



한우 Mitochondrial DNA D-Loop 영역의 RFLP Marker가 산유량에 미치는 영향

정의룡* · 정구용¹

상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과, ¹상지대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

Effect of RFLP Marker of the Mitochondrial DNA D-Loop Region on Milk Production in Korean Cattle

Eui-Ryong Chung* and Ku-Young Chung¹

Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University

¹Department of Animal Science and Technology, Sangji University

Abstract

This study was performed to determine sequence variation and RFLP of the mt DNA D-loop region using Southern blot hybridization analysis and to develop mt DNA marker affecting milk production traits in Hanwoo cows. The PCR was used to amplify an 1142 bp fragment within the D-loop region of mt DNA using specific primers. Mt DNA were digested with seven restriction enzymes and hybridized using DIG-labeled D-loop probe. The mt DNA RFLP polymorphisms were observed in the four enzymes, *Bam*HI, *Rsa*I, *Xba*I and *Hpa*II. Nucleotide substitutions were detected at positions 441 (G/C), 469 (T/C), 503 (C/T), 569 (G/A), 614 (C/A) and 644 (C/T) of the mt DNA D-loop region between two selected lines. Significant relationship between the *Xba*I RFLP type and breeding value was found($p<0.05$). Cows with A type had higher estimated breeding values than those with B type ($p<0.05$) between high and low milk production lines. Therefore, the RFLP marker of mt DNA could be used as a selection assisted tool for individuals with high milk producing ability in Hanwoo.

Key words : mt DNA, RFLP marker, nucleotide sequence, milk production, Hanwoo cow

서론

포유동물의 유전자는 핵내의 염색체에 존재하며 후대에 유전하는 genomic DNA와 핵외 세포질내에 존재하며 모계 유전하는 mitochondria DNA (mt DNA)가 각각 독자적인 구조와 기능을 갖는다는 사실이 Hutchison 등(1974)에 의해 보고된 이후 그동안 많은 연구자들에 의해 mt DNA 분자 변이에 관한 연구가 이루어져 왔다. 특히, mt DNA는 약 16,500 염기쌍으로 이루어진 폐환상 이중 분자 구조로 염색체 DNA와 다른 자기 복제 능력이 있어 독자적인 단백질 합성계를 형성하며 염기 치환율이 염색체 DNA보다 약 5~10배 빠르고, genome의 분자량이 작아 염기 서열 구조 및 변이 해석이

매우 용이하다는 장점을 갖고 있다(Brown *et al.*, 1979). 인간에서 mt DNA의 염기 서열 구조가 처음으로 밝혀진 이후 소(Anderson *et al.*, 1982), 돼지(Watanabe *et al.*, 1986), 닭(Desjardins and Morais, 1990) 및 면양(Hiendleder *et al.*, 1998) 등 각종 동물에서 mt DNA의 전체 염기 서열이 밝혀졌다. 최근 세포질 유전 효과에 따른 모계 유전의 중요성이 많은 연구자들에 의해 강조되면서 가축의 성장률, 번식능력 및 비유형질 등 주요 경제형질에 영향을 미치는 세포질 유전 담당체인 mt DNA의 염기 서열내 변이와 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 등 다형 분석에 많은 흥미와 관심이 집중되었다(Bell *et al.*, 1985). 특히, 소의 경우 mt DNA 다형성에 관한 연구는 Laipis 등(1979)이 Holstein 종 젖소에서 mt DNA를 분리한 후 각종 제한효소 인지 부위를 기초로 물리적 지도를 작성한 이래 여러 연구자들에 의해 축우 품종을 대상으로 다양한 제한효소 절단 양상에 의한 mt DNA의 다형성과 제한효소 물리적 지도가 작성되었다(Bhat *et al.*, 1990;

* Corresponding author : Eui-Ryong Chung, Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel: 82-33-730-0541, Fax: 82-33-730-0503, E-mail: erchung@mail.sangji.ac.kr

Hauswirth *et al.*, 1982; Watanabe *et al.*, 1985).

그러나, 그동안 소 mt DNA의 다형성 해석은 주로 전체 mt DNA를 대상으로 각종 제한효소 절단형에 의존하여 연구가 진행되어져 왔다. 특히, mt DNA 가운데 D-loop (displacement loop) 영역은 mt DNA의 복제 개시점으로 전체 mt DNA에 비해 10배 이상 높은 염기 치환율과 고빈도의 염기 서열 변이가 존재한다는 사실이 밝혀짐에 따라(Ron *et al.*, 1993), 최근에는 mt DNA내 D-loop 영역을 염기 서열이나 PCR-RFLP 분석에 의한 품종간 또는 개체간 유전적 다형성과 염기 서열 차이를 비교하여 경제 형질과 관련된 새로운 정보원으로서 활용이 시도되고 있는 추세이다. 젖소의 경우, 유량, 유조성분 등 유생산과 관련된 변이 가운데 약 2~10%가 모계 효과에 기인하는 것으로 보고됨에 따라(Bell *et al.*, 1985; Freeman, 1990; Ron *et al.*, 1993), 젖소에서 우유 생산 형질에 영향을 미치는 DNA marker를 검출하기 위한 목적으로 비유형질과 mt DNA 분자 변이간의 관련성에 대한 연구가 진행된 바 있다(Boettcher *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1989; Ron *et al.*, 1993). 특히, 소 mt DNA의 D-loop 염기 서열 변이가 젖소의 산유량 및 육우의 도체 형질과 유의적으로 관련되어 있다는 사실이 보고되었다 (Mannen *et al.*, 1997; Ron *et al.*, 1993; Schutz *et al.*, 1993). 육우의 산육 능력과 밀접한 관련이 있는 이유시 체중은 암소의 산유량에 가장 큰 영향을 받는 것으로 잘 알려져 있다(Ensminger, 1987). 그러나, 한우의 우유 생산 능력은 어린 송아지가 증체할 수 있는 잠재성을 충족시키지 못할 만큼 적은 양으로 송아지의 정상적인 성장과 발육에 커다란 지장을 초래하는 문제점으로 지적되어져 오고 있다. 따라서 본 연구는 우리나라 고유한 한우에서 mt DNA D-loop 영역의 염기 서열과 RFLP를 분석하고 우유 생산 형질에 영향을 미치는 DNA marker를 탐색 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물

축산연구소 한우시험장에서 혈통 관리되고 있는 한우 시험축 가운데 산유량 및 송아지 이유시 체중에 대한 능력 검정 분석 자료를 토대로 산유 능력이 우수한 다유성 개체 120두와 산유 능력이 낮은 저유성 개체 110두(Table 1)를 각각

Table 1. Estimated average breeding value (EBV) of high and low milk production lines in Hanwoo cows

Selected line	No. of individuals	EBV \pm SD	Maximum	Minimum
High line	53	15.46 \pm 1.05	30.78	10.43
Low line	49	-10.31 \pm 1.28	-10.86	-24.54

분리 선발하고 이들 선발집단 총 230두의 각 개체별로부터 혈액 시료를 채취하였다. 이 가운데 산유량에 대한 육종가 추정치가 최상위 값을 갖는 다유 계통 53두와 최하위의 값을 갖는 저유 계통 개체 49두를 다시 선발하여 RFLP 및 염기 서열 분석을 위한 공시축으로 이용하였다.

Total DNA의 분리 및 정제

공시축의 혈액으로부터 mt DNA를 포함하고 있는 total DNA의 분리 및 정제는 Miller 등(1988)의 방법을 일부 변형하여 실시하였으며, 분리된 DNA는 TE buffer(10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA)에 용해하였다. 추출된 DNA의 농도는 spectrophotometer(JASCO V-550, Japan)로 260 nm의 UV 흡착에 의해 측정하였다.

mt DNA의 Primer 합성 및 Probe 제작

축우 mt DNA의 D-loop 영역 가운데 15601번과 404번 사이를 지정하는 염기 서열 부위의 1142bp 단편을 증폭하기 위한 primer로서 forward primer 5'-TAGTGCTAATACCAACGCC-3'와 reverse primer 5'-AGGCATTTTCAGTGCCTTGC-3'의 염기 배열을 설계하여 합성하였으며, PCR 증폭은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5 mL tube에 template DNA 약 100 ng, primer 각 10 pm, dNTP 각 200 μ M, 10 \times PCR buffer 그리고 Taq DNA polymerase 1 unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 10 μ L로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 30회 반복한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 종료했다. 그리고 digoxigenin으로 labeling된 mt DNA probe를 제조하기 위하여 200 μ M의 dTTP 대신에 130 μ M의 dTTP와 70 μ M digoxigenin-11-dUTP(Boehringer Mannheim)을 첨가하여 증폭하였다.

제한효소 절단 및 Southern Blotting

HpaII, BamHI, XbaI, HinfI, EcoRI, HindIII 및 RsaI 7종류의 제한효소 절단을 위한 20 μ L의 반응액은 일정량의 증류수에 5 μ g의 DNA, 30 units의 제한효소를 각각 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 이상 반응하여 완전히 소화 절단하였다. 반응액을 0.9% agarose gel과 1 \times TBE buffer(90 mM tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 30 V에서 24시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 후 agarose gel을 denaturation 및 neutralization 과정으로 처리한 후 nylon membrane (Boehringer Mannheim)에 진공펌프(Hoeffler)를 사용하여 blotting한 후 UV crosslinker(UVP)에서 DNA를 nylon membrane에 고정시켰다.

Hybridization

Nylon membrane의 DNA와 digoxigenin-labeled mt DNA probe간의 혼성화를 위하여 pre-hybridization 용액(50% formamide, 5 × SSC, 5% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS)에 넣어 42℃의 hybridization oven (Stuart Scientific, UK)에서 2시간 동안 반응하였다. 이어서 hybridization 용액에 30~60 μL의 digoxigenin-labeled mt DNA probe를 첨가하여 42℃에서 24시간 이상 반응시켰다. 반응이 종료 후 nylon membrane을 0.1% SDS가 함유된 2 × SSC 용액에 넣어 상온에서 15분간 2회 세척하고 다시 0.1% SDS, 2 × SSC 용액으로 60℃에서 30분간 2회 세척하였다. 세척된 nylon membrane을 DIG luminescent detection kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 처리한 후 X-ray film에 노출하여 DNA band를 검출하였다.

Mt DNA D-loop 영역의 Sequencing

다유성 및 저유성 개체간의 mt DNA D-loop 영역의 염기 서열을 비교 분석하기 위하여 PCR 증폭산물을 ethanol로 정제한 후, ABI 310 Genetic Analyzer 자동 염기 서열 분석 장치(PE Applied Biosystem, USA)를 사용하여 염기 서열을 결정하였다.

통계분석

mt DNA의 RFLP type과 한우 암소의 유생산에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 이들 RFLP와 유생산간에 관련성을 통계 분석하였다. 본 연구에 사용된 분석 자료는 송아지 분만 후 60일령, 90일령 및 120일령의 이유시 체중에 대한 보정기록과 송아지 분만 후 1개월간의 비유 초기 산유 능력을 추정하고 이 가운데 선발 개체들에 대한 분만 후부터 이유시까지 120일간의 실제 비유량을 측정하였다.

다유 및 저유성 선발 계통에 대한 통계적 처리는 SAS (SAS, Inst. Inc., Cary NC)의 PROC GLM 방법을 이용하여 검정하였으며 그 통계 분석모형은 다음과 같다.

$$Y_{ij} = \mu + Mt_i + P_j + e_{ij}$$

Y_{ij} = 관측치, μ = 전체평균, M_i = j 번째 mt DNA RFLP형 효과, P_j = 육종가, e_{ij} = 임의효과

결과 및 고찰

우리나라 고유의 육우품종인 한우의 세포질내 유전정보원으로서 mt DNA의 RFLP형을 검출하고 RFLP marker가 한우의 비유능력에 미치는 효과를 분석하고자 산유능력에 대한

육종가 추정치에 기초하여 다유성 및 저유성 개체로 분리 선발한 집단에서 최상위와 최하위 계통에 속하는 개체들을 각각 53두와 49두 선발하였다. 각 개체들의 genomic DNA를 *HpaII*, *BamHI*, *XbaI*, *HinfI*, *EcoRI*, *HindIII* 및 *RsaI* 7종류의 제한효소로 각각 처리하여 절단한 후 mt DNA probe로 hybridization시켜 DNA 절단 양상을 검출하였다. 먼저, mt DNA probe를 합성하고자 D-loop 영역을 포함하는 15601번과 404번 사이의 1142bp 염기 서열 부위를 PCR을 이용하여 digoxigenin으로 표지된 probe를 증폭하여 합성한 후 agarose gel로 전기영동하여 probe band를 확인하였다(Fig. 1).

Genomic DNA를 7종류의 제한효소로 각각 절단하였을 때 각 제한효소들의 특정한 염기 인지 부위에 따라 검출된 band의 수와 크기가 서로 다른 특징적인 RFLP 형이 관찰되었고 이들 제한효소별 절단부위의 수와 분리된 단편들의 크기를 분류하여 Table 2에 제시하였다. Fig. 2는 7종류의 제한효소 가운데 *EcoRI*, *HindIII* 및 *HinfI* 3종류의 제한효소로 절단하고 이들 제한효소에 따른 mt DNA의 다형성을 분석한 결과로서 각각의 제한효소 인지부위에 따라 제한효소 특이적인 banding pattern이 생성되었으나 검정 두수 모두에서 동일한 RFLP 양상이 검출되어 이들 제한효소에는 mt DNA 다형성이 확인되지 않았다. 그러나, *BamHI*, *RsaI* 및 *XbaI* 3종류 제한효소로 각각 절단하였을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 banding pattern에 따라 개체 간에 변이가 관찰되었다 즉, A와 B로 명명한 2종류의 RFLP 형이 이들 3종류의 제한효소에서 각각 관찰되었으며 특히, *HpaII* 제한효소로 절단하였을 경우 A와 B형 이외에 C형의 3종류 type이 검출되었다. *BamHI*

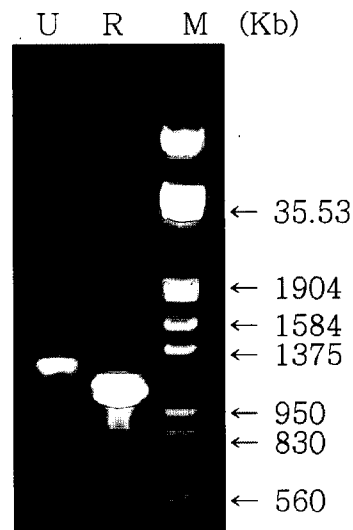


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of digoxigenin-labeled mt DNA D-loop probe amplified in PCR.
 U : PCR amplification of mt DNA D-loop region. R: PCR amplification of D-loop probe labeled with digoxigenin. M: molecular marker (λ DNA/*EcoRI* + *HindIII*).

Table 2. Restriction fragment patterns of mt DNA D-loop observed in Hanwoo cows

Restriction enzyme	Type	Number of bands	Fragment sizes (Kb)
<i>EcoRI</i>	A	3	10.5, 6.5, 3.3
<i>HindIII</i>	A	3	1.7, 1.2, 0.6
<i>HinfI</i>	A	1	0.5
<i>BamHI</i>	A	4	9.4, 7.0, 6.3, 4.0
	B	3	7.0, 6.3, 4.0
<i>RsaI</i>	A	5	4.0, 3.5, 2.4, 1.6, 1.0
	B	5	4.3, 4.0, 2.4, 1.9, 1.0
<i>XbaI</i>	A	2	16.0, 4.1
	B	2	15.0, 4.1
<i>HpaII</i>	A	1	3.3
	B	1	0.6
	C	2	3.3, 0.6

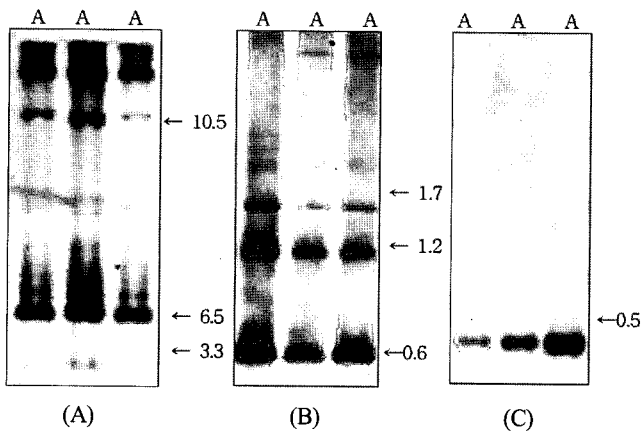


Fig. 2. RFLP banding patterns observed when genomic DNA was digested with *EcoRI*(A) and *HindIII*(B) and *HinfI*(C) and hybridized with a bovine mt DNA D-loop probe.

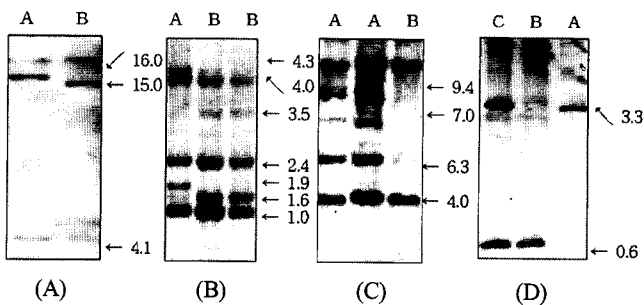


Fig. 3. RFLP banding patterns observed when genomic DNA was digested with *XbaI*(A), *RsaI*(B), *BamHI*(C) and *HpaII*(D) and hybridized with a bovine mt DNA D-loop probe.

인되었다. *RsaI* 제한효소에서 검출된 A형은 4.0, 3.5, 2.4, 1.6 및 1.0kb 5개 band 그리고 B 형은 4.3, 4.0, 2.4, 1.9 및 1.0kb 5개 band가 각각 출현하였다. 또한, *XbaI* 제한효소의 다형은 A형의 경우 16.0 와 4.1kb 그리고 B형은 15.0과 4.1kb 2개의 band가 각각 검출되었다. 한편, *HpaII* 제한효소의 경우 A형은 3.3kb, B형은 0.6kb 그리고 C형은 3.3kb와 0.6kb의 band가 모두 출현하여 A와 B 두개의 대립유전자에 의해 지배되는 3 종류의 유전자형이 관찰되었다. Ron 등(1992)은 젓소에서 mt DNA probe를 이용하여 총 31종류의 제한효소로 처리한 결과 20종류의 제한효소에서 총 23개의 mt DNA RFLP 다형성을 검출 보고한 바 있다. 또한, Watanabe 등(1989)은 유럽과 Zebu 계통의 교잡우인 Philippine 품종의 mt DNA를 15종류의 제한효소로 절단한 결과 이들 가운데 *BamHI*, *BhIII*, *EcoRV*, *HindIII*, *PstI* 및 *ScaI* 6종류의 제한효소에서 각각 다형성이 검출되었고, 일본 Japanese black과 Shorthorn 그리고 Holstein 3품종의 mt DNA를 19종류의 제한효소로 처리하여 *HindIII*, *TaqI* 및 *MspI*에서 각각 다형성을 관찰하였다. Bhat 등(1990)도 Holstein, Hariana 및 Indian Water Buffalo 3품종에 13종류의 제한효소를 이용하여 절단했을 때 6종류의 제한효소(*AvaII*, *BamHI*, *BgIII*, *HindIII*, *HpaI* 및 *PstI*)에 의한 Holstein종에서 다형성을 보고하였다. 또한, Chung 등(1996)은 국내 한우와 Holstein 품종을 대상으로 10종류의 제한효소에 의한 mt DNA 다형성을 분석하고 *PstI*, *ScaI* 및 *HpaI* 3종류의 제한효소에서 다형성을 각각 검출하였다. 지금까지 대부분의 mt DNA 다형성에 관한 연구는 전체 mt DNA를 순수 분리 정제하여 각종 제한효소 처리에 의한 단순 절단형이거나 mt DNA 전체를 probe로 직접 이용하여 제한효소 인지 부위의 차이에 따른 다형성을 분석한 결과가 대부분이었다. 그러나 본 실험에서는 mt DNA내 D-loop 영역을 probe로 합성하고 각 제한효소에 의해 절단된 부위와 hybridization시켜 생성된 RFLP type을 검출하였다.

이상과 같은 mt DNA내 D-loop를 probe로 이용하여 검출한 mt DNA의 RFLP type과 선발집단에서 이들 각 type의 출현빈도는 Table 3에 제시한 바와 같다. *BamHI*, *RsaI* 및 *XbaI* 3종류의 제한효소에서는 모두 A와 B로 분류한 2종류의 type이 출현하였으나 *HpaII* 제한효소의 경우 A, B 및 C 3종류의 RFLP type이 관찰되었다. 그리고 산유 능력에 따라 다유 및 저유 계통으로 선발한 두 우군에서 *BamHI* 과 *RsaI* 제한효소 절단에 의한 RFLP type의 출현빈도에 각각 통계적 유의차가 인정되었다. 즉, *BamHI* 제한효소의 RFLP type에서 A와 B type의 출현율이 다유 계통과 저유 계통에서 각각 87%와 71% 그리고 13%와 29%로 A type은 다유 계통이 약 16% 정도 높은 반면 B type은 저유 계통이 상대적으로 높은 출현율을 보여 두 선발군간의 출현빈도에 뚜렷한 차이가 인정되었다. 또한, *RsaI* 제한효소의 RFLP type에서도 다유와 저유 선

제한효소의 A형은 9.4, 7.0, 6.3 및 4.0kb 4개의 절편으로 분리되었으나 B형은 9.4kb를 제외한 나머지 3개의 절편이 확

Table 3. Frequencies of the RFLP type of mt DNA D-loop region between high and low milk production lines in Hanwoo cows

Enzyme	RFLP type	High line	Low line	P
		Frequency(%)	Frequency(%)	
<i>HpaII</i>	A	0.55	0.49	NS
	B	0.13	0.16	
	C	0.32	0.35	
<i>BamHI</i>	A	0.87	0.71	*
	B	0.13	0.29	
<i>RsaI</i>	A	0.79	0.93	*
	B	0.21	0.07	
<i>XbaI</i>	A	0.90	0.83	NS
	B	0.10	0.17	

* P < 0.05, NS: non-significant.

발 계통에서 A와 B type의 출현율이 각각 79와 93% 그리고 21과 7%로 두 선발 계통 간에 분명한 차이가 확인되었다. 즉, 다유 계통의 선발 집단에서 A type의 출현율이 저유 계통의 선발 집단에 비해 약 14% 정도 낮았고 B type의 출현율은 상대적으로 14% 높은 것으로 분석되었다. 그러나, *HpaII* 제한효소의 A, B 및 C type의 출현율은 두 선발 집단 간에 각각 55, 13 및 32% 그리고 49, 16 및 35%로 상호 유사한 빈도를 나타냈고 *XbaI* 제한효소 역시 두 선발 계통 간에 A와 B type의 출현율이 각각 90과 10% 그리고 83과 17%로 비슷한 경향을 나타내 선발 집단간 RFLP type의 출현율은 통계적 유의차가 인정되지 않았다. Chung 등(1996)은 한우와 젃소에서 *HpaII* 제한효소로 RFLP 출현빈도를 조사한 결과 젃소의 A 형이 67.4%로 한우의 35%에 비해 약 두배 높은 출현율을 보였고 B 형의 출현율은 한우가 65%로 젃소의 32.6%보다 월등히 우세한 출현율을 나타냈다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구의 전체 출현빈도는 A와 B 형이 각각 61과 39%로 Chung 등(1996)이 발표한 성적과 비교해 볼 때 젃소의 성적과 대체로 유사한 경향이었으나 한우와는 각각 약 26% 정도의 출현율 빈도에 차이를 보였다.

한편, 한우의 산유능력 추정치에 기초하여 추정된 육종가를 극단적으로 최상위와 최하위 값을 갖는 계통을 각각 선발하여 두 계통간의 mt DNA D-loop 영역의 염기 서열을 비교 분석하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이 다유 및 저유 두 계통간에 441번째 염기가 G/C, 469번째 염기는 T/C, 503번째 염기는 C/T, 569번째 염기는 G/A, 614번째 염기는 C/A 그리고 644번째 염기는 C/T로 각각 염기가 치환되어 있었고 특히, 677번째 염기는 다유 계통 개체의 A 염기가 저유 계통 개체에서는 결실되어 있다는 사실이 확인되었다. 이처럼 극

단적으로 선발된 두 계통 간에 염기 서열의 차이는 곧 우유 생산 능력 차이에 영향을 미칠 것으로 예상된다.

mt DNA의 D-loop 염기 배열 내 RFLP marker가 한우 암소의 산유량에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 생산된 송아지의 60, 90 및 120일령의 이유시 체중에 대한 성적 기록과 송아지 분만 후 1개월간의 비유 초기 산유량을 추정하고 이 가운데 선발 개체들에 대한 분만 후부터 이유시까지 120일간의 실제 비유량을 측정하여 추정된 육종가에 기초하여 선발된 다유 및 저유 계통을 대상으로 SAS package의 GLM 방법을 이용하여 유량 육종가에 따른 유의성을 통계 분석하였다. 즉, 다유 및 저유 선발 계통을 대상으로 검출된 RFLP type과 육종가 추정치간의 관련성을 분석한 결과 Table 4에 제시한 바와 같이 *XbaI* 제한효소에서 RFLP type과 산유능력 추정치 간에 유의적인 관련성이 인정되었다(P < 0.05). 즉, RFLP A type의 추정치가 6.233으로 B type의 0.757보다 유의적으로 높은 유량 육종가 값을 나타냈다. 이러한 결과는 *XbaI* 제한효소의 mt DNA RFLP type은 한우의 산유 능력에 효과적으로 영향을 미치고 특히, A type의 개체가 B type의 개체에 비해 산유 능력 향상에 더 바람직한 type으로 평가되었다. 따라서, *XbaI* 제한효소의 RFLP type은 한우의 다유성 개체 선발을 위한 DNA marker로서의 이용 가능성을 시사해 주고 있다. 그러나, *HpaII*, *BamHI* 및 *RsaI* 제한 효소의 경우 RFLP type과 산유량 육종가 간에 유의차가 인정되지 않았다. 본 연구 결과에 대한 보다 정확한 검증용 위해서는 앞으로 더 많은 한우 집단과 산유 능력 검정에 따라 선발된 시험축을 대상으로 조사해 볼 필요가 있다고 판단된다.

젃소에서 우유와 유지방 생산 변이 가운데 2~10%가 모계 효과에 기인하는 것으로 밝혀진 이후 동물의 비유 형질 및 산

Table 4. Least square means (LSM) and standard errors (SE) for RFLP types using D-loop probe in Hanwoo cows

Enzyme	Type	EBV
		LSM± SE
<i>HpaII</i>	A	2.835±0.231
	B	-1.231±0.322
	C	4.074±0.435
<i>BamHI</i>	A	-0.364±0.153
	B	5.950±0.394
<i>RsaI</i>	A	-2.272±0.267
	B	4.965±0.381
<i>XbaI</i>	A	6.233±0.254 ^a
	B	0.757±0.328 ^b

^{ab} Superscripts with different letters in the same column significantly differ (p < 0.05).

		10	20	30	40	50
HML	TTGAGGCACA	ATCGAAAAACA	AATTACTAAA	ATGAAGACAG	GTCTTTGTAG	
LML	TTGAGGCACA	ATCGAAAAACA	AATTACTAAA	ATGAAGAGAG	GTCTTTGTAG	
		60	70	80	90	100
HML	TACATCTAAT	ATACTGGTCT	TGTAAACCAG	AGAAGGAGAA	CAACTAACCT	
LML	TACATCTAAT	ATACTGGTCT	TGTAAACCAG	AGAAGGAGAA	CAACTAACCT	
		110	120	130	140	150
HML	CCCTAAGACT	CAAGGAAGAA	ACTGCAGTCT	CACCATCAAC	CCCCAAAAGCT	
LML	CCCTAAGACT	CAAGGAAGAA	ACTGCAGTCT	CACCATCAAC	CCCCAAAAGCT	
		160	170	180	190	200
HML	GAAGTTCTAT	TTAAACTATT	CCCTGAACAC	TATTAATATA	GTTCCATAAA	
LML	GAAGTTCTAT	TTAAACTATT	CCCTGAACAC	TATTAATATA	GTTCCATAAA	
		210	220	230	240	250
HML	TACAAAAGAGC	CTTATCAGTA	TTAAATTTAT	CAAAAATCCC	AATAACTCAA	
LML	TACAAAAGAGC	CTTATCAGTA	TTAAATTTAT	CAAAAATCCC	AATAACTCAA	
		260	270	280	290	300
HML	CACAGAATTT	GCACCCTAAC	CAAATATTAC	AAACACCACT	AGCTAACATA	
LML	CACAGAATTT	GCACCCTAAC	CAAATATTAC	AAACACCACT	AGCTAACATA	
		310	320	330	340	350
HML	ACACGCCCAT	ACACAGACCA	CAGAATGAAT	TACCTACGCA	AGGGGTAATG	
LML	ACACGCCCAT	ACACAGACCA	CAGAATGAAT	TACCTACGCA	AGGGGTAATG	
		360	370	380	390	400
HML	TACATAACAT	TAATGTAATA	AAGACATAAT	ATGTATATAG	TACATTAAAT	
LML	TACATAACAT	TAATGTAATA	AAGACATAAT	ATGTATATAG	TACATTAAAT	
		410	420	430	440	450
HML	TATATGCCCC	ATGCATATAA	GCAAGTACAT	GACCTCTATA	<u>C</u> CAGTACATA	
LML	TATATGCCCC	ATGCATATAA	GCAAGTACAT	GACCTCTATA	<u>C</u> CAGTACATA	
		460	470	480	490	500
HML	ATACATATAA	TTATTGAC <u>T</u> G	TACATAGTAC	ATTATGTCAA	ATTCATTCTT	
LML	ATACATATAA	TTATTGAC <u>C</u> G	TACATAGTAC	ATTATGTCAA	ATTCATTCTT	
		510	520	530	540	550
HML	GA <u>A</u> AGTATAT	CTATTATATA	TTCCTTACCA	TTAGATCACG	AGCTTAATTA	
LML	GA <u>T</u> AGTATAT	CTATTATATA	TTCCTTACCA	TTAGATCACG	AGCTTAATTA	
		560	570	580	590	600
HML	CCATGCCGCG	TGAAACCA <u>C</u> C	AACCCGCTAG	GCAGGGATCC	CTCTTCTCGC	
LML	CCATGCCGCG	TGAAACCA <u>A</u> C	AACCCGCTAG	GCAGGGATCC	CTCTTCTCGC	
		610	620	630	640	650
HML	TCCGGGCCCA	TAA <u>C</u> CCGTGG	GGGTCGCTAT	CCAATGAACT	TTA <u>C</u> CAGGCA	
LML	TCCGGGCCCA	TAA <u>A</u> CCGTGG	GGGTCGTTAT	CCAATGAACT	TTA <u>T</u> CAGGCA	
		660	670	680	690	700
HML	TCTCCTTCTT	TCTTCAGGGC	CATCTCA <u>ACT</u>	AAAACGGTCC	CATTCTTCTT	
LML	TCTCCTTCTT	TCTTCAGGGC	CATCTCA <u>CT</u>	AAAACGGTCC	CATTCTTCTT	
		710	720	730	740	750
HML	CTTAAATAAG	ACATCTCGAT	GGACTAATGG	CTTAATCAGC	CATGCTCACA	
LML	CTTAAATAAG	ACATCTCGAT	GGACTAATGG	CTTAATCAGC	CATGCTCACA	

Fig. 4. Nucleotide sequences of mt DNA D-loop region in Hanwoo selected for high and low milk production lines.

HML, high milk production line; LML, low milk production line. Sequence differences between the two selection lines are indicated by underlined letter.

육 형질 등 경제 형질에 대한 세포질 유전 효과의 영향에 많은 흥미와 관심이 집중되었다. Brown 등(1989)은 Holstein 젖소에서 mt DNA의 360번째 염기 서열에서 *HpaII* 제한효소의 RFLP marker에 따라 유지율과 밀접하게 관련되어 있음을 관찰하였고, Schutz 등(1992)은 mt DNA내 D-loop 영역의 특정 RFLP형이 유량 및 유 조성에 유의적으로 연관되어 있음을 보고하였다. 특히, Schutz(1993)은 169번째와 16074번째에서 A → G로 그리고 T → C로 단일 염기 치환이 일으킬 경우 유 생산량이 각각 482와 842kg 정도 유의적으로 더 높은 것으로 추정하였고 유지방, 무지고형분 및 에너지 요구량에도 관련되어 있음을 확인하였다. 또한, Ron 등(1993)과 Schutz 등(1994)은 젖소에서 mt DNA의 D-loop 염기서열 다형성이 유량은 물론 번식 형질과도 유의적으로 관련되어 있음을 보고한 바 있다. 한편, Mannen 등(1998)은 일본 흑모화우에서 mt DNA D-loop 영역의 염기 서열 변이가 도체 형질 및 육질에 영향을 미친다는 분석 결과를 발표하였다. 육용종 한우에서 보다 다양한 mt DNA RFLP를 검출하기 위해서는 본 연구에서 사용한 제한효소 이외에 다른 제한효소의 추가 분석과 검사 두수를 확대하여 유량 및 유 조 성분 함량의 주요 생산 형질과의 관련성을 조사할 필요가 있다. 또한, Southern blot hybridization 기법을 이용한 RFLP 분석과 함께 PCR 기법을 이용한 mt DNA의 RFLP 분석은 비유 형질과 관련된 새로운 DNA 표지인자 개발에 필요하다고 판단된다. 결론적으로 생리적 및 유전적으로 비유량이 극히 저조한 한우 암소의 우유 생산 능력 향상을 위해 모계 효과에 관련된 mt DNA의 다형성을 검출하여 한우의 산유량에 유의적으로 영향을 미치는 marker를 개발하고 이를 DNA 표지인자로 이용하는 선발 기술은 한우의 비유량 증가에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 mt DNA의 D-loop 영역을 probe로 이용한 Southern blot hybridization 분석 기법을 이용하여 한우에서 mt DNA의 RFLP를 분석하고 RFLP marker가 유생산에 미치는 영향을 분석하여 산유량 관련 DNA marker를 개발하고자 수행하였다. Mt DNA의 D-loop 영역내 404번부터 15061까지 1142 bp 크기의 염기 서열 부위를 특이적인 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다. Mt DNA를 *HpaII*, *BamHI*, *XbaI*, *HinfI*, *EcoRI*, *HindIII* 및 *RsaI* 7종류의 제한효소를 이용하여 각각 절단한 후 DIG로 표지된 D-loop probe를 이용하여 검출한 결과 *XbaI*, *RsaI*, *BamHI* 및 *HpaII* 4종류의 제한효소에서 각각 RFLP 다형성이 검출되었고 *EcoRI*, *HindIII* 및 *HinfI* 3종류 제한효소는 변이가 존재하지 않았다. 다유 계통과 저

유 계통 선발 집단간의 각 제한효소별 RFLP type의 출현빈도를 비교한 결과 *BamHI* 및 *RsaI* 제한효소에서 두 집단간의 RFLP type의 출현율에 각각 통계적 유의성($P < .05$)이 인정되었다. 다유 및 저유성으로 극단의 육종가 값을 갖는 두 계통의 mt DNA D-loop 영역의 염기 서열을 비교 분석한 결과 441번째 염기가 G/C, 469번째 염기는 T/C, 503번째 염기는 C/T, 569번째 염기는 G/A, 614번째 염기는 C/A 그리고 644번째 염기는 C/T로 각각 염기가 치환되었고 특히, 다유 계통 개체의 677번째의 A 염기가 저유 계통 개체에서는 결실되어 있다는 사실이 확인되었다. 한편, 한우 암소의 유생산에 영향을 미치는 효과를 규명하기 위하여 mt DNA RFLP 형과 송아지 이유시 체중, 생시체중 및 비유량을 측정하여 얻어진 육종가의 성적을 근거로 통계 분석한 결과 *XbaI* 제한효소의 RFLP type이 산유 능력 육종가와 유의적인 관련성이 확인되었다 ($p < .05$). 즉, RFLP A type을 갖는 축군의 평균 육종가 추정치가 6.233으로 B type을 갖는 축군의 평균 육종가 추정치 0.757보다 월등히 높은 것으로 나타났다. 결론적으로 산유량과 관련성이 확인된 mt DNA RFLP type은 한우의 산유량 향상을 위한 DNA marker로 이용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 상지대학교 교내 학술연구지원비(연구년제)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Anderson, S., De Drujin, M. H. L., Coulson, A. R., Eperon, V. C., Sanger, F., and Young, I. G. (1982) The complete sequence of the bovine mitochondrial DNA : conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **156**, 683-717.
2. Bell, B. R., McDaniel, B. T., and Robison, O. W. (1985) Effect of cytoplasmic inheritance on production traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **68**, 2038-2051.
3. Bhat, P. P., Mishar, B. P., and Bhat, P. N. (1990) Polymorphism of mitochondrial DNA(mt DNA) in cattle and buffaloes. *Biochem. Genet.* **28**, 311-318.
4. Boettcher, P. J., Freeman, A. E., Johnston, S. D., Smith, R. K., Beitz, D. C., and McDaniel, B. T. (1996) Relationships between polymorphism for mitochondrial deoxyribonucleic acid and yield traits of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* **79**, 647-654.

5. Brown, W. M., George, M. J., and Wilson, A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA molecules from rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1967-1971.
6. Brown, D. R., Koehler, C. M., Lindberg, G. L., Freeman, A. E., Mayfield, J. E., Myers, A. M., Schutz, M. M., and Beitz, D. C. (1989) Molecular analysis of cytoplasmic genetic variation in Holstein cow. *J. Anim. Sci.* **67**, 1926-1932.
7. Chung, E. R., Park, J. J., and Han, S. K. (1996) RFLP analysis of bovine mt DNA using PCR technique. *Korean J. Anim. Sci.* **38**, 307-320.
8. Chung, E. R., Kim, W. T., Kim, Y. S., Lee, J. K., and Han, S. K. (2002) Sequence and genetic variation of mitochondrial DNA D-loop region in Korean cattle. *J. Anim. Sci. & Technol.(Kor.)* **44**, 181-190.
9. Desjardins, P. and Morais, R. (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **212**, 599-634.
10. Ensinger, M. E. (1987) Beef cattle science(6th ed.). The Interstate Pub. pp. 87-89.
11. Freeman, A. E. (1990) Cytoplasmic inheritance associated with economic traits-phenotypic and molecular difference. 4th World Congr. Genet. Applied to Livest. Prod. Edinburgh, Scotland XIV. pp. 140-143.
12. Hauswirth, W. W., and Laipis, P. J. (1982) Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4686-4690.
13. Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., and Janke, A. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J. Mol. Evol.* **47**, 441-448.
14. Hutchison III, C. A., Newblod, J. E., Potter, S. S., and Edgell, H. M. (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**, 536-538.
15. Laipis, P. J., Hauswirth, W. W., O'Brien, T. W., and Mochaels, G. S. (1979) A physical map of bovine mitochondrial DNA from a single animal. *Biochem. Biophys. Acta.* **565**, 22-26.
16. Mannen, H., Kojima, T., Oyama, K., Mukai, F., Ishida, T., and Tsuji, S. (1998) Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese black cattle. *J. Anim. Sci.* **76**, 36-41.
17. 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.
18. Ron, M., Genis, I., and Shani, M. (1992) Mitochondrial DNA polymorphism and determination of effects on economic traits in dairy cattle. *Anim. Biotech.* **3**, 201-219.
19. Ron, M., Yoffe, O., and Weller, J. I. (1993) Sequence variation in D-loop DNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Anim. Genet.* **24**, 183-186.
20. Schutz, M. M., Freeman, A. E., Aeitz, D. C., and Mayfield, J. E. (1992) The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **75**, 1331-1341.
21. Schutz, M. M., Freeman, A. E., Lindberg, G. L., and Beitz, D. C. (1993) Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* **76**, 621-629.
22. Watanabe, T., Hayashi, Y., Semba, R., and Ogasawara, N. (1985) Bovine mitochondrial DNA in restriction endonuclease cleavage patterns and the location of the polymorphic sites. *Biochem. Genet.* **26**, 947-957.
23. Watanabe, T., Hayashi, Y., Kimura, J., Yasuda, Y., Saitou, N., Tomita, T., and Ogasawara, N. (1986) Pig mitochondrial DNA: polymorphism, restriction map orientation and sequence data. *Biochem. Genet.* **24**, 385-396.
24. Watanabe, T., Masangkay, T. S., Wakana, S., Saitou, N., and Tomita, T. (1989) Mitochondrial DNA polymorphism in native Philippine cattle based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem. Genet.* **27**, 431-438.