

한우 Exostosin-1 유전자의 SNP 탐색 및 경제형질 관련성 분석

김범수¹ · 김남국¹ · 이승환¹ · 조용민² · 허강녕¹ · 박응우³ · 양부근⁴ · 윤두학^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²농촌진흥청 기획조정관실,

³농촌진흥청 연구정책국, ⁴강원대학교 동물생명과학대학 동물자원과학전공

Association Study Between the Polymorphisms of Exostosin-1 Gene and Economic Traits in Hanwoo

Bum-Soo Kim¹, Nam-Kuk Kim¹, Seung-Hwan Lee¹, Yong-Min Cho², Kang-Nyeong Heo¹, Eung-Woo Park³,
Boo-Keun Yang⁴ and Duhak Yoon^{1*}

¹Animal Genomics & Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, R. D. A., Korea

²Green Growth & Future Strategy Team, R. D. A., Korea

³Cooperation & Governance Unit Research Policy Planning Division Research Policy Bureau, R. D. A., Korea

⁴Department of Animal Resources Science, Kangwon National University, Korea

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the polymorphism on exostosin-1 (EXT1) gene and to associate with economic traits in Hanwoo (Korean cattle). We sequenced for detection of single nucleotide polymorphism (SNP) with 24 unrelated individuals and identified four SNPs (T272196A, C272359T, G290964A and A302092G). Relationship between the genotypes of 583 Hanwoo individuals by PCR-RFLP and economic traits were analyzed by general linear model. In EXT1 gene, there were four SNPs associated with economic traits such as eye muscle area breeding value, marbling score breeding value, backfat and thickness breeding value ($p < 0.05$ to $p < 0.01$). In conclusion, this study indicates an important role of EXT1 gene in determining the meat quality or economic characteristics in Hanwoo.

(Key words : Hanwoo, EXT1, SNP, PCR-RFLP)

서 론

가축의 개량에 있어서 경제 형질과 관련된 양적형질유전자좌위 (QTL)를 검출 하려는 많은 연구가 진행되어져 왔으며, 유전적 표지인자(DNA marker)를 이용하여 이를 통한 가축의 육종가 추정 이 이루어지고 있다. 이러한 시도는 동물 각 개체가 가지고 있는 유전자 변이의 구조를 파악한 후 유전자변이와 표현형간의 연관분석을 통해 각 유전자 변이가 갖는 유전값(genetic value) 및 통계적 유의성을 기반으로 형질과 관련한 DNA 마커를 선발 하고, 이를 통한 표지인자 도움선발(Marker-Assisted Selection; MAS)에 궁극적으로 이용하려고 한다(Lande와 Thompson, 1990; Darvasi와 Soller, 1994). 경제형질과 관련된 DNA 표지인자의 개발에 기초가 되는 후보 유전자의 선택은 유전자의 기능을 바탕으로 하는 접근법과 다른 종에서의 결과를 바탕으로 비교유전체 방법을 이용한 위치 접근방법, 소 genome 전체에 존재하는 microsatellite 혹

은 이미 얻어진 bovine genome 연구 결과를 이용하여 경제형질에 영향을 줄 수 있는 위치를 찾아내는 QTL 분석 방법들이 주로 이용 되고 있다(유 등, 2006).

Exostosin-1 (EXT1) 유전자는 소 염색체 14 (BTA14) 46.3cM 영역에 위치하며 (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/cow/>), 이 영역은 QTL 연구를 통해 근내지방도(31-86cM) 및 도체중(43-79cM)과 관련되어 있음이 보고되어 있으나(Casas 등, 2003; Kim 등, 2003), 현재까지 EXT1 유전자와 경제형질과의 관련성 연구는 진행된 바 없다. EXT1 유전자는 인간의 경우 8번 염색체에 위치하며 다발성 외골증 환자에서 암 억제 유전자로 작용한다고 최초로 보고되었고 746개의 아미노산을 암호화 하며(Ahn 등, 1995), 11개의 exon 영역을 가지고 있다(Ludecke 등, 1997). 또한 각 중간 염색체의 위치는 다르지만 cDNA을 비교하였을 때 모두 99% 이상의 높은 상동성을 가지고 있다. EXT1 단백질은 세포 내 기질과 표면에서 proteoglycans의 발현에 매우 중요한 역할을

* Corresponding author : Dr. Duhak Yoon, Animal Genomics & Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science, R. D. A., Suwon, 441-706, Republic of Korea. Tel: +82-31-290-1603, E-mail: dh.yoon@korea.kr

하며, 이러한 proteoglycans은 뼈, 연골, 인대, 피부 등에서 구성 물질 혹은 세포나 조직의 보호물질이나 재생에 관여한다(Hecht 등, 1995; Raskind 등, 1995). 또한 EXT1은 N-deacetylase/N-sulfotransferase (NDST)의 발현에 영향을 주며, NDST의 발현은 heparan sulfate (HS) sulfation을 조절하여 proteoglycans과 같은 단백질과의 결합으로 인한 다양한 생리학적 반응에 영향을 미친다(Presto 등, 2008). 기존의 다양한 연구들을 통해 EXT1 유전자가 세포나 조직의 형성 및 생리적 반응에 관여함이 보고되었으나, 아직까지 정확한 기능이 규명되지는 않고 있다. 따라서 소 QTL 연구 및 유전자 기능적 측면을 고려할 때 EXT1 유전자가 가축형질과 관련되어 있을 것으로 판단된다.

따라서 본 연구는 근내지방도 및 도체중 관련 QTL 영역 내에 위치하는 EXT1 유전자 염기서열을 결정하여 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 발굴하고, 각 SNP와 경제형질과의 관련성을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 genomic DNA 추출

한우 후대검정을 통하여 혈통기록과 도체성적을 보유하고 있는 제 32차~35차 후대검정우 집단 총 583두를 공시축으로 선정하여 실험을 수행하였다. 공시축의 genomic DNA는 개체로부터 혈액을 채취하고 genomic DNA의 분리 및 정제는 Miller 등(1988)의 salting out 방법을 수정보완하여 분리 정제하였으며 spectrophotometer를 이용하여 DNA 농도를 측정 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA)에 용해하여 냉동고에 보존하면서 실험에 이용하였다.

2. PCR primer 설계 및 증폭

EXT1 유전자로부터 SNP를 검출하기 위하여 한우 24두를 이용하여 염기서열 결정을 하였다. 한우 EXT1 유전자의 증폭을 위한 primer는 NCBI GenBank에 등록된 염기서열(GenBank Accession no. NC_007312)을 근거로 exon 영역 양쪽의 intron이 약 200 bp 정도 포함 되도록 하여 Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) 프로그램을 이용하여 primer를 제작하였다(Table 1). PCR 반응은 template DNA 1 ul (50 ng), 10×PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 2.5 mM dNTPs, 10 pmol primer, 1 unit Taq polymerase (G&P, Korea)를 사용하여 총 반응액 15 ul로 보정 후 PTC-240 DNA Engine Tetrad 2 Cycler(MJ reserch, USA)를 이용하여 반응을 수행하였다. 합성 반응은 95℃에서 10분간 최초 변성(pre-denaturation) 시킨 후, 95℃에서 40초 동안 변성(denaturation), 61℃에서 40초간 접합(annealing), 그리고 72℃에서 1분간 합성(extension) 반응의 3단계를 35회 반복한 후 72

℃에서 마지막 합성(final extension)을 10분간 수행하였다. PCR이 끝난 후 3 ul의 PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동을 실시하고 UV 상에서 증폭 여부를 확인하였다.

3. 염기서열 분석

증폭된 PCR 산물을 MultiScreen® PCR 96-Well Plate kit (Millipore, USA)을 사용하여 정제 후, PCR-direct sequencing 방법으로 유전자의 염기서열을 분석하였다. 먼저 정제한 PCR 산물 2 ul에, Big-dye terminator (Applied Biosystems, USA) 0.5 ul, 5 pmol의 primer 1 ul, 5X buffer(400 mM tris, 10 mM MgCl₂) 1.75 ul를 넣고, 총 반응액을 10 ul로 조정하였다. PCR 온도 조건은 95℃에서 10초간 denaturation, 50℃에서 5초간 annealing, 60℃에서 4분간 extension의 3단계과정을 35회 반복 수행하였다. PCR 산물은 isopropanol 및 ethanol 정제 과정 후, 건조된 pellet에 8 ul의 Hi-Di formamide를 넣고 95℃에서 2분간 변성(denaturation) 과정을 거쳐, 50 cm의 capillary를 장착한 염기서열 분석기(ABI 3730, Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 결정하였고 염기서열 변이 분석은 SeqMan 프로그램(DNAstar, USA)을 이용하여 실시하였다.

4. PCR-RFLP을 이용한 유전자형 결정

PCR-direct sequencing을 통해 SNP를 확인하고, PCR-RFLP법을 이용하여 유전자형 분석을 실시하였다. 각 SNP에 대한 제한효소 등은 Table 2에 나타내었다.

PCR-RFLP 분석은 PCR 반응물 5 ul에 제한효소 1~1.5 unit을 첨가하고 각 제한효소별 활성온도에서 3시간 이상 반응 시킨 후 절단된 DNA 단편의 크기를 고려하여 ethidium bromide가 포함된 2~3% agarose gel에 전기영동한 후, 나타난 DNA band 양상 분석을 통해 최종적으로 각 개체별 SNP 유전자형을 판정하였다.

5. 경제형질과의 통계적 연관성 분석

도체 형질에 대한 육종가 추정치(estimated breeding value)와 각 SNP의 유전자형간 연관성 분석은 R package의 회귀분석모형(linear regression model)을 이용하여 분석하여 p value 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 인정하였고 분석 모형은 아래와 같다.

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

위 식에서,

$$Y_{ij} = \text{육종가 추정치}$$

$$\mu = \text{각 육종가의 평균}$$

$$G_i = i \text{ 번째 SNP 유전자형의 효과}$$

$$e_{ij} = \text{임의오차}$$

Table 1. Primer list for SNP discovery and genotyping of exostosin-1 (EXT1) gene

| Primer ID | Length | Primer sequences (5'-3') | Product size (bp) | PCR stie |
|-----------|--------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|
| EXT1-1F | 20 | cattgtgcaacccaagatg | 732 | Exon 1 |
| EXT1-1R | 20 | tgaggtgacaactgggtctcg | | |
| EXT1-2F | 20 | cacagcaaaaaggggagaaa | 781 | Exon 1 |
| EXT1-2R | 20 | caactctgggtcctcagctc | | |
| EXT1-3F | 20 | ctgagcaagccaaaatgtca | 574 | Exon 2 (T272196A PCR-RFLP) |
| EXT1-3R | 20 | gtccaaaggcagggtgtaaa | | |
| EXT1-4F | 20 | atggggttttcacattccaa | 521 | Exon 3 |
| EXT1-4R | 20 | cctggatctgaggagactgc | | |
| EXT1-5F | 20 | tggcatctcattgtttcca | 465 | Exon 4 |
| EXT1-5R | 20 | ggatgccatgagtgtgaatg | | |
| EXT1-6F | 20 | tttgaaggagcaggactt | 490 | Exon 5 |
| EXT1-6R | 20 | gggacttgagttccaacaa | | |
| EXT1-7F | 20 | tggaaatgggccttaaatg | 432 | Exon 6 (G290964A PCR-RFLP) |
| EXT1-7R | 20 | gtgtagcaggaaggagtgg | | |
| EXT1-8F | 20 | tctgtcccctctctggttg | 682 | Exon 7 |
| EXT1-8R | 20 | tgacctccatgggaaaagaa | | |
| EXT1-9F | 20 | ctctggccttcttgactg | 840 | Exon 8 |
| EXT1-9R | 20 | tggatcgtgtggtttcaaga | | |
| EXT1-10F | 20 | ggcaaaatgtcaagcagtc | 514 | Exon 9 (A302092G PCR-RFLP) |
| EXT1-10R | 20 | taacgatgcaacaagccaag | | |
| EXT1-11F | 20 | ctgcatctgtggatgtctctg | 497 | Exon 10 |
| EXT1-11R | 20 | gagcaaaagcaaggaggaga | | |
| EXT1-12F | 20 | gacctgtgcttgcatttca | 564 | Exon 11 |
| EXT1-12R | 20 | tggaacagtcctgtgcagtc | | |
| EXT1-E1F | 20 | ttactccgcctcttcta | 366 | Exon 2 (C272359T PCR-RFLP) |
| EXT1-E1R | 20 | gtccaaaggcagggtgtaaa | | |

결과 및 고찰

1. EXT1 유전자의 염기서열 분석 및 SNP 탐색

한우 EXT1 유전자의 염기서열 결정 결과, 11개의 exon 영역과 exon의 주변 100 bp 이상의 intron 영역을 포함하여 총 약 6.8 kb 정도의 염기서열을 확인 할 수 있었다. 유전자의 exon 영역을 확인한 이유는 유전자의 exon 영역은 아미노산을 암호화하는 영역으로 유전자의 변이가 발생하는 경우 아미노산의 변화를 초래하여 단백질 기능에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 크기 때문이다 (Chasman과 Adams, 2001; Sunyaev 등, 2001). 결정된 염기서열

은 기존의 NCBI GenBank (GenBank Accession no. NC_007312)에 보고된 염기서열과 99% 이상의 상동성을 나타냈다.

SNP는 염기서열의 변이 빈도가 0.01 이상이며 (Kruglyak와 Nickerson, 2001) homo형과 hetero형의 염기가 모두 나타난 좌위를 SNP로 선정하였다. SNP 탐색 결과 intron 1에서 T272196A, exon 2에서 C272359T, intron 6에서 G290964A 그리고 intron 8에서 A302092G 총 4개의 SNPs를 확인 할 수 있었다 (Fig. 1). EXT1 유전자의 exon 2에서 발견된 C272359T SNP는 Arg (R) 아미노산을 암호화하는 코돈 (CG C→U)으로 아미노산에 변화를 주지 않는 synonymous SNP임을 확인하였다. 발굴된 4개의 SNPs는 0.2~0.4 사이의 높은 변이 빈도를 나타내었으며, 기존의

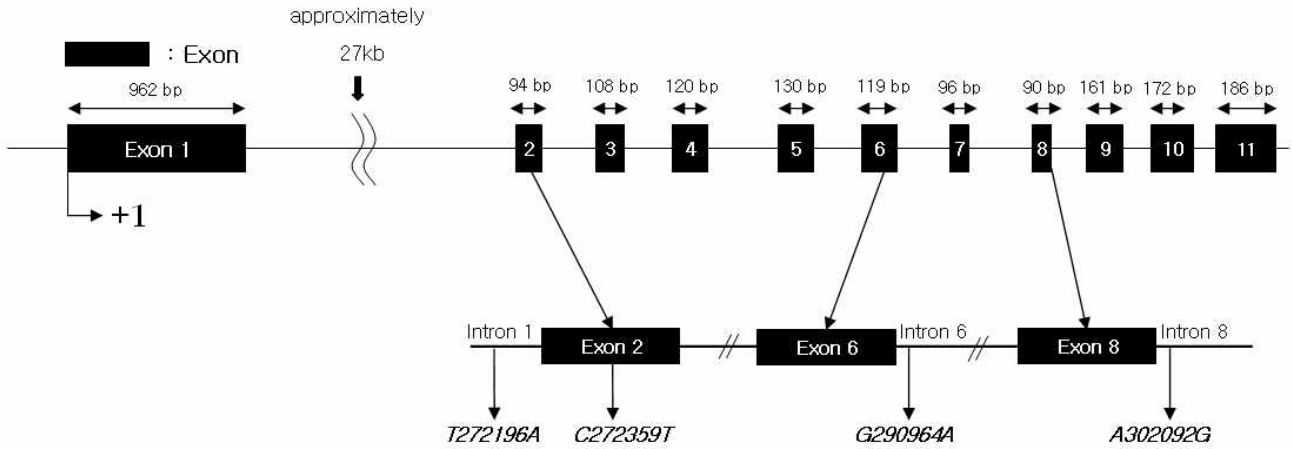


Fig. 1. The position of PCR region (soild line with arrows) and SNPs detected in Hanwoo exostosin-1 (EXT1) gene.

GenBank에서 보고 된 338개의 소 EXT1 유전자의 SNP 정보와 비교하여 볼 때 모두 새로운 SNPs인 것으로 나타났다.

2. EXT1 유전자형 분석

PCR-direct sequencing에 의해 발굴한 SNPs들은 모두 제한효소 인식부위를 가지고 있어 PCR-RFLP법을 이용하여 유전자형 분석을 실시하였다. 제한효소 인식부위가 1부위인 경우는 SNP 탐색에 사용한 PCR primer를 그대로 사용하고, 다수 존재하는 C272359T 좌위의 경우는 PCR primer를 다시 설계하여 PCR 증폭반응을 수행하고 PCR-RFLP법을 이용하여 유전자형 분석을 실시하였다(Table 1). 총 583두의 공시축의 개체별 유전자형을 확인하기 위해 각 SNP 부위에 대하여 PCR-RFLP 분석을 위한 제한효소와 제한효소 최적반응온도 및 검출된 유전자형별 PCR-RFLP

절편 크기를 결정하였다(Table 2). 제한 효소 처리 후 전기영동은 각 단편의 크기를 고려하여 약 2~3%의 agarose gel에 전기영동하였으며, 검출된 DNA 절편 양상을 분석하여 각 유전자형을 결정하였다(Fig. 2). PCR-RFLP를 통해 검출된 총 583두의 공시축에 대한 유전자형의 출현 빈도를 계산한 결과를 Table 3에 제시하였다.

3. 한우 경제형질과의 통계적 연관성 분석

PCR-RFLP를 통해 검출된 총 583두의 공시축에 대한 유전자형과 도체형질의 육종가 추정치(estimated breeding value)와 연관성 분석결과 4개의 SNPs 중 T272196A, G290964A 및 A302092G SNPs에서 유의적인 연관성이 관찰되었으나, 다른 1개의 SNP C272359T SNP에서는 유의적 연관성을 확인할 수 없었

Table 2. Restriction enzyme for PCR-RFLP of exostosin-1 (EXT1) gene in Hanwoo

| SNP | Restriction enzyme | SNP genotype | Fragment size(bp) | Reaction temp.(°C) |
|----------|---|--------------|-------------------|--------------------|
| T272196A | <i>CviQ I</i> (5'...G▼TAC...3') | AA | 574 | 25 |
| | | AT | 574 414 160 | |
| | | TT | 414 160 | |
| C272359T | <i>Cac8I</i> (5'...GCN▼NCG...3') | TT | 366 | 37 |
| | | CT | 366 249 117 | |
| | | CC | 249 117 | |
| G290964A | <i>BstXI</i> (5'...CCANNNNN▼NTGG...3') | AA | 432 | 37 |
| | | AG | 432 348 84 | |
| | | GG | 348 84 | |
| A302092G | <i>Ban II</i> (5'...GRGCY▼C...3') | AA | 541 | 37 |
| | | AG | 541 362 179 | |
| | | GG | 362 179 | |

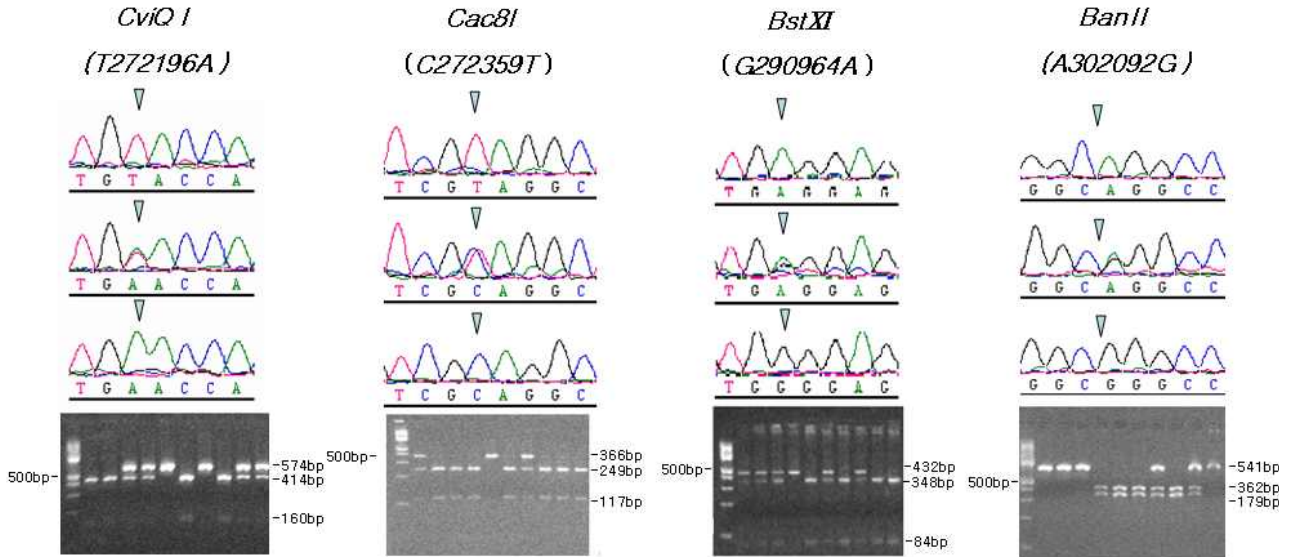


Fig. 2. PCR-RFLP patterns and sequence chromatograms of 4 SNPs detected in Hanwoo exostosin-1 (EXT1) gene. The left lane on each electrophoretic pattern is standard size marker of 100 bp DNA ladder.

Table 3. Genotype and allele frequencies of SNPs in Hanwoo exostosin-1 (EXT1) gene

| SNP position | Frequencies | | | | |
|--------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| | Genotype | | | Allele | |
| T272196A | AA | AT | TT | A | T |
| | 0.1913 | 0.4734 | 0.3353 | 0.4280 | 0.5720 |
| C272359T | CC | CT | TT | C | T |
| | 0.6842 | 0.2594 | 0.0564 | 0.8139 | 0.1861 |
| G290964A | AA | AG | GG | A | G |
| | 0.0545 | 0.2538 | 0.6917 | 0.1814 | 0.8186 |
| A302092G | AA | AG | GG | A | G |
| | 0.3501 | 0.3581 | 0.2918 | 0.5292 | 0.4708 |

다 (Table 4).

T272196A SNP의 유전자형 효과는 근내지방도 육종가에서 유의적인 연관성이 인정되었다 ($p=0.014$). T272196A SNP의 A 대립유전자는 근내지방도 육종가 (-0.101 ± 0.041)의 증가와 관련 있는 것으로 나타났다 ($R^2=0.012$). G290964A SNP의 유전자형 효과는 등지방두께 육종가에서 유의적인 연관성이 인정되었다 ($p=0.001$). G290964A SNP의 G 대립유전자는 등지방두께 육종가 (-0.029 ± 0.009)의 증가와 관련 있는 것으로 나타났다 ($R^2=0.018$). A302092G SNP는 등지방두께 육종가 ($p<0.001$) 및 등심단면적 육종가 ($p=0.020$)에서 각각 유의적인 연관성이 인정되었다. A302092G SNP의 G 대립유전자는 등지방두께 육종가 (-0.032 ± 0.006)와 등심단면적 육종가 (0.459 ± 0.197) 증가와 관련 있는 것으로 나타났다. A302092G SNP의 G 대립유전자는 등지방두께 육종가 변화를 4.6% ($R^2=0.046$), 등심단면적 육종가 변화를 1.1% ($R^2=0.011$) 영향을 주는 것으로 나타났다.

EXT1 유전자는 BTA14번의 근내지방도 및 도체중 관련 QTL 영역 내 영역에서 검출된 후보유전자이다. 그러나 EXT1 유전자에서 검출한 4개의 SNP를 이용한 연관분석실험에서는 근내지방도 및 도체중 보다는, 등지방두께형질에서 가장 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 그 첫 번째 이유는, 한우에 있어서 근내지방도와 등지방두께는 서로 유전적으로 상관이 높은 형질이다 (유전상관 0.2~0.3). 따라서 등지방두께에서 가장 유의한 결과를 얻은 것은 두 형질의 유전상관 때문일 가능성이 있다. 그리고 두 번째 이유는 BTA14에서 검출된 QTL 영역 자체가 single QTL이 아니라, multiple QTL 영역이기 때문에, 그 영역내에서 검출된 SNP를 이용하여 연관분석한 결과에서 기존 QTL에서 검출되지 않은 효과가 검출된 결과인 것으로 사료된다.

실험에서 얻어진 intron 영역의 SNP의 경우 상대적으로 exon 영역의 SNP에 비하여 특정 위치의 염기 변이가 유전자의 발현에 미치는 영향은 상대적으로 낮으나 경우에 따라서 특정 유전자에서

Table 4. Association between three SNPs in EXT1 gene and marbling score breeding value (MSBV), backfat thickness breeding value (BFBV) and eye muscle area breeding value (EMABV) in Hanwoo cattle

| Traits | SNPs | ¹⁾ N | ²⁾ Freq | ³⁾ b±SE | F-value | P-value | R ² |
|--------|-----------------|-----------------|--------------------|---------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| MSBV | T272196A | 507 | 0.428 | -0.101±0.041 | 5.995 | 0.014* | 0.012 |
| | C272359T | 532 | 0.186 | 0.105±0.062 | 2.849 | 0.092 | 0.005 |
| | G290964A | 532 | 0.181 | -0.003±0.049 | 0.004 | 0.947 | 0.004 |
| | A302092G | 497 | 0.470 | 0.028±0.037 | 0.592 | 0.441 | 0.001 |
| BFBV | T272196A | 507 | 0.428 | -0.010±0.007 | 1.864 | 0.172 | 0.004 |
| | C272359T | 532 | 0.186 | 0.006±0.011 | 0.310 | 0.577 | 0.001 |
| | G290964A | 532 | 0.181 | -0.029±0.009 | 9.8921 | 0.001* | 0.018 |
| | A302092G | 497 | 0.470 | -0.032±0.006 | 23.717 | <0.0000001* | 0.046 |
| EMABV | T272196A | 507 | 0.428 | 0.409±0.216 | 3.593 | 0.058 | 0.008 |
| | C272359T | 532 | 0.186 | 0.182±0.328 | 0.306 | 0.579 | 0.001 |
| | G290964A | 532 | 0.181 | 0.232±0.260 | 0.791 | 0.374 | 0.001 |
| | A302092G | 497 | 0.470 | 0.459±0.197 | 5.391 | 0.020* | 0.011 |

* Significant SNP after Bonferroni correction.

¹⁾ Number of animals with traits and genotype.

²⁾ Frequency of minor allele respectively.

³⁾ Allele substitution effect and standard error.

는 전사(transcription)나 번역(translation)에 중요한 역할을 하는 경우도 있다(Ajit 등, 2003). 그러므로 본 실험결과에서 경제형질과 관련성이 있는 intron 영역의 SNP도 주목할 만 한 것으로 판단된다.

최근까지의 BTA14 QTL 영역에 존재하는 유전자들을 대상으로 육우의 경제형질과 연관성 연구가 많이 진행되어 왔다(Wibowo 등, 2008). 2,4-dienoyl CoA reductase 1 (DECR1)에 존재하는 SNP의 경우는 등지방두께 형질, core binding factor, runt domain, α subunit 2, translocated to 1 gene(CBFA2T1)에 존재하는 SNP의 경우는 근내지방도(Marques 등, 2008), fatty acid binding protein 4 (FABP4)에 존재하는 SNP는 도체중 및 근내지방도와 관련성이 있다고 보고되고 있다(Lee 등, 2010). 이외에도 BTA14 QTL 영역에 존재하는 많은 유전자들의 SNP와 경제형질들과의 관련성 연구가 보고되었으며 EXT1 유전자 역시 경제형질과(등지방두께, 등심단면적 및 근내지방도)의 관련성이 인정되었다. 실험에서 나타난 EXT1 유전자의 SNP 변이로 인해 경제형질에 직접적인 영향을 주는지는 아직 확인되지 않았다. 그러나, 이들 SNP는 유전자의 기능을 조절하지 않는 SNP (intron 및 synonymous)으로 판명되었다. 따라서, 각 형질의 QTL과 연관된 LD marker 일 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

본 연구의 결과로 BTA14 (48-58cM) 영역에 존재하는 한우 EXT1 유전자는 한우의 근내지방도 및 등심단면적 및 등지방두께에서 관련이 있는 것으로 나타났다. 근내지방도의 경우 현재 소의

등급판정시 육질등급에 등지방두께 및 등심단면적은 육량등급에 기준으로 작용하여 소 도체의 등급에 중요한 영향을 주는 형질이다. 따라서 등지방두께, 등심단면적 및 근내지방도 형질과 관련이 있는 EXT1 유전자를 이용하여 한우의 선발 및 개량에 활용이 가능 할 것으로 판단한다.

요 약

본 연구는 한우의 경제형질 관련 유전적 표지인자(DNA marker) 개발을 목적으로 EXT1 유전자의 다형성과 발현양상을 관찰하여 경제형질과의 관련성을 확인하고자 수행하였다. PCR-direct sequencing을 통하여 4개(T272196A, C272359T, G290964A 및 A302092G)의 SNPs를 탐색 하였으며, 탐색된 SNPs를 통하여 PCR-RFLP 기법으로 유전자형을 결정한 후 경제형질과 관련성을 분석하였다. 그 결과 T272196A 좌위에서 근내지방 육종가($p=0.014$), G290964A 좌위에서 등지방두께 육종가 추정치($p=0.001$), A302092G 좌위에서는 등지방두께 육종가($p < 0.001$) 및 등심단면적 육종가($p=0.020$)에서 각각 유의적인 연관성이 인정되었다. 따라서, 본 연구를 통해 확인된 SNP를 이용하여 한우의 선발에 활용 가능할 것으로 사료된다.

(주제어: 한우, Exostosin-1 유전자, 단일염기다형성, 제한효소절편 길이다형성)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 연구개발사업 어젠더(2-05-13)의 과제번호 PJ006406에 의해 추진되어진 것임. 실험에 이용된 한우 후대검정우 시료는 농협중앙회 한우개량사업소의 협조로 확보되었으며, 시료 확보를 위해 도움을 주신 것에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Ahn, J., Ludecke, H. J., Lindow, S., Horton, W. A., Lee, B., Wagner, M. J., Horsthemke, B. and Wells, D. E. 1995. Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses(EXT1). *Nature Genet.* 11:137-143.
- Ajit, N., Shlomo, H. M. and Melissa, J. M. 2003. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA.* 9:607-617.
- Casas, E., Shackelford, S. D., Keele, J. W., Koohmaraie, M., Smith, T. P. and Stone, R. T. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2976-2983.
- Chasman, D. and Adams, R. M. 2001. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *J. Mol. Biol.* 307:683-706.
- Darvasi, A. and Soller, M. 1994. Selective DNA pooling for determination of linkage between a molecular marker and a quantitative trait locus. *Genetics.* 138:1365-1373.
- Hecht, J. T., Hogue, D., Strong, L. C., Hansen, M. F., Blanton, S. H. and Wagner, M. 1995. Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome 11 and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes 11 and 8. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1125-1131.
- Kim, J. J., Farnir, F., Savell, J. and Taylor, J. F. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1933-1942.
- Kruglyak, L. and Nickerson. 2001. Variation is the spice of life. *Nature Genet.* 27:234-236.
- Lande, R. and Thompson, R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics.* 124:743-756.
- Lee, S. H., van der Werf, J. H., Lee S. H., Park, E. W., Oh, S. J., Gibson J. P. and Thompson, J. M. 2010. Genetic polymorphisms of the bovine Fatty acid binding protein 4 gene are significantly associated with marbling and carcass weight in Hanwoo (Korean Cattle). *Anim Genet.* (doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02024.x).
- Ludecke, H. J., Ahn, J., Lin, X., Hill, A., Wagner, M. J., Schomburg, L., Horsthemake, B. and Well, D. E. 1997. Genomic organization and promoter structure of the human EXT1 gene. *Genomics.* 40:351-354.
- Marques, E., Nkrumah, J. D., Sherman, E. L. and Moore, S. S. 2009. Polymorphisms in positional candidate genes on BTA14 and BTA26 affect carcass quality in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87:2475-2484.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16:1215.
- Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilen, M., Eriksson, I. and Kusche-Gullberg, M. 2008. Heparan Sulfate biosynthesis enzyme EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 150:4751-4756.
- Raskind, W. H., Conrad, E. U., Chansky, H. and Matsushita, M. 1995. Loss of heterozygosity in chondrosarcomas for markers linked to hereditary multiple exostoses loci on chromosomes 8 and 11. *Am. J. Hum. Genet.* 56:1132-1139.
- Sunyaev, S., Ramensky, V., Koch, I., Lathe, W 3rd., Kondrashov, A. S. and Bork, P. 2001. Prediction of deleterious human alleles. *Hum. Mol. Genet.* 10:591-597.
- Yu, S. L. and Lee, J. H., 2006. Current Research Status for Economically Important Candidate Genes and Micorarray Studies in Cattle. *J. Anim. Sci. & Technol.* 48:169-190.
- Wibowo, T. A., Gaskins, C. T., Newberry, R. C., Thorgaard G. H., Michal, J. J. and Jiang, Z. 2008. Genome Assembly Anchored QTL Map of Bovine Chromosome 14. *Int. J. Biol. Sci.* 4:406-414.

(Received Aug. 11, 2010; Revised Nov. 25, 2010; Accepted Dec. 2, 2010)