

GeneFishing PCR 기법을 이용한 한우 등심조직의 육질 등급 간 차등 발현 유전자의 발굴

신성철 · 신기현 · 박종근 · 이준제 · 백명기 · 허연범 · 채지선 · 정구용¹ · 정의룡*

상지대학교 응용동물과학부 생명공학과, ¹상지대학교 응용동물과학부 동물자원학과

서 론

쇠고기의 육질은 품종에 따라 크게 차이가 나며 같은 품종이라도 성별, 거세유무 등에 따라 달라지고 동일한 도체 내에서도 부위에 따라 근육 및 지방분포 상태가 다르며 육질에도 차이가 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 우리나라 고유의 쇠고기 생산 자원인 한우는 성장 속도가 느린 만숙종으로서 비육 생리상 외국의 육우와는 달리 육질을 결정하는 근내지방의 침착이 늦게 이루어지는 특성을 갖고 있는 반면 육질이 우수하여 고급육 생산을 위한 비육우로서 그 유전적 자질이 높게 평가되고 있다.

한우 고급육을 생산하기 위해서는 일차적으로 근내지방 침착도를 증가시켜야 하며 이를 위해 그동안 영양 사양학적, 생화학적 및 면역학적인 방법으로 근내지방 축적에 관한 연구가 수행되었다. 근내지방 침착도를 증가시키고 피하지방 축적을 감소시키기 위해서는 근내 지방 축적 기작을 정확하게 이해해야 하나 사양 및 영양소 급여체계에 관한 연구 등의 방법으로는 이러한 기작을 정확하게 이해하기 어렵다. 한우 고급육 생산을 위한 근내지방 축적 메카니즘 및 조절작용을 구명하기 위해서는 DNA 분자수준에서 체지방 축적 및 지방대사 조절에 관여하는 유전자들의 발현양상을 비교 분석하고 근내지방 축적 정도에 따라 발현 양상에 차이가 나는 차등 발현 유전자를 발굴하여 고급육 생산에 활용하는 연구가 필요하다.

GeneFishing PCR 방법은 ACP(annealing control primer)을 이용한 PCR 기법으로 품종, 개체 및 조직 부위 등에서 mRNA의 발현 차이가 나는 유전자(differentially expressed gene; DEG)들을 탐색하고 동정하는 분자유전학적 기술이다²⁾. 이 기술을 이용하여 한우의 고급육 및 저급육의 육질 등급간에 차등적으로 발현되는 유용 유전자를 발굴하여 고급육 조기 진단용 마커로 활용할 수 있을 것이다. 또한 관련 유전자들의 기능을 구명함으로써 지방의 근내 축적에 관련된 signal pathway 및 cellular regulation에 관한 기작을 밝힐 수 있다. 따라서 본 연구는 GeneFishing PCR 기법을 이용하여 한우 등심조직에서 육질 등급간에 차등 발현되는 유전자들을 발굴하고 한우 육질 등급간에 차이를 보이는 유용 유전자를 한우의 육질등급 판정을 위한 표지 유전자로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 한우 등심시료

한우 등심에서 차등적으로 발현되는 유전자를 동정하기 위해 고급육(1⁺ 등급) 및 저급육(3

등급)으로 도체 등급판정된 비거세우 개체 가운데 등급별로 각 3두씩 총 6두를 선발하여 공시하였다. 시료는 도축 후 30분 이내에 등심(longissimus dorsi)을 채취하여 액체질소로 냉각하였고 -80℃에 동결 보존하여 사용하였다.

2. Total RNA 추출 및 cDNA 합성

각 등심시료로부터 total RNA는 TRizol reagent (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 분리 추출하였다. 추출된 total RNA 약 1 μ g을 역전사 효소를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다.

3. ACP-based GeneFishing PCR

GeneFishing DEG kits(Seegene, USA)의 20종류 ACP(annealing control primer) set를 이용하여 발현 차이 유전자를 탐색하였다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel 상에서 확인하였다.

4. Cloning 및 Sequencing

유전자 발현 차이 양상을 보이는 유전자 단편은 GENE CLEAN II Kit(Qbiogene, USA)을 이용하여 agarose gel에서 분리 정제한 후 pGEM -T Easy vector(Promega)에 cloning하고 ABI Prism 310 Genetic Analyzer(Perkin Elmer, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였다.

5. RT-PCR에 의한 DEG의 동정

고급육과 저급육 간에 발현 차이가 나는 유전자의 염기서열 분석 결과를 NCBI GenBank에서 유전자 homology search를 실시하여 차등 발현 유전자를 동정하였고, DEG의 염기서열을 기초로 하여 DEG-specific primer를 제작 합성한 후 RT-PCR을 수행하여 차등발현 유전자의 확인 및 발현량을 비교분석하였다.

결과 및 고찰

한우 고급육에 특이적으로 발현되는 유전자를 동정하기 위하여 GeneFishing DEG kits을 이용하여 육질등급에 따른 등심조직에서 차등적으로 발현되는 유전자를 확인한 결과 총 20종류의 primer set 가운데 8개의 primer에서 고급육(1⁺ 등급)과 저급육(3등급)간에 발현 차이를 보이는 유전자가 확인되었다(Figure 1). 즉, 육질 등급간에 총 10개의 차등 발현 유전자가 확인되었고 이 가운데 고급육 한우 등심에서 발현량이 높은 유전자가 4개(DEG 2, 5, 12, 13) 그리고 저급육 등심에서 발현량이 높은 유전자가 6개(DEG 1, 3, 9, 10, 11, 15) 각각 검출되었다. 발현량 차이 유전자는 PCR로 재 증폭(Figure 2)한 다음 cloning하여 염기서열을 분석하고 BLAST program을 이용하여 유전자 상동성 검색을 실시하였다(Table 1). DEG 1은 malate dehydrogenase 2(MDH2), DEG 3는 myosin heavy chain 2a, DEG 10은 triosephosphateisomerase 1(TPI 1), DEG 11과 15는 actin, alpha 1, skeletal muscle(ACTA1) 유전자들과 각각 96~98%의 상동성을 보였다. 저급육에서 발현량이 높은 DEG는 주로 근섬유소 및 근육 관련 유전자들로 분석되었고 고급육에서 발현량이 높은 유전자는 대부분 EST 유전자로서 앞으로 이들 EST 유전자의 기능 분석을 통해 지방대사 관련 여부에 대한 연구가 진행될 필요가 있다.

본 연구를 통해 한우 고급육에서 차등 발현되는 유전자들은 한우 육질 및 등급판정을 위한

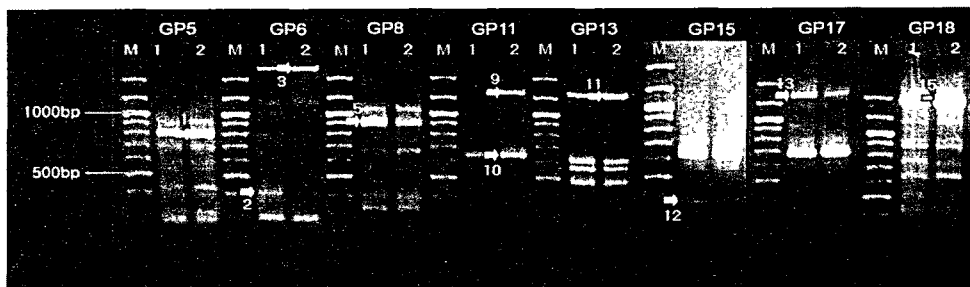


Figure 1. Differentially expressed genes(DEG) between high and low meat quality in *longissimus dorsi* of Hanwoo. The arrows indicate the DEG. The amplified PCR products were separated on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. M: DNA size marker.



Figure 2. Gene expression analysis of DEG between high and low meat quality by RT-PCR. The amplified PCR products were separated on a 2.0% agarose gel and stained with ethidium bromide. The spots indicate differentially expressed genes(DEG). M: DNA size marker.

표지인자(marker)로 활용할 수 있어 유전자 마커를 이용한 고급육 생산 한우 개체의 육질 조기진단이 가능할 것이다. 또한, 한우 고급육에 특이적으로 발현되는 유전자들의 기능을 연구함으로써 지방대사 조절 및 근내 지방축적 기작에 관한 정보를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 한우 근내 지방 축적 기작을 구명하고 고급육과 저급육에서 차등 발현되는 유전자를 발굴 동정하여 한우 육질 진단을 위한 분자 표지 마커로 활용하기 위해 GeneFishing PCR 기법을 이용하여 한우 육질등급에 따른 등심조직에서 차등적으로 발현되는 유전자를 분석하였다. 한우 육질 등급(1⁺ 등급 vs 3 등급)간에 총 10개의 차등 발현 유전자가 확인되었고 이 가운데 고급육 한우 등심에서 발현량이 높은 유전자가 4개 그리고 저급육 등심에서 발현량이 높은 유전자 6개가 각각 검출되었다. 발현량 차이 유전자를 cloning하여 염기서열을 분석하고 상동성 검색을 실시한 결과 고급육에서 발현량이 높은 DEG는 주로 EST(expressed sequence tag) 유전자들로 밝혀졌고 저급육에서 발현량이 높은 DEG는 malate dehydrogenase 2(MDH2),

Table 1. Sequence homology and characterization of differentially expressed genes

DEG No.	Identity	GeneBank acc. no.	Base pairs	Sequence homology
DEG1	Bos taurus malate dehydrogenase 2, mitochondrial (MDH2), mRNA	XM_589838.1	1295	98%
DEG2	(EST) 1162306 MARC 7BOV Bos taurus cDNA 5', mRNA	DN281142.1	796	99%
DEG3	Bos taurus MyHC-2a mRNA for myosin heavy chain 2a, complete cds	AB059398.1	5965	98%
DEG5	(EST) BovGen_15668 normal cattle brain Bos taurus cDNA clone RZPDp1056I1416Q 5', mRNA	CO887343.1	743	98~100%
DEG9	PREDICTED: Bos taurus similar to hemojuvelin isoform a (LOC512336), mRNA	XM_589838.1	1263	99%
DEG10	Bos taurus triosephosphate isomerase 1 (TPI1), mRNA, complete cds	BT021064.1	1238	98%
DEG11	Bos taurus actin, alpha 1, skeletal muscle (ACTA1), mRNA	NM_174225.1	1485	97%
DEG12	PREDICTED: Bos taurus similar to cardiac ankyrin repeat protein (LOC523149), partial mRNA	XM_601444.1	426	100%
DEG13	(EST) Bos taurus LM-24-HW cDNA library Bos taurus cDNA clone LM-24-HW-001-38 (5'), mRNA	BM986167.1	860	99%
DEG15	Bos taurus actin, alpha 1, skeletal muscle (ACTA1), mRNA	NM_174225.1	1485	96%

myosin heavy chain 2a, triosephosphate isomerase 1(TPI 1), actin, alpha 1, skeletal muscle(ACTA1) 유전자들로 동정되었다. 본 연구를 통해 한우 육질간 차등 발현되는 유전자들은 한우 육질 및 등급판정을 위한 표지인자(marker)로 활용할 수 있어 유전자 마커를 이용한 고급육 생산 한우의 육질 조기진단이 가능할 것이다.

참고문헌

1. Huerta-Leidenz, N. O., et al. (1993) *J. Anim. Sci.*, 71, 625-630.
2. Kim, Y. J., et al. (2004) *BioTechniques* 36, 1-5.
3. Romf, R. and Kahl, G. (1997) *BioTechniques* 23, 28-32.
4. Asmed, N., et al. (2000) *Mol. Vis.* 6, 144-147
5. Bauer, D., et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 4272-4280.