

## 한우육의 육질에 중요 영향을 미치는 근내지방축적 최적기에 발현되는 단백질 동정

임진규

경북대학교 동물공학과

### Identification of the Proteins Expressed at Optimum Marbling in Hanwoo Loin

Jin-Kyu Lim

Dept. of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### Abstract

Proteins from the loin tissues age-ranged from 0 to 24 months of ten Korean cattle were extracted, separated and compared on two-dimensional(2-D) gels to identify the proteins whose expression is highly correlated to marbling. We also compared the difference of loin proteins between castrated and non-castrated bull cows on two-dimensional gels. As the marbling in the loin of the cattle is optimized at 18 to 24 months, eight proteins expressed significantly higher level in 24-month than in 0- or 6-month were selected in terms of isoelectric points(pIs) and molecular weights. Using these values, we searched the Swiss-Prot database via the ExPASy molecular biology server with TagIdent program. The proteins with the nearest molecular weights and isoelectric points were selected from the lists. These possible candidates were confirmed by N-terminal microsequencing of the eight selected proteins. Three proteins, myoglobin, hemoglobin and ATPase, whose N-termini were not blocked could be microsequenced and found to be exactly matched to the selected candidates. It is suggested that the proteins increasingly expressed in marbling periods can be involved in meat color, lipid transport and flavor improvement.

**Key words:** loin proteins, marbling, 2-D gel electrophoresis

#### 서론

조직화학적으로 육질은 골격근을 구성하고 있는 근섬유의 조직에 따라 좌우되는데 이들 근섬유의 특성 차이는 유전적 요인이 지배적이나(1,2), 육질은 가축의 나이, 도축조건, 요리방법, 개인적 선호도 차이 등 다양한 요인에 의해 좌우된다(3). 그러나 일반적으로 경험적으로 고기조직내 지방축적(marbling)은 고기의 질을 결정하는 중요한 요소임이 인정되고 있다.

비록 소고기 조직에 5%의 지방만 존재해도 사람들이 만족할 만한 육질을 나타낸다고 알려져 있지만, 근조직내의 높은 지방축적도는 고기의 질감과 풍미를 높이는 데 필수적이라고 대부분 받아들여지고 있다(4). 근조직내의 지방축적은 고기조직 사이에서 유허체와 같은 역할로써 고기를 연하게 해주고, 요리할 때 고기가 수축하는 것을 막아주고 수분 손실을 막아 줌으로써 고

기즙이 풍부하도록 해준다. 그외에도 입안에서 침이 나오도록 유발함으로써 삼킬 때도 부드럽게 넘어가도록 하는 역할을 하거나 지방성분인 향기성분을 유지하여 요리시 식욕을 돋구어 주는 역할을 한다(5-7). 이와 같은 이유들 때문에 가축사양이나 가축육종에서는 근조직내 양질의 지방축적을 위해 사양방법 개발과 가축종자 선발을 해오고 있으며, 소를 거세하거나 거세의 효과를 내는 호르몬을 주사함으로써 양질의 지방축적을 피하고 있다(8,9).

육질을 결정짓는 여러 요소 중 근조직내의 단백질은 가축의 성장단계에 따라 계속적으로 합성되고 분해되면서 지방의 전달, 근육조직의 변형, 풍미성분의 합성과 분해 등을 조절하는 기능을 하여 고기의 맛을 결정하는 역할을 한다(10). 근육조직내의 효소, 근섬유, connective protein 등은 모두 단백질들이며 이들은 해당 유전자에 의해 그 발현이 결정된다. 따라서, 근조직내

지방축적의 변화나 풍미성분의 변화에는 반드시 단백질 성분의 변화가 동반되기 마련이고, 이에 관여하는 단백질을 찾아내면 아울러 육질결정에 중요한 역할을 하는 유전자를 찾을 수 있게 된다.

일반 단백질과 같이 고기조직의 단백질들도 동일한 생화학적 방법으로 분리, 정제가 가능하다. 예를 들어 이차원 전기영동방법(two-dimensional gel electrophoresis)에 의해 단백질을 분리할 때, 등전점 별로 일차원적 분리가 이루어진 단백질을 다시 단백질의 크기에 따라 SDS-polyacrylamide gel 상에 분리하면 20×20cm 되는 gel에서 수 천종 이상의 단백질을 순수 분리할 수 있다(11). 이 기술을 이용하면 이론적으로 proteomics의 정의와 같이 한 개체의 유전자에 의해 발현되는 모든 종류의 단백질의 발현과 생리적, 환경적 변화에 따른 발현 정도의 변화를 2-D gel상에서 확인할 수 있다(12-14). 이 방법은 역시 유전자 정보만으로는 알 수 없는 단백질 발현의 차이, post-translational modification, 조직특이도 등을 알아 낼 수 있고, 단백질의 생화학적 성질을 잘 모를 지라도 순수 분리가 가능하게 된다.

단백질의 순수 분리가 이루어지면 그 양이 fmol에서 pmol 정도만 되어도 mass spectrometer 방법을 이용하여 정확한 단백질의 분자량을 측정할 수 있다. 이와 같이 측정된 단백질들의 분자량과 pI값들이 database화 되어 있고 현재 급속도로 진행 중인 genome project로부터 여러 종류의 단백질의 정확한 이론적 분자량을 알 수 있기 때문에 미지의 단백질이라도 정확한 분자량과 pI값을 알면 어느 정도 그 단백질의 기능을 예측할 수 있게 되었다(15,16). ExPASy molecular biology server는 internet상으로 Swiss-Prot 단백질 database를 검색할 수 있도록 정보를 공유하고 있기 때문에 2-D gel 상에서 정확한 단백질의 분자량과 pI값을 얻으면 그에 해당하는 가능성 높은 단백질의 정보를 얻을 수 있다. 이러한 이유로 전 세계적 전산망이 구축되고 있고 단백질의 database는 급속히 확장되고 있기 때문에 앞으로는 2-D gel상에서 단백질을 순수 분리하고 거기서 얻은 정보로부터 손쉽게 단백질의 성질을 규명할 수 있고 해당 단백질의 cDNA sequence도 동시에 얻을 수 있게 된다.

본 연구에서는 Hwang과 Lim(17)의 연구결과를 더 발전시켜서 각 단백질들의 정확한 pI값과 분자량을 computer program을 이용하여 얻고 이 값들을 가지고 Swiss-Prot database를 검색하였다. 검색결과 얻은 단백질들의 정보가 어느 정도 신뢰할 만한 것인지 N-terminal microsequencing을 통해 확인하였다. 그 결과, 정확한 분자량과 pI값을 가지고 database를 검색해서 얻

은 단백질들의 정보가 높은 수준으로 신뢰할 만함을 알았고, 현재까지 선발한 8개의 단백질들의 기능과 육질간의 관계를 추정하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

한우 등심조직 시료들은 수원 축산기술연구소에서 도축하여 -80°C에서 보관하였다가 실험에 사용하였으며, 시료는 각 네 마리의 0, 6, 24개월령 숫소로부터 얻은 등심이였다. 비거세우 등심조직은 두 마리의 24개월령 한우에서 채취하였다. 도살 전에 소들은 무제한 사료 급여를 공급받았으며 모두 건강하였다.

실험에 사용한 chemical들은 모두 ACS 등급의 시약이었으며 gel electrophoresis에 사용된 시약들은 electrophoresis grade시약(BioRad, USA)이었다. 실험방법은 전체적으로 Hwang과 Lim(17)의 방법과 동일하였다.

### 시료준비

한우 등심 조직들은 도살 즉시 액체질소에서 얼려서 실험실로 운반되었고 -80°C에서 보관하였다. 가시적인 지방층과 connective tissue는 시료 무게를 달 때 제거하였다. 각 시료당 100mg을 달아서 1.5ml tube내에서 pestle로 분쇄하였고 여기에 9.8M urea, 2%(w/v) NP-40, 2% ampholyte, pH 3~10, 100mM DTT가 들어 있는 lysis 용액 1ml을 가하여 시료를 용해시켰다. 불용물질은 실온에서 10분간 10,000×g에서 고속원심분리하여 제거하였다.

### 이차원 전기영동 분석

최대 약 0.4mg의 단백질을 일차원 isoelectric focusing(IEF) gel, pH 3~10에서 전개하기 위해 4°C에서 250V로 2시간, 500V로 2시간 그리고 800V로 18시간 작동하고, 이차원으로 20×20cm sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide(SDS-PAGE) gel에서 6mA, 18시간 동안 전개하여 2-D gel상에 분리된 단백질을 얻었다. 분리가 완료된 gel은 단백질을 가시화하기 위해 silver staining하였다. 단백질의 분자량과 pI를 측정하기 위해 표준 2-D SDS-PAGE용 단백질을(BioRad, USA) 사용하였다. 표준단백질은 hen egg white conalbumin type I(76 kDa, 6.0~6.6 pI), bovine serum albumin(66.2 kDa, 5.0~5.18 pI), bovine muscle actin(43 kDa, 5.47~5.53 pI), rabbit muscle glyceraldehyde 3-phos-

phate dehydrogenase(36 kDa, 8.3~8.5 pI), bovine carbonic anhydrase(31 kDa, 5.9~6.0), soybean trypsin inhibitor(21.5 kDa, 4.5 pI)과 equine myoglobin(17.5 kDa, 7.0 pI)이었다.

#### Ammonium sulfate를 이용한 단백질의 분획

단백질 분획을 위해 4g의 등심조직을 동결상태에서 무게를 달고 얼음에 잠긴 상태로 1% Triton X-100이 들어 있는 phosphate buffered saline(PBS)에서 Dounce homogenizer로 20회 반복하여 분쇄하였다. 분쇄되지 않은 조직이나 지방 덩어리는 4°C, 12000×g로 원심분리하여 제거하였다. 맑은 상등액에 ammonium sulfate 농도가 30%와 50% 되도록 하여 단백질을 분획하였다. 침전된 단백질은 4°C, 10000×g, 10분간 원심분리하여 모은 후 PBS에서 dialysis하였다. 필요에 따라 단백질을 농축해야 할 때 10% TCA로 단백질을 침전시켰다.

#### Gel 염색

Silver staining은 일반적인 방법을 변형시켜 사용하였다(18,19). Gel은 fixing 용액(50% methanol, 10% acetic acid)에서 20분간 prefixed되고 10% glutaraldehyde에서 30분간 fixed된다. 많은 양의 물로 닦은 후 5mg/L dithiothreitol(DTT)로 15분간 환원시켰다. 곧 이어 0.1% silver nitrate로 15분간 반응시켰다. Silver nitrate를 충분히 제거한 뒤 0.019% formaldehyde/3% sodium carbonate 용액에서 발색반응을 진행시키고 적당한 염색이 되면 2.5M citric acid 용액을 5ml 가하여 반응을 정지시켰다.

Coomassie Blue staining은 gel을 10분간 0.25% Coomassie Blue R-250이 50% methanol에 녹아 있는 용액에서 실시하여 단백질을 가시화하였다. 단백질을 먼저 PVDF membrane에 electrotransfer했을 때는 membrane을 염색하고 50% methanol로 탈색하여 membrane상의 단백질의 위치를 결정하였다.

#### N-terminal microsequencing

SDS-PAGE에서 분리된 단백질을 PVDF membrane에 옮기기 위해 electroblotting방법으로 48mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol(v/v) 용액에서 80V, 2시간 동안 실시하여 gel에 있는 단백질을 membrane에 옮겼다. Coomassie Blue R-250으로 염색하여 위치를 확인하고 단백질 spot을 잘라서 자동 아미노산 서열 분석기에서(G1005A, Hewlett-Packard, USA) 아미노산 서열을 결정하였다.

Passive adsorption 방법을 위해 gel을 colloidal gold 용액(BioRad, USA)에서 10분간 염색하고 원하는 단백질 spot을 잘라서 냉동건조시켰다. 건조된 gel에 2% SDS, 200mM Tris 30μl를 넣어서 gel을 적시고 15분 후에 200μl 물을 가한 후 gel과 같은 크기의 PVDF membrane을 넣고 methanol을 10% 되게 가했다. 2일 후 membrane을 꺼내어 microsequencing 하였다.

#### Database 검색

단백질의 pI값과 분자량을 가지고 일치되는 단백질을 찾기 위해 ExPASy molecular biology server에 있는 TagIdent program으로 Swiss-Prot database를 검색하였다. 검색을 위해 pI와 분자량의 차를 각각 ±0.25와 ±20%로 열고 검색하였다.

N-terminal 아미노산 서열을 가지고 database를 검색하기 위해 NIH의 BlastP program을 이용하여 Swiss-Prot을 검색했다. 정확한 pI와 분자량을 얻기 위해 2-D 화상분석용 software(PDQUEST, BioRad, USA)를 이용하여 각 2-D gel상의 단백질들을 표준 단백질들과 비교하였다.

## 결과 및 고찰

#### 정확한 분자량 및 pI값 측정

이미 선발한 marbling 관여 단백질들(17)의 정확한 분자량과 pI값을 알기 위해, 2-D gel 분석 software인 PDQuest를 이용하여 2-D SDS-PAGE 표준단백질을 기준으로 보정된 값을 구하였다. 그 결과 각 단백질들의 pI값과 분자량은 이미 알고 있던 값에 비해 다소 차이를 보였기 때문에(Fig. 1) 이 값들을 가지고 다시 database 검색을 하게 되었다. 분자량의 경우 오차의 한계가 500 Da 범위로 좁혀졌으며, pI는 소수점 둘째 자리까지의 값을 얻을 수 있었다. 이러한 정밀측정방법을 이용하여 거세우와 비거세우 시료간의 차이를 조사한 결과 2종의 단백질이 거세우에는 현저히 발현되지만 비거세우에는 발현이 되지 않음을 알게 되었다(Fig. 2. A와 C, Spot #6과 #7). 또한 거세우에서는 약하게 나타났지만 비거세우에서 현저히 나타나는 단백질(Fig. 2. Spot #8)도 검색에 추가하여 조사하였다(Table 1).

#### Swiss-Prot database 검색

ExPASy molecular biology server에서 proteomics 관련 program 중 TagIdent program을 이용하였다. Table 1에 요약한 단백질들의 2-D gel상의 pI값과 분자량

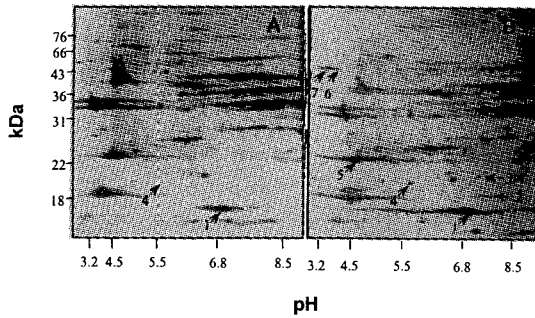


Fig. 1. Comparison of the two-dimensional gel profiles of the total proteins in 6-month(A) and 24-month loins.

The numbers indicate the Spot ID in Table 1. The molecular weights and the isoelectric points of the proteins were precisely measured by the computer-aided comparison of the locations of the spots with those of standard proteins.

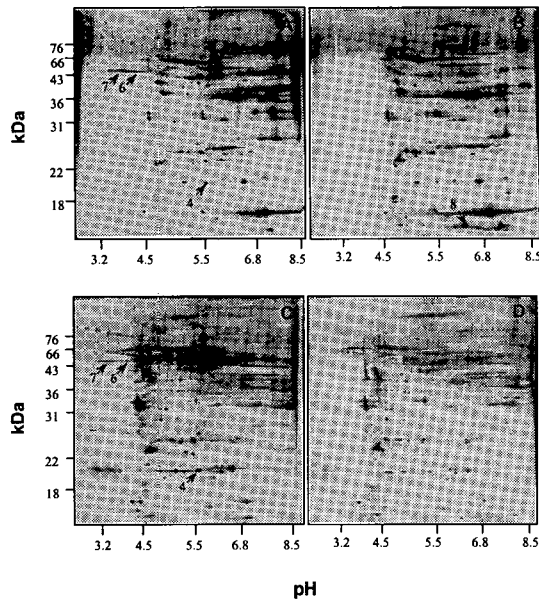


Fig. 2. Proteins exclusively expressed in the 24-months non-castrated(A and C) bull cow were localized on the two-dimensional gel by comparing with the 24-months castrated bull cow proteins(B and D).

The total soluble fraction of the loin proteins in 1% Triton X-100/PBS was fractionated with 50% ammonium sulfate and the precipitated proteins were collected. The total proteins(A and B) and the fractionated proteins(C and D) were separated on two-dimensional gels, respectively.

을 입력하고 오차한계  $pI \pm 0.25$ , 분자량  $\pm 20\%$ 의 범위에서 현재까지 알려진 단백질 중 Table 1의 단백질을 database에서 추출하고 그들 중에서 발현 동물, 발현 조직을 고려

하고 가장 가까운 pI값과 분자량을 갖는 단백질을 선발하여 Table 1에 요약하였다.

Spot #1은 가장 유사성을 보이는 단백질이 myoglobin이었고 이 결과는 이미 Hwang과 Lim(17)이 단백질 microsequencing을 통해 확인하였다. 주목해야 할 것은 측정 pI값과 분자량이 각각 7.0과 17000 Da이었는데 정확한 값은 6.97과 16946.40 Da으로 pI값과 분자량이 일치하면 확률적으로도 동일한 단백질일 가능성이 높음을 알 수 있다. Database에서 분자량은 mass spectrometer로 측정된 값이기 때문에 소수점 이하 둘째 자리까지 분자량을 정확히 확인할 수 있다. 따라서 단백질의 분자량 측정을 mass spectrometer로 하고 pI값을 immobilized pH gradient(IPG, Pharmacia, USA) gel(IPG gel)을 이용하여 측정하면 훨씬 더 정확히 동일 단백질을 찾을 수 있게 된다(20,21).

Spot #2, 4, 5는 N-termini가 block되어 있어서 Edman 분해방법으로 아미노산서열을 밝힐 수 없었다. Internal sequencing 등으로 아미노산 서열을 밝히기까지는 결론적으로 말할 수 없지만 Spot #2는 metalloproteinase inhibitor 또는 phosphatidyl ethanolamine binding protein(PEBP)과 가장 근접한 값을 갖는데 이들 단백질은 각각 근육조직에서 단백질구조 재조합을 조절하거나 지방의 이동을 조절하는 단백질들이다. Spot #4는 pI값과 분자량이 각각 최대 0.4, 1,000 Da 정도의 차이를 보이지만 유사성을 보이는 단백질들은 철분 이동에 관여하는 ferritin, 지방의 산화 등에서 형성되는 과산화물을 제거해 주는 역할을 하는 glutathione peroxidase와 유사성을 보이므로 이것 역시 지방대사나 근육의 색도 증진 등에 필요한 단백질들로서 육질증진에 모두 필요한 요소들이다. Spot #5는 proteinase E, protein kinase C inhibitor와 가장 큰 유사성을 갖는 것으로 나타났다. 이 단백질들은 근육조직의 단백질 재배열이나 근육세포의 세포분열을 조절하는데 관여할 수 있으므로 근육조직 형성에 좋은 역할을 할 수 있다. Spot #3는 분자량과 pI값으로부터 얻은 단백질이 microsequencing 결과 다시 한 번 검정된 경우인데, GMP kinase(22)는 GMP가 생성되게 하고 이 GMP는 ATP와 결합하여 GDP와 ADP를 이룬다. 이 purine계 핵산은 대사과정을 거쳐 IMP를 만들게 됨으로써 고기조직의 중요 향미 성분을 형성하게 된다(5). 위 과정은 Spot #6의 ATP synthase와 연결되면 더욱 효과적으로 IMP를 근육내에 축적할 것으로 추측할 수 있다. 현 단계로서는 순수한 추측이지만 Spot #1, #3, #8의 pI와 분자량을 가지고 유사성을 예측한 단백질들이 microsequencing에 의해 확인되었기 때문에 다른 단백질들도 동일한 단백질일 가능성이 있다. Spot #1, myoglobin은 근육조직에 철분을 함유케

**Table 1. Swiss-Prot database searching with the proteins whose expressions are correlated with the optimum marbling.**

Spot ID	pI <sup>1)</sup>	kDa <sup>1)</sup>	Identification <sup>2)</sup> (pI, MW) <sup>3)</sup>	Amino Acid Sequence pI <sup>4)</sup> , MW <sup>4)</sup>
1	7.0	17.0	myoglobin	QLVLNA pI=6.97 MW=16946.40 Da
2	7.1	21.5	phosphatidyl ethanolamine binding protein (7.39, 20854.55) metalloproteinase inhibitor 2 precursor (7.01, 21717.78)	Blocked N-terminus
3	6.8	21.5	GMP Kinase	SGPRPPVVLSSG pI=6.83, MW=21778.68
4	5.6	22.0	ferritin heavy chain (5.53, 20920.36) glutathione peroxidase(6.0, 23257.54)	Blocked N-terminus
5	4.55	27.6	protein kinase C inhibitor(4.8, 28007.28) proteinase E (4.86, 26060.29)	Blocked N-terminus
6	4.4	48.6	chlorine channel protein(4.47, 48958.61) ATP synthase (4.79, 47870.38)	not enough for sequencing
7	4.1	49.5	no match	not enough for sequencing
8	6.5	16.0	Hemoglobin beta chain	MLTAEKAAVT pI=6.51, MW=15859.23

<sup>1)</sup>The measured values on two-dimensional gel.

<sup>2)</sup>Proteins from the database with similar pIs and molecular weight to the selected proteins

<sup>3)</sup>The pI and molecular weight from the database, the N-terminus was blocked or the sequence not yet identified.

<sup>4)</sup>The values from the database, the N-terminus was identified.

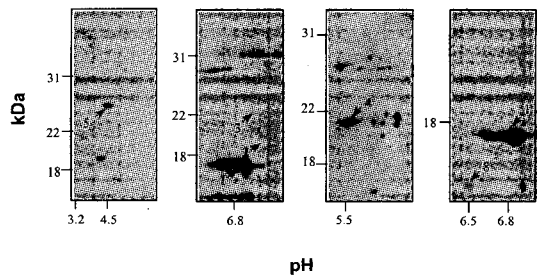
하는데 이 철분의 산화 정도에 따라 고기의 색깔이 변화한다. 2-D gel 분석에 의하면 myoglobin은 생후 1년까지 계속 근육내 축적이 증가하다가 일정 수준을 유지함으로써 육질개선의 좋은 marker로는 적합하지 않다.

Spot #7과 같이 해당하는 단백질이 database에 들어 있지 않으면 더 이상의 분석이 불가능해지는 수도 있다. 이 경우는 N-terminal sequencing을 성공적으로 할 수 있을 지라도 단백질의 성질을 규명하는데 어려움이 따른다. pI 4.1은 높은 산성의 단백질임을 의미한다. 대부분의 단백질은 중성근처의 pI값을 갖는데 SWISS-PROT의 database에 들어 있는 대부분의 단백질들이 역시 중성근처의 pI값을 갖고 있다. Spot #7과 같이 발현되는 양은 작고 강한 산성을 띠는 단백질은 mass spectrometer에 의한 정확한 분자량 측정과 N-terminal과 C-terminal로부터의 아미노산서열 결정을 통해 해당 유전자를 cloning할 수 있게 된다.

**Edman 분해방법에 의한 N-terminal microsequencing**

Edman 분해방법으로 단백질 microsequencing을 위해 필요한 단백질 양은 PVDF membrane 상의 단백질을 Coomassie staining 했을 때 선명하게 보일 수 있는 양이면 된다. 즉, 약 100ng에서 1µg 정도의 단백질이 필요하다. Two-dimensional gel에서 선발된 단백질들의 N-terminal sequencing을 하기 위해 fractionation 방

법으로 단백질을 농축시키고 2-D gel에서 순수 분리한 후 원하는 단백질이 포함된 gel의 부위를 잘라서 그 안에 든 단백질들을 PVDF membrane으로 electrotransfer 하였다(23). 원하는 단백질의 위치를 알기 위해 Coomassie Blue R-250으로 단백질을 염색하고 해당 단백질 spot을 칼로 오려서 microsequencing을 진행하였다 (Fig. 3). 이 경우 60~70%의 단백질은 이미 N-terminal block이 되어 있기 때문에 성공적으로 아미노산 서열을 얻을 확률은 매우 낮다(24)(Table 1). 해결 방법으로 colloidal gold staining과 passive adsorption에 의한 PVDF membrane에 단백질을 이전하는 방법으로 acetic acid에 의한 N-terminal acetylation을 억제하고자 하는 시도가 이루어지고 있으나 많은 경우 단백질의 N-



**Fig. 3. The protein spots were selected from the comparison experiments and transferred to PVDF membrane for N-terminal microsequencing. The arrowed spots were dissected and subjected to Edman degradation sequencing.**

terminus가 이미 block되어 있는 상태이다. 따라서 본 연구자는 pepsin으로 단백질을 부분적으로 분해하여 절편을 얻고 각 절편의 N-terminal sequencing을 시도하고 있다(25). 그러나 대부분의 경우 peptic digestion을 통해 N-terminal sequencing을 할 수 있을 만큼의 단백질을 확보하기가 힘들고 비용도 많이 들기 때문에 소량의 단백질을 가지고 정확한 분자량을 얻고 IPG gel (20,21)을 이용해 정확한 pI값을 얻는 것이 가장 효율적으로 단백질의 성질을 규명하는 방법이다.

### 육질 개선에 분석결과 이용

Table 1의 결과와 Fig. 1과 Fig. 2에 나타난 단백질들의 발현 양상을 종합해 볼 때 이 단백질들 대부분은 육질성숙에 관여하는 것으로 추측된다. 근육내 지방축적에 관여할 수 있는 Spot #2, PEBP,와 Spot #4, glutathione peroxidase, 단백질 골격의 변화나 근육세포의 성장(26) 등에 관련있는 Spot #2, metalloproteinase inhibitor와 # 5, proteinase, 그리고 풍미에 영향을 줄 수 있는 Spot #3, GMP kinase와 #6, ATP synthase들은 좋은 대상 단백질이 된다. 맛이라는 것은 상당히 주관적이기는 하나 서론에서 언급된 근내지방축적이나 고기의 연도, 색깔, 수분 유지도 등은 일반적으로 고기의 등급을 좌우하는 중요 요소임이 알려져 있다. 따라서 앞으로는 marbling score와 이 단백질 발현정도, 그리고 수분유지도와 이들 단백질의 발현정도와 같이 객관적 지표를 가지고 육질과 이 단백질들의 발현간의 상관관계를 조사하고 가장 우수한 상관관계를 보이는 단백질을 선발하면 가축의 사양조건 개선이나 고품질 육우 육종과 같은 경우 소를 도축하지 않고도 이 단백질의 발현정도만을 생화학적으로 간단하게 측정함으로써 좋은 성과를 올릴 수 있게 된다. 그리고, 단백질의 유전자를 얻게 되면 유전자 구조에 관한 연구를 통해 이 단백질들의 발현이 어떻게 조절되는지를 추측할 수 있기 때문에 효율적인 사양조건 개선을 이룰 수 있다.

### 요 약

생후 24개월까지의 한우에서 채취한 등심조직 10점으로부터 단백질을 추출한 후 이차원 전기영동법으로 이들 단백질을 분리하였다. 근내지방축적이 활발한 12에서 24개월령의 시료 단백질과 근내지방축적이 미약한 0에서 6개월령의 단백질들을 이차원 전기영동 gel에 전개하여 상호 비교함으로써 지방축적이 활발한 시기에 특이적으로 발현되는 단백질들을 선발하여 성질을 규명하고자 하였다. 참고로 지방축적능력이 떨어지

는 비거세우와의 비교를 병행하여 근내지방축적이 활발한 시기에 발현이 되는 8종의 단백질을 선발하였다. 이차원 전기영동 gel에서 단백질을 분리하였기 때문에 각 단백질의 정확한 등전점과 분자량을 알 수 있었고 이들 정보를 이용하여 SWISS-PROT의 단백질 database를 ExPASy server를 통해 검색하여 동일 단백질일 가능성이 높은 여러 종류의 단백질 이름을 얻게 되었다. 이들 단백질을 ammonium sulfate로 분획하고 이차원 전기영동하여 순수 분리시킨 뒤 PVDF 막에 옮겨 주어서 아미노산의 microsequencing을 하였다. 성공적으로 얻은 세 개의 아미노산 서열은 모두 예상한 단백질이 선발한 단백질과 동일 단백질임을 확인시켜 주었고 아직 아미노산 서열을 모르는 단백질들도 동일 단백질일 가능성이 높음을 시사했다. 검색결과 알려진 단백질들은 고기의 색깔, 지방운반, 향미성분 축적에 연관될 수 있는 기능을 가진 단백질들이 알려졌다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술처의 (국책) 생명공학기술연구과제로 수행된 내용의 일부로써 이에 감사드립니다.

### 문 헌

1. Seideman, S. C. and Crouse, J. D. : The effect of sex condition, genotype and diet on bovine muscle fiber characteristics. *Meat Sci.*, **17**, 55-72(1986)
2. Ashmore, C. R., Tompkins, G. and Doerr, L. : Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. *J. Anim. Sci.*, **34**, 37-41(1972)
3. Hilton, G. G., Tatum, J. D., Williams, S. E., Belk, K. E., Williams, F. L., Wise, J. W. and Smith, G. C. : An evaluation of current and alternative systems for quality grading carcasses of mature slaughter cows. *J. Anim. Sci.*, **76**, 2094-2103(1998)
4. Wilson, N. R., Dyett, E. J., Hughies, R. B. and Jonies, C. R. V. : *Meat and meat products: factors affecting quality control*. Applied Science Publisher, New Jersey, pp.55-80(1981)
5. Judge, M. D., Aberle, E. D., Forrest, J. C., Hedrick, H. B. and Merkel, R. A. : *Principles of meat science*. 2nd ed., Kendall/Hunt Publishing Company, Iowa, pp.271-333(1989)
6. Morgan Jones, S. D. : *Quality and grading of carcasses of meat animals*. CRC Press, New York, pp.131-155 (1995)
7. Blumer, D. N. : Relationship of marbling to the palatability of beef. *J. Anim. Sci.*, **22**, 771-778(1963)
8. Gregory, K. E. and Ford, J. J. : Effects of late castration, zeranol and breed group on growth, feed efficiency and carcass characteristics of late maturing bovine males. *J. Anim. Sci.*, **56**, 771-780(1988)

9. 강대진 : 가축영양학. 선진문화사, 서울, p.203(1991)
10. Morgan, J. B., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Crouse, J. D. and Savell, J. W. : Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.*, **71**, 408-414(1993)
11. Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A. C., Miller, M. J. and Miller, C. R. : Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **173**, 424-435(1998)
12. Pennington, S. R., Wilkins, M. R., Hochstrasser, D. F. and Dunn, M. J. : Proteome analysis: from protein characterization to biological function. *Trends Cell Biol.*, **7**, 168-173(1997)
13. Persidis, A. : Proteomics. *Nature Biotechnol.*, **16**, 393-394(1998)
14. James, P. : Breakthroughs and views of genomes and proteomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **231**, 1-6(1997)
15. Bonetto, V., Bergman, A.-C., Jomvall, H. and Silard, R. : C-terminal sequence analysis of peptides and proteins using carboxypeptidases and mass spectrometry after derivatization of Lys and Cys residues. *Anal. Chem.*, **69**, 1315-1319(1997)
16. Yates, J. R., Eng, J. K. and McCormack, A. L. : Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases. *Anal. Chem.*, **67**, 3202-3210(1995)
17. Hwang, S. I. and Lim, J. K. : Isolation and identification of proteins increasingly expressed in beef loin on maturation. *J. Korean Soc. Agri. Chem. Biotechnol.*, **42**, 39(1999)
18. Merrill, C. R., Goldman, D. and van Keuren, M. L. : Gel protein stain: silver stain. *Methods Enzymol.*, **104**, 441-449(1984)
19. Wilson, C. M. : Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol.*, **91**, 236-247(1983)
20. Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.-C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K. L. and Hochstrasser, D. F. : From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*, **14**, 61-65(1996)
21. Packer, N. H., Wilkins, M. R., Golaz, O., Lawson, M. A., Gooley, A. A., Hochstrasser, D. F., Redmond, J. W. and Williams, K. L. : Characterization of human plasma glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Biotechnology*, **14**, 66-70(1996)
22. Gaidarov, I. O., Suslov, O. N., Ovchinnikova, T. V. and Abdulaev, N. G. : Guanylate kinase from bovine retina: isolation, primary structure and expression in *E. coli*. *Bioorg. Khim.*, **20**, 367(1994)
23. Tobin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354(1979)
24. Thiede, B., Otto, A., Zimny-Arndt, U., Muller, E. C. and Jungblut, P. : Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*, **17**, 588-599(1996)
25. Yuan, C. S., Wnuk, S. F., Robins, M. J. and Borchardt, R. T. : A novel mechanism-based inhibitor(6'-bromo-5', 6'-didehydro-6'-deoxy-6'-fluorohomoadenosine) that covalently modifies human placental S-adenosyl-homocysteine hydrolase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18191-18197(1998)
26. Kim, D. G., Sung, S. K. and Jung, K. K. : The relationship between histochemical properties and meat quality of *M. Longissimus dorsi* in Hanwoo steer. *Kor. J. Anim. Sci.*, **41**, 89-100(1999)

(1999년 3월 13일 접수)