

## SLA Class III 영역의 돼지 Complement Factor B(CFB)

### 유전자의 Cloning, cSNP 동정 및 유전자형 분석

김재환\*,\*\* · 임현태\* · 서보영\* · 종타오\* · 유채경\* · 정은지\* · 전진태\*

경상대학교 응용생명과학부(BK21 program)\*, \*\*농촌진흥청 국립축산과학원\*\*

## Cloning, cSNP Identification, and Genotyping of Pig Complement Factor B (CFB) Gene Located on the SLA Class III Region

Jae-Hwan Kim\*,\*\*, Hyun-Tae Lim\*, Bo-Yeong Seo\*, Tao Zhong\*, Chae-Kyoung Yoo\*, Eun-Ji Jung\* and Jin-Tae Jeon\*

Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University\*, National institute of Animal Science, RDA\*\*

### ABSTRACT

The primers for RT-PCR and RACE-PCR were designed by aligning the pig genomic sequence and the human complement factor B (CFB) coding sequence (CDS) from the GenBank. Each PCR product was amplified in pig cDNA and sequencing was carried out. The CDS length of pig CFB gene was determined to be 2298 bp. In addition, the pig CDS was more longer than human and mouse orthologs because of insertion and deletion. The identities of porcine nucleotide sequences with those of human and mice were 84% and 80%, and the identities of amino acids were 79% to 77%, respectively. Three complement control protein (CCP) domains, one Von Willebrand factor A (VWFA) domain and a serine protease domain, that are revealed typically in mammals, were found in the pig CFB gene. Based on the CDSs determined, the primers were designed in intron regions for amplification of entire length of exons. In amplification and direct sequencing with genomic DNAs of six pig breeds, three cSNPs (coding single nucleotide polymorphisms) were identified and verified as missense mutations. Using the Multiplex-ARMS method, we genotyped and verified the mutations identified from direct sequencing. To demonstrate recrudescence, we performed both direct sequencing and Multiplex-ARMS with two randomly selected DNA samples. The genotype of each sample exhibited the same results using both methods. Therefore, three cSNPs were identified from pig CFB gene and that can be used for haplotype analysis of the swine leukocyte antigen(SLA) class III region. Moreover, the results indicate that the Multiplex-ARMS method should be powerful for genotyping of genes in the SLA region.

(Key words : Pig CFB, cSNP, Direct sequencing, Multiplex-ARMS, Genotype, SLA)

---

본 연구에서의 변이를 포함하는 염기서열은 GenBank(EU282539)에 등록되었음.

Corresponding author : J. T. Jeon, Division of Applied Life Science, Department of Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Gyeongnam, Korea.

Tel : 055-751-5516, Fax : 055-756-7171, E-mail : jtjeon@gnu.ac.kr

## I. 서 론

돼지의 조직 혹은 기관을 이용한 인간의 장기이식에 대한 중요성이 높아지고 있다. 특히 돼지는 사람과 생리적으로 유사하다는 장점을 가지고 있으며, 미니돼지인 경우 사람의 장기와 크기가 비슷하기 때문에 최근 들어 돼지가 인간의 장기를 대체하기 위한 동물로서 돼지의 중요성이 높아지고 있다 (Sachs, 1994; Chen 등, 2004). 그러나 돼지 조직 혹은 기관에서 발견되는 각각의 분자들이 사람의 항원제시세포 (antigen-presenting cell)에 의한 면역 방어시스템을 가동시켜 면역거부반응을 일으키게 된다. 이러한 면역반응은 주조직적합성복합체 (major histocompatibility complex; MHC) 영역에 존재하는 유전자들에 대응되는 많은 분자들이 중요하게 작용한다 (Rothbard와 Gefter, 1991; Ierino 등, 1999).

동종 혹은 이종간 조직이식에 대한 적합성은 MHC에 속해있는 많은 유전자들의 각 allele들의 일치유무에 영향을 받게 된다 (Casalho와 Platt, 2001). 그렇기 때문에 MHC haplotype들의 동정은 돼지를 이용한 조직이식 연구에 필수적인 과정이다. 돼지의 MHC로 알려져 있는 swine leukocyte antigen (SLA) 내 항원제시를 위한 분자들을 암호화하는 각 유전자들에 대한 많은 allele들이 분석되었으며, 이를 바탕으로 동일한 유전형질을 갖는 순종혈통을 구축하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다 (Sachs 등, 1976; Wu 등, 2004; Lee 등, 2005; O'Connell 등, 2005). 또한 최근 들어 SLA 영역에 대한 genome 정보들이 보고되면서 각 유전자들의 polymorphism 및 haplotype 분석이 더욱 가속화되고 있다 (Chardon 등, 2001; Renard 등 2006).

돼지 SLA 영역은 class I, II 및 III로 구분되며, 7번 염색체에 위치한다. 특히 class III는 genome 상에서 약 700 kb 정도로 확장되어 있으며, 이 내부에는 다양한 기능을 갖는 단백질을 암호화하는 약 60개의 유전자가 존재하고 있다 (Renard 등, 2006). 또한 사람과 마우스의 class III 영역의 비교 결과 매우 유사한 구조를 갖는 것으로 확인되어 진화과정에서 매우 잘

보존되어 있는 영역으로 알려져 있다 (Chardon 등, 1999). 현재 class III 영역에 대한 연구는 class I 및 II 영역에 비해서 미비하지만, 최근 들어 class III 영역과 질병과의 연관성에 대한 연구가 보고 되면서 이 영역에 대한 관심이 점점 높아지고 있다 (Schroeder 등, 1998; Okamoto 등, 2003; Shichi 등, 2005).

CFB (complement factor B)는 SLA class III 영역에 존재하며, 보체의 대체경로에서 C3 전환 효소의 중요한 구성원이다 (Tuckwell 등, 1997). 이 유전자는 AMD (age-related macular degeneration), AHR (airway hyperresponsiveness), 염증반응 등 최근 들어 사람의 질병과의 연관성이 보고되고 있다 (Gold 등, 2006; Taube 등, 2006). 따라서 본 연구는 SLA class III 영역에 위치하는 돼지 CFB 유전자의 coding sequence (CDS) 분석 및 coding single nucleotide polymorphism (cSNP)을 동정하고, Multiplex-Amplification Refractory Mutation System (ARMS) 방법을 이용하여 동정된 cSNP에 대한 유전자형을 분석하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Genomic DNA, RNA 추출 및 cDNA 합성

돼지 6품종 (Landrace, Large White, Duroc, Berkshire, Korean native pig, Miniature pig)의 genomic DNA는 혈액으로부터 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)를 이용하여 추출하였다. 또한 total RNA는 간과 난소 조직으로부터 easy-BLUE Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)을 사용하여 추출하였으며, mRNA는 PolyATtract mRNA Isolation Systems (Promega, USA)를 사용하여 정제하였다. 또한 cDNA 합성은 Smart<sup>TM</sup> Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Kit (Clontech, USA)을 사용하여 실시하였다.

### 2. RT-PCR

GenBank database에 등록되어 있는 돼지 genomic 서열 (AL773527)과 사람의 CFB CDS

서열(NM\_001710)을 정렬하여 돼지 CFB 유전자의 CDS를 추정하였다. CDS를 증폭하기 위한 primer는 2 set의 primer를 서로 overlapping되게 제작하였다(Table 1). PCR 반응은 cDNA 50 ng, *Taq* polymerase 1.5 unit (TaKaRa, Japan), 10 × buffer 2.5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol primer 각각 1.5  $\mu$ l 그리고 증류수 13.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 25  $\mu$ l로 반응하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 하여 35회 반복하였다. 그 후 72°C에서 5분간 신장시킨 후 4°C에서 종료하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하였으며, QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)로 정제하였다. 그 후 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)을 사용하여 cloning한 후 Applied Biosystems 3700 DNA sequencer(PE Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 결정하였다.

### 3. RACE-PCR

RT-PCR에서 제외된 5' 및 3' 방향의 CDS를 결정하기 위해서 SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA)를 이용하여 5' 및 3' RACE를 수행하였다. RACE를 위한 1차 및 2차 primer는 RT-PCR에 의해서 분석된 서열을 토대로 제작하였다(Table 1). 1차 RACE-PCR 반응은 합성된 cDNA 5  $\mu$ l, *Taq* polymerase 2.5 unit (TaKaRa, Japan), 10 × buffer 5  $\mu$ l, 0.2

mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, RACE-5'-1 (10 pmol) primer 혹은 RACE-3'-1 (10 pmol) primer 각각 2  $\mu$ l, UPM(10×) 5  $\mu$ l 그리고 증류수 28.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 50  $\mu$ l로 반응하였다. 2차 RACE-PCR 반응은 1차 PCR product 3  $\mu$ l에 *Taq* polymerase 2.5 unit (TaKaRa, Japan), 10 × buffer 5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, RACE-5'-2 (10 pmol) primer 혹은 RACE-3'-2 (10 pmol) primer 각각 3  $\mu$ l, NUP 2  $\mu$ l 그리고 증류수 32.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 50  $\mu$ l로 수행하였다. 1차 및 2차 PCR 반응조건은 동일하게 수행하였으며 다음과 같다. 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초를 1 cycle로 하여 35회 반복하였다. 그 후 72°C에서 5분간 신장시킨 후 4°C에서 종료하였다. 증폭된 PCR product는 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)로 정제하여 염기서열 결정에 사용하였다.

### 4. CDS 분석 및 계통유전학적 분석

GenBank로부터 사람, 마우스, 소, 말의 CFB 유전자에 대한 아미노산 서열을 수집한 후 앞서 결정된 돼지 CFB 유전자의 CDS에 대한 아미노산 서열과 함께 Clustal W program을 이용하여 정렬하였다. Neighbor-joining tree는 사람, 마우스, 소, 말 및 돼지 *APMI* 유전자의 아미노산 서열을 토대로 PAM model을 이용하여 산출된 거리지수를 기초로 작성되었다(Dayhoff 등, 1978).

Table 1. Primer sequences used for amplification of pig CFB cDNA in this study

Analysis method	Primer name	Primer sequence (5'-3')
RT-PCR	SET1-F	CGACTTGGGCTGGTACCCTTGATCCTG
	SET1-R	ATGAATGACCGTGACCGGAT
	SET2-F	TGCAGACTGGGTCACAGAAC
	SET2-R	GGGCAGCACTTTGTAGAGGTTGA
5' RACE-PCR	RACE-5'-1	GGTAGAAGCCAGAAGGACACACGT
	RACE-5'-2	TCCTTGAGAAGGTGGAAGGTGCC
3' RACE-PCR	RACE-3'-1	GGTGATTCCCTATGCTGACCCCA
	RACE-3'-2	TTCAAGTTGGCGTGATCAGCTG

## 5. Exon 영역을 위한 primer 제작 및 증폭

RT-PCR 및 RACE-PCR에 의해서 결정된 CFB 유전자의 전체 CDS와 돼지 SLA class III 영역의 genomic sequence (GenBank accession no. AL773562)를 alignment하여 genome 상의 exon/intron 영역을 결정하였다. 결정된 각각의 exon 영역을 증폭하기 위한 primer는 7 set을 제작하였으며, 하나 이상의 exon이 포함되게 하여 양 말단의 intron에서 제작되었다. Exon 영역의 증폭을 위하여 돼지 6품종을 사용하였으며, 이때 각 품종별로 나타날 수 있는 cSNP의 정확한 확인을 위하여 각 품종별로 5개체의 genomic DNA를 혼합하여 사용하였다. PCR 반응은 *Taq* polymerase 1.5 unit (Genet Bio, Korea), 10 × buffer 2.5  $\mu$ l, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol primer 각각 1.5  $\mu$ l, genomic DNA 각각 2  $\mu$ l, 그리고 증류수 13.7  $\mu$ l를 첨가하여 최종 25  $\mu$ l로 반응하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 55~65°C에서 45초, 72°C에서 60초를 1 cycle로 하여 35회 반복 수행하였으며, 72°C에서 5분간 신장시킨 후 4°C에서 종료하였다. PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

## 6. Direct sequencing 및 cSNP 동정

증폭된 PCR 산물은 GELase™ Agarose Gel-Digesting Preparation (Epicentre, USA)을 사용하여 gel 정제를 실시하였으며, Applied Biosystems 3700 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 direct sequencing을 실시하였다. 결정된 염기서열은 Sequencher ver. 4.6 (Gene codes, USA)을 사용하여 6품종 사이에서 나타나는 cSNP를 확인하였다.

## 7. Multiplex-ARMS를 위한 primer 제작 및 유전자형 분석

확인된 cSNP를 대상으로 ARMS 방법을 사용하여 primer를 제작하였다 (Table 3). 이 때 하나

의 SNP에서 나타나는 두 allele를 확인하기 위하여 ARMS 방법에 따라 3' 말단의 첫째 염기가 mismatching된 두 개의 reverse primer를 제작하였으며, 5' 방향에 T 염기의 추가로 분석 후 두 allele를 구분할 수 있게 하였다. 또한 multiplex PCR에 의한 유전자형 분석을 위해서 각각의 forward primer는 FAM, PET 및 NED을 이용하여 형광표지 하였다. Multiplex PCR 반응은 주형 DNA 0.04  $\mu$ g, H-*Taq* DNA polymerase 1.5 unit (Bioneer, Korea), 10×buffer 1.5  $\mu$ l, 0.25 mM dNTP, primer를 첨가한 후 3차 증류수를 첨가하여 최종 15  $\mu$ l로 반응하였다. 이 때 primer의 농도는 최적의 반응을 위해서 primer set에 따라 0.5~1.5  $\mu$ M로 첨가하였다. PCR 조건은 touch-down PCR 방법을 사용하여 95°C에서 15분간 변성시킨 후 94°C에서 60초, 63°C에서 75초, 72°C에 60초를 5회 반복, 94°C에서 60초, 62°C에서 75초, 72°C에 60초를 5회 반복, 94°C에서 60초, 61°C에서 75초, 72°C에 60초를 25회 반복 수행하였다. 그 후 65°C에서 30분간 처리 후 8°C에서 종료하였다. PCR product는 Applied Biosystems 3700 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)를 이용하여 전기영동을 실시한 후 GenScan version 2.1 (Applied Biosystems, USA)로 유전자형을 확인하였다.

## 8. Multiplex-ARMS와 direct sequencing 결과와의 blind test

결과의 정확성을 재확인하기 위하여 무작위로 두 개의 DNA 시료를 선택하여 direct sequencing에 의한 염기서열 분석과 Multiplex-ARMS에 의한 유전자형 분석을 동시에 실시하여 두 결과를 비교하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 돼지 CFB 유전자의 CDS 결정 및 분석

RT-PCR과 RACE-PCR에 의해서 돼지 CFB 유전자의 CDS가 분석되었으며, 이 서열을 GenBank database에 등록하였다 (GenBank accession

no. EU282539). 사람 (GenBank accession no. NC\_000006, NM\_001710)과 마우스 (GenBank accession no. NC\_000083, NM\_008198)의 CFB 유전자는 동일하게 18개의 exon으로 구성되어 있으며, 1번 exon에 개시코돈이 존재한다. 반면에 CDS의 전체길이는 사람이 2295 bp, 마우스는 2286 bp로 다르게 보고되었다 (Ishikawa 등, 1990; Horiuchi 등, 1993). 본 연구에서 분석된 돼지 CFB 유전자의 CDS의 길이는 2298 bp로 사람에게 비해서 3 bp, 마우스에 비해서 12 bp가 길게 나타났다. Clustal W 프로그램을 이용하여 사람, 마우스, 돼지 CFB 유전자의 아미노산 서열을 정렬한 결과 중간에 아미노산의 삽입 및 결실이 존재함을 확인하였다 (Fig. 1). 그러나 중간에 나타나는 염기의 삽입 혹은 결실에 의해서 아미노산의 첨가 혹은 결실이 발생했지만 아미노산 해독들은 변화하지 않았다. 분석된 돼지 CFB 유전자의 아미노산 서열을 토대로 사람 및 마우스와 비교한 결과 사람과는 79%, 마우스와는 77%의 상동성을 보였다.

포유류의 CFB는 N-말단으로부터 3개의 보체 조절단백질 (complement control protein, CCP) 영역, Von willebrand factor A (VWFA) 영역, 그리고 serine protease (SP) 영역이 존재한다고 보고되어 있다 (Mole 등, 1984; Tuckwell 등, 1997; Shin 등, 2007). 본 연구에서 분석된 돼지 CFB 유전자의 아미노산배열에서 이 유전자에서 나타나는 특이적 영역들을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 각 CCP 영역은 일반적으로 약 60개의 아미노산으로 구성되며 4개의 cystein 잔기를 갖는다고 보고되어 있다 (Reid와 Day, 1989). 돼지 CFB 유전자의 서열에서 CCP1은 75개, CCP2는 61개, CCP3은 57개로, 비교된 사람과 마우스에서 동일하게 나타났다. Cystein 잔기는 각 영역별로 4개씩 존재했으며, 사람 및 마우스, 그리고 결과로 제시하지 않았지만 소와 말에서의 아미노산 변이는 나타나지 않았다. CCP 영역은 보체의 대체경로에서 D 인자에 의해 절단되는 부위로서 C3 전환효소 형성의 개시에 작용한다 (Oglesby 등, 1988; Xu와 Volanakis, 1997). 3개의 CCP 영역이 C3b 혹은 C4b와의 결합에 작용하지만, 특히 CCP3가 이 과정에서 중추적인

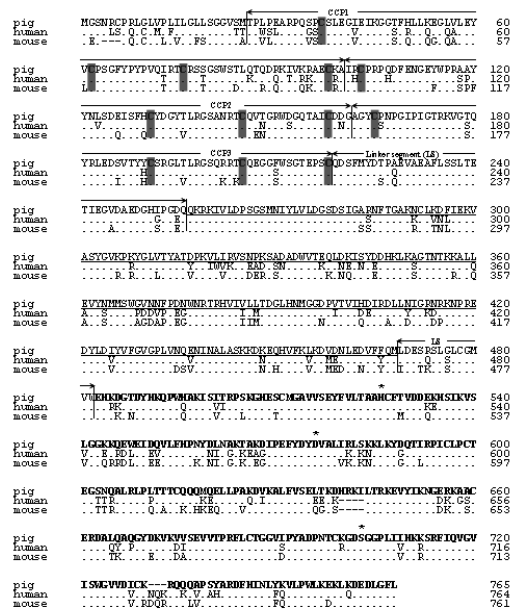


Fig. 1. The alignments of amino acid sequences translated from coding sequences of pig CFB gene (GenBank accession no. EU282539) and its human (GenBank accession no. NM\_001710) and mouse (GenBank accession no. NM\_008198) orthologs. CCP1, CC2, CCP3, and two linker segments are shared by arrows. The underlined and bold sequences indicate the VWFA domain and a serine protease domain, respectively. The four cysteines which are generally located on each CCP domain are shown as gray boxes. The asterisks indicate the catalytic triad. A dash indicates a gap introduced for optimal alignment, and a dot indicates that the residue is identical in all three species. Sequences were aligned using Clustal W.

역할을 하는 것으로 추정되고 있다 (Hourcade 등, 1995; Tuckwell 등, 1997). 또한 VWFA는 C3b와의 결합에 관여한다. SP 영역 내에서 중추적 기능을 하는 아미노산인 His, Asp, Ser이 확인되었으며, 이들 역시 사람, 마우스, 소, 말과의 아미노산 변이는 나타나지 않았다.

## 2. 계통유전학적 분석

본 자료에서 명시하지 않았지만 사람, 마우스, 소, 말, 돼지의 CFB 유전자의 아미노산 서열을 토대로 Dayhoff 등 (1978)의 PAM model을 이용하여 유전적 거리지수를 측정된 결과, 돼지와 소가 0.1571로 가장 낮은 수치를 나타내며 가장 가까운 유연관계를 나타낸 반면, 말, 사람, 마우스 순으로 멀어짐을 보였다. 유전적 거리지수를 토대로 작성된 neighbor-joining tree에서 역시 돼지와 소가 가장 가까운 유연관계를 나타내었다(Fig. 2). 이는 소와 돼지가 우제목(Artiodactyla)에 속하기 때문에 가장 가까운 유연관계를 나타내며, 기제목(Perissodactyla)에 속하는 말이 다음으로 가까우며, 사람과 마우스는 포유류에 속하기 때문에 상대적으로 가장 먼 유연관계를 나타내는 것으로 사료된다.

## 3. 품종별 cSNP 동정

분석된 돼지 CFB 유전자의 CDS와 GenBank database로부터의 genomic sequence를 염기정렬하여 exon/intron 영역을 결정하고 이를 바탕으로 exon 영역을 증폭할 수 있는 7 set의 primer를 제작하였다. 이들 각 primer set와 돼지 6품종의 genomic DNA를 이용하여 증폭하고 direct sequencing을 실시하여 품종별 cSNP를 확인하였다. 그 결과 3개(C13T, A1696G, A2015C)의 cSNP가 동정되었으며, translation 결과 이들 모두에서 아미노산치환이 발생하였다(Fig. 3, Table 2). 13번째에서 Duroc과 Korean native pig가, 2015번째에서 Duroc이 homo-type으로 나타난 반면, 나머지 품종에서는 hetero-type으로 나타났다. 또한 1696번째에서는 모두 homo-type으로 나타났는데, Duroc에서는 A/A인 반면 나머

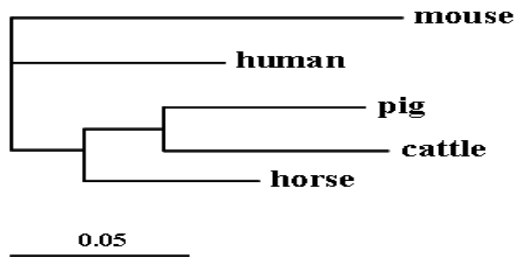


Fig. 2. A neighbor-joining tree constructed from the amino acid sequences of five mammal CFB genes. The tree was generated using Point Accepted Mutation(PAM) model of amino acid mutation published by Dayhoff et al. (1978).

지 품종에서는 G/G로 확인되었다.

## 4. Multiplex-ARMS에 의한 유전자형 분석

Multiplex-ARMS 방법은 각 SNP에 대해서 두 allele 중 target allele에는 결합하고 다른 allele에는 결합하지 않도록 제작된 두 개의 allele-specific reverse primer와 형광표지된 forward primer를 사용하여 유전자형을 분석하는 기법으로서 하나 혹은 여러 개의 SNP에 대한 유전자형을 분석할 수 있는 기법이다. 이 기법은 빠르고 상대적으로 저렴하고 간편하다는 장점이 있기 때문에 최근 들어 유전자형분석에 많이 사용되고 있다(Balbi 등, 2007; Lacerra 등, 2007; Taylor 등, 2007).

돼지 CFB 유전자에서 동정된 3개의 cSNP를 대상으로 Multiplex-ARMS 방법을 위한 primer를 제작한 후(Table 3), SNP 동정에 사용한 품종별 하나의 DNA sample를 사용하여 유전자형 분석을 실시하였다. 그 결과 Table 2에 제시된

Table 2. Information of three cSNPs identified from pig CFB gene among six pig breeds

Position of nucleotide	Pig breeds <sup>1)</sup>						Position of amino acid
	L	Y	D	B	KNP	M	
C13T	C/T	C/T	C/C	C/T	C/C	C/T	R5C
A1696G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	G/G	T566A
A2015C	A/C	A/C	A/A	A/C	A/C	A/C	K672T

<sup>1)</sup> L, Landrace; Y, Yorkshire; D, Duroc; B, Berkshire; KNP, Korean native pig; M, Miniature pig

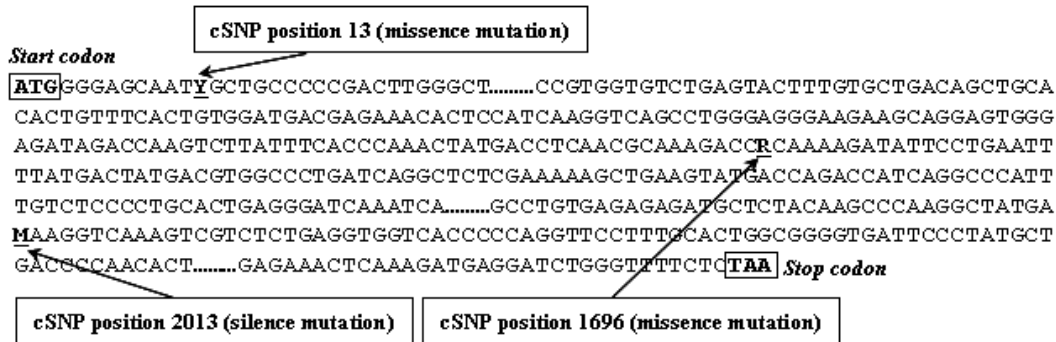


Fig. 3. The positions of cSNPs identified from pig CFB gene. Y, R, and M are depicted as C or T, A or G, and A or C, respectively. The dots denote the abbreviation of nucleotide sequences.

각 품종별 유전자형과 동일한 결과를 얻을 수 있다. 이런 결과를 재확인하기 위해서 모든 품종을 대상으로 무작위로 2개의 genomic DNA (sample 1, 2)을 선발하여 direct sequencing과 Multiplex-ARMS 방법을 이용하여 유전자형을 분석하고 비교하였으며, Fig. 4와 같이 두 분석 결과가 일치됨을 확인하였다.

5. SLA 영역에 대한 효율적인 유전자형 분석 및 방법

인간의 장기 대체 동물모델로서 중요한 돼지의 순종혈통 구축을 위해서 SLA 영역 내 존재하는 유전자들의 polymorphism 및 haplotype 분석이 필수적이다. 이를 위해서는 순종혈통 구축과정에서 각각의 개체들의 유전자형 분석을 통한 haplotype을 간편하고 효율적으로 분석할

수 있는 방법이 필요하다. 최근에 보고된 많은 연구결과들은 PCR-RFLP나 PCR-ssp 혹은 이 두 방법을 혼용하여 SLA 영역의 유전자들에 대한 haplotype을 분석하고 있다 (Martins 등, 2003; Ando 등, 2005). 이 중 PCR-RFLP는 분석시료수의 한계를 나타내며, 제한효소의 인지부위 특이성 때문에 분석이 불가능한 polymorphism이 존재할 수 있다. 본 연구에서 사용한 Multiplex-ARMS 방법은 각 allele에 특이적인 primer를 제작함으로써 이를 이용하여 각 allele에 대한 유전자형을 한번에 확인할 수 있는 방법으로 PCR-ssp 보다는 좀 더 간편하고 효율적인 방법이라고 사료된다.

본 연구에서는 direct sequencing에 의해 돼지 CFB 유전자에서 아미노산 변화를 초래하는 3개의 cSNP를 동정하였다. 또한 Multiplex-ARMS 방법을 이용하여 이들에 대한 유전자형을 손쉽

Table 3. The sequence and information of three primer sets for the Multiplex-ARMS method

cSNP position	Forward primer (5' -3')	Reverse primer <sup>1)</sup> (5' -3')	Primer con.( $\mu$ m)	Product size(bp)
13	AGGCCAAGGTCAGATCTTAG (FAM)	TTTCACCACCATGGGGAGCAAGC CACCACCATGGGGAGCAAGT	0.5	129 125
1696	CACGTGGTTGTCAGAGGAAG (PET)	TTTTTGACCTCAACGCAAAGACAG TGACCTCAACGCAAAGACAA	1.5	280 276
2015	CAGGAGAGGAGAAGCTGTAG (NED)	TTTTTACAAGCCCAAGGCTATGGC TACAAGCCCAAGGCTATGGA	1.2	197 193

<sup>1)</sup> Two reverse primers for each cSNP were designed by ARMS method. For distinguishing of each fragment after genotyping by Multiplex-ARMS method, T nucleotides were inserted in the 3' end of reverse primers.

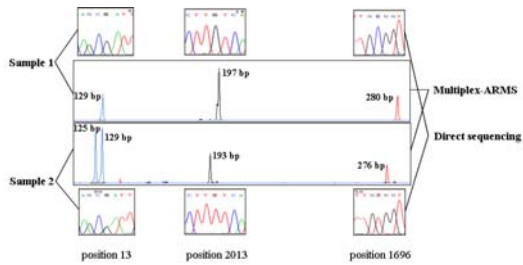


Fig. 4. The result of genotyping based on three cSNPs from pig CFB gene with two random DNA samples (sample 1 and sample 2). The genotypes of three cSNPs analyzed using the Multiplex-ARMS method were the same as those analyzed using direct sequencing.

게 분석하였으며, 그 결과는 direct sequencing에 의해 확인된 결과와 일치하였다. 본 연구에서 동정된 3개의 cSNP는 SLA class III 지역의 haplotype 분석을 위한 기초 자료로 사용 가능하며, Multiplex-ARMS 기법은 이중장기 개발에 필수적인 SLA 전체 영역 내 유전자들의 유전자형 분석을 위한 효율적인 분석방법이라고 사료된다.

#### IV. 요약

GenBank database로부터 돼지 genomic 서열과 사람의 CFB 유전자의 CDS를 정렬하여 돼지 CFB 유전자의 CDS를 추정하였다. 이를 바탕으로 제작된 primer를 이용하여 RT-PCR을 실시하여 CDS 내부서열을 결정하였으며, 결정된 서열을 바탕으로 primer 제작 및 RACE-PCR을 실시하였다. 돼지 CFB 유전자의 전체 CDS 길이는 2298 bp였으며, 사람 및 마우스와의 비교결과 염기삽입/결실이 확인되었다. CDS 및 아미노산 서열을 사람 및 마우스와 비교한 결과 CDS는 84% 및 80%, 아미노산 서열은 79%, 77%의 상동성을 보였다. 포유류의 CFB에서 일반적으로 나타나는 보체조절단백질 (complement control protein, CCP) 영역, Von willebrand factor A (VWFA) 영역, 그리고 serine protease 영역이 확인되었으며, 단백질 기능에 중요하게 작용하는

아미노산 잔기들은 돼지를 포함한 사람, 마우스, 소, 말에서 동일하게 나타났다. 사람, 마우스, 소, 말, 돼지 CFB 유전자의 아미노산 서열에 의한 유전적 거리지수 및 neighbor-joining tree 작성 결과 돼지는 같은 우제목에 속하는 소와 가장 가까운 계통유전학적 유연관계를 나타내었다. 결정된 CDS를 바탕으로 exon 영역을 증폭하기 위한 primer를 제작하였고, cSNP 분석을 위해서 돼지 6품종을 대상으로 direct sequencing을 실시하였다. 그 결과 아미노산 치환을 일으키는 3개 (C13T, A1696G, A2015C)의 cSNP가 동정되었다. 동일한 DNA를 사용하여 동정된 3개의 cSNP를 대상으로 Multiplex-ARMS 방법으로 유전자형 분석 결과 direct sequencing 결과와 일치하였다. Multiplex-ARMS 방법의 재현성 확인을 위해 무작위로 2개의 DNA 시료를 선발한 후 direct sequencing과 Multiplex-ARMS 분석을 각각 실시하였으며, 3개의 cSNP에 대한 유전자형이 일치함을 재확인하였다. 따라서 본 연구에서 확인된 3개의 cSNP는 SLA class III 영역의 haplotype 분석을 위한 기초 자료로 사용될 수 있으며, Multiplex-ARMS 기법은 이중장기 개발에 필수적인 SLA 전체 영역 내 유전자들의 유전자형 분석을 위한 효율적인 분석방법이라고 사료된다.

#### V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 ‘바이오그린 21사업(바이오장기: 20070401-034-029-007-03-0)의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다. 김재환, 임현태, 서보영은 교육과학기술부 BK21 사업의 장학금을 수혜받았습니다.

#### VI. 인용 문헌

1. Ando, A., Ota, M., Sada, M., Katsuyama, Y., Goto, R., Shigenari, A., Kawata, H., Anzai, T., Iwanaga, T., Myioshi, Y., Fujimura, N. and Inoko, H. 2005. Rapid assignment of the swine major histocompatibility complex (SLA) class I and II



- genotypes in Clawn miniature swine using PCR-SSP and PCR-RFLP methods. *Xenotransplantation*. 12:121-126.
2. Balbi, G., Ferrera, F., Rizzi, M., Piccioli, P., Morabito, A., Cardamone, L., Ghio, M., Palmosano, G. L., Carrara, P., Pedemonte, S., Sessarego, M., De Angioletti, M., Notaro, R., Indiveri, F. and Pistillo, M. P. 2007. Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms with a clinical subset of Italian patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 149:40-47.
  3. Cascalho, M. and Platt, J. L. 2001. The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity* 14:437-446.
  4. Chardon, P., Renard, C. and Vaiman, M. 1999. The major histocompatibility complex in swine. *Immunol. Rev.* 167:179-192.
  5. Chardon, P., Rogel-Gaillard, C., Cattolico, L., Duprat, S., Vaiman, M. and Renard, C. 2001. Sequence of the swine major histocompatibility complex region containing all non-classical class I genes. *Tissue Antigens.* 57:55-65.
  6. Chen, F., Xie, J., Xhou, Y., Li, N. and Chou, K. Y. 2004. Novel SLA-DR alleles of three Chinese pig strains and the related function in human T cell response, *Cell. Mol. Immunol.* 1:212-21.
  7. Dayhoff, M. O., Schwart, R. M. and Orcutt, B. C. 1978. A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff, M. (Ed.), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 5. National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, pp. 345-352.
  8. Gold, B., Merriam, J. E., Zernant, J., Hancox, L. S., Tailber, A. J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G. R., Smith, R. T., the AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman, G. S., Dean, M. and Allikmets, R. 2006. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics.* 38:485-462.
  9. Horiuchi, T., Kim, S., Matsumoto, M., Watanabe, I., Fujita, S. and Volanakis, J. E. 1993. Human complement factor B: cDNA cloning, nucleotide sequencing, phenotypic conversion by site-directed mutagenesis and expression. *Mol. Immunol.* 30: 1587-1592.
  10. Hourcade, D. E., Wagner L. M. and Oglesby, T. J. 1995. Analysis of the short consensus repeats of human complement factor B by directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 270:19716-19722.
  11. Ierino, F. L., Gojo, S., Banerjee, P. T., Giovino, M., Xu, Y., Gere, J., Kaynor, C., Awwad, M., Monroy, R., Rembert, J., Hatch, T., Foley, A., Kozlowski, T., Yamada, K., Neethling, F. A., Fishman, J., Bailin, M., Spitzer, T. R., Cooper, D. K., Cosimi, A. B., LeGeurn, C. and Sachs, D. H. 1999. Transfer of swine major histocompatibility complex class II genes into autologous bone marrow cells of baboons for the induction of tolerance across xenogeneic barriers. *Transplantation.* 67:1119-1128.
  12. Ishikawa, N., Nonaka, M., Wetsel, R. A. and Colten, H. R. 1990. Murine complement C2 and factor B genomic and cDNA cloning reveals different mechanisms for multiple transcripts of C2 and B. *J. Biol. Chem.* 265:19040-19046.
  13. Lacerra, G., Musollino, G., Di Noce, F., Prezioso, R. and Carestia, C. 2007. Genotyping for known Mediterranean alpha-thalassemia point mutations using a multiplex amplification refractory mutation system. *Haematologica.* 92:254-255.
  14. Lee, J. H., Simond, D., Hawthorne, W. J., Walters, S. N., Patel, A. T., Smith, D. M., O'Connell, P. J. and Moran, C. 2005. Characterization of the swine major histocompatibility complex alleles at eight loci in Westran pigs. *Xenotransplantation* 12:303-307.
  15. Martens, G. W., Lunney, J. K., Baker, J. E. and Smith, D. M. 2003. Rapid assignment of swine leukocyte antigen haplotypes in pedigreed herds using a polymerase chain reaction-based assay. *Immunogenetics* 55:395-401.
  16. Mole, J. E., Anderson, J. K., Davison, E. A. and Woods, D. E. 1984. Complete primary structure for the zymogen of human complement factor B. *J. Biol. Chem.* 259:3407-3412.

17. O'Connell, P. J., Hawthorne, W. J., Simond, D., Chapman, J. R., Chen, Y., Patel, A. T., Welters, S. N., Burgess, J., Weston, L., Stokes, R. A., Moran, C. and Allen, R. 2005. Genetic and functional evaluation of the level of inbreeding of the Westran pig; a herd with potential for use in xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 12:308-315.
  18. Oglesby, T. J., Accavitti, M. A. and Volanakis, J. E. 1988. Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2. *J. Immunol.* 141:926-931.
  19. Okamoto, K., Makino, S., Yoshikawa, Y., Takaki, A., Nagatsuka, Y., Ota, M., Tamiya, G., Kimura, A., Bahram, S. and Inoko, H. 2003. Identification of *IkBLas* the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 72:303-312.
  20. Renard, C., Hart, E., Sehra, H., Beasley, H., Coggill, P., Howe, K., Harrow, J., Gilbert, J., Sims, S., Rogers, J., Ando, A., Shigenari, A., Shiina, T., Inoko, H., Chardon, P. and Beck, S. 2006. The genomic sequence and analysis of the swine major histocompatibility complex. *Genomics* 88:96-110.
  21. Reid, K. B. and Day, A. J. 1989. Structure-function relationships of the complement components. *Immunol. Today.* 10:177-180.
  22. Rothbard, J. B. and Geffter, M. L. 1991. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 9:527-565.
  23. Sachs, D. H. 1994. The pig as a potential xenograft donor. *pathol. Biol.* 42:185-191.
  24. Sachs, D. H., Leight, G., Cone, J., Schwarz, S., Stuart, L. and Rosenberg, S. 1976. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplantation.* 22: 559-567.
  25. Schroeder, H. W., Zhu, Z. B., March, R. E., Campbell, R. D., Berney, S. M., Nedospasov, S. A., Turetskaya, R. L., Atkinson, T. P., Go, R. C., Cooper, M. D. and Volanakis, J. E. 1998. Susceptibility locus for IgA deficiency and common variable immunodeficiency in the HLA-DR3-B8-A1 haplotype. *Mol. Med.* 4:72-86.
  26. Shichi, D., Kikkawa, E. F., Ota, M., Katsuyama, Y., Kimura, A., Matsumori, A., Kulski, J. K., Naruse, T. K. and Inoko, H. 2005. The haplotype block, *NFKBIL1 - ATP6V1G2 - BAT1 - MICB - MICA*, within the class III class I boundary region of the human major histocompatibility complex may control susceptibility to hepatitis C virus-associated dilated cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 66:200-208.
  27. Shin, D. H., Webb, B., Nakao, M. and Smith, S. L. 2007. Molecular cloning, structural analysis and expression of complement Bf/C2 genes in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *Dev. Comp. Immunol.* 31:1168-1182.
  28. Taube, C., Thurman, J. M., Takeda, K., Joetham, A., Miyahara, N., Carroll, M. C., Dakhama, A., Giclas, P. C., Holers, V. M. and Gelfand, E. W. 2006. Factor B of the alternative complement pathway regulates development of airway hyperresponsiveness and inflammation. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:8084-8089.
  29. Taylor, A., Tabrah, S., Wang, D., Sozen, M., Duxbury, M., Whittall, R., Humphries, S. E. and Norbury, G. 2007. Multiplex ARMS analysis to detect 13 common mutations in familial hypercholesterolaemia. *Clin. Genet.* 71:561-568.
  30. Tuckwell, D. S., Xu, Y., Newham, P., Humphries, M. J. and Volanakis, J. E. 1997. Surface loops adjacent to the cation-binding site of the complement factor B von Willebrand factor type A module determine C3b binding specificity. *Biochemistry.* 36:6605-6613.
  31. Wu, Q., Xiong, P., Liu, J. Y., Feng, S. T., Gong, F. L. and Chen, S. 2004. The study of new SLA classical molecules in inbreeding Chinese Wuzhishan pig. *Transplant. P.* 36:2483-2484.
  32. Xu, Y. and Volanakis, J. E. 1997. Contribution of the complement control protein modules of C2 in C4b binding assessed by analysis of C2/Bf chimeras. *J. Immunol.* 158:5958-5965.
- (접수일자 : 2008. 7. 16. / 수정일자 : 2008. 11. 12. / 채택일자 : 2008. 11. 24.)