

발간등록번호

11-1390271-000047-01

98-N1-05-01-A-07

**한우 성장 단계별 특이 유전자 클로닝 및 발현양상  
해석을 통한 활용기술 개발**

GOVP 12015814

**Cloning and characterization of differentially  
expressed genes during growth stages of Hanwoo**

**농촌진흥청  
축산기술연구소**

**과학기술부**

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 한우의 성장단계별 특이 유전자 클로닝 및 발현양상 해석을 통한 활용기술개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2000. 9.

주관연구기관명 : 농촌진흥청  
축산기술연구소

주관연구책임자 : 정 일 정

연구 원 : 윤 두 학

“ : 김 태 현

공동연구기관명 : 경북대학교

공동연구책임자 : 임 진 규

공동연구기관명 : 인제대학교

공동연구책임자 : 구 용 범

# 요 약 문

## I. 제 목

한우의 성장 단계별 특이 유전자 클로닝 및 발현양상 해석을 통한 활용기술개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

개방화에 따른 국내 축산업의 국제 경쟁력 확보를 위하여 양적으로는 생산성을 높이고 질적으로는 우수한 육질의 품종을 개발하기 위하여 전통적인 가축 개량 및 축산물 이용 체계와 병행하여 분자유전학적 연구방법의 접목이 필요하다.

한우의 성장과 지방생합성 및 근내 지방 생성에 관련된 많은 유전자 자원을 확보하고 그 유전자들의 조절 기전을 밝힐 수 있는 기술을 배양하는 것이 우리나라 고유 유전자원인 한우의 보전, 생산성 및 효율성 향상에 필수적 조건이 되고있다.

한우의 성장 단계에 따라 특이 발현되는 유전자들을 분리 동정하며, 발현 조절기작을 해명하고자 하였다. 성장 단계별로 근육 내에 특이하게 발현되는 단백질의 분리동정을 통하여 우수 육질과 특이하게 발현되는 단백질간의 상관관계 분석을 통하여 고급육형 한우의 개량을 위한 분자유종기술의 개발을 하고자 하였다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

한우의 성장단계별 간과 근육조직으로부터 cDNA library 및 subtractive cDNA library를 제작하며, 성장단계별 특이 발현 유전자들의 염기서열 분석, 유사성분석 및 기능별 분류를 실시하여 카탈로그화 한다. 지방 생합성과 관련성이 높은 후보 유전자를 선별하여 그 구조 및 다형성을 분석하여 한우 개량에 이용 가능성을 탐색한다.

2-D gel electrophoresis를 이용한 각 성장단계별 우육단백질을 카탈로그화하여 성장단계 특이 발현되는 단백질의 분리정제를 위한 조건을 확립하고, 특이 발현 단백질들의 분자량과 pI값에 의한 카탈로그화를 하여, 성장단계 특이 순수 단백질을 분리한다. 기능이 알려지지 않은 단백질의 유전자 클로닝 및 특이 발현 유전자의 구조분석을 수행한다.

#### IV. 연구개발결과

한우의 성장단계별 간과 근육조직으로부터 12, 24개월령의 cDNA library를 및 subtractive library를 제작하였다. 성장단계별 특이 발현 유전자의 cDNA clone 278개를 분리하여 염기서열 분석하였고, 유사성분석 및 기능별 분류를 실시하여 catalog화하였다. 간 및 근육조직에서 유용할 것으로 추정되는 유전자를 선정하여 Northern blot 분석을 통해 발현양상 증가 유전자 확인하였다. 특이 발현양상을 보이는 유전자 11종의 full length cDNA 확보 및 genomic library에서 promoter 영역 cloning 중에 있다.

2-D gel electrophoresis를 이용한 각 성장단계별 우육단백질을 catalog화하였으며, 성장단계별로 특이하게 발현되는 단백질의 분리정제를 위한 조건확립하였다. 또한 성장단계별 특이 발현하는 단백질들의 분자량과 pI값에 의한 단백질의 카탈로그화와 이들 단백질을 PVDF에 전기적으로 옮겨주는 방법을 통해 순수분리하였다. Microsequencing과 Mass spectrometry을 통하여 아미노산 서열을 비교 분석하였으며, 24개월령 발현에 차이를 보이는 11종의 단백질을 분리 확보하였다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

분리 확보된 특이 발현 유전자들의 구조 분석과 경제형질과의 관련성 연구를 통해 새로운 분자유종기술의 개발과 고부가가치를 지니는 축산물 생산에 응용할 수 있고, 특이 발현 유전자 및 단백질의 발현조절기작 해명에 의해 고급육형 한우의 생산성 향상 및 한우의 우수성을 과학적으로 증명, 홍보하는데 활용하여 새로운 수요 창출을 기대하며, 우리 고유 유전자원의 특성구명에 의한 산업재산권 확보 등을 추진해 나갈 것이다.

기술적 측면에서 Immobilized pH Gradient IEF를 통해 고정화된 규칙적 일차적 IEF를 할 수 있게 되었고, 자연 상태 단백질의 50%정도가 N-terminal blocking되어 있는 단백질을 Mass Spectrometry를 통해 단백질의 정확한 분자량을 알아내고 데이터베이스를 통해 동정할 수 있게 되었다. 또한 앞으로 cDNA micro array 기술의 도입을 통하여 성장에 중요한 유전자, 육질에 중요한 유전자 등을 빠르게 밝힐 수 있으므로 한우의 개량이 한층 용이하게 되며, 진단시약 개발에도 활용할 수 있을 것이다.

# S U M M A R Y

Genes differentially expressed in the liver and the muscle loin eye of Hanwoo (Korean native cattle) during its growth (0 - 24 months) were investigated by cDNA subtraction and screening. cDNA subtractions were performed successfully and cDNA subtractive libraries were constructed.

A total of 132 cDNA clones were selected from muscle loin eye subtractive cDNA library. These cDNA clones were sequenced and analysed. We have analyzed four cDNA clones as candidates of age specific genes. The expression pattern of the candidate genes were confirmed by semiquantitative RT-PCR and Northern blot analysis. The expression of Bovine ADRP gene are induced highly in the 24-month tissue. To advance studies of ADRP gene regulation and potential function, we have cloned and characterized the complete Hanwoo ADRP gene.

We analysed the nucleic acid variation using PCR-SSCP and direct sequencing method. We observed two nucleotides substitution in exon 8 of Hanwoo ADRP gene. Adenine (A) was substituted to thymine (T) and one T was inserted at 1273th and 1275th position of bovine ADRP mRNA, respectively.

No gene was found to be reduced in expression in the liver during growth, whereas 77 genes including 17 unknown genes showed increased expression in liver during growth. The expression of the 40 out of 77 genes showed gradual increase in their expression for up 24 months, whereas 37 genes showed fast increases in their expression within 6 months and stayed almost unchanged thereafter. Genomic cloning was performed using 14 cDNA clones, which have 5'-nontranslating region, as probes and 5 genes were isolated. The promoter regions were subcloned from 3 genes (retinol binding protein, cytochrome P450, aralkyl acyl CoA:amino acid N-acyltransferase).

Protein profiles of beef loin were constructed by comparing the two-dimensional gel electrophoresis patterns of the proteins from different growth stages of Hanwoo, Korean cattle. Proteins from the lean muscle of 0, 6, 12 and 24 months old Hanwoo were separated by isoelectric focusing(IEF) on 16 cm tube gels or Immobilized pH Gradients (IPG), and further processed second dimensionally by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using 18 x 20 cm gel. Proteins with pI values ranging 3.0 to 10.0 and molecular weight 15 to 100 kDa could be clearly detected on gel by silver staining. Interestingly, many of the proteins significantly increased and decreased during growth happened to be low molecular ones. To

isolate the increased proteins, the soluble proteins were obtained from the tissue by 1% Triton X-100 extraction, then fractionated by 30% and 50% ammonium sulfate. The isolation condition of each particular protein was determined. Most of the isolated proteins were N-terminal Blocked, so the precise molecular weight of the proteins were analyzed by mass spectrometry. We have developed the method of Mass Spectrometry from the 2-D PAGE gel.

# C O N T E N T S

<b>1. Introduction</b>	10
<b>2. Development of Technology</b>	12
<b>3. Contents and results</b>	14
<b>A. First subtitle</b>	14
<b>Analysis of expression pattern and gene structure of useful genes in muscle</b>	
1) Materials and methods	14
a) Collection of muscle samples of Hanwoo	14
b) Isolation of mRNA from muscles	14
c) Construction of subtractive cDNA library	16
d) Selection of specific genes by Southern blot hybridization	16
e) Construction of cDNA library	17
f) Genomic library screening and subcloning of the specific genes	17
2) Results and discussion	18
a) Construction of subtractive cDNA library and selection of candidate gene	18
b) Analysis of expression patterns of candidate genes	24
c) Analysis of genomic DNA sequences of Hanwoo ADRP gene	27
d) Analysis of polymorphism of ADRP gene	30
<b>B. Second subtitle</b>	33
<b>Analysis of expression pattern and gene structure of useful genes in liver</b>	33
1) Materials and methods	33
a) Collection of liver samples of Hanwoo	33
b) Isolation of mRNA from liver	33
c) Construction of subtractive cDNA library	35
d) Selection of specific genes by Southern blot hybridization	38
e) Construction of genomic library of Hanwoo	38
f) Genomic library screening and subcloning of specific genes	38

2) Results and discussion	39
a) Isolation of mRNA from liver	39
b) Construction of subtractive cDNA library	39
c) Screening of specifically expressed genes by slot-blot hybridization	39
d) Construction and screening of genomic library	40
e) Subcloning and Analysis of promoter region of candidate genes	50
<b>C. Third subtitle</b>	51
<b>Isolation and identification of the growth-related proteins</b>	
1) Materials and methods	51
a) Isolation of the growth-related proteins	51
Preparation of samples	51
Extraction of proteins	51
Ammonium Sulfate fractionation	51
Protein assay	51
2-dimensional gel electrophoresis	51
b) Identifications of the growth-related proteins	52
Microsequencing	52
Mass spectrometry	52
2) Results and discussion	53
a) Comparison of gel images	53
b) Analysis of amino acid sequences	54
c) Measurement of molecular weight of protein	56
d) Searching the protein database	60
<b>D. Summary</b>	62
<b>4. Accomplishments versus plans and expected contribution to other fields</b>	63
<b>5. Usage of the results</b>	66
<b>6. References</b>	67



# 목 차

제 1 장 서 론	10
제 2 장 국내의 기술개발 현황	12
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 세부과제	14
근육조직 유용유전자의 구조 및 발현양상 분석	
1. 재료 및 방법	14
가. 한우의 월령별 근육조직의 채취	14
나. 한우의 근육조직으로부터 mRNA 의 분리	14
다. Subtractive cDNA library 제조	16
라. Southern blot hybridization에 의한 특이발현 유전자의 선별	16
마. cDNA library의 제조	17
바. 특이발현 유전자의 genomic library screening 및 subcloning	17
2. 결과 및 고찰	18
가. 한우 subtractive cDNA library 의 제작 및 후보 유전자 선정	18
나. 후보유전자들의 발현양상 확인 및 분석	24
다. ADRP 유전자의 genomic DNA 염기서열 분석	27
라. ADRP 유전자의 다형성 분석	30
제 2 세부과제	33
간 조직 유용유전자의 구조 및 발현양상 분석	33
1. 재료 및 방법	33
가. 한우의 월령별 간 조직의 채취	33
나. 한우의 간 조직 mRNA 의 분리	33
다. PCR에 의한 Subtractive cDNA library 제조	35
라. 성장 단계별 간 조직 특이 발현 유전자의 선별	38
마. 한우 genomic library의 제조	38
바. 특이발현 유전자의 genomic gene의 screening 및 subcloning	38

2. 결과 및 고찰	39
가. 한우의 간 조직 mRNA의 분리	39
나. Subtractive cDNA library 제조	39
다. Slot-blot hybridization에 의한 성장단계별 특이 발현 유전자의 screening	39
라. Northern blot 분석	40
마. 한우 genomic library 제조 및 특이발현 유전자의 genomic clone screening	50
바. Promoter subcloning 및 분석	
<b>제 3 세부과제</b>	<b>51</b>
<b>한우의 성장단계별 특이 단백질 동정</b>	
1. 재료 및 방법	51
가. 성장 특이 단백질의 분리	51
(1) 시료준비	51
(2) 단백질 용출	51
(3) Ammonium Sulfate fractionation	51
(4) Protein assay	51
(5) 이차원 전기영동	51
나. 성장 특이 단백질의 동정	52
(1) Microsequencing	52
(2) Mass spectrometry	52
2. 결과 및 고찰	53
가. 이미지의 비교 분석	53
나. 아미노산 서열 분석	54
다. 단백질의 분자량 측정	56
라. 단백질 데이터베이스 검색	60
<b>적 요</b>	<b>62</b>
<b>제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도</b>	<b>63</b>
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b>	<b>66</b>
<b>제 6 장 참 고 문 헌</b>	<b>67</b>

# 제 1 장 서 론

일반적으로 특정지역 또는 나라의 토종가축은 그 지역 주민의 선호도와 부합하는 경향을 보인다. 한우는 식육의 양적 생산에서는 외국육우에 비하여 떨어지지만여타 품종보다 질병에 대한 저항성이 강하며, 우리 국민의 음식문화에 알맞는 고급육질의 쇠고기를 생산한다. 그러나 2001년부터는 완전 개방화가 되어 축산물의 가격 하락으로 인한 많은 어려움을 겪을 것으로 예상하고 있다. 특히 우리나라 고유 축종인 한우기반의 약화가 우려되고 있는 실정이다.

개방화와 국민 생활 수준으로 다양한 소비자의 요구가 나타나 많은 육량과 우수한 육질 즉 근내 지방도가 높은 쇠고기를 선호하는 등 다양한 품종의 개발이 요구되고 있다. 이에 한우 산업의 국제경쟁력을 확보하기 위해서 한우 산육능력의 열세를 한우의 특성을 살려 품질 고급화와 차별화 전략이 요구되고, 한우의 산육능력 증진 및 육질개선에 의한 고급육형 한우 육성 체계화 하여야 한다. 이러한 요구를 충족시키는데는 기존의 유전자원과 전통적인 기술과 더불어 새로운 기술을 흡수한 분자 육종방법을 이용하여 고부가가치의 기능성 축산물의 개발이 필요하다.

동물이 성장함에 따라 체내 지방이 축적되는데 이는 각 조직내 지방전구세포(preadipocytes)가 지방세포(adipocytes)로 분화·증식 및 이들 지방세포의 축적에 의하며 이때 수많은 유전자들이 발현에 관여하고, 또한 Glucocorticoids, Insulin 및 cAMP가 지방세포 분화를 유기시키는 것으로 알려져 있다. 한편 somatostatin을 성장중인 동물에 투여했을 때 체내지방산생합성 관련 효소의 역가(Activity) 및 발현 유전자를 감소시켜, 증체량은 증가되면서 지방축적율은 감소된다고 보고되고 있다. 이러한 연구결과들은 선진 외국에서 대부분 실험동물 수준에서 이루어진 결과로써, 실험동물의 특정 시기, 생리적 조건 및 사료형태에 따른 지방산 합성에 관련된 효소의 유전자 발현양상에 대한 연구를 오래 전부터 집중적으로 수행하고 있다.

생산성과 직접적으로 관련된 성장속도는 성장호르몬에 의해서만 조절되는 것이 아니라 그 외의 여러 가지 요소들이 관련되어 있을 것으로 사료되며, 성장단계에 따라 관련 유전자들의 적절한 발현이 중요한 역할을 할 것으로 보인다. 이러한 성장단계에 따라 특이적으로 조절 발현되는 유전자에 관한 체계적인 연구가 국내외적으로 수행된 바 없으며, 근내 지방 생성에 관한 연구 기술도 아직 초보적인 단계에 있다. 따라서, 우리의 한우를 보전하고 그 장점을 더욱 더 개발하고 단점을 보완하여, 국제적 경쟁력을 갖춘 한층 더 가치있는 축종으로 개발하기 위한 기초연구가 우선적으로 수행되어야 할 것이다.

본 연구의 범위는 다음과 같으며, 한우의 성장단계별 특이 발현 유전자를 클로닝하고 한우 개량에 있어 기초자료를 확보하기 위하여 유전자 수준에서의 연구와 단백질 탐색 2부분으로 나누어 접근을 시도하였다.

유전자 수준에서의 연구는 한우의 성장단계별 특이 발현 유전자를 선별하기 위하여 0개월, 6개월, 12개월, 24개월령의 한우의 간 및 근육 조직에서 발현되는 유전자의 전사체(mRNA)의 차이를 조사하고, mRNA로부터 cDNA를 합성하여 각 월령의 간과 근육 조직 cDNA사이의 subtraction을 실시하고 subtracted cDNA library를 제조하였다. Subtractive cDNA library로부터 월령별 특이 발현 유전자를 screening 하고 그 cDNA clone의 염기배열을 조사하여 그 유전자를 동정한다. 특이 발현 유전자의 cDNA를 probe로 이용하여 genomic DNA library로부터 특이 발현 유전자를 cloning 하였다. 특이 발현 유전자의 전체 염기서열을 분석하고 다른 유전자들과 비교하였다. 또한 특이 발현 유전자의 발현 양상을 분석하였으며, 발현 기작 해명을 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

단백질에서의 접근 방법은 성장시기별로 출생 후 0, 6, 12, 24개월된 한우의 간과 근육 조직에서 성장에 따라 발현이 증감되는 단백질을 찾기 위해 많은 단백질을 동시에 고해상도로 분리할 수 있는 2-D gel electrophoresis 방법을 위한 실험 조건을 확립하고, 반복성을 높이기 위한 시료의 처리 방법을 개발하였다. 확립된 실험조건에서 한우의 간과 근육조직에서 성장단계에 따라 특이하게 발현되는 단백질들을 선별을 하였으며, 선별된 단백질들의 분자량과 pI를 기준으로 catalogue화하고 순수 분리 및 동정을 하여 아미노산의 서열을 결정하고자 하였으며, 그로부터 cDNA를 cloning하고자 하였다.

본 연구를 수행함으로써 전통적 가축개량 및 축산물 이용체계와 병행하여 분자생물학적 인력확보 및 기술축적으로 2000년대 축산관련 생물공학 산업에 보다 능동적인 과학자의 선택의 폭 및 역량을 넓혀 경쟁력 있는 축산기술의 확립과 한우를 고급육형으로 개량하기 위해서는 이들 최신 연구정보를 수집·이용하여 한우의 성장단계별 각 조직시료로부터 지방산생합성 관련 효소 및 그들의 유전자를 분리 확보하여 구조 및 기능상의 특성을 구명함으로써 한우의 육질개선을 위한 생리적·생화학적 기초 자료를 확보하고, 외국 육우에 비해 불포화지방산의 함량이 높은 정도를 분자생물학적 기법에 의한 접근으로 구명함과 성장단계별·조직별 특이적으로 발현되는 유전자와 단백질을 탐색하여 재래가축인 한우의 능력개량과 사육방법의 개선으로 차별성 및 우수성을 부각시켜 고급육 생산이 가능할 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

선진 외국의 경우 소 유전자 지도작성 연구를 1991년부터 미국 USDA주관으로 수행하고 있으며, 또한 EC 와 미국을 포함한 여러 나라에서 공동으로 돼지 유전자 지도작성연구도 1991년부터 수행하고 있다. 국제적인 공동연구의 결과로 1998년 까질 확인된 가축의 경제형질관련 유전자 및 microsatellites의 수는 소 1,800개, 돼지 1,900개, 닭 701개, 그리고 양 550개 정도로 알려져 있다. 한편 일본 농림수산성과 가축개량센타가 주관으로 10년간 연구사업으로 일본 화우에 대한 경제형질관련 특이 표지인자를 발굴하기 위하여 1995년에 착수하는 등 축산 선진국에서는 가축의 유전체 연구에 총력을 기울이고 있다.

또한 기능유전체학의 범위에서 약 5-10만개로 추정되는 유전자에 대한 기능 확인 작업은 유전체 연구의 핵심분야로 전세계적으로 지속적으로 이루어 이루어지고 있다. 이중 일부 유전자의 기능은 가축의 성장 및 육질에 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 산업적으로 이용되고 있다. 대표적으로 돼지 스트레스증후군(porcine stress syndrome; PSS) 유전자인 HAL gene는 유전자형에 따라 돼지고기의 육질과 밀접한 관계가 있음이 밝혀짐으로써 종돈의 선발에 이용되고 있다. 또한 Estrogene receptor gene(ESR gene)은 돼지의 다산성과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 산업적으로 이용성이 높은 것으로 생각되어지고 있다. 그 외에 RN gene은 돼지고기의 산성화를 촉진과 관련있는 것으로 추정되고 있다. Glycolysis와 lipogenesis에 관여하는 효소로 glucokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase 그리고 malic enzyme 등이 있으며, ACC (acetyl-CoA carboxylase), FAS (fatty acid synthase) 그리고 LPL (lipoprotein lipase), 유전자들은 지방산 생합성과 관련되어 있다.

국내의 경우는 선진 외국에 비하여 가축의 분자유전기술 도입이 늦어 기술 수준이 낮으며, 따라서 효율적 한우개량을 위한 분자유전학적인 연구업적이 미진하여 가축의 유전자 조절기술개발에 대한 기초자료 부족한 상황이다.

농촌진흥청 축산기술연구소에서는 한우의 고급육 생산을 위한 분자 유전적 접근으로 obese 유전자의 point mutation이 한우의 근내지방 축적과 유의적으로 관련됨을 보고하였고, 또한 지방산 생합성과 관련된 유전자를 중심으로 산업적으로 이용성을 조사하기 위하여 ACC, FAS, LPL 유전자를 클로닝하여 다형성을 검출하였고 경제 형질과의 관련성을 조사하고 있다.

본 연구는 이러한 한우의 고급육 생산을 위하여 각 성장 단계에서 특이하게 발현되는 유전자를 클로닝하여 그 유전자의 특성을 구명하고 산업적 이용성을 검토하고자 하였다.

따라서 이 연구는 가축의 유전자 조절기술을 위한 기초자료를 제공함으로써 관련분야에서 광범위한 활용이 기대되고 이로 인한 축산기술 선진화하는데 중요한 기초가 될 것이며, 특이유전자 분리의 다형성분석을 통한 분자유종기술개발로 우수종축생산을 위한 체계구축 및 한우고기의 품질고급화 및 차별화를 통한 품질 경쟁력 확보로 안정적 한우사육반 구축할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 세부과제

#### 근육조직 유용유전자의 구조 및 발현양상 분석

##### 1. 재료 및 방법

###### 가. 한우의 월령별 근육조직의 채취

한우의 성장단계별 근육조직은 축산기술연구소에서 생시부터 24개월령까지 2개월령 간격으로 도축한 한우 송아지로부터 채취하였으며, 채취된 조직은 바로 1 cm 이하의 절편을 만들어 액체 질소에 냉동하여 -70℃에 보관하여 사용하였다.

근육내 지방의 침착은 생후 12개월령에 개시되며 지방침착이 왕성하게 일어나는 시기는 24개월이라는 것이 축산기술연구소의 연구결과로 보고되어졌다. 지방의 침착은 지방생합성을 통하여 이루어지며 이에 반드시 어떤 유전자가 관여할 것으로 판단되어지므로 본 연구에서는 지방침착이 개시하는 12개월령 또는 지방침착이 되지 않는 12개월령 이하의 성장단계와 지방침착이 왕성하게 일어나는 시기인 24개월령의 근육조직을 공시재료로 하였다. 또한 개체간의 변이를 줄이기 위하여 동일한 월령의 한우 6두 이상으로부터 등심조직을 채취하여 사용하였다.

###### 나. 한우의 근육조직으로부터 mRNA의 분리

###### 1) Total mRNA의 분리

Total RNA의 순수분리는 FastTrack kit(Invitrogen)을 이용하여 순수분리하였다. -70℃에 보관된 간 조직 절편 1g을 이용하여 total RNA를 다음과 같은 방법으로 분리하였다.

- (1) 50ml centrifuge tube에 12ml의 denaturation solution (26 mM sodium citrate, 0.5 % N-lauryl sarcosine, 125 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 4 M guanidine thiocyanate) 을 넣고, 얼음에 5분간 둔다.
- (2) 근육 조직 1 g 을 denaturation solution에 넣고, 30초 ~ 1분 가량 high speed homogenizer로 파쇄한다.
- (3) 2M sodium acetate(pH 4.0) 1.2 ml을 넣고 서서히 완전히 섞은 다음

Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol mixture 12 ml을 넣고 서서히 섞은 후 10 초 동안 격렬하게 섞은 후 얼음에 15분간 배양한다.

- (4) 4 °C에서 20분간 10,000 x g 로 원심분리한 후 상층액을 회수하여 새로운 tube로 옮긴다.
- (5) 동량의 isopropanol을 넣고 -20 °C에서 30분간 둔다.
- (6) 4 °C에서 15분간 10,000 x g로 원심분리한 후 상층액을 제거한다.
- (7) 5 ml denaturation solution으로 RNA 침전물을 현탁하고 완전히 녹인 후 동량의 isopropanol을 넣고 -20 °C에서 30분 이상 배양한다.
- (8) 4 °C에서 15분간 10,000 x g로 원심분리하고 상층액을 제거한 후 10 ml의 75 % ethanol로 세척한 후 4 °C에서 15 분간 10,000 x g로 원심분리한다.
- (9) 상층액을 제거하고 침전물을 건조시킨다.
- (10) RNase-Free DW 1 ~ 3 ml에 RNA를 녹인 후, 사용 전까지 -20°C에 보관한다.

## 2) mRNA 순수분리

Total RNA로부터 PolyAtract system III, IV( promega, USA )를 이용하여 다음과 같은 방법으로 mRNA를 순수분리하였다.

- (1) Total RNA 1 mg을 RNase-free DW 500  $\mu$ l에 녹인 후, 65 °C에서 10분간 배양한다.
- (2) 3  $\mu$ l의 Biotinylated-Oligo(dT) probe와 10  $\mu$ l의 20 x SSC를 첨가한다.
- (3) 부드럽게 잘 섞은 후 상온에서 10분간 반응시킨다.
- (4) SA-PMP가 들어있는 tube에 반응액을 넣고 잘 섞은 후 상온에서 10분간 반응시킨다.
- (5) Magnetic stand를 이용하여 SA-PMP를 모은 후 상층액을 조심스럽게 제거한다.
- (6) SA-PMP를 300  $\mu$ l의 0.1 x SSC로 4회에 세정한다.
- (7) 세정이 끝난 후 1차로 100  $\mu$ l의 RNase-free DW로 mRNA를 추출한 후 2차로 150  $\mu$ l의 RNase-free DW로 추출한다.
- (8) 4 °C에서 10분간 10,000 x g로 원심분리하여 mRNA가 포함되어있는 상층액만을 회수한다.
- (9) 0.1 부피의 3 M sodium acetate 와 동량의 isopropanol을 넣고 -20 °C에서 배양한다.



- (10) 12,000 x g에서 10분간 원심분리한다.
- (11) 1 ml의 75 % ethanol로 pellet을 세척한다.
- (12) 건조된 pellet을 RNase-free DW에 녹인다.
- (13) 농도 측정 후 즉시 -70 °C에 보관한다.

#### 다. Subtractive cDNA library 제조

cDNA library는 PCR-select cDNA subtraction kit( ClonTech )을 이용하여 제작하였다. 24 개월령 특이 발현 subtracted cDNA library를 제조하기 위해 6 개월령 및 12 개월령 cDNA를 Driver로 이용하였고, 12개월령 특이발현 subtracted cDNA library를 제조하기 위하여 24 개월령 cDNA를 Driver로 이용하였다.

Subtracted cDNA library 제작은 kit의 사용설명서에 준하여 다음과 같은 과정을 수행하여 제작하였다.

- (1) mRNA로부터 kitso의 cDNA 합성 primer를 이용하여 한 가닥 및 두 가닥의 cDNA를 합성한다.
- (2) 합성된 cDNA를 제한효소 *Rsa* I 으로 절단하여 blunt end를 만든다.
- (3) Tester cDNA의 양쪽 끝에 각각 다른 두 개의 adaptor를 붙인다. 이때 Driver cDNA에는 adaptor를 붙이지 않는다.
- (4) 2 차례의 hybridization을 실시하여 Tester cDNA 와 Driver cDNA에 있는 동일 cDNA를 제거한다.
- (5) Hybridization이 끝난 cDNA를 PCR에 의해 증폭시킨다.
- (6) T-vector인 pCR2.1 vector와 ligation 시킨다.
- (7) Ligation mixture로 *E. coli* TOP 10F'를 형질전환시켜 subtracted cDNA library를 구축한다.

#### 라. Southern blot hybridization에 의한 특이 발현 유전자의 선별

제작한 subtractive cDNA library로부터 성장 단계별 특이발현 유전자를 확보하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 먼저 24 개월령 특이 발현 유전자를 탐색하기 위하여 24 개월령과 12 개월령 사이 및 24 개월령과 6개월령 사이의 subtractive cDNA library에서 890개의 clone으로부터 plasmid DNA를 추출한다. 제한효소 *Eco*RI 으로 절단한 후 1 % agarose gel에 전기영동한 다음 nylon membrane 에 옮기고 12개월령 또는 6개월령의 cDNA를 DIG(BM)으로 labeling한 probe를 사용하여 Southern blot hybridization을 실시하였다. 서로

다른 월령의 cDNA probe로 hybridization하여 서로 비교하고 월령별 유전자의 발현 정도를 분석하여 차이가 나는 cDNA clone을 선별하였으며, 선별된 clone의 염기배열을 조사하고 GenBank Data를 검색하여 유전자의 상동성을 조사하였다.

#### 마. cDNA library의 제조

6개월령, 12개월령, 24개월령 근육조직으로부터 mRNA를 추출한 후 각각은 ZAP express cDNA vector kit를 이용하여 cDNA library를 제작하였다.

제작 과정은

- (1) 추출한 mRNA를 근거로 First 와 Second strand cDNA를 제작한다.
- (2) 제작한 ds cDNA를 Pfu DNA polymerase를 이용하여 Blunt end로 만든다.
- (3) *EcoRI* adaptor를 연결한다.
- (4) *XhoI* 으로 절단한 후 size fraction을 수행한다.
- (5) ZAP express vector에 삽입한다.
- (6) Gigapack gold II package kit를 이용 packaging 한다.
- (7) Host cell인 XL-1Blue MRF'을 이용하여 cDNA library를 제작한다.
- (8) Titration 후 증폭하여 -70℃에 보관한다.

#### 바. 특이발현 유전자의 genomic library screening 및 subcloning

Subtracted cDNA library로부터 선별된 성장단계별 특이발현 clone의 cDNA를 probe로 하여 한우 genomic library를 screening하였다. Promoter 지역을 포함하는 genomic clone을 얻기 위해, 특이발현 cDNA clone 중에서 5'-untranslating region을 포함하거나, 개시코돈에 가까운 부위를 갖는 cDNA clone을 선별하여 probe 제조에 사용하였다. 분리된 phage clone으로부터 genomic DNA를 순수분리하였고, 제한효소로 절단하여, Southern blot hybridization에 의해 promoter 부위를 포함하는 절편을 확인하고, pBluescript II SK(+) vector를 이용하여 subcloning 하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 한우 subtracted cDNA library의 제작 및 후보 유전자 선정

#### 1) Subtracted cDNA library 제작

한우 근육조직에서 성장단계에 따른 특이 발현 유전자를 cloning하기 위하여, 6개월령, 12개월령, 그리고 24개월령 근육조직으로부터 total RNA를 분리하였다. 이렇게 추출한 total RNA로부터 mRNA 만을 정제하여 ds cDNA를 만들었다. Fig. 1은 12개월령과 24개월령 서로간의 subtraction을 실시한 후 전기영동한 결과로서 subtraction 하지 않은 것과 subtraction을 실시한 것 사이의 band의 양상은 확연한 차이를 보여주고 있으며, 또한 서로간의 subtraction한 band의 양상도 차이가 있음을 보여 주고 있다. 즉 subtraction이 정상적으로 이루어진 것으로 판단되어졌다.

이와 같이 나타난 subtraction 산물을 plasmid vector에 cloning 하여 대장균에 형질전환 시켜 특이 발현 유전자를 발굴하기 위한 subtracted cDNA library를 제작하였으며, 성장단계에 따른 각 개월령 특이 발현 유전자 탐색연구에 이용하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 24개월령의 cDNA에서 12개월령과 6개월령의 cDNA를 제거한 것과 12개월령에서 24개월령을 제거한 3개의 subtraction library를 제작하였다.

고급육으로 판정되는 쇠고기는 대부분 높은 상강도를 보인다. 즉 근육내 침착되어 있는 지방이 높아야 한다. 동물의 성장은 가장 먼저 골격이 먼저 성장을 하고 다음으로 근육이 발달하게 된다. 이후 지방이 침착을 하게되는데 육안적으로 확인 가능한 시기는 소의 경우 12개월령 이후이며, 왕성하게 일어나는 시기는 24개월이라는 축산기술연구소의 연구 결과로 밝혀졌다. 근육내 지방의 침착은 지방생합성을 통하여 이루어지며 이에 반드시 어떤 유전자가 관여할 것으로 판단되어진다. 이에 따라 본 연구에서는 한우 성장단계 중 지방침착이 시작되는 12개월령과 거의 지방이 침착되지 않을 것으로 판단되는 6개월령, 그리고 지방침착이 왕성하게 일어나는 24개월령의 근육조직에서 RNA를 추출하여 subtractive cDNA library를 제작하였다. 따라서 이 library로부터 탐색되는 유전자들에는 지방의 생합성과 관련된 유전자가 특이하게 많을 것으로 추정하였다.

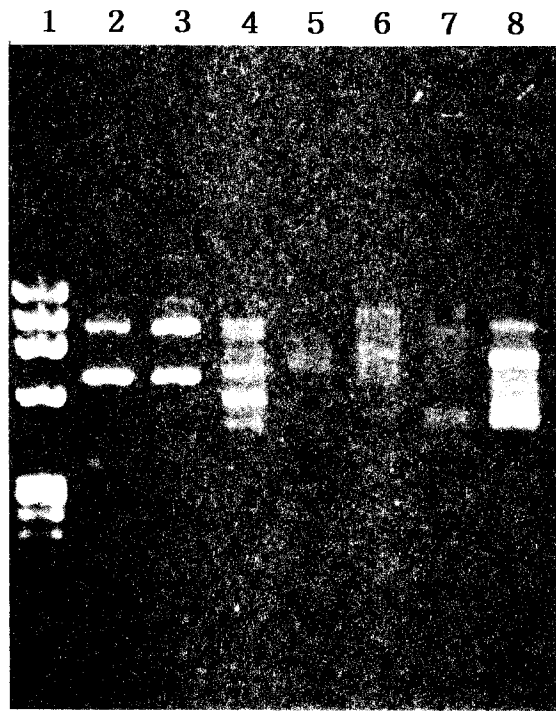


Figure 1. Electrophoretic pattern after subtracted with 12 and 24 months each other. Lane 1 : size marker,  $\phi$ X174 DNA/*Hae*III; 2 : Subtracted control DNA in kit; 3 : Subtracted human skeletal cDNA; 4 : Unsubtracted human skeletal cDNA; 5 : 24 mon. bovine skeletal cDNA subtracted with 12 mon. cDNA; 6 : Unsubtracted 24 months bovine skeletal cDNA; 7 : 12 mon. bovine skeletal cDNA subtracted with 24 month cDNA; 8 : Unsubtracted 24 months bovine skeletal cDNA.

Table 1. Construction of subtractive cDNA library

	cDNA(tester)	cDNA(driver)
Subtraction #1	12 month	24 month
Subtraction #2	24 month	12 month
Subtraction #3	24 month	6 month

## 2) Southern blot hybridization에 의한 특이 발현 유전자의 screening

구축한 subtractive library로부터 먼저 24개월령의 특이 발현 유전자로 추정되는 clone들을 확보하기 위하여 무작위로 890개의 clones를 선정하여 plasmid DNA를 분리한 후, 1% agarose gel에 전기영동을 실시하였고 ( Fig. 2, 3, 4, 5-A ), nylon membrane에 옮긴 후 12 및 6개월령 한우 근육조직 RNA로부터 합성된 2 가닥의 cDNA를 probe로 하여 Southern blot을 수행하였다 ( Fig. 2, 3, 4, 5-B ).

전기 영동 사진인 Fig. 2, 3, 4, 5-A와 Southern blot 결과인 Fig. 2, 3, 4, 5-B를 비교하였다. A panel에서 확인된 cDNA 단편들을 Southern blot 분석결과인 B panel에서 positive signal이 나타나지 않은 clone을 1차적으로 선정하였고, Northern blot을 통한 발현양상을 확인하고자 하였다.

이와 같이 Southern blot 분석을 실시하여 24개월령에서 특이 발현될 것으로 추정되는 436개의 clone을 확보하였다. 이 clone들 중 225개는 24개월령에서 12개월령을 subtraction 한 library로부터 유래한 것이고, 나머지 211개는 24개월령에서 6개월령을 subtraction 한 library에서 얻은 것이었다. 이들 436개의 clone들 중 132개의 clone들을 24개월 특이 발현 가능 유전자로 선정하였다.

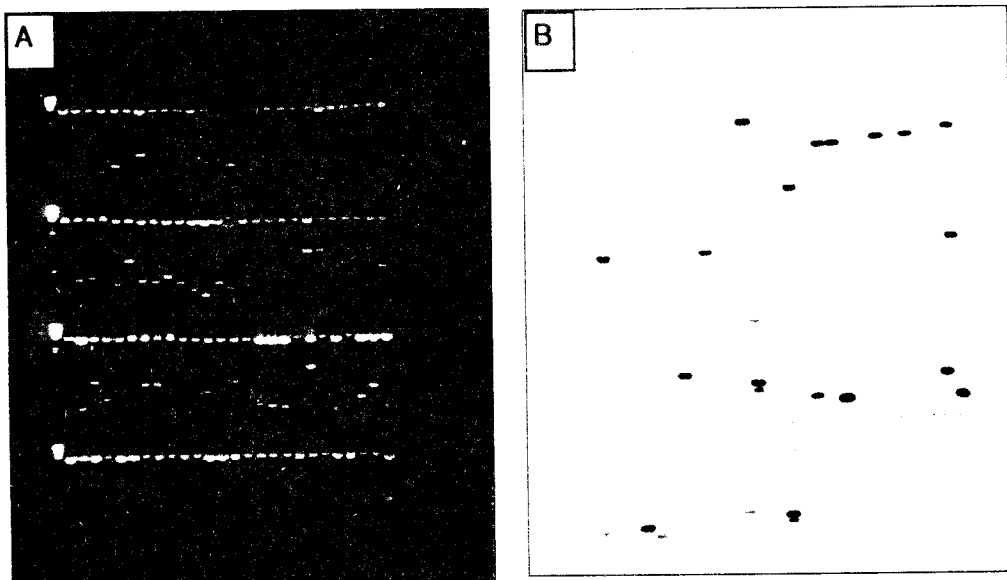


Figure 2. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis.

A : Agarose gel electrophoresis after *EcoR* I digestion

B : Southern blot analysis

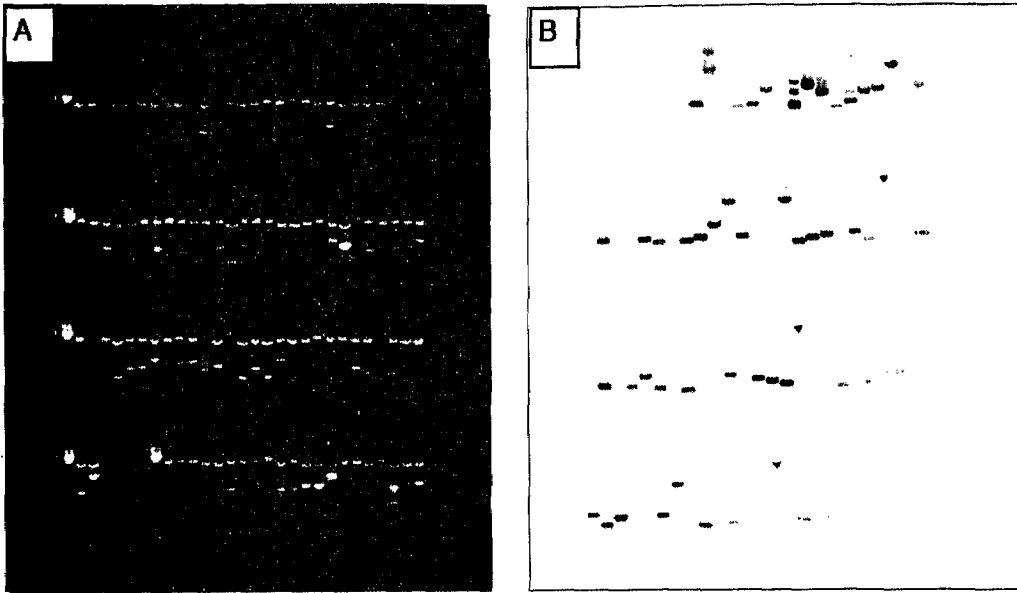


Figure 3. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis.  
 A : Agarose gel electrophoresis after *EcoR* I digestion  
 B : Southern blot analysis

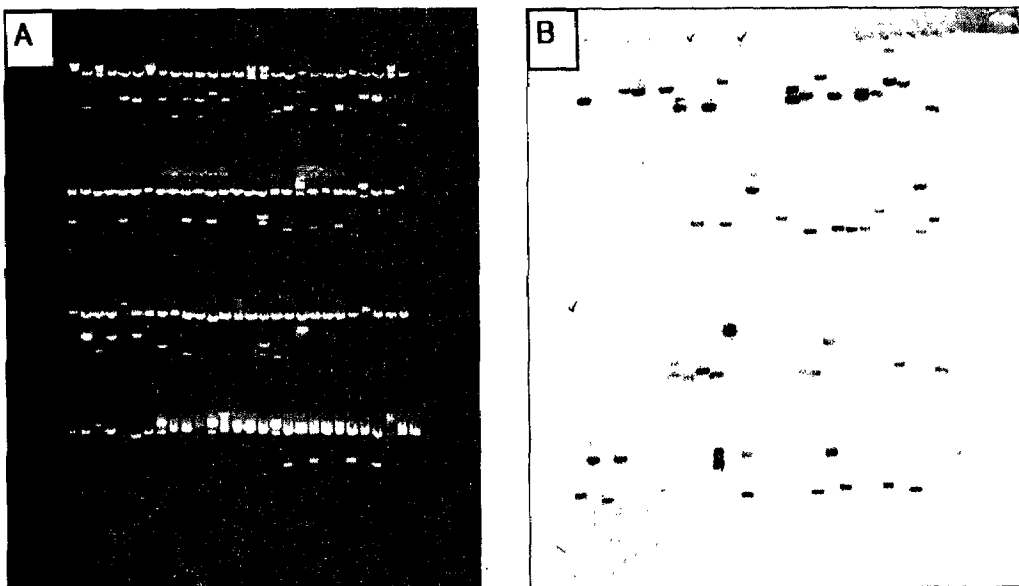


Figure 4. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis.  
 A : Agarose gel electrophoresis after *EcoR* I digestion  
 B : Southern blot analysis

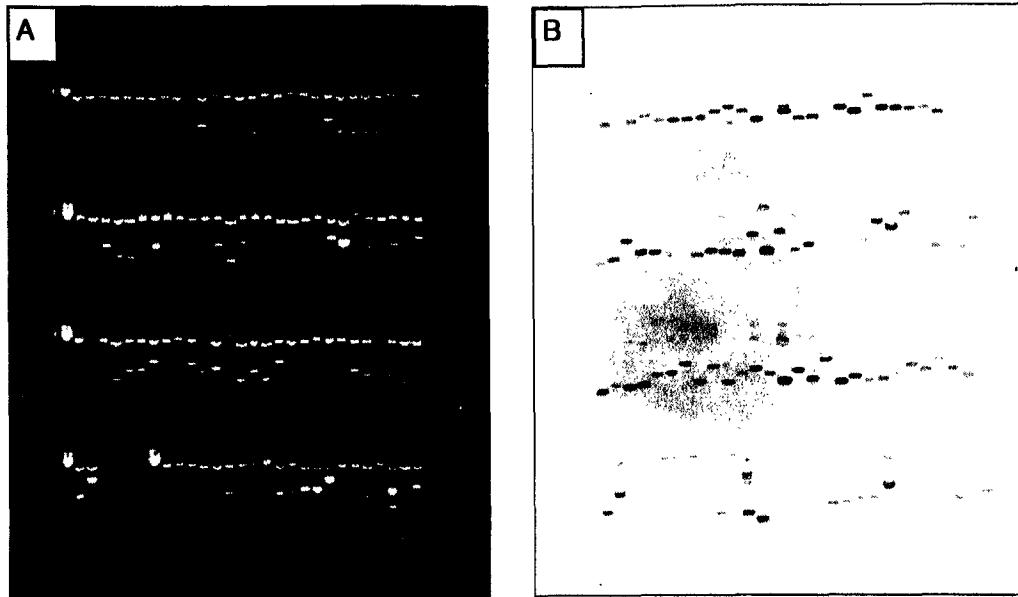


Figure 5. Agarose gel electrophoresis and Southern blot analysis.  
 A : Agarose gel electrophoresis after *EcoR* I digestion  
 B : Southern blot analysis

### 3) 24개월령 특이발현 후보 유전자의 선정

24개월령 한우 근육조직에서 특이 발현되는 것으로 추정된 132개의 cDNA clone들을 동정하기 위하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 database BLAST를 이용하여 상동성을 조사하였고, Table 2와 같이 나타났다. 염기서열이 결정된 132개의 clone들에는 cytoskeleton의 구성성분인 microfilament를 만드는 actin 유전자와 95% 이상의 homology를 나타내는 clone 이 15개, actin filaments와 interaction 하여 force와 movement가 생기도록 하는 molecular motors인 myosin 유전자와 95% 이상의 homology를 나타내는 clone들이 9 개를 포함하여 많은 수의 clone 들이 ( 8종 ) 근육 발달과 관련된 유전자로 확인되었다. 그리고 VCP, Ca<sup>2+</sup> ATPase, Aldolase A, UCP 2 와 같은 10종의 에너지 대사 관련 유전자에 해당하는 clone들이 검출되었으며, 또한 leptin(obese) gene, ADRP (adipose differentiation -related protein) 등과 같은 4종의 지방대사와 관련된 clone들도 검출되었다. 그밖에 상동성 검색결과 이미 알려진 유전자와는 유사성이 전혀 없는 것과 기능이 완전히 알려지지 않은 유전자를 갖고 있는 clone들이 많이 검출되었다. 이들 24 개월령 특이 발현 추정 cDNA clones중 EPV20 protein, TCTP, Aldolase A 및 bovine ADRP mRNA와 높은 유사도를 보이는 cDNA 단편을

probe로 이용하여 각각의 유전자에 관한 발현양상을 조사한 후, 성장단계 특이 발현 유전자를 cloning하기 위한 1차적인 후보 유전자로 선정하여 연구를 진행하였다. 후보 유전자로 선정되지 않은 많은 EST clone은 한우의 성장단계 특이 발현 유전자를 탐색을 위한 앞으로의 연구에 중요한 재산이 될 것으로 판단되어 진다.

Table 2. Homology list of 132 subtracted cDNAs

Gene name	Homo. (%)	No. of clones
<b>○ Muscle developmental related genes ( 8 genes )</b>		
Actin	>95	15
Myosin	>95	9
Mus musculusAmpd3 gene	>95	34
Troponin T	92	3
Muscle c-protein	90	1
Translationally controlled tumor protein	93	2
Human voltage-dependent calcium channel beta-1 subunit	90	1
Actin-binding filament cofilin	90	1
<b>○ Energy metabolism related genes ( 10 genes )</b>		
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	92	2
Pig Valosin-containing Protein (VCP)	94	2
Human aldolase A	92	3
ADP/ATP translocator	98	2
Mitochondrial cytochrome oxidase	99	1
Muscle-specific serine kinase1 (MSSK1)	93	2
Bovine 70 kDa HSP	99	1
GM2-activator protein	81	1
Human ryanodine receptor	94	1
Uncoupling protein 2 (UCP2)	99	1



Table 2. Continued

Gene name	Homo. (%)	No. of clones
○ Lipid metabolism related genes ( 4 genes )		
Acidic ribosomal phosphoprotein p1	90	1
Leptin (obese) gene	97	3
Adipose differentiation related protein (ADRP)	99	1
Galactosyltransferase	97	1
○ Others		
B.Taurus clone TUS4	99	1
Ferrochelataase	99	1
Human dynamitin	88	1
Human glycyl-tRNA synthetase mRNA	90	1
Homo sapiens calsequestrin1 (CASQ1)	91	1
Farnesyltransferase	87	1
Pyrophosphatase	93	1
Osteonectin	96	1
ERCC3 mRNA	88	1

#### 나. 후보유전자들의 발현양상 확인 및 분석

1차로 선정된 후보 유전자들은 RT-PCR 및 Northern blot 분석을 실시하여 성장 단계에 따른 발현 양상을 확인하고 분석하였다.

EPV20 protein은 그 기능이 완전히 밝혀지지 않았으며, bovine milk의 skim milk fraction에서 처음으로 분리 정제된 glycoprotein의 일종이다. Lotte(1997)의 연구에 따르면 EPV20은 사람의 epidemics에서 발현되는 HE1 유전자와 유사도가 높은 것으로 보고 되었고, 소의 신장, 비장, 간과 유선조직에서는 발현되지만 정소에서의 발현은 없었다. 반면, human의 경우에는 testis에서 가장 많이 발현되고 있음을 밝혔다. 본 연구에서는 EPV20 유전자의 발현양상을 RT-PCR 로 분석하였으며, 그 결과 한우의 근육조직에서도 발현은 되지만 성장단계에 따른 발현 양의 차이는 미미했다 (Fig. 6B).

Aldolase 는 glycolytic enzyme의 family gene 중 하나로서, skeletal muscle 에서는 type A 가 발현되며, 발달과정에 있어 발현 량의 차이가 있음이 밝혀져 있다. 본 연구에

서는 aldolase A 발현 양상은 RT-PCR로 확인한 바, 성장단계에 따른 발현 량의 차이는 없었다 (Fig. 6C).

Translationally controlled tumor protein (TCTP)는 histamin-releasing factor (HRF)로서 P23으로 알려져 있고, translation level에서 조절되는 growth-related protein으로 보고되었다. 본 연구에서는 성장단계에 따른 TCTP 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 Northern blot 분석을 실시하였으며, 분석 결과, TCTP 유전자는 한우 근육조직에서 월령이 증가함에 따라 발현 양도 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 7).

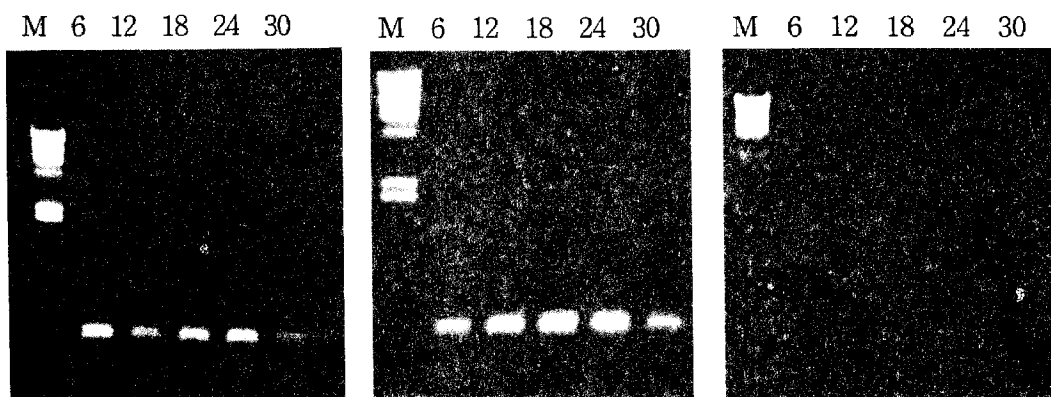


Figure 6. Semiquantitative analysis of GAPDH (A: control), EPV20 (B) and Aldolase A (C) mRNA levels in muscle loin eye of Hanwoo.

ADRP(Adipose Differentiation Related Protein)는 membrane associated protein으로 크기는 50 kDa으로 알려져 있으며 기능은 명확하지 않지만 지방세포가 분화되는 초기에 급격히 증가하는 것으로 보고되어져, adipose differentiation program의 초기단계에 이용될 수 있는 marker 중 하나로이용 가능성이 알려졌다. ADRP 유전자와 99.9%의 유사도를 나타내는 cDNA 단편을 probe로 하여 Northern 분석을 실시한 결과, 24개월령 이전에는 발현양 차이가 미미했지만 24개월령 등심조직에서는 발현양이 급격히 증가되었으며, 30개월령 조직에서는 발현양이 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과는 ADRP 유전자가 지방세포의 분화 초기에 발현이 급격히 일어난다는 결과로 볼 때 지방의 침착이 12개월령에 시작한 하지만 24개월령에 지방세포의 분화가 급격히 증가하여 본격적인 지방의 축적이 일어난다는 이전의 연구결과를 뒷받침하는 것이다.

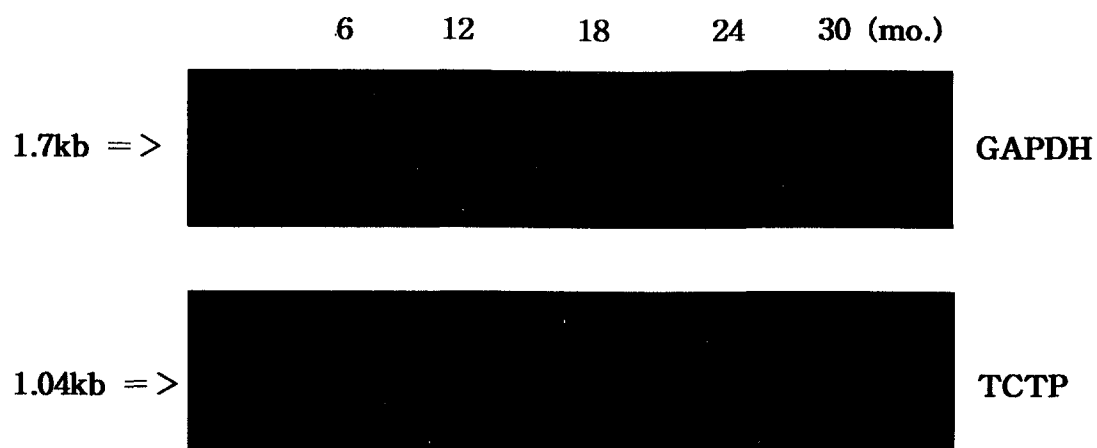


Figure 7. Northern blot analysis of TCTP gene expression level in the muscle loin eye of Hanwoo.

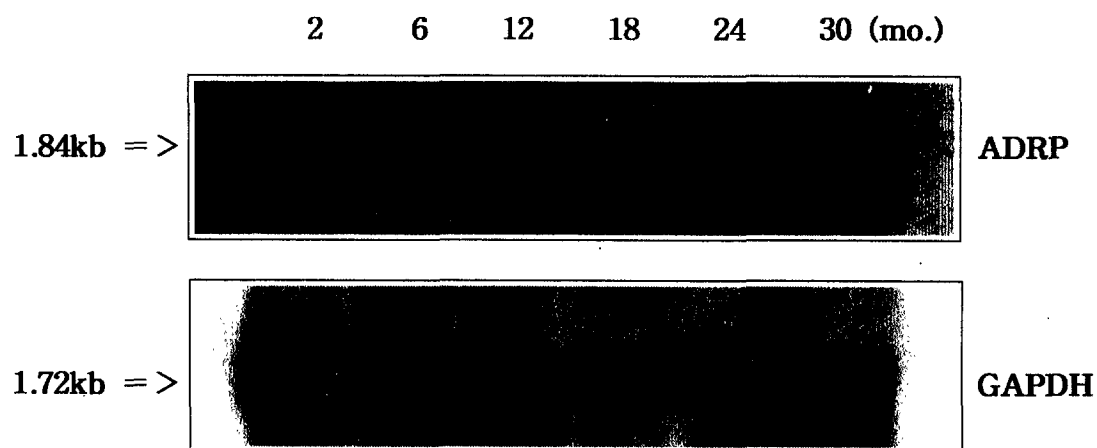


Figure 8. Age-specific gene expression of the bovine ADRP in the muscle loin eye.

## 다. ADRP 유전자의 genomic DNA 염기서열 분석

선정된 후보 유전자들의 발현양상 확인 및 분석 후 24 개월령에서만 발현량이 급격히 증가하는 ADRP 유전자 cloning을 본 연구의 목표로 하였다. ADRP 유전자는 mouse에서 처음으로 분리되었고, mRNA는 크기가 1680bp이며 425개의 아미노산으로 이루어져 있다. 50 kDa membrane protein으로 adipose tissue에서 가장 많이 발현되는 것으로 보고되어졌으며 (Jiang 과 Serrero, 1992). 지방세포의 분화 초기에 발현되는 FAB (fatty acid binding protein) 과 LPL (lipoprotein lipase)보다도 먼저 발현하는 것으로 밝혀졌으며, Mouse ADRP 유전자 전체 크기가 약 15kb이며, 8개의 exon과 7개의 intron으로 구성되어있고, Mouse 4번 염색체상에 위치하는 것으로 보고되었다 (Eisinger 와 Serrero, 1993). Human에 있어서도 ADRP mRNA의 일부가 밝혀졌으며, 크기는 1314 bp이고, 9번 염색체에 위치하는 것으로 보고되었다(Heid 등, 1996). 이 ADRP 유전자는 지방구 세포에 지방을 저장하는 기능을 하며 주로 긴 사슬 지방산을 지방세포로 transport 하는 것으로 추정하였다 (Gao 와 Serrero, 1999). 최근에 bovine에서도 cDNA 염기서열이 보고되어 GenBank 등록이 되었다(Nielsen 등, 1999). 이러한 연구들을 기초로 bovine ADRP genomic DNA 구조는 분석하고자 하였다. Genomic DNA 구조분석은 한우 genomic library를 screen 하여 분석하는 방법과 기존의 알려진 cDNA 염기서열을 근거로 하여 PCR 방법에 의한 cloning을 병행하여 분석하였다.

Fig. 9는 한우 ADRP 유전자의 genomic DNA의 exon 2번부터 exon 8번까지의 염기서열을 나타낸 것이다. 분석된 염기서열은 Table 3 에서 보는바와 같이 exon의 크기는 24 bp부터 688bp의 크기로 밝혀졌으며, intron은 1번을 제외한 2~7번의 크기는 92 ~ 1677bp의 크기를 갖는 것으로 확인되었다. Promoter 영역과 intron 1번 영역의 염기서열은 완전한 분석은 이루어지지 않았다. Genomic library screening 결과로 추정되는 intron 1번의 크기는 약 7kbp 정도로 한우 ADRP 유전자의 전체 크기는 15kb로 추정되어진다. 이후 한우 ADRP 전체 유전자의 염기서열을 결정하고 분석 할 것이다.

1 TTGGCTGATT TCTTCTTTT CACCAAGAA AG**ATG**GCATC TTTTCAGTT GAACTAAG TGGTATGATT exon2  
71 TATAAATAGA CGGATGATTC TTGATTCCCTT TCCCACCAG CCCTGTTTTG TAGACATTAA CTCCTCCCTC  
141 CCTCTGGTT GCAGAGCTGTG GTGACCAGGG TGGCCAACT CCCTTTGGTG AGCTCCAGT ATGATCTGTT exon3  
211 CTCTCCGCT TACATCAGTA GAAAGATCA GTATCCTTAC TTGAATCTC TTTTGGATG GTTGAAGAA  
281 GATGAAGA CATTCACTTC TGTGGCTGTG ACCAGCCGCC TGCCAATCAT CCAAAATTA TACCTACAAA  
351 GTGAGTTTC ATTTTGGCCT CAAAATTAC TCCCATATAG TCATTGAGAG TGATCCCAA GCTGGTTGA  
421 ATAAGAAGC TAGCCTTAGC CCTGAGCTT TCATCAGTCA GGAATCCTC AGCCTTCCCT GAGACACATA  
491 ACTGCCTTT CTGAGAAGT CCAGGTGATG CTCATTGTTA TAGAAGGCCT GCTTCAGAGC AATGGCAAAT  
561 ATGATATTAA AAGAAATTC CCAGAGATGT TTCTCTGTTG GCAAGTGAGA TCAAACGGGG AATCAGTGAG  
631 TAAACTGAAA TAACTGACTT CCTTGGGACT ACGCAGTATA CATGAACTGC TTTAAAAAGA AATCACTGTA  
701 CAAATGCCC ACTTAAAGT TACCATTAG TGGCTTTTAG TATATTCACC GTGTGTTCA GGCATCACC  
771 TGATCAATCT TAGAACACTG TCATCTCTCC AGAAAGAAAC TTCATACCAC TTTCTGTTG GATGAGGAA  
841 GAAGTCCCTG AATGAGAGC GGTAAATGGT GCACAATATT ATGAATGAAC AATATTGTGA GTCCCAGTGA  
911 ATTGTACACC TAAAAATAGT TAAAATGGT AAGTTTGCTT TGTATATTTT ACCATATTTT TAAAAAAAAG  
981 AAACCTTATA CTCATTCTCA ATCACGCCAC CACCCACC CCCTTCCCA ACCTTAGGCA ACTACTAATC  
1151 TATTTTCTCT ATAGATTTGC ATATCCTGGA CATGTAATAT AAATGGAATC ATAAAAACG TGGTCTTTG  
1221 TGACTGGCTA GTTTTCACTT AGCATAATGT TTCCAAATTT CATTCAAAT GTAGCATCAT CTCAGTATTT  
1191 CATTCTTTT TAATATGGAA TAATTAATA TTCTGTTGTG TGGATATATC ATTTTCATGT ACAGTTGATG  
1261 TTCGGGTGAC TCTTACTTTT TGCCTATCAT GAGCAATGAA TGCTAATGCG AACACTGTA CACAGTTTT  
1331 TGTGTGGACA TAGTCTTTT CATATATATA CTTAGGAGTG GAATTTTCAG TTTCTCAACA TTTATTATCT  
1401 GCTTTGGAAT AAGGGATTA ATCATCTGT CAAATTTTA CATCATGGAC TTTTAGGATT ATGGGGAGCC  
1471 TTTTAGTAGC TTTCCAACT TGCTACTCCC CAAATGTTGG GAGTTGGTGG GGGAGCTTG ACTAAAATCT  
1541 GGGTCTTGT AGGGAGATCC AGGGTCTGT TAGCACAGTT TCCTGGTGAT AACCCCAAAT ATACTGCCAC  
1611 TTAAGTGAAT AAGTGTAGGT AGAGATTAGA CTAGCATGGA AATGCTAATT TTGAGGTTT TTAGATACCT  
1681 CATTCCCTGA ATGAGGATC GGGCGAAGC TGGCTTCTCT TAACCTTAGG GGACAAGTGA TGAGGAAGAG  
1741 GCTTCCCTGC CACCTACCTT CTTGGCTTGC CATTGCCTCA GCTTGTGCT CCCCCACCC CACCACACAC  
1801 ACACATCCTT ATTTCCCTGT CAGTAGAAGG AAGTGTCTGG AAACCTGGCA AGGATCTCTT TTCTGAACT  
1861 GAGAAACCAG ACAAGCATT GTGTGGTAAA CTAATAATAA TATTTTTCG TGTTTTCCA CAGTAAAAAT  
1921 AAAGGTTCAA GTTATGTGT CACTCTTACC AGACTGTAA CATTTCACC ACTTGTGATT CTCTAGTT exon4  
1981 TTTTCCAA TACTTATGTT TTTAAGGCT TAGCACAGT TTAGCAAGT TTTTATTT TAAATAAA  
2101 TACAAATG GTGAGCTTG GACAAGAGT CTGAGGCTG CCACCTACA TTTTTAAGT TTTATCTGTT  
2171 TAATACAGT TGTTCAGGC CACAAACAGG CAGTACTTAT TTGTTCAAAC CTTGAATATA TTTTGAAG  
2241 AGTAATGACC ACTCTCTTAC TTCTGAACT GTTGTAGTT GTCTTAAGAA GCAGAGATGA GCTATCCACC  
2311 TTTGGGCCAG ACTATATCTG ATCTCTGTTA AATTTGTGGC TTCATCTCTG CAGGTGAAAT TGCTTCTTA  
2381 AATCACTGAG TCCTGTGTGG TATTGGATAA ATGCAGAGGT GGTGAATAGA ACCTTTTCTT ACTTGGTATC  
2451 TGAGAGCACA GCCAGTAGAA TGGAGAAGT GTACTTCTGC CTGTGTGTG GCCTGGGGTA GTGTGCCTGG  
2521 TACCCTGTC TCTGCTTACA GGCATGTATG AGGGGCCAG TAGAAGCATC TCAGTGGACA ATGCCATTTT  
2591 CTCTAGAGTT CCACTGTGTC CTCACTACAG GTTCATCTAG TTTAAAACAA AGAAAAACC TCGACAAGTT  
2661 TTTTATCCAG TTCCACTTTT TGGTCTCCCG ACAACCTTG AGTGGTGGCA GGTAGGSCAT TTATACCTGT  
2731 TAAGGGAAT GAGGCTCATC CACTCTCAGT TACTTGTCCA AGACCCACAA CTAGAAAGTA AAAGGGCCAG  
2801 ATTCATCCTT TAACTCTTCA GCTGTGCTGC CTTAGTGAAG ACCTTCTAT AGGTATCTGT GCCCGTGT  
2871 CTCACCAGCC AGATGGCCTG CTTTTTTTCC CCATAGTTT TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG  
2941 TAAAGATG TTTGAACT ATCTTCTG GGTAAAGT TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG  
3011 TAAAGATG TTTGAACT ATCTTCTG GGTAAAGT TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG  
3081 TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG  
3151 TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG TTTTATCTG  
3221 GTTTCTTTCC TTTTGGCCA CGCCATGCTG CTTATGGGAT TTCAGTCCC TGACCAAGAA TTGAACCCGG  
3291 GCCATGGCAG TGTAAAGTCCA GAACCTGAC TACTAGGCCA CCAAGGAACT TCTTCCAGT TTTTATCT  
3361 TAAAGCAAT TTTCTAAATA GCTTCATTGA GATATACTTT ATATACCAA AAAATTCAAC CTGTTTCCCT  
3431 CCTACATGTT TGGTTGCATG AGCCTCACCA CAATCCAGTT GTAGAATATT TTTATCACC CCAAGGTAA  
3501 AAGTTCTGTC ACCCCAAAG AGTAAAGCTC ATGATCTTTC ATGCCCTGTG ACAGTCAGTC TCCATTCCCC  
3571 CATCCACAC CGCTGTCCG CATGTGTGGG TTCTCAGTTA CTCAGTTGTG TCCAATGCTT TGTGACCCCA  
3641 TGGGCTGTAG CCCATTAGGC TCCTTTGTG ATGGGATTCT CCAGGCAAGA ATACTGGAGT GGGTTGCCCT

Figure 9. Nucleotide sequence of the ADRP genomic clone from Hanwoo. Black boxes are exon2 ~ exon 8. Bold and italic letters are start and stop codon. The putative polyadenylation signal is under lined.

3711 TCCCTTCTCC AGGGGATCTT CCCAACCCAG GGATCAAACC CGGGTCTCTT GCATTGCAGG CGGATTCTTT  
3781 TGTACATAGT AACTTTTGAA ACTTCCAGAG AAATTAACCT AAGGAAATAC TTTCTACAAA TGAATTGCCC  
3851 TTTGTGGGCT ACTATATGGG ATTATTAAT ATTCAGTGCT TACTGTGTGC CAGGGAAGAC ACTCTGGTGG  
3921 GAAGAGACCT GTGTCAATGA CGTGTACAG TGATGTGTTC TGGGTGCTA AGCCCAATAG CAGATAGGAG  
3991 CCATCTTGGG CAAAGGGGTG CATAATTACC AGATGGGTGG GTGGAATCAA CAAAGACAAG ATCCAAGTTA  
4061 AGAGTTAAG CCTTGTACT TAGAGCACTT AGAGCTGTGA TCCCTAAGGC TTCCTTTTTT TCCCCCCTT  
4131 TTTTATAACT TCAGAAAAAG AAGCCAAAAA ACTGGGAAGGA TTTCATATGG TTGAGAAGGT GAGTTACTAT **exon6**  
4201 **ATTAGACTTT** **TAATCTGTTC** **AACCAAGCTG** **GGTCAAGGG** **CTTACCAATA** **GCCCTTTTGT** **AGGGTTGAAG**  
4271 **AAGCTTAATCG** **AAAAGGCCAG** **GAGAGCACTT** **CTCAGTCCA** **TTCGCCCTTC** **AACCTGCTGA** **GTACAACCTC**  
4341 ATTCAAAGGT AGCGGAAGTG AGTTCAATTA TCTCCAGGGT TAGGATAAAC GTAATCATAA AATCCAAGAA  
4411 TTTAATCTT ACATTATGAA CAATCCAGTA GAAAAATGGG CCAAGAGCAC ATAGAAAAT CACAGAAAAG  
4481 GAAGTATATA ATTAGCTGAA TACATGAAGC GGTGTTAATC TTACGCTGAG TGGTCAGATT ACTGATTCC  
4551 TTTCTGTCT GGTGGCGTTC GCAAAGCTAG ATTCGGTGGG CGATGGTGTG GAGGAGAGGT ATACTTGTGT  
4621 TTTTTTACTT CTGGAGGATT TAAGGGAAAG AGGAAAGTTA GAGACACACC TGTGCCCGGA GCAGCTTTTC  
4691 TCCTAGCAAT GTATATTCAT TCAGAGTTGC AAAAGAGTAT AAACAATGCA CATTAACTAA TAGACTGATT  
4761 ACATTGACAC ATCCACAAAA GACTACTGAG TTCCCCTTGA AGGATTGCCA AGTTACAGAC AGTATGCATT  
4831 GTTCACCATT AAAAACCCAGT TTACTCTTGG AAGGGGAAGT AGGTGGTTGG CAACAGGGAA GAGGAAGTTT  
4901 AAGTTCCTTT CTCTTTCATA ATTGTATATT ACACACATGT TAAATTCAG TTGCCGTACC TGTGTTAAAC  
4971 CGGAGGGAAA TTGGAGATAG TGGTTAATA AATAAGAGGC AGTCAAGTCC TATGGCTGCT TGGTGACTTA  
5041 TACATATTGA TAACAAGTAA CAATGCTCTT GGGCTTCTCT GGTGGCTCAG ATGGAAAAGA ATCTGTTTGT  
5111 AATGCAGGAG ACCCAGGTTT AATCCCTGGT TTGGGAGTAT CCCCAGAGT AGGGAATGGC AACCCACTCT  
5181 AGTATTTCTG CCTGAAGAAT CCCATGGACA GAGGAACCTA GCAGGCTACA GTCCACCGGG TCCAATAAG  
5251 TCGATGTGAT TGAGCAACTT ACACAGGGCA GAACAGAACA TGCTATCTC TGATACGCTA TCAGAGATAG  
5321 CCACAATGCT ATCAGAGATA TCTCCTAAA TACCAAGAAC TTCTGTAAGT ATTGATGATG GCTGGTTTAC  
5391 ATCATAGACC TGAGATCAGG CTAATATGAA TATCTATTAA TAGTTGGTTC TTTGCTTCT TCCAACATGT  
5461 TCTAGACTGA **ACTTCCAGT** **AAGAATGTC** **ATAATCTGA** **CTACCAAT** **CTAGATGTC** **AGGATAGCT** **exon7**  
5531 **TAATTTTTC** **TGGTGTGAT** **GGAAGAGAGC** **CACTGCTAC** **GATCATACAG** **ATGATGTA** **CTTCTCTAG**  
5601 GTGAGACATG TGGGACAGGG TCATCCACTA CAGAGTGTGT CGAAATCTT ACCAGGCACC TCAGCCTTCT  
5671 TATTATTCTT CTTAGAATAT TCTTCTTAG CAAAAGTTGA ACAATACAGG ATACACACGT TGCTTGTAT  
5741 GTGATAGAAG CAAAAGTGTG CAGTAACTTT AACAACCTAC AGATAGGTAT ATTGCCCAA TCAGGACACA  
5811 ACTACTTGAG AAACAGGCAT TTCCCTCATA AAAGGTACAA GCTAAGTGAA TACAGGTATC TTTACTGCAT  
5881 AGTAGGTTTT TTTGATAGTA TAAATAGAGT TGCTATGAGA ATGCTTTGTA GGAAGGGTAC TGACTCAACC  
5951 TGGAGTGAG GATGGGTGAA TCAGATGTTT TGCTGGAAGA GATGATGTT CAGTTGAGAC CTAGGGGGTG  
6021 AATAAACTAG GTGAAAGGGC ATTAAGGGGG TGAATGTTCC AGACAGAAGA AATATCATAT TGTAGTCTTA  
6091 GAAAGTGGTT CTTTATCTTC CAAAAGCTAA TATACACTTG CCCTTCAAAG TAACATTAAT CATTGTGTTA  
6161 CATCATATCT CACTTGAAGA AAGAACATTC CAGTTGTCTT ACTAATGTGG AGGGTATTTT CCTTCTGTCT  
6231 GGTCTCCCTT GTTACGTTTC TTCTGCTTAA GACCATGAAC TTCGAAGCCT CAGGCAGTAG TTCAAGTCCC  
6301 AACTCAGCCA TTTCCAGCTT GTTATCTGGG GCATAGCTTA TGTCTACCT GTGGTGTACC TAGTCACTCA  
6371 GTCGTGTCCA ACTCTGGCAG CCCATGGACT GTAGCCACC AGGCTCCTCT TGTCCATGGG CATTCTCCAG  
6441 GCAAGAATAC TGGAGTTGCC ATGCCCTCCT CCAGAGGATC TTTCCAACC AGGGATTGAA CCCAGTCTC  
6511 CTGCATTGCC GGCAGATTCT TTACCGTCTG AACCAACAAG GAAGCCCAAG AATACTAGAG TGGGTAGCCT  
6581 ATCCCTTCTC CAGGGGATCT TCCCCACCA GGAACCTGAAC CAGAGTCTCC TGCATTGCAG GCAGATTCTT  
6651 TACCAGAGCT ACCTGGGAAG CTCTATGTTT TGCCATGAA ATGTGAAAGA ATACTGCCAC GCTCAGGGAT  
6721 GTTGTGAGAG TTTTAAAAAG CTAAGAATC CACATGTGTG GTGGACATAT CCCAGCTGAA TGTACGTGAA  
6791 CTAAGTACA CATACCCTG CTGAATCCAC TGCTCATTCT TAAACTGTG TTACTTTCAG **exon8**  
6861 **TACCAACT** **TCTATGTC** **CTGAGTCT** **CTTAAACT** **TACAAGT** **TGCAAAAT** **TATTTCAA**  
6931 **TATTAATG** **TATTAATG** **ATATTAAAG** **TCTTCAAG** **CTTCTTCT** **TGCAAAAT** **TATTTCAA**  
7001 **CTCTCTCT** **CTATGCTT** **CTCTTAAA** **CAATTTCTCT** **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **AAAGTCCAG**  
7071 **TCCAAAAAT** **CAAGGATCT** **TGAGCTATG** **CAATGATTA** **TCTTCTCT** **TGCAAAAT** **TATTTCAA**  
7141 **TCTTCTCT** **CTTTTATG** **TCTCTCT** **CTCTTAAA** **CAATTTCTCT** **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **AAAGTCCAG**  
7211 **TCTTCTCT** **CTTTTATG** **TCTCTCT** **CTCTTAAA** **CAATTTCTCT** **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **AAAGTCCAG**  
7281 **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **CTTTTATG** **TCTCTCT** **CTCTTAAA** **CAATTTCTCT** **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **AAAGTCCAG**  
7351 **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **CTTTTATG** **TCTCTCT** **CTCTTAAA** **CAATTTCTCT** **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **AAAGTCCAG**  
7421 **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **CTTTTATG** **TCTCTCT** **CTCTTAAA** **CAATTTCTCT** **AGGCTTAT** **TCTTCTCT** **AAAGTCCAG**  
7491 **TTAGCTCT** **ATCCTTTG** **TACTACTT** **CTCTTCT** **TGTA** **TGA** **TAAAACACC** **TTCATGTAGG**  
7561 CTGTTGTATG AATTGGGGTC TGCTCTGAGC AGGCCTCAAC TCTGGTTTGT CTCACAATGC ATGCTTGTGT  
7631 ACCCTGTGTT TTTTATCTTT TCATAAAGAA GTGCCCTCTT TGAATTCAT AAAATTCACT GCAGAATAG

Figure 9. Continued

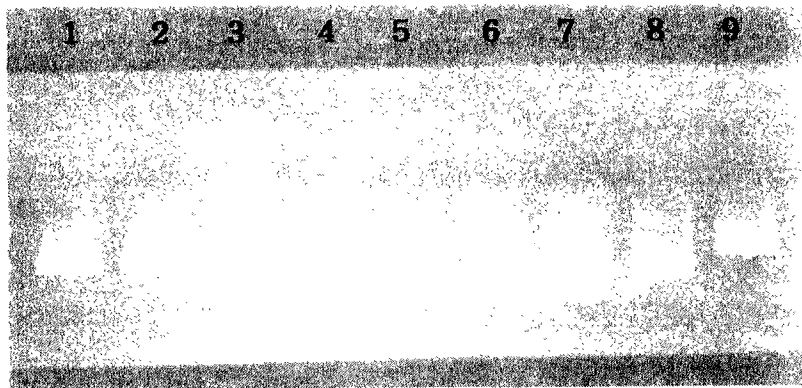
**Table 3. Size of exons and introns of Hanwoo ADRP gene**

Exon	Size	Intron	Size
1	24bp	1	?
2	62bp	2	92bp
3	196bp	3	1677bp
4	83bp	4	795bp
5	285bp	5	953bp
6	182bp	6	1139bp
7	135bp	7	1250bp
8	688bp		

#### 라. ADRP 유전자의 다형성 분석

한우 ADRP 유전자 염기서열을 결정하고 분석한 결과 Neilsen(1999)이 보고한 bovine cDNA 염기서열과 완전히 일치하였다. 그러나 exon 8번 영역에서 다형성을 보이는 염기의 치환 및 삽입이 관찰되었다. 다형성이 나타난 염기의 위치는 bovine ADRP mRNA의 1273번에 해당하고, 이 다형성은 아미노산 서열에 변화를 나타내었다. 다형성의 형태는 1273번의 A가 T로 치환된 형태와 1275번에 T가 삽입된 형태로 나타나고 있다. A의 T로의 치환은 아미노산이 Val에서 Phe로 바뀌어지고, T 삽입에 의해서는 아미노산 배열이 달라지고 stop codon으로 되어 38개의 아미노산이 짧아진다. Fig. 10은 이러한 다형성을 PCR-SSCP 방법으로 검사한 결과이다. 1, 2, 5과 8번 lane은 기본형인 A1A1형의 유전자형이며, 3, 4와 7번 lane은 A1A2 유전자형 (A→T와 T 삽입), 6과 9번 lane은 A2A2 유전자형 (T 삽입)으로 추정하였으며, 한우 269두에 대하여 빈도를 측정하였을 때 A1A1형이 0.78, A1A2형이 0.19, A2A2형이 0.03의 빈도로 추정되어졌다. Fig. 11은 검출된 다형성 영역의 염기서열을 결정한 결과로 Fig. 11에서 첫 번째 lane은 정상적인 wild type (A1형)으로 염기서열은 1273번부터 ATCCC 이었고, B는 T가 1275번 염기서열에 삽입된 형태로 염기서열은 ATTCCC 이었다. 세 번째 lane은 A와 T가 같이 존재하여 N으로 reading 된 것으로 염기서열은 NTTCCC로 읽혀졌다. 본 연구에서 확인한 다형성은 이론적으로 추정되는 할 수 있는 형태는 모두 4가지이다. 즉 wild type인 ATCCC, A가 T로 치환된 TTCCC, wild type에 T가

삽입된 ATTCCC, 그리고 T가 치환되고 T가 삽입된 TTTCCC인 것이다. 그러나 PCR-SSCP 분석을 통한 본 연구 결과에서는 4가지 유형 중 3가지만 검출할 수 있었다. 즉 1273번의 A가 T로만 치환된 TTCCC 경우는 검출되지 않았다. 이에 대한 정확한 이유는 분석이 더 필요하지만 추정되는 원인으로는 먼저 이용된 모든 개체에 대한 염기서열을 분석하지 못하여서 실제로 존재는 하나 단지 검색이 못된 경우, 둘째 어떠한 이유는 모르지만 A의 T치환은 반드시 T의 삽입을 동반한다는 것, 셋째 PCR에 의해 이러한 분석이 진행되므로 PCR 과정에서 DNA의 구조 특성상 생길 수 있는 오류로 추정할 수 있다. 그러나 연구의 결과를 바탕으로 보면, 이러한 다형성을 기존의 염기서열을 아미노산으로 전환하였을 경우 Fig. 12에서 보는 바와 같이 염기 T의 삽입은 355 번째의 아미노산을 TGA로 만들어 translation을 종결시킴으로 인해 wild type 보다 38 개의 아미노산이 적은 염기서열을 보이게 된다. 즉 T의 삽입은 다른 단백질 형태로 발견될 수 있음을 추정할 수 있었다. 따라서 T가 삽입된 ADRP 유전자는 다른 기능을 가질 것으로 추정되며 이는 체내 지방의 대사에 있어 지방구의 분화 또는 지방의 축적에 있어 서로 다른 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 추정의 검정은 많은 개체를 분석하고, 지방축적 정도를 측정하여 상호간의 상관관계를 분석함으로써 검정이 가능할 것으로 사료된다.



**Figure 10. PCR-SSCP polymorphism in the Hanwoo ADRP gene. Lane 1, 2, 5 & 8 : A1A1; lane 3, 4, & 7: A1A2; lane 6 & 9: A2A2. Genotype frequency : 0.78 0.19, 0.03 in 269 heads of Hanwoo.**



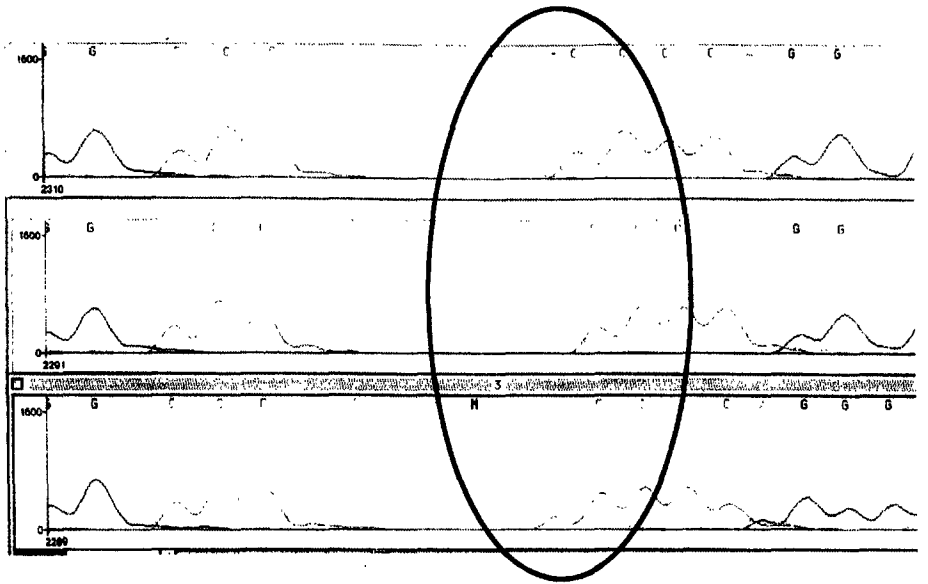


Figure 11. Nucleic acid variations in the exon 8 polymorphic region of the Hanwoo ADRP.

	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355
A1	CCC	TTT	TAT	CCC	CAG	GTG	ACC	GAG	TCT	GAG
	P	F	Y	P	Q	V	T	E	S	E
A2	CCC	TTT	TTT	TCC	CCA	GGT	GAC	CGA	GTC	TGA
	P	F	F	S	P	G	D	R	V	*
	356	357	358	359	360	361	362	363	364	
A1	AGT	GCT	CAG	GCC	CCA	GGT	ACA	ACC	AGG	
	S	A	Q	A	P	G	T	T	R	
A2	GAG	TGC	TCA	GGC	CCC	AGG	TAC	AAC	CAG	
	E	C	S	G	P	R	Y	N	Q	

Figure 12. Comparison of amino acid sequences of the allele A1 & A2.

Allele A1 is wild type and A2 is mutant type which is substituted A by T in 1273th and inserted another T in 1275th base of exon 8 of ADRP. Asterisk indicates stop codon.

## 제 2 세부과제

### 간 조직 유용유전자의 구조 및 발현양상 분석

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 한우의 월령별 간 조직의 채취

한우는 축산기술연구소에서 선별한 한우 수송아지를 사용하였으며, 0개월 (생시), 6개월, 12개월, 24개월령 별로 도축하여 간을 채취함과 동시에 1 cm<sup>2</sup> 이하의 절편을 만들어 액체 질소에 냉동하여 -70℃에 보관하여 사용하였다. 개체간의 변이를 평준화하기 위하여 동일한 월령의 한우 6두 이상으로부터 간을 채취하여 사용하였다.

##### 나. 한우의 간 조직 mRNA의 분리

###### 1) 간 조직 total mRNA의 분리

Total RNA의 순수분리는 RNagent total RNA isolation kit(Promega, USA)을 이용하여 순수분리하였다. -70℃에 보관된 간 조직 절편 1g을 이용하여 total RNA를 다음과 같은 방법으로 분리하였다.

- (1) 50 ml centrifuge tube에 denaturing solution 12 ml을 넣고, 얼음에 5분간 둔다.
- (2) 간 조직 1g을 denaturing solution에 넣고, 30초 ~ 1분 동안 high speed homogenizer로 파쇄한다.
- (3) 2 M sodium acetate (pH 4.0) 1.2 ml을 넣고 처음에는 서서히 2, 3회 섞은 후, 강하게 10초간 섞는다.
- (4) Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol mixture 12 ml을 넣고 10초 동안 격렬하게 섞는다.
- (5) 얼음에 15분간 배양한다.
- (6) 4℃에서 20분간 10,000 x g (약 9,000 rpm)로 원심분리한다.
- (7) 상층액을 따내어 50 ml centrifuge tube로 옮긴다.
- (8) 동량의 isopropanol을 넣고 -20℃에서 incubation 한다 (최소 30분 이상).
- (9) 4℃에서 15분간 10,000 x g (약 9,000 rpm)로 원심분리한다.
- (10) 5 ml 의 denaturing solution으로 RNA 침전물을 현탁하고 완전히 녹을 때까지

지 아주 약하게 vortex 한다.

- (11) 동량의 isopropanol을 넣고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 이상 배양한다.
- (12)  $4^{\circ}\text{C}$  15분간  $10,000 \times g$  (약 9,000 rpm)로 원심분리하고, 최소 10 ml의 차가운 75 % ethanol을 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15 분간  $10,000 \times g$  (약 9,000 rpm)로 원심분리한다.
- (13) 상층액을 버리고, 옆에서 침전물을 말린다.
- (14) RNase-Free Water 1 ~ 3 ml에 RNA를 resuspend 하고, 사용전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관한다.

## 2) mRNA 순수분리

분리한 total RNA로부터 FastTrack<sup>®</sup> 2.0 Kit (Invitrogen)을 이용하여 다음과 같은 방법으로 mRNA를 순수분리하였다.

- (1) 1.5 ml의 total RNA 당  $95 \mu\text{l}$ 의 5 M NaCl를 넣고, 잘 섞는다.
- (2) Oligo(dT) cellulose 1개를 넣는다.
- (3) Tube를 sealing하고 2분 동안 상온에 두어 oligo(dT) cellulose가 팽창되도록 한다.
- (4) Tube를 15 ~ 60 분간 실온에서 부드럽게 흔든다.
- (5)  $3,000 \times g$  (약 4,200 rpm)으로 5 분간 실온에서 원심분리하여 oligo(dT) cellulose pellet을 모은 뒤, 상층액을 조심스럽게 제거한다.
- (6) 20 ml의 binding buffer로 oligo(dT) cellulose를 부드럽게 현탁하고, 실온,  $3,000 \times g$  (약 4,200 rpm)으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한다.
- (7) 10 ml의 binding buffer로 resin을 부드럽게 현탁하고, 실온에서  $3,000 \times g$  (약 4,200 rpm)으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한다.
- (8) 10 ml의 low salt wash buffer로 resin을 부드럽게 현탁하고, 실온에서  $3,000 \times g$  (약 4,200 rpm)로 5 분간 원심분리하여 상층액을 제거한다.
- (9) 원심분리 후 buffer에 기포가 더 이상 생기지 않을 때까지 적어도 2 ~ 4 회 step (8) ~ (9)를 반복한다. 마지막 wash 후  $800 \mu\text{l}$ 의 low salt wash buffer에 oligo(dT) cellulose를 현탁한다.
- (10) Oligo(dT) cellulose를 spin column에 넣고, 실온에서  $5,000 \times g$ 로 10초간 원심분리한다.
- (11) Microcentrifuge tube의 liquid을 제거한 뒤, spin-column 속에 모든 cellulose를 넣기 위해 필요한 만큼 step (5) ~ (6)을 반복한다 (2 ~ 3회).

- (12) 세정하기 위하여 column을 다시 tube속에 넣고, low salt wash buffer를 top까지(약 500  $\mu$ l) 채우고 tip으로 buffer와 oligo(dT) cellulose를 섞은 후, 10초간 원심분리한다.
- (13) (12)를 최소 3번 반복 (flow-through가 OD<sub>260</sub>에서 0.05이하)하여야 한다.
- (14) 새로운 microcentrifuge tube에 spin-column를 넣는다.
- (15) 200  $\mu$ l의 elution buffer를 넣고 멸균한 tip으로 cellulose bed 속에서 부드럽게 섞는다.
- (16) 실온에서 30초간 원심분리한다.
- (17) (15) ~ (16)을 2 ~ 3회 반복한다.
- (18) Tube로부터 column을 제거한다.
- (19) 0.15 volume (60  $\mu$ l)의 2 M NaOAc와 2.5 volume (1 ml)의 100 % EtOH를 넣고 고체화될 때까지 -70 °C에 둔다.
- (20) 녹인 후, 4 °C에서 최대속도로 20 분간 원심분리한다
- (21) EtOH를 제거하고 75 % EtOH로 세정 후, 건조시킨 다음 20 ~ 50  $\mu$ l정도의 elution buffer (10 mM Tris, pH 7.5)로 RNA를 현탁한다.
- (22) mRNA의 농도를 계산한 후, 즉시 -70 °C에 저장한다.

#### 다. PCR에 의한 subtraction cDNA library 제조

cDNA subtraction 방법에는 여러 가지가 있다. 그러나, 대부분의 경우 까다로우며 그 효율성이 떨어지는 단점이 있다. 이 연구에서는 PCR에 의한 subtraction을 이용하였으며, Clone Tech의 PCR-select cDNA subtraction kit을 이용하였으며, 그 대략적인 방법을 그림으로 표시하였다. 간단히 살펴보면, 12개월령 한우의 간 cDNA와 0개월령 간 cDNA 중에서 12개월령에서 더 많이 발현되는 cDNA를 찾고자 할 때 12개월령 cDNA (tester)에서 0개월령 cDNA (driver)를 subtraction 하는데, 우선 tester cDNA (12개월령 cDNA)를 *Rsa*I로 소화하여 작은 절편으로 만들고, 반으로 나눈다. 각각의 tester cDNA에 서로 다른 adapter (1과 2R)를 부착하고 각각의 driver cDNA (0개월령 cDNA)를 과량 넣어서 hybridization을 한다 (first hybridization). 이 두 개의 hybridization한 시료를 섞어서 다시 hybridization하게 되면 (second hybridization) 여러 가지 anealing products 들이 생성되게 된다. 그들을 두 번의 PCR에 의해 증폭하게 되는데, 1 차 PCR의 경우 primer로는 adapter의 바깥쪽에 해당하는 primer를 사용하고 2 차 PCR은 안쪽의 nested primer를 사용하여 증폭한다. 그 결과 12개월령 cDNA에 더 많이 존재하는 cDNA만이 선택적으로 증폭되게

된다. 증폭된 cDNAs (subtracted cDNA)는 pGEM T-vector(Promega)에 cloning하여 library를 제조하여 screening에 사용하였다.

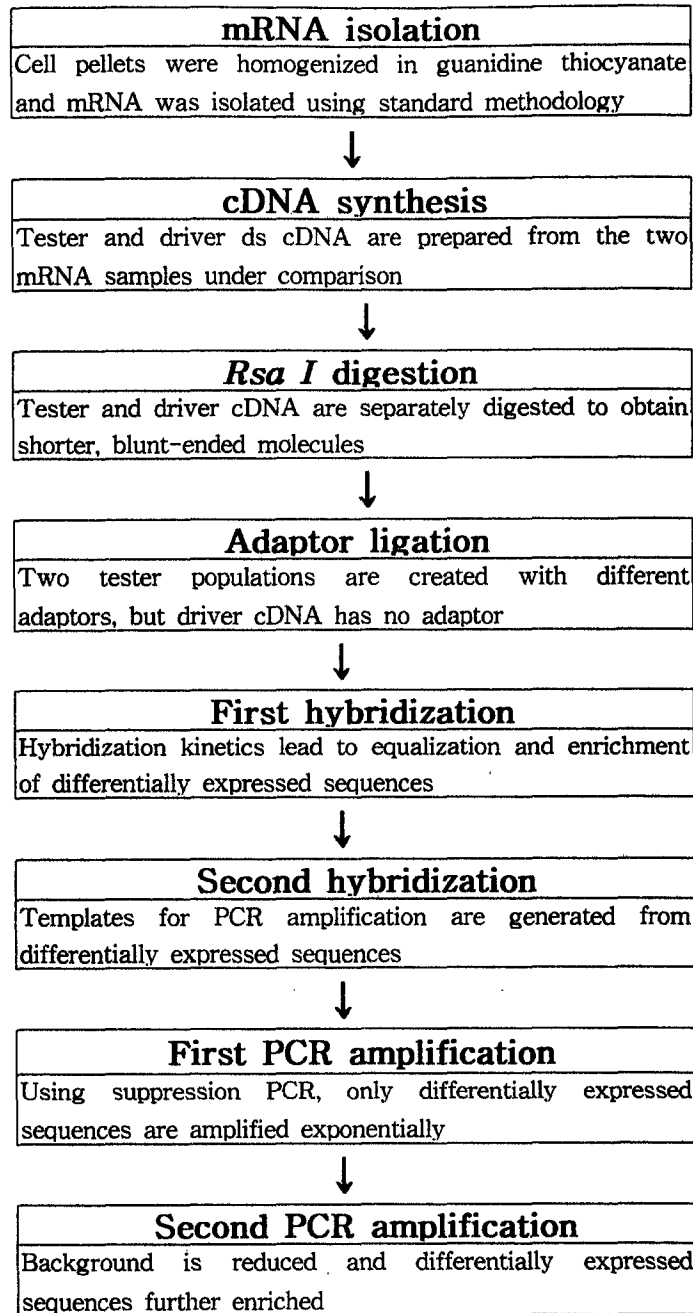


Figure 1. Procedure of the PCR-select cDNA subtraction. The cDNA in which specific transcripts are to be found is called "tester" and the reference cDNA is called "driver"

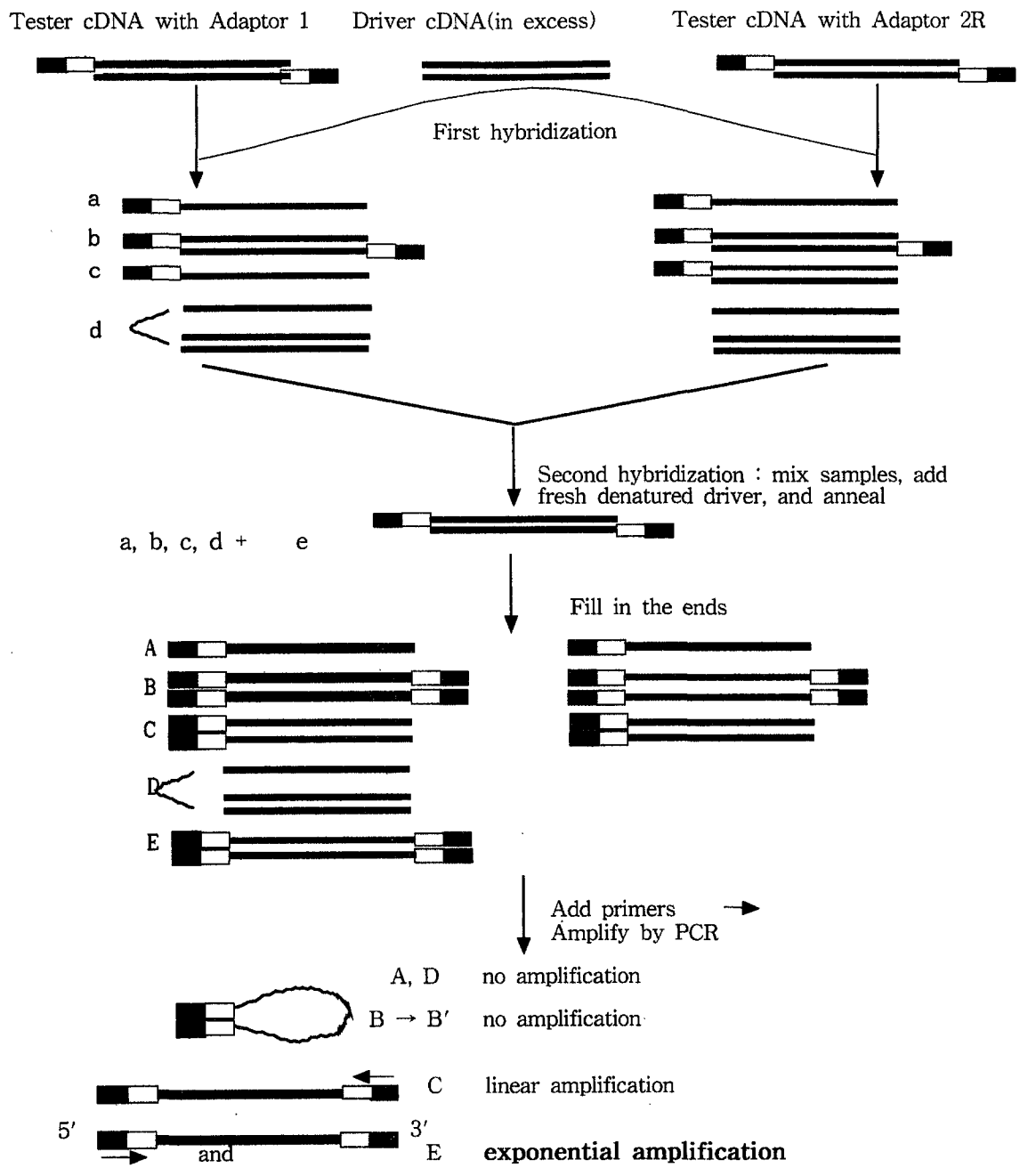


Figure 2. Schematic diagram of the PCR-select cDNA subtraction

#### 라. 성장 단계별 간 조직 특이 발현 유전자의 선별

Subtractive cDNA library로부터 성장 단계별 특이발현 유전자의 선별은 slot-blot hybridization 방법을 사용하였다. Library clone중에서 무작위로 675개의 clone을 선택하여 각각의 clone으로부터 plasmid DNA를 분리하고, 1/10 부피의 2 M NaOH를 첨가하여 변성시킨 다음, 반으로 나누어 각각을 nylon membrane에 slot-blotter를 이용하여 점적하여 replica membrane을 만들어 hybridization에 사용하였다. Hybridization probe는 각 월령별 mRNA로부터 total cDNA를 합성할 때,  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -dATP를 첨가하여 labeling하여 사용하였다. Replica membrane을 서로 다른 월령의 cDNA probe로 hybridization하여 서로 비교하고 월령별 유전자의 발현 정도를 비교하여 차이를 나타내는 cDNA clone을 선별하였으며, 선별된 clone의 염기배열을 조사하고 GenBank Data를 검색하여 유전자를 동정하였다.

#### 마. 한우 genomic DNA library의 제조

한우의 간 조직으로부터 고분자(500Mb 이상)DNA를 분리하여 genomic library를 제작하였다. Genomic DNA를 *Sua3A1*으로 부분 소화하여 35-40 Kb 크기의 절편이 가장 많이 생성되는 조건을 결정하여 large scale digestion하고, size fractionation 하지 않고 효율적으로 cloning 할 수 있는 cosmid vector인 SuperCos 1(Stratagene)의 *Bam*HI site 에 삽입하였다. Ligation mixture는 Gigapack Gold III packaging extract(Stratagene, USA)로 packaging 하여, 대장균(*E. coli* XL-1 MRF)에 감염하여 LB(amp) 한천배지에 도말하였으며, titration 후 증폭하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하고 사용하였다.

#### 바. 특이발현 유전자의 genomic gene의 screening 및 subcloning

한우 genomic library로부터 genomic clone의 screening은 subtraction library로부터 선별한 성장단계별 특이발현 cDNA clone의 riboprobe를 합성하여 실시하였다. Promoter 지역을 포함하는 genomic clone을 얻기 위해, 특이발현 cDNA clone 중에서 5'-nontranslating region을 포함하거나, 개시코돈에 가까운 부위를 갖는 cDNA clone을 선별하여 probe 로 사용하였다. 분리된 cosmid clone으로부터 cosmid를 순수분리하고 제한효소로 절단하여, southern blot hybridization을 실시하여 promoter 부위를 포함하는 절편을 확인하고, pGEM 7Z에 subcloning 하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 한우의 간 조직 mRNA의 분리

각 월령별 한우의 total RNA는 조직 1 g 당 3 mg 이상 얻을 수 있었으며, formaldehyde-agarose gel 전기영동의 결과 28S와 18S의 ribosome RNA band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 순수분리된 간 조직 total RNA로부터 mRNA를 분리하였다. 그 결과 1 mg의 total RNA로부터 2 ~ 5  $\mu$ g의 mRNA를 얻을 수 있었으며, formaldehyde-agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

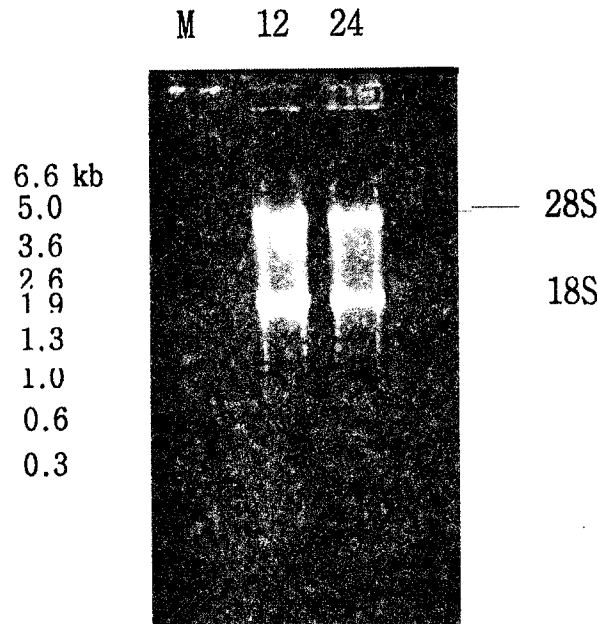


Figure 3. Formaldehyde-agarose gel (1.5 %) electrophoresis of total RNA purified from livers of Hanwoo aged 12 months and 24 months, respectively.

### 나. Subtractive cDNA library 제조

24개월령 한우의 간 조직과 0개월령 한우의 간 조직 사이의 cDNA를 subtraction 한 결과, 비교적 양호하게 subtraction이 되었음을 전기영동으로 확인하



였다. 동일한 방법으로 24개월령과 12개월령 사이의 subtraction도 성공적으로 시행하였다 (Fig. 4). 그러나, 0개월령에서 12개월령 cDNA의 subtraction 혹은 0개월령에서 24개월령 cDNA의 subtraction은 만족할 만한 결과가 나오지 않았다. 따라서, 한우가 성장함에 따라서 억제되는 유전자들은 거의 없는 것으로 생각된다. Subtraction 한 cDNA 절편들을 pGEM T-vector에 cloning 하여 library를 만들었으며, 그 size는 각각 15,000 개 이상이었다.

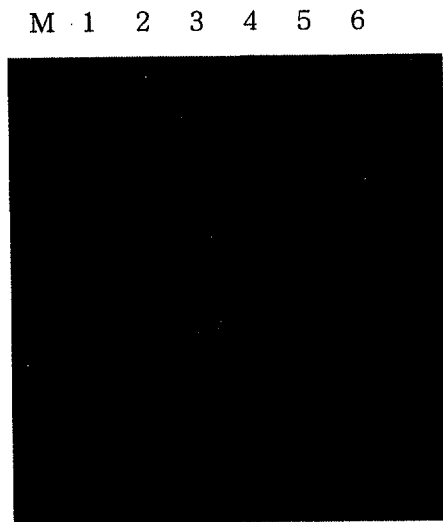


Figure 4. cDNA from liver tissues of 24 months old Hanwoo was subtracted with that from liver tissue of 12 months old Hanwoo and amplified by PCR.

M: marker DNA(200 - 2000 bp)

lane 1-3 : first PCR

lane 4-6 : second PCR

lane 1, 4 : control DNA(phage x174-*Hae*III)

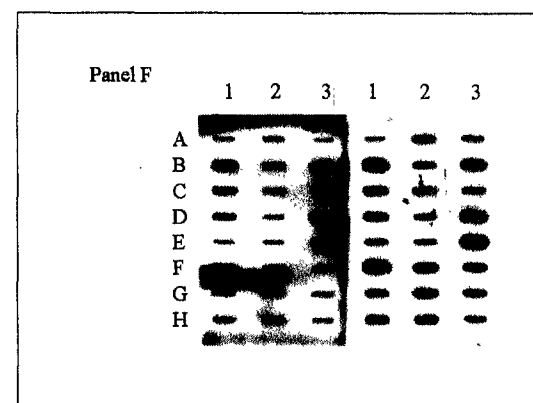
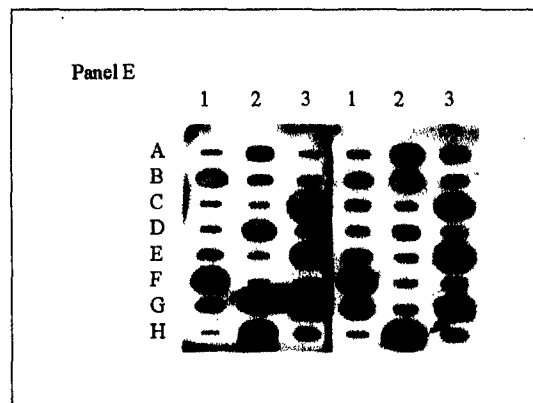
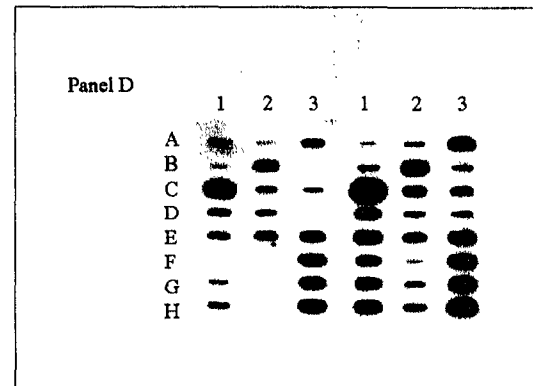
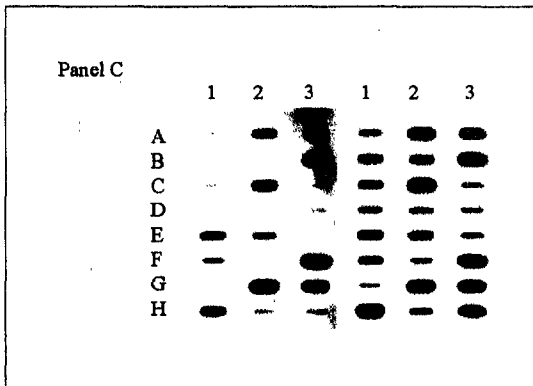
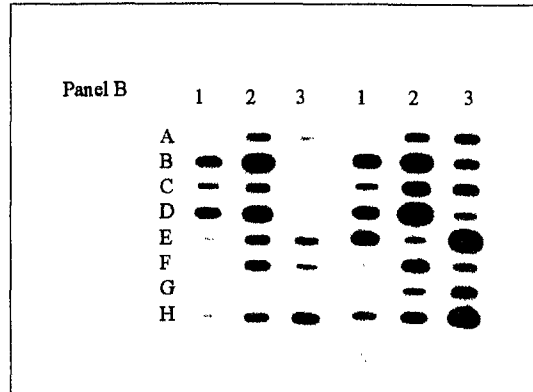
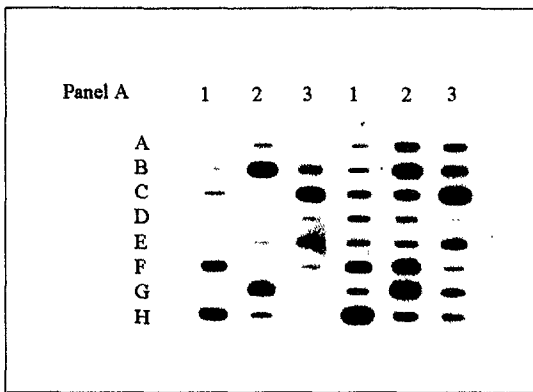
lane 2, 5 : tester cDNA(24 months) unsubtracted

lane 3, 6 : tester cDNA(24 months) subtracted

#### 다. Slot-blot hybridization에 의한 성장단계별 특이발현 유전자의 screening

Subtraction cDNA library clone 중에서 임의로 675개의 clone을 선택하여 성장단계에 따른 발현양상을 조사하고자 하였다. 675개의 clone으로부터 각각 plasmid

를 분리하였으며, nylon membrane을 이용하여 slot-blotting 하였다. Probe로는 각 월령별 mRNA로부터 합성한 cDNA를 이용하였다. Fig. 5는 675개 중 230개 clone의 12개월령 probe와 24개월령 probe로 hybridization 결과를 보여주고 있다. 동일한 실험을 675개의 clone을 대상으로 각 월령 별 probe를 사용하여 전부 확인하였다 (전체 hybridization 자료 미 제시). Table 1은 Fig. 5에서 조사된 특이발현 유전자들의 염기배열을 조사하고 GenBank 자료를 검색한 결과를 나타내고 있다.



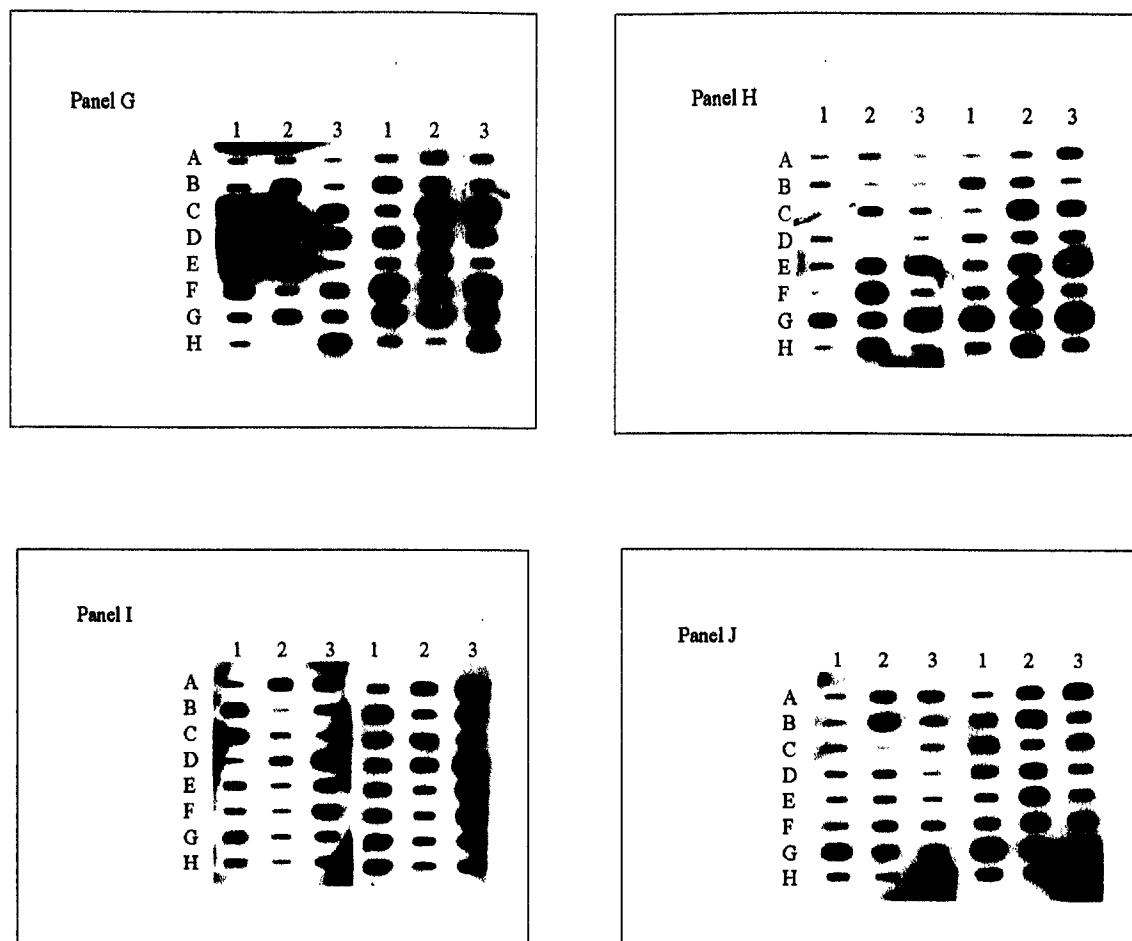


Figure 5. The left halves of the panels are the same blots as the right ones. The left halves were hybridized with cDNA probe prepared from liver tissue of 12 month old Hanwoo, while the right half was hybridized with cDNA probe from the liver tissue of 24 month old Hanwoo.

A1 :  $\beta$ -actin plasmid(hybridization control), cDNA clones(1 ~ 230) were numbered in the order of A2, A3, B1, and so on unless they are specifically noted.

panel A : clone no. 1 ~ 23

panel B : clone no. 24 ~ 46

panel C : clone no. 47 ~ 72(clones, 51, 52, 66 are missing)

panel D : clone no. 73 ~ 95

panel E : clone no. 96, 97, 98, 99 ~ 115

panel F : clone no. 116 ~ 138

panel G : clone no. 139 ~ 161

panel H : clone no. 162 ~ 184

panel I : clone no. 185 ~ 207

panel J : clone no. 208 ~ 230

Table 1. cDNA clones that are expressed differentially in the liver of 24 month old Hanwoo.

Clone no.	Gene name	Homology	Subtraction library	Slot (Fig.5)
1	Unknown	-	24-12	A2(panel A)
2	Ubiquitin conjugating enzyme E2	83%	"	A3(panel A)
7	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	83%	"	C2(panel A)
16	Mitochondrial aralkyl acylCoA:amino acid N-acyltransferase	96%	"	F2(panel A)
18	Ubiquinol-cytochrome C reductase subunit precursor	77%	"	G1(panel A)
20	Unknown	-	"	G3(panel A)
21	Serum albumin	98%	"	H1(panel A)
22	Hydroxysteroid sulfotransferase subunit	76%	"	H2(panel A)
23	Basic transcription factor 44 kDa subunit	91%	"	H3(panel A)
25	Ubiquitin-like protein	75%	24-0	A3(panel B)
28	Ceruloplasmin (ferroxidase)	91%	"	B3(panel B)
30	Prostaglandin F synthase	98%	"	C2(panel B)
31	Apolipoprotein J	96%	"	C3(panel B)
34	Growth hormone receptor	98%	"	D3(panel B)
35	Aldehyde dehydrogenase	98%	"	E1(panel B)
37	Cytochrome P450	98%	"	E3(panel B)
43	Cytochrome P450	100%	"	G3(panel B)
46	Albumin	100%	"	H3(panel B)
48	Unknown	-	"	A3(panel C)
49	Unknown	-	24-12	B1(panel C)
50	Unknown	-	"	B2(panel C)
52	Unknown	-	"	A3(panel E)
54	Unknown	-	"	C1(panel C)

Table 1. Continued

Clone no.	Gene name	Homology	Subtraction library	Slot (Fig.5)
72	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase	89%	24-12	H3(panel C)
74	Alcohol dehydrogenase	95%	24-0	A3(panel D)
76	Retinol-binding protein	97%	"	B2(panel D)
77	Unknown	-	"	B3(panel D)
83	Ceruloplasmin (ferroxidase)	92%	"	D3(panel D)
84	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	77%	"	E1(panel D)
86	Unknown	-	"	E3(panel D)
87	Haptoglobin	87%	"	F1(panel D)
93	Aldehyde dehydrogenase	100%	"	H1(panel D)
96	Apolipoprotein F	87%	"	B2(panel E)
109	Somatotropin receptor 1B	99%	24-12	F3(panel E)
110	Unknown	-	"	G1(panel E)
117	B-cell receptor CD22-A isoform	71%	"	A3(panel F)
120	Squalene epoxidase	96%	"	B3(panel F)
129	Serum amyloid P component)	86%	"	E3(panel F)
130	Unknown	-	"	F1(panel F)
131	Bile salt-activated lipase	88%	"	F2(panel F)
132	Somatotropin receptor 1B	100%	"	F3(panel F)
141	Delta-aminolevulinatase dehydratase	92%	"	B1(panel G)
144	Unknown	-	"	C1(panel G)
147	Unknown	-	24-0	D1(panel G)
148	Aldehyde dehydrogenase	100%	"	D2(panel G)
151	Factor I (C3b/C4b inactivator)	83%	"	E2(panel G)
154	Aldehyde oxidase	96%	"	F2(panel G)
156	Complement C3 protein	90%	"	G1(panel G)
158	Unknown	-	"	G3(panel G)

Table 1. Continued

Clone no.	Gene name	Homology	Subtraction library	Slot (Fig.5)
163	Bile salt-activated lipase	83%	"	A3(panel H)
165	Cytochrome P450	100%	"	B2(panel H)
168	Complement component C1r	83%	"	C2(panel H)
169	Cytochrome P450	99%	24-0	C3(panel H)
171	Ceruloplasmin	82%	"	D2(panel H)
172	-	-	"	D3(panel H)
173	Glycoprotein III	100%	"	E1(panel H)
179	Fibronogen-like protein	66%	"	G1(panel H)
182	Cytochrome oxidase	78%	"	H1(panel H)
184	Unknown	-	"	H3(panel H)
186	Complement factor B	86%	"	A3(panel I)
188	Homologue yeast sec7	93%	"	B2(panel I)
189	Aldehyde dehydrogenase	99%	"	B3(panel I)
201	Lactate dehydrogenase-B	92%	24-12	F3(panel I)
202	Unknown	-	"	G1(panel I)
204	PAS-4	93%	"	G3(panel I)
205	Phosphotyrosine independent ligand p62B B-cell isoform	95%	"	H1(panel I)
209	Kininogen I precursor	99%	"	A3(panel J)
214	Carbonic anhydrase III gene	83%	"	C2(panel J)
217	Catalase	72%	24-0	D2(panel J)
218	FcgRIII gene	99%	"	D3(panel J)
220	Carbamyl phosphate synthetase	92%	"	E2(panel J)
221	Skm-BOP2	94%	"	E3(panel J)
223	Retinol-binding protein	90%	"	F2(panel J)
224	Growth hormone receptor	94%	"	F3(panel J)
226	Unknown	-	"	G2(panel J)
227	Presenilin-1 gene	90%	"	G3(panel J)
228	Peptide methionine sulfoxide reductase	96%	"	H1(panel J)
229	Unknown	-	"	H2(panel J)

총 675개의 clone을 월령별 cDNA probe로 hybridization 한 결과, 성장단계별 특이발현 유전자는 그 발현양상에 따라 6개월 이내에 급속하게 발현이 증가되어 그 이후 발현량이 그대로 유지되는 그룹과 24개월까지 계속해서 증가되는 그룹으로 나눌 수 있었다. 전자의 경우 10개의 unknown clone을 비롯하여 총 37종의 cDNA clone이 있으며, 후자의 경우 7개의 unknown clone을 포함해서 40종의 cDNA clone이 조사되었다. 그 결과를 Table 2와 Table 3에 나타내었다.

Table 2 Genes of incremental expression up to 24 months in Hanwoo liver

Names of genes	Number of clones out of 675 clones
Bovine serum albumin (22)	22
Heptoglobin (9)	9
Cytochrome P450(8)	8
Complement factor(7)	7
Ceruloplasmin(5)	5
Aldehyde dehydrogenase (5)	5
MHC II (4)	4
Aralkyl acyl CoA synthase (3)	3
Bile salt-activated lipase (3)	3
Apolipoprotein J(3)	3
Somatotropin receptor(2)	2
Apolipoprotein F(2)	2
Alcohol dehydrogenase(2)	2
Fibronogen beta chain(1)	1
Fructose-2,6-bisphosphatase(1)	1
Reverse transcriptase (1)	1
Transitional endoplasmic reticulum ATPase (1)	1
Lactate dehydrogenase(1)	1
Kininogen I precursor(1)	1
Phosphotyrosine independent ligand p62B B-cell isoform(1)	1

Table 2 Continued

Names of genes	Number of clones out of 675 clones
Serine protease inhibitor(1)	1
Glycoprotein III(1)	1
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) (1)	1
Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) core protein(1)	1
D1c dopamine receptor (1)	1
Chromosome X(1)	1
3-hydroxy-3-methyl-glutary CoA synthase (1)	1
Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit precursor(1)	1
Liver-type alkaline phosphatase	1
Bovine mitochondrial gene(1)	1
Mariner transposon Hsmar1 orf gene (1)	1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (1)	1
Unknown(7)	7

Table 3. Genes of fast increased expression within 6 months in Hanwoo liver

Names of genes	Number of clones out of 675 clones
Aldehyde oxidase	2
Retinol-binding protein	2
Basic transcription factor 44kD subunit	2
Growth hormone receptor	2
Ubiquitin-like protein	1
Prostaglandin F synthase	1
Peptide methione sulfoxide reductase	1
Hydroxysteroid sulfotransferase	1
Serum amyloid P component	1



Table 3. Continued

Names of genes	Number of clones out of 675 clones
Fibrinogen like protein	1
Huntington's Disease Region	1
FcgRIII gene	1
Squalene epoxidase	1
Telomeric DNA sequence	1
NADH dehydrogenase	1
Catalase	1
B-cell receptor CD22-A isoform	1
Yeast sec 7	1
Cytochrom oxidase	1
<i>S.cerevisiae</i> G2-specific B-type cyclin-like protein	1
B-cell receptor CD22-A isoform	1
Carbonic anhydrase III gene	1
PAS-4	1
Putative PKC regulatory protein	1
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1
Delta-aminolevulinate dehydratase	1
Carbonyl phosphate synthetase	1
Unknown	10

#### 라. Northern blot 분석

실제로 slot-blot 분석에 의해 선별된 cDNA clone 들이 성장단계별 특이발현 유전자인지를 알아보기 위해 6종 (apolipoprotein F, apolipoprotein J, bovine serum albumin, aralkyl acy CoA : amino acid N-acyltransferase, bila salt-activated lipase, haptoglobin) 의 cDNA clone을 선택하여 Northern blot 분석에 의해 확인하였다. 그 결과, 6개 clone 모두 유전자 발현이 성장에 따라 증가하는 것으로 확인되어 slot-blot 분석법이 믿을 수 있는 방법임을 증명하였다 (Fig. 6).

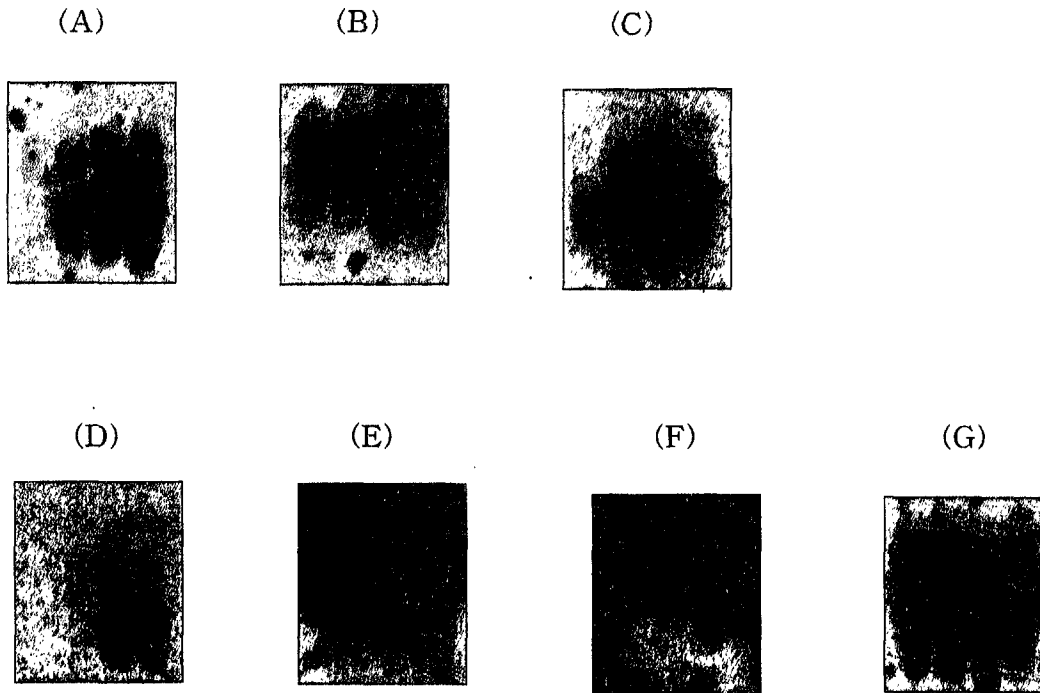


Figure 6. Growth-dependent differential expression in liver of the six genes: apolipoprotein F(A), bile salt-activated lipase(B), bovine serum albumin(C), haptoglobin(D), arakyl acyl CoA synthase(E), apolipoprotein J(F); Panel G : beta-actin as control(G).

**마. 한우 genomic library 제조 및 특이발현 유전자의 genomic clone screening**

한우의 성장단계별 특이 발현유전자 cDNA clone 들 중에서 5'-nontranslating region을 포함하는 clone들로부터 riboprobe를 합성하여 screening에 사용하였다. 총 14종의 cDNA clone (dehydrogenase, retinol binding protein, bile salt-activated lipase, aldehyde oxidase, celluloplasmin, cytochrome P450, apolipoprotein J, haptoglobin, peptide methionine sulfoxide reductase, Fc gamma RIII, kininogen I precursor, serine protease inhibitor, aralkyl acylCoA:amino acid N-acryltransferase, bovine serum albumin)의 genomic clone screening을 시도하였다. 그 중에서 5종 (retinol binding

protein, cytochrom P450, peptide methionine sulfoxide reductase, apolipoprotein J, aralkyl acylCoA: amino acid N-acyltransferase)의 genomic clone을 획득하였다. 이들 genomic clone 들의 promoter 부위를 포함할 것으로 추정되는 절편을 Southern blot 분석에 의해 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

**바. Promoter subcloning 및 분석**

확보한 4개의 genomic clone이 포함하는 promoter 부위 절편의 subcloning을 시도하였다. 그 결과, retinol binding protein, cytochrom P450, aralkyl acylCoA: amino acid N-acyltransferase의 genomic clone으로부터 *EcoRI* 절편을 pGEM 7Z의 *EcoRI* site에 subcloning 하였으며, 염기서열을 분석 중에 있다.

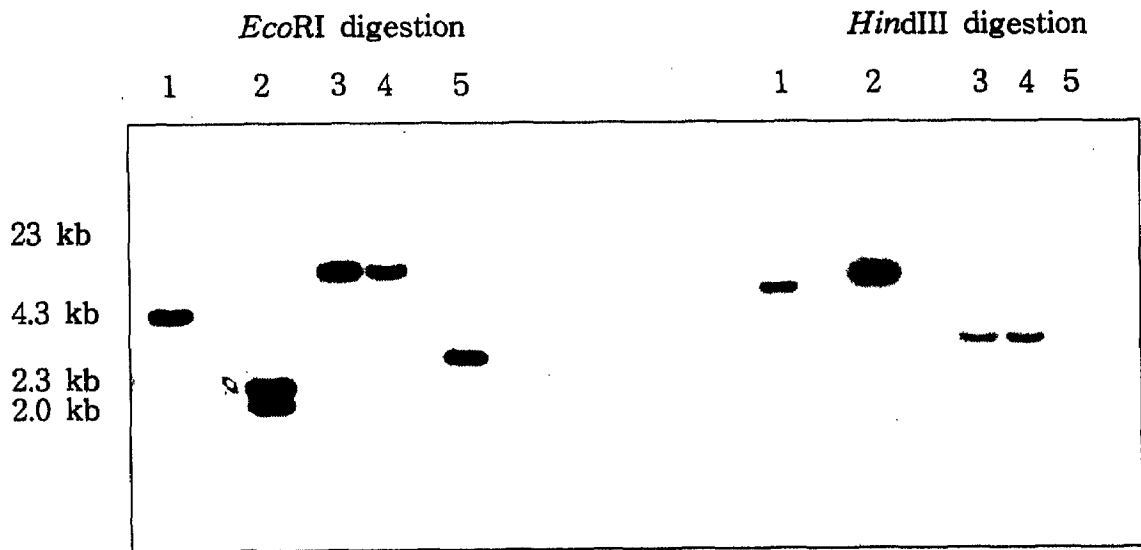


Figure 7. Southern blot analysis of 4 genomic clones.

- lane 1 : retinol binding protein, lane 2 : cytochrom P450
- lane 3 & 4 : peptide methionine sulfoxide reductase
- lane 5 : aralkyl acylCoA: amino acid N-acyltransferase

### 제 3 세부과제

## 성장단계별 특이 단백질 분리 및 기능 분석

### 1. 재료 및 방법

#### *Preparation of samples.*

0, 12, 24개월령의 거세우와 비거세우 등심을 공시하여 액체질소에 급속냉동 후 곧바로  $-75^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

#### *Extraction.*

비거세우, 거세우 등심 각각 1 g 을 10 % Triton X-100이 첨가된 30 ml PBS 에 녹여 homogenizing하여 가용단백질을  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 비가용 단백질을 분리하였다. 상층액은 새로운 튜브에 모아졌고, 펠렛은 1 % Triton X-100 10 ml로 2차례 씻어서 보관하였다.

#### *Ammonium sulfate fractionation.*

Purification을 위해서 우선 1 % Triton X-100이 첨가된 PBS에 녹는 단백질에 대하여 분석하였다. 1 % Triton X-100에서 가용부분은 ammonium sulfate에 의해 농축되고 분획되었다. 그 단백질들은 30 %, 50 % 그리고 50 % 이상으로 단계적으로 분획되었다. 이 단계 후에 30 %, 50 % pellet은 2 L의 10 mM PBS에 투석되었고, 50 % 이상의 상층액은 10 % TCA에 의해 침강되었다. 이 상층액은 12,000 rpm에서 15분간 원심분리되어 그 펠렛을  $\text{dH}_2\text{O}$ 과 solution E에 녹였다.

#### *Protein assay.*

각각의 분획된 단백질은 연속적 희석으로 UV spectrophotometer로 그 적정농도를 결정하기 위하여 Bio-Rad Protein Assay Kit을 사용하여 595 nm에서 표준곡선을 만든 다음 각각의 흡광도를 측정하여 농도를 측정하였다.

#### *2-D Electrophoresis.*

일차원 IEF tube gel은 30  $\mu\text{l}$  samples로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 300 V에서 2시간, 500 V에서 2시간, 그리고 800 V에서 16시간 전기영동 하였다. 그 IEF gel은 튜브로부터 뽑혀져서 이차원 전기영동 gel에 위해 놓여졌다. 각 gel은  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 40 mA로 4시간

전기영동 시켰다. 전기영동 후 각 gel은 silver 염색하여 비거세와 거세를 비교되었다. 뚜렷하게 다른 단백질들이 정제를 위해 위치가 잡혀졌다. Immobilized pH Gradients(IPGs) IEF는 Bio-Rad IPGs strip pH 3-10을 12시간 샘플과 함께 rehydration 시킨 후 5시간 linear ramping 으로 10,000 V로 올린 후 6시간 동안 전기영동하였다. 이 후 20분간 equilibration 시킨 후 이차원 전기영동시켜 단백질을 분리하였다.

### ***Electrotransfer.***

이 단계를 위해 선택되어 분리된 gel은 Coomassie Brilliant Blue R250 dye로 염색되었다. 그 단백질들은 4 °C의 48 mM Tris base, 39 mM glycine, 20% w/v methanol (pH 8.5)를 포함하는 electrophoretic transfer buffer에서 constant 80 V로 2시간동안 가동되어 nitrocellulose paper로 옮겨졌다. 옮겨진 후 nitrocellulose membrane은 membrane의 glycine을 제거하기 위하여 100 % ethanol로 씻었다.

### ***Image Analysis.***

보다 정확한 이차원 gel의 이미지 분석을 위하여 Bio-Rad의 이차원 전기영동 이미지 비교 프로그램인 PDQUEST를 사용하여 좀 더 낮은 농도에서의 단백질 차이를 비교하였다. 이 프로그램은 2개 이상의 이차원 gel에서 공통되는 spot을 3개 이상 정해 준 후 자동적으로 위치를 변화에 따른 상대적인 차이점을 분석하였다.

### ***In Gel Extraction.***

Silver 염색된 원하는 단백질 부분을 잘라서 50 % v/v acetonitrile in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 로 세척하고 10 mM DTT와 50 mM iodoacetamide로 각각 환원과 alkylation 처리를 한 후 0.5 % TFA, 50 % v/v acetonitrile 또는 Formic acid/Water/2-propanol (1:3:2 v/v/v)로 추출하여 완전 건조시켜 후 0.1 % TFA로 세척한 후 진공 건조 후 보관하였다.

### ***Mass Analysis.***

Hewlett Packard의 LC/MSD를 ESI 방식으로 사용하였다. 우선 샘플의 ionization을 돕기 위해 50 % MeOH/ 0.5 % Acetic acid (1:1 v/v) 혼합액으로 용해시킨 후, Electrospray Ionization(ESI) LC Mass Spectrometry에 2 ml/min의 flow rate에서 20  $\mu\text{l}$  부피로 loading하여 Mass Spectrum을 얻은 후,

deconvolution하여 abundance가 높은 순으로 그 자료를 검토하여 단백질을 최종 분자량을 결정하였다.

### Database Search

단백질 Database 중 ExPASy의 TagIdent에서 분자량과 대략적인 pI 값을 넣어 그 단백질의 정보를 얻을 수 있었다. 또한 proteomics에 대한 정보를 인터넷을 통해 쉽게 접근할 수 있도록 홈페이지를 개설하였다 ( <http://bh.knu.ac.kr/~jkylim/>).

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 이미지의 비교 분석

Fig. 1과 같이 Bio-Rad의 PDQUEST 프로그램을 사용하여 생시 등심 단백질과 24개월령 등심 단백질을 비교하여 그 차이 나는 것의 양적 변화를 비교하였다.

Fig. 1의 이차원 전기영동에서 보는 바와 같이 한우 등심의 성장 단계별로 변화되는 단백질 양상을 볼 수 있었다. 이 변화를 Table 1에서와 같이 catalogue화하여 그 각각을 microsequencing을 통하여 N-terminal sequence로 단백질을 동정하고자 하였다.

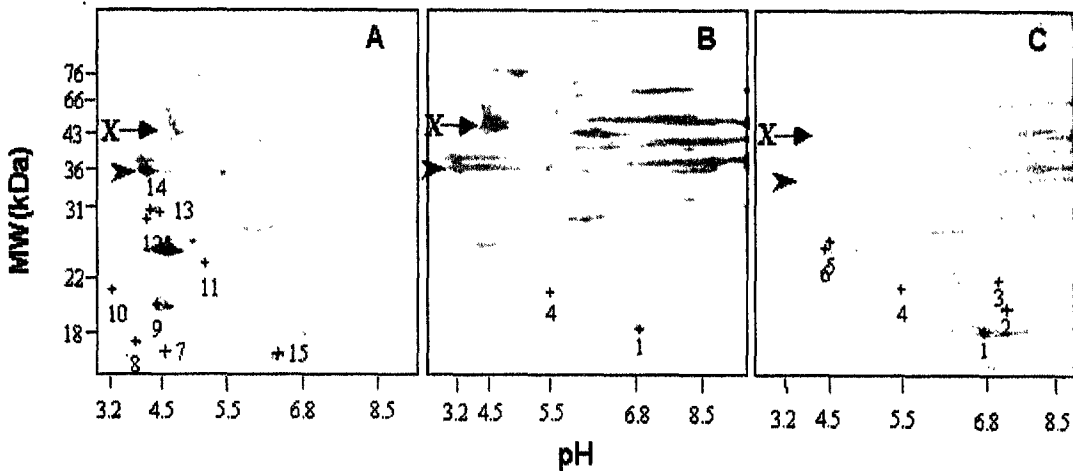


Figure 1. Loin protein expression of Hanwoo. A: 0 month, B: 12 months, and C: 24 months. The amount of proteins are decreased or increased.

Table 1. Variations in protein expression during the growth of Hanwoo

	Protein ID	pI	MW(kDa)	Solubility in 1% TritonX-100	Precipitated with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Increased	1	6.4	18	Soluble	>50%
	2	7.0	20	Soluble	>50%
	3	6.8	22	Soluble	>50%
	4	5.6	22	Soluble	50%
	5	4.3	27	Insoluble	NA
	6	4.3	28	Insoluble	NA
Decreased	7	4.6	16		
	8	3.8	17		
	9	4.4	19		
	10	3.2	21		
	11	5.1	24		
	12	4.3	29		
	13	4.4	30		
	14	4.35	31		
	15	6.3	12		

#### 나. 아미노산 서열 분석

이차원 전기영동 후 PVDF membrane으로 electroblotting하여 옮긴 후 Fig. 2에서와 같이 Coomassie blue staining 하였다. 그 다음 Fig. 3에서와 같이 증감된 spot을 오려서 Edman degradation법으로 autosequencing하여 그 결과를 각각 얻었는데, #1의 아미노산 서열을 데이터베이스에서 검색한 결과 myoglobin으로 밝혀졌고, #4는 N-terminal blocking되어 있었다. 전기영동의 분리 특성상 50% 이상의 단백질의 N-terminal이 blocking 되어 있을 수 있으므로 다음의 정확한 pI값과 분자량 측정으로 단백질을 동정하고자 하였다.





#### 다. 단백질의 분자량 측정

이차원 전기영동에서 분리된 단백질의 분자량을 측정하기 위하여 일단 24개월령에 가장 많이 발견되는 단백질인 myoglobin을 대상으로 Mass Spectrometry의 조건을 잡고 난 후 gel에서의 extraction을 통하여 그 단백질의 분자량을 측정하였다. Fig. 4의 Mass Spectrum에서 볼 수 있듯이 형태를 갖춘 Ion Set이 가지는 이온화수의 값을 그것의 m/z 값과 곱해서 16,951 Da이라는 분자량을 얻을 수 있었다. Table 2에서는 IPGs 이차원 전기영동의 정확한 pI값과 Mass Spectrometry의 분자량을 기준으로 증감된 단백질을 추정하여 다음의 아미노산 서열 정보를 얻었다.

##### 1) Apolipoprotein A-1, Cation-dependent: Lactadherin

MKAVLTLAV LFLTGSQARH FWQDDPQSS WDRVKDFATV YVEAIKDSGR DYVAQFEASA  
LGKQLNLKLL DNWDTLASTL SKVREQLGPV TQEFWDNLEK ETASLRQEMH KDLEEVKQKV  
QPYLDEFQKK WHEEVEIYRQ KVAPLGEEFR EGARQKVQEL QDKLSPLAQE LRDRARAHVE  
TLRQQLAPYS DDLRQLTAR LEALKEGGGS LAEYHAKASE QLKALGEKAK PVLEDLRQGL  
LPVLESLKVS ILAAIDEASK KLNAQ

##### 2) Mannose-6-phosphate Receptor

MMSPLHSSWR TGLLLLLLFS VAVRESWQTE EKTCDLVGEK GKESEKELAL LKRLTPLFNK  
SFESTVGGSP DMYSYVFRVC REAGNHSSGA GLVQINKSNG KETVVGRFNE TQIFNGSNWI  
MLIYKGGDEY DNHCGRQRR AVVMISCNRH TLADNFPVS EERGKVQDCF YLFEMDSSLA  
CSPEISHLSV GSILLVTLAS LVAVYIIGGF LYQRLVVGAK GMEQFPHLAF WQDLGNLVAD  
GCDFVCRSKP RNVPAAYRGV GDDQLGEESE ERDDHLLPM

##### 3) Dihydrodiol Dehydrogenase 3

MDPKGQRVKL NDGHFIPVLG FGTFAPREVP KSEALEVTKF AIEAGFRHID SAHLYQNEEQ  
VGQAIRSKIA DGTVKREDIF YTSKLWSTSL RPELVRPALE KSLNNLQLDY VDLYIIHFPV  
ALKPGETLFP TDENGKPIFD SVDLCRTWEA LEKCKDAGLT KSIGVSNFNH KQLEKILNKP  
GLKYKPCVNCQ VECHPYFNQS KLLDFCKSHD IVLVAYGALG SQRLKEWVNP NLPFLLEDPV  
LSAIAKKHRQ TPALVALRYQ IQRGVVVLAK SYNKKRIKEN IQVDFDELTP EDMKAIDGLN  
SNMRYNELLL GVGHPPEYFV EEY

#### 4) Proteoglycan Link Protein

MKSLLLLVI SFCWADHSD NYTVDHDRVI HIQAENGPRL LVEAEQAKVF SRRGGNVTLP  
CKFYRDPTAF GSGTHKIRIK WTKLTS DYLK EVDV FVSMGY HKKTYGGYHG RVFLKGGSDN  
DASLVITDLT LEDYGRYKCE VIEGLEDDTA VVALDLQGVV FPFYFRLGRY NLNFHEAQQA  
CLDQDAVIAS FDQLYDAWRS GLDWCNAGWL SDGSVQYPIT KPREPCGGQN TVPGVRNYGF  
WDKDKSRYDV FCFTSNFNGR FYYLIHPTKL TYDEAVQACL NDGAQIAKVG QIFAANKLLG  
YDRCDAGWLA DGSVRYPI SR PRRRCSPSEA AVRFVGFDPK KHKLYGVYCF RAYN

#### 5) Beta Crystallin S

SKAGTKITFF EDKNFQGRHY DSDCDCADFH MYL SRCNSIR VEGGTWAVYE RPNFAGYMYI  
LPRGEYPEYQ HWMGLNDRLS SCRAVHLSSG GQYK LQIFEK GDFNGQM HET TEDCPSIMEQ  
FHMREVHSCK VLEGAWIFYE LPNYRGRQYL LDKKEYRKPV DWGAASPAVQ SFRRIVE

#### 6) Acetylcholine Receptor Protein, Alpha Chain

MEPRPLLLLL GLCSAGLVLG SEHETRLVAK LFEDYNSVVR PVEDHRQAVE VTVGLQLIQL  
INVDEVNQIV TTNVRLKQQW VDYNLKWNPD DYGGVKKIHI PSEKIWRPDL VLYNNADGDF  
AIVKFTKVLL DYTGHITWTP PAIFKSYCEI IVTHFPFDEQ NCSMKLGTWT YDGSVVVINP  
ESDQPDLSNF MESGEWVIKE SRGWKHVVFY ACCPSTPYLD ITYHFVMQRL PLYFIVNVII  
PCLLFSFLTG LVFYLPTDSG EKMLTSLISVL LSLTVFLLVI VELIPSTSSA VPLIGKMYLF  
TMVFVIASII ITVIVINTHH RSPSTHVMP E WVRKV FIDTI PNIMFFSTMK RPSREKQDKK  
IFTEDIDISD ISGKPGPPPM GFHSPLIKHP EVKSAIEGIK YIAETMKS DQ ESNNAAEWVK  
YVAMVMDHIL LAVFMLVCII GTLAVFAGRL IELNQQG

#### 7) Cytosol Aminopeptidase

TKGLVLGIYS KEKEEDEPQF TSAGENFNKL VSGKLR EILN ISGPSLKAGK TRTFYGLHED  
FPSVVVVLG KKTAGIDEQE NWHEGKENIR AAVAAGCRQI QDLEIPSVEV DPCGDAQAAA  
EGAVLGLYEY DDLKQKRKV VSAKLHGSED QEAWQRGVLF ASGQNLARRL METPANEMTP  
TKFAEIVEEN LKSASIKTDV FIRPKSWIEE QEMGSFLSVA KGSEEPVFL EIHYKGS PNA  
SEPPLVFGK GITFDGGIS IKAAANMDLM RADMGGAATI CSAIVSAAKL DLPINIVGLA  
PLCENMPGK ANKPGDVVRA RKGKTIQVDN TDAEGR LILA DALCYAHTFN PKVIINAATL  
TGAMDIALGS GATGVFTNSS WLWNKLF EAS IETGDRVWRM PLFEHYTRQV IDCQLADVNN

IGKYRSAGAC TAAAFLLKEFV THPKWAHLDI AGVMTNKDEV PYLRKGMAGR PTRTLIEFLF  
RFSQDSA

### 8) Macrophage Scavenger Receptor I and II

MAQWDDFPDQ QEDTDSCTES VKFDARSVTA LLPPHPKNGP TLQERMKSYK TALITLYLIV  
FVVLVPIIGI VAAQLLKWET KNCTVGSVNA DISPSPEGKG NGSEDEMFR EAVMERMSNM  
ESRIQYLSDN EANLLDAKNF QNFSITTDQR FNDVLFQLNS LLSSIQEHEN IIGDISKSLV  
GLNTTVLDLQ FSIETLNGRV QENAFKQEE MRKLEERIYN ASAEIKSLDE KQVYLEQEIK  
GEMKLLNNIT NDLRLKDWEH SQTLKNITLL QGPPGPPGK GDRGPPGQNG IPGFPLIGT  
PGLKGDGRGIS GLPGVRGFPG PMGKTGKPL NGQKGQKGEK GSGSMQRQSN TVRLVGGSGP  
HEGRVEIFHE GQWGTVCDDR WELRGGLVVC RSLGYKGVQS VHKRAYFGKG TGPIWLNEVF  
CFGKESSIEE CRIRQWGVRA CSHDEDAGVT CTT

### 9) Mitochondrial Elongation Factor TS

MSLLRSLRLC LVARTGSCPL SALGPGPLLP SLQAGLPLLQ SPQQWHTFHS GSWLSSASSK  
ELLMKLRRT GYSFINCKKA LETCGDLKQ AESWLHKQAQ KEGWSKAARL HGRKTKEGLI  
GLLQEGDTTV LVEVNCETDF VSRNLKFQQL VQQVALGTL HCQNLKDQLS TYSKGFLNSS  
ELSELPAGPE REGSLKDQLA LAIGKLGEM ILKRAAWKV PAGFYVGSYV HGAMHSPSLH  
NLVLGKYGAL VICETSELKA NLADLGRRLG QHVVGMAPLS VGSLDDEPGG EAETKMLSQP  
YLLDPSITLG QYVQPHGVS VDFVRFECGE GEDAADAE

### 10) Palmitoyl-Protein Thioesterase

MASSSCLWLL ALAFLLGSCA SLALGHLDPP APLPLVIWHG MGDSCCNPLS MGAIKKMVEK  
KIPGIHVLSL EIGKTLREDV ENSFFLVNS QVTTVCQILA KDPKLQGGYN AMGFSQGGQF  
LRAVAQRCPSPPMVNLISVG GQHQGVFGLP RCPGESSHIC DFIRKTLNAG AYNKAIQERL  
VQAEYWHDP IREDIYRNHSI FLADINQERG VNESYKKNLM ALKKFVMVKF LNDTIVDPVD  
SEWFGFYRSG QAKETIPLQE STLYTQDRLG LKAMDKAGQL VFLALEGDHL QLSEEWFYAH  
IIPFLE

### 11) Lactadherin

MPCPRLLAAL FCSSGLFAAS GDFCDSSLCL HGGTCLLNED RTPPFYCLCP EGFTGLLCNE  
TEHGPCFPNP CHNDAECQVT DDSHRGDVFI QYICKCPLGY VGIHCETTCT SPLGMQTGAI

ADSQISASSM HLGFMGLQRW APELARLHQT GIVNAWTSNG YDKNPWIVQN LMRKMWVTGV  
 VTQGASRAGS AEYLKTFKVA YSTDGRQFQF IQVAGRSGDK IFIGNVNNSG LKINLFDTPL  
 ETQYVRLVPI ICHRGCTLRF ELLGCELNGC TEPLGLKDNT IPNKQITASS YYKTWGLSAF  
 SWFPYYARLD NQGKFNWTA QTNSASEWLQ IDLGSQKRVT GIITQGARDF GHIQYVAAYR  
 VAYGDDGVTW TEYKDPGASE SKIFPGNMDN NSHKKNIFET PFQARFVRIQ PVAWHNRITL  
 RVELLGC

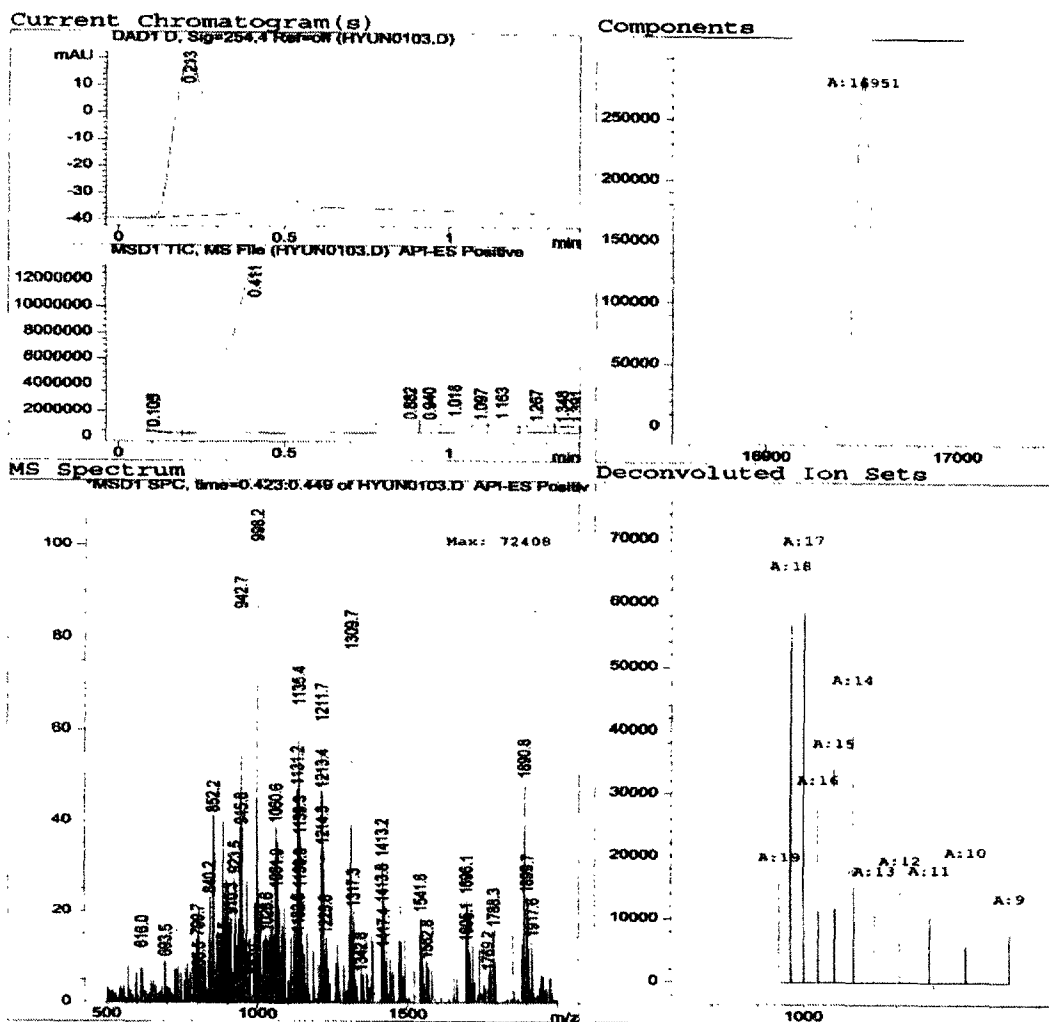


Figure 4. Mass spectrum and ion set of myoglobin using Hewlett Packard ESI Mass Spectrometry.

Table 2. Identifying Loin proteins using pI value and mass analysis.

	Protein ID	pI	MW(kDa)	Precipitated with (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Subjected Proteins
Increased	A	5.3	28	50%	1) Apolipoprotein A-1, Cation-dependent[prec.] 2) Mannose-6-phosphate Receptor[prec.]
	B	7.6	38	50%	3) Dihydrodiol Dehydrogenase 3 4) Proteoglycan Link Protein[prec.]
	C	6.3	21	>50%	5) Beta Crystallin S
Decreased	D	5.7	50	50%	6) Acetylcholine Receptor Protein, $\alpha$ Chain[prec.] 7) Cytosol Aminopeptidase 8) Macrophage Scavenger Receptor I and II
	E	6.2	31	>50%	9) Mitochondrial Elongation Factor TS[prec.] 10) Palmitoyl-Protein Thioesterase[prec.]
	F	6.7	47	>50%	11) Lactadherin[prec.]

#### 라. 단백질 데이터베이스 검색

알아낸 단백질 분자량과 pI 값으로 일단 ExPASy의 TagIdent (<http://www.expasy.ch/tools/tagident.html>)에서 단백질 종류를 알아내고, 그 정보로 PROWL (<http://prowl1.rockefeller.edu/prowl/proteininfo.html>)에서 각각의 아미노산 서열등의 세부정보를 알아보았다. 만약 밝혀지지 않은 경우에는 그 peptide를 microsequencing해서 그 정보로서 단백질 identification하는 유전자 연구의 새로운 방향의 기초를 설립하였다.

이상에서 이차원 전기영동으로 개월 별 한우 등심을 분리하여 그 양적 질적 변화의 분석으로 증감되는 단백질을 catalogue화하였다. 증감된 성장 특이 단백질 중 microsequencing이 가능한 단백질들의 아미노산 서열을 분석하였으나 myoglobin을 제외한 나머지 단백질들은 이차원 전기영동의 물리 화학적 특성상 N-terminal blocking이 되어 있는 것으로 나타나서 본 연구에서는 IPGs의 도입과 Mass spectrometry의 분자량 측정으로 성장 특이 단백질을 동정하고자 국내에서는 아직 정립되어 있지 않은 이차원 전기영동 후의 단백질의 ESI Mass Spectrometry 분석을 위한 조건을 확립하였다.

Trypsin등의 효소를 사용한 단백질의 Peptide Mapping 및 Tandem Mass Spectrometry의 sequencing의 기술력 도입으로 한우 성장단계별 특이 단백질의 proteome map을 작성할 수 있고 나아가서 이 map을 이용하여 성장단계별, 기능성, 지방축적, 등의 경제형질과 연관된 단백질들을 쉽게 찾을 수 있게된다. 본 연구를 통하여 얻은 기초 data를 계속 확대 발전시켜 한우의 proteosome map을 완성할 경우 한우특이 유전자의 선발은 물론, 소의 유전자 기능 (functional genomics)을 이해할 수 있는 database로도 활용할 수 있게 된다.

## 적 요

한우 성장단계별 특이발현 유전자를 조사하기 위하여 간 조직과 근육조직으로부터 subtractive cDNA library를 제작, screening 하였다.

근육조직으로부터 제작된 cDNA library에서 총 132개의 clone이 선발되어 분석되어졌다. 이중 4개의 cDNA clone을 성장단계 특이발현 후보유전자로 선정하였고, Northern blot과 semiquantitative RT-PCR을 하여 발현 양상을 분석하였다. Bovine ADRP 유전자가 24개월령에 급격히 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다. 한우 ADRP 유전자의 기능과 구조 분석을 위하여 genomic DNA를 클로닝하여 분석하였다.

2종류의 다형성을 direct sequencing과 PCR-SSCP 방법에 의해 관찰하였다. 한우 ADRP 유전자의 exon 8번영역에서 염기의 치환 및 삽입이 관찰되었다. 염기의 치환은 mRNA 1273번에서 A가 T로 바뀌었으며, 삽입은 mRNA 1275번 위치에 T가 추가로 삽입된 것이었다.

간 조직에서는 성장하는 동안 발현이 억제되는 유전자는 없었으며, 미지의 유전자 17종을 포함하여 77개의 유전자가 성장함에 따라 발현이 증가함을 확인하였다. 40종의 유전자가 24개월령까지 지속적으로 발현이 증가하였고, 37종은 6개월령까지 급속히 증가한 다음 그 이후부터는 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. 5'-nontranslating region을 포함하는 14종의 clone에 대한 전체유전자 클로닝을 시도하였으며, 5종의 유전자가 선정되었으며, 3종류 유전자(retinol binding protein, cytochrom P450, aralkyl acylCoA: amino acid N-acyltransferase)의 promoter 영역을 subcloning하여 분석 중에 있다.

한우 성장단계에 따른 등심조직 단백질을 2-D 전기영동하여 비교하여 단백질 profile을 만들었다. 0, 6, 12, 24개월령된 한우의 등심 단백질은 먼저 16cm tube gel 등전점 전기영동 또는 IPG (Immobilized pH gradient) 전기영동법으로 분리하였고, 이후 12 % polyacrylamide gel (18 × 20cm) 전기영동에 의해 분리하였다. pI 값이 3.0 ~ 12.0 범위를 갖는 단백질들과 분자량이 15 ~ 100 kDa 의 단백질들은 silver 염색에 의하여 깨끗하게 관찰이 되어졌다. 한우가 성장하는 동안 등심조직에서 특이하게 증가하거나 감소하는 단백질들은 대부분이 분자량이 작은 것들이었다. 증가되는 단백질들을 분리하기 위해 수용성 단백질들은 Triton X-100을 사용하여 조직으로부터 추출한 후, 30%와 50% ammonium sulfate을 이용 분획하였다. 각각의 단백질들에 대한 추출조건들을 결정할 수 있었다. 분리된 대부분의 단백질들은 N-terminal이 block 되어있어, 정확한 분자량은 mass spectrometry를 이용하여 분석하였고 이를 위한 알맞은 조건을 확립하였다.

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

### 제 1 절 연구개발 목표 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도 (%)
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 성장 단계별 각 조직의 cDNA library 구축                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Subtractive library</li> <li>- 성장단계 : 12, 24개월령</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한우 24개월령 간 및 등심 조직 특이 발현 유전자의 클로닝을 위하여 12개월령과 24개월령의 subtraction library 구축 및 생시, 6개월령과 24개월령 subtraction library 구축</li> </ul>	100
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 성장 단계에 따른 근육내의 단백질 발현 양상조사</li> <li>○ 우육조직단백질의 체계적 정제 분리 방법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2-D gel electrophoresis를 이용한 각 성장 단계별 우육단백질의 카탈로그화</li> <li>○ 성장단계별로 특이하게 발현되는 단백질의 분리정제를 위한 조건확립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2D-gel eletrophoresis 실험조건 확립</li> <li>-반복성을 높이기 위한 sample preparation 방법의 개발</li> </ul> </li> </ul>	100
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 성장 단계별 특이 발현 유전자의 구조 분석                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- cDNA cloning 및 염기서열 분석</li> </ul> </li> <li>○ 성장단계별 특이 발현 유전자의 카탈로그화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 각 조직에서 성장 단계에 따라 점차로 발현이 증가하는 cDNA clone 34종 82개(간 조직) 및 196개(근육조직)의 clone들을 분리하여 염기 서열을 분석함</li> <li>○ 성장 단계에 따라 발현이 증가하는 cDNA clone을 동정하여 유사성 분석 및 기능별 분류를 실시하여 카탈로그화 함</li> </ul>	100
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 성장단계 특이적 순수단백질 분리</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 2-D gel 전기영동 방법과 image analysis로 성장단계별 특이 발현하는 단백질들의 분자량과 pi 값에 의한 단백질들의 catalog화와 이들 단백질을 PVDF에 전기적으로 옮겨주는 방법을 통해 순수 분리함.</li> </ul>	100
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 성장 특이 단백질의 아미노산 확보 및 서열 결정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ micorsequencing과 SWISS-PROT을 통해 그 기능이 이미 알려진 단백질들의 아미노산 서열의 비교 분석</li> <li>○ Mass Spectrometry와 Immobilized pH gradient(IPG)-IEF를 사용하여 24개월령 발현에 차이를 보이는 11종의 단백질 분리 확보</li> </ul>	100



번호	세부연구목표	달성내용	달성도 (%)
6	○ 성장단계별 특이 유전자의 발현 분석 및 단백질의 활용	○ 근육조직에서 동정된 cDNA clones 유전자중 유용하다고 생각되는 유전자들을 선발하여 발현 양상을 Northern blot analysis 및 RT-PCR에 의해 확인함 ○ 간 조직에서 slot blot 및 Northern blot 분석에 의해 24개월령까지 점차 발현양상이 증가하는 33종의 유전자 확인 ○ 육미와 관련성 있는 단백질의 선발과 한우와 외래종 소의 유전자 다형성 확인	100
7	○ 특이발현유전자의 genome 구조 분석	○ 근육조직에서 특이 발현 유전자의 genomic DNA cloning 및 유전자 다형성 분석 - 한우 Genomic DNA library 구축 및 phage DNA 확보 - genomic DNA염기 서열 결정 및 다형성 검출 ○ 간조직 발현양상에 특이성을 보이는 유전자 14종을 선발하여 genomic library에서 promoter region cloning 및 염기서열 결정	100

## 제 2 절 관련분야의 기술발전의 기여도

한우는 우리 나라 고유의 재래가축인 동시에 단백질 공급원으로서 사회문화적, 학문적, 경제적 가치가 매우 큰 유전자원이다. 한우는 다른 육우에 비해 체구가 적은 편으로 공급물량면에서는 불리한 점이 많으나, 우리 입맛에 맞고 비육산업의 활성화를 위해서는 고급육 생산을 위한 육질개량이 우선되어야 된다고 사료되어, 한우의 유전적, 생리적 배경을 밝혀 내어 유전자 수준에서의 육질 향상을 도모하고자 과제가 수행되었다. 이에 한우의 24개월령 특이 유전자등을 확보하여 한우가 유전자원으로서, 비육산업과 축산업의 기둥으로서 활용가치를 높이는데 본 연구결과의 활용가치는 매우 높을 것으로 기대된다.

한우 성장단계 및 조직별 여러 subtraction library를 구축하여, 24개월령 특이발현유전자

및 단백질들을 확보하였고, 한우 고기의 육질에 영향을 미치는 요인을 분자생물학적 접근 방법으로 해결하고자 과제를 수행하였고, 기대 만큼 활용가능성이 있는 유전자 및 단백질을 발견함과, 아직 기능 및 구조가 알려져 있지 않은 유전자등을 확보하므로써 새로운 연구과제의 출발, 한우 개량 및 비육우 산업에 이바지할 것으로 추정된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

분리 확보된 특이 발현 유전자들의 구조 분석과 경제형질과의 관련성 연구를 통해 새로운 분자유종기술의 개발과 고부가가치를 지니는 축산물 생산에 응용할 수 있고, 특이 발현 유전자 및 단백질의 발현조절기작 해명에 의해 고급육형 한우의 생산성 향상 및 한우의 우수성을 과학적으로 증명, 홍보하는데 활용하여 새로운 수요 창출을 기대하며, 우리 고유 유전자원의 특성구명에 의한 산업재산권 확보 등을 추진해 나갈 것이다.

기술적 측면에서 Immobilized pH Gradient IEF를 통해 고정화된 규칙적 일차적 IEF를 할 수 있게 되었고, 자연 상태 단백질의 50%정도가 N-terminal blocking되어 있는 단백질을 Mass Spectrometry를 통해 단백질의 정확한 분자량을 알아내고 데이터베이스를 통해 동정할 수 있게 되었다. 또한 앞으로 cDNA micro array 기술의 도입을 통하여 성장에 중요한 유전자, 육질에 중요한 유전자 등을 빠르게 밝힐 수 있으므로 한우의 개량이 함충 용이하게 되며, 진단시약 개발에도 활용할 수 있을 것이다.

## 제 6 장 참 고 문 헌

- Brasaemle D.L., T. Barber, N.E. Wolins, G. Serrero, E.J. Blanchette-Mackie, and C. Londos (1997) Adipose differentiation-related is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38(11):2249-63.
- Cynthia M. SMAS and Hei Sook SUL (1995) Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 309:697-710
- Eisinger D.P., and G. Serrero (1993) Structure of the gene encoding mouse adipose differentiation-related protein(ADRP). *Genomics* 16(3):638-44.
- Francine M. Gregoire, Cynthia M. SMAS and Hei Sook SUL (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews* 1998 78(3): 783-809
- Gao J, and Serrero G (1999) Adipose differentiation related (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 274(24):16825-30.
- Greenberg A.S., J.J. Egan, S.A. Wek, M.C. Jr. Moos, C. Londos, A.R. Kimmel (1993) Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(24):12035-9
- Heid H.W., M. Achnolzer, and T.W. Keenan (1996) Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem. J.* 320:1025-30.
- Hochstrasser DF, Harrington MG, Hochstrasser AC, Miller MJ, Miller CR (1998) Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173, 424-435.
- Jiang H.P., and G. Serrero (1992) Isolation and characterization of a full cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(17):7856-60.
- Londos C, D.L. Brasaemle, C.J. Schultz, J.P. Segrest and A.R. Kimmel (1999) Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 10(1): 51-8
- McLafferty FW, Kelleher NL, Begley TP, Fridriksson EK, Zubarev RA, Horn DM (1998) Two-dimensional mass spectrometry of biomolecules at the subfemtomole level. *Current*

Opinion in Chemical Biology 2:571-578.

Merril CR, Goldman D, van Keuren ML (1984) Gel protein stain: silver stain. *Methods Enzymol.* 104, 441-449.

Moore KK, Ekeren PA, Lunt DK, Lunt SB (1991) Relationship between fatty acid-binding protein activity and marbling scores in bovine longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 69, 1515-1521.

Nishiu J, T. Tanaka, Y. Nakamura (1998) Isolation and chromosomal mapping of the human homolog of perilipin (PLIN), a rat adipose tissue-specific gene, by differential display method. *Genomics* 48(2): 254-7.

Ou K, Wilkins MR, Jan JX, Gooley AA, Fung Y, Scheumack D, Williams KL (1996) Improved high performance liquid chromatography of amino acids derivatized with 9-fluorenylmethyl chlorofomate. *J. Chromatogr. A* 723, 219-225.

Steiner S, D. Wahl, B.L. Mangold, R. Robison, J. Raymackers, L. Meheus, N.L. Anderson, A. Cordier (1996) Induction of the adipose differentiation-related protein in liver of etomoxir-treated rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Jan 26;218(3):777-82

Thiede B, Otto A, Zimny-Arndt U, Muller EC, Jungblut P (1996) Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* 17, 588-599.

To Yuen Hui and David A. Bernlohr (1997) Fatty acid transporters in animal cell. *Frontiers in Bioscience* 2 : 222-231

Wilson CM (1983) Staining of proteins on gels: comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* 91, 236-247.

Yan JX, Wilkins MR, Ou K, Gooley AA, Williams KL, Sanchez JC, Golaz O, Pasquali C, Hochstrasser DF (1996) Large scale amino acid analysis for proteome studies. *J. Chromtogr. A* 736, 291-302.

Ye H, G. Serrero (1998) Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes. *Biochem J* 330 ( Pt 2): 803-9.