

# 홀스타인종과 한우에 있어서 BoLA-DRB3 유전자의 단일염기다형과 반수체 분석

정행진<sup>1</sup> · 유성란<sup>2</sup> · 라세돌<sup>2</sup> · 이준현<sup>2</sup> · 도창희<sup>1</sup> · 류승희<sup>3</sup> · 상병찬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 원예학과, <sup>2</sup>충남대학교 동물바이오시스템과학과, <sup>3</sup>충남대학교 동물자원생명과학과, <sup>3</sup>충청남도 축산기술연구소

## Analyses of single nucleotide polymorphisms and haplotypes of BoLA-DRB3 gene in Holstein and Hanwoo

Hang-Jin Jeong<sup>1</sup>, Seong-Lan Yu<sup>2</sup>, M. R. Hoque<sup>2</sup>, Jun-Heon Lee<sup>2</sup>, Chang-Hee Do<sup>1</sup>, Seung-Heui Ryoo<sup>3</sup>, Byung-Chan Sang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Biosystem Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>3</sup>Government of Changcheongnam-Do, Livestock Research Institute, Cheongyang 345-811, Korea

Received on 10 February 2011, revised on 4 March 2011, accepted on 9 March 2011

**Abstract** : BoLA (bovine leukocyte antigens) have been known as gene complex related with bovine diseases and immunological traits. This study was conducted to find out the characteristics of BoLA-DRB3 gene related to mastitis and BL(bovine leukocyte) from 280 cattle [193 animals of Holstein cattle and 87 animals of Hanwoo]. As a result, five PCR-RFLP types (b, d, e, f and g) using HaeIII restriction enzyme, three BstYI restriction patterns (b, d and e) and eight RsaI restriction types (b, d, f, I, j, n, o and w) were identified. Moreover, we identified new d' type (197→175/22), having one more cutting site by BstYI enzyme than d type allele and n' type (180→169/11) having one more cutting site by RsaI enzyme than n allele was additionally identified. Next, we identified 53 SNPs in BoLA-DRB3 exon2 from 280 cattle. SNP frequency and heterozygosity of Holstein and Hanwoo were investigated in all the SNP genotype. These results might be based on research for identifying marker associated with bovine diseases.

**Key words** : BoLA-DRB3, PCR-RFLP, Holstein, Hanwoo

## I. 서론

소의 주 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex: MHC)에는 소 백혈구 항원 시스템 (bovine leukocyte antigens: BoLA)이 존재하며 이 부위는 면역학적 연관성이 있는 유전자들이 많이 존재하므로(Lewin 등, 1999) 이 유전자부위는 동물들에서 면역체계에 중요한 역할과 관련된 질병 저항성 후보 유전자에 대한 연구들이 많이 보고되어 있으며 최근에도 계속적으로 연구가 진행되고 있다(Maillard 등, 2003; Takeshima 등, 2008). 이 MHC는 3가지 class로 나누어지는데 그 중에서 class II는 외부 항원의 면역반응 초기화에 관여하는 세포표면에 위치하는

유전자들로 이 유전자들은 상당히 높은 다형성을 갖고 있으며 T-cell에 대한 항원제시와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Allen 등, 1997). BoLA의 유전자들 중 DRB3 유전자도 class II에 속하는 유전자로 이 유전자 역시 다른 유전자들과 같이 아주 높은 다형성을 갖고 있을 뿐만 아니라 다형성과 면역과의 관계에 대한 많은 연구들이 보고되고 있다(Blattman 등, 1997; Xu 등, 1993; Davies 등, 1997; Lewin 등, 1999). MHC class II 중 BoLA-DRB3 alleles에는 119개의 많은 polymorphism을 갖고 있으며 이러한 다형성은 여러 질병의 저항성이나 감수성에 영향을 미치는 것으로 많은 연구가 이루어지고 있다(<http://www.ebi.ac.kr/ipd/mhc/bola/index.html>). 특히 유방염이나 소 백혈병에 관한 연구가 여러 나라에서 보고되고 있다(Lewin 등, 1986; Xu 등, 1993; Sharif 등, 1998; Juliarena 등, 2008).

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5788

E-mail address: bcsang@cnu.ac.kr

BoLA-DRB3 exon2 유전자는 BLV(bovine leukemia virus)에 감염된 소중에 특히 지속성 림프구 증가증(persistent lymphocytosis: PL)의 저항성과 민감성에 밀접한 연관을 갖고 있는 것으로 보고되었다(Lewin 등, 1986; 1988). 이 연구결과를 토대로 DRB 3.2\*11 allele가 PL의 저항성과 관련이 있다는 것을 Xu 등(1993)이 처음 보고하였으며 저항성을 가지는 모든 haplotype들은 ER(endoplasmic reticulum) motif의 아미노산 70-71번의 glutamic acid와 arginine로 구성되어 있으며 감수성을 가지는 haplotype들의 대부분이 아미노산 75-78에 valine-aspartic acid-theronine-tyrosine(VDTY)으로 구성되는데 이들 region이 면역세포인 T cell이 인식하고 peptide 결합부위로 매우 중요한 역할을 하기 때문임을 보고하였다. 이들의 연구결과가 보고된 이후 BoLA-DRB3.2 유전자 allele과 BLV 감염 및 감염 후 PL과의 연관성에 대해 연구가 여러 나라에서 이루어진 결과 러시아의 Ayrshire과 Black Pied 종에서는 DRB3.2\*7 allele에서 저항성이 확인되었고 이란의 홀스타인종에서는 DRB3.2\*11과 \*23에서 확인되었다(Udina 등, 2003; Nassiry 등, 2005). 그리고 BLV감염 후 PL로 가는 두 가지의 경로인 BLV에 감염되었지만 BLV env gp51과 gag p24에 대하여 항체의 양이 높게 증가하지 않는 경우인 low proviral load(LPL)와 BLV에 감염되었지만 BLV env gp51과 gag p24에 대하여 항체의 양이 높게 증가하는 경우인 high proviral load(HPL)에 따라 저항성과 관련된 allele에는 차이가 있음을 확인하였다. LPL상태에서 저항성을 나타내는 결과는 이탈리아 홀스타인종에서 DRB 3.2\*11 allele에서 저항성을 나타내었으며 DRB3.2\*8에서는 민감성과 관련성을 확인하였고, 아르헨티나의 홀스타인종에서는 DRB3.2\*11의 두 가지의 subtype인 \*0901, \*0902 및 \*0902에서 강한 연관성, HPL상태의 경우는 DRB 3.2\*1501과 \*1503(\*16)에서 저항성이 있음이 확인되었다(Juliarena 등, 2008). 우리나라의 경우 젖소의 생산성에 지대한 영향을 미치는 BLV감염에 의한 백혈병(BL)과 세균 감염에 의한 유방염의 피해는 심각한 수준으로 추정되어 이들 질병에 대한 항병성과 밀접한 연관을 가지고 있는 BoLA-DRB3 유전자의 특성에 대한 연구의 필요성이 시급한 실정이다.

따라서 국내에서 사육중인 홀스타인종과 한우의 BoLA-DRB3 유전자를 PCR를 통하여 DRB3 유전자를 증폭하고 이 유전자의 염기서열 내에 존재하는 단일염기다형성(single

nucleotide polymorphisms:SNPs)을 조사하여 홀스타인종과 한우의 DRB3 유전자에 있어 유전적 차이를 확인하였고 이를 백혈병 및 유방염과 관련된 항병성 연구에 이용할 수 있는 기초자료를 얻고자 본 연구를 실행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료 및 Genomic DNA 추출

본 연구에 이용된 공시동물은 충청남도 및 충청북도 소재 5개 목장의 1산 이상 홀스타인종 젖소 193두와 충청남도 축산기술연구소의 한우 87두를 포함한 총 280두를 이용하였다.

혈액채취는 젖소의 경정맥에서 3 ml의 혈액을 EDTA가 함유된 진공채혈관(Vacutainer tube with EDTA)에 채취하였으며, 채취한 혈액은 Genomic DNA 추출 전까지 4°C에 보관하였다. 혈액을 원심분리하여 백혈구(buffy coat)를 분리한 후 백혈구 200 µl를 DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였으며 genomic DNA는 4°C에 보관 저장하여 사용하였다.

### 2. BoLA-DRB3 유전자의 증폭

BoLA-DRB3 유전자의 증폭을 위해 van Eijk 등(1992)이 보고한 primer를 사용하였다(Table 1). BoLA-DRB3 유전자는 두 번의 PCR를 통하여 증폭하였다. 첫 번째 PCR 증폭은 50 ng genomic DNA에 1× buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> buffer, 0.2 mM dNTP, 첫 번째 과정의 oligonucleotide primer인 HL-030과 HL-031을 각각 10 pmol, 1.5 units AmpliTaq Gold DNA polymerase(Applied Biosystems, USA) 및 멸균수를 첨가하여 총 25 µl 용량으로 반응하였다. PCR 반응조건은 최초 denaturation으로 94°C에서 10분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 2분, 72°C에서 1분을 15회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 반응한 후 4°C

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for amplification of BoLA-DRB3 gene.

Primer name	Primer sequence
HL-030	ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTC
HL-031	TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT
HL-032	TCGCCGCTGCACAGTGAAGTCTC

에서 종료하였다. 두 번째 PCR 증폭은 첫 번째 PCR로 증폭된 PCR product 1 µl에 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> buffer, 0.2 mM dNTP, 두 번째 과정의 oligonucleotide primer인 HL-030과 HL-032를 각각 10 pmol, 1.5 units AmpliTaq Gold DNA polymerase(Applied Biosystems, USA) 및 멸균수를 첨가하여 총 25 µl 용량으로 반응하였다. PCR 반응조건은 최초 denaturation으로 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 94°C에서 1분, 65°C에서 30초, 72°C에서 4분을 40회 반복하였으며, 72°C에서 10분간 반응한 후 4°C에서 종료하였다. 증폭된 PCR product들은 2% agarose gel에 전기 영동하여 증폭여부 및 크기를 확인하였다.

**3. 제한효소 절편다형분석**

BoLA-DRB3의 타입을 확인하기 위하여 PCR 증폭산물을 제한효소 RsaI, BstY(New England Biolabs, USA) 및 Hae III(Promega, USA)로 절단하였다. 제한효소처리 반응액은 PCR 증폭산물 15µl에 2.5 unit의 RsaI, BstYI 및 Hae III 제한효소와 각 제한효소에 맞는 1× buffer 및 멸균수를 넣어 최종부피를 20 µl가 되도록 하였으며 이 반응액은 RsaI과 Hae III는 37°C, BstYI은 60°C에서 overnight으로 반응하였다. 절단된 DNA단편은 12% PAGE gel에 전기영동을 실시하여 절편 양상을 확인하였고 각 제한효소에 따른 BoLA-DRB3의 타입으로 분류하였다.

**4. BoLA-DRB3 유전자의 단일염기다형성 (Single nucleotide polymorphisms; SNPs)**

BoLA-DRB3 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms)을 확인하기 위하여 PCR 증폭 후 PCR Purification Kit(Bioneer, Korea)로 PCR 증폭산물을 정제한 다음 HL-030과 HL-032 primer를 이용하여 Applied Biosystems 3730 DNA sequencer(PE Applied Biosystemser, USA)로 sequencing을 실시하여 염기서열을 획득하였고 이 염기서열의 정확도 유무를 확인하기 위하여 Chromas software(Eqchnelysium, Australia)를 사용하였으며 다수의 개체로부터 얻어진 염기서열들은 ClustalW program을 이용하여 alignment한 후 단일염기다형을 확인하였다(http://www.ebi.ue.uk/Tools/clustalw2; Thompson 등, 1994). 또한 홀스타인종과 한우의 각 SNP

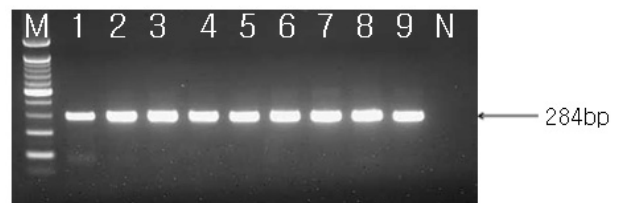
들의 유전자형 빈도(allele frequency), 다형성 지수(heterozygosity 및 polymorphsim information content: PIC)는 Cervus 3.0 (Kalinowski 등, 2007)를 이용하여 계산하였다.

**III. 결과 및 고찰**

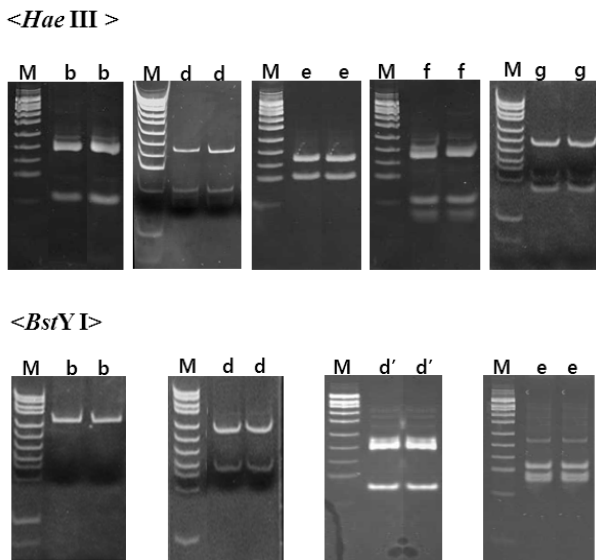
**1. BoLA-DRB3 유전자의 증폭양상 및 제한효소 절편다형에 따른 타입의 분류**

BoLA-DRB3 exon2 유전자를 증폭하기 위하여 van Eijk 등(1992)이 보고한 것과 동일한 primer를 사용하여 PCR로 증폭한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 젓소와 한우 모두 284 bp 위치에서 확인되었고 이는 van Eijk 등(1992)이 보고한 결과와 일치하였다. 또한, 증폭산물에 대한 정확성을 재확인하기 위하여 sequencing을 실시하였으며 이를 BLAST한 결과 BoLA-DRB3 exon2와 일치하는 것으로 확인되었다.

현재 BoLA-DRB3 유전자에 대한 제한효소 절편 양상은 International Society for Animl Genetics (ISAG) BoLA Nomenclature Committee에서 RsaI의 경우에는 25가지 타입, Hae III의 경우에는 9가지 타입 및 5가지의 BstYI의 타입으로 매우 다양한 타입들이 현재 보고되고 있다(van Eijk 등, 1992; Gelhaus 등, 1995; Maillard 등, 1999; http://www.projects.roslin.ac.uk/bola/bolahome.html). 본 연구에서는 홀스타인 193두와 한우 87두 총 280두를 이용하여 BoLA-DRB3 유전자의 제한효소 절편다형양상을 확인한 결과 HaeIII의 경우 b, d, e, f 그리고 g의 5가지 절편타입 양상들을 확인할 수 있었고, BstYI의 경우 b, d, e 3가지의 절편 타입 양상을 보이는 것 외에 기존의 d타입



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis of the BoLA-DRB3 exon2 PCR products in Holstein and Hanwoo. M: 100 bp DNA ladder marker (ELPIS, Korea), lanes 1-9: PCR products of BoLA-DRB3 exon2 and lanes N: negative control. The size of PCR product is indicated.

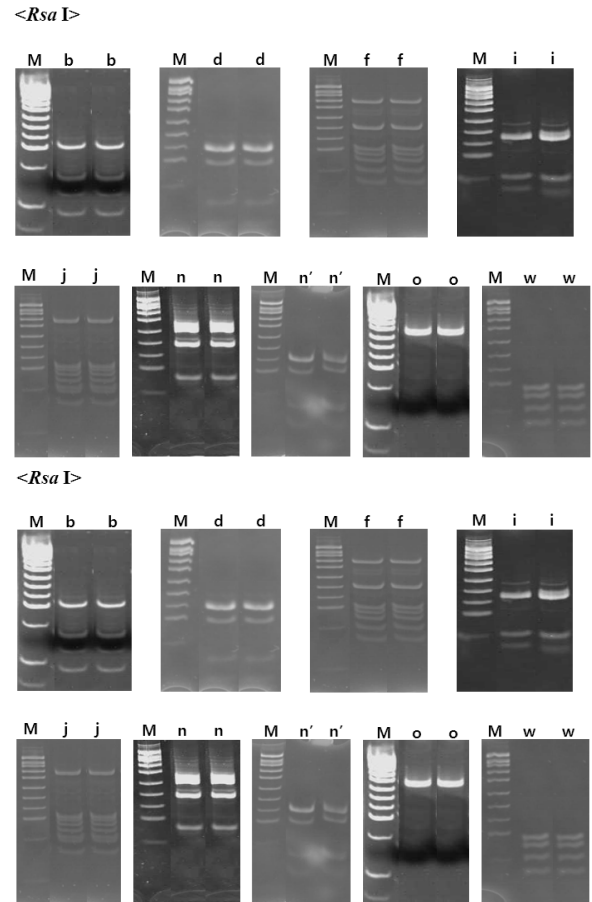


**Fig. 2.** PCR-RFLP types of DRB3 exon2 region using *Hae*III and *Bst*YI restriction enzymes in Holstein and Korean cattle. There are 5 and 5 types identified from *Hae*III and *Bst*YI digestions, respectively. M indicates size standard marker (*Msp*I digestion of pUC18 DNA, Sigma, USA). The restriction fragments were resolved on a 12% polyacrylamide gel.

에 유사한 양상을 가지고 있는 d'의 새로운 절편타입으로 4가지를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 가장 다양한 타입이 보고된 *Rsa*I의 경우 이번 결과에서 가장 다양한 절편 타입 양상을 보여 기존의 보고된 b, d, f, i, j, n, o 그리고 w 8가지의 타입과 n 타입에서 한 번 더 잘린 양상의 n'타입으로 9가지 양상이 확인되었다(Fig. 3). 새로운 절편타입들의 정확한 염기서열을 확인하기 위하여 sequencing한 결과 단일염기다형에 의하여 우리나라의 홀스타인종과 한우에서 나타난 새로운 절편양상을 확인할 수 있었다(Fig. 4). *Bst*YI의 d'타입의 경우 Holstein종과 한우 모두에서 나타났으며, *Rsa*I의 n'타입은 Holstein에서만 발견된 것으로 보아 두 가지 타입이 한우 특이적인 타입이 아니라 우리나라의 기후풍토에 오랜 기간 동안 사육되어오는 동안 변이가 되어 특이적으로 나타나게 된 타입이라고 사료된다.

## 2. BoLA-DRB3 유전자의 다형성 분석

BoLA-DRB3 유전자는 단일염기다형에 의해 현재 119개의 다른 allele들이 나타날 정도로 많은 단일염기다형들이 존재하는 것으로 알려져 있어 본 연구에서는 우리나라의 홀스타인종과 한우의 BoLA-DRB3 유전자내에 단일염기



**Fig. 3.** Identified PCR-RFLP patterns using *Rsa*I restriction enzyme from Holstein and Korean cattle. M indicates size standard marker (*Msp*I digestion of pUC18 DNA, Sigma, USA). The restriction fragments were resolved on a 12% polyacrylamide gel.

다형을 확인하였다. 그 결과 총 280두에서 53개의 단일염기다형을 확인할 수 있어 이미 보고된 결과들과 유사하게 이 유전자는 많은 변이를 가지고 있음을 확인할 수 있었고 본 실험을 통해 얻은 자료를 기초로 하여 Cervus 3.0 프로그램(Kalinowski 등, 2007)으로 다형성지수(heterozygosity와 PIC)를 추정하였다. 각 frequency와 heterozygosity 및 PIC 추정치는 Table 2에 정리하였다. 홀스타인종과 한우로 나누어 frequency를 조사한 결과 SNP 82, 100, 108, 115, 119 그리고 199는 홀스타인종과 한우 모두 homotype에 분포하였고, SNP 26, 49, 50, 51 및 143은 모든 genotype에서 고루 분포하였다. 그리고 SNP 114 및 149에서는 홀스타인종은 고루 분포한 반면 한우는 homotype에서만 발견되었으며, SNP 82에서는 반대로 한우는 고루 분포하였으나 홀스타인종은 homotype에서만 분포하였다. 이러한 결과는 최근 Miyasaka 등 (2011)이 일본의 고유품

#DRB3*1201	TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC ACC GAC CCC GTA GTT GTG TCT GCA GTA CGT GTC CAC CGC GGC CCG CGC CCG CTC
#d' Type	... .. .SWM .S. ... .. MTY ... .. .YS ...
#d Type	... .. .MM. ... .. .CAC .S. ... .. .T. ... .. .C. .YS ...
#n' Type	... .. .MM. ... .. .CAC .S. ... .. .T. ... .. .C. .YS ...
#n Type	... .. .CA. ... .. .CAC ... .. .T. ... .. .C. ... ..
<b>Rsa I</b>	
#DRB3*1201	CAG GAT GTC CTT CTG GCT GTT GCA <u>GTA CTC</u> GGC GAC CAG CGG CCC TAG CTC GGT CAC CGC CCG GTA CTC GCC CCG GTC
#d' Type	... S.W S.. ... .. <u>SIR</u> ... .. .W. SG. .C. ... ..
#d Type	... .W ... .. .KM .G. .C. ... Y.. ... .. .A. ... .Y. ... ..
#n' Type	... .. <u>KA</u> .G. .C. ... Y.. ... .. .A. ... .Y. ... ..
<b>Rsa I</b>	
#n Type	... .. <u>AA</u> .G. .C. ... C.. ... .. .A. ... .T. ... ..
<b>BstY I</b>	
#DRB3*1201	GCT GCC GAA GCG CAC CGA GTC TTC TCC ATT ATG GAA GTA TCT GTT CAG GAA CCG CAC CCG CTC GGT CCC GTT GAA GAA
#d' Type	... .. .WW ... .. .A ... <u>.G.</u> ... ..
#d Type	... .. .TW ... .. .A ... <u>.KR</u> ... .. S.. ... ..
#n' Type	... .. .KW ... .. .KW ... .YR ... .. S.. ... ..
#n Type	... .. .T. ... .. .A ... .G ... .. C.. ... ..
#DRB3*1201	ATG ACA CTC TTT CTT GGA ATA CTC CAG GAA ATG TGC TGC AGA GAG AGG AT
#d' Type	... .. .ASR ... ..
#d Type	... .. .Y ... .ATR ... ..G ... ..
#n' Type	... .. .ATR ... ..G ... ..
#n Type	... .. .ATG ... ..G ... ..

**Fig. 4.** Alignment of the BoLA-DRB3 exon2 sequence(DRB3\*1201) variations for the Holstein and Hanwoo. Dots indicate identical nucleotides with DRB3\*1201(K: G/T, M: A/C, R: A/G, S: C/G, W: A/T, Y: C/T).

종인 화우와 홀스타인 종의 DRB3 사이의 주요한 allele을 조사한 결과 서로 다름을 보고한 결과와 유사한 결과로 한 품종이 homotype에 치우쳐 나타나는 SNP position에 대해 좀 더 연구를 하면 각 품종의 유전학적 특성에 대해 알 수 있을 것으로 추정된다. 또한 유방염이나 소 백혈병에 잘 걸리지 않는 한우만의 특징을 알아볼 수 있을 것이라 기대된다. Heterozygosity는 0.073~0.668(평균 0.3715)로 나타났고 PIC는 0.070~0.586(평균 0.3023)로 나타났으며 가장 높은 heterozygosity와 PIC를 나타내는 것은 SNP 189로 각각 0.668과 0.586으로 추정되었다. Heterozygosity와 PIC 값이 낮게 나온 것은 cloning과정을 통해 유전자형을 한 가지로 만들어 분별력을 높이는 과정이 더 필요할 것으로 사료된다. 또한, heterozygosity가 높고 수가 많은 SNP에 대해 질병 민감성이나 저항성에 대한 연관성 유무를 파악하여 유전학적으로 사용할 수 있는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구결과를 PL 저항성과 연관이 있다고 밝혀진 ER motif의 아미노산 Glu(70)와 Arg(71)으로 구성되는 핵산 서열(Xu 등, 1993), 종양 발달 저항성 간에 연관이 있다고 알려진 Glu(74), Arg(77) 및 Val(78)들의 서열(Yang과 Roger, 1993)과 최근 일본 내에 사육되고 있는 홀스타인종의 DRB3 allele이 유방염 병원균과의 관계를 확인한 결과 항원과 결합하는 pocket4와 7에 존재하는 Tyr(47), Ile(67), Ala(71) 및 Ala(74) 아미노산이 유방염에 저항성을 가지는 것으로 확인되었다(Yoshida 등, 2009). 따라서 위의 저항성들을 보일 수 있는 아미노산과 SNP들과의 상관관계를 확인한 결과 71번 아미노산을 만들 수 있는 71 및 72 SNP들이 많은 SNP들을 나타내므로 유방염에 저항성을 가지는 아미노산을 가지고 있는 개체를 선발하는데 이용할 수 있을 뿐만 아니라 다른 SNP들을 이용하여 유전자형들과 저항성 간의 연관성을 연구하는데 중요한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

**Table 2.** Genotype frequencies of SNPs in BoLA-DRB3 gene.

SNP position	Genotype	No. of cattle				Frequency				H <sup>1</sup>	PIC <sup>2</sup>	HWE test <sup>3</sup>
		Holstein		Hanwoo		Holstein		Hanwoo				
		+	-	+	-	+	-	+	-			
25 A>C	AA	62	6	29	20	0.369	0.24	0.518	0.357	0.4747	0.3589	NS
	AC	84	14	19	7	0.5	0.56	0.339	0.226			
	CC	22	5	8	4	0.131	0.2	0.143	0.129			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
26 A>C	AA	74	8	13	6	0.440	0.32	0.232	0.196	0.4807	0.3620	NS
	AC	53	13	27	11	0.315	0.52	0.482	0.355			
	CC	41	4	16	14	0.244	0.16	0.286	0.451			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
27 C>T	CC	102	14	31	21	0.607	0.56	0.554	0.677	0.3085	0.2583	ND
	CT	58	11	25	9	0.345	0.44	0.446	0.29			
	TT	8	0	0	4	0.03	0	0	0.129			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
28 G>A	GG	109	17	34	21	0.649	0.68	0.607	0.677	0.3241	0.2688	ND
	GA	52	8	22	7	0.31	0.32	0.393	0.226			
	AA	7	0	0	3	0.042	0	0	0.097			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
29 A>C	AA	107	15	33	22	0.637	0.6	0.589	0.71	0.3389	0.2787	ND
	AC	54	10	23	8	0.321	0.4	0.411	0.256			
	CC	7	0	0	1	0.042	0	0	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
49 C>G	CC	37	7	15	8	0.220	0.28	0.268	0.258	0.4984	0.3711	NS
	CG	93	11	20	6	0.554	0.44	0.357	0.194			
	GG	38	7	21	17	0.226	0.28	0.375	0.548			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
50 A>T	AA	37	9	15	8	0.220	0.36	0.268	0.258	0.4984	0.3711	NS
	AT	94	10	20	6	0.56	0.04	0.357	0.194			
	TT	37	6	21	17	0.220	0.24	0.375	0.548			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
51 C>A	CC	37	8	30	8	0.220	0.32	0.536	0.258	0.4984	0.3711	NS
	CA	94	10	5	6	0.56	0.04	0.089	0.194			
	AA	37	7	21	17	0.220	0.28	0.375	0.548			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
53 G>C	GG	71	11	23	19	0.423	0.44	0.411	0.613	0.4908	0.3672	NS
	GC	81	13	26	6	0.482	0.52	0.464	0.194			
	CC	16	1	7	6	0.095	0.04	0.125	0.194			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
61 C>A	CC	75	14	27	10	0.446	0.56	0.482	0.323	0.4443	0.3425	ND
	CA	75	9	19	10	0.446	0.36	0.339	0.323			
	AA	18	2	10	11	0.107	0.08	0.179	0.355			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			

**Table 2.** Genotype frequencies of SNPs in BoLA-DRB3 gene.

SNP position	Genotype	No. of cattle				Frequency				H <sup>1</sup>	PIC <sup>2</sup>	HWE test <sup>3</sup>
		Holstein		Hanwoo		Holstein		Hanwoo				
		+	-	+	-	+	-	+	-			
62 T>G	TT	119	18	36	24	0.708	0.72	0.643	0.774	0.2756	0.2351	ND
	TG	30	4	17	4	0.179	0.16	0.304	0.129			
	GG	19	3	3	3	0.113	0.12	0.054	0.097			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
63 C>A>T	CC	75	13	19	12	0.446	0.52	0.339	0.387	0.4712	0.4060	ND
	CT	7	1	10	2	0.042	0.04	0.179	0.065			
	CA	72	9	14	6	0.429	0.36	0.25	0.194			
	AA	11	2	7	2	0.065	0.08	0.125	0.065			
	TT	3	0	6	9	0.018	0	0.107	0.36			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
71 T>C>G>A	TT	43	5	19	12	0.256	0.2	0.339	0.387	0.6206	0.5485	NS
	CT	81	13	18	12	0.482	0.52	0.321	0.387			
	CC	10	0	8	0	0.06	0	0.143	0			
	GG	19	3	3	3	0.113	0.12	0.054	0.097			
	GT	15	4	8	4	0.089	0.16	0.143	0.129			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
72 T>C	TT	43	10	31	19	0.256	0.04	0.554	0.613	0.4608	0.3515	ND
	TC	91	9	12	4	0.542	0.36	0.214	0.129			
	CC	34	6	13	8	0.202	0.24	0.232	0.258			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
74 C>T	CC	65	13	21	17	0.387	0.52	0.548	0.548	0.4908	0.3672	NS
	CT	74	7	19	5	0.440	0.28	0.339	0.161			
	TT	29	5	16	9	0.173	0.2	0.286	0.29			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
75 G>C	GG	77	10	39	18	0.458	0.04	0.696	0.58	0.4747	0.3589	NS
	GC	78	9	16	6	0.464	0.36	0.256	0.194			
	CC	13	6	1	7	0.077	0.24	0.018	0.226			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
82 G>C	GG	164	19	41	20	0.976	0.76	0.732	0.645	0.0962	0.0905	ND
	GC	3	6	9	2	0.018	0.24	0.161	0.065			
	CC	1	0	6	9	0.006	0	0.107	0.290			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
83 A>G	AA	85	15	39	22	0.506	0.6	0.696	0.71	0.3389	0.2787	ND
	AG	76	9	13	8	0.452	0.36	0.232	0.258			
	GG	7	1	4	1	0.042	0.04	0.071	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
84 A>T	AA	31	2	17	15	0.185	0.08	0.304	0.484	0.5035	0.3736	NS
	AT	102	18	20	9	0.607	0.72	0.357	0.290			
	TT	35	5	19	7	0.208	0.2	0.339	0.226			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			

**Table 2.** Genotype frequencies of SNPs in BoLA-DRB3 gene.

SNP position	Genotype	No. of cattle				Frequency				H <sup>1</sup>	PIC <sup>2</sup>	HWE test <sup>3</sup>
		Holstein		Hanwoo		Holstein		Hanwoo				
		+	-	+	-	+	-	+	-			
85 G>C	GG	99	10	41	0	0.589	0.4	0.732	0	0.3797	0.3047	ND
	GC	56	15	14	31	0.333	0.6	0.25	1			
	CC	13	0	1	0	0.077	0	0.018	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
96 T>C	TT	111	18	46	26	0.661	0.72	0.821	0.839	0.2582	0.2225	ND
	TC	56	5	4	4	0.333	0.2	0.071	0.129			
	CC	1	2	6	1	0.006	0.08	0.107	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
100 C>G	CC	145	22	51	27	0.863	0.88	0.911	0.871	0.0731	0.0696	ND
	CG	23	3	5	4	0.137	0.053	0.089	0.129			
	GG	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
101 C>A	CC	94	16	44	21	0.556	0.64	0.786	0.677	0.3085	0.2583	ND
	CA	68	7	8	9	0.405	0.28	0.143	0.290			
	AA	6	2	4	1	0.036	0.08	0.071	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
103 G>C	GG	73	8	28	10	0.435	0.32	0.5	0.323	0.4149	0.3258	ND
	GC	89	15	18	11	0.53	0.6	0.321	0.355			
	CC	6	2	10	10	0.036	0.08	0.179	0.323			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
105 A>G	AA	85	16	35	12	0.506	0.64	0.625	0.388	0.1405	0.1291	ND
	AG	74	7	11	9	0.440	0.28	0.196	0.290			
	GG	9	2	10	10	0.054	0.08	0.196	0.323			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
108 C>T	CC	158	22	45	22	0.940	0.88	0.804	0.71	0.0731	0.0696	ND
	CT	10	3	7	1	0.056	0.053	0.125	0.032			
	TT	0	0	4	8	0	0	0.071	0.258			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
113 T>A	TT	35	5	20	5	0.208	0.2	0.357	0.161	0.4908	0.3672	NS
	TA	127	19	26	16	0.756	0.76	0.464	0.516			
	AA	6	1	10	10	0.036	0.04	0.179	0.323			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
114 C>A	CC	119	19	51	27	0.708	0.76	0.911	0.871	0.2402	0.2091	ND
	CA	48	6	5	4	0.286	0.24	0.089	0.129			
	AA	1	0	0	0	0.006	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
115 C>G	CC	165	22	46	27	0.982	0.88	0.821	0.871	0.0962	0.0905	ND
	CG	2	0	7	4	0.012	0	0.125	0.129			
	GG	1	3	3	0	0.006	0.12	0.054	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			



**Table 2.** Genotype frequencies of SNPs in BoLA-DRB3 gene.

SNP position	Genotype	No. of cattle				Frequency				H <sup>1</sup>	PIC <sup>2</sup>	HWE test <sup>3</sup>
		Holstein		Hanwoo		Holstein		Hanwoo				
		+	-	+	-	+	-	+	-			
116 C>T>G	GG	43	7	17	7	0.256	0.28	0.304	0.226	0.5658	0.4971	NS
	GT	37	5	16	5	0.220	0.2	0.286	0.161			
	GC	61	7	8	6	0.363	0.28	0.143	0.194			
	CC	5	2	10	10	0.03	0.08	0.179	0.323			
	CT	19	4	5	1	0.113	0.16	0.089	0.032			
	TT	3	0	0	2	0.018	0	0	0.065			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
119 C>T	CC	144	25	50	29	0.857	1	0.893	0.935	0.0731	0.0696	ND
	CT	24	0	6	2	0.143	0	0.107	0.065			
	TT	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
124 T>C	TT	35	5	23	21	0.208	0.2	0.411	0.677	0.4984	0.3711	NS
	TC	110	16	19	9	0.655	0.64	0.339	0.29			
	CC	23	4	14	1	0.137	0.16	0.25	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
143 T>A	TT	60	9	27	20	0.357	0.36	0.482	0.645	0.5051	0.3744	NS
	TA	63	7	8	4	0.375	0.28	0.143	0.129			
	AA	45	9	21	7	0.268	0.36	0.375	0.226			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
149 C>T	CC	114	15	46	27	0.679	0.6	0.821	0.871	0.2756	0.2351	ND
	CT	53	10	10	4	0.315	0.4	0.179	0.129			
	TT	1	0	0	0	0.006	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
173 A>T>G	AA	24	6	18	14	0.143	0.24	0.321	0.452	0.6595	0.5773	NS
	AT	75	8	12	9	0.446	0.32	0.214	0.290			
	AG	33	5	10	1	0.196	0.2	0.179	0.032			
	GG	12	0	8	4	0.071	0	0.143	0.129			
	GT	17	6	8	3	0.101	0.24	0.143	0.097			
	TT	7	0	0	0	0.042	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
174 A>T	AA	74	11	24	20	0.44	0.44	0.429	0.645	0.4680	0.3554	NS
	AT	81	13	22	6	0.482	0.52	0.393	0.194			
	TT	13	1	10	5	0.077	0.04	0.179	0.161			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
188 T>G	TT	101	14	31	23	0.601	0.56	0.554	0.742	0.4035	0.3542	ND
	TG	55	11	16	3	0.327	0.44	0.286	0.097			
	GG	12	0	9	5	0.071	0	0.161	0.161			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			

**Table 2.** Genotype frequencies of SNPs in BoLA-DRB3 gene.

SNP position	Genotype	No. of cattle				Frequency				H <sup>1</sup>	PIC <sup>2</sup>	HWE test <sup>3</sup>
		Holstein		Hanwoo		Holstein		Hanwoo				
		+	-	+	-	+	-	+	-			
189 G>A=T	GG	36	4	13	8	0.214	0.16	0.232	0.258	0.6684	0.5862	NS
	GA	54	13	6	5	0.321	0.52	0.107	0.161			
	GT	29	3	5	1	0.173	0.12	0.089	0.032			
	AA	7	1	10	11	0.042	0.04	0.179	0.355			
	AT	24	4	9	2	0.143	0.16	0.161	0.065			
	TT	18	0	13	4	0.107	0	0.232	0.129			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
191 A>T	AA	103	13	31	23	0.613	0.52	0.554	0.742	0.4038	0.3192	ND
	AT	53	12	17	3	0.315	0.48	0.304	0.097			
	TT	12	0	8	5	0.071	0	0.143	0.161			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
194 T>G	TT	115	17	27	13	0.684	0.68	0.482	0.419	0.3668	0.2966	ND
	TG	50	8	23	9	0.298	0.32	0.411	0.290			
	GG	3	0	6	9	0.018	0	0.107	0.290			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
195 A>G	AA	106	19	37	23	0.631	0.76	0.661	0.742	0.3241	0.2688	ND
	AG	55	6	13	5	0.327	0.24	0.232	0.161			
	GG	7	0	6	3	0.042	0	0.107	0.097			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
199 G>C	GG	145	18	43	26	0.863	0.72	0.768	0.839	0.1649	0.1553	ND
	GC	23	7	13	5	0.137	0.28	0.232	0.161			
	CC	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
201 C>T	CC	114	17	39	24	0.679	0.68	0.696	0.774	0.2402	0.2091	ND
	CT	52	8	17	7	0.310	0.32	0.304	0.226			
	TT	2	0	0	0	0.012	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
205 G>C	GG	109	13	40	25	0.649	0.52	0.714	0.806	0.3085	0.2583	ND
	GC	58	12	16	6	0.345	0.48	0.286	0.194			
	CC	1	0	0	0	0.006	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
206 A>T	AA	89	15	33	11	0.530	0.6	0.589	0.355	0.3797	0.3047	ND
	AT	70	7	12	10	0.417	0.28	0.214	0.323			
	TT	9	3	11	10	0.054	0.12	0.196	0.323			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
244 G>T	GG	101	12	24	19	0.601	0.48	0.429	0.613	0.3797	0.3047	ND
	GT	60	13	26	12	0.357	0.52	0.464	0.387			
	TT	7	0	6	0	0.042	0	0.107	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			

**Table 2.** Genotype frequencies of SNPs in BoLA-DRB3 gene.

SNP position	Genotype	No. of cattle				Frequency				H <sup>1</sup>	PIC <sup>2</sup>	HWE test <sup>3</sup>
		Holstein		Hanwoo		Holstein		Hanwoo				
		+	-	+	-	+	-	+	-			
245 C>T	CC	125	18	40	25	0.744	0.72	0.714	0.804	0.2402	0.2091	ND
	CT	41	7	16	6	0.244	0.28	0.286	0.194			
	TT	2	0	0	0	0.012	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
246 T>C	TT	127	17	43	26	0.756	0.68	0.768	0.839	0.2402	0.2091	ND
	TC	40	8	13	5	0.238	0.32	0.232	0.161			
	CC	1	0	0	0	0.006	0	0	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
248 T>G	TT	89	14	45	20	0.530	0.56	0.804	0.645	0.3241	0.2688	ND
	TG	77	8	9	10	0.458	0.32	0.161	0.323			
	GG	2	3	2	1	0.012	0.12	0.036	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
250 A>G	AA	125	16	41	23	0.744	0.64	0.732	0.742	0.2756	0.2351	ND
	AG	28	4	15	6	0.167	0.16	0.268	0.194			
	GG	15	5	0	2	0.089	0.2	0	0.065			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
251 G>T>C	GG	91	13	26	13	0.542	0.52	0.464	0.419	0.5459	0.4465	**
	CC	0	0	10	10	0	0	0.179	0.290			
	TT	52	6	0	0	0.31	0.24	0	0			
	GT	24	6	0	0	0.143	0.24	0	0			
	CT	0	0	10	5	0	0	0.179	0.161			
	GC	1	0	10	3	0.006	0	0.179	0.097			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
252 A>G> T>C	AA	98	13	17	12	0.583	0.52	0.304	0.387	0.4763	0.4307	ND
	GG	6	4	9	10	0.036	0.16	0.161	0.290			
	TT	2	0	0	0	0.012	0	0	0			
	AT	30	3	15	6	0.179	0.12	0.268	0.194			
	AG	25	3	10	3	0.149	0.12	0.179	0.097			
	AC	7	2	5	0	0.042	0.08	0.089	0			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			
258 C>G	CC	112	15	44	27	0.667	0.6	0.786	0.871	0.3389	0.2787	ND
	CG	29	5	8	3	0.173	0.2	0.143	0.097			
	GG	27	5	4	1	0.161	0.2	0.071	0.032			
	Total	168	25	56	31	1	1	1	1			

<sup>1</sup> Heterozygosity.

<sup>2</sup> Polymorphism information content.

<sup>3</sup> Hardy-Weinberg Equilibrium test, NS means not significant, ND means not done.

#### IV. 결론

본 연구는 질병 및 경제형질과 밀접한 연관이 있다고 밝혀진 BoLA-DRB3 유전자의 특성에 대한 연구를 하고자 홀

스타인종 193두와 한우 87두를 포함한 총 280두를 이용하여 실험하였다. BoLA-DRB3 exon2의 PCR-RFLP type을 분석한 결과 *Hae*III에서는 b, d, e, f 그리고 g 5가지가 확인되었고, *Bst*YI에서는 b, d, e 3가지와 기존의 d 타입에

서 한 곳이 더 잘린 d'의 새로운 타입을 확인하였으며 *RsaI*의 경우 기존의 b, d, f, i, j, n, o 그리고 w 8가지의 타입과 n 타입에서 한 곳이 더 잘린 n'타입이 확인되었다. *BstYI*의 경우 홀스타인종과 한우에서 둘 다 나온 것으로 보아 한국의 기후풍토에서 오랜 기간 사육되어온 소들에서 나타나는 특이적인 타입인지에 대한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다. 또한, *RsaI*에서 발견된 새로운 타입은 홀스타인종에서만 나타났는데 이것도 한우 특이적인 타입이 아니라 우리나라에서 자라게 되면서 변이가 되어 나타나는 것인지에 대한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

BoLA-DRB3 exon2 유전자의 염기서열을 분석하여 53개의 polymorphism들을 확인할 수 있었다. 홀스타인과 한우로 나누어 frequency를 조사한 결과 두 품종이 모두 고루 분포하였고 모든 genotype에 고르게 분포하고 frequency가 그 중 한 가지 type에서 좀 더 높게 나타났다. Heterozygosity는 평균 0.3715, PIC는 평균 0.3023로 나타났고 가장 높은 heterozygosity와 PIC를 나타내는 것은 SNP 189 (0.668, 0.586)이었다. 이상의 결과에서 BoLA-DRB3 유전자의 PCR-RFLP type, 염기서열 및 연관성분석은 소 백혈병과 유방염과 연관된 소의 질병저항성을 연구하는데 중요한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제번호:20070404031)의 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Allen BKD, North D. 1997. Bovine Lymphocyte Antigen class II alleles as risk factor for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 406-412.
2. Ballingall KT, Luyai A, McKeever DJ. 1997. Analysis of genetic diversity at the DQA loci in African cattle: evidence for a BoLA-DQA3 locus. *Immunogenetics* 46: 237-244.
3. Davies CJ, Andersson L, Mikko S, Ellis SA, Hensen EJ, Lewin HA, Muggli-Cockett NE, van der Poel JJ, Russell GC. 1997. Nomenclature for factors of the BoLA systems 1996: report of the ISAG BoLA Nomenclature Committee. *Anim. Genet.* 28: 159-168.
4. Gelhaus A, Schnitter L, Mehlitz D, Horstmann RD, Meyer CGD. 1995. Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA DRB3 alleles. *Anim Genet.* 26: 147-153.

5. Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Marino B, Rodriguez-Dubra C, Esteban EN. 2008. Association of BLV-infection profiles with alleles of BoLA DRB3.2 gene. *Anim. Genet.* 39: 432-438.
6. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increase success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1006.
7. Lewin HA, Bernoco D. 1986. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *Anim. Genet.* 17: 197-207.
8. Lewin HA, Wu MC, Stewart JT. 1988. Association between BoLA and subclinical bovine leukosis virus infection in a herd of Holstein-Friesian cow. *Immunogenetics* 27: 338-344.
9. Lewin HA, Russell GC, Glass EJ. 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunol. Rev.* 167: 145-158.
10. Maillard JC, Renard C, Chardon P, Chantal I, Bensaid A. 1999. Characterization of 18 new BoLA DRB3 alleles. *Anim Genet.* 30: 200-203.
11. Maillard JC, Berthier D, Chantal I, Thevenon S, Sidibé I, Stachurski F, Belemsaga D, Razafindralyé H, Elsen JM. 2003. Selection assisted by a BoLA-DR/DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. *Genet. Sel. Evol.* 35: 193-200.
12. Miyasaka T, Takeshima SN, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsushashi T, Miyazaki Y, Tanabe Y, Ishibashi K, Sentsui H, Aida Y. 2011. The diversity of bovine MHC class II DRB3 and DQA1 alleles in different herds of Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *Gene.* 472: 42-49.
13. Nassiry MR, Shahroodi FE, Mosafer J, Mohammadi A, Manshad E, Ghazanfari S, Mohammad Abadi MR, Sulimova GE. 2005. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. *Genetika* 41: 817-822.
14. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, Leslie KE. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 29: 185-193.
15. Takeshima S, Matsumoto Y, Chen J, Yoshida T, Mukoyama H, Aida Y. 2008. Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by Streptococci and Escherichia species. *Tissue Antigens* 72: 525-531.
16. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
17. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
18. Udina IG, Karamysheva EE, Turkova SO, Orlova AR,

- Sulimova GE. 2003. Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene Bola-DRB3. *Genetika*. 39: 383-396.
19. van Eijk MJ, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.* 23: 483-496.
20. Xu A, van Eijk MJ, Park C, Lewin HA. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151: 6977-6985.
21. Yang D, Roger DS. 1993. Milk and fat yields decline in Bovine Leukemia Virus infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 6538-6541.
22. Yoshida T, Mukoyama H, Furuta H, Kondo Y, Takeshima SN, Aida Y, Kosugiyama M, Tomogane H. 2009. Association of the amino acids motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Anim. Sci. J.* 80(5): 510-519.
23. Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJ. 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.* 27: 337-341.