factor
MEF2	myocyte-specific enhancer binding factor	EREF	Estrogen response element
NFKB	nuclear fator kappa B/C-realative	ETSF	Human and murine ETS1 factor
OCT	ocamer binding protein	GFII	Growth factor idependente
RBIT	Regulator of B-cell IgH transcripton	IRFF	interferons regulatory factors
SFIF	vertebrate steroidogenic factor	LEF	LEF1/TCF
SORY	Sox/ sRY sex/testis determing and	MEF3	binding sites of MEF3
STAT	signal transdcer and activator of	NFAT	nuclear factor of activated T-cell
TCFF	TCF11 transcription factor protein related HMG box factor transcript factor	RBPF	RBPJ-Kappa
		SATB	special AT rich sequence binding protein
		TBPF	tata binding protein factor transcriptional repression



Primers

A region

BTN-BF: 5'-CAT CTA GCC CAT TAG TGA TGA-3'

BTN-BR: 5'-TAG CCT CCA GTA ATA GAA CTG A-3'

B region,

BTN-BF2: 5'-TGG AGG CTA TCA TTA CTT GC-3'

BTN-BR2: 5'-CCT GAT AGG CTG TAG TCC AT-3'

C region,

BTN-BF3: 5'-CTA CAG CCT ATC AGG CTC CT-3'

BTN-BR3: 5'-GAG AAC AGT TCC AGA TAC TG-3'

D region,

BTN-BF4: 5'-GAA CTG AAA GTC TAC CCT TGG CA-3'

BTN-BR4: 5'-TTG CCT TCT GCC AAG GGT AGA CT-3'

E region,

BTN-BF5: 5'-GAA CTG AAA GTC TAC CCT TGG CA-3'

BTN-BR5: 5'-ACA GAG GAG GAT CCC ACT GAG G-3'

Figure 3. Scheme of butyrophilin promoter region and primer location for polymorphism analysis in *Capra hircus L.*

나. Competitive RT-PCR을 통한 butyrophilin 유전자의 발현량 분석

Competitive RT-PCR은 1쌍의 primer set으로 2개의 주형을 경합적으로 증폭시켜 2개의 밴드를 확인하여 이미 알고 있는 competitor의 양과 비교하여 알고자 하는 유전자를 분석하는 실험방법이다. Butyrophilin mRNA 발현량 분석을 위한 competitor는 Competitive RT-PCR Kit를 이용하여 제작하였다. 제작되어진 competitor를 분광광도계를 이용하여 정량 하였다. 농도를 알고 있는 competitor를 순차적으로 희석하여 butyrophilin mRNA 발현량 분석에 이용하였다. 서로 다른 농도의 competitor를 시료와 함께 PCR 증폭하여 검출된 2개의 밴드의 농도를 이미지 분석기를 통해 측정하였다.

임신기간과 비유기간내 생쥐에서 유선과 근육, 뇌, 간 조직 등을 취하여 유선과 근육조직에서만 butyrophilin mRNA 발현을 확인하였다(Figure 4). Butyrophilin mRNA의 PCR 증폭산물(730bp) 230bp위치를 인식하는 Kpn I 제한효소를 처리하면 230bp과 500bp 반응 산물을 생산함을 확인하였다(Figure 5). 유즙 분비는 임신기간 동안 임신유지 호르몬과 출산시 분비되어지는 lactogenic 호르몬에 의해 조절되어진다. 이것을 확인하기 위해 임신 10일째와 15일째 생쥐와 출산 후 5일째, 10일째 그리고 17일째 생쥐의 butyrophilin mRNA의 발현량을 분석하였다. 본 연구에서는 butyrophilin mRNA의 발현이 임신유지 호르몬에 의해 어느 정도의 발현조절을 받는지 확인하기 위하여 임신중인 생쥐의 난소절제를 시행하여 난소 호르몬에 의해 발현됨이 확인되었다(Figure 6) 또한 비유기 동안의 butyrophilin mRNA 발현의 변화는 분만 후 5일째, 10일째 및 17일째의 생쥐를 통해 분석하였다(Figure 7). 발현 확인된 butyrophilin mRNA는 competitive RT-PCR을 통해 정량분석을 하였고(Figure 8), 서로 다른 농도의 competitor와 시료를 반응시켜 다른 농도의 competitor와 반응한 각각의 결과를 비교하여 정량 하였다(Figure 8). Competitor와 butyrophilin mRNA의 농도 비율 (Y축)과 PCR 증폭에 이용된 서로 다른 competitor 농도를(X축) log값으로 계산하여 그래프로 나타냈다. 그래프상의 Y좌표가 0이 되는 competitor의 농도를 butyrophilin mRNA의 발현량으로 결정하였다(Figure 10). 정량분석을 위해서 각 개체간 유사하게 발현되는 β -actin mRNA를 표준유전자로 이용하였고 임신기간과 비유기간 동안 지속적으로 발현되는 β -casein mRNA 발현을 확인하여 butyrophilin mRNA의 변화와 비교하였다(Figure 6, 7).

생쥐의 임신 10일째에서는 β -actin과 β -casein의 mRNA 발현이 다른 개체와 유사하게 발현되었으나 butyrophilin mRNA는 검출되지 않았다. 반면 임신 15일째에서는

butyrophilin mRNA 발현을 관찰할 수 있었다(Figure 6). Butyrophilin mRNA는 발현이 확인되지 않은 임신 10일째 생쥐에 발현을 유도하기 위해 임신 9일째 난소 제거 수술을 시행하였고 24시간 후에 생쥐의 유선에서의 발현량을 분석하였다. 그 결과 임신 10일째의 생쥐에서 비유기와 유사한 발현량을 확인하였다. 임신 15일째 butyrophilin mRNA 발현이 난소제거시 어느 정도의 변화를 나타내는지 확인 하였으나 유의적인 차이가 없음을 관찰하였다.(Figure 9-12). 또한 β -casein mRNA의 발현양상은 난소제거에 의한 변화가 관찰되었다. 임신 말기에 발현되어 분만과 동시에 유즙을 통해 분비되어지는 butyrophilin의 비유기 동안의 mRNA 발현변화는 분만 후 5일째, 10일째 및 17일째의 생쥐의 유선조직에서 분석하였으며 임신말기에 검출된 mRNA의 발현량보다 수치적으로 높았으며 비유가 진행됨에 따라 그 양이 감소 하였다(Figure 13-15).

임신 10일째 생쥐의 butyrophilin mRNA 발현량은 관찰이 되지 않았고 난소제거를 통해 1.7fg 까지 검출되었다. 임신 5일째는 1.1fg, 난소제거 수술에 의해서는 1.4fg이 검출 되었고 분만 후 비유가 시작된 후 5일째에는 butyrophilin mRNA의 발현량이 1.9fg, 10일째에는 1.8fg, 17일째에는 1.7fg이 검출 되었다(Figure 16). 즉, lactogenic 호르몬의 분비로 인해 butyrophilin mRNA의 발현은 유도되어지며 임신말기에 유도되어진 mRNA의 발현은 분만 후에도 지속되어졌다. 비유기간과 임신기간의 butyrophilin mRNA 발현 분석에 있어 그룹내 각 개체간의 발현량에 대하여 유의적 차이를 확인하였다($P < 0.01$).

Lactogenic 호르몬의 분비에 의한 butyrophilin mRNA 발현 유도를 세포배양계에서도 시도하였다. Prolactin과 steroid 호르몬의 처리로 HC11 세포에서의 butyrophilin mRNA 발현을 유도하였다. 생쥐 유선상피세포 HC11 은 37°C, 5% CO₂ 환경에서 RPMI 1640 배지에서 배양되었고, 호르몬 처리는 steroid 호르몬인 dexamethasone 0.1 μ M과 10% fetal calf serum, 5 μ g/ml prolactin을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 호르몬 처리시 성장 촉진인자는 첨가하지 않았으며 호르몬 처리한 cell로부터 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하여 butyrophilin mRNA와 β -casein mRNA의 발현을 PCR을 통하여 확인하였다. Prolactin과 steroid 호르몬에 의한 β -casein mRNA는 발현이 확인되었으나, 배양한 HC11 세포에서는 butyrophilin mRNA의 발현을 확인하지 못하였다(Figure 17). 비유기 동안 지속적으로 발현되어지는 다른 유즙 단백질과는 다르게 butyrophilin은 초유에서만 발현되어지는 발현적 특성을 가지고 있다. 그러므로 비유기간 동안 영향을 미치는 요인들에 대한 분석은 필수적이다. 모유에 포함되어 있는 단백질중 특히 초유에 포함되어 분비되는 면역글로불린들은 신생아의 면역증진을 도우며

특정한 기간에 제한적으로 발현되어지는 특징을 가지고 있다. 따라서, butyrophilin 유전자의 전사조절 영역의 분석과 발현량 분석은 유즙 단백질 연구와 유전자원 개발에 있어 초석이 될것이다.

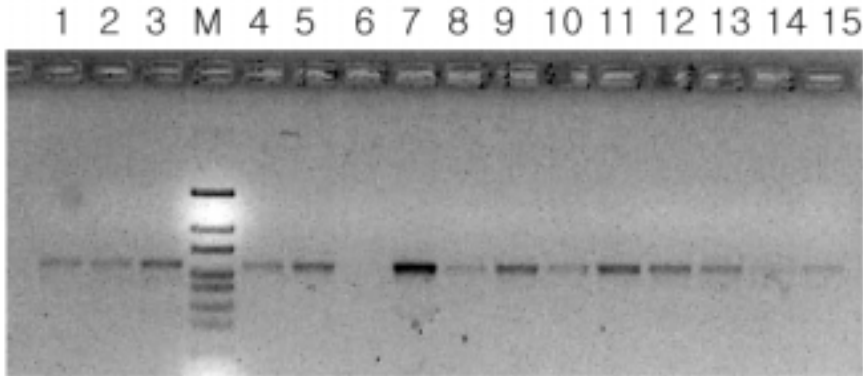


Figure 4. The expression analysis of butyrophilin mRNA in mouse mammary gland and muscle during lactation by PCR ; in mammary gland at 5 days, 10 days and 17 days after lactation(lanes 1-3), 100bp-ladder marker(lane M), in muscle at 5 days after lactation(lanes 4-7), at 10 days after lactation(lanes 8-11), at 17 days after lactation(lanes 12-15).

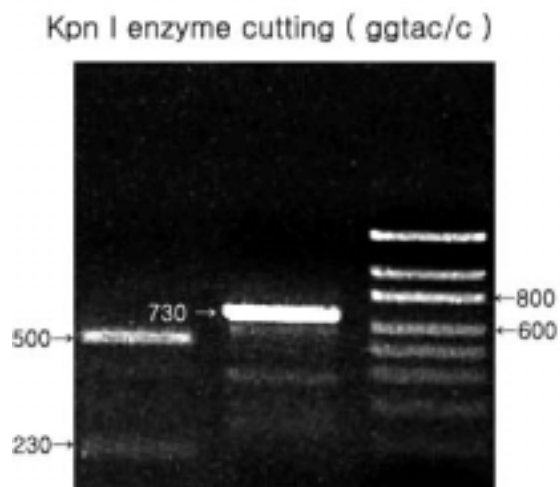


Figure 5. Gel electrophoresis and analysis of enzyme digestion of butyrophilin gene product . The 730bp was PCR product size whereas 500bp and 230bp correspond to the enzyme digestion products.

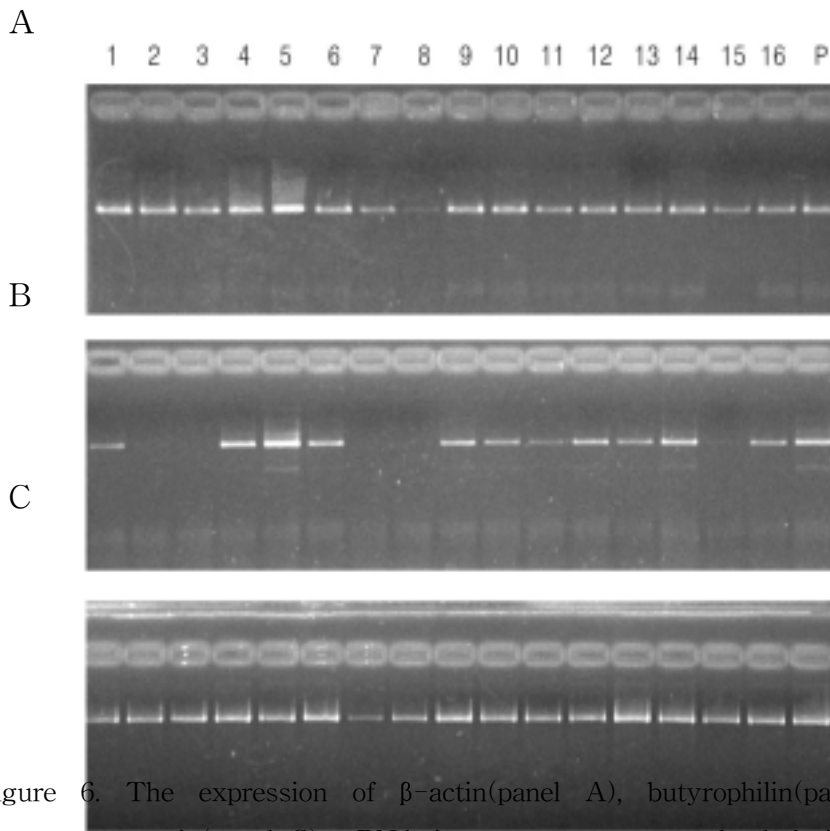
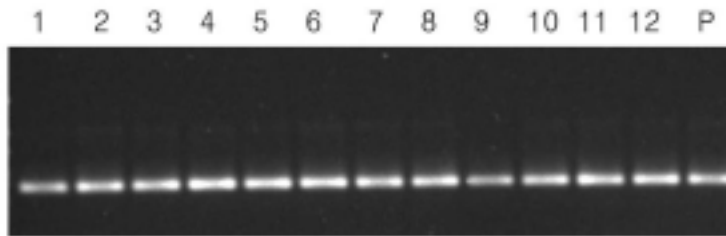
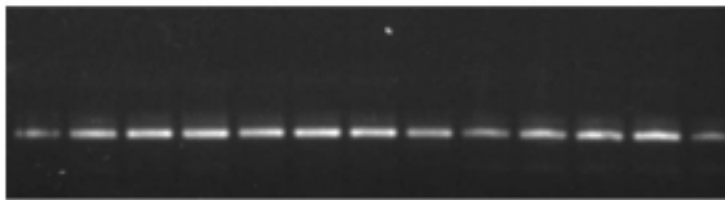


Figure 6. The expression of β -actin(panel A), butyrophilin(panel B) and β -casein(panel C) mRNA in mouse mammary gland during pregnancy; in mammary gland at 10 days after pregnancy (lanes 1-3), at 15 days after pregnancy(lanes 9-12), in ovariectomized mouse mammary gland at 10 days after pregnancy (lanes 4-6), at 15 days after pregnancy (lanes 13-16). The negative controls of butyrophilin expression were analyzed in virgin mammary gland(lanes 7-8). The positive control of butyrophilin expression was analyzed in mammary gland at 5days after lactation.

A



B



C

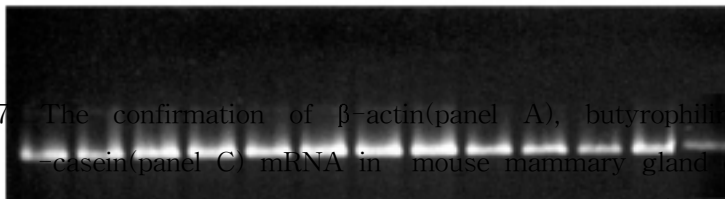


Figure 7 The confirmation of β -actin(panel A), butyrophilin(panel B) and β -casein(panel C) mRNA in mouse mammary gland during lactation; in mouse mammary gland at 5 days after lactation(lanes 1-4), at 10 days after lactation(lanes 5-8), at 17 days after lactation(lanes 9-12)and the positive control (lane P).

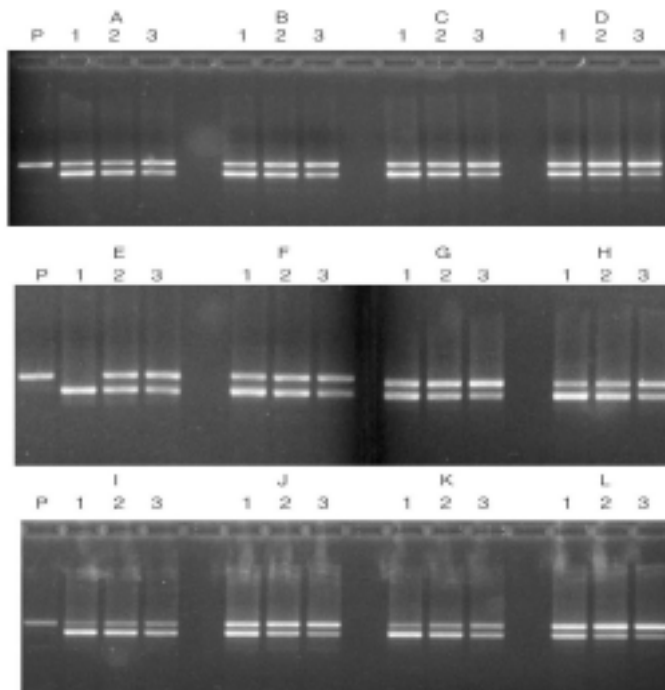


Figure 8. Quantification of the butyrophilin mRNA in mouse mammary gland during lactation by competitive RT-PCR. The 540bp band corresponds to the competitor molecule whereas 730bp band corresponds to the target sequence. The quantification of butyrophilin mRNA expression determined by competitive RT-PCR ; 5 days after lactation (lanes A-D), 10 days after lactation(lanes E-H), 17 days after lactation(lanes I-L). The 540bp molecular size was concentration of competitor; 1:(37×10^{-5})*1/3 ng, 2:(37×10^{-5})*1/6 ng, 3:(37×10^{-6})ng

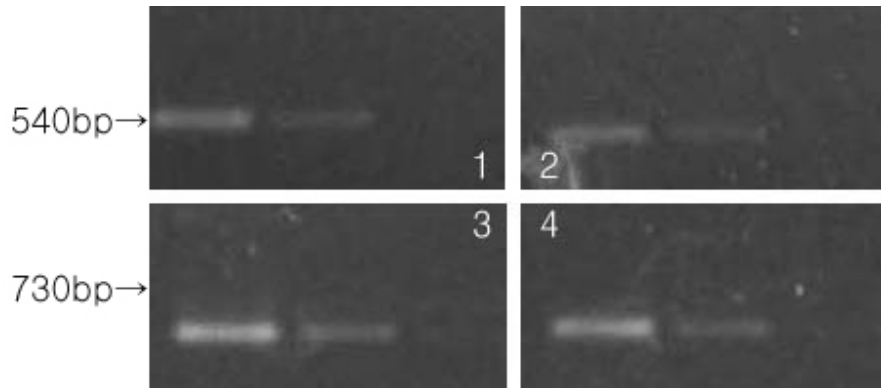
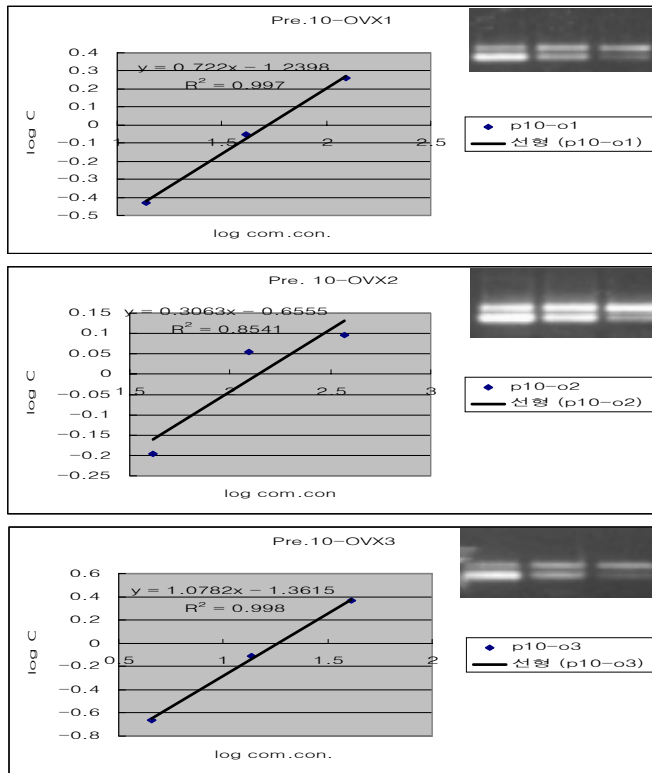


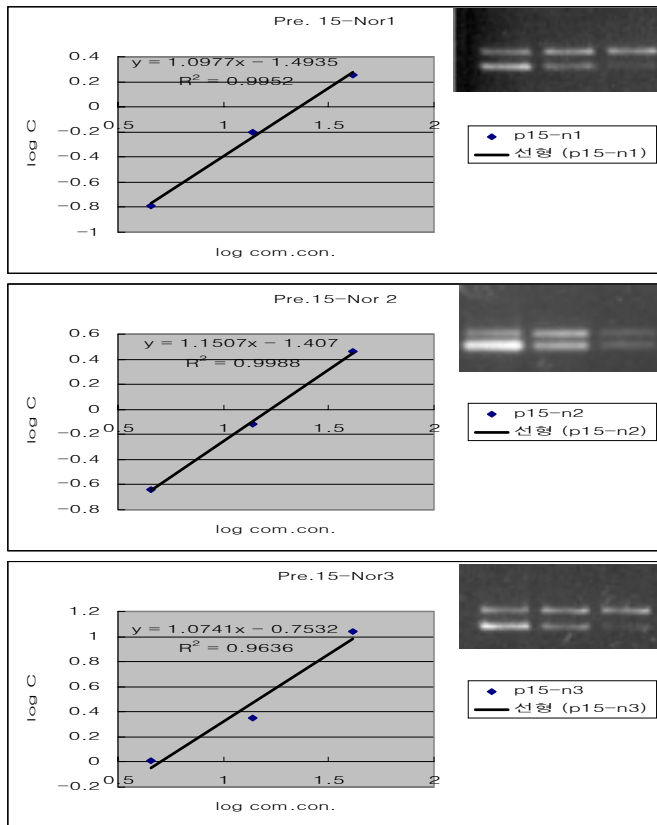
Figure 9. Gel electrophoresis of competitive RT-PCR products of butyrophilin. The quantification of the butyrophilin expression was analyzed in mouse mammary gland during pregnancy by competitive RT-PCR. The 540bp corresponds to the competitor molecule whereas 730bp corresponds to the target sequence. The negative controls of butyrophilin mRNA expression were analyzed in virgin mouse mammary gland(panels 1 and 2). The expression of butyrophilin mRNA was analyzed in the mammary gland of ovariectomized mouse at 9 days after pregnancy(panels 3 and 4); at 10 days after pregnancy.



* log com. con. - competitor concentration (fg) * OVX - ovariectomy

* log C/T - band density ratios between competitor and target

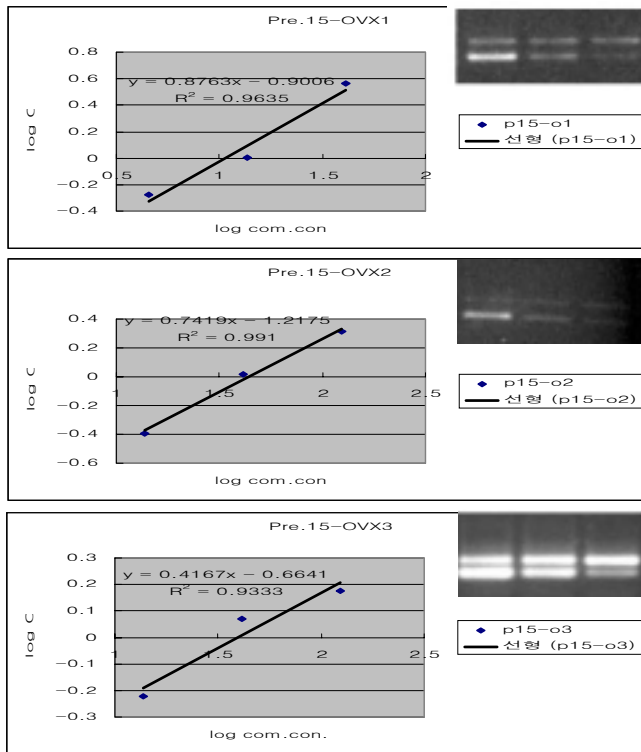
Figure 10. The butyrophilin mRNA quantification by competitive RT-PCR. After the reverse transcription step, 3 PCR reactions were run in parallel with different amounts of competitor. The band density ratios between competitor and target were determined after photographing the agarose gel and plotted versus the initial amount of competitor added in the PCR reaction. The three samples for expression analysis in ovriectomized mouse of at 10days after pregnancy : p10-o1, p10-o2 and p10-o3.



* log com. con. - competitor concentration (fg) * OVX - ovariectomy

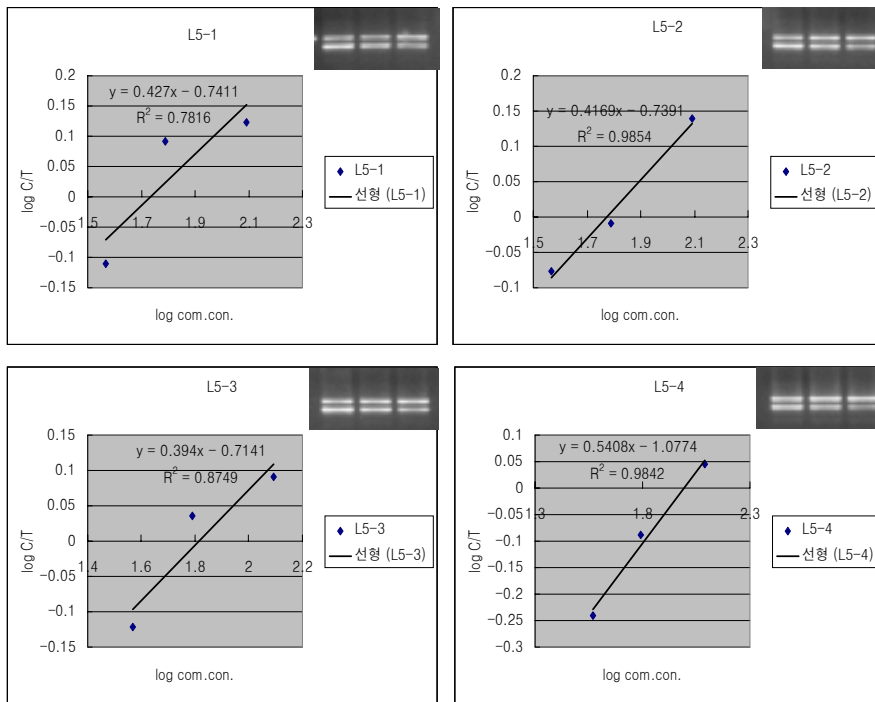
* log C/T - band density ratios between competitor and target

Figure 11. The butyrophilin mRNA quantification by competitive RT-PCR. After the reverse transcription step, 3 PCR reactions were run in parallel with different amounts of competitor. The band density ratios between competitor and target were determined after photographing the agarose gel and plotted versus the initial amount of competitor added in the PCR reaction. The three samples for expression analysis in mouse mammary gland at 15 days after pregnancy: p15-n1, p15-n2 and p15-n3.



* log com. con. - competitor concentration (fg) * OVX - ovariectomy
 * log C/T - band density ratios between competitor and target

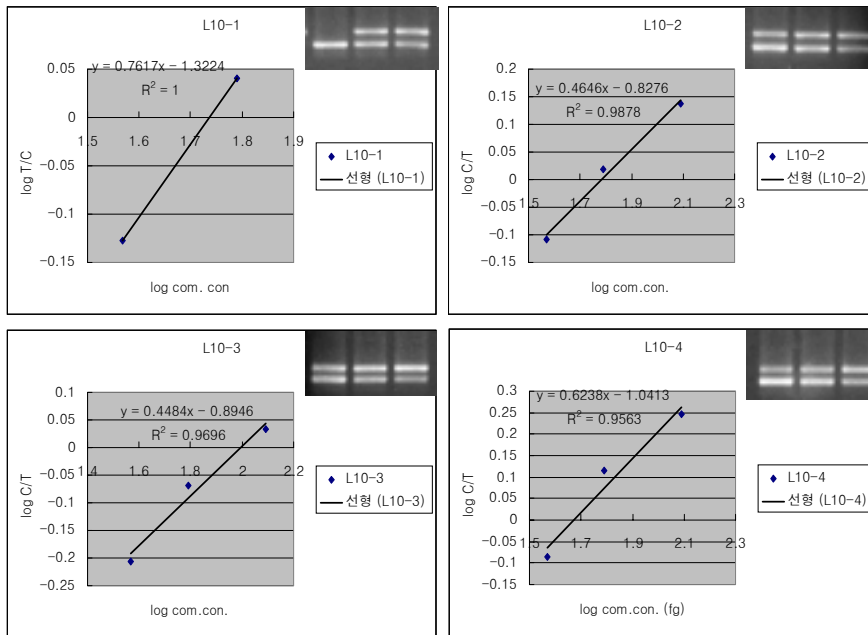
Figure 12. The butyrophilin mRNA quantification by competitive RT-PCR. After the reverse transcription step, 3 PCR reactions were run in parallel with different amounts of competitor. The band density ratios between competitor and target were determined after photographing the agarose gel and plotted versus the initial amount of competitor added in the PCR reaction. The three samples for expression analysis in ovriectomized mouse of at 15 days after pregnancy: p15-o1, p15-o2 and p15-o3.



* log com. con. - competitor concentration (fg)

* log C/T - band density ratios between competitor and target

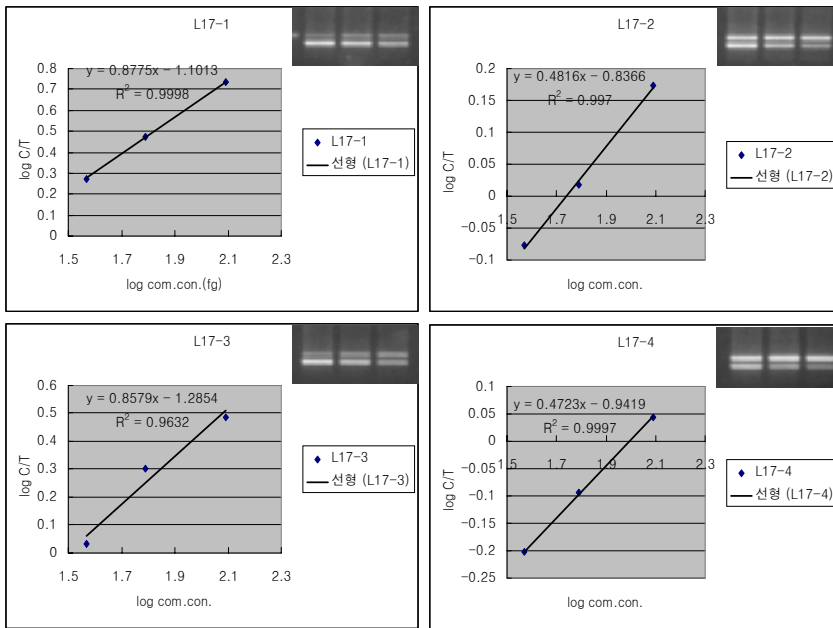
Figure 13. The butyrophilin mRNA quantification by competitive RT-PCR. After the reverse transcription step, 3 PCR reactions were run in parallel with different amounts of competitor. The band density ratios between competitor and target were determined after photographing the agarose gel and plotted versus the initial amount of competitor added in the PCR reaction. At the equivalence point (log ratio = 0), the initial amount of target cDNA corresponds to the initial amount of competitor. The four samples for expression analysis in mouse mammary gland at 5 days after lactation: L5-1, L5-2, L5-3, and L5-4.



* log com. con. - competitor concentration (fg)

* log C/T - band density ratios between competitor and target

Figure 14. The butyrophilin mRNA quantification by competitive RT-PCR. After the reverse transcription step, 3 PCR reactions were run in parallel with different amounts of competitor. The band density ratios between competitor and target were determined after photographing the agarose gel and plotted versus the initial amount of competitor added in the PCR reaction. At the equivalence point (log ratio = 0), the initial amount of target cDNA corresponds to the initial amount of competitor. The four samples for expression analysis in mouse mammary gland at 10 days after lactation: L10-1, L10-2, L10-3 and L10-4



* log com. con. - competitor concentration (fg)

* log C/T - band density ratios between competitor and target

Figure 15. The butyrophilin mRNA quantification by competitive RT-PCR. After the reverse transcription step, 3 PCR reactions were run in parallel with different amounts of competitor. The band density ratios between competitor and target were determined after photographing the agarose gel and plotted versus the initial amount of competitor added in the PCR reaction. At the equivalence point (log ratio = 0), the initial amount of target cDNA corresponds to the initial amount of competitor. The four samples for expression analysis in mouse mammary gland at 17 days after lactation : L17-1, L17-2, L17-3 and L17-4.

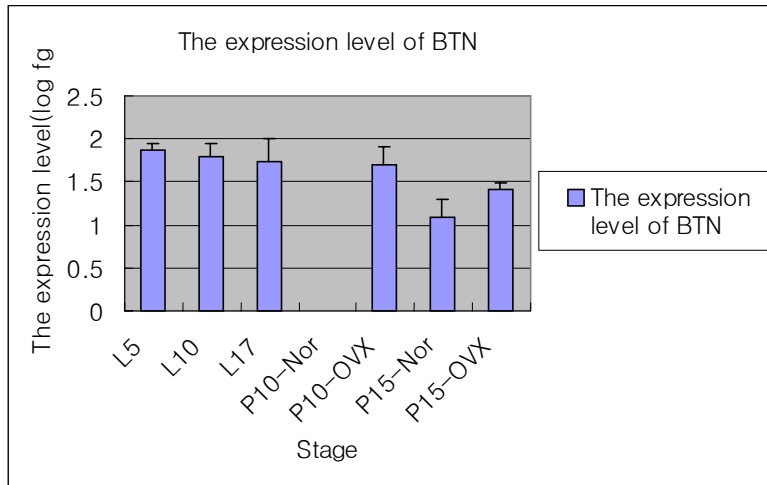


Figure 16. The expression of butyrophilin in mouse mammary gland at lactation(L), pregnancy(P), and in ovariectomized mouse at pregnancy(OVX). The expression analysis of butyrophilin was performed in mammary gland at 5 days after lactation (L5), at 10 days after lactation (L10), at 17 days after lactation(L17), at 10 days after pregnancy(P10-Nor), at 15 days after pregnancy(P15-Nor), ovariectomized mouse at 10 days after pregnanc(P15-OVX), and at 15 days after pregnancy (P15-OVX).

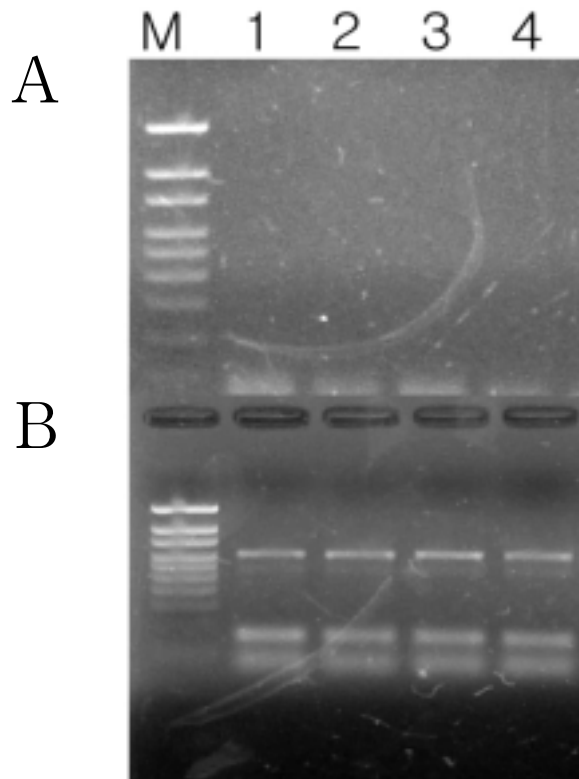


Figure 17. The analysis of butyrophilin mRNA(panel A)and β -casein(panel B) mRNA from HC11 cells treated with dexamethason or prolactin .
 Lanes 1-2, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ prolactin and $0.1\mu\text{M}$ dexamethasone; lane 3, $0.1\mu\text{M}$ dexamethasone; lane 4, basal medium

다. STAT5a 유전자의 클로닝 및 발현 조절인자

1) STAT5α의 cDNA 클로닝 및 pMX-STAT5α발현 벡터 구축

클로닝을 위해 primer를 제작하고 Long-span PCR을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성되어진 STAT5a 의 cDNA는 pBluescript(SK+) cloning vector에 cloning하여 염기서열을 분석하여 클로닝되어진 Mouse STAT5a cDNA에서 STATs의 Domain 구조를 확인하였다 (Figure 18). STAT5a 유전자를 pMX vectors에 존재하는 *EcoR* I 와 *Not* I 제한효소로 처리하여 (Figure 21) pMX expression vector에 삽입하여 pMX-STAT5a vector를 구축하였다(Figure 20).

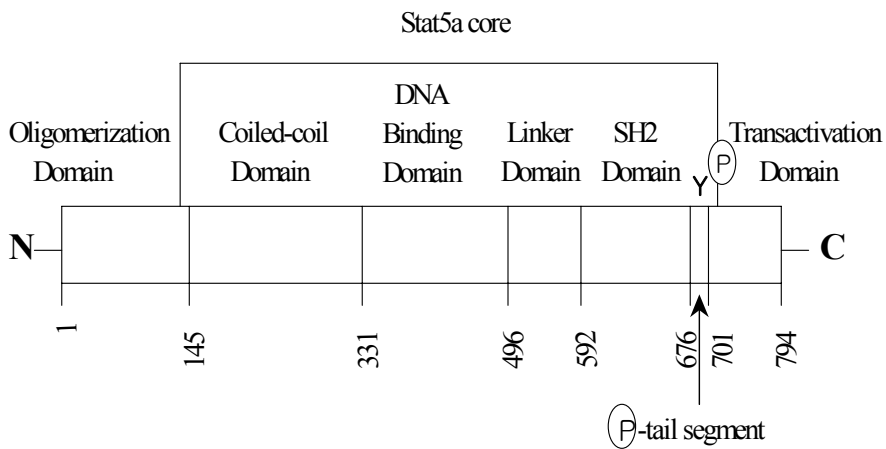


Figure 18. Domain structure of STATs. STATs bind to receptors and dimerize via bivalent SH2-phosphotyrosine interactions. Phosphorylation of the conserved tyrosine is required for STATs dimerization. The N-terminal region mediates oligomerization of STAT dimers.

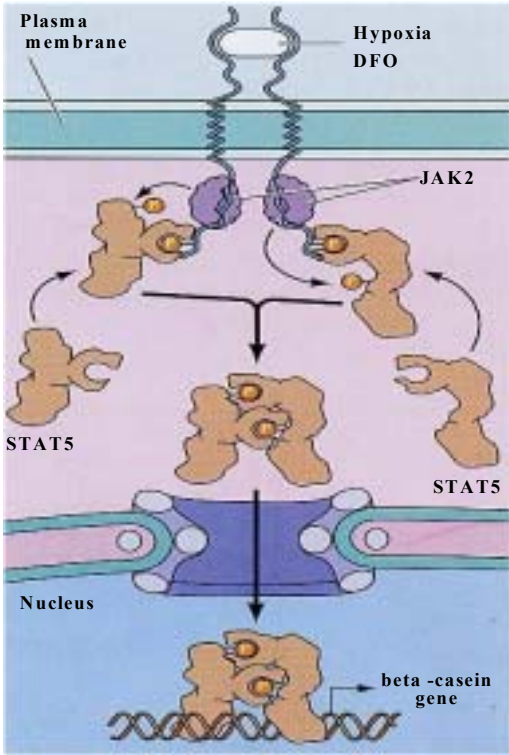


Figure 19. JAK-STAT5a pathways. Jaks are activated upon binding of DFO, hypoxia to the receptors; STAT5a is recruited to the receptors and

tyrosine phosphorylated by Jaks. Then STAT5a dimerize, followed by their translocation into the nucleus, where they modulate expression of target gene (beta-casein gene).

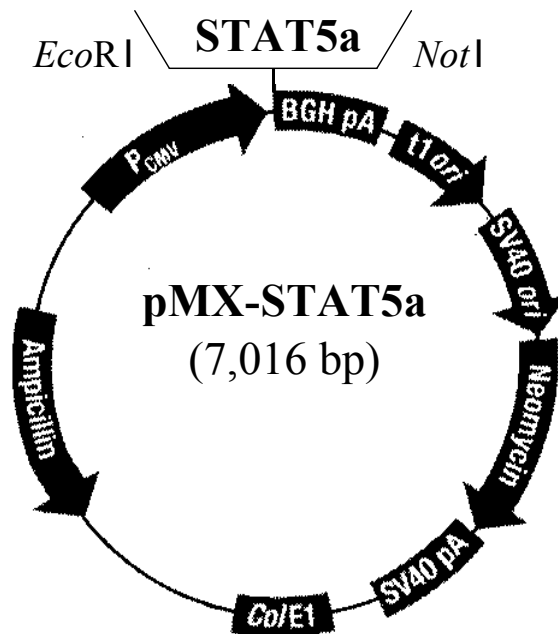


Figure 20. Structure of the pMX-STAT5a vector (retrovirus vectors). Mouse STAT5a cDNA was inserted into the *EcoRI* and *NotI* sites of the pMX vectors (Onishi *et al.*, 1998).

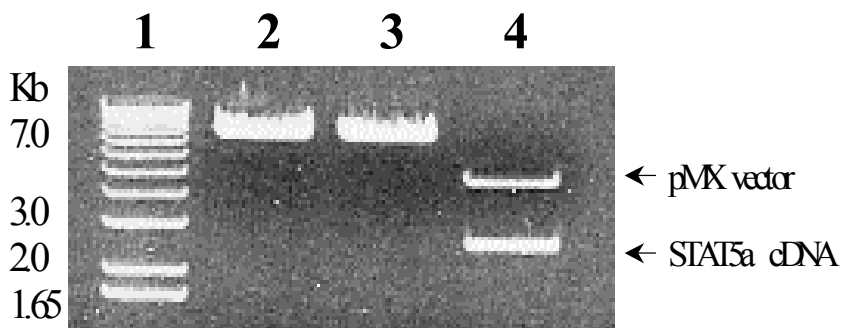


Figure 21. Confirmation of STAT5a cDNA.

Lane 1 : 1 Kb ladder DNA size marker

2 : Digestion of pMX-STAT5a with *Not* I

3 : Digestion of pMX-STAT5a with *EcoR* I

4 : Digestion of pMX-STAT5a with *Not* I and *EcoR* I

2) DFO(desferrioxamine)처리에 의한 STAT5a의 활성 변화

DFO(desferrioxamine)에 의한 STAT5a의 활성을 분석하기 위하여 STAT5a antibody를 이용하여 Western Blot을 시행하였다. DFO에 의한 STAT5a의 활성은 mouse mammary gland epithelial cell 과 monkey kidney cell인 COS-7 Cell을 이용하여 측정하였다. HC11 cell은 별도의 자극 물질이 없어도 인산화 되어 STAT5a 단백질 합성이 이루어지나 COS-7 Cell은 반드시 어떤 자극 물질을 통해서만 인산화되어 STAT5a 단백질 합성이 이루어지는 특성을 갖고 있다. HC11 cell 세포를 이용하여 Iron chelator인 DFO(desferrioxamine)와 기존에 밝혀진 prolactin과의 비교 실험에서 DFO도 STAT5a의 인산화를 유도하여 STAT5a 단백질 합성에 기여한다는 것을 밝혔다(Figure 22). DFO (desferrioxamine; 200 μ l)를 시간(0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 hr) 별로 세포에 노출(exposure)

시킨 결과, STAT5a 단백질 합성이 계속 증가하다가 12시간에서 최고에 도달한 후 감소하는 추세를 보였으며(Fig. 24) DFO(desferrioxamine)를 농도별(0, 10, 50, 100, 200 μ l)로 세포에 노출시켰을 때에도 위와 마찬가지로 단백질 합성이 증가함을 알 수 있었다. COS-7 Cell에서의 prolactin(15 μ l)존재 하에 DFO(desferrioxamine)의 농도를 변화시켜(0, 10, 50, 100, 200 μ l) 24시간 동안 세포에 노출시킨 후 단백질의 합성변화를 관찰한 결과 이 세포주의 특성대로 STAT5a 단백질은 합성되지 않았다(Figure 23). COS-7 Cell에서 단백질이 합성되지 않음을 확인한 후 pMX-STAT5a gene construct를 COS-7 세포에 삽입(transfection)하여 transfectants 세포를 이용하여 HC11 세포에서와 같은 경향을 보이는지를 확인하였고 DFO(desferrioxamine)를 시간별, 농도별로 처리해본 결과 HC11 세포에서와 같이 단백질 합성이 뚜렷하게 증가함을 관찰하였다.

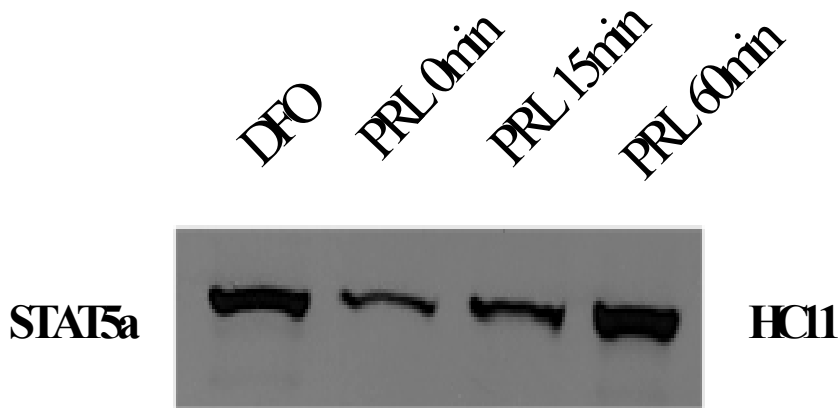


Figure 22. Comparison of STAT5a expression from HC11 cells treated with DFO (desferrioxamine) or prolactin (PRL).

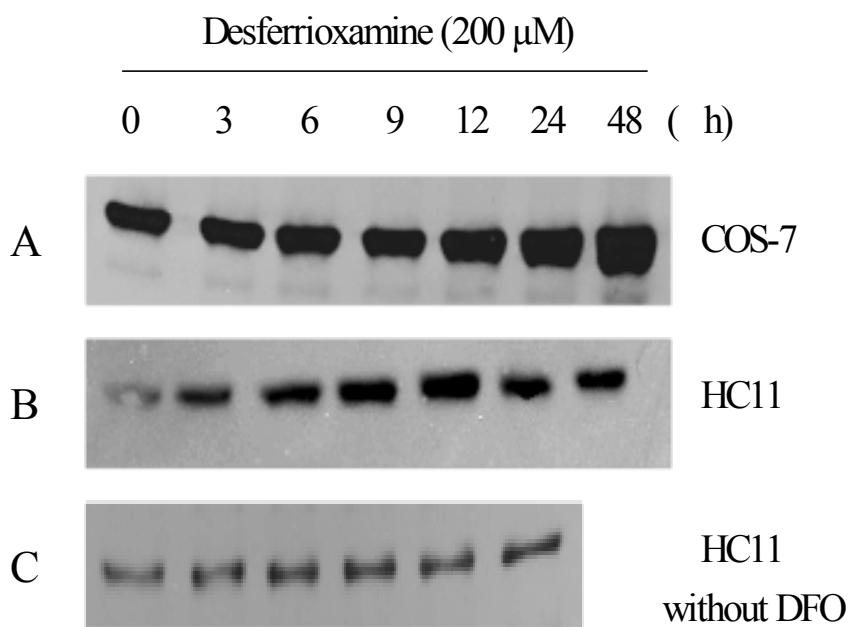


Figure 23. Synthesis of STAT5a by treated with DFO 200 μ M for 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h in transfected COS-7 cells (A), HC11 cells (B) and treated without DFO for 0, 3, 6, 9, 12, 24 h in HC11 cells (C), detected Western blotting with antibody.

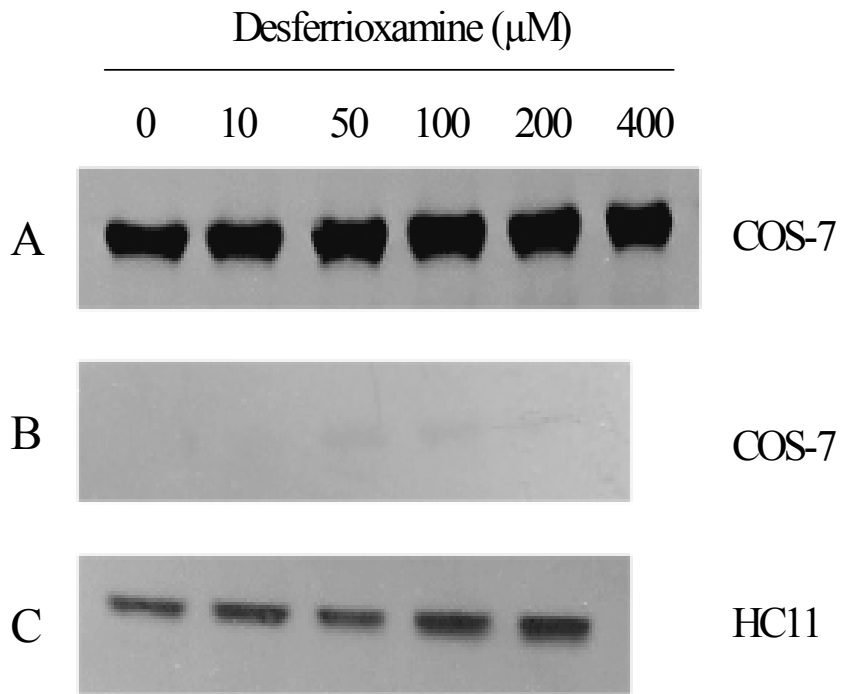


Figure 24. Synthesis of STAT5a by DFO concentration in transfected COS-7 cells (A), untransfected COS-7 cells (B) and HC11 cells (C), detected by Western blotting with antibody.

3) Hypoxia조건하에서의 STAT5a의 활성 변화

Normoxia(20% O₂)와 Hypoxia(2% O₂)에서의 STAT5a 단백질 합성의 비교를 위해 Hypoxia Incubator가 동원되었으며, HC11 세포에서의 비교 실험이 이루어졌다. pMX-STAT5a gene construct를 COS-7 세포에 삽입(transfection)하여 transfectants 세포를 이용한 실험에서 Normoxia(20% O₂) 조건에서보다 Hypoxia(2% O₂) 조건에서 STAT5a 단백질 합성이 더 많이 이루어진다는 결과를 얻었다.

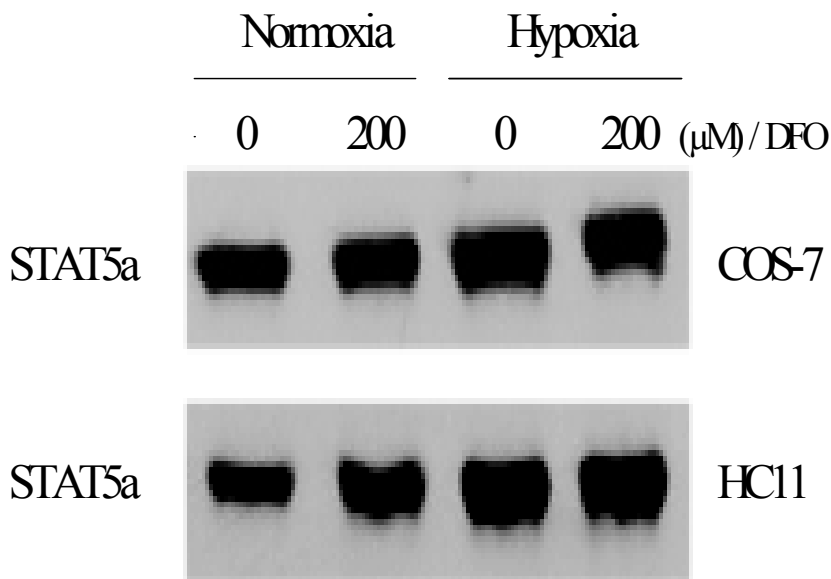


Figure 25. Synthesis of STAT5a by DFO and hypoxia in transfected COS-7 cells and HC11 cells, detected by Western blotting with antibody.

4) STAT5a 단백질과 β -casein promoter와의 결합활성

Bovine β -casein 발현에 있어 STAT5a 단백질과의 결합여부를 확인하기 위해 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay)를 시행하였다. bovine의 β -casein promoter probe 제작을 위해 oligo를 합성하였고 (5'-AGATTTCTAGGAATTCAAAT C-3'), 방사성 동위원소(Radio Isotope)를 이용하여 ^{32}P 로 bovine (젖소)의 β -casein gene promoter를 표지(Phosphorylation)하여 Probe의 제작하였다. 제작되어진 β -casein gene promoter Probe와 DNA Binding Reaction을 통하여 DFO(desferrioxamine)와 Hypoxia(2% O_2)가 세포질 내에서 STAT5a 단백질을 자극하여 2량체가 되어 핵 안으로 들어가 bovine(젖소)의 β -casein gene promoter에 있는 binding site에 결합(binding)함으로써 주요 유단백질인 beta-casein 유전자의 전사활성에 미치는 효과를 확인하였다. Normoxia(20% O_2 , without DFO)에 비해 DFO 처리군과 Hypoxia(2% O_2)조건에서 STAT5a 단백질이 bovine의 beta-casein 유전자 promoter와 더 강력하게 결합(binding)함을 확인하였다.

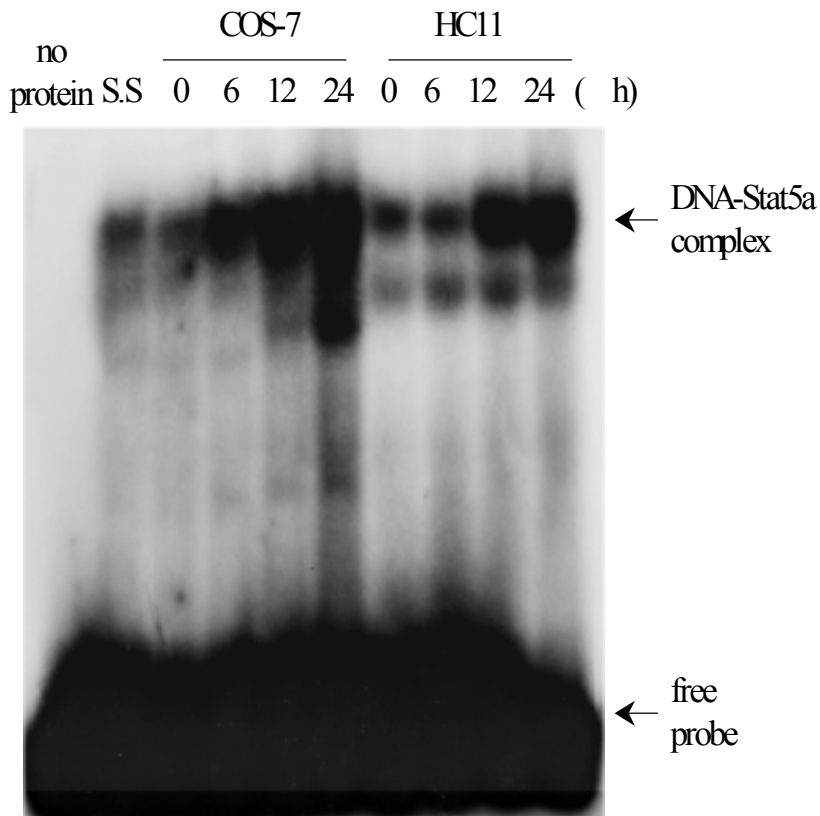


Figure 26. DNA-binding activities of STAT5a in transfected COS-7 cells and HC11 cells treated with DFO concentration, detected by EMSA. Nuclear extracts were prepared and analyzed in bandshift assays using ^{32}P -labeled β -casein promoter STAT5a binding site as a probe. To demonstrate the identity of the complexes, anti-STAT5a antibody was preincubated with the extracts for 30 min prior to the binding reaction with the labeled oligomer, as indicated (S.S, super shift). No protein, negative control.

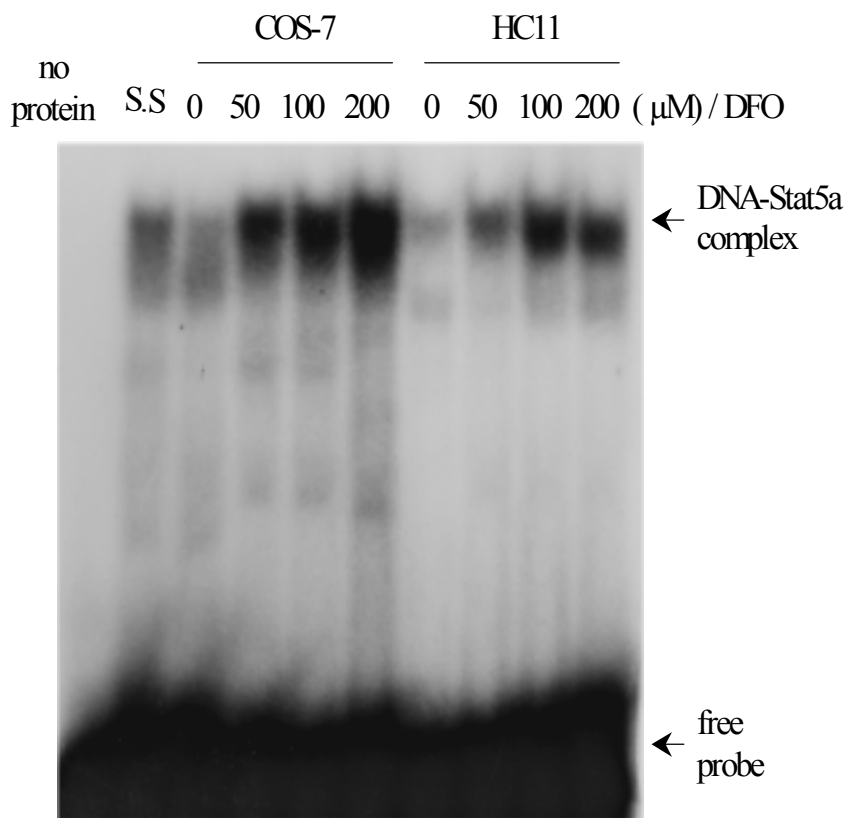


Figure 27. DNA-binding activities of STAT5a in transfected COS-7 cells and HC11 cells treated with DFO by time, detected by EMSA. Nuclear extracts were prepared and analyzed in bandshift assays using ³²P-labeled β-casein promoter STAT5a binding site as a probe. To demonstrate the identity of the complexes, anti-STAT5a antibody was preincubated with the extracts for 30 min prior to the binding reaction with the labeled oligomer, as indicated (S.S, super shift). No protein, negative control.

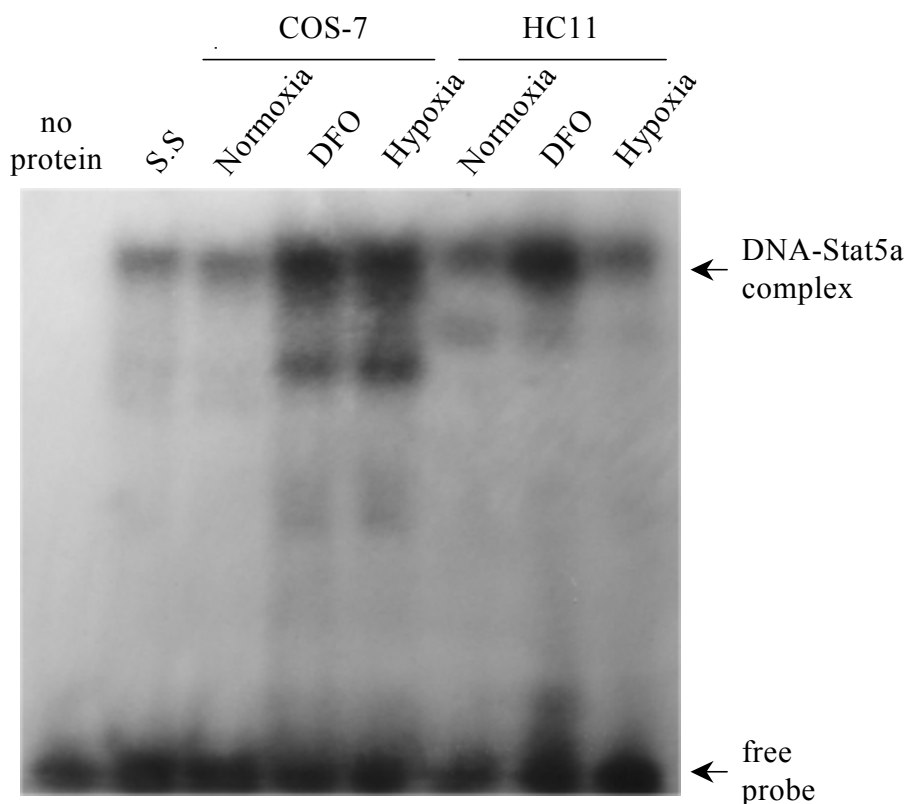


Figure 28. DNA-binding activities of STAT5a in transfected COS-7 cells and HC11 cells treated with normoxia, DFO and hypoxia, detected by EMSA. Nuclear extracts were prepared and analyzed in bandshift assays using ^{32}P -labeled β -casein promoter STAT5a binding site as a probe.

To demonstrate the identity of the complexes, anti-STAT5a antibody was preincubated with the extracts for 30 min prior to the binding reaction with the labeled oligomer, as indicated (S.S, super shift). No protein, negative control.

제 3 절 Marker assisted selection (MAS) 개발

1. 연구내용

가. 모든 연관분석은 젯소의 반형매 가계의 특성을 이용하는 데 주안점을 두며, 공식은 다음과 같다. 어느 해당 가계에 대한 likelihood는 아래 공식에 의해서 구해질 것이다.

$$\sum_{i=1}^{2^x/2} P_i \times \prod_{j=1}^n \left[\sum_{k=1}^{2^x} \left[P(k | i) \times \prod_{m=1}^x AFM_{jm} \right] \right]$$

위에서,

- $\sum_{i=1}^{2^x/2}$: 모든 가능한 종모우 연관단계들의 합
- $\prod_{j=1}^n$: 모든 아들 소들에 대한 승적
- $\prod_{k=1}^{2^x}$: 멘델법칙에 상응하는 부계생식세포 k의 합
- $\sum_{m=1}^{2^x}$: Synteny group내에 있는 모든 markers들에 대한 승적
- $\prod_{m=1}^x$: Phase i 가 주어졌을 경우 생식세포 k에 대한 확률

$P(k | i)$: 부계 생식세포 k가 주어졌을 경우, marker m에 대한 빈도수
 AFM_{jm} : 부계 생식세포 k가 주어졌을 경우, marker m에 대한 빈도수

젯소집단내에 존재하는 linkage disequilibrium을 이용하는 것이 본 연구의 기본접근 방법이다.

나. Genetic marker를 분석모형에 포함할 경우 혼합모형식은 다음과 같다.

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ ZX' & Z'Z + \lambda A^{-1} & Z'W \\ W'X & W'Z & W'Z + r G^{-1}_{(r|r)} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b \\ u \\ v \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}$$

위에서,

$$\lambda = \sigma_e^2 / \sigma_A^2, \quad r = \sigma_e^2 / \sigma_v^2, \quad \sigma_A^2 = \sigma_u^2 + 2\sigma_v^2$$

다. MAS 개발의 기본 전략은 첫째로, 현 젯소 후대검정 체계에 QTL 정보를 삽입하

였을 경우의 선발반응 검토. 둘째로, 후대검정 진, Young bull에 대한 QTL 정보를 삽입하였을 경우의 효율검토. 셋째로, MAS와 전통적인 BLUP 선발반응을 비교하기 위함이다. 시뮬레이션을 이용하여 세가지 전략에 대한 문제를 해결한다.

라. 본 연구에서는 모수추정에 Markov Chain Monte Carlo의 한 방법으로 깃스샘플링이 이용되었다. 깃스샘플링을 위한 프라이어 분포의 결정에 있어서, 이론적으로 부적절한 프라이어의 사용은 위험하므로 흔히 응용분야에서 많이 이용해온 플랫폼 프라이어는 사용하지 않았다. 프라이어 분포의 결정후에 프라이어와 조건부함수(우도)의 곱으로 나타나는 조인트 포스테리아 밀도함수 (joint posterior density) 를 유도하였다. 깃스샘플링을 위해서 조인트 포스테리아 밀도함수로부터 변량들을 상수로 놓고 남은 변량들을 정리하여 특정 밀도함수의 kernel 형태로 만드는 작업을 함으로써 Full conditional density들을 유도하였다.

마. 깃스샘플링을 하여 포스테리아 모수추정 작업에서도 기대치 등의 함수를 구하였으며, 깃스샘플링을 이용하여 유전모수 추정을 위한 계산전략과 알고리즘은 위의 모든 작업들에 의존한다. 함수들의 계산 및 Full conditional density들로부터의 generating 이 주된 작업이다. 또한 깃스체인에서 워밍업이 필요한데 모수들이 안정될 때까지는 구한 값들을 버려야 한다. 이 시기를 결정하는 기준을 결정하는 연구가 수행되었고, 주 연구에 있어서 스케일러 깃스를 룬체인을 이용하여 구하였다. 또한 thinning rate은 시뮬레이션의 결과를 토대로 아주 보수적인 수준에서 결정되었다. 이는 sample들의 autocorrelation을 줄이는 효과가 있다.

바. 컴퓨터 프로그래밍은 포트란을 이용하였고, 프로그래밍에 있어서 MTGSAM 및 연구자가 기존연구에서 짠 프로그램 등을 최대한 이용, 수정, 보완하였고, 더 나아가 Numerical recipe, IMSL 등의 보조프로그램들을 최대한 활용하여 효율적인 프로그램이 되도록 추진하였다. 본 연구와 관련된 프로그래밍 작업에 있어서는 디버깅작업 이외에도 간단한 데이터 시뮬레이션으로 프로그램의 정확성을 확인하였다.

2. 연구결과

본 연구로부터 시뮬레이션에 이용된 값들은 Table 1에 나타나 있고, composite interval mapping을 이용하여 얻은 QTL효과와 QTL위치는 Table 2에서 보여주고 있다.

Table 1. Input values used in the simulation¹.

Population	QTL additive effect ²				σ_a^2	σ_e^2 ³	Heritability
	QTL 1	QTL 2	QTL 3	QTL 4			
1	2.081	1.913	2.348	-	1.000	1.000	0.500
2	-	0.311	0.220	0.332	0.111	1.000	0.100
3	-	0.598	0.358	0.735	0.429	1.000	0.300
4	-	0.885	0.612	1.081	1.000	1.000	0.500
5	-	1.288	0.945	1.688	2.330	1.000	0.700
6	-	2.280	2.138	3.213	9.000	1.000	0.900

¹ Trait mean was 15.8 units. No dominance or epistasis was considered.

² QTL1 was located at 67cM on chromosome 1, and QTL2, QTL3 and QTL4 at 25, 90 and 100cM on chromosome 2.

³ σ_a^2 =additive variance and σ_e^2 = environmental variance.

Table 2. Estimates \pm standard errors of QTL genetic effect (GE) and linkage position (LP, cM) in population 1 using CIM¹.

	QTL 1		QTL 2		QTL 3	
	GE	LP	GE	LP	GE	LP
Input value	2.081	67	1.913	25	2.348	90
CIM_0	1.759 \pm 0.254	69.13	2.697** \pm 0.217	38.40	3.154** \pm 0.193	97.85
CIM_1	1.832 \pm 0.453	69.20	2.174 \pm 0.351	37.75	2.684 \pm 0.285	97.79
CIM_3	1.836 \pm 0.453	69.03	2.030 \pm 0.335	37.62	2.457 \pm 0.280	98.73
CIM_5	1.953 \pm 0.455	69.03	1.945 \pm 0.296	37.12	2.360 \pm 0.270	99.01
CIM_7	1.953 \pm 0.468	69.13	1.920 \pm 0.278	36.70	2.360 \pm 0.253	99.39
CIM all	2.029 \pm 0.597	66.42	1.833 \pm 0.368	35.87	2.464 \pm 0.325	99.33

¹CIM_0 represents IM. CIM_1, CIM_3, CIM_5, CIM_7 and CIM_all were the composite interval mapping with 1, 3, 5, 7, and all other marker as cofactors.

본 시뮬레이션 연구로부터 composite interval mapping을 이용하여 QTL mapping을 한 결과는 Figure 1에서 보여주고 있다. 단순한 interval mapping 보다 composite interval mapping이 QTL mapping에 효율적임을 보였다.

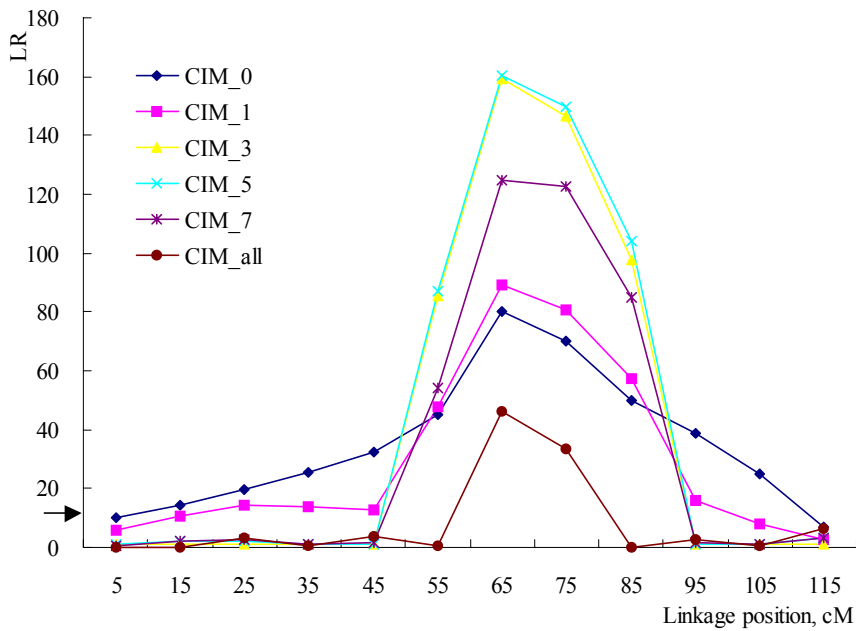


Figure 1. Likelihood ratio using CIM in search for a single QTL on chromosome 1. CIM_n indicated composite interval mapping using n cofactors as controls. The arrow represented a maximum genome-wide threshold value at a 0.05 significance level.

QTL이 두 개 존재할 때의 QTL mapping에서 시뮬레이션 연구로부터 composite interval mapping을 이용하여 QTL mapping을 한 결과는 Figure 2에서 보여주고 있다. 역시 단순한 interval mapping 보다 composite interval mapping이 QTL mapping에 효율적임을 보였다.

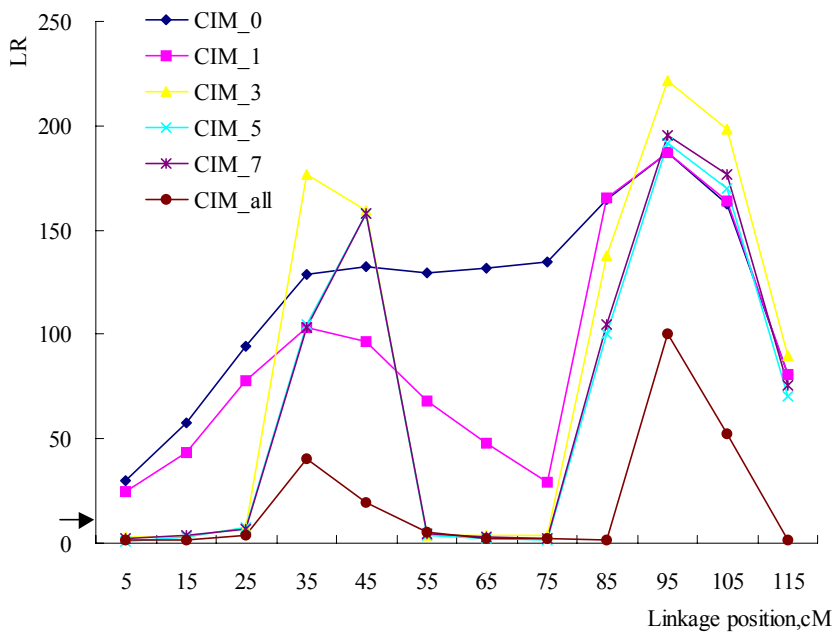


Figure 2. Likelihood ratio using CIM in search for multiple QTLs on chromosome 2. CIM_n indicated a composite interval mapping using n cofactors as controls. The arrow represented a maximum genome-wide threshold value at a 0.05 significance level.

시뮬레이션 연구로부터 composite interval mapping을 이용하여 QTL의 유전력에 따라 QTL mapping을 한 결과는 Figure 3에서 보여주고 있다. 유전력이 클수록 granddaugther design에서 composite interval mapping이 QTL mapping에 효율적임을 보였다.

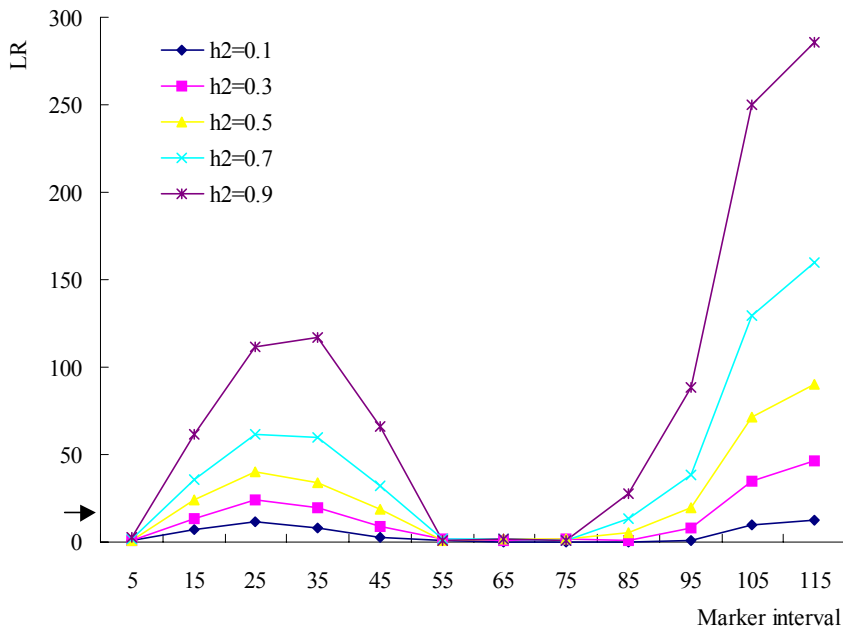


Figure 3. Likelihood ratio from mapping multiple QTLs on chromosome 2 simulated with various heritability levels. The input values for heritability ranged from 0.1 to 0.9 with an increment of 0.2. A Forward regression using 5 cofactors was used to obtain the results. The arrow represented a maximum genome-wide threshold value at a 0.05 significance level.

시뮬레이션 연구로부터 composite interval mapping을 이용하여 marker spacing에 따라 QTL mapping을 한 결과는 Figure 4에서 보여주고 있다. marker spacing이 작을수록 granddaughter design에서 composite interval mapping이 QTL mapping에 효율적임을 보였다. marker spacing이 30-40cM일 때는 QTL detection에 문제가 있고, 20cM이하에서는 2개의 QTL을 찾을 수 있었다. 더 나아가 10cM 떨어진 2개의 QTL (QTL3 and QTL4)를 2개로 detect하기 위해서는 marker spacing이 2cM에서만 가능했다.

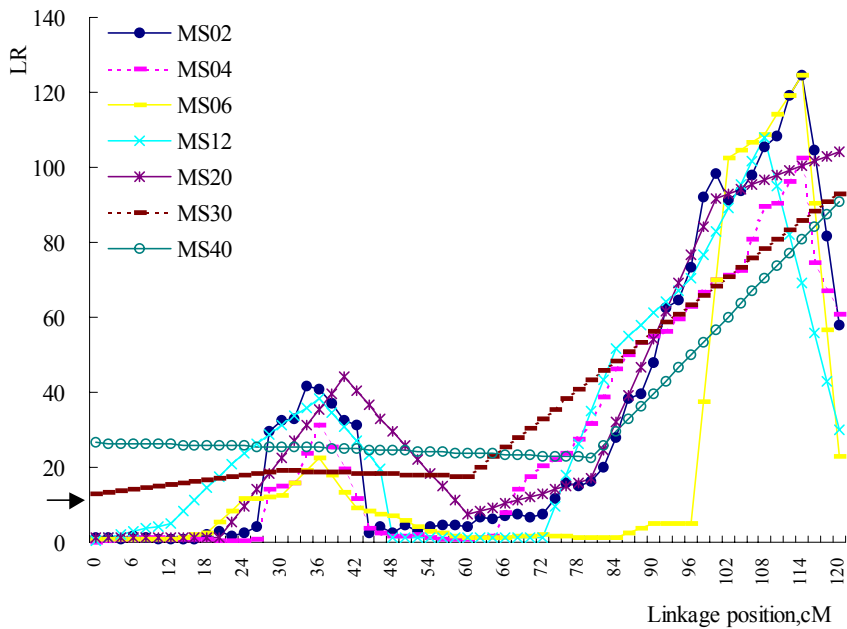


Figure 4. Likelihood ratio from mapping multiple QTLs on chromosome 1 simulated with various marker spacing. The results were obtained by forward regression using 5 cofactors. MSxx indicated marker spacing of xx cM where xx took a value of 2, 4, 6, 12, 20, 30, or 40. The arrow represented a maximum genome-wide threshold value at a 0.05 significance level.

시뮬레이션 집단구조: POP1: 15 families each with 30 granddaughters; POP2: 20 families each with 30 granddaughters; POP3: 15 families each with 60 granddaughters; POP4: 20 families each with 60 granddaughters; POP5: based on real data with 15 families.

시뮬레이션으로부터 POP1, POP2, POP3, POP4, POP5에서 composite interval mapping을 한 결과는 Figure 5, 6, 7에 있다. QTL의 유전력에 따라 Figure 5는 유전력이 0.3, Figure 6은 유전력이 0.5, Figure 7은 유전력이 0.7일때의 QTL mapping을 한 결과이다.

유전력이 0.3일 때 POP4에서 composite interval mapping을 한 결과가 가장 QTL을 잘 detection하고 있고, POP2, POP3, POP1의 순서이다. POP5에서는 QTL1이 잘 detection되지 않았다. 이와 같은 경향은 Figure 6과 7에서도 비슷하나, 유전력이 커질수록 보다 더 효율적으로 QTL을 잘 detection하고 있고, 특히 유전력이 0.5와 0.7에서는 POP5에서도 QTL1을 detection 할수 있었다.

Table 3, 4, 5는 QTL의 위치와 효과에 대한 추정치로서 유전력이 0.3, 0.5, 0.7일 때의 결과를 보여주고 있다. 이들 추정치역시 QTL detection에서의 결과와 유사한 결과를 보여주고 있다. POP4에서 QTL의 위치의 추정치가 시뮬레이션된 값과 가장 가까웠고, POP2, POP3, POP1, POP5의 순서였다.

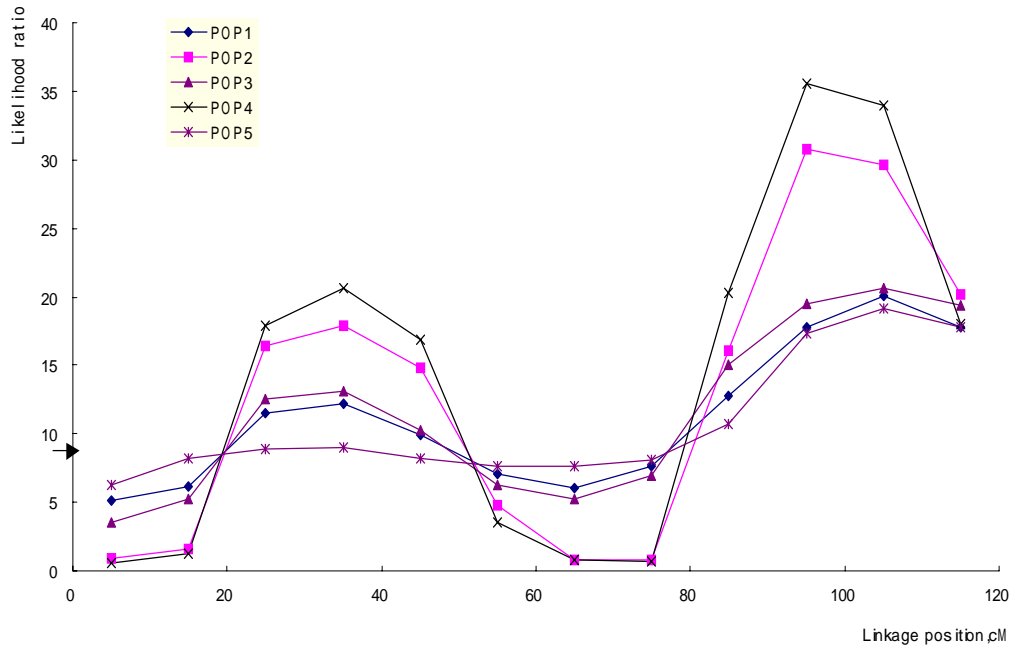


Figure 5. Likelihood ratio using composite interval mapping for QTLs with the heritability of 0.3. The arrow represents the chromosome-wide threshold value at 0.05 significance level.

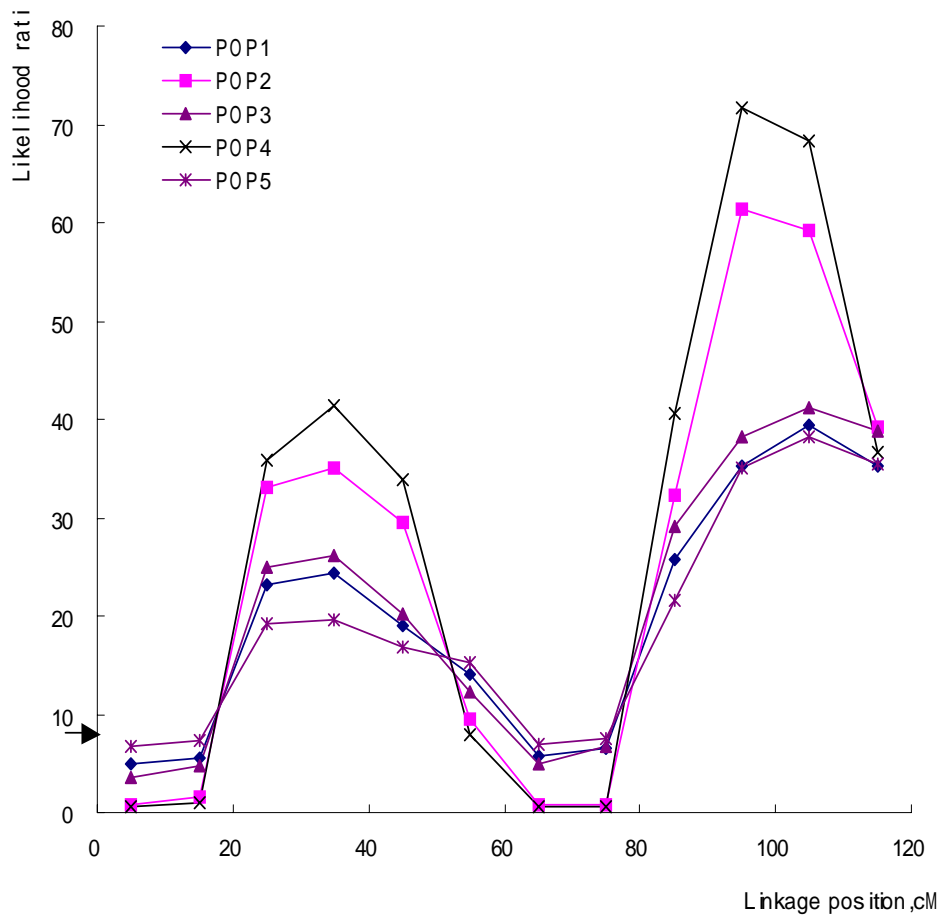


Figure 6. Likelihood ratio using composite interval mapping for QTLs with the heritability of 0.5. The arrow represents the chromosome-wide threshold value at 0.05 significance level.

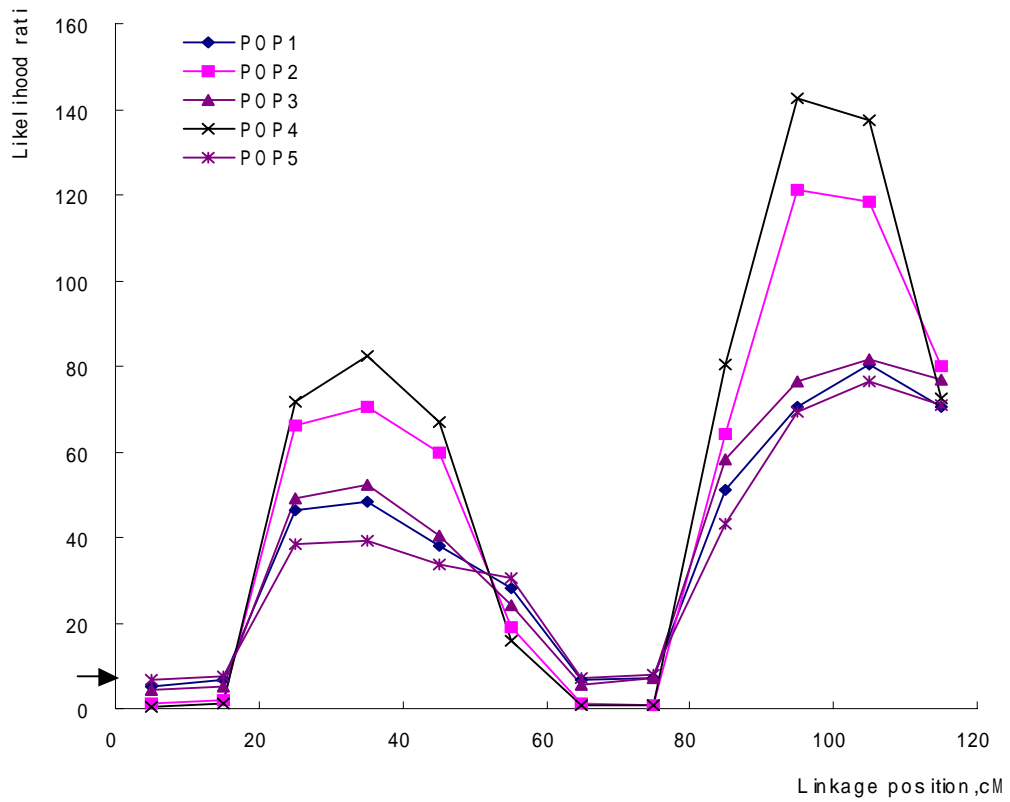


Figure 7. Likelihood ratio using composite interval mapping for QTLs with the heritability of 0.7. The arrow represents the chromosome-wide threshold value at 0.05 significance level.

Table 3. Estimates of QTL genetic effect (GE) and linkage position (LP, cM) using composite interval mapping in the populations of POP1 to POP5 simulated with the heritability of 0.3^{1,2}.

	QTL 1		QTL 2	
	GE	LP	GE	LP
Input value	0.639	35	0.806	99
POP 1	0.518* ± 0.028	32.00** ± 0.68	0.733** ± 0.034	105.01** ± 0.47
POP 2	0.633 ± 0.027	34.08 ± 0.62	0.801 ± 0.033	99.88 ± 0.44
POP 3	0.591 ± 0.028	32.17** ± 0.64	0.735* ± 0.033	104.06** ± 0.46
POP 4	0.657 ± 0.027	34.21 ± 0.62	0.832 ± 0.033	99.75 ± 0.43
POP 5	0.504* ± 0.040	26.85** ± 0.89	0.705* ± 0.044	105.09** ± 0.50

¹The standard errors were empirically obtained from 20 replicates.

²* P<0.5, ** P<0.01.

Table 4. Estimates of QTL genetic effect (GE) and linkage position (LP, cM) using composite interval mapping in the populations of POP1 to POP5 simulated with the heritability of 0.5^{1,2}.

	QTL 1		QTL 2	
	GE	LP	GE	LP
Input value	0.957	35	1.179	99
POP 1	0.896* ± 0.028	32.29** ± 0.64	1.098* ± 0.031	104.21** ± 0.45
POP 2	0.952 ± 0.026	34.19 ± 0.58	1.154 ± 0.030	99.09 ± 0.41
POP 3	0.911 ± 0.026	32.38** ± 0.61	1.102* ± 0.031	103.97** ± 0.43
POP 4	0.960 ± 0.026	34.49 ± 0.59	1.213 ± 0.030	99.07 ± 0.41
POP 5	0.870* ± 0.036	29.97** ± 0.69	1.082* ± 0.039	106.05** ± 0.47

¹The standard errors were empirically obtained from 20 replicates.

²* P<0.5, ** P<0.01.

Table 5. Estimates of QTL genetic effect (GE) and linkage position (LP, cM) using composite interval mapping in the populations of POP1 to POP5 simulated with the heritability of 0.7^{1,2}.

	QTL 1		QTL 2	
	GE	LP	GE	LP
Input value	1.390	35	1.807	99
POP 1	1.136* ± 0.026	32.17** ± 0.60	1.721* ± 0.030	102.39** ± 0.40
POP 2	1.368 ± 0.025	34.79 ± 0.56	1.795 ± 0.028	99.04 ± 0.37
POP 3	1.342 ± 0.025	32.31** ± 0.58	1.733* ± 0.029	102.35** ± 0.39
POP 4	1.412 ± 0.024	34.89 ± 0.56	1.848 ± 0.028	99.03 ± 0.38
POP 5	1.310* ± 0.033	28.95** ± 0.68	1.684* ± 0.036	102.89** ± 0.45

¹The standard errors were empirically obtained from 20 replicates.

²* P<0.5, ** P<0.01.

제 4 장 목표달성 및 관련분야에의 기여

제 1 절 연도별 연구 목표 및 착안점

1. 1차년도

구 분	연구목표 및 착안점	
	착 안 사 항	척 도 (%)
1차년도	○ 젖소 종모우에 대한 가계 선정	10%
	○ Bovine BTN과 STAT5a genes에 대한 genetic polymorphisms 구명	15%
	○ 생산형질(유량, 유지방, 유단백, 무지고형분), 그리고 체세포수 등에 대한 genotyping 실시	15%
	○ Bovine BTN 유전자에 대한 mutation sites 구명	15%
	○ 유선특이적 발현 BTN 전사조절영역의 단리, 구조결정	15%
	○ 유선 전사조절인자 STAT5a의 cDNA 클로닝, 염기결정	15%
	○ MAS 모형의 선택	15%

2. 2차년도

구 분	연구목표 및 착안점	
	착 안 사 항	척 도 (%)
2차년도	○ BTN과 STAT5a 유전자들의 mutation site 검색을 위한 sequencing	20%
	○ BTN과 STAT5a genes와 생산형질들에 대한 연관성 분석	20%
	○ 유선 특이적 발현 BTN 전사조절영역의 구조변이 해석	20%
	○ 유선 전사조절인자 STAT5a의 mRNA 발현량 분석	20%
	○ QTL의 Breeding values 추정	10%
	○ BTN과 STAT5a genes에 대한 QTL parameter 추정	10%

3. 3차년도

구 분	연구목표 및 착안점	
	착 안 사 항	척 도 (%)
3차년도	○ Bovine BTN과 STAT5a genes에 대한 QTL mapping	20%
	○ Genomic mapping	20%
	○ 유선 특이발현 BTN 전사조절영역의 기능 분석	20%
	○ 유선 전사조절인자 STAT5a의 전사조절 분석	20%
	○ 한국형 MAS 개발 및 실제데이터에의 적용	20%

4. 최종 연구 목표

구 분	연구목표 및 착안점	
	착 안 사 항	척 도 (%)
최종목표	○ BTN과 STAT5a 유전자들의 생산형질들과의 관련성 구명	20%
	○ QTL 분석 및 QTL map 작성	20%
	○ BTN과 STAT5a 유전자들의 구조 구명 및 유선 특이적 발현기작 구명	30%
	○ 한국형 MAS 개발 및 씨젯소 생산체계에의 활용	30%

제 2 절 연구목표의 달성도

1. 1차년도

가. QTL detection and map 작성

관련자료의 수집과 문헌 조사를 통한 최근의 연구동향을 분석하고, Granddaughter 설계에 의한 반형매 16가계 선정 및 각 가계별 기초 통계량을 산출(후보우 91두, 기록 수 : 316개) 하였으며, 후보우 91두에 대한 butyrophilin과 signal transducers and activators of transcription 5a 유전자의 PCR 증폭 절편 확인 및 유생산형질과 관련된 다고 보고된 유단백질 유전좌위 κ -casein, α_{s1} -casein, α_{s2} -casein의 PCR 증폭 절편 확인하였다.

나. 유선발현 유전자의 특성 연구

유용한 butyrophilin promoter를 확보하고 이용하기 위하여, 아직까지 염기서열이 보고되지 않은 한국 재래 흑염소(*Capra hircus L.*)의 butyrophilin promoter영역의 클로닝을 하였으며, 염기서열 결정반응에 의해 1.2kb의 전 염기서열을 분석하였다. 클로닝한 흑염소의 염기서열과 GenBank에 등재된 소의 butyrophilin 염기서열을 비교한 결과 5'flanking region에서 91%, exon 1부위에서 93%, intron 1영역에서 92%의 높은 상동성으로 염기서열이 잘 보존되어 있음을 확인하였다. 또한 butyrophilin promoter 영역 내 1.2kb 상위부위에 해당하는 약 2.8kb크기의 영역도 클로닝을 수행하였고, 소 품종간 혹은 같은 품종내에서 butyrophilin promoter 영역 내에서의 구조특성을 분석하였다.

세포배양 시스템을 이용하여 signal transducers and activators of transcription 5a 유전자의 발현조절 연구를 실시하기 위하여 COS-7 세포주의 최적 배양조건을 검토하였고, 제작된 YT-1 cDNA library에서 STAT5a에 특이한 primer를 제작 이용하여 550bp의 cDNA 단편을 획득하여 염기서열 분석을 실시하였다.

다. MAS 개발

Marker Assisted Selection의 개발을 위한 관련자료의 수집과 문헌 조사를 하여

최근의 연구동향분석과 국내의 젓소집단의 자료조사 및 Marker Assisted Selection의 응용가능성의 분석, Marker Assisted Selection을 이용하기 위한 QTL 분석모델로서 본 연구에서 Combined Interval Mapping을 개발하고, 새로운 방법을 평가하기 위한 시뮬레이션 디자인과 전략에 대한 연구를 수행함으로써 1차년도 연구목표를 달성하였다.

2. 2차년도

가. QTL detection and map 작성

Butyrophilin과 STAT5a 유전자 및 Prolactin의 다형성 검색을 하여 각각의 유전자형 빈도와 유전자 빈도를 이용한 PIC, Heterozygosity 값을 산출하였다. 또한 생산형질과의 연관관계를 분석하였으며, 그들의 염기 서열을 확인하였다.

나. 유선발현 유전자의 특성 연구

재래 흑염소 품종에서 butyrophilin 유전자의 전사조절영역 내에서의 다형성을 분석하기 위해 다수 개체에서 염기서열 분석을 실시하였으며, 한우 및 홀스타인 품종으로부터 다수 개체를 선발하여 염기서열을 결정하여 비교 분석하였으나, 다형성이 있는 염기서열 위치는 검출되지 않았다.

또한 STAT5a 유전자의 발현양상을 구명하기 위해 DFO(desferrioxamine)에 의한 STAT5a의 활성화 촉진에 대해 수행하였으며(STAT5a antibody를 이용한 Western Blot), pMX-STAT5a gene construct를 COS-7 세포에 삽입(transfection)한 transfectants 세포를 이용한 실험 결과, Normoxia(20% O₂) 조건에서보다 Hypoxia(2% O₂) 조건에서 STAT5a 단백질 합성이 더 많이 이루어진다는 결과를 얻을 수 있었다.

다. MAS 개발

모수추정방법에 있어서 보다 합리적인 방법을 선택을 위하여 문헌과 외국학자들과의 토의를 통해 likelihood와 posterior density에 의한 방법을 이용하여 QTL의 모수추정방법을 개발, 특히 깃스샘플링을 이용한 모수추정방법을 개발하고, MAS를 이용한 모형의 우수성을 증명하기 위한 연구를 함으로써 2차년도의 목표는 완전히 달성하였다.

3. 3차년도

가. QTL detection and map 작성

보증종모우 및 후보종모우 96두에 대하여 PCR-RFLP법을 이용하여 Butyrophilin 1, 2, 3, 그리고 4에 대한 genotyping을 실시하였으며, SSCP법을 이용하여 STAT5a, 또한 STAT5a에 대한 microsatellite genotyping을 실시하였다. 이들로부터 얻어진 유전자빈도를 이용하여 각 유전자좌위에 대한 PIC값과 heterozygosity값을 산출하였다. 또한 이들 유전자좌위들의 독립성 검정을 실시하였고, 305일 생산형질과 성년형 생산형질 및 생산형질들에 대한 예측유전능력에 대한 연관성을 분석하였다.

나. 유선발현 유전자의 특성 연구

유선발현 butyrophilin 전사조절 영역의 기능을 해석하기 위한 연구를 수행하였으며, 유선 전사조절인자 signal transducers and activators of transcription 5a의 전사조절을 분석하였다.

다. MAS 개발

시뮬레이션을 통해 granddaughter design에서 효율적인 QTL mapping 방법과 design, population size를 밝힘으로써 granddaughter design의 합리적인 모형을 제시하였다. 특히 실제 젓소 집단과 같은 구조를 가진 데이터를 시뮬레이션하여 우리가 갖고 있는 젓소 집단에 이용할 수 있는 연구를 수행함으로써 3차년도의 목표를 달성하였다.

제 3 절 관련분야에 대한 기대 효과

지금까지의 국내외 연구의 관심이었던 유단백질 유전좌위 뿐만 아니라 본 연구에서 사용된 butyrophilin, signal transducers and activators of transcription 5a, prolactin, 그리고 BoLA-DRB3에 대한 결과로 볼 때, 앞으로 candidate gene들의 genetic marker로서의 이용가능성이 높아질 것으로 보이며, 쪼소의 Genome 분석 연구에 기초자료로서 이용가치가 있을 것이라 사료된다. 또한 지속적인 연구가 수행된다면 생산형질과 질병형질들에 대한 mapping이 가능해 질 것으로 보이며, 유선발달과 비유개시의 분자기작 구명으로 인한 인위적 조절이 가능해 질 것으로 사료된다.

또한 본 연구를 통해 유도된 granddaughter design에서 깃스샘플링을 이용한 모수추정방법은 앞으로 granddaughter design을 이용하는 많은 연구에서 사용될 수 있고, 시뮬레이션을 통해 granddaughter design에서 효율적인 QTL mapping 방법과 design, population size를 밝힘으로써 앞으로 granddaughter design의 QTL mapping을 하는데 있어서 중요한 지침서로 이용되리라고 사료된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1. 젓소 개량에 유단백질 유전좌위 중심의 연구에서 보다 다양한 유전자들을 이용한 개량 방법, 특히 후보유전자들을 유용하게 이용할 수 있다는 것을 확인하여, 앞으로 젓소 개량에 후보유전자들을 이용하는 연구에 많은 영향을 미칠 것으로 예상된다.
2. 본 연구에서 얻어진 자료를 기초로 앞으로 후보유전자에 대한 연구가 지속적으로 수행된다면, 젓소에 대한 생산형질 뿐만이 아닌 질병형질에 대한 연관지도 작성 및 양적 형질 유전자지도 작성에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 예상된다.
3. 본 연구의 결과 marker assisted selection을 위한 보다 다양한 유전자연구의 초석을 다짐과 동시에 앞으로 이들 후보유전자들의 유전자 기능연구(functional genomics)에도 기초자료를 제공할 수 있을 것이라 사료된다.
4. 모유에 포함되어 있는 단백질 중 특히 초유에 포함되어 분비되는 면역글로불린들은 신생아의 면역증진을 도우며 특정한 기간에 제한적으로 발현되어지는 특징을 가지고 있는 butyrophilin 유전자의 전사조절 영역의 분석과 발현량 분석은 유즙 단백질 연구와 유전자원 개발에 있어 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.
5. 본 연구의 결과 Signal transducers and activators of transcription 5a 유전자에 대한 인위적 조절이 가능하다는 것을 확인하여, 앞으로 젓소의 비유관련 생리학적, 생화학적인 효과와 이에 관련한 다른 유전자들의 검색에 기초자료로서 이용할 수 있을 것이라 예상된다.
6. 본 연구로부터 나온 결과로부터 granddaughter design에서 김스샘플링을 이용한 모수추정방법은 앞으로 granddaughter design을 이용하는 많은 연구에서 활용이 예상된다.
7. 또한, 시뮬레이션을 통해 granddaughter design에서 효율적인 QTL mapping 방법 (composite interval mapping등)과 실험디자인의 효율성을 밝힘으로써 앞으로의

granddaughter design의 QTL mapping을 하는데 있어서 중요한 지침서로 많은 활용이 예상된다.

8. 본 연구의 수행과정에서 후보유전자의 분석과 생산형질들과의 연관성 분석을 통한 이들의 genetic marker로서의 이용 가능성 여부의 확인, 이들 유전자들의 조절 기작, 특성 및 유전자의 기능을 동시에 연구하고 앞으로 연구 결과에 대한 시뮬레이션 분석 및 통계적 분석 모델을 제시하는 연구를 병행하여, 지금까지 유전자형 분석에 대한 한 분야로 치우쳐져 있었던 젓소개량 연구에 대한 기본 모델을 제시하였다고 사료되며, 앞으로 젓소 개량을 위한 연구에 있어서 본 연구의 수행 시스템은 하나의 지침이 될 수 있을 것으로 보인다.

제 6 장 참 고 문 헌

1. Amorena, B., and Stone, W. H. 1978. Serologically defined(SD) locus in cattle. *Science*. 201:159-160.
2. Andersson, L., Bohme, J., Rask, L., and Peterson, P.A. 1986a. Genomic hybridization of bovine major histocompatibility genes: 1. Extensive polymorphism of DQ α and DQ β genes. *Anim. Genet.* 17:95-112.
3. Andersson, L., Bohme, J., Peterson, P. A., and Rask, L. 1986b. Genomic hybridization of bovine class II major histocompatibility complex genes: 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Anim. Genet.* 17:295-304.
4. Andersson, L., and Rask, L. 1988. Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenet.* 27:110-120.
5. Andersson, L., Lunden, A., Sigurdardottir, S., Davies, C. J., and Rask, L. 1988. Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenet.* 27:273-180.
6. Antoniou, E., Hirst, B.J., Grosz, M., and Skidmore, C. J. 1999. A single strand conformational polymorphism in the bovine gene Stat5a. *Anim. Genet.* 30:232.
7. Ashwell, M.S., Ogg S. L., and Mather, I. H. 1996. The bovine butyrophilin gene maps to chromosome 23. *Anim. Genet.* 27:171-173.
8. Banghert, L. R., Chamberlain, C. W., Velarde, J., Korobsko, I. V., Ogg, S. L., Jack, L. J. W., Vakharia, V. N., and Mather, I. H. 1998. Butyrophilin is expressed in

mammary epithelial cells from a single-size messenger RNA as a type I membrane glycoprotein. *J. Bio. Chem.* 273:4171-4179.

9. Barendse, W., and Fries, R. 1999. *The genetics of cattle : genetic linkage mapping, the gene maps of cattle and the lists of loci.* 337. CABI Publishing. New York.

10. Bernoco, D., Lewin, H. A., Andersson, L., Arriens, M. A., Byrns, G., Cwik, S., Davies, C. J., Hines, H. C., Leibold, W., and Lie, O. 1991. Joint report of the fourth international bovine lymphocyte antigen (BoLA) workshop, East Lansing, Michigan, USA. 25 August 1990. *Anim. Genet.* 22:477-496.

11. Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., and Davis, R. W. 1980. Construction of genetic linkage map in using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32:314-331.

12. Bryne, P. F., and McMullen, M. D. 1996. Defining genes for agricultural traits:QTL analysis and the gene approach. *Probe* 7:24-27.

13. Chang, K. W., Cho, K. H., Lee, K. H., Lee, K. J., and Oh, J. K. 2001. Polymorphisms of butyrophilin loci and association with milk production traits of Holstein dairy cattle. *Proceedings of Annual Congress. Korean Society of Anim. Sci. & Technol.* p. 76.

14. Chang, K. W. 1997. Distributional properties of haplotype loci on milk protein in dairy young bulls. Master's program in graduate school of Konkuk University.

15. Chung, E. R., Rhim, T. J., and Han, S. K. 1996. Association between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. *Korean J. Anim. Sci.* 38:321-336.

16. Curran, J. L. 1997. Genome mapping - A practical approach: 1. Human linkage mapping. p. 2. IRL press, Oxford.
17. Davey, H. W., Ogg, S. L., Husaini, Y., Snell, R. G., Korobko, I. V., Mather, I. H., and Wilkins, R. J. 1997. Structure and sequence of the bovine butyrophilin gene. *Gene*. 199:57-62.
18. Davey, H. W., Ogg, S. L., Husaini, Y., Snell, R. G., Korobko, I. V., Mather, I., and Wilkins, R. J. 1999. Structure and sequence of the bovine butyrophilin gene. *Gene*. 199:57-62.
19. Dean, M., White, M. B., Amos, J., Gerrard, B., Stewart, C., Khaw, K. T., and Leppert, M. 1990. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell*. 61:863-870.
20. Dietz, A. B., Dettileux, J. C., Freeman, A. E., Kelley, D. H., Stabel, J. R., Kehrli, M. E. Jr. 1997a. Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80:400-405.
21. Dietz, A. B., Cohen, N. D., Timms, L., and Kehrli, M. E. Jr. 1997b. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:406-412.
22. Falconer, D. S. and Mackay, T. F. C. 1996. Introduction to quantitative genetics. p. 43. Longman. Essex.
23. Garcia-Briones, M. M., Russell, G. C., Oliver, R. A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., Palma, E. L., Sobrino, F., and Glass, E. J. 2001. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine*. 19:1167-1171.

24. Gelhaus, A., Schnittger, L., Mehltitz, D., Horstmann, R. D., and Meyer, C. G. 1995. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Anim. Genet.* 26:147-153.
25. Henderson, C. R. 1973. Sire evaluation and genetic trends. page 10 in *Proc. Animal Breeding Genet. Symp. in Honor of Dr. J. L. Lush.* Am. Soc. Anim. Sci., Champaign, II.
26. Hubert, R., Weber, J. L., Schmitt, K., Zhang, L., and Arnheim, N. 1992. A new source of polymorphic DNA markers for sperm typing: Analysis of microsatellite repeats in single cells. *Am J. Hum Genet.* 51:985-991.
27. Husaini, Y., Wilkins, R. J., and Davey, H. W. 1999. Identification of five point mutations, including an *Alu I* RFLP, in the bovine butyrophilin gene. *Anim. Genet.* 30:400-401.
28. Jack, L. J. W., and Mather, I. H. 1990 Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted I association with the milk-fat globule membrane during lactation. *J. Bio. Chem.* 265:14481-14486.
29. James, N. I. 1996. STATs : Signal transducers and activators of transcription. *Cell.* 84:331-334.
30. Lee, K. J., Kim, J. U., Lee, Y. K., Kang, M. S., and Kang, S. H. 1995a. Studies on the segregation of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes in two families of dairy cows. *Korean J. Anim. Sci.* 37:225-231.
31. Lee, K. J., Kim, J. U., Lee, Y. K. Hong, K. P., and Kim, K. S. 1995b. Studies on the analysis of κ -casein and β -lactoglobulin genotypes of dairy cattle in Korea using the polymerase chain reaction. *Korean J. Anim. Sci.* 37:311-320.

32. Lee, K. J., Kang, M. S., and Lee, Y. K. 1996. A study on the distributional properties of milk protein loci in young bulls by semen typing. *Korean J. Anim. Sci.* 38:449-454.
33. Lorraine, S., Lum, P. D., and Mederano, J. F. 1997. Polymorphisms of bovine β -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *J. Dairy Sci.* 80:1389-1397.
34. Liu, X., Robinson, G. W., Wagner, K-U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Henninghausen, L. 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes and Development.* 11:179-186.
35. Liu, X., Gallego, M. I., Smith, G. H., Robinson, G. W., and Hennighausen, L. 1998. Functional rescue of STAT5a-null mammary tissue through the activation of compensating signals including STAT5b. *Cell Growth Diff.* 9:795-803.
36. Lunden, A., Sigurdardottir, I. E. L., Danell, B., Rendel, J., and Andersson, L. 1990. The relationship between bovine major histocompatibility complex class II polymorphism and disease by use of bull breeding values. *Anim. Genet.* 21:221-232.
37. Malewski, T., and Swierchowski, L. 1995. Computer-aided analysis of potential transcription factor binding site in the rabbit β -casein gene promoter. *Biosystems.* 36:109-119.
38. Malewski, T. 1998. Computer analysis of distribution of putative cis- and trans-regulatory elements in milk protein gene promoters. *Biosystems.* 45:29-44.
39. Mather, I. H., and Jack, L. J. W. 1993. A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major proteins of bovine milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 76:3832-3850.

40. Mather, I. H. 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83:203-247.
41. McCracken, J. Y., Molenaar, A. J., Snell, R. J., Davey, H. W., and Wilkins, R. J. 1997. A polymorphic TG repeat present within the bovine STAT5A gene. *Anim. Genet.* 28:459-460.
42. Muggli-Cockett, N. E., and Stone, R. T. 1988. Identification of genetic variation in the bovine major histocompatibility complex DR β -like genes using sequenced bovine genomic probes. *Anim. Genet.* 19:213-225.
43. Muggli-Cockett, N. E., and Stone, R. T. 1989. Partial nucleotide sequence of a bovine major histocompatibility class II DR β -like gene. *Anim. Genet.* 20:361-370.
44. Ng-Kwai-Hang, K. F. 1998. Genetic polymorphism of milk proteins; Relationships with production traits, milk composition and technological properties, *Can J Ani Sci.* 78 (Suppl):131-147.
45. Ogg, S. L., Komaragiri, M. V. S., and Mather, I. H. 1996. Structural organization and mammary-specific expression of the butyrophilin gene. *Mamm. Genome.* 7:900-905.
46. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 86:2766-2770.
47. Park, C., Russ, I., D, Y., and Lewin, H. A. 1995. Genetic mapping of F13A to BTA 23 by sperm typing : Difference in recombination rate between bulls in the DYA-PRL interval. *Genomics.* 27:113-118.
48. Rothschild, M. F., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T.,

- Eckardt, G., Sasaki, S., Vincent, A., McLaren, D., Southwood, O., van der Steen, H., Mileham, A., and Plastow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pig. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 93:201-205.
49. Rothschild, M. F., and Soller, M. 1997. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. *Probe.* 8:13-20.
50. Rothschild, M. F., Messer, L., Day, A., Wales, R., Short, T., Southwood, O., and Plastow, G. 2000. Investigation of the retinal-binding protein 4 (RBP 4) genes as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mamm. Genome.* 11:75-77.
51. Sang, B. C., Ryoo, S. H., Lee, S. H., Yoo, S. L., Lee, T. H., and Yu, D. Y. 2000. Sequence analysis of β -lactoglobulin promoter in Korean cattle. *J. Anim. Sci. & Tech.* 42:443-450.
52. Spooner, R. L., Leveziel, H., Grosclaude, F., Olive, R. A., and Vaiman, M. 1978. Evidence for a possible major histocompatibility complex(BLA) in cattle. *J. Immuogenetics.* 5:335-346.
53. Seyfert, H. M., and Luethen, F. 1998. The structure of the bovine butyrophilin-encoding gene differs grossly from mouse concerning promoter localization and exon organization of the 5'-untranslated region. *Proc. 6th World Cong. on Gen Appl Livestock Prod.* 25:19-23.
54. Seyfert, H. M., Pitra, C., Meyer, L., Brunner, R. M., Wheeler, T. T., Molenaar, A., McCracken, J. Y., Herrmann, J., Thiesen, H. J., and Schwerin, M. 2000. Molecular characterization of STAT 5a- and STAT 5b-encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees of divergent evolution of various domains. *J. Mol. Evol.* 50:550-561.
55. Shuster, D. E., Kehrl, M. E. Jr., Ackermann, M. R., and Gilbert, R. O. 1992.

Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89; 9225–9229.

56. Sigurdardottir, S., Borsch, K. G., and Andersson, L. 1991. Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Anim. Genet.* 22:199–209.

57. Sitte, K., East, I. J., Lavin, M. F., and Jazwinska, E. C. 1995. Identification and characterization of new BoLA-DRB3 alleles by heteroduplex analysis and direct sequencing. *Anim. Genet.* 26:413–417.

58. Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. 1996. Functional interactions between STAT5a and the glucocorticoid receptor. *Nature.* 383:726–728.

59. Stone, R. T., and Muggli-Cockett, N. E. 1990. Partial nucleotide sequence of a novel major histocompatibility complex class II β -chain gene, BoLA-DIB. *Anim. Genet.* 21:353–360.

60. Strakenburg, R. J., Hansen, L. B., Kehrl, L. B. Jr., and Chester-Jones, H. 1997. Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins in milk selection and control lines. *J. Dairy Sci.* 80:3411–3419.

61. Takeda, K., and Akira, S. 2000. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:199–207.

62. Taylor, C., Everest, M., and Smith, C. 1996. Restriction fragments length polymorphism in amplification products of the bovine butyrophilin gene: assignment of bovine butyrophilin to bovine chromosome 23. *Anim Genet.* 27:183–185.

63. Vilotte, J. L., and Soulier, S. 1992. Isolation and characterization of the mouse α -lactalbumin-encoding gene: interspecies comparison, tissue and stage-specific

expression. *Gene*. 119:287-292.

64. Vernet, C., Boretto, J., and Mattei, M. 1993. Evolutionary study of multigenic families mapping close to the human MHC class I region. *J. Mol. Evol.* 37:600-612.

65. Wang, S. R., Lin, L., Cheung, I. C., and Lin, T. T. 1998. Characterization and functional analysis of the porcine lactoferrin gene promoter. *Gene*. 215:203-212.

66. Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II : Methods for discrete population genetic data*. 141. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts.

67. Yu, S. L., Lee, T. H., Sang, B. C., Shin, S. T., Lee, K. K., and Yu, D. Y. 2000. Characterization of lactoferrin Gene 5' flanking region of Korean native goat. *J. Anim. Sci. & Tech.* 42:9-20.

68. Zegeye, A., Ashwell, M., Ogg, S., Rexroad, C., and Mather, I. H. 1999. RFLP markers in the bovine butyrophilin gene. *Anim Genet.* 30:385-386.

69. Zinkernagel, R.M., and Doherty, P. C. 1979. MHC-restricted T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction- specificity, function, and responsiveness. *Adv. in Immunology.* 27:221-292.

70. 이광진, 조주현. 1997. 유전적 표지를 이용한 젓소의 연관 현상에 관한 연구. *한축지.* 39(2):101-113.

71. 황보식. 1996. 유지방구의 구성단백질에 대한 최근의 연구. *한낙지.* 14:175-183.

72. 젓소 유전능력 평가 보고서: 2002년 상반기. 2002. 축산기술연구소.

73. ISAG (International Society for Animal Genetics) BoLA Nomenclature

Committee of Roslin Institute. UK.

<http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/>

[부록]

Table 1. Information of Holstein proven bulls in Korea

OBS	Registered ID	Code	Name	Birthday
1	120300011035	H-177	칼 리 스톨	12/03/83
2	120300011070	H-191	리 빌	09/17/89
3	120300011072	H-193	카 슨	10/21/89
4	120300011076	H-197	부 루 터 스	02/13/90
5	120300011077	H-198	커 스톨	12/18/89
6	120300011311	H-264	에어로스페이스	12/29/90
7	120300011338	H-265	씨 에 라	09/09/91
8	120300011356	H-266	알 렉 스	03/22/91
9	120300011357	H-267	징 글	04/08/92
10	120300011358	H-268	마 이 다 스	07/08/91
11	120300011359	H-269	니 콜 라 스	05/25/92
12	120300011179	H-923	밴 커	09/11/91
13	120300011217	H-931	구 스톨 프	05/07/92
14	120300011245	H-941	팩 터	11/15/92
15	120300011263	H-947	루 카 스	04/08/94
16	120300011279	H-948	체 주 도	08/18/94
17	120300011016	HK-002	금 강	11/24/88
18	120300011149	HK-020	물 푸 레	08/23/91
19	120300011305	HK-061	신 지 도	08/26/95

Table 2. Infomation of Holstein candidate young bulls in Korea

OBS	Registrated ID	Code	Name	Birthday	Remarks
1	120300011037	H-179	게 리 트	03/04/83	Foreign ¹
2	120300011039	H-181	필 립	07/21/83	"
3	120300011060	H-182	젯 스 로	09/04/83	"
4	120300011061	H-183	마 그 념	12/13/84	"
5	120300011062	H-184	할 리 웃	12/15/83	"
6	120300011064	H-186	허 니 문	03/03/85	"
7	120300011066	H-187	카 발 리 어	12/06/83	"
8	120300011067	H-188	이 노 스	04/23/84	"
9	120300011068	H-189	스 노 우 맨	05/29/84	"
10	120300011071	H-192	비 너 스	12/15/89	"
11	120300011074	H-195	오 디	01/21/90	"
12	120300011075	H-196	클 레 이 터	11/18/89	"
13	120300011388	H-270	마 틴	02/23/92	"
14	120300011177	H-921	엑 스포	08/11/91	"
15	120300011178	H-922	오 라 프	08/21/91	"
16	120300011180	H-924	화 이 어	11/23/91	"
17	120300011181	H-925	서 진 트	12/12/91	"
18	120300011182	H-926	폴 카	12/27/91	"
19	120300011183	H-927	반 다 나	09/11/91	"
20	120300011184	H-928	바 이 오 닉	04/03/92	"
21	120300011210	H-929	푸 레 루 드	11/22/92	"
22	120300011211	H-930	바 베	04/02/92	"
23	120300011218	H-932	엑 스트 림	10/31/92	"
24	120300011219	H-933	샤 프	12/20/92	"
25	120300011220	H-934	클 레 어	10/19/92	"
26	120300011221	H-935	쉐 발 리 어	08/15/92	"
27	120300011222	H-936	게 리	05/26/92	"
28	120300011223	H-937	콘 웨 이	08/20/92	"
29	120300011231	H-938	웬 들	12/01/92	"
30	120300011243	H-939	클 리 브	06/12/93	"
31	120300011244	H-940	수 너	11/23/93	"
32	120300011246	H-942	플 루 언 스	11/29/93	"
33	120300011259	H-943	밥	06/15/94	"
34	120300011260	H-944	허 드 슨	04/09/94	"
35	120300011261	H-945	플 로 이 드	02/28/94	"
36	120300011262	H-946	닉	09/17/93	"

(To be continued)

OBS	Registrated ID	Code	Name	Birthday	Remarks
37	120300011281	H-949	울릉도	08/20/94	Foreign ¹
38	120300011282	H-950	마라도	11/13/94	"
39	120300011278	H-951	백령도	11/22/94	"
40	120300011280	H-952	흑산도	12/06/94	"
41	120300011283	H-953	대청도	10/30/94	"
42	120300011284	H-954	독도	09/28/94	"
43	120300011314	H-956	달라스	03/05/95	"
44	120300011313	H-957	자마	03/01/95	"
45	120300011315	H-958	벨코트	01/31/95	"
46	120300011316	H-959	트랜스	03/28/95	"
47	120300011049	HK-009	영산강	09/21/89	Korea ²
48	120300011168	HK-024	지리산	02/17/92	"
49	120300011170	HK-026	오대산	03/02/92	"
50	120300011189	HK-027	소백산	05/24/92	"
51	120300011187	HK-028	태백산	08/08/92	"
52	120300011198	HK-030	무궁화	09/09/92	"
53	120300011207	HK-032	코스모스	01/09/93	"
54	120300011225	HK-034	원추리	02/24/93	"
55	120300011232	HK-036	철쭉	04/19/93	"
56	120300011237	HK-037	들국화	07/15/93	"
57	120300011247	HK-039	태평양	12/05/93	"
58	120300011265	HK-041	동해	04/18/94	"
59	120300011251	HK-044	홍해	07/05/94	"
60	120300011252	HK-045	지중해	06/21/94	"
61	120300011277	HK-049	웨들해	12/13/94	"
62	120300011295	HK-051	오동도	11/25/94	"
63	120300011296	HK-052	소청도	01/06/95	"
64	120300011297	HK-053	한산도	02/23/95	"
65	120300011303	HK-059	포길도	05/07/95	"
66	120300011392	HK-098	한세상	09/14/97	"
67	120300011406	HK-100	대망	12/07/97	"

(To be continued)

OBS	Registrated ID	Code	Name	Birthday	Remarks
68	500001261	HK-103	대 기 록	08/01/97	Korea ²
69	500001263	HK-105	대 권	09/30/97	"
70	500001264	HK-106	대 영 웅	10/16/97	"
71	500009054	HK-108	대 초 원	03/18/98	"
72	500009055	HK-109	대 우 주	04/12/98	"
73	500009056	HK-110	대 운 하	04/12/98	"
74	500013370	HK-114	대 업	07/25/98	"
75	500014195	HK-116	대 양	02/11/98	"
76	500014194	HK-118	대 하	06/21/98	"
77	500014857	HK-121	대 사	04/21/98	"

¹ Candidate bulls selected from foreign country.

² Candidate bulls selected from Korea.

Table 3-1. Genotypic distributions of BTN, STAT5a, and PRL loci for proven and candidate young bulls

Code	Name	Loci					
		BTN1	BTN2	BTN3	BTN4	STAT5a	PRL
HK-002	금강	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-009	영산강	AA	AB	AB	AA	AA	AB
HK-020	물푸레	AA	AB	AB	AA	AA	AA
HK-024	지리산	AA	AB	AA	AA	AB	AA
HK-026	오대산	AA	AB	AA	AA	AB	AA
HK-027	소백산	AA	AA	AA	AA	AB	AB
HK-028	태백산	AA	BB	AB	AA	AB	AA
HK-030	무궁화	AA	AA	AB	AA	AA	AB
HK-032	코스모스	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-034	원추리	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-036	철쭉	AA	AB	AB	AA	AA	AA
HK-037	들국화	AA	AA	AB	AA	AA	AA
HK-039	태평양	AB	AB	AB	AA	AA	AA
HK-041	동해	AA	AB	AA	AB	AB	AA
HK-044	홍해	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-045	지중해	AA	AB	AA	AA	AA	AB
HK-049	웨들해	AA	BB	AA	AA	AA	AA
HK-051	오동도	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-052	소청도	AA	AB	AA	AA	AB	AA
HK-053	한산도	AB	AA	AB	AA	AA	AA
HK-059	포길도	AA	AA	AA	AB	AA	AA
HK-061	신지도	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-098	한세상	AA	AB	AB	AA	AA	AB
HK-100	대망	AA	AA	AB	AA	AA	AA
HK-103	대기록	AA	AB	AB	AA	AA	AA
HK-105	대권	AA	AB	AB	AA	AA	AA
HK-106	대영웅	AB	AB	AB	AA	AA	AA
HK-108	대초원	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-109	대우주	AA	BB	AA	AA	AA	AA
HK-110	대운하	AA	AB	AA	AA	AA	AA
HK-114	대업	AB	AB	AA	AA	AB	AA
HK-116	대양	AB	AA	AB	AB	AA	AA
HK-118	대하	AA	AB	AB	AA	BB	AA

(Continued)

Code	Name	Loci					
		BTN1	BTN2	BTN3	BTN4	STAT5a	PRL
HK-121	대사	AA	AA	AB	AA	AA	AA
H-177	칼리스트	AA	AB	AA	AA	AA	AB
H-179	게리트	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-181	필립	AA	AB	AA	AA	AA	AB
H-182	젯스타	AA	AA	AB	AB	AA	AA
H-183	마그넘	AA	AA	AA	AB	AA	AA
H-184	할리웃	AA	AA	AA	AA	AA	AB
H-186	허니문	AA	AB	AA	AA	AB	AB
H-187	카발리어	AA	AB	AA	AA	AB	AB
H-188	이노스	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-189	스노우맨	AB	AB	AA	AB	AA	AA
H-191	리빌	AB	AB	AA	AB	AA	AA
H-192	비너스	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-193	카슨	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-195	오디	AA	AB	AA	AA	AB	AB
H-196	클레이투스	AA	AB	AA	AA	AA	AB
H-197	브루터스	AA	AA	AA	AA	AA	AB
H-198	커스터	AB	AA	AB	AB	AA	AA
H-264	에어로스페이스	AA	AB	AB	AA	AA	AA
H-265	씨에라	AA	AB	AB	AA	AB	AA
H-266	알렉스	AA	AB	AB	AA	AA	AA
H-267	징글	AA	AB	AB	AA	AB	AA
H-268	마이다스	AB	AB	AB	AB	AA	AA
H-269	니콜라스	AB	AB	AB	AB	AA	AA
H-270	마틴	AA	AB	AB	AA	AA	AB
H-921	엑스포	AA	AA	AA	AA	BB	AA
H-922	오라프	AB	AB	AA	AB	AA	AA
H-923	벤커	AA	AB	AA	AA	AA	AB
H-924	화이어	AA	BB	AA	AB	AA	AA
H-925	사전트	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-926	폴카	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-927	반다나	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-928	바이오닉	AA	AB	AA	AB	AA	AB
H-929	프레루드	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-930	바베	AA	BB	AA	AA	AA	AB

(Continued)

Code	Name	Loci					
		BTN1	BTN2	BTN3	BTN4	STAT5a	PRL
H-931	구트타프	AA	BB	AA	AA	AA	AA
H-932	엑스트림	AA	BB	AA	AA	AA	AA
H-933	샤프	AA	AA	AB	AA	AA	AA
H-934	클레어	AB	BB	AB	AB	AA	AA
H-935	쉐발리어	AA	AB	AA	AA	AA	AB
H-936	게리	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-937	콘웨이	AB	AA	AA	AB	AB	AA
H-938	웬들	AA	BB	AA	AA	AA	AA
H-939	클리브	AA	AB	AB	AA	AB	AA
H-940	수너	AB	AA	AA	AB	AB	AA
H-941	팩터	AA	AB	AB	AA	AB	AA
H-942	플루언스	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-943	밥	AA	AB	AB	AA	AA	AA
H-944	허드슨	AA	BB	AA	AA	AA	AA
H-945	플로이드	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-946	닉	AA	AA	AA	AA	AA	AA
H-947	루카스	AA	AA	AB	AA	AA	AB
H-948	제주도	AB	AB	AB	AB	AA	AA
H-949	울릉도	AB	AB	AA	AB	AA	AA
H-950	마라도	AB	AB	AA	AB	AB	AA
H-951	백령도	AA	AB	AB	AA	AA	AB
H-952	흑산도	AA	AA	AA	AA	AA	AB
H-953	대청도	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-954	독도	AA	AB	AA	AA	AA	AA
H-956	달라스	AA	AB	AB	AA	AA	AA
H-957	차마	AA	AB	AA	AA	AB	AA
H-958	벨코트	AB	AA	AA	AB	AA	AA
H-959	트랜스	AA	BB	AB	AA	AB	AA

Table 3-2. Genotypic distributions of STAT5a microsatellite and BoLA-DRB3 loci for proven and candidate young bulls

Code	Name	Loci			
		STAT 5a microsatellite	BoLA-DRB3 <i>Rsa</i> I	BoLA-DRB3 <i>Hae</i> III	BoLA-DRB3 <i>Bst</i> X2 I
HK-002	금강	110/112	IG	AA	AB
HK-009	영산강	112/114	OV	AB	AB
HK-020	물푸레	112/114	IG	BDd	AB
HK-024	지리산	112/114	OV	BD	BB
HK-026	오대산	112/112	LU	AA	AB
HK-027	소백산	110/112	LU	AA	AB
HK-028	태백산	110/112	LM	AA	BB
HK-030	무궁화	110/112	MM	AA	AE
HK-032	코스모스	112/112	OV	BD	BB
HK-034	원추리	112/112	IG	BD	BE
HK-036	철쭉	110/114	LM	BE	AB
HK-037	들국화	110/112	IG	BB	AB
HK-039	태평양	110/112	FU	BB	AB
HK-041	동해	110/112	OV	BD	BB
HK-044	홍해	110/112	FU	AA	AB
HK-045	지중해	112/112	FU	AB	AB
HK-049	웨들해	112/112	IG	AA	AB
HK-051	오동도	110/110	IG	AB	AB
HK-052	소청도	112/112	OV	AA	AB
HK-053	한산도	112/112	IG	AB	AB
HK-059	포길도	112/112	FU	AA	AA
HK-061	신지도	112/114	LM	BD	AB
HK-098	한세상	112/112	OV	BD	BB
HK-100	대망	112/112	FU	AB	AB
HK-103	대기록	110/112	OV	AB	BB
HK-105	대권	112/114	LU	BB	AB
HK-106	대영웅	112/112	MM	AB	AB
HK-108	대초원	112/112	OV	AA	AB
HK-109	대우주	112/112	LM	AB	BB
HK-110	대운하	110/112	LM	AB	AB
HK-114	대엽	110/110	LM	AB	AB
HK-116	대양	112/112	LM	AB	AB
HK-118	대하	110/112	OV	BD	AB

(Continued)

Code	Name	Loci			
		STAT 5a microsatellite	BoLA-DRB3 <i>Rsa</i> I	BoLA-DRB3 <i>Hae</i> III	BoLA-DRB3 <i>Bst</i> X21
HK-121	대사	112/112	IG	AB	AB
H-177	칼리스트	110/112	OO	BB	BB
H-179	게리트	112/112	IG	AA	BB
H-181	필립	110/112	IG	AB	AB
H-182	젯스타	112/112	IG	BB	BB
H-183	마그넘	112/112	IG	AA	AA
H-184	할리웃	114/114	OO	AB	AB
H-186	허니문	112/114	IG	AA	BB
H-187	카발리어	112/112	LM	AA	AB
H-188	이노스	110/110	MM	AA	AB
H-189	스노우맨	110/112	LM	AA	BB
H-191	리빌	110/110	LM	AA	BB
H-192	비너스	112/112	MM	BB	BB
H-193	카슨	112/114	IG	BD	BB
H-195	오디	112/114	OV	BD	AB
H-196	클레이투스	112/112	OV	BB	BB
H-197	브루터스	110/114	OO	BD	BB
H-198	커스터	110/112	LU	AB	BB
H-264	에어로스페이스	110/114	LM	AB	BB
H-265	씨에라	110/112	IG	BD	BB
H-266	알렉스	112/112	LU	BB	BB
H-267	징글	110/112	LM	BD	BB
H-268	마이다스	112/112	OV	AB	BB
H-269	니콜라스	112/112	OO	AB	BB
H-270	마틴	112/112	LU	BD	BB
H-921	엑스포	112/112	OV	BB	BB
H-922	오라프	112/112	LU	AA	BB
H-923	벤커	112/112	IG	AA	BB
H-924	화이어	114/114	MM	AA	BB
H-925	사전트	112/112	FU	BD	BB
H-926	폴카	110/112	FU	AA	EE
H-927	반다나	112/114	IG	BD	AB
H-928	바이오닉	110/112	OV	AB	BB
H-929	프레루드	110/110	IG	AB	BB
H-930	바베	112/112	IG	AB	BB

(Continued)

Code	Name	Loci			
		STAT 5a microsatellite	BoLA-DRB3 <i>Rsa</i> I	BoLA-DRB3 <i>Hae</i> III	BoLA-DRB3 <i>Bst</i> X21
H-931	구트타프	110/112	IG	AB	BB
H-932	엑스트림	112/112	IG	BD	BB
H-933	샤프	112/112	IG	AB	AB
H-934	클레어	110/112	OV	AD	BB
H-935	쉐발리어	112/112	OV	AD	BB
H-936	게리	110/114	IG	AD	BB
H-937	콘웨이	112/114	LU	AA	BB
H-938	웬들	112/114	LU	AB	BB
H-939	클리브	110/112	IG	AB	BB
H-940	수너	110/112	OV	AA	AB
H-941	팩터	110/112	LM	AA	BB
H-942	플루언스	110/110	LM	AA	AB
H-943	밥	112/112	IG	BD	BB
H-944	허드슨	110/112	IG	AA	BB
H-945	플로이드	110/110	LM	BB	BB
H-946	닉	112/112	MM	AA	AA
H-947	루카스	110/112	MM	AA	AA
H-948	제주도	110/112	LM	AB	BD
H-949	울릉도	112/112	LM	AB	BB
H-950	마라도	110/112	OV	AA	AB
H-951	백령도	112/112	OO	AA	BB
H-952	흑산도	112/114	OO	AD	AA
H-953	대청도	110/112	OO	AB	BB
H-954	독도	112/114	IG	AD	BB
H-956	달라스	112/114	IG	AB	BB
H-957	차마	112/112	LM	AA	BB
H-958	벨코트	112/112	LM	AA	BB
H-959	트랜스	112/112	IG	AA	BB

Table 4. The mean and standard deviation of each genotype, and probability between 305-day milk yield and STAT5a, PRL, and BoLA-DRB3 gene

Loci	Genotype	Mean	STD	Prob
STAT5a	AA	7106.22	652.19	0.4514
	AB	7067.08	668.18	
STAT5a Microsatellite	110/110	6828.84	514.38	0.9274
	110/112	7132.86	577.02	
	110/114	7160.90	937.92	
	112/112	7115.10	673.17	
	112/114	7040.87	792.61	
	114/114	7110.45	709.16	
PRL	AA	7087.96	648.69	0.9751
	AB	7093.08	688.09	
DRB3- <i>Rsa</i> I	FU	7286.16	470.14	0.1497
	IG	6987.40	545.05	
	LM	7094.00	778.39	
	LU	7156.53	806.60	
	MM	6818.27	559.27	
	OO	7711.84	557.01	
	OV	6983.61	649.43	
DRB3- <i>Hae</i> III	AA	7078.71	537.30	0.1202
	AB	7176.92	636.69	
	AD	7368.32	982.15	
	BB	6653.71	782.50	
	BD	7178.25	641.08	
DRB3- <i>Bst</i> X2 I	AA	7345.48	1018.75	0.9268
	AB	7035.53	595.06	
	BB	7097.57	675.94	

Table 5. The mean and standard deviation of each genotype, and probability between 305-day fat yield and STAT5a, PRL, and BoLA-DRB3 gene

Loci	Genotype	Mean	STD	Prob
STAT5a	AA	263.16	28.39	0.6472
	AB	262.82	33.88	
STAT5a Microsatellite	110/110	251.31	25.02	0.9057
	110/112	263.50	27.78	
	110/114	263.78	42.43	
	112/112	265.22	30.40	
	112/114	261.67	31.79	
	114/114	252.55	26.94	
PRL	AA	263.45	29.67	0.6939
	AB	260.55	29.06	
DRB3- <i>Rsa</i> I	FU	270.99	15.87	0.2066
	IG	259.82	27.64	
	LM	263.39	39.88	
	LU	265.90	30.56	
	MM	245.31	16.09	
	OO	287.01	19.56	
	OV	258.98	26.93	
DRB3- <i>Hae</i> III	AA	262.04	28.46	0.2203
	AB	266.71	27.38	
	AD	271.36	38.52	
	BB	246.76	29.81	
	BD	266.71	29.82	
DRB3- <i>Bst</i> X2 I	AA	265.34	43.08	0.9177
	AB	260.56	28.14	
	BB	263.80	29.93	

Table 6. The mean and standard deviation of each genotype, and probability between 305-day protein yield and STAT5a, PRL, and BoLA-DRB3 gene

Loci	Genotype	Mean	STD	Prob
STAT5a	AA	228.61	20.86	0.3444
	AB	222.89	21.40	
STAT5a Microsatellite	110/110	213.76	18.15	0.6064
	110/112	226.68	19.83	
	110/114	231.55	28.96	
	112/112	229.75	20.85	
	112/114	226.24	23.58	
	114/114	229.85	21.14	
PRL	AA	226.22	21.05	0.4250
	AB	230.41	20.98	
DRB3- <i>Rsa</i> I	FU	234.99	14.78	0.0665
	IG	224.24	19.51	
	LM	224.45	23.50	
	LU	232.58	25.66	
	MM	214.78	13.61	
	OO	247.53	18.79	
	OV	225.47	19.22	
DRB3- <i>Hae</i> III	AA	224.43	15.77	0.0571
	AB	232.55	21.71	
	AD	240.60	27.23	
	BB	214.01	25.39	
	BD	228.46	20.78	
DRB3- <i>Bst</i> X2 I	AA	231.84	33.69	0.9830
	AB	226.12	20.94	
	BB	227.56	20.73	

Table 7. The mean and standard deviation of each genotype, and probability between 305-day SNF yield and STAT5a, PRL, and BoLA-DRB3 gene

Loci	Genotype	Mean	STD	Prob
STAT5a	AA	620.10	56.82	0.4465
	AB	615.03	54.93	
STAT5a Microsatellite	110/110	588.59	44.59	0.8052
	110/112	620.69	50.50	
	110/114	625.53	83.06	
	112/112	622.22	59.53	
	112/114	617.74	62.27	
	114/114	604.45	28.35	
PRL	AA	617.71	56.35	0.8578
	AB	620.24	57.60	
DRB3- <i>Rsa</i> I	FU	638.26	43.71	0.1804
	IG	610.44	49.70	
	LM	615.71	64.83	
	LU	630.50	69.91	
	MM	585.97	44.73	
	OO	663.63	51.39	
	OV	613.62	54.27	
DRB3- <i>Hae</i> III	AA	613.13	44.58	0.0469
	AB	630.10	54.41	
	AD	648.76	72.54	
	BB	579.52	69.84	
	BD	626.21	57.19	
DRB3- <i>Bst</i> X2 I	AA	632.24	88.54	0.9612
	AB	613.85	52.54	
	BB	620.32	57.69	

Table 8. The mean and standard deviation of each genotype, and probability between ME milk yield and each locus

Loci	Genotype	Mean	STD	Prob
BTN1	AA	7664.36	703.23	0.1206
	AB	7948.42	628.26	
BTN2	AA	7979.85	703.78	0.0932
	AB	7685.09	713.61	
	BB	7440.60	416.03	
BTN3	AA	7578.18	636.85	0.0082
	AB	7973.37	732.07	
BTN4	AA	7684.21	702.31	0.3368
	AB	7857.18	667.28	
STAT5a	AA	7745.00	699.47	0.4536
	AB	7668.31	685.86	
STAT5a Microsatellite	110/110	7472.41	555.27	0.9552
	110/112	7735.83	620.99	
	110/114	7809.10	1011.29	
	112/112	7754.94	721.73	
	112/114	7682.56	821.31	
	114/114	7789.85	669.84	
PRL	AA	7722.59	681.44	0.9468
	AB	7710.96	757.34	
DRB3- <i>Rsa</i> I	FU	7937.26	481.34	0.1334
	IG	7598.51	589.22	
	LM	7734.44	814.04	
	LU	7787.44	830.41	
	MM	7465.19	632.13	
	OO	8396.77	618.60	
DRB3- <i>Hae</i> III	AA	7680.07	552.51	0.1075
	AB	7844.88	684.19	
	AD	8003.98	1088.08	
	BB	7269.76	828.84	
	BD	7814.78	676.73	
DRB3- <i>Bst</i> X2 I	AA	8030.22	1109.31	0.9322
	AB	7685.08	642.75	
	BB	7720.23	710.33	

Table 9. The mean and standard deviation of each genotype, and probability between ME fat yield and each locus

Loci	Genotype	Mean	STD	Prob
BTN1	AA	291.01	32.04	0.3672
	AB	298.59	30.82	
BTN2	AA	298.29	32.90	0.2881
	AB	292.94	32.74	
	BB	279.52	21.23	
BTN3	AA	287.37	291.60	0.0378
	AB	301.66	295.93	
BTN4	AA	291.60	31.90	0.6000
	AB	295.93	31.94	
STAT5a	AA	292.62	30.92	0.6707
	AB	293.51	35.89	
STAT5a Microsatellite	110/110	280.50	26.94	0.8843
	110/112	291.36	30.68	
	110/114	293.60	46.35	
	112/112	296.32	32.57	
	112/114	291.36	33.84	
	114/114	282.85	26.38	
PRL	AA	292.88	31.94	0.8325
	AB	291.20	31.97	
DRB3- <i>Rsa</i> I	FU	301.54	17.30	0.1845
	IG	288.25	30.99	
	LM	295.69	41.80	
	LU	295.68	32.08	
	MM	274.21	19.46	
	OO	318.46	21.55	
DRB3- <i>Hae</i> III	AA	291.62	30.40	0.2079
	AB	297.64	29.65	
	AD	300.48	43.07	
	BB	275.27	32.89	
	BD	295.81	31.83	
DRB3- <i>Bst</i> X2 I	AA	295.88	47.52	0.9189
	AB	292.20	30.75	
	BB	292.68	32.06	