

지방산 결합 단백질(FABP) 유전자를 이용한 한우 도체 및 육질 관련 SNP 분자 표지 개발

신성철 · 김기락 · 박종근 · 신기현 · 이준제 · 허연범 · 정구용 · 정의룡*

상지대학교 동물생명자원학부

서 론

지방산 결합 단백질(fatty acid binding protein, FABP)은 장쇄 지방산(long chain fatty acid) 대사에 관련된 진화적으로 보존된 단백질 그룹의 하나로서²⁾ 혈장 막으로부터 β -산화 및 triacylglycerol 또는 인지질 합성 장소로 지방산을 운송하는 작은 세포 내 단백질이다. 지방산 결합 단백질은 세포내 지방산 농도 및 다양한 세포 및 조직 대사를 조절하는 것으로 알려져 있고, 이 같은 생리적 작용 때문에 포유 동물에서 근내지방 함량의 후보 유전자로 주목되고 있다³⁾. 심장지방산결합단백질(H-FABP) 유전자는 근세포에 주로 발현되는 반면 지방형(adipocyte type) 지방산 결합 단백질은 거의 전적으로 지방 세포에서 발현된다. 특히, 심근과 골격근 또는 비유중인 유선조직에서와 같이 지방산 요구가 높은 여러 조직에 존재하는 H-FABP 단백질은 돼지의 근내지방 함량, 등지방 두께 및 성장률과 연관성이 있다고 보고된 바 있다¹⁾. 그러나 소의 경우 최근에 RH mapping 기술로 2번 염색체상에서 H-FABP 유전자가 위치하고 있음을 보고하였으나⁴⁾, 현재까지 도체 및 육질 형질과의 연관성을 밝힌 연구는 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구는 한우의 도체 품질을 결정하는 육질 등급 판정 항목이자 경제적으로 매우 중요한 근내 지방도, 배 최장근 단면적 및 등지방 두께에 대한 개체별 유전능력 차이를 조기에 식별하는 선발 기술을 개발하기 위해 한우 지방산 결합 단백질 유전자의 전체 염기 서열을 분석하고, 한우의 도체 및 육질 형질과 연관된 SNP(single nucleotide polymorphism) 분자 표지를 발굴하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시축, 도체 성적 및 Genomic DNA 시료 추출

본 연구에 사용한 한우는 국가 능력검정사업에 등록하고 후대 검정을 통하여 혈통 기록과 도체성적을 보유하고 있는 제 32차(162두) 및 33차(147두) 후대 검정우 집단 총 309두를 공시축으로 선정하였다. 각 공시축으로부터 혈액을 채취하고 Genomic DNA의 분리 및 정제는 Salting out 방법을 일부 변경하여 수행하였다.

2. PCR을 이용한 H-FABP 유전자 증폭

한우 H-FABP 유전자의 SNP 검출을 위해 complete cds를 모두 포함하는 총 8개의 primer를 설계 및 합성하여 PCR 증폭 반응을 수행하였다.

3. Direct sequencing을 통한 H-FABP 유전자의 SNP 검출

PCR을 통해 검출된 증폭 산물을 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA)를 이용하여 direct sequencing 법으로 염기 서열을 분석하여 H-FABP 유전자의 SNP를 검출하였다.

4. PCR-RFLP 기법을 이용한 H-FABP 유전자의 SNP marker typing

검출된 주요 SNP 부위에 대한 제한 효소 인지 부위 존재 여부를 파악하고, PCR-RFLP 분석을 실시하기 위해 실험 조건에 적합하게 primer를 설계 및 합성하였다(Table 1). H-FABP 유전자의 SNP 검출부위 177번째, 2753번째, 3523번째 및 5232번째(GenBank accession no. DQ174319)에는 각각 *Bsp1286 I* 과 *Bme1580 I*, *NlaIII*, *TspR I* 및 *DraIII* 제한 효소를 처리하여 절단하고, 절단된 DNA 단편의 크기를 고려하여 각각 2~3% agarose gel로 전기영동한 후, 발현된 DNA band 양상을 관찰하고 각 검정 개체별 SNP genotype을 판정하였다.

5. SNP marker와 도체 및 육질 형질과의 연관성 분석

도체 및 육질 형질의 표현형 측정치 및 육종가 추정치(estimated breeding value, EBV)에 영향을 미치는 H-FABP 유전자의 SNP marker 효과를 분석하기 위해 SAS 8.1 프로그램의 일반 선형모형(GLM) 방법으로 통계처리 하여 연관성을 분석하였다.

결과 및 고찰

1. H-FABP 유전자의 염기 서열 분석 및 SNP 검출

Direct sequencing을 통해 H-FABP 유전자의 염기서열을 분석한 결과 C177G, G2753A,

Table 1. Primer sequences, amplified region and fragment size for PCR amplification in SNP genotyping of H-FABP gene

Candidate gene	Primer sequences (5' - 3')	Nucleotide substitution	Amplified region	Fragment size(bp)	Analysis method	GenBank accession no
H-FABP	GGAAGTTAGTGGACAGCAAG CTGACCAACTTCAGATCGTT	C177G	Intron I	400	RFLP	DQ174319
	AGTAAAACCCACCCATGTAGC CTTCTGGAACCTATGGACAA	A2753C	Intron I	427	RFLP	
	AACGTCTTTGAAGTTCTCA CACCTTGACTTTCCTGTCAT	C3523T	Intron I	302	RFLP	
	ATATGTGATATGGACCAGGG AACCCAAACTACTGATGGTG	T5232C	Intron II	415	RFLP	

C2905A, C3523T, T5232C, G7127A 등 총 6개의 SNP를 검출하고, 국제 NCBI GenBank에 등록하였다(GenBank submission no. DQ174319).

2. PCR-RFLP 기법을 이용한 H-FABP 유전자의 SNP marker typing

H-FABP 유전자의 주요 SNP 부위에 대한 각각의 PCR-RFLP 분석 결과는 Fig. 1에 제시하였다. 먼저 intron I 영역 내 염기서열 177번째 SNP 부위에 *Bsp1286 I* 및 *Bme1580 I* 두 종류 제한 효소 인지 부위가 존재하여 PCR-RFLP 기법으로 분석한 결과 3종류 SNP 유전자형을 검출하였다. 즉, *Bsp1286 I* (*GDGCH[▼]C*) 제한 효소로 절단했을 때 C 대립 유전자는 각각 113과 287bp band가 검출되었고, G 대립 유전자는 400bp band가 검출되었으며, C/G hetero type은 113, 287 및 400bp의 banding 패턴을 나타냈다. 또한 *Bme1580 I* (*GKGC[▼]M[▼]C*) 제한 효소로 절단했을 때도 *Bsp1286 I* (*GDGCH[▼]C*) 제한 효소로 절단했을 때와 같은 결과의 DNA banding 패턴을 나타내었다. 두 번째 SNP 부위로 intron I 영역 내 염기서열 2753번째 SNP 부위를 포함하는 증폭 산물에는 *NlaIII* (*CATG[▼]*) 제한 효소를 처리하여 agarose gel에 전기영동한 결과 A 대립 유전자의 경우 12와 415bp band가 검출되었고, G 대립 유전자는 12, 125 및 290bp band가 검출되었으며, A/C hetero type은 12, 125, 290 및 415bp의 banding 패턴을 나타냈다. 세 번째 SNP로서 intron I 영역 내 염기서열 3523번째 SNP 부위를 포함하는 증폭산물에는 *TspR I* (*NNCASTGNN[▼]*) 제한 효소를 처리하여 agarose gel에 전기 영동한 결과 C 대립 유전자의 경우 68과 234bp band가 검출되었고, T 대립 유전자는 302bp band가 검출되었다. 그리고 C/T

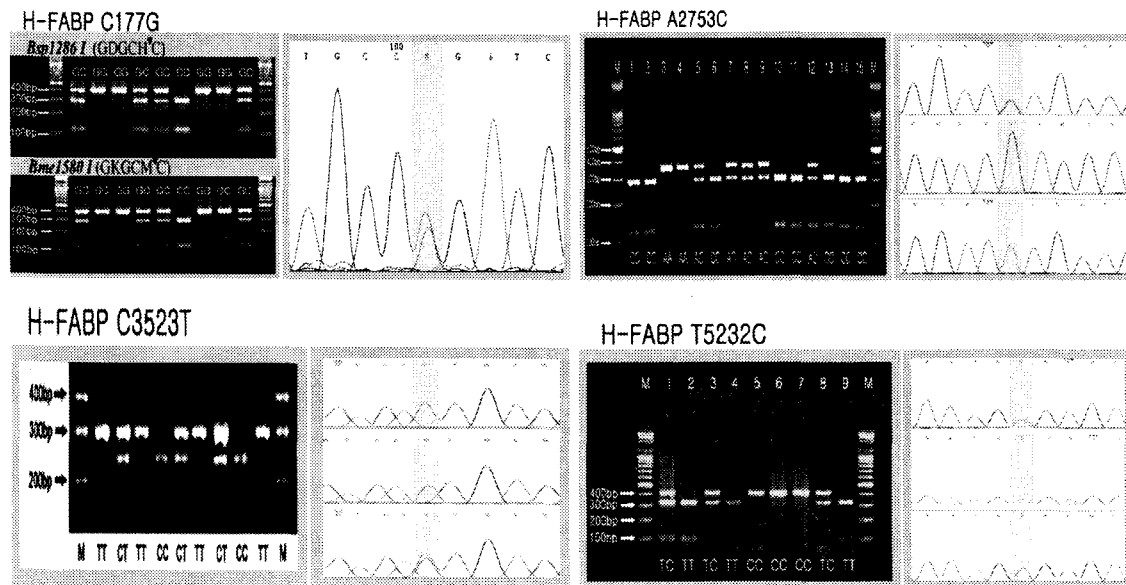


Fig. 1. PCR-RFLP and sequence chromatograms for the detection of the gene specific SNP of the H-FABP gene in Korean cattle. SNPs with the C/G, A/C, C/T and T/C transitions were detected at positions 177(C177G), 2753(A2753C), 3523 (C3523T) and 5232(T5232C) within intron I and intron II regions of the H-FABP gene, respectively. M: molecular size marker.

hetero type은 68, 234 및 302bp의 banding 패턴을 나타냈다. 네 번째 SNP로서 intron II 영역 내 염기 서열 5232번째 SNP 부위를 포함하는 증폭산물에는 *DraIII*(CACNNN[▼]GTG) 제한효소를 처리하여 agarose gel에 전기 영동한 결과 T 대립유전자의 경우 91과 324bp band가 검출되었고, C 대립 유전자는 415bp band가 검출되었다. 그리고 T/C hetero type은 91, 324 및 415bp의 banding 패턴을 나타냈다.

3. H-FABP 유전자의 SNP marker와 도체 및 육질형질과의 연관성 통계 분석

H-FABP 유전자의 주요 SNP marker와 한우 도체 및 육질 관련 형질과의 연관성을 통계 분석한 결과, intron I 영역 내 3523번째 SNP 유전자형과 한우의 등지방두께(BF) 및 등지방두께 육종가(BVBF), 그리고 배최장근 단면적 육종가(BVEMA)에 유의적인 연관성($P<0.05$)이 입증되었다(Table 2). 그 외에 177번째와 2753 및 5232번에서 검출된 H-FABP 유전자의 SNP 유전자형에서는 도체 및 육질형질과의 유의적인 연관성이 입증되지 않았다.

요 약

본 연구는 한우의 도체 품질을 결정하는 육질 등급 판정 항목이자 경제적으로 매우 중요한 근 내지방도, 배최장근 단면적 및 등지방두께에 대한 개체별 유전능력 차이를 조기에 식별하는 선발 기술을 개발하기 위해 세포내 지방산 농도 및 다양한 세포 및 지질대사를 조절하는 지방산결합 단백질(H-FABP) 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 SNP를 검출하고, SNP marker가 한

Table 2. Least squares means and standard errors for carcass traits and meat quality of different H-FABP (C3523T) genotype in Korean cattle(n=309)

Traits	SNP genotype			P-value	Additive effect	Dominance effect
	C/C	C/T	T/T			
LW/Kg	585.000±36.121	540.379±5.747	548.939±6.287	0.3253	36.060±36.664	53.179±38.423
CW/Kg	328.500±23.200	308.531±3.691	315.015±4.038	0.3825	13.484±23.549	26.451±24.679
DP/%	56.200± 1.095	57.048±0.174	57.333±0.190	0.3698	-1.133± 1.112	-0.562± 1.165
BF/cm	1.150± 0.189 ^a	0.624±0.030 ^b	0.656±0.033 ^b	0.0238*	0.493± 0.192*	0.557± 0.201**
EMA/cm ²	69.000± 5.787	74.518±0.920	76.045±1.007	0.3060	-7.045± 5.874	-3.992± 6.156
MS/1~7	3.000± 0.875	2.177±0.139	1.909±0.152	0.2460	1.090± 0.889	0.554± 0.931
BVCW/kg	5.705± 7.189	2.436±1.143	5.078±1.251	0.2882	0.626± 7.297	5.910± 7.647
BVEMA/cm ²	-4.260± 2.405 ^b	0.101±0.382 ^a	1.213±0.418 ^a	0.0215*	-5.474± 2.441*	-3.249± 2.558
BVBF/cm	0.792± 0.401 ^a	0.135±0.063 ^{ab}	-0.048±0.069 ^b	0.0311*	0.840± 0.407*	0.473± 0.427
BVMS/1~7	0.199± 0.090	-0.026±0.014	-0.039±0.015	0.1142	0.239± 0.091	0.212± 0.096

LWT, live weight; CWT, carcass weight; DP, dressing percentage; BF, backfat thickness; EMA, *M. Longissimus dori* area; MS, marbling score

* Effect was significant at $P<0.05$, ** Effect was significant at $P<0.01$

^{a, b} Within a row, means without a common superscript letter differ ($P<0.05$).

우의 도체 및 육질 형질에 미치는 영향에 대하여 분석하고자 수행하였다. 염기 서열 분석 결과 총 6개의 SNP를 검출하였고, 이들 중 4개의 주요 SNP를 선발하여 PCR-RFLP기법으로 genotyping 하고, 각 SNP marker가 한우 도체 및 육질 형질에 미치는 영향을 통계분석 하였다. H-FABP의 C3523T SNP marker가 한우의 배최장근 단면적 및 등지방 두께에 유의적인 영향을 미쳤다($P<0.05$). 따라서, 본 연구를 통해 개발된 한우 H-FABP 유전자의 특정 SNP marker는 배최장근 단면적은 넓고 등지방두께는 얇은 우수한 고급육을 생산하는 한우의 조기 식별 및 육질진단에 매우 유용한 SNP 분자 표지로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Gerbens. F., *et al.* (2000) *J. Anim. Sci.* 78:552-559.
2. Hirsch. D., *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8625-8629.
3. Nechtelberger. D., *et al.* (2001) *J. Anim. Sci.* 2001. 79:2798-2804.
4. Roy. R., *et al.* (2003) *Animal Genet.* 34(6):466-467.