

PCR-RFLP를 이용한 한우 Leptin gene의 유전자형 변이와 경제형질과의 관련성 분석

임현진* · 오재돈* · 공홍식* · 전광주* · 이학교* · 이승수* · 윤두학** · 김종대** · 조병욱***
국립한경대학교 유전정보연구소*, 축산연구소**, 밀양대학교***

Association of Genetic Missense Mutation and Economic Traits of Leptin Gene using PCR-RFLP in Korea Cattle(Han-Woo)

H. Y. Lim*, J. D. Oh*, H. S. Kong*, G. J. Jeon*, H. K Lee*, S. S Lee*, D. H. Yoon**,
C. D. Kim** and B. W. Cho***

Genomic Informatics Center, Hankyong National University*, National Livestock Research Institute**,
Dept. of Animal Science, Miryang National University.***

ABSTRACT

The identification of the leptin gene in 1994 and it's adipocytes specific protein leptin has provided the first physiological links to the regulatory system controlling body weight and fat deposits. The meat tastes is mainly determined by quantify and quality of triglyceride stored in adipose tissue. This study was conducted to analyze genetic characteristics of Hanwoo leptin gene and also to investigate the association of DNA marker with some economic meat traits for Hanwoo.

The leptin hormone gene polymorphisms were identified by digestion with *Kpn2 I* and *Msp I*. Slaughter weight(SWT), slaughter percentage(SP), longissimus muscle area(LMA), beef marbling score(MS) and back fat thickness(BF) were compared among three genotypes by **PCR-RFLP** and showed significant differences among genotypes. PCR-RFLP(*Kpn2 I*) were detected significant for SP, MS and BF. The allele was associated with fatter carcasses and C allele with leaner carcasses.

(Key words : Hanwoo, Leptin gene, PCR-RFLP, Marbling score, Meat quality)

I 서 론

가축에 있어서 양적형질 유전자좌(QTL) 위치가 확인되고 이들 부위에 주요 경제형질에 영향을 미칠 것으로 예측되는 일부 후보 유전자가 보고되고 있다(Anderson 등, 1991 ; Rathfe. je 등, 1997 ; Rothchiild 등, 1999). 최근에는 분자 유전자학적 눈부신 진보로 인해 일부 가축에서의 경제형질에 영향을 미치는 주 유전자(major gene) 활용 가능성이 제시되면서 분자 육종을 통한 가축개량의 접근이 모색되기에 이르렀다. 한우에서의 이러한 분자 육종을 위한 접근 방법의 도입

은 보다 효율적인 개량 성과를 얻을 수 있는 가능성을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 한우는 일반적으로 만숙종으로서 다른 외국 품종과 차별적 육질 특성(근내지방 교잡종)을 보이는 육용종으로 알려져 있으며 국내의 경우 일본의 화우에서 차별화된 육질의 유전 특성을 근거로 한 브랜드 전략과 유사한 단일 품종 브랜드로서 육성해 나가고 있다. 따라서 최근의 고급육으로서의 개량 성과를 높이기 위해 분자 육종 측면에서 육질관련 형질에 관여된 유전특성 분석은 매우 중요하다. 육우에서는 매우 중요한 경제형질로서 성장율, 근내지방, 등심 단면적 및 등지방 두께

Corresponding author : Gwang-Joo Jeon, Genomic Informatics Center, Hankyong National University, 67 Sukjong-dong, Ansong-city, Kyonggi-do, 456-749, Korea. Tel : 82-031-670-5331 Fax : 82-031-675-5331, E-mail : gjjeon@hnu.hankyong.ac.kr

등을 둘 수가 있다. 특히 최근의 시장 구조는 육질 특성에 따른 등급간의 가격 차이가 커지고 소의 지방 축적과 체중에 관여하는 호르몬으로서 leptin 이 매우 중요한 역할을 하고 있다고 보고되고 있으며(Blache 등, 2000 ; Delavauel 등, 2000 ; Ehrhardt 등, 2000), leptin의 수준에 따라 사료 섭취량이 조절되며 체지방의 축적과 지방의 에너지로서 사용 정도가 다른 것으로 알려져 있다. leptin 호르몬의 이러한 생리적 특성은 지방대사와 관련된 가축의 경제형질(체중, 성장률, 근내지방, 등지방)에 연관된 후보 유전자로서의 가능성을 제시하고 있다. Jiang 등(1997)과 Kennes 등(2000)은 돼지의 주요 품종 집단별 leptin 유전자 지역에서의 SNP를 찾아내고 이를 일부 좌위와 경제형질(등지방 두께, 일당 증체량)간의 연관성을 보고하였다. 특히 소에서는 leptin 유전자의 exon 2 지역의 SNP 좌위가 도체 지방량에 매우 유의적으로 미치는 것으로 확인하였으며 이 지역은 missense mutation이 일어나는 곳으로 leptin 유전자 산물의 각각의 polymorphism에 따라 변경되어 leptin의 기능적 변화와 일부 알려진 발생되는 것으로 보고하고 있다(Buchanan 등, 2002). 한우 집단에서 지방대사와 관련된 강력한 후보유전자로 알려진 leptin 유전자내의 exon 2 부위의 PCR-RFLP (*Kpn2 I Msp I*) 발현 특성을 분석하고 이를 도체형질에 미치는 유전자형 효과를 규명하고자 본 연구를 수행하였다.

II 재료 및 방법

1. 공시축

본 연구에서 이용된 공시재료는 도체성적을

보유한 한우 31차, 32차 후보종모우 집단 228두 선발 후 혈액을 채취하여 Genomic DNA의 분리 및 정제는 Miller 등(1998)의 방법을 일부 변형하여 분리 정제하였으며, 분리된 DNA는 TE buffer(10 nM Tris-HCL pH 7.4 : 1 mM EDTA)에 용해하였다.

2. Genomic DNA 분리 유전자형 분석

채취한 혈액에서의 Genomic DNA 분리 및 정제는 Miller 등(1998)의 방법을 일부 변경하여 수행하였다. 분리 정제된 DNA는 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4 ; 1 mM EDTA)에 용해하여 분석에 사용하였다.

Bovine leptin gene의 염기서열(GenBank Accession No. U503615)를 근거로 하여 각각의 제한효소로 절단되는 site의 primer를 Table 1에 나타내었다.

PCR(Polymerase Chain Reaction; Saiki 등, 1998) 반응을 위하여 Template DNA 100 ng, Taq polymerase 2.5 unit, 2.5 mM dNTP 4 μ l, sense primer 10 pmole 1 μ l, antisense primer 10 pmole 1 μ l, 10x reaction buffer 5 μ l 및 탈이온수를 첨가하여 총 50 μ l의 mixture를 준비하여 94 $^{\circ}$ C 서 10분 동안 pre-denaturation 후 94 $^{\circ}$ C 1분 두 좌위에 대한 annealing 온도 61 $^{\circ}$ C (*Kpn2 I*) 55 $^{\circ}$ C (*Msp I*)에서 45초, 72 $^{\circ}$ C 분간 35회 반응시킨 후 72 $^{\circ}$ C 서 10분 동안 final-extension 하였다.

PCR 증폭여부 및 크기가 확인된 PCR-Products 10 μ l를 각각의 제한효소(*Kpn2 I*: MBI Fermentas, *Msp I*: Promega, ToYoBo)로 55 $^{\circ}$ C - 37 $^{\circ}$ C 서 증폭 산물을 완전히 절단 반응시켰다. 절단된 DNA 단편을 확인하기 위하여 5% pol-

Table 1. Primer Sequence and site of leptin gene with cattle

Fragment	Primer sequence	Location	size(bp)
OB amp 1	5'ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC3'	1108 ~ 201	94
	5'TGGTGCATCCTGGACCTTCC3'		
OB amp 2	5'AGCAGTCCGTCTCCTCCAAACAGAG3'	3004 ~ 395	392
	5'GGACTTTGGGAAGAGAGGCCTTCA3'		

주) Primer 위치는 NCBI database에 등록된 소 leptin gene(4kb)에 근거한 것임.
(Genebank acc. no U503615 : R.L. 1996)

acrylamide gel과 2 % agarose gel을 이용하여 전기영동 하여 각 개체의 유전자형을 결정 하였다.

3. 통계적 분석

한우 leptin gene에 대한 각 유전자형에 대한 경제형질과의 연관성을 분석하기 위하여 SAS@ 8.1 Package/PC(SAS, 1990)를 이용하여 최소자승법(least square means)으로 분석하였다. 분석에 이용한 모델식은 다음과 같다.

$$y_{ijk} = \mu + b_iSW_{ijk} + P_i + G_j + e_{ijk}$$

위 식에서

- y_{ijk} = 도체형질의 관측지
- μ = 각 경제형질의 전체평균
- p_i = 검정차수(1 : 31차, 2 : 32차)
- b_i = 회귀계수
- SW_i = 개체의 도체중
- G_j = j 번째 유전자형 효과($i=1$ (AA), 2(BB), 3(AB))
- e_{ijk} = 임의오차

III 결과 및 고찰

1. 한우 leptin gene의 PCR-RFLP

leptin gene에 대한 PCR-RFLP 분석을 위해 관련 유전자의 영역에 특정 염기서열을 포함하는 primer를 이용하여 PCR 수행 후 PCR-products에 제한효소 *Kpn2 I*, *Msp I*로 절단하여 전기영동 후 제한효소 인지부위의 존재여부에 따라 제한효소 좌위의 유전적 다형현상(RFLP : Bostein 등, 1980)의 발현 여부를 확인하였다.

exon 2에 있는 제한효소 다형성 좌위를 나타내기 위해 *Kpn2 I* 제한효소 처리를 한 결과, Fig. 1와 같이 C 대립유전자는 75 bp와 19 bp의 단편으로 절단되는 반면 T 대립유전자는 94 bp의 단편이 잘리지 않는 상태로 발현되는 것을 알 수가 있다. 따라서 호모상태의 C 대립유전자를 가진 개체는 75 bp와 19 bp 만을 가지는 band 양상을 나타내고 있으며 C와 T 대립유전자간의 이형 접합체를 가진 개체의 94 bp와 75

bp와 19 bp를 보이며 T 대립유전자는 호모상태로 가진 개체는 94 bp의 band 양상을 보였다.

또다른 제한효소로 절단한 유전자형에 대한 분석을 위해 *Msp I*으로 처리한 결과(Fig. 2). M 대립유전자 동형 접합체를 가진 개체의 경우 90 bp의 band 양상을 보이고 있으며 M과 m의 이형접합체를 가진 개체의 경우 90 bp와 50 bp 및 40 bp의 band 출현 양상을 보였다.

각각의 PCR-RFLP 결과 얻어진 leptin gene에 대한 유전자 빈도와 유전자형 빈도는 Table 2, 3과 같다. 제한효소 *Kpn2 I*으로 처리한 PCR-RFLP 유전자형에 있어서 각각의 빈도는 CC형은 0.05, CT형의 빈도는 0.39 그리고 TT형의 빈도는 0.56으로 관찰되었으며 *Msp I*으로 처리한 결과 MM형의 빈도는 0.2 Mm형

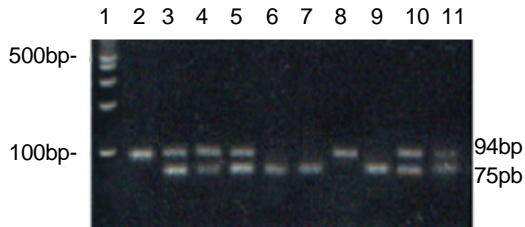


Fig. 1. A 5% polyacrylamide gel displaying a *Kpn2 I* restriction digest on an amplified portion of Hanwoo leptin exon 2. Lane 1, 100bp ladder, lanes 2, 8 are CC, lanes 3, 4, 5, 10, 11 are CT, lanes 6, 7, 9 are TT.



Fig. 2. A 2% agarose gel displaying a *Msp I* restriction digest on an amplified portion of Hanwoo leptin exon 2. Lane 1, 100bp ladder, lanes 14, 15 are MM, lanes 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13 are Mm, lanes 5, 6, 7, 16 are mm.

Table 2. Genotype and gene Frequencies of *Kpn2 I* polymorphism in leptin gene

Genotype	Genotype Frequency	Gene Frequency
CC	0.05(11)	C = 0.24
CT	0.39(89)	
TT	0.56(128)	T = 0.76
Total	1.00(228)	1.00

Table 3. Genotype and gene Frequencies of *Msp I* polymorphism in leptin gene

Genotype	Genotype Frequency	Gene Frequency
MM	0.20(45)	M = 0.35
Mm	0.31(70)	
mm	0.49(113)	m = 0.65
Total	1.00(228)	1.00

의 빈도는 0.31 그리고 mm형의 빈도는 0.49로 관찰 되었다.

한우 집단에서 PCR-RFLP에 의한 유전자 빈도를 살펴보면 *Kpn2 I*에 의해 처리한 결과 C 유전자 빈도(0.25)보다 T 유전자 빈도(0.75)가 높았으며 *Msp I*의 경우 M 유전자 빈도(0.35)보다 m 유전자 빈도(0.65)가 높게 나타났다.

대륙종 및 유럽계통에서 유래된 육우 4품종에 대한 PCR-RFLP(*Kpn2 I*) 유전자형 분석결과(Fiona 등, 2002)를 보면 앵거스 품종의 T 대립유전자 발현빈도가 0.58, 시멘탈에서 0.52 헤어포드 종에서 0.55 그리고 샤롤레에서는 0.34로 보고하고 있는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과와 비교 하였을 때 본 연구의 대상 집단인 한우에서는 매우 상이한 Leptin gene의 PCR-RFLP 유전자형의 발현 특성 나타내고 있다. 특히 보고된 4품종의 관련 유전자형 발현 특성과 경제형질 연관성에 대해 언급한 내용을 보면 이들의 육질특성, 특히 근내지방 교잡도 면에서 가장 우수한 품종(앵거스)이 T 대립유전자 빈도가 높은 경향을 보였다라는 점을 볼 때 한우의 경우 T 대립유전자 빈도가 이들 4품종 보다 월등히 높은 0.75를 보인 것으로 보아 관련 유전자 다형이 육질(근내지방도)에 매우 깊은 연관성이 있을 것으로 추정된다. 따라서 한우 집단 전반에 걸친 공시 축을 충분

히 확보하여 분석을 통한 유전특성 및 연관성 분석이 진행 될 필요가 있을 것으로 생각된다.

제한 효소 *Msp I*에 의해 수행된 유전자 다형 분석 결과 분석된 유전자 빈도는 Table 3과 같이 나타났다. Kim(1999)의 보고에 따르면 한우 집단내의 M 유전자 빈도는 0.36이며, m 유전자 빈도는 0.64로 본 연구의 결과와 매우 유사한 양상의 결과를 나타내었다.

2. 한우 leptin gene의 PCR-RFLP에 대한 경제형질 간의 유전적 효과 분석

본 연구에서 조사한 한우 집단의 도체중, 도체율, 근내지방도, 배장근 단면적, 및 등지방 두께 등 도체형질과 leptin gene의 PCR-RFLP를 이용하여 2종류의 제한효소 처리에 의해 발현되는 유전자형 변이와, 경제형질과의 관련성을 분석하여 Table 4, 5에 나타내었다.

*Kpn2 I*에 의한 PCR-RFLP에서 발현되는 각각의 유전자형이 도체관련 형질(도체율, 근내지방도 및 등지방 두께)에 유의한 영향($p < 0.05$)을 미치는 것으로 나타났다.

특히 본 연구에서 분석대상이 된 leptin의 경우 소의 지방대사와 밀접한 관계가 있는 호르몬으로서 작용한다는 점에서 이들 유전자형에 따른 관련형질의 연관성 발견여부는 매우 시사점이 크다고 하겠다. T 대립유전자를 가진개체(CT, CC)와 C 대립유전자로 동형 접합체를 가진 개체간의 관련형질의 초내가 있다는 것을 알 수가 있었다. 근내지방의 경우 T 대립유전자를 가진 개체들이 지방축적이 높은 것으로 나타났으며 등지방 두께의 경우에서도 유사한 경향을 나타냈다. 이는 유전자내 동일한 위치에서의 SNP를 PCR-RFLP(*Kpn2 I*)에 의해 분석하여 체내지방 축적 정도와 이들 유전자형간의 연관성을 분석한 결과(Fiona 등, 2002)와 본 연구의 결과를 비교 분석한 결과 T 대립유전자가 지방 축적에 높은 효과를 나타내는 것으로 보고하고 있다. 이는 동일한 유전자 지역에서 염기치환(cytosin → thymine)이 발생되게 되는데 이에 따라 leptin을 코딩하는 유전자내 missense mutation에 의한 leptin의 아미노산 조성이 Alanin에서 Valine으로 전환되는 결과를 가져

Table 4. Least square means of economic traits on the genotype(*Kpn2 I*) in Hanwoo.

Geno type	SWT ¹ (kg)	SP ² (%)	MS ³	LMA ⁴ (cm ²)	BF ⁵ (cm)
Mean	302.66 ± 4.80	56.65 ± 0.29	1.97 ± 0.67	75.18 ± 0.64	0.73 ± 0.05
CT	297.36 ± 8.61	56.00 ± 0.51 ^a	1.20 ± 0.40 ^a	75.30 ± 0.35	0.66 ± 0.09 ^a
CC	306.38 ± 3.16	57.11 ± 0.19 ^b	2.35 ± 0.15 ^b	75.32 ± 0.86	0.79 ± 0.03 ^b
TT	304.23 ± 2.65	56.85 ± 0.16 ^{ab}	2.36 ± 0.12 ^b	74.93 ± 0.72	0.73 ± 0.02 ^b

¹ SWT : slaught weight, ² SP : slaught percentage, ³ MS : marbling score, ⁴ LMA : longissimus muscle area, ⁵ BF : backfat thickness.

^{ab} Values with different superscripts are significantly different(P<0.05).

Table 5. Least square means of economic traits on the genotype(*Msp I*) in Hanwoo

Geno type	SWT ¹ (kg)	SP ² (%)	MS ³	LMA ⁴ (cm ²)	BF ⁵ (cm)
Mean	303.20 ± 3.58	56.92 ± 0.22	2.38 ± 0.17	74.97 ± 0.98	0.75 ± 0.04
MM	300.01 ± 4.42 ^a	56.92 ± 0.27	2.63 ± 0.21	74.86 ± 1.21	0.75 ± 0.04
Mm	300.25 ± 3.53 ^a	56.97 ± 0.21	2.21 ± 0.17	74.44 ± 0.97	0.72 ± 0.04
mm	309.35 ± 2.78 ^b	56.86 ± 0.17	2.30 ± 0.13	75.61 ± 0.77	0.78 ± 0.03

¹ SWT : slaught weight, ² SP : slaught percentage, ³ MS : marbling score, ⁴ LMA : longissimus muscle area, ⁵ BF : backfat thickness.

^{ab} Values with different superscripts are significantly different(P < 0.05).

오게 된다(Konfortov 등, 1999). T 대립유전자를 가진 개체들에서 높은 leptin mRNA 발현을 보고한(Fiona 등, 2002) 결과를 통해 leptin 유전자내 *Kpn2 I* 제한효소 유전자형 발견은 육질 및 관련 도축형질을 개량 할 수 있는 유전자 표지(genetic marker)로서의 가능성을 시사해주고 있다.

leptin 유전자의 또 다른 SNP를 나타내는 PCR-RFLP(*Msp I*)의 경우 이들 유전자 다형은 유전자형 MM과 Mm을 가지는 개체와 비교하여 볼 때 mm 유전자형을 보이는 개체에서 높은 도체중량을 보였다는(p < 0.05) 것을 제외하고는 본 연구에서는 유전자형과 경제형질과의 관련성이 나타나지 않았다. Kim(1999)은 동일 지역 내 PCR-RFLP에 따른 유전자형과 육질관련 형질(근내지방 축적 정도)의 관련성이 존재 한다고 보고하고 있으나 본 연구에서는 유의성이 인정되지 않아 Kim(1999)과 상이한 결과를 나타내었다.

Kim(1999)은 leptin gene의 염기다형 현상 확인을 주로 수행하면서 일부 공시축(한우 170두)에 대한 연관성 분석을 실시하였는데 본 연구의 결과와 비교하여 볼 때 유전자형의 발현 빈도에서는 유사한 양상을 보였으나 경제형질과의 관련성 분석에 있어서 상이한 결과를 나타냈다. 이는 분

석 대상 집단이 다르며 집단의 공시축 규모가 상이함으로서 발생되는데 기인된 결과라고 생각된다. 향후 충분한 개체기록(능력검정)을 보유한 집단에 대한 광범위한 연구가 보완될 필요가 있다고 생각된다. 또한 경제형질 연관 유전자 표지를 위해 제한효소 좌위 이외의 단염기 다형이 경제형질에 미치는 효과 분석 등의 추가 수행을 통해 보다 활용성이 높은 경제형질 개량 유전자 표지의 개발 연구가 필요하다고 생각된다.

IV 요 약

본 연구는 도체성적을 보유하고 있는 제 31차, 32차 한우 후보종모우 집단 228두를 선발하여 DNA를 분리 정제 후 exon 2에 위치한 bovine leptin gene 염기서열 가운데 특정 염기서열을 갖는 2 좌위의 primer를 합성하여 PCR 수행 후 PCR-product를 이용하여 2 종류의 제한효소 *Kpn 2 I*, *Msp I* 으로 반응시킨 후 두 가지 형태의 대립 유전자를 검정하여 경제형질과의 관련성을 분석하였다. PCR-RFLP를 통하여 얻어진 leptin gene의 유전자형 빈도는 *Kpn2 I*의 경우 C 유전자 빈도(0.25)보다 T 유전자 빈도(0.75)

가 높게 나타났으며 *Msp I*으로 처리한 경우 M 유전자 빈도(0.35)보다 m 유전자 빈도(0.65)가 높게 나타났다. 통계적 분석을 통하여 각 유전자형에 대한 경제형질과의 관련성을 분석한 결과 제한효소 *Kpn2 I*으로 처리한 경우 도체율에서 CT 유전자형과 CC 유전자형 사이에 유의적 차이가 나타났으며($p < 0.05$), *Msp I*의 경우 도체중 Mm 유전자형과 mm 유전자형 사이에 통계적 유의성이 나타났다($p < 0.05$).

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 2003년도 과제인 “한우 경제형질 QTL 탐색 및 응용기술개발”의 일환으로 수행되었다. 농촌진흥청 바이오그린21사업단 관계자들과 시료를 제공한 한우개량사업부 관계자들에게 깊은 감사를 드리는 바입니다.

VI 인용 문헌

- Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Hohansson, K., Andersson-Klund, I. M., Edfors-Lilja, M., Fredholm, L., Hansson, J., Hskansson and Lundstrom, K. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fattness in pigs. *Science* 263:1771-1774.
- Blache, D., Tellam, R. L., Chags, L. M., Blackberry, M. A., Vercoe, P. E. and Martin, G. B. 2000. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in shiip. *J. Endocrinol.* 164:625-637.
- Bostein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *A. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Delavaud, C., Bocquier, F., Chilliard, T., Keisler, D. H., Gertler, A. and Kann, G. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol.* 165:519-526.
- Dyer, C. J., Simons, J. M., Matteri, R. L. and Keisler, D. H. 1997. cDNA cloning and tissue specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor and NPY-Y2 receptor, *Domest. Amin. Endocrinol.* 14:295-303.
- Ehrhardt, R. A., Slepatis, R. M., Siegal-Willott, J., Van Amburgh, M. E., Bell, A. W. and Boisclair, Y. R. 2000. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *J Endocrinol.* 166:519-528.
- Fiona, C. Buchanan., Caroy, J. Fitzsimmons Andrew, G., Van Kessel Tracey, D., Thue Dianne C., Winkelman-Sim and Sheila, M, Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* 34:150-116.
- Fitzsimmons, C. J., Schmutz, S. M., Bergen, R. D. and Mckinnon, J. Apotential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mamm. Genome.* 9:432-434.
- Fitzsimmons, C. J. 1999. An investigation into leptin's role as a candidate gene for carcass fat levels in beef cattle. M.Sc. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK.
- Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L. and Spurlock, M. C. 1998. The Biology of leptin; A review. *J. Amin. Sci.* 76:1405-1420.
- Ji, S., Willis, G. M., Scott, R. R. and Spurlock, M. E. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Amin. Biotech.* 9:1-14.
- Kim, H. B. 1997. Polymorphism study of obese gene by PCR-RFLP for development of DNA marker related to meat quality in Hanwoo(*Bos taurus koreanae*).
- Miller, S. A., Kykes, D. D. and Polesky, H. F. 1998. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Reg.* 16:1215.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- SAS. 2000. SAS/STAT User's guide. SAS institute Inc., Cary, NC., USA.
- Rathfe, T. A., Rohrer, G. A. and Johnson. R. K. 1997. Evidence for quantitative traits loci affecting ovulation rate in pigs. *J. Anim. Sci* 75:1486-1494.
- Rothchild, M. F., Jacobson, C., Vaskes, D., Yuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, M., Vincent, S., Maclaren, A. D., Southwood, O., Van Der Steen, H., Mileham, A. and Plstow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing fitter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:201-205.
- 윤두학. 2002. 한우의 분자 유전학적 특성 규명을 위한 유전적 다양성 분석과 육질관련 표지 유전자 개발. 고려대학교 박사학위 논문. (접수일자 : 2003. 11. 17. / 채택일자 : 2004. 4. 16)