

제3세대 한우유전체지도작성

이용석*,*** · 최인호**,***

인제대학교 의과대학 기생충학교실*, 영남대학교 생명공학부**, 소유전체연구소재은행***

The 3rd Generation Genome Map of the Korean Cattle (Hanwoo)

Yong Seok Lee*,*** and Inho Choi**,***

Department of Parasitology*, College of Medicine, Inje University, Busan and School of Biotechnology** and Bovine Genome Resources Bank***, Yeungnam University, Gyeongsan, Republic of Korea

ABSTRACT

Recently, the 2nd generation genome map of the Korean cattle (Hanwoo) has been constructed by comparison of the nucleotide sequence of the Korean cattle BAC clones with whole genome sequence of the bovine data-base (*B_tau* 2.1 build). The objective of this study was to update the 2nd generation genome map of the Korean cattle using the similar approach. The nucleotide sequence of the Korean cattle BAC clones utilized in the construction of the 2nd generation map was compared with the newly released bovine data-base (*B_tau* 3.1 build) to generate the 3rd generation map. While, 5,105 BAC clones were localized on bovine chromosome in the 2nd generation map, a total of 9,595 BAC clones, which spans about 37.27% of the bovine chromosome after eliminating the overlapping sequence among the clones, have been mapped on the bovine chromosome in the 3rd generation map. Further analysis of the nucleotide sequence of the BAC clones will allow us to develop map and facilitate to pinpoint the genes that are important for the improvement of the performance in this cattle breed.

(Key words : Korean cattle (Hanwoo), BAC End Sequence (BES), chromosome map)

I. 서 론

고해상도 소 유전자지도는 30쌍의 소 염색체에 존재하는 유전자의 위치를 정확히 표시한 지도로써 경제형질유전좌위 (ETL; Economic Trait Loci)와 양적형질유전좌위 (QTL; Quantitative Trait Loci)의 발굴 등에 활용할 수 있는 소 유전체 연구자들에게 가장 핵심적인 연구재료이다 (Barendse 등, 1997; Ihara 등, 2004). 소-인간, 소-생쥐의 비교 조사혼용지도(radiation hybrid map) 구축의 시도는 소 유전체 지도구축을 가속화하는 계기를 마련하였으며 (Womack 등, 1997; Itoh 등, 2005), 그 결과 소-인간의 유전체 전체의 비교 조사혼용지도 완성의 계기가 되었다 (Band 등, 2000; Larkin 등, 2003; Everts-van der Wind 등, 2004). 최근에 소의 박테리아인공염색체 (BAC; bacterial artificial chromosome) 클론을 활용한 소-인간 비교유전체 지도가 소 유전체의 whole genome shotgun 서열을 기초로 하여 구축되었다 (Larkin 등, 2003). 이와 같은 방법으로 한우에서도 소-인간 비교유전체지도의 초안이 제작되었다 (Chae 등, 2007).

어떤 생명체가 갖고 있는 염색체 DNA를 큰 토막으로

잘라서 안정되게 보관하는 방법인 박테리아인공염색체 도서관 (library)의 제작 기술은 연구자들에게 이미 잘 알려진 방법으로 다양한 생물들의 물리적 유전자지도 (physical map) 작성을 위해 많이 사용 되어왔다 (Kim 등, 1996). 최근 한우에서도 박테리아인공염색체 도서관이 구축되었으며 (Chae 등, 2007), 이렇게 제작 된 박테리아인공염색체 클론 중 21,024개의 클론에 대한 말단염기서열분석 (BAC end sequence analysis)을 통해 비교유전체지도가 제작되었다 (Choi 등, 2007). 또한 제작된 한우의 유전체도서관은 연구자가 원하는 유전자가 포함된 클론을 PCR 기법을 통해 쉽게 찾아 낼 수 있도록 해 주며 이는 원하는 유전자를 포함한 유전체 영역의 서열을 분석할 때 많은 도움이 된다 (Yu 등, 2005; Choi 등, 2006). 이러한 일례로 최근 한우 박테리아인공염색체 클론을 이용하여 광우병 관련 유전자인 PRNP (PRioN Protein) 유전자를 포함한 유전체영역의 해독이 성공적으로 이루어진 바 있다 (Choi 등, 2006).

본 연구는 외국소 (*Bos taurus*)의 유전체정보 (B_tau2.1)를 토대로 만들어진 한우의 유전체지도 (Choi 등, 2007)를 최근 새롭게 바뀐 외국소 (*Bos taurus*)의 유전체정보 (B_tau3.1)를 바탕으로 새롭게 만들어진 한우 유전체지도

Corresponding author : Inho Choi, Bovine Genome Resources Bank and School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan, Republic of Korea
Tel: 053-810-3024, Fax: 053-810-4769, E-mail: inhochoi@ynu.ac.kr

의 제작에 대한 내용으로 한우 유전체를 연구하는 국내·외 연구자들에게 도움을 줄 수 있는 기초자료를 만들고자 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 박테리아인공염색체 말단 염기서열의 해독

384 clear well plate (Genetix, USA)에 보관된 박테리아인공염색체 클론들을 TB (Terrific Broth) 배지가 1 ml씩 들어 있는 96 deep well dome (Bioneer, Korea)에 접종하였다. 96 deep well plate에 접종된 클론은 37°C의 진탕 배양기 (HT-Megagrow Bioneer, Korea) 안에서 550 rpm의 속도로 16시간 동안 배양하였다. 배양된 각 박테리아인공염색체 클론은 Montage BAC96 miniprep kit (Millipore, USA) 또는 alkaline lysis 방법 (Birboim and Doly, 1979; Kelley 등, 1999)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 각 박테리아인공염색체클론의 말단염기서열 분석은 클론 DNA 500 ng/ μ l에 AmpliTaq DNA polymerase FS (Applied Biosystems, USA)를 포함하는 1 μ l의 BigDye ready mix, 4 μ l 5X buffer (200 mM Tris-HCl, pH 9.0, 5 mM MgCl₂)와 3 pmol로 희석한 공통 프라이머 (universal primer) 0.64 μ l을 넣고 총량이 11 μ l이 되도록 하여 반응하였다. 염기서열분석에 사용한 공통 프라이머의 염기서열은 각각 다음과 같다.

T7: 5'-AATACGACTCACTATAG-3'

RP2: 5'-TACGCCAAGCTATTTAGGTGAGA-3'

M13R: 5'-GCGGATAACAATTTACACAGG-3'

Thermocycler (MJ research, USA)를 이용한 PCR 반응 조건은 아래와 같다. 최초 96°C에서 2분간 반응하여 DNA를 변성 시킨 다음, 96°C 10초, 50°C 10초, 60°C 4분간 총 80회 반응을 하였다. 이 PCR 산물은 에틸알코올을 사용하여 침전 과정을 통해 순수 분리한 후 DNA 분석장치 (AB-3730XL DNA analyzer, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다.

2. 염기서열의 분석과정 (sequence analysis)

자동염기서열분석장치에서 얻은 초기파일 (chromatogram file)을 Phred 프로그램을 이용하여 텍스트 형태로 자동 전환시켰다. 이 과정에서 펄스크립트 (Perl script)를 통해 일정수준 (Phred 점수 20) 이하의 데이터는 삭제한 후 멀티 파스타 (multi FASTA) 형식의 파일로 데이터를 취합 하였다 (Ewing and Green, 1998; Ewing 등, 1998). Crossmatch 프로그램 (<http://www.phrap.org>)을 이용하여 데이터에 혼재되어 있는 벡터서열을 제거한 후 Repeat Masker 프로그램 (Jurka 등, 2005)을 이용하여 반복서열을 제거 (repeat masking) 하였다 (Ver. 2007. 12). 이러한 처리과정을 거친 결과에서 남은 서열의 길이가 100 bp 이하인 경우는 데이터로 사용하지 않았으며, 최종의 멀티 파스타 형식의 데

이터는 자체 구축한 서버에서 BLAST를 이용하여 1×10^{-40} 의 E-value 조건에서 BLASTN 분석을 수행하였다 (Altschul 등, 1990). BLAST에 사용된 데이터베이스는 format-db 프로그램을 통해 만들어진 *Bos taurus* 유전체 데이터베이스 3.1 버전이었다.

3. 유전체 매핑 (BES mapping)

BLAST 분석을 통해 얻은 결과 파일을 스프레드시트 형식으로 변환 한 후 변환된 파일에서 BLAST 결과가 있는 것과 없는 것을 서로 나누었다. BLAST 결과가 있는 것 중에서 앞쪽 방향서열 (forward)과 역 방향서열 (reverse)이 같은 염색체에 일치되는 경우와 앞쪽 방향서열과 역 방향서열이 다른 염색체에 일치되는 경우 그리고 앞쪽 방향서열 또는 역 방향서열 어느 한쪽만 결과가 있는 것으로 다시 한 번 나누었다. 매핑에는 서로 같은 염색체에 일치되는 서열들 중에서 길이가 300 Kbp 이하인 것들을 사용하였다 (Chae 등, 2007; Choi 등, 2007). BLAST 결과 파일에서 나와 있는 서열의 좌표 정보를 이용하여 펄스크립트를 작성한 후에 GD library라는 소프트웨어를 이용하여 그림을 확대해도 계단현상이 생기지 않도록 벡터화된 그림 형식인 포스트스크립트 (postscript) 형식의 파일을 생성하였다. 1차 매핑을 한 후에 2차적으로 반복서열이 제거된 서열들만 모아서 멀티파스타 형식으로 취합한 후 자체적으로 구축한 서버에서 BLAST 수행을 통해 1×10^{-10} 의 조건으로 BLASTN 분석을 실시하였다. BLAST 결과 중 결과가 있었던 것들은 1차 분석에서 나온 한쪽 방향만 일치되는 서열들의 결과를 종합하여 같은 염색체에 일치되는 것들을 추가적으로 매핑하였다 (Choi 등, 2007).

III. 결과 및 고찰

한우 염색체 DNA를 이용해 제작된 약 150,000개의 박테리아인공염색체클론 (Chae 등, 2007) 중 총 21,024 BAC 클론에 대한 말단염기서열 (BES) 분석을 수행하였다 (Table 1). 이 중 염기서열 분석결과와 신뢰도가 낮은 서열 (Phred score 20 이하) 및 벡터로부터 유래한 염기서열을 제거한 다음 그 크기가 100 bp 이상인 클론의 수는 20,153개 (38,061 BES, 23,585,813 bp) 이었으며, 평균 크기는 620 bp 이었다. 이 중에서 한 클론에 대한 양쪽 말단 염기서열이 모두 위 조건을 만족하는 클론 (paired BES를 갖는 클론)의 수는 17,908개 이었고 한쪽 말단 염기서열만 위 조건을 충족시키는 클론 (single BES를 갖는 클론)의 수는 2,245개였다. 양쪽 말단 모두에서 벡터 염기서열 제거 후 100 bp 이상의 말단 염기서열을 얻지 못한 경우는 전체 분석 클론 중 약 4.14% 뿐 이었다. 이러한 경우는 클론에 삽입된 insert가 없거나, 염기서열 분석에서 실패 한 것으로 판단된다. 이러한 결과를 통해 본 연구에서 제작된 한우 박테리아인공염색체 클론 중 최소 95.86%의 클론이 한

Table 1. BLAST analysis

BLAST results	No. of clones (<i>Bt</i> build 2.1)	No. of clones (<i>Bt</i> build 3.1)
BLAST trials ^a	20,158	20,153
no blast hits	6,957	2,716
significant blast hits ^b	13,201	17,437
single-end hits ^c	7,075	7,319
• single-hits ^d	4,767	5,104
• multiple-hits ^e	2,308	2,215
paired-end hits ^f	6,126	10,118
• each end hit at different chromosome	1,226	814
• each end hit at the same chromosome	4,900	9,304
– each end with single hit	2,447	4,562
– one or both of the ends hit with multiple hits	2,453	4,742

^a Total number of BAC clones used for blast analysis after editing the BESs.

^b Blast hits with significant E-value ($E < e^{-40}$). Only one end^c or both ends^f of the BESs show a hit. Each BES hits only one position^d or more than one position^e of the bovine genome.

우 염색체 DNA 토막을 포함하고 있는 것으로 추정된다.

분석한 클론 중 신뢰도가 높으며 (Phred score 20 이상), 벡터를 제거한 크기가 100 bp 이상인 말단염기서열이 한쪽 (single BES) 또는 양쪽 모두 (paired BES)에 존재하는 20,153개 클론에 대하여 반복염기서열을 제거 한 후 공개된 염색체별 소 유전체 염기서열 (NCBI Genome *B. taurus* Build 3.1)과 유사성을 비교 (blast analysis)하였다 (Table 2). 분석에 사용된 20,153개의 클론 중 2,716 클론이 양쪽 말단염기서열 모두 소의 염기서열과 어떤 유사성 (no hit; $E < e^{-40}$)도 나타내지 않은 반면, 17,437개 클론은 높은 유사성 (significant blast hit; $E < e^{-40}$)을 나타냈다. 소 염기서열

과 높은 유사성을 나타낸 17,437개 클론의 말단염기서열 중 7,319개 클론이 한 쪽만 높은 유사성 (single-end hit)을 나타냈으며, 10,118개 클론은 양쪽 모두에서 높은 유사성 (paired-end hits)을 나타냈다. 한쪽 말단 염기서열만 높은 유사성을 나타낸 7,319개 클론 중 5,104개 클론은 소유전체 염기서열의 한 곳에만 유사도 (single hit)를 나타냈고 2,215개 클론의 경우는 여러 곳과 유사도 (multiple hits)를 보여주었다. 양쪽 말단염기서열 모두에서 유사도를 나타낸 10,118개 클론 중 814개 클론의 경우 두 말단염기서열이 각각 서로 다른 염색체의 일부분과 유사도를 나타냈고, 9,304개 클론의 경우 두 말단염기서열 모두 같은 염색체와 유사성을 보여주었다. 양쪽 말단 염기서열이 모두 같은 염색체에 유사성을 보여준 9,304개의 클론 중 각각의 양쪽 말단염기서열이 소 염기서열의 한 부분과만 유사도 (single hit)를 나타낸 클론의 수는 4,562개 이며, 양 말단 중 한 쪽 이라도 여러 곳과 유사도 (multiple hits)를 나타내는 클론의 숫자는 4,742개 이다. 이렇게 한우 BAC클론 말단염기서열 (BES)과 30쌍의 소 염색체가 갖고 있는 염기서열을 비교분석 (blast analysis)한 결과를 바탕으로 각 클론의 염색체상의 위치를 파악하여 유전체 지도를 작성하였다. Fig. 1은 한우 박테리아인공염색체 클론에 대한 염색체지도 중 8번 염색체에 대해서만 하나의 예로 제시하였으며 모든 염색체에 대한 유전체 지도는 소유전체연 구소재은행의 홈페이지 (<http://bovinebank.kr>)에 공개할 예정이다. BAC 클론의 염색체상 위치 파악에는 각 BAC 클론의 양쪽 말단염기서열 모두가 같은 번호의 소 염색체 염기서열과 높은 유사성 ($E < e^{-40}$)을 보이는 (paired-ends hits) 클론을 먼저 선별하였다. 따라서 Table 2에서 표기한 것처럼 같은 염색체 상에 두 말단 염기서열이 모두 유사도를 보이는 9,304개 클론에 대한 분석을 실시하였다. 이 중에서 한쪽 또는 양쪽 모두 같은 염색체에 2곳 이상과 유사도를 나타내는 클론 (4,742개)의 경우 E-value의 점수를 고려하여 양쪽 말단염기서열 모두 높은 E-value 점수로 같은 염

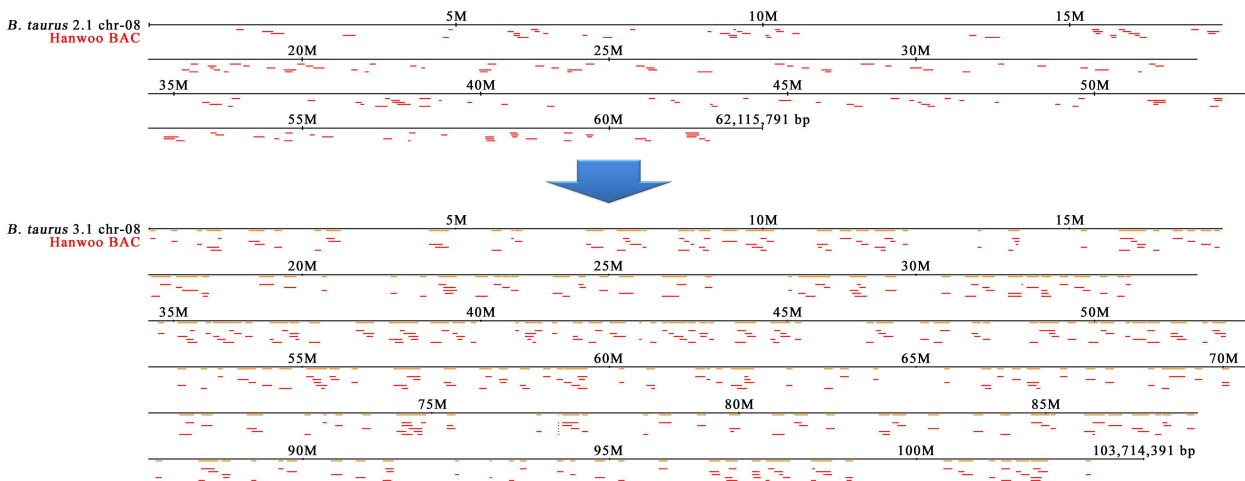


Fig. 1. Hanwoo BESs mapping results comparison between *B. taurus* 2.1 and *B. taurus* 3.1. Coverage increased 266% by mapped BAC clone length.

Table 2. A comparison of Hanwoo BESs mapping against *B. taurus* 2.1 and *B. taurus* 3.1. Of the 9,595 clones used in map construction, 3,158 clones did not overlap (HW_BAC_Number) while 6,437 clones did. The total length after removing the overlaps (HW_BAC_length) was 907,203,954 bp. Map coverage, therefore, is approximately 32.27% since the length of the current *B. taurus* 3.1 genome is estimated at 2,434,234,369 bp.

<i>B. taurus</i> Chromosome	<i>Bos taurus</i> Chr_length			HW_BAC_length						HW_BAC_Number		
	<i>B. taurus</i> 2.1	<i>B. taurus</i> 3.1	increase	<i>B. taurus</i> 2.1	Coverage	<i>B. taurus</i> 3.1	Coverage	Length increase	Coverage increase	<i>B. taurus</i> 2.1	<i>B. taurus</i> 3.1	increase
1	102,834,029	146199855	142.17%	30672795	29.83%	52129052	35.66%	169.95%	119.54%	316	570	180.38%
2	86543008	125830715	145.40%	27334393	31.58%	48461024	38.51%	177.29%	121.94%	285	505	177.19%
3	85360813	116487270	136.46%	28082663	32.90%	44504302	38.21%	158.48%	116.13%	272	453	166.54%
4	69556449	110873015	159.40%	21883387	31.46%	44291782	39.95%	202.40%	126.98%	227	471	207.49%
5	76426644	118991210	155.69%	21464254	28.08%	45455049	38.20%	211.77%	136.02%	218	472	216.51%
6	69624268	111759995	160.52%	17446326	25.06%	39090138	34.98%	224.06%	139.58%	185	401	216.76%
7	69141744	100843871	145.85%	18516527	26.78%	35192296	34.90%	190.06%	130.31%	188	601	319.68%
8	62115791	103714391	166.97%	17202479	27.69%	38865881	37.47%	225.93%	135.31%	170	403	237.06%
9	64650424	95030419	146.99%	20477371	31.67%	37352576	39.31%	182.41%	124.10%	206	397	192.72%
10	70001009	95818654	136.88%	23017085	32.88%	37909957	39.56%	164.70%	120.33%	227	377	166.08%
11	87172399	101635058	116.59%	24311090	27.89%	40270943	39.62%	165.65%	142.08%	250	426	170.40%
12	48608624	77661216	159.77%	16371357	33.68%	32507949	41.86%	198.57%	124.28%	167	338	202.40%
13	62721844	83371483	132.92%	19093069	30.44%	33834666	40.58%	177.21%	133.32%	188	334	177.66%
14	50711261	82229632	162.15%	16611804	32.76%	33298557	40.49%	200.45%	123.62%	159	359	225.79%
15	53815408	75235388	139.80%	13547880	25.17%	25157919	33.44%	185.70%	132.83%	133	258	193.98%
16	56991954	72834534	127.80%	15328631	26.90%	28491481	39.12%	185.87%	145.44%	153	261	170.59%
17	45915461	70149481	152.78%	12610219	27.46%	27938268	39.83%	221.55%	145.01%	125	275	220.00%
18	56508949	62891490	111.29%	14268017	25.25%	21424374	34.07%	150.16%	134.92%	132	211	159.85%
19	56387648	63471274	112.56%	16665300	29.55%	24606257	38.77%	147.65%	131.17%	170	250	147.06%
20	42952723	68513148	159.51%	14542803	33.86%	26311392	38.40%	180.92%	113.43%	134	255	190.30%
21	49724630	63018605	126.74%	14991237	30.15%	23730749	37.66%	158.30%	124.90%	146	238	163.01%
22	48330986	59883977	123.90%	15121607	31.29%	23852080	39.83%	157.74%	127.30%	165	246	149.09%
23	41602928	48658295	116.96%	14267882	34.30%	19947919	41.00%	139.81%	119.54%	150	214	142.67%
24	45245742	60067927	132.76%	14452001	31.94%	23560487	39.22%	163.03%	122.80%	134	245	182.84%
25	41414979	42406217	102.39%	10353438	25.00%	15806658	37.27%	152.67%	149.10%	102	176	172.55%
26	35715000	47909400	134.14%	10685423	29.92%	17843087	37.24%	166.99%	124.48%	102	189	185.29%
27	31566707	43263251	137.05%	11359107	35.98%	18173946	42.01%	159.99%	116.74%	110	196	178.18%
28	34887537	40448552	115.94%	10896445	31.23%	14260150	35.26%	130.87%	112.88%	109	141	129.36%
29	45822729	45135891	98.50%	12711798	27.74%	15963444	35.37%	125.58%	127.49%	126	167	132.54%
X	48857030	99900155	204.47%	6340664	12.98%	16971571	16.99%	267.66%	130.90%	56	166	296.43%
Total	1,741,208,718	2,434,234,369	139.80%	510,627,052	29.33%	907,203,954	37.27%	177.66%	127.08%	5,105	9,595	187.95%

색체와 유사도를 나타낼 때만 유전체지도 작성에 사용하였다. 또한, 본 연구에 사용된 BAC 클론에 삽입된 한우 염색체 DNA의 평균 크기가 약 140 kb (Chae 등, 2007)로 추정되므로, 양쪽 말단염기서열이 같은 염색체에 유사성을 나타낸 총 9,304개의 클론 중 양쪽 말단염기서열간의 간격이 300 kb 이상인 클론을 제외한 나머지 8,505개 클론만 1차적으로 유전체지도 작성에 사용하였다.

1차적으로 지도 작성에 사용되지 않은 클론 중 $E < e^{-40}$ 조건으로 소 염색체 염기서열과 유사성을 나타내지 않은 2,716개 클론과 반복염기서열 제거 후 한쪽의 말단염기서열만 유사성을 나타내고 다른 쪽은 유사도를 보이지 않은 (single-end hit) 7,319개의 클론에 대하여 낮은 e-value ($E < e^{-10}$)에서 2차 유사성 비교를 다시 시도하였다. 2차 유사성 비교를 통해 선발된 클론들 중 양쪽 말단염기서열의 크기가 300 kb가 넘는 것을 제외한 1,090개 클론에 대해 추가로 유전체지도 작성을 하였다. 따라서 1차 분석 8,505개와 2차 분석 1,090개, 총 9,595 BAC 클론의 염색체상 위치가 밝혀졌다. 지난 번 COMPASS 프로그램을 이용해 제작된 한우의 제2차 소 조사혼용지도 (Everts-van der Wind 등, 2004; Chae 등, 2007)에 올려진 629개의 양쪽 말단 염기서열에 모두 유사성이 있는 (paired-ends hit) 클론 중 265개만이 이번 지도 작성에 포함되었다. 또한, 이번 유전자 지도 작성에 사용된 9,595개 BAC 클론의 평균 insert 크기가 약 126.8 kb 인 것으로 계산되므로 예상한 한우 BAC 클론의 평균 크기와 유사하다. 현재까지 전체 소 염색체에 대한 염기서열이 밝혀지지 않은 상태 이므로 향후에 보다 정확한 소의 염색체 염기서열이 밝혀지고 유전자의 지도가 작성 될 경우 지금까지 말단염기서열 분석을 마친 클론 중 보다 많은 한우 BAC 클론이 소 유전자 지도에 더 올라갈 수 있을 것으로 예상된다. 아직까지 말단염기서열이 밝혀지지 않은 나머지 약 130,000개의 BAC 클론에 대한 염기서열 분석 작업이 완료될 경우 보다 자세한 한우 BAC 클론 지도가 완성 될 것이고, 이에 따른 한우 유전체 분석 및 소 품종간의 차이를 규명할 수 있는 특이 염기서열 규명에 큰 역할을 할 수 있을 것으로 판단되며, 아울러 외국소의 WGS (Whole Genome Shotgun) 데이터를 보완 하는데 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

현재 NCBI에 등록되어있는 *Bos taurus*의 유전체 염기서열은 Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center에서 whole genome shotgun 방식에 의해 밝혀진 서열을 조합 (assembly)하여 만든 것으로 annotation을 위해 데이터를 고정시킨 시간은 2006년 12월 20일 이며, 2007년 1월 3일 공개된 Build 3.1 (based on Btau_3.1) 이다. 본 서열은 3,054개의 contig로 구성되어 있으며 각 contig 사이엔 10,000개의 N이 포함되어 연결이 되어 있다. 하지만 각 contig는 실제 매우 많은 NGAP을 포함하고 있어, 전체적으로는 97,891개의 NGAP을 포함하고 있다 (Table 2).

지도에 사용된 9,595개의 클론 중 중복 (overlapping)되지 않는 클론은 모두 3,158개 이며 중복 되거나 다른 클론에

포함 되는 클론 수는 모두 6,437개로서, 겹치는 영역을 제거한 총 길이는 907,203,954 bp이다. 현재 NCBI Btau_3.1의 전체 길이가 2,434,234,369 bp 이므로 약 37.27%의 coverage를 보여준다 (Table 2). 이는 남은 130,000여 개의 클론을 모두 분석할 경우 수치상 230%의 coverage로서 거의 완벽에 가까운 유전체지도를 작성할 수 있을 것으로 판단된다.

NCBI의 소 유전체 데이터 B_tau2.1에 비해 B_tau3.1은 전반적으로 139.8% 길이가 늘어났다. 그 결과에 따라 한우의 말단염기서열의 매핑 결과 밝혀진 외국소 유전체 서열에 대한 한우 유전체 클론의 coverage는 약 29.33%에서 37.27%로 늘어나 전반적으로 127% 증가하였으며, 양쪽 말단이 B_tau2.1에 매핑된 클론 숫자는 5,105 비해 B_tau3.1은 9,595 클론이 매핑되어 전반적으로 188% 증가하였다. 하지만 이와 같이 매우 높은 E-value로 BLAST를 수행했음에도 불구하고 BLAST 결과가 나오지 않는 클론이 많은 이유는 한우의 특이적인 서열일 수도 있으며 NCBI의 소 유전체 데이터 (B_tau3.1)가 아직 완벽하지 못한 가능성도 있으나 후자일 확률이 더 높을 것으로 판단된다. 또한 이와 반대로 매우 많은 곳에 매핑이 된 경우는 현재까지 밝혀진 반복염기서열 데이터베이스 (Reptbase)가 완벽하지 않다는 증거로 여겨진다. 또한 서로 다른 염색체에 매핑이 된 경우는 WGS (Whole Genome Shotgun) 데이터의 조합이 완벽하지 않다는 증거로도 여겨진다.

IV. 요약

최근 한우의 유전체 연구의 핵심 소재인 박테리아인공 염색체 (BAC; Bacterial Artificial Chromosome) 클론이 제작되었고 이에 대한 염기서열의 해독과 이를 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 소 유전체 데이터 (B_tau 2.1)와 비교 분석하여 한우의 유전체지도 초안 (제2세대 한우유전체지도)이 제작되었다. 본 연구에서는 기존에 확보한 한우의 박테리아인공염색체 클론의 염기서열을 최근에 공개된 소유전체 데이터 (B_tau 3.1)와 비교 분석하여 한우 유전체 지도를 최신화하기 위해 실시하였다. 제2세대 한우유전체지도에서 총 5,105개의 클론에 대한 염색체상 위치가 결정된 반면에 제3세대 한우유전체지도에서는 총 9,595개의 클론에 대한 염색체 위치가 결정되어 약 2배 정도로 향상되었다. 또한 겹치는 부분을 제외했을 때 제3세대 한우유전체지도에 사용된 클론은 소 전체 염색체의 약 37.27%에 해당되는 부분을 커버하는 것으로 나타났다. 앞으로 추가적인 한우 클론의 염기서열 해독을 통해 얻어진 데이터를 확보한다면 한우염색체 정밀 지도의 완성과 이를 이용한 한우 개량에 유용한 유전자 발굴에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

(주요어 : 한우, 박테리아인공염색체 말단서열분석, 유전체 지도)

V. 사 사

본 논문의 저자들은 논문 발표를 위한 자료 분석 및 논문 편집에 큰 도움을 주신 인제의대 기생충학교실 생물정보팀, 영남대학교 생명공학부 분자생물학연구실 및 소유전체연구소재은행의 모든 연구원들에게 진심으로 감사함을 표합니다. 이 논문은 2008년도 교육과학기술부의 재원으로 한국과학재단(208-C-000-073)의 지원을 받아 수행된 연구임.

VI. 인 용 문 헌

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-410.
2. Band, M. R., Larson, J. H., Rebeiz, M., Green, C. A., Heyen, D. W., Donovan, J., Windish, R., Steining, C., Mahyuddin, P., Womack, J. E. and Lewin, H. A. 2000. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Res.* 10:1359-1368.
3. Barendse, W., Vaiman, D., Kemp, S. J., Sugimoto, Y., Armitage, S. M., Williams, J. L., Sun, H. S., Eggen, A., Agaba, M., Aleyasin, S. A., Band, M., Bishop, M. D., Buitkamp, J., Byrne, K., Collins, F., Cooper, L., Coppettiers, W., Denys, B., Drinkwater, R. D., Easterday, K., Elduque, C., Ennis, S., Erhardt, G., Ferretti, L., Flavin, N., Gao, Q., Georges, M., Gurung, R., Harlizius, B., Hawkins, G., Hetzel, J., Hirano, T., Hulme, D., Jorgensen, C., Kessler, M., Kirkpatrick, B. W., Konfortov, B., Kostia, S., Kuhn, C., Lenstra, J. A., Leveziel, H., Lewin, H. A., Leyhe, B., Lil, L., Burriel, I. M., McGraw, R. A., Miller, J. R., Moody, D. E., Moore, S. S., Nakane, S., Nijman, I. J., Olsaker, I., Pomp, D., Rando, A., Ron, M., Shalom, A., Teale, A. J., Thieven, U., Urquhart, B. G. D., Vage, D.-I., Weghe, A. V. d., Varvio, S., Velmala, R., Vilkki, J., Weikard, R., Woodside, C., Womack, J. E., Zanotti, M. and Zaragoza, P. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome *Mammalian Genome.* 8:21-28.
4. Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
5. Chae, S. H., Kim, J. W., Choi, J., Larkin, D. M., Everts-Van Der Wind, A., Park, H. S., Yeo, J. S. and Choi, I. 2007. Chromosomal localization of Korean cattle (Hanwoo) BAC clones via BAC end sequence analysis. *Asian-australasian journal of animal sciences.* 20:316-327.
6. Choi, J. M., Chae, S. H., S. W., K., Choi, D. S., Lee, Y. S., Park, H. S., Yeo, J. S. and Choi, I. 2007. Localization of the 5,105 Hanwoo (Korean cattle) BAC clones on Bovine Chromosome by Analyzing BAC End Sequences (BESs) of the 21,024 clones. *Asian-australasian journal of animal sciences.* 20:1636-1650.
7. Choi, S. H., Kim, I. C., Kim, D. S., Kim, D. W., Chae, S.

- H., Choi, H. H., Choi, I., Yeo, J. S., Song, M. N. and Park, H. S. 2006. Comparative genomic organization of the human and bovine PRNP locus. *Genomics.* 87:598-607.
8. Everts-van der Wind, A., Kata, S. R., Band, M. R., Rebeiz, M., Larkin, D. M., Everts, R. E., Green, C. A., Liu, L., Natarajan, S., Goldammer, T., Lee, J. H., McKay, S., Womack, J. E. and Lewin, H. A. 2004. A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Res.* 14:1424-1437.
9. Ewing, B. and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8:186-194.
10. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C. and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175-185.
11. Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K. M., Snelling, W. M., Kappes, S. M., Beattie, C. W., Bennett, G. L. and Sugimoto, Y. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* 14:1987-1998.
12. Itoh, T., Watanabe, T., Ihara, N., Mariani, P., Beattie, C. W., Sugimoto, Y. and Takasuga, A. 2005. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. *Genomics.* 85:413-424.
13. Jurka, J., Kapitonov, V. V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O. and Walichiewicz, J. 2005. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res.* 110:462-467.
14. Kelley, J. M., Field, C. E., Craven, M. B., Bocskai, D., Kim, U. J., Rounsley, S. D. and Adams, M. D. 1999. High throughput direct end sequencing of BAC clones. *Nucleic Acids Res.* 27:1539-1546.
15. Kim, U. J., W., B. B., T., S., V., M., C., B., L., K. H., I., S. M. and H., S. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics.* 34-2: 213-218.
16. Larkin, D. M., Everts-van der Wind, A., Rebeiz, M., Schweitzer, P. A., Bachman, S., Green, C., Wright, C. L., Campos, E. J., Benson, L. D., Edwards, J., Liu, L., Osoegawa, K., Womack, J. E., de Jong, P. J. and Lewin, H. A. 2003. A cattle-human comparative map built with cattle BAC-ends and human genome sequence. *Genome Res.* 13:1966-1972.
17. Womack, J. E., Johnson, J. S., Owens, E. K., Rexroad, C. E., 3rd, Schlapfer, J. and Yang, Y. P. 1997. A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mamm Genome.* 8:854-856.
18. Yu, S. L., Kim, J. E., Chung, H. J., Jung, K. C., Lee, Y. J., Yoon, D. H., Lee, S. H., Choi, I., Bottema, C. D., Sang, B. C. and Lee, J. H. 2005. Molecular cloning and characterization of bovine PRKAG3 gene: structure, expression and single nucleotide polymorphism detection. *J. Anim Breed Genet.* 122: 294-301.

(접수일자 : 2009. 1. 19. / 수정일자 : 2009. 4. 14. / 채택일자 : 2009. 4. 16.)