

## 제주마에서 Esterase(Es) locus의 silent allele 검출

조길재\* · 조병욱<sup>1</sup> · 강한석<sup>1</sup> · 김용균<sup>2</sup>

한국마사회 유전자검사실  
<sup>1</sup>밀양대학교 말과학연구소  
<sup>2</sup>밀양대학교 생물공학과

## Detection of Silent Allele at Esterase(Es) Locus in Jeju Native Horse

Gil-Jae Cho\*, Byung-Wook Cho<sup>1</sup>, Han-Seok Kang<sup>1</sup> and Yong-Kyun Kim<sup>2</sup>

Laboratory of Equine Genetics, Korea Racing Association, Gwachon 427-070, Korea

<sup>1</sup>Equine Research Center, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

### Abstract

The purpose of this present study was to investigate the polymorphism of esterase locus for individual identification and parentage verification in Jeju native horse (JNH). Seventy three random JNH samples were studied by polyacrylamide gel isoelectric focusing(IEF) at pH 3.5~6.0. We detected international recognized alleles, F, G, H, I, M, and an silent allele I<sup>0</sup>. Gene frequencies of allele I showed 0.479 the highest, while allele H and M(I<sup>0</sup>) with relatively low frequencies were 0.027 and 0.014, respectively.

**Key words** – esterase polymorphism, IEF, Jeju native horse, gene frequency

### 서 론

Esterase(Es)는 ester의 가수분해를 촉매하여 그 구성분인 산과 알코올을 분해하는 가수분해효소의 총칭으로서 동·식물의 조직중에 널리 분포되어 있다. Es는 non-specific carboxylesterase와 cholinesterase로 크게 나눌 수 있으며 Es에 대한 다형연구는 사람과 동물에서 많이 보고되어 있다[8]. 말의 혈청단백질인 Es는 1966년 Gahne [5]에 의해서 처음으로 다형 시스템으로 보고되었는데 Gahne는 Es를 FF, FI, FS, II, IS 및 SS의 표현형으로 분류하였다. 또

한 이들이 Es<sup>F</sup>, Es<sup>I</sup>, 그리고 Es<sup>S</sup>의 공우성대립유전자와 Es<sup>0</sup>의 silent 대립유전자에 의하여 지배됨이 보고된 이래 많은 학자들에 의해 연구되어 현재는 유전적 다형을 검출하기에 다소 어려운 silent 대립유전자를 포함하여 10개(F, G, H, M, N, I, L, O, R, S)의 대립유전자가 알려져 있으며 각국의 많은 실험실에서 말의 혈액형 검사에 이용하고 있다.

Es다형 검출은 horizontal polyacrylamide gel electrophoresis (HPAGE) [5], acid starch gel electrophoresis (SEG) [11], isoelectric focusing (IEF) [13]에 의해서 분석할 수 있다. HPAGE로 Es다형 분석시는 F (F 혹은 G), H, I, M, S의 대립유전자를 관찰할 수 있으며 IEF로 분석하면 F, G, H, I (I 혹은 S), L, M의 대립유전자를 찾아낼 수 있다. 또, acid SEG로 분석하면 F, G, H, I, L, M의 대립유전자를

\*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 82-2-509-1933, Fax : 82-2-509-1909

E-mail : chogj@mail.kra.co.kr

관찰할 수 있는 것으로 알려져 있다.

말의 친자확인에 이용하고 있는 Es좌위는 디라브렛종에서는 다형 변이가 다양하지 않지만 재래종 말에서는 상당히 복잡한 다형이 관찰됨으로 향후 제주말의 혈통등록을 위한 혈액형 검사시 직면할 수 있는 silent 대립유전자를 검출하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 공시재료

제주도에서 사육중인 제주마(천연기념물 347호) 73두로부터 채혈한 혈액을 원심분리한 후 혈청 40  $\mu$ l와 dithiothreitol (100 mg/2.56 ml distilled water) 20  $\mu$ l, iodoacetamide (4.6 mg/1 ml distilled water) 40  $\mu$ l을 혼합하여 전처리한 후 전기영동에 이용하였다.

#### Esterase의 유전적 다형분석

혈청단백질인 esterase의 유전적 다형분석은 Yokohama 와 Mogi [13]의 등전점 방법을 응용하였다. 겔의 제작은 ACES 117.3 mg, stock sol. (29% acrylamide 57.1 ml, 0.9% bis acrylamide 97.3 ml, saccharose 35 g, glycerol 5 ml에 distilled water를 가하여 235 ml 제조) 13.0 ml, pharmalyte (pH 4-6.5) 0.4 ml, servalyte (pH 4-5) 0.3 ml을 혼합하여 녹인 후 ammonium persulfate 0.35 ml을 혼합하여 겔을 제작하였다.

#### 전기영동

시료와 영동 buffer anode (0.04 M DL-glutamic acid)와 cathode (0.2 M L-histidine)를 filter paper (TOYO No. 526)에 묻혀서 겔상에 loading한 후 2.5W에서 15분간 영동하여 시료의 filter paper를 제거한 후 4시간동안 영동하였다.

#### 염색 및 판독

염색액은 stock sol (0.19 M trisaminomethane 98.6 g, 0.05 M citric acid monohydrate 60 g을 distilled water에 녹임) 350 ml,  $\alpha$ -naphthyl acetate 8 ml, fast blue B salt 30 mg을 혼합하여 약 2분간 염색시켜 distilled water로 세척한 다음 건조시킨 후 결과를 판독하였다.

### 결 과

#### Esterase의 유전적 다형분석

등전점 전기영동으로 제주마 73두에서 혈청단백질인 esterase의 유전적 다형을 분석한 결과는 Table 1과 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 제주마의 Es유전적 다형은 F, G, H, I, M, I<sup>0</sup>의 6개의 대립유전자로 분포되어 있으며, 대립유전자 I I가 22두(30.1%), FI 16두(21.9%), FF 9두(12.3%), GI 9두(12.4%) 순으로 높은 분포를 보였다. 또한 특이적인 silent 대립유전자로 추정되는 I<sup>0</sup>I<sup>0</sup>가 1두(1.4%)에서 관찰되었다.

#### Esterase 다형의 유전자 빈도

Es다형의 유전자 빈도는 Table 2에서 보는 바와 같이

Table 1. Frequencies of esterase polymorphism in 73 Jeju native horse

Locus	Phenotype	No.(%) of JNH	Phenotype	No.(%) of JNH
Es	FF	9 (12.3)	FI	16 (21.9)
	FG	5 ( 6.8)	FH	1 ( 1.4)
	GI	9 (12.3)	GG	7 ( 9.6)
	MM	1 ( 1.4)	HI	1 ( 1.4)
	HH	1 ( 1.4)	II	22 (30.1)
	I <sup>0</sup> I <sup>0</sup>	1 ( 1.4)		

Table 2. Gene frequencies of esterase polymorphism in 73 Jeju native horse

Locus	Allele	Gene frequency
Es	F	0.274
	G	0.192
	I	0.479
	H	0.027
	M	0.014
	I <sup>0</sup>	0.014

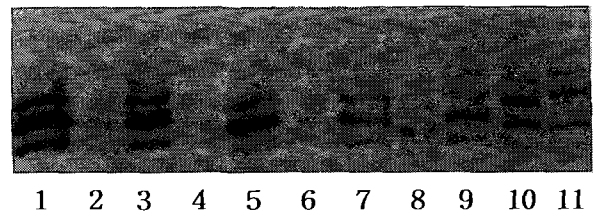


Fig. 1. Isoelectric focusing (IEF) patterns of esterase polymorphism in JNH 1, 3, 5, 7, 8, 9:phenotype I. 2, 4, 6:phenotype I<sup>0</sup>. 10:phenotype GI. 11:phenotype FI.

Es의 유전자 빈도는 대립유전자 I가 47.9%로 가장 높은 빈도를 보였으며 그 다음은 F (27.4%), G (19.2%), H (2.7%), M과 I<sup>0</sup>가 각각 1.4% 순으로 분포하였다.

## 고 찰

Esterase (Es)의 유전적 다형특성에 관해서는 많은 연구 결과가 알려져 있다. Kaminski [7]는 starch gel 전기영동법으로 alkaline 및 acid pH에서 Es다형을 연구한 결과 alkaline pH에서는 F, FI, FS 대립유전자를 관찰한 반면 acid pH에서는 G, GI, FI가 관찰되어 acid pH에서는 S 대립유전자를 찾을 수 없다고 보고하였다. Sandberg [9]는 Es다형연구에서 sire, dam에서 FI 대립유전자가 관찰되었으나 offspring에서는 F<sub>m</sub>I가 검출되어 mutation을 보고하였고, pH 5.4와 pH 8.5의 SGE에서 sire, dam, offspring의 Es다형을 비교한 결과 pH 5.4와 pH 8.5에서 sire와 dam은 각각 G, GI인 반면 offspring은 pH 5.4에서 G, I<sub>m</sub>의 대립유전자가 관찰되었으나 pH 8.5에서는 G 대립유전자는 검출되었지만 I<sub>m</sub>에 부합되는 band를 관찰할 수 없어 silent 대립유전자로 보고한 바 있다[10].

Tomaszewska와 Didkowski [12]는 400두의 Poland Tarpan 말에서 Es를 조사한 결과 8두에서 Es<sup>0</sup> 대립유전자를 보고하였으며 Ceriotti 등 [2]은 IEF (pH 3.5~5.0)와 SEG (pH 8.5와 4.8)법으로 Italian 말의 Es를 조사한 결과 pH 8.5에서는 대립유전자 I, S가 검출되었으나 pH 4.8에서는 서로가 겹쳐서 판독할 수 없었으며 대립유전자 F, G, I는 IEF와 SEG 모두에서 관찰하였다. 또한 그들은 Es다형 검출시 acid pH SEG보다도 IEF법이 더 유용하고 IEF와 pH 8.5의 SEG법으로 동시에 검사하면 더욱더 정확한 성적을 얻을 수 있다고 보고하였다. Fisher와 Scott [4]는 IEF법에 의해서 Mongolian pony의 Es를 조사한 결과 전형적인 Es<sup>1</sup> 대립유전자는 세 개의 band를 가지고 있는데 대개 가운데 band가 진하게 염색되고 anode와 cathode 양쪽의 band는 약하게 반응되는 Es<sup>1</sup> 대립유전자 위치에 매우 약하게 보이는 band 한개를 확인하고 염색액의 농도를 강하게 하고 시간도 길게 하였으나 여전히 약한 band 한개만 나타남으로써 Gahne [5]가 소개한 silent 대립유전자로 추정하여 Es silent 대립유전자 I<sup>0</sup>로 명명하였다. Bowling과 Ryder [1]는 Przewalski horse를 대상으로 blood marker를 연구

한 결과 Es다형에서는 특히 대립유전자 P를 포함하여 H, I, O 등 4개의 대립유전자를 검출하였고 이들 중 Es<sup>P</sup> 대립유전자의 빈도는 59%라고 보고한 바 있으며 Cozzi 등 [3]은 Italy의 Sarcidano horse에서 Bowling과 Ryder [1]가 보고한 Es<sup>P</sup> 대립유전자와 비슷한 것으로 추정되는 Es<sup>G\*</sup> 대립유전자를 보고한 바 있다.

Es의 유전적 다형에 대한 유전자 빈도를 조사한 결과 Han 등 [6]은 I, F, G, S, O의 유전자 빈도가 각각 0.356, 0.348, 0.186, 0.085, 0.025으로 보고하였으나 본 실험에서는 S 및 O의 대립유전자가 관찰되지 않았으며 I, F, G의 유전자 빈도가 각각 0.479, 0.274, 0.192 순으로 높게 나타나 Han 등[6]의 결과와 유사하였다. 그러나 대립유전자 H, M, I<sup>0</sup>가 관찰되고 S와 O가 출현치 않은 것은 서로 다른 검사 시료에 기인된 것으로 사료된다.

제주마 73두에 대해서 IEF법으로 Es좌위를 조사한 결과 1두에서 Fisher와 Scott [4]가 밝힌 silent 대립유전자 I<sup>0</sup>가 검출되었다. 향후 제주마에서 Es 유전적 다형을 연구할 때는 silent 대립유전자 I<sup>0</sup>외에 다른 silent 대립유전자의 관찰 및 mutation으로 인한 대립유전자의 관찰에도 더욱더 세심한 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

제주마의 Es유전적 다형은 F, G, H, I, M, I<sup>0</sup>의 6개의 대립유전자가 분포되어 있으며, 대립유전자 II가 22두(30.1%), FI 16두(21.9%), FF 9두(12.3%), GI 9두(12.4%) 순으로 높은 분포를 보였다. 또한 특이적인 silent 대립유전자로 추정되는 I<sup>0</sup>I<sup>0</sup>가 1두(1.4%)에서 관찰되었다. Es의 유전자 빈도는 대립유전자 I가 47.9%로 가장 높은 빈도를 보였으며 그 다음은 F (27.4%), G (19.2%), H (2.7%), M과 I<sup>0</sup>가 각각 1.4% 순으로 분포하였다.

## 참 고 문 헌

1. Bowling, A. T and O. A. Ryder. 1987. Genetic studies of blood markers in Przewalski's horses. *J. Heredity* 78, 75-80.
2. Ceriotti, G., C. Cristofalo and T. Gliozzi. 1984. Analysis of esterase locus in Italian horse population (Cavallo

- Murgese) by isoelectric focusing and comparison with starch gel electrophoresis. *Pros. 19th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 38-39.
3. Cozzi, M. C., P. Valiati, L. Delbo, G. Falcone and M. Cancedda. 1998. Detection of an unrecognised variant at carboxylesterase (Es) locus in a feral horse population bred in Sardinia. *Pros. 26th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 18.
  4. Fisher, R. A and A. M. Scott. 1978. Isoelectric focusing of horse serum esterase isozymes and detection of new phenotypes. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* **9**, 207-213.
  5. Gahne, B. 1966. Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumin, prealbumins and plasma esterase of horse. *Genetics* **54**, 681-694.
  6. Han, S. K., H. D. Byun, D. R. Kim and S. K. Chio. 1998. Genetic analysis of the Cheju native horses. *Pros. 26th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 16-17.
  7. Kaminski, M. 1974. Esterase phenotypes in horses. *Pros. 14th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 23.
  8. McDermid, F. M., N. S. Agar and C. K. Chai. 1975. Electrophoretic variation of red cell enzyme systems in farm animal. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* **6**, 127-174.
  9. Sandberg K. 1976. An apparent case of mutation in the horse esterase (Es) system. *Pros. 15th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 18-19.
  10. Sandberg, K., L. Andersson and S. Bengtsson. 1986. Another case of mutation in the equine serum esterase (Es) system. *Pros. 20th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 80.
  11. Scott, A. M. 1972. Improved separation of polymorphic esterases in horses. *Pros 12th Eur. Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 551.
  12. Tomaszewska, K and S. Didkowski. 1980. The occurrence of zero esterase types in Tarpan horses in Poland. *Pros. 17th ISAG Conf. Anim. Blood Grps. Biochem. Polymorphism*. pp. 68.
  13. Yokohama, M and K. Mogi. 1985. Detection of the protease inhibitor (Pi) systems of the light breed horses by isoelectric focusing. *Jpn. J. Zootech Sci.* **56**, 883-888.

(Received April 28, 2003; Accepted July 30, 2003)