

Estrogen Receptor- α 유전자 5' 영역의 Single Nucleotide Polymorphism의 탐색과 한우와 Holstein에서 번식능력 및 산유능력과의 관계

염규태¹ · 전향아¹ · 박해금¹ · 김영신¹ · 김현¹ · 김재환¹ · 성환후¹ · 조영무¹ · 조재현² · 고응규^{1,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²경상대학교 수의과대학

Single Nucleotide Polymorphism Exploring the 5'-Regions of Estrogen Receptor- α Gene and Association With Reproduction Performance and Milk Yield in Hanwoo and Holstein Dairy Cattle

Gyu-Tae Yeom¹, Hyang-A Jeon¹, Hae-Geum Park¹, Young Sin Kim¹, Hyun Kim¹, Jae Hwan Kim¹, Hwan-Hoo Seong¹, Young Moo Cho¹, Jae-Hyeon Cho² and Yeoung-Gyu Ko^{1,†}

¹Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Republic of Korea

²Institute of Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

This study was conducted for SNPs in the 5'-regions of estrogen receptor- α (ESR- α), and association with calving interval (CI), service per conception (SPC) and 305 days milk yield in Hanwoo and Holstein dairy cattle. The genetic improvement was incurred low reproduction performance. The objective of this study was to investigate connections between single nucleotide polymorphisms (SNP) of Estrogen receptor- α (ESR- α) with reproduction performance (calving interval, service per conception, and 305 d milk yield) in Hanwoo and Holstein dairy cattle. Hanwoo and Holstein blood samples were collected from 183 and 124 dam of breeding farms and DNA was extracted. Primer design was based on NCBI GenBank (Accession No. AY340579). The PCR-RFLP method with *Bgl* I was used to genotype the cattle. The result showed two variants of the ESR- α gene. The *Bgl* I cut the 492 bp amplification product into 322 bp and 170 bp fragments for allele G, while allele A remained uncut, resulting in two restriction fragments for homozygote G/G and three fragments for heterozygote A/G. We found two of different genotypes in these breeds, A/G and G/G. In Hanwoo, the A/G genotype frequency was 0.13, and G/G was 0.87. The CI of A/G was 382.18 \pm 10.03 days, and G/G was 381.69 \pm 5.22 days. The SPC of A/G was 1.62 \pm 0.16, and G/G was 1.32 \pm 0.04. While CI showed no significance difference, SPC exhibited significant difference ($p < 0.05$). In Holstein cattle, the frequency of genotype A/G was 0.02 and G/G was 0.98. The 305 days milk yield of A/G was 7,253.00 \pm 936.00 kg and of G/G was 8,747.51 \pm 204.88 kg, showing no significant difference.

(Key words : Estrogen receptor- α , Single nucleotide polymorphism, Reproduction performance, Genotype)

서 론

지난 수십 년간 개량 및 육종이 진행됨에 따라 1980년에 비해 한우의 체중은 약 1.5배 증가하였고, 젖소에서 산유량은 약 2배 증가하였다. 또한, 한우의 번식능력인 분만간격, 수태 당 인공수정 횟수 등 번식률 향상에 목표를

두고 연구가 진행되어 왔으며(Han 등, 1989), 한우의 번식에 영향을 미치는 요인(산차, 계절, BCS, 호르몬, BUN 등)에 관한 연구도 수행되었다(Han 등, 1989; Baek 등, 1998; Yang 등, 1999; Kim 등, 2002; Jung 등, 2004; Choi 등, 2006; Choe 등, 2008; Choe 등, 2008; Kim 등 2009). 또한, 젖소에서 분만간격은 젖소의 경제형질인 산유량과 직접적으로 연관되어 있으며, 번식능력을 평가할 수 있는

* This work was carried out with the support from the Agenda Program (No. PJ008632), Rural Development Administration, Republic of Korea.

† Corresponding author : Phone: +82-63-620-3535, E-mail: kog4556@korea.kr

요소로 알려져 있다(Rege와 Famula, 1993). 하지만 개량 및 육종이 진행됨에 따라 중요한 번식능력인 수태율에 저하가 나타나는 등(Royal 등, 2000; Dobson 등, 2007; Dobson 등, 2008) 악영향이 따르고 있다. 축산업의 가장 큰 목적은 가축의 고품질화, 생산성 증가를 통해 경제성을 높이는 것이다. 현재 우리나라의 가축 선발 체계는 능력검정 및 후대검정을 이용하기 때문에 비용이 많이 들고, 시간이 오래 걸린다. 이러한 방법으로는 선발강도 및 선발의 정확도를 높이는 데 한계가 있다고 생각된다. 최근에는 DNA를 분석해 각 개체별 차이를 예측하고 선발하기 위해, SNP(Single Nucleotide Polymorphism)를 이용하고 있다. SNP는 염기서열 중 하나의 염기변이를 뜻하는데, 이러한 SNP는 사람과 동물에서 약 300만개 이상이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 세계적으로 SNP 검색을 통해 각 개체의 유전능력과 관계를 분석하고 있다. Falaki 등(1996)은 Italian Holstein-Friesian Bull 중에서 Growth hormone, Growth hormone receptor 유전자의 SNP가 산유능력 및 특성에 영향을, Driver 등(2009)은 Progesterone receptor 유전자의 SNP는 Holstein 착유우에서 번식 특성에 영향을 미친다고 하였다. 따라서 본 연구는 자성호르몬인 Estrogen의 수용체 유전자에서 SNP를 검색하고, 그에 따라 번식능력 및 산유능력에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

공시축

실험에 사용된 가축은 국내 육종 및 개량 농가 중 번식기록 및 착유기록이 양호한 전북 남원, 강원 평창, 경북 예천의 한우와 전북 고창의 Holstein 착유우를 대상으로, 0~7산의 다양한 연령대 개체를 선발하여 한우 183두, Holstein중 착유우 124두를 실험에 공시하였다.

채혈 및 DNA 추출

소를 보정한 후 경정맥에서 혈액 10~20 mL를 채혈해 Heparin 처리가 된 Vacutainer에 보관하였다. 농가에서 채혈한 혈액을 4°C에서 Over night한 후, 3,000 rpm으로 900초간 원심분리 후 백혈구 층만 피펫으로 분리하였다. 분리한 백혈구 층은 MagExtractor®-Genome(TOYOBO, Japan)을 이용해 DNA를 추출한 후 4°C에서 냉장 보관하였다.

PCR 반응

Primer는 NCBI GenBank에 등록된 Bovine estrogen

receptor alpha gene(GenBank accession no. AAFC030-55827)를 기초로 설계하여 AccuPower™ Negative dye PCR PreMix(Bioneer, USA)을 이용해 PCR을 실시하였다. PCR 반응을 위한 Primer는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 GeneAmp® PCR system9700(AppliedBiosystems, USA)를 이용해 실시하였으며, PCR 반응 조건은 Pre-denature 95°C 5분 1 cycle, Denature 95°C 30초, Annealing 58°C 30초, Extension 72°C 30초 37cycle, Final-extension은 72°C 5분으로 설정해 PCR을 실시하였다.

제한효소 처리 및 전기영동

492 bp의 PCR 증폭산물을 Bgl I(TAKARA Bio Inc., Japan)으로 처리하였다. 제한효소 반응액은 Bgl I 1 µL, 10x Buffer 2 µL, D.W. 7 µL, PCR product 10 µL를 포함해 총 20 µL로, 37°C에서 5시간 반응하였다. 제한효소 처리가 끝난 후, 1.5% Agarose gel을 이용해 100 v, 400 mA에서 40분간 전기영동을 실시하였다.

DNA Sequencing

전기영동 결과에서 다르게 나온 개체들의 염기서열을 확인하기 위해 PCR Purification kit(QiaGen, USA)를 이용하여 PCR product를 정제한 후, ABI 3130xl(Applied Biosystems, USA)를 이용해 염기서열에 관한 data를 얻고, SeqManII(DNAstar, ver. 5.06, 2003)으로 분석하였다.

분만간격 및 305일 유량

한우의 분만간격 및 수태 당 인공수정 횟수는 농협 한우종합관리 site (https://chuksan.nonghyup.com/main/subetc_login_management.html)에서, Holstein의 305일 유량은 농협중앙회 젖소개량사업소 site (http://rd.dic.co.kr/inquiry/inquiry_0102.tjsp)의 database를 토대로 조사하였다.

통계분석

실험 결과의 통계분석은 SAS Program(SAS ver. 9.2, 2008)으로 Duncan's multiple range-test를 이용해 5%의 범위 내에서 분산분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

PCR Product의 Bgl I 제한효소 처리 및 Sequencing 결과

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 혈액으로부터 추출한 DNA로 PCR을 실시한 후 Bgl I 제한효소를 처리한 후, UV 램프 아래에서 확인한 결과이다. PCR 반응결과, 495 bp의 밴드가 확인되었고, Bgl I 효소처리 후 495 bp, 322

Table 1. Primers used for exploring of ESR- α gene SNP

	Sequencing (5'-3')	Amplification product size
Forward primer	GGT TAA CGA GGT GGA GGA AT	492 bp
Reverse primer	CTC CTT ACT CTC CAC TGC CA	

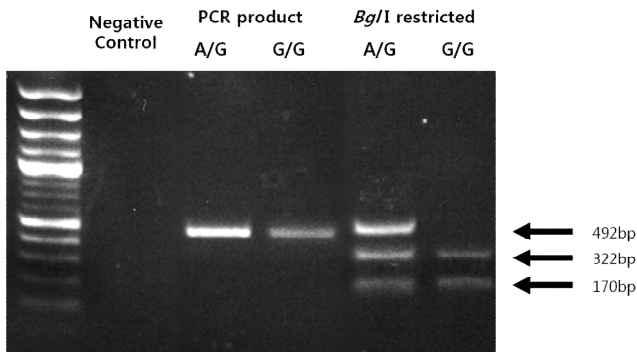


Fig. 1. Results of electrophoresis after enzyme restricted.

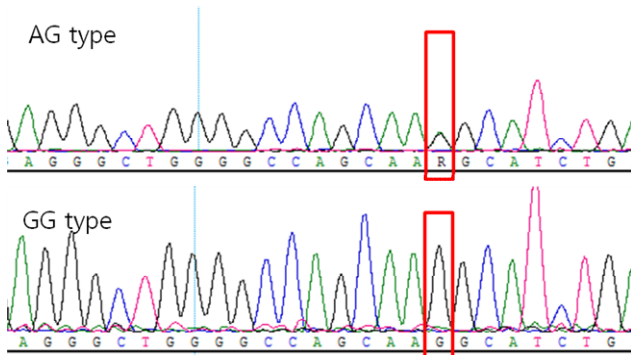


Fig. 2. Results of DNA sequencing in SeqManII.

bp, 170 bp의 3 밴드가 나타난 A/G형과 322 bp, 170 bp의 2 밴드가 나타난 G/G형이 확인되었다. Fig. 2는 PCR 산물의 sequencing 결과이다. A/G형으로 나타난 유전자는 sequencing을 실시하여 확인한 결과 heterozygote로 보인다.

유전자 빈도

제한효소 처리와 함께 Sequencing으로 유전자형을 확인한 결과, 나타난 유전자 빈도는 Table 2와 같다. 한우의 A/G형은 0.13, G/G형은 0.87으로 나타났고, Holstein 중의 A/G형은 0.02, G/G형은 0.98로 나타났다. Szreder와 Zwi-erzchowski(2004)는 소의 품종에 따라 A/G형은 0.00~0.36, G/G형은 0.64~1.00의 빈도를 보인다고 보고하였다. 한우의 경우, 남원, 평창, 예천의 여러 지역에서 시료를 채취하였고, Holstein의 경우, 고창 한 지역에서만 시료 채취를 하여 유전자 빈도에 품종 및 지역적 차이가 있는 것으로 보여, 좀 더 다양한 지역을 대상으로 시료 분석

Table 2. The frequency of SNP in estrogen receptor- α gene

Species	No. of cattle	Genotype frequency of A/G	Genotype frequency of G/G
Hanwoo	183	0.13	0.87
Holstein	124	0.02	0.98

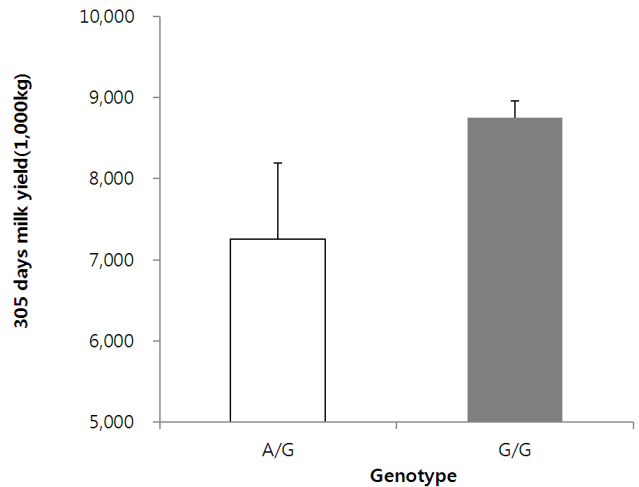


Fig. 3. Calving interval in Hanwoo different genotype.

수를 확대할 필요가 있을 것으로 생각된다.

분만간격 및 305일 유량

본 실험에서 sampling한 한우 183두와 Holstein 124두 중 번식장애 및 저수태를 보이는 개체를 제외한 한우 163두, 착유 기록이 없는 개체를 제외한 Holstein 83두의 번식기록 및 산유능력을 조사한 결과이다. 한우의 분만간격과 수태 당 인공수정 횟수는 농협 한우종합관리 site의 database를 토대로 조사하였다. 분만간격의 경우, A/G형에서 382.18 ± 10.03 일, G/G형에서 385.36 ± 3.74 일로 나타났으며, Han 등(1987)이 보고한 383.46일, Kim 등(1993)의 388.55일과 비슷한 경향을 보였다. 또한, Han 등(2002)의 355.9일, Beak 등(1998)의 375.3일보다는 느리고, 농협중앙회 한우개량농가육성 사업보고서(2008)의 408.4일보다는 빠르게 나타났으나, 유의적 차이는 확인할 수 없었다. Fig. 4는 SNP에 따른 수태 당 인공수정 횟수를 나타낸 그래프이다. A/G형에서는 1.62 ± 0.16 회, G/G형에서는 1.31 ± 0.04 회로 나타나, $p < 0.05$ 의 범위 내에서 유의적 차이를 보였다. 이는 1.21 ± 0.02 회로 조사된 한(2002)의 결과보다 높게 나타났지만, Erat 등(2013)의 2.29 ± 0.18 회, Türkyilmaz (2005)의 2.01 ± 0.3 결과보다 낮게 나타났다. 인공수정의 성공률은 수정 적기 탐색과 기술자의 능력 등 영양상태, 계절 등에 영향을 많이 받지만, 유전자에 따른 차이도 나타나는 것으로 보인다. Fig. 5는 305일 유량을 측정된 결과이다. A/G형에서는 $7,253.00 \pm 936.00$ kg, G/G형에서는 $8,747.51 \pm 204.88$ kg으로 나타났으며, 유의적 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 3개 지역에서 sampling한 한우

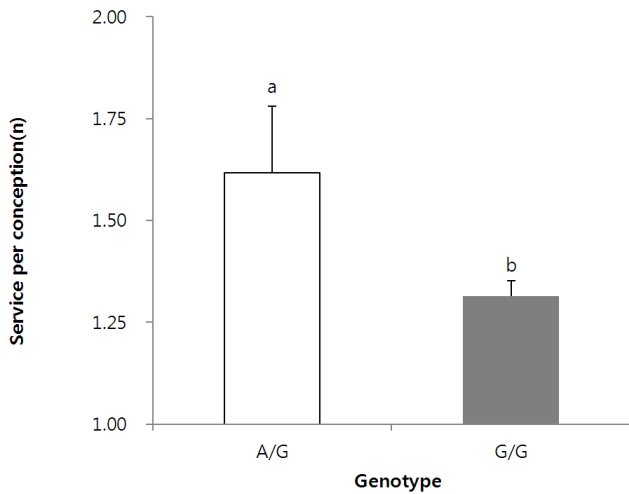


Fig. 4. Service per conception in different genotype. Values with different superscripts differ significantly (Mean \pm SE, $p < 0.05$).

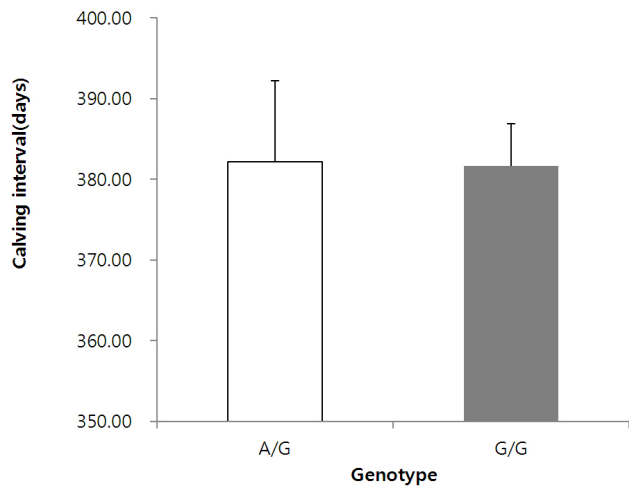


Fig. 5. 305 days milk yield in Holstein different SNP.

에 비해 1개 지역 농가를 대상으로 실험을 실시한 결과인 듯 하며, 한우에 비해 A/G형의 유전자를 가진 개체의 수가 매우 적기 때문에 사료된다.

REFERENCES

- Baek KS, Ko YG, Seong HH, Lee MS, Ryu LS, Na SH (1998): Survey on the effect of the parity on reproductive traits of Korean Native Cows. Korean J Animal Reprod 22(4):359-366.
- Baek KS, Ko YG, Seong HH, Lee MS, Choi SH, Kim YK (1998): Survey on the effect of the herd size on reproductive traits of Korean Native Cows. Korean J Animal Reprod 22(4):367-373.
- Choe CY, Son DS, Choi GC, Song SH, Choe CY, Choi SH, Kim HJ, Cho SR, Hur CG, Kang DW (2006): Survey on the incidence of reproductive disorders in Hanwoo. Korean J Emb Trans 21(4):331-338.
- Choe CY, Son DS, Cho SR, Kim HJ, Choi SH, Kang DW (2008): Alteration in concentrations of blood urea nitrogen and sex steroid hormone in Korean Cattle with reproductive disorders. J Emb Trans 23 (1):59-64.
- Choi IS, Kim UH, Kang HG, Kim IH (2008): Relationship between BCS during prepartum, calving and postpartum periods and fertility of Korean Brown Cattle. J Vet Clin 25(4):280-285.
- Dobson H, Smith RF, Royal MD, Knight CH, Sheldon IM (2007): The high-producing dairy cow and its reproductive performance. Reprod Domest Anim 42(2):14-23.
- Dobson H, Walker SL, Morris MJ, Routly JE, Smith RF (2008): Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows?. Animal 2(8):1104-1111.
- Driver AM, Hwang W, Gajic S, Mondon RL, Rosa GJM, Khatib H (2009): Short communication: Effect of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. J Dairy Sci 92(8):4082-4085.
- Erat S, Kalender H, Celik O (2013): Effect of parity and reproductive status on peak milk yield and some reproductive traits of Holstein cows. Lalahan Hay Arast Enst Derg 53(1):17-27.
- Falaki M, Gengler N, Sneyers M, Prandi A, Massart S, Formigoni A, Burny A, Portetelle D, Renaville R (1996): Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian Bulls. J Dairy Sci 79(8):1446-1453.
- Han CK, Lee NH, Park YJ, Chung YC (1987): Survey on the reproductive traits of Korean Native Cattle. Korean J Anim Sci 29(12):566-572.
- Han CK, Lee NH, Park YJ, Chung YC (1989): Survey on the reproductive traits of Korean Native Cattle. Korean J Anim Reprod 13(1):1-6.
- Han KJ (2002): Effects of environmental factors on reproductive traits in Korean Cattle. J Anim Sci & Technol 44(2):191-200.
- Jung YH, Lee MS, Jeon SS, Jang SS, Suh GH, Park JJ, Lee CW, Na KJ, Rho GJ, Choe SY (2004): Blood Urea Nitrogen and body condition score on reproductive efficiency in Korean cattle. Korean J Emb Trans 19(1):53-59.
- Kim HY, Song SH, Cho HJ (2002): Studies on the reproductive performance and treatment of reproductive disorder in Hanwoo. Korean J Anim Reprod 26(3):291-298.

16. Kim BH, Lee SK, Kim IH, Kang HG (2009): The effect of parity and calving seasons on reproductive performance of Korean native cows. *J Emb Trans* 24 (2):127-130.
17. Roh SH (1993): Studies on the estimation of genetic parameters for the reproductive traits Korean Native Cattle. Graduate School of Kon-Kuk University.
18. Royal M, Mann GE, Flint AP (2000): Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet J* 160(1):53-60.
19. Szreder T, Zwierzchowski L (2004): Polymorphism within the bovine estrogen receptor- α gene 5'-region. *J Appl Genet* 45(2):225-236.
20. Türkyilmaz MK (2005): Reproductive characteristics of Holstein cattle reared in a private dairy cattle enterprise in Aydin. *Turk J Vet Anim Sci* 29(4):1049-1052.
21. Yang BK, Kim JB, Cheong HT, Park CK, Kim CI, Hwang HS, Kim HK (1999): Analysis of blood chemical values and hormone of repeat breeder and reproductive disorder in Hanwoo. *Korean J Anim Reprod* 23(2):175-180.

(Received: 15 September 2014/ Accepted: September 23 2014)