

碩士學位論文

濟州馬의 성장호르몬과 성장호르몬  
수용체 유전자 염기서열의  
다형성에 대한 研究

濟州大學校 大學院

動物資源科學科

金 成 美

2010年 2月

濟州馬의 성장호르몬과 성장호르몬  
수용체 유전자 염기서열의  
다형성에 대한 研究

指導教授 梁 榮 勳

金 成 美

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

2010년 2월

金成美의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2010年 2月

DNA Sequence Polymorphism for the  
Growth Hormone and Growth Hormone  
Receptor Genes in Jeju Horse

Sung-Mi Kim

(Supervised by professor Young-Hoon Yang)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL  
FULLFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF AGRICULTURE

2010. 2.

THIS THESIS HAS BEEN EXAMINED AND APPROVED

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

I. 서 론 .....	1
II. 연구사 .....	3
1. 성장호르몬 유전자 .....	3
2. 성장호르몬 수용체 유전자 .....	5
III. 재료 및 방법 .....	7
1. 마필집단과 DNA표본 .....	7
2. 유전자 증폭과 TTGE 분석 .....	8
3. TTGE DNA 밴드양상에 대한 염기서열 확인 .....	12
4. PCR-RFLP에 의한 유전자형 분석 .....	12
5. 유전자형과 양적형질의 관련성 분석 .....	16
IV. 결과 및 고찰.....	17
V. 요약 .....	30
ABSTRACT .....	32
참고문헌 .....	34

## The list of Figure

Fig. 1. Growth hormone gene and PCR amplified regions. ....	9
Fig. 2. Growth hormone receptor gene and PCR amplified regions. ....	10
Fig 3. Growth Hormone Gene and sequences of polymorphic sites. ....	21
Fig 4. Growth Hormone Receptor Gene and sequences of polymorphic sites. ....	22
Fig 5. PCR-RFLP band patterns of GH gene fragment digested with Tsp509I for the SNP C1518T. ....	23
Fig 6. PCR-RFLP band patterns of GH gene fragment digested with BsiKAI for the SNP G1745A. ....	23
Fig 7. PCR-RFLP band patterns of GH gene fragment digested with BstUI for the SNP T1778C. ....	24
Fig 8. PCR-RFLP band patterns of GHR gene fragment digested with BspH 1 for the SNP C1172T. ....	24
Fig 9. PCR-RFLP band patterns of GHR gene fragment digested with HhaI for the SNP C1562G. ....	25

## The list of Table

Table 1. PCR primers, binding sites, and product sizes of growth hormone gene .....	9
Table 2. PCR primers, binding sites, and product sizes of growth hormone receptor gene .....	10
Table 3. RFLP primers and product sizes of growth hormone and growth hormone receptor genes .....	12
Table 4. GH and GHR polymorphisms and allele frequencies in horse .....	26
Table 5. Genotype and allele frequencies of GH gene digested with Tsp509 I for the SNP C1518T .....	26
Table 6. Genotype and allele frequencies of GH gene digested with BsiHKA I for the SNP G1745A .....	27
Table 7. Genotype and allele frequencies of GH gene digested with BstU I for the SNP T1778C .....	27
Table 8. Genotype and allele frequencies of GHR gene digested with BspH1 for the SNP C1172T .....	28
Table 9. Genotype and allele frequencies of GHR gene digested with Hha I for the SNP C1562G .....	28
Table 10. Least squares means and standard errors of body weight by GH and GHR genotype and SNPs .....	29

## I. 서 론

제주도는 예로부터 사나운 짐승들이 없고 기후와 지리적 조건이 좋아 말 기르기에 적합한 곳으로 잘 알려져 있다. 제주도의 역사는 제주마의 역사라고 불려질만큼 제주마와 삶을 함께 해왔다. 과하마, 토마, 조랑말로 불리우는 이러한 제주마는 귀중한 유전자원으로 평가되고 있다(제주도, 2002).

제주에서 말의 사육기원은 확실하지는 않으나 오래전서부터 농경문화와 함께 사육되어 온 것으로 추정되고 있다. 기록에 의하면 고려 원종 때 원나라에서 제주도에 목장을 설치하고, 충렬왕 2년(1276)에 몽고말 160마리가 도입된 바가 있다. 과거 한때 마필두수가 고려말에서 조선전기까지 2~3만두에 달하던 제주마의 사육은 일본강점기와 6.25를 겪으면서 급감하게 되었고, 그 후 농기계의 보급 등 농경문화의 변천으로 마필의 이용가치가 점점 떨어짐에 따라 사육두수가 1960년에 12,077필이었던 마필수가 1986년에는 1,347필로 현저하게 감소되었다. 그 후 제주도에서는 소멸되어가는 제주마 보존의 필요성이 제기되었고, 정부도 문화적, 학술적, 산업적 측면에서 그 중요성을 인정하여 1986년에 천연기념물 제347호로 지정하게 되었다. 1990년 이후 제주마가 관광 승마와 경마에 이용되면서 사육두수는 다시금 증가추세를 보이기 시작하였다.

제주마는 농경문화시대를 전후로 하여 비교적 최근에 이르기까지 다양한 용도로 이용되었는데, 승용, 식용, 운반, 군용, 농경 등에 유용되었을 뿐만 아니라 마필의 생산품인 갈기, 가죽, 꼬리, 피모, 기름 등은 다양한 용도로 사용되었다. 현재 제주마는 우리나라 고유의 향마로써 수레견인, 승마, 경마, 마상무예 공연 등에 주로 활용되고 있다(제주도, 2002; 남도영, 2003; 장덕지, 2007).

제주마는 개량마에 비해 체형과 체격이 뚜렷하게 작은 왜소한 말로 잘 알려져 있다. 이러한 제주마가 경마에 이용되면서 경주능력이 뛰어난 교잡마와 개량마에 비해 상대적으로 열악한 체격 때문에 한 때 농가의 관심에서 벗어나게 되면서 사육두수는 다시 감소하게 되어 또 한번 순수 제주마의 소멸에 대한 위기의식을 느끼게 되었다. 이에 제주마 보존의 체계적인 증식관리가 필요하게 되었고 그 결과 2000년에는 농림부로부터 제주도축산진흥원을 등록기관으로 지정하고 등록사업을

시작하게 되었다. 또한, 2002년부터는 등록 관리되고 있는 제주마가 제주경마공원에서 경주마로 이용되기 시작하면서 사육두수는 다시 증가하고 있는 실정이다.

제주마의 체형과 성장에 관련하여 다양한 연구보고가 있었으나(정 등, 1991; 양 등, 1991; 양 등, 1991; 양영훈, 2002), 유전적 특성과 관련한 연구는 Kim 등(1999)과 Yang 등(2002)에 의한 미토콘드리아 DNA를 이용한 모계조상 추적에 대한 연구와 Kim 등(2002)에 의한 제주마에서의 transferrin gene에 대한 연구 이외에는 찾아보기가 힘들었다. 특히 제주마의 체형과 그와 관련된 성장인자인 성장호르몬(Growth Hormone)과 성장호르몬 수용체(Growth Hormone Receptor) 유전자의 특성에 대해서는 보고된 바가 없다.

본 연구는 제주마의 성장과 관련된 성장호르몬과 성장호르몬 수용체 유전자의 염기서열을 확인하고, 타 품종인 더러브렛 및 교잡마 집단과 비교 분석하며, 체중과의 관련성을 분석하여 제주마의 유전적 특성을 밝히고자 수행하였다.



## II. 연구사

### 1. 성장호르몬 유전자(Growth Hormone Gene)

성장호르몬(Growth Hormone, GH) 또는 somatotropin(STH)은 191개의 아미노산으로 이루어진 작은 단백질로서 뇌하수체 측두엽의 성장자극세포(somatotroph cell)에서 합성, 저장, 분비가 되는 single chain polypeptide hormone이다. 성장호르몬은 넓고 다양한 생물학적 기능(세포의 분화, 증식, 성장과 대사, 면역조절 및 재생기능 등)의 조절에 필수적인 역할을 하는 것으로 알려지고 있다(Gluckman 등, 1987; Kelley, 1989; Gertner, 1992; Breier 등, 1998). 성장호르몬은 세포 증식과 단백질 합성을 통하여 성장을 조절한다고 보고된 바 있다(Strobil과 Thomas, 1994).

성장과 관련하여 성장호르몬 결핍 장애를 가진 사람이나 실험동물(마우스)에서는 출생 후 성장이 지연되고 왜소발육의 특징이 보고된 바 있으며(Donahue와 Beamer, 1993; Zhou 등, 1997), 성장호르몬은 직접적으로 중추신경계(Central Nervous System) 성장을 도와준다는 연구결과가 보고되었다(Baumann, 1999; Noguchi, 1991). McIlwain 등(2004)은 성장호르몬과 성장호르몬 길항제의 작용으로 인해 뇌와 척수, 체 성장에 있어서 차별적으로 속도와 지속성에 영향을 줌을 보고한 바가 있다. Charlton 등(1988)은 Lewis마우스를 이용한 연구에서 상염색체의 열성 돌연변이 형질로 인한 성장호르몬 결핍은 왜소증과 연관된 것으로 보고하였다.

성장호르몬은 면역조절 특성에 관해서도 다양한 연구가 이루어졌는데, Elvinger 등(1991)과 Kelley(1990)는 암소와 인간에서 성장호르몬의 주입은 면역세포기능을 강화한다고 보고하였고, LeRoith 등(1996)은 나이든 원숭이에서 성장호르몬은 면역세포기능을 자극한다는 연구결과를 보고하였다. Malinowski 등(1997)은 recombinant equine somatotropin(reST)이 나이와 연관되어 몸의 조건, 근육상태, 영양분의 이용에 있어서 긍정적 효과를 가져 온다고 발표하였다.

번식과 관련하여 Breier 등(1996)은 마우스에서 성장호르몬이 정자 활동성과 같은 생식활동에 있어서도 직·간접적으로 상당한 영향을 미친다고 보고하였는데,

성장호르몬 결핍인 수컷 난쟁이 마우스에서 정낭 내 IGF-I 농도와 정자의 운동성이 성장호르몬 치료를 통해 현저하게 증가됨을 보여주었다.

성장호르몬 유전자의 유전적 구조와 관련하여 쥐(Barta 등, 1981), 소(Woychik 등, 1982), 양(Byrne 등, 1987), 돼지(Vize와 Wells, 1987), 사람(Fiddes 등, 1979; Roskam과 Rougeon, 1979; DeNoto 등, 1981), 염소(Kioka 등, 1989), 닭(Tanaka 등, 1992), 마우스(Das, 1996), 말(Ascation-Martinez와 Barrera-Saldana, 1994)을 포함한 많은 동물에서 염기서열분석이 이루어졌다.

소에서 성장호르몬과 관련하여 보고된 연구로 Lagziel 등(1999)은 이스라엘 Holstein 품종의 bovine Growth Hormone(bGH)를 Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP)를 이용하여 분석을 한 결과 인트론 III에서 Msp I 부위의 다형성을 확인하였으며, 유단백질 성분함량에 영향을 주는 좌위와 연관되어 있음을 확인하였다. Lechniak 등(1999)은 성장호르몬 유전자의 다형성은 수소의 정자특성과 같은 번식형질 사이에도 관련이 있음을 보고한 바 있다.

닭에서도 성장호르몬과 관련하여 많은 연구보고가 있었는데, Kuhnlein 등(1997)은 White Leghorn 닭에서 성장호르몬 인트론내의 다형성을 확인하고, 이 부위의 다형성은 산란능력을 15%까지 증가시킬 수 있으며 질병예방에도 도움을 준다고 보고한 바가 있다. Ip 등 (2001)은 Yzazellow Wai Chow(YWC) 품종인 중국 재래종 닭의 cGH 염기서열에서 인트론 내에 다형성을 확인하였고 이 다형성은 계통분석에서 유용하게 사용될 것으로 보고한 바가 있다.

사슴에서 성장호르몬의 다형성 및 뿔 생산량 사이의 상관관계 분석에 적절한 혼합 모델을 사용하여 실시한 결과, G→A의 Single Nucleotide Polymorphism(SNP)은 뿔의 생산량에 상당한 영향을 준다고 보고된 바가 있다(Du와 Bai, 2007).

말에서 성장호르몬 분비는 다른 종에서의 분비형태와 비슷하다고 보고되었으며(Thompson 등, 1992; Stewart와 Tuffnell, 1990; HessDudan 등, 1994; Sticker 등, 1995), 성장호르몬의 염기서열 비교연구에서 Buonomo 등(1996)은 말과 소의 염기서열이 89.5% 일치한다고 보고한 바가 있다.

이처럼 성장 호르몬 유전자에 대한 많은 연구가 끊임없는 이루어지고 있으며 이들 가운데 일부는 성장관련 형질에 다양하게 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있다.

## 2. 성장호르몬 수용체 유전자(Growth Hormone Receptor Gene)

성장호르몬 수용체 유전자는 성장호르몬 타겟 세포의 세포벽에서 성장호르몬을 포착하여 생화학적인 신호의 개시와 유전자의 반응을 활성화 또는 신진 대사의 변화를 일으키게 하는 단백질이다(Carter-Su 등, 1996).

성장호르몬 수용체 유전자의 결핍은 성장호르몬 유전자와 함께 인간과 마우스에서 출생 후 성장을 지연시키고 왜소발육을 나타나게 한다고 보고된 바가 있다(Donahue와 Beamer, 1993; Zhou 등, 1997). 성장호르몬 수용체 유전자의 변이체(mutation)로 인해 성장호르몬 분비기능을 마비시켜 Laron syndrome이 나타나고 심각하게 성장을 저해한다고 보고된 바가 있다(Kaji, 1998; Arman 등, 2008).

Burnside 등(1991)은 닭의 성장호르몬 수용체 유전자의 염기서열에서 변이체를 확인하였고, 이 변이체는 성과 연관되어 난장이 닭의 표현형을 발현시키는 원인임을 보고한 바 있다.

육우에서는 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP는 성장인자와 고기생산에 관련되어 있고, IGF-1 혈청농도, 도체중, 도체품질, 지육율, 수분손실과도 관련이 있다고 보고되어 왔다(Ge 등, 2003; Maj 등, 2004, 2006; Di Stasio 등, 2005). 특히, 성장호르몬 수용체 유전자의 4번째 인트론에서 나타난 A/G SNP는 체중과 사료효율에 있어서 G인자보다 A인자가 강하게 지배적으로 영향을 주고 있다고 보고된 바 있다(Sherman 등, 2008). Qin 등(2007)은 세 가지 품종의 소(Nanyang cattle, limousin, galloway)에 있어서 성장호르몬 수용체 유전자의 exon10 부위에서 5개의 다형성을 확인하였고, 그 결과로 AA, BB, CC, AB, AC, 그리고 BC 6개의 유전자형 가운데 CC 유전자형인 개체의 체중이 가장 적었다고 보고한 바 있다. Zhao 등(2007)은 Qinchuan cattle에서 SSCP를 이용하여 성장호르몬 수용체 유전자의 exon10 부위에서 다형성을 확인하였다. 생산형질과 유전자형 사이의 상관관계를 분석한 결과, AB 유전자형이 다른 유전자형에 비해 생산형질에 크게 영향을 주고 있음을 확인하였다. 젖소에서는 성장호르몬 수용체 유전자와 Prolactin Receptor(PRLR)의 다형성이 경제형질인 우유 단백질 생산과

연관되어 있으며, 성장호르몬 수용체 유전자의 F279Y는 지방과 단백질 비율에 높은 영향을 끼치고, PRLR S18N은 지방과 단백질 생산량에 영향을 끼친다고 보고된 바가 있다(Viitala 등, 2006).

또기에서도 성장호르몬 수용체 유전자와 관련된 보고가 있었는데, 5개의 집단 (Belgian hare, Tianfu black rabbit, Great line of Zika rabbit, Harbin white rabbit, and California rabbit)에서 PCR-SSCP를 이용하여 성장호르몬 수용체 유전자의 다형성을 분석한 결과 2개의 변이체 (C705T, C810T)가 확인되었고, 다형성은 도체형질에 영향을 준다고 보고된 바가 있다(Deng 등, 2008).

이처럼 성장 호르몬 수용체 유전자에 대한 연구는 성장호르몬과 더불어 많은 연구가 지속적으로 진행되고 있다.



### Ⅲ. 재료 및 방법

#### 1. 마필집단과 DNA표본

##### 1) 마필집단

제주마의 성장호르몬(Growth Hormone)과 성장호르몬 수용체(Growth Hormone Receptor) 유전자의 변이성(Polymorphism)을 조사하기 위하여 제주마, 교잡마, Thoroughbred 품종으로 총 386두의 마필을 이용하였다. 제주마는 제주도 축산진흥원에서 등록·관리되고 있는 마필로 195두였으며, 제주마와 Thoroughbred 품종 교잡마는 111두, Thoroughbred 품종은 제주도내 사육되고 있는 순수 품종으로 80두가 조사되었다. 마필의 DNA는 혈액으로부터 추출하여 유전자 분석에 이용하였다.

##### 2) DNA 추출

혈액으로부터 DNA의 추출은 Miller 등(1988)의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 혈액 1ml을 1.5ml 튜브에 넣은 후, Lysis buffer (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 10mM Na<sub>2</sub> EDTA)를 넣고 원심분리(1,500×g, 10분)를 한 후 부유물을 제거하는 방법으로 적혈구를 제거하였다. 이 과정을 반복적으로 하면서 백색 백혈구 펠렛을 형성하였다. 펠렛이 형성되면 Extraction buffer (10mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH8.0)로 부유시킨 후, 10% SDS 50μl, Proteinase K solution (20mg/ml) 10μl를 넣고 50℃ Shaking Incubator에서 24시간 반응시켰다. 반응이 완료되면 6M NaCl를 첨가하여 균질화 혼합물이 되도록 강하게 흔들어준 후 상온에서 5분간 방치 후 원심분리(5,000×g, 20분)시켰다. 원심분리가 끝나면 부유물만 새로운 1.5ml 튜브에 덜어낸 후 -20℃ 에탄올을 부유물의 2배로 넣고 튜브를 상하반전 시키면서 DNA가 응축되는 것을 확인한 후 원심분리(10,000×g, 4℃, 10분)하여 DNA 펠렛을 침전시켰다. 에탄올을

제거하고  $-20^{\circ}\text{C}$  70% 에탄올 1ml을 넣고 간단한 vortexing으로 펠렛을 세척한 후 원심분리( $10,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10분)하여 DNA 펠렛을 재침전 시키고 에탄올을 버렸다. LTE buffer (10mM Tris-HCl, 2mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH8.0)  $100\mu\text{l}$ 를 넣고 DNA가 용해될 때까지 부드럽게 교반하였다. 추출한 DNA는  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동보관하면서 실험에 이용하였다.

## 2. 유전자 증폭과 Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis(TTGE) 분석

### 1) 유전자 증폭부위와 primers 제작

성장호르몬과 성장호르몬 수용체 유전자의 염기서열 다형성 조사를 위한 PCR은 primers를 제작하여 이용하였다.

#### (1) 성장호르몬 유전자의 증폭부위와 primers

성장호르몬 유전자의 primer 제작을 위한 염기서열은 말의 성장호르몬 유전자(Gene Bank acc. no. DQ845297, 1923bp)의 염기서열을 기준으로 하여 primer를 제작하였다. primer 부착부위와 증폭부분은 Fig. 1과 같으며, primer 염기의 증폭 조건과 PCR 산물의 크기는 Table 1과 같다.



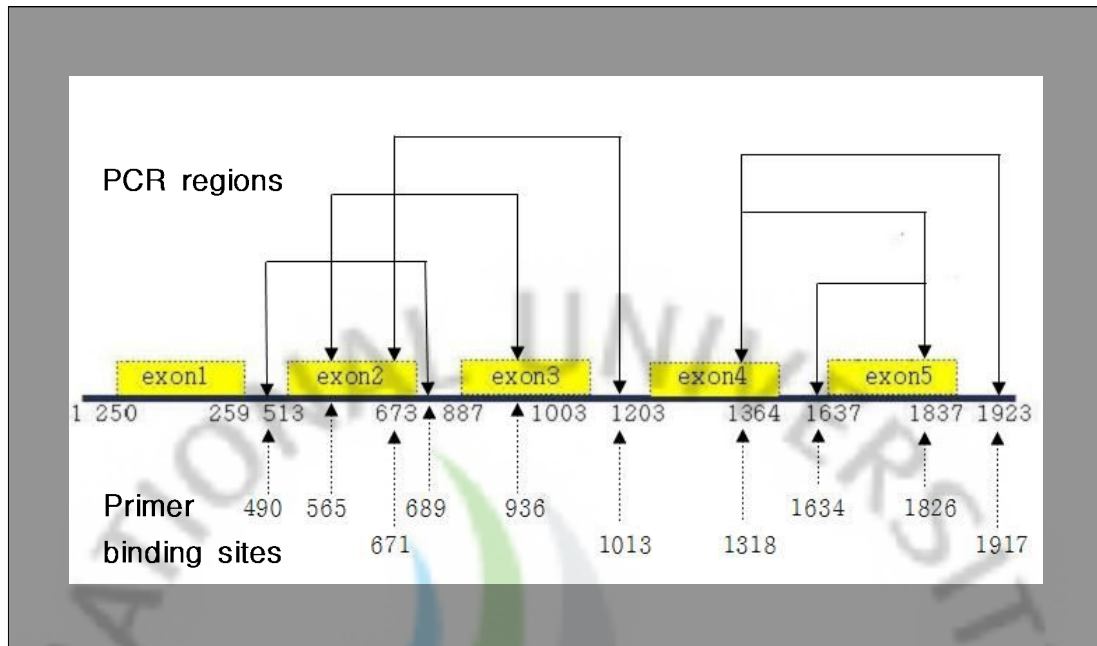


Fig. 1. Growth hormone gene and PCR amplified regions.

Table 1. PCR primers, binding sites, and product sizes of growth hormone gene

Name	Sequence (5'→3')	PCR Tm(°C)	Binding sites	Product Size(bp)
GHF1318	ATGAGAAGCTGAGGGACCTAGA	62	1318	600
GHR1894	AGGAAAGATGGGTAGGCACTAGAG		1917	
GHF490	CCACCCTCCATGTGTTCCTCTA	56	490	200
GHR668	TCCCTGGGAAGCTTACAAACTC		689	
ALF1	TCAGGATGTGGGCGCCTTC	66	565	372
ALR1	TGGGCGTTCCTGGATCGAGTATCT		936	
GHF1318	ATGAGAAGCTGAGGGACCTAGA	56	1318	512
GHR301	CACAGCTGCTTTCCACGAAGC		1826	
GHF671	TTTGTAAGCTTCCCAGGGATGGGT	56	671	343
GHR993	GGCCACTCACAGATCTCTGCT		1013	
GHF302	CAGGAGCTGGAAGACGGCAG	60	1634	193
GHR301	CACAGCTGCTTTCCACGAAGC		1826	

(2) 성장호르몬 수용체 유전자의 증폭부위와 primers

마필의 성장호르몬 수용체 유전자에 대한 다형성조사는 소의 성장호르몬 수용체 유전자(Gene Bank acc. no. NM\_176608, 2014bp)의 염기서열을 기준으로 primer를 제작하여 이용하였다. primer 부착부위와 증폭부분은 Fig. 2와 같으며, 증폭조건과 PCR 산물의 크기는 Table 2와 같다.

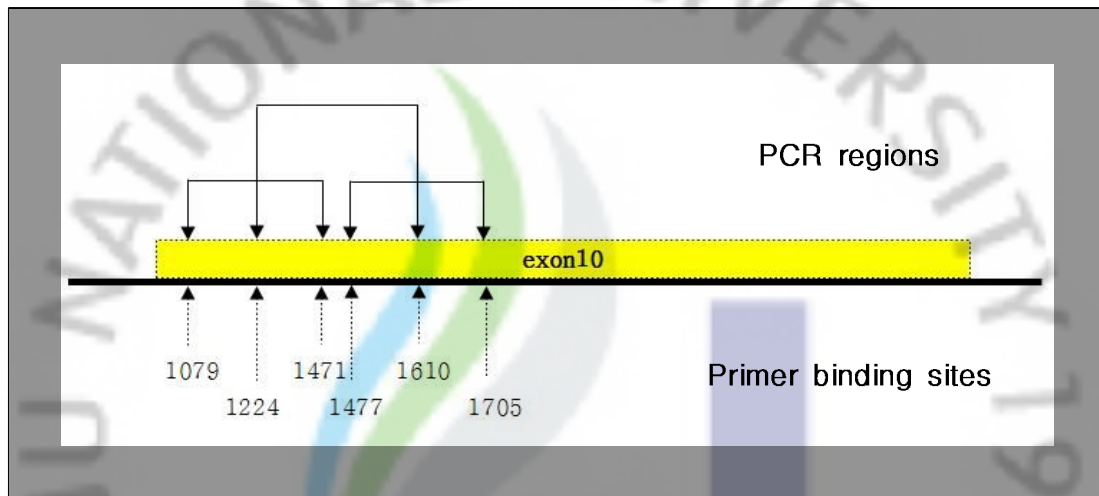


Fig. 2. Growth hormone receptor gene and PCR amplified regions.

Table 2. PCR primers, binding sites, and product sizes of growth hormone receptor gene

Name	Sequence (5'→3')	PCR Tm(°C)	Binding sites	Product Size(bp)
GHRF1079	GACCCCGATGAAAAGACTGAAGGA	56	1079	393
GHRR1471	TGCCAGTGAAGCTCGGATTGCTT		1471	
GHRF1224	ATGCCAGCGACATGAGTGATGGTA	56	1224	387
GHRR1610	TGAAGTTGGCTTGGCAGAGT		1610	
GHRF1477	CGACTTTTATGCCCAGGTAAGCGA	56	1477	230
GHRR1705	AAAGCTTGGCTCGACACGTGAT		1705	



### (3) PCR 반응조건 설정

유전자 증폭을 위한 PCR반응은 100ng genomic DNA, 5pM primer, 0.25mM dNTP, 10X reaction buffer (with MgCl<sub>2</sub>), 1U Taq polymerase(Bioneer, Korea)를 첨가하여 총 20 $\mu$ l의 반응액으로 PCR을 하였다.

성장호르몬과 성장호르몬 수용체 유전자는 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시키고 조건에 따라 92 $^{\circ}$ C-56 $^{\circ}$ C ~62 $^{\circ}$ C-72 $^{\circ}$ C에서 30sec-30sec-45sec로 34cycle의 반응을 한 후, 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 증폭 후 4 $^{\circ}$ C로 종료하였다.

### 2) TTGE 분석

염기서열의 다형성 조사는 THE DCODE<sup>TM</sup> SYSTEM (BIO-RAD)을 이용하고 PCR 증폭산물을 이용하여 Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis(TTGE) 전기영동방법을 이용하였다. TTGE는 6M Urea를 첨가한 8% polyacrylamide gel [Bis acrylamide (37.5:1), 50x TAE (2M Tris base, 1M Acetic acid, 50mM 0.5M Na<sub>2</sub>EDTA pH8.0), 400 $\mu$ l의 10% Ammonium persulfate, 40 $\mu$ l TEMED]에서 PCR product 3 $\mu$ l와 2 $\mu$ l의 2X loading dye (0.05% Bromophenol blue, 0.05% Xylene cyanol, 70% Glycerol)를 잘 섞어 loading하였다. TTGE 전기영동 온도는 PCR products의 melting profiles에 따라서 52 $^{\circ}$ C에서 59 $^{\circ}$ C의 범위로 하였으며, 온도의 증가속도는 최초 시작온도에서 1 $^{\circ}$ C/hr의 속도로 상승시키면서 1.25 TAE Running Buffer에서 7시간, 100V, 30mA, 5W 전기영동을 하였다. 전기영동 후에는 Silver staining작업을 하여 DNA 밴드의 다형성을 확인하였다.

### 3. TTGE DNA 밴드양상에 대한 염기서열 확인

다형현상을 보이는 DNA 밴드를 지닌 표본들은 염기서열분석을 위하여 PCR 증폭산물을 재차 얻은 후, gel purification 작업 (AccuPrep Gel Purification Kit, BIO-NEER)을 거쳐 pGEM-T Easy Vector System (promega, America)을 이용하여 벡터에 삽입한 후 cloning을 하였다. 수확된 클론으로부터 AccuPrep Plasmid Mini Extraction Kit (BIO-NEER)를 이용하여 벡터를 추출하였고, 상업적 sequencing 회사에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.

### 4. PCR-RFLP에 의한 유전자형 분석

#### 1) PCR과 제한효소 처리

성장호르몬과 성장호르몬 수용체 유전자의 유전자형 분석은 PCR-RFLP의 방법으로 진행하였다. primer는 제작하여 이용하였다 (Table 3).

Table 3. RFLP primers and product sizes of growth hormone and growth hormone receptor genes

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	PCR Tm(°C)	Product size(bp)
GH	Forward	CCTGACCCAGGAAAGATCTGACTCTTAA	56	192
	Reverse	TGCTTGAGGATCTGCCAGC		
	Forward	CAGGAGCTGGAAGACGGCAG	56	173
	Reverse	CGACACTTCATGACCCGCAGGTACGTCCG		
GHR	Forward	GATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGGT	56	115
	Reverse	CACAGCTGCTTTCACGAAGC		
	Forward	CCGGGCCAAAAACAAGACAGGGATAGC	56	174
	Reverse	AAAGCTTGGCTCGACACGTGAT		
GHR	Forward	ATCACTTAATATCCTTGGGGCAAAGGATCA	56	331
	Reverse	TGCCAGTGAACCTCGGATTGCTT		



CAGGAGCTGG AAGACGGCAG CCCCCGGGCT GGCAGATCC TCAAGCAAAC

forward primer

CTACGACAAG TTTGACACAA ACTTGCGCAG TGATGATGCA CTGCTCAAGA

ACTACGGGCT GCTCTCCTGC TTCAAGAAGG ACCTGCACAA GGCTG **CGACG**

CG↓CG

TACCTGCGGG TCATGAAGTG TCG

reverse primer

### ③ BsiHKA I 제한효소 처리

PCR 증폭산물(GHF1715×GHR301, 115bp) 5 $\mu$ l에 2 $\mu$ l 10X 4buffer (BioLabs, England), 0.5 $\mu$ l BsiHKA I(5U), 0.2 $\mu$ l 100X BSA(0.2%), DW 12.3 $\mu$ l를 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. PCR 증폭부위와 제한효소 인지부위는 다음과 같다.

GATGATGCAC TGCTCAAGAA CTACGGG G TG CT C TCCTGCT TCAAGAAGGA

forward primer

G WG CW↓C

↑ A

CCTGCACAAG GCTGAGACGT ACCTGCGGGT CATGAAGTGT CGCCGCTTCC

TGGAAGCAG CTGTG

reverse primer

### ④ Hha I 제한효소 처리

PCR 증폭산물(GHR1532F×GHR1705R, 174bp) 5 $\mu$ l에 2 $\mu$ l 10X 4buffer (BioLabs, England), 0.25 $\mu$ l Hha I(5U), 0.2 $\mu$ l 100X BSA(0.2%), DW 12.55 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. PCR 증폭부위와 제한효소 인지부위는 다음과 같다.

CCGGGCCAAA AAAACAAGAC AGGGATAG CC CAATGTGACA TGCATCCCGA  
 forward primer G CG↓C  
 ↑  
 AGTGGTCTCA CTCTGCCAAG CCAACTTCAT CATGGACAAC GCCTACTTCT  
 GTGAGGCAGA TGCCAAAAAG TGCATCCCCG TGGCCCCTCA CGTCGAGGTT  
 GAATCACGTG TCGAGCCAAG CTTT  
 reverse primer

⑤ BspH I 제한효소 처리

PCR 증폭산물(GHR1141R×GHR1471R, 331bp) 5 $\mu$ l에 2 $\mu$ l 10X 4 buffer (BioLabs, England), 0.5 $\mu$ l BspH I(5U), DW 12.5 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. PCR 증폭부위와 제한효소 인지부위는 다음과 같다.

ATCACTTAAT ATCCTTGGGG CAAAGGA T CA CG A CTCTGGA CGTACCAGCT  
 forward primer T↓CA TG↑A  
 GTTATGAACC TGACATTCTG GAGACTGATT TCAATGCCAG CGACATGAGT  
 GATGGTACCT CAGAGGTTGC TCAGCCACAA AGGTTAAAAG GGGAAGCAGA  
 TCTTTTGTGC CTGACCAGA AAAATCAAAA GGAATCATCT TCTAGTAATG  
 CTACCCCTGC TACTCAGCAG CCCAGTGTTA TCCTAGCAGA GGAAAACAAA  
 CCAAGACCAC TTCTTATTGG TGGAAGTGG TCAACTCATC AAGCTGCCCA  
 TACTCAACTA AGCAATCCGA GTTCACTGGC A  
 reverse primer

## 2) 전기영동과 유전자형 판독

PCR-RFLP에 의한 유전자형 판독은 polyacrylamide gel 전기영동 방법을 이용하였다. 제한효소 처리산물을 8% polyacrylamide gel[Bis acrylamide (24:1), 0.5X TBE(44.5 mM Tris base, 44.5 mM boric acid, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA pH8.0), 200 $\mu$ l의 10% Ammonium persulfate, 20 $\mu$ l TEMED]에서 전기영동을 하였으며, Silver staining방법으로 유전자형을 판독하였다.

## 5. 유전자형과 양적형질의 관련성 분석

유전자형에 따른 체중에 대한 관련성 분석은 제주경마공원의 경주마기록(제주마 195두, 교잡마 111두)으로부터 측정된 체중을 이용하였다. 통계적 분석은 SAS프로그램 (version 9.1)의 GLM을 이용하였으며, 통계적 분석모형은 다음과 같다.

$$Y_{ijklm} = \mu + \text{Breed}_i + \text{Sex}_j + \text{Age}_k + \text{SNP-type}_l + e_{ijklm}$$

$Y_{ijklm}$ 은 체중,  $\text{Breed}_i$ 는 품종효과(제주마, 교잡마),  $\text{Sex}_j$ 는 성별효과,  $\text{Age}_k$ 는 나이효과,  $\text{SNP-type}_l$ 은 성장호르몬과 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP 유전자형 효과,  $e_{ijklm}$ 은 오차항으로 설정하였다.



#### IV. 결과 및 고찰

제주도내 사육되고 있는 마필 집단에서 성장호르몬(Growth Hormone)과 성장호르몬 수용체(Growth Hormone Receptor) 유전자 염기서열의 다형성에 대한 분석 결과는 다음과 같다.

제주마 집단과 교잡마(제주마×Thoroughbred)집단, Thoroughbred 품종 집단에서 TTGE 전기영동에 의한 변이체 조사와 변이체들에 대한 sequencing 결과 성장호르몬 유전자의 염기서열에서는 exon 5 부위에 2개(G1745A, T1778C)와 intron 부위에 1개(C1518T)의 SNP를 확인하였고(Fig. 3), 성장호르몬 수용체 유전자에서 exon 10 부위에 2개(C1172T, C1562G)의 SNP를 확인하였다(Fig. 4).

성장호르몬 exon 부위에 나타난 SNP G1745A는 CTG codon이 CTA로 변화되었으나 동일하게 Lecine을 나타내고 있었으며, T1778C SNP는 GCT가 GCC로 변화되었으나 역시 동일하게 Alanine을 지시하고 있었다. 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP C1172T는 GAC가 GAT로 codon이 변화되었으나 아미노산은 조성은 Aspartic acid로 동일하였고, C1562G SNP는 TCC가 TCG로 변화되었지만 역시 동일한 Serine을 나타내고 있었다.

Grochowska 등(1999)은 소의 성장호르몬 유전자에서 127번째 아미노산이 Leucine이 Valine으로 변화하면서 성장호르몬 분비에 영향을 끼친다고 보고한 바가 있다. 또한, Ip 등(2001)은 닭의 YWS 중에서 exon 4의 2338bp 위치에 codon이 CTC가 CTG로 변화되었음을 관찰하였지만 동일하게 Leucine을 생성하여 아미노산 조성에는 변화가 없었음을 보고한 바 있다. 본 연구에서 확인된 성장호르몬 유전자와 성장호르몬 수용체 유전자 exon 부위의 SNP는 아미노산 조성에는 영향을 주지 않고 있었다.

집단의 각 개체들에 대한 PCR-RFLP 분석을 하기 위하여 제한효소를 처리하여 polyacrylamide gel에서 전기영동을 한 결과, 성장호르몬 유전자에서 C1518T 변이체는 Tsp509I의 처리로 TT(192bp), CC(162bp), CT(192, 162bp)의 3개의 절단단편이 확인되었다(Fig. 5). G1745A 변이체는 BsiHKA I의 처리로 AA(115bp), GG(83bp), AG(115, 83bp) 3개의 절단단편이 확인되었고(Fig. 6), T1778C 변이체는 BstU I의 처리로 TT(173bp), CT(173, 147bp) 2개의 절단단편이 확인되었다(Fig. 7).

성장호르몬 수용체 유전자에서 C1172T 변이체는 BspH1의 처리로 CC(331bp), CT(331, 303bp) 2개의 인자형(DNA size)이 확인되었으며(Fig. 8), C1562G 변이체는 Hha I의 처리로 CC(174bp), GG(146bp), CG(174, 146bp) 3개의 인자형(DNA size)이 확인되었다 (Fig. 9).

성장호르몬 유전자와 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP 인자 빈도는 성장호르몬 유전자 단편에서 C1518T의 변이체는 C가 0.59, T가 0.41의 빈도로 나타났고, G1745A의 SNP는 G가 0.88, A가 0.12, T1778C의 SNP는 T가 0.90, C가 0.10의 빈도로 나타났다. 성장호르몬 수용체 유전자 단편에서 C1172T의 SNP는 C가 0.96, T가 0.04로 나타났으며, C1562G의 SNP는 C가 0.90, G가 0.10의 빈도로 나타났다(Table 4).

품종별로는 성장호르몬 C1518T SNP의 인자형 빈도는 제주마에서 TT형은 0.155, CT형은 0.526, CC형은 0.319이고 교잡마 집단은 TT형은 0.075, CT형은 0.484, CC형은 0.441이고, Thoroughbred 집단은 TT 0.228, CT 0.582, CC 0.190으로 나타났다. 인자 빈도는 제주마는 T인자가 0.418, C인자가 0.582이고, 교잡마는 T 0.317, C는 0.683이고, Thoroughbred는 T 0.519, C 0.481로 나타났다. 품종 간에 C인자와 T인자의 빈도가 비교적 고른 분포를 보이는 것을 확인할 수 있었다(Table 5).

성장호르몬 G1745A SNP의 인자형 빈도는 제주마는 AG형은 0.190, GG형은 0.810이고 교잡마는 AA형은 0.016, AG형은 0.365이고 GG형은 0.619, Thoroughbred는 AG 0.253, GG 0.747로 나타났다. AA형은 교잡마에서만 확인할 수 있었다. 인자 빈도는 제주마는 A인자가 0.095, G인자가 0.905이고, 교잡마는 A 0.198, G 0.802이고, Thoroughbred는 A 0.127, G 0.873으로 나타났다. 모든 품종에서 G인자의 빈도가 높게 나타나는 경향을 보였고 AA 유전자형은 교잡마 1두에서만 확인되었다(Table 6).

성장호르몬의 T1778C SNP의 인자형 빈도는 제주마는 TT형은 0.814, CT형은 0.186이고 교잡마는 TT형은 0.725, CT형은 0.275, Thoroughbred은 TT 0.776, CT 0.224로 나타났다. 인자 빈도는 제주마는 T인자가 0.907, C인자가 0.093이고, 교잡마는 T 0.863, C 0.137, Thoroughbred는 T 0.888, C 0.112로 조사되어 모든 품종에서 T인자 빈도가 높게 나타나고 있음을 확인하였다(Table 7).



성장호르몬 수용체 유전자의 염기서열에 나타난 2개의 변이체 중 C1172T SNP의 인자형 빈도는 제주마는 CC형은 0.891, CT형은 0.109이고 교잡마는 CC형은 0.917, CT형은 0.083, Thoroughbred는 CC 0.100로 나타났다. Thoroughbred 집단에서는 CC형만 나타났다. 인자 빈도는 제주마는 C인자가 0.945, T인자가 0.055이고, 교잡마는 C 0.958, T 0.042이고, Thoroughbred의 경우 C 인자만 출현하였다(Table 8).

성장호르몬 수용체 유전자 C1562G SNP의 인자형 빈도는 제주마 집단에서 CC형은 0.964, CG형은 0.036이고 교잡마 집단에서는 CC형은 0.692, CG형은 0.299, GG형은 0.009, Thoroughbred는 CC 0.615, CG 0.346, GG 0.039로 나타났다. GG형은 Thoroughbred와 교잡마 집단에서만 나타났고 제주마 집단에서 출현되지 않았다. 인자 빈도는 제주마는 C인자가 0.982, G인자가 0.018이고, 교잡마는 C 0.841, G 0.159이고, Thoroughbred는 C 0.788, G 0.212로 나타났다. G인자의 빈도는 제주마에서 0.018, 교잡마에서는 0.159, Thoroughbred에서는 0.212로 점점 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Table 9).

제주마와 교잡마의 SNP 인자형들과 체중의 관련성 분석을 한 결과, 체중에 있어서 성장호르몬의 SNP C1518T, G1745A, T1778C와 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP C1172T는 인자형에 따른 유의차는 없었다( $p>0.05$ ). 그러나 성장호르몬 수용체 유전자 C1562G SNP좌위의 인자형에서는 체중의 차이( $p<0.05$ )를 확인할 수 있었는데, CC 유전자형이 CG의 유전자형보다 유의적으로 15.2kg 적게 나타나고 있었다(Table 10).

한편, Sherman 등 (2008)은 intron에 나타난 SNP도 체중에 영향을 주고 있다는 보고를 한 바 있는데 소에서 성장호르몬 수용체 유전자의 intron 4의 A/G SNP는 체중에 영향을 주고 있다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 조사된 성장호르몬의 intron 부위의 SNP C1518T는 체중과의 관련성을 찾아볼 수 없었다( $p>0.05$ ).

결론적으로 본 연구에서는 제주마의 성장호르몬이나 성장호르몬 수용체 유전자의 염기서열에서는 5개의 SNPs 변이체가 관찰되었고, 성장호르몬 유전자의 intron에서 C1518T와 exon 5에서 G1745A, T1778C가 확인되었고 성장호르몬 수용체 유전자의 exon 10에서 C1172T, C1562G가 확인되었다. 성장호르몬 exon 부위에 존재하는 G1745A, T1778C의 SNPs와 성장호르몬 수용체 유전자 exon

부위에 나타난 C1172T, C1562G의 SNPs는 아미노산 변화에는 영향을 주지 않았다. 체중과의 연관성에서 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP C1562G는 인자형(CC, CG)별로 체중에 유의적인 차이를 보였다.

밝혀진 C1562G SNP가 Marker Assisted Selection에 이용가능성은 체중 이외의 성장관련형질(체고, 체장 등)과의 관련성에 대한 조사와 미확인된 염기서열에 대한 조사도 필요한 것으로 생각되었다.



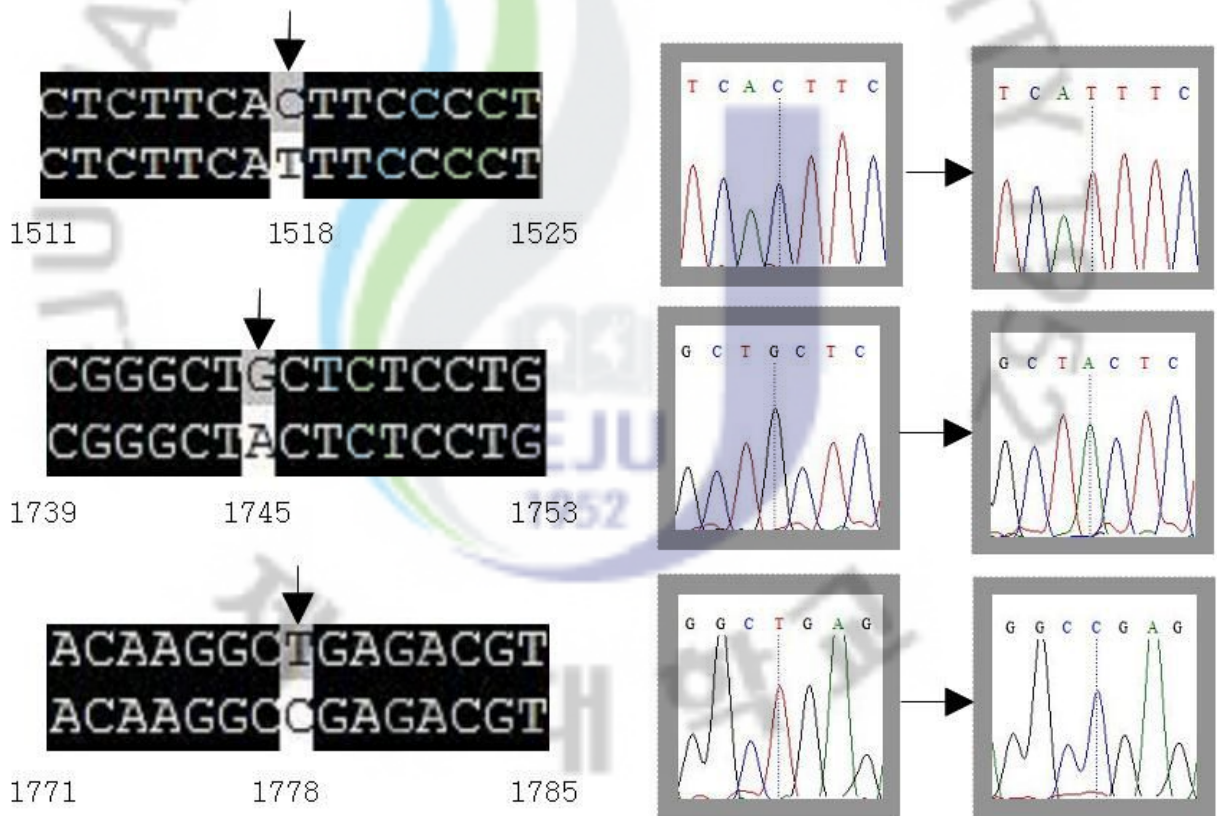
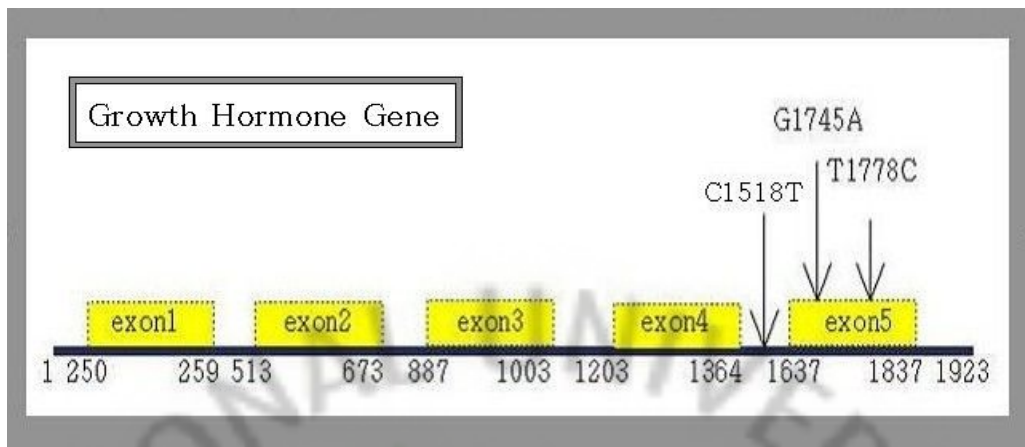


Fig 3. Growth Hormone Gene and sequences of polymorphic sites.

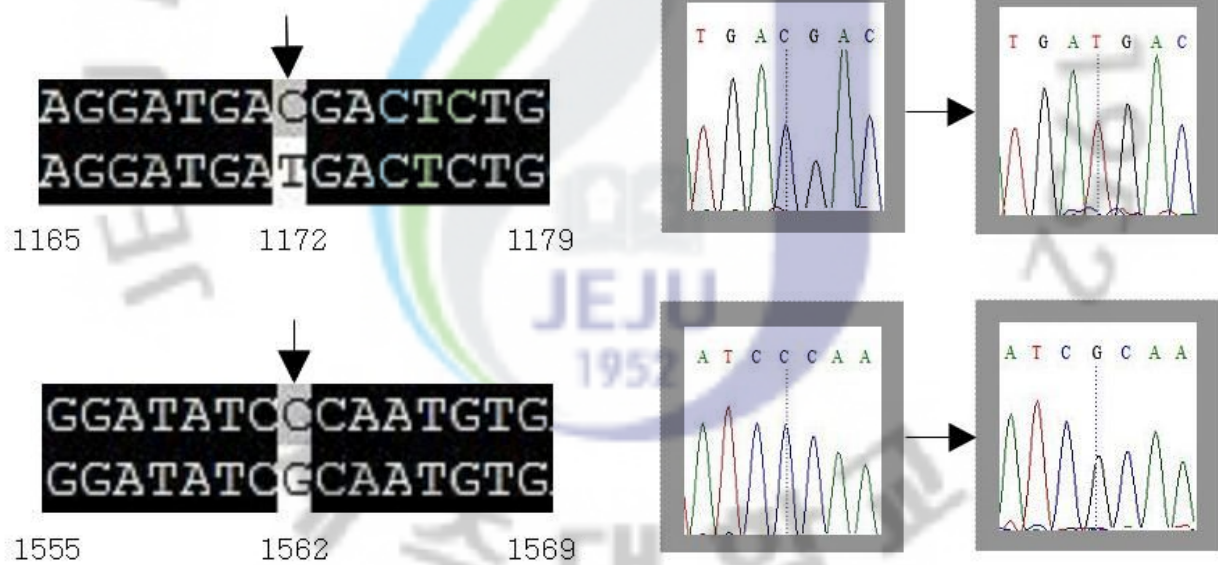
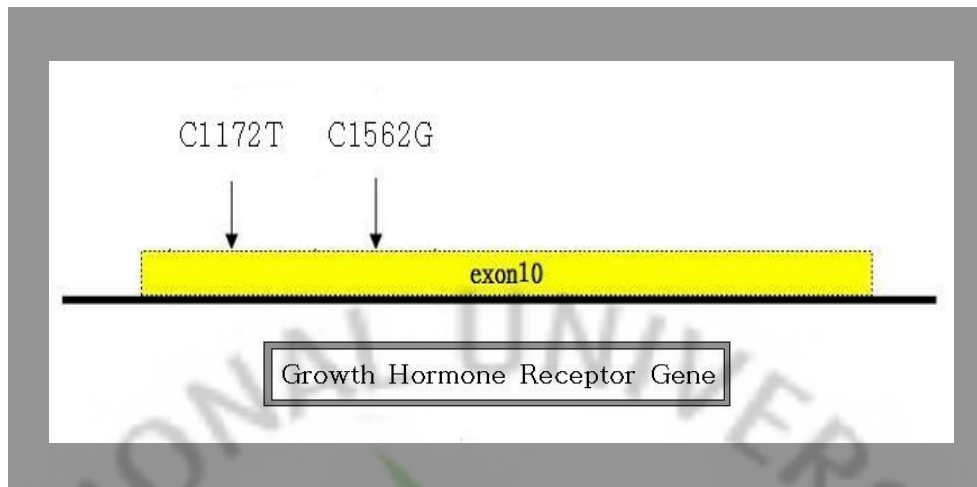


Fig 4. Growth Hormone Receptor Gene and sequences of polymorphic sites.

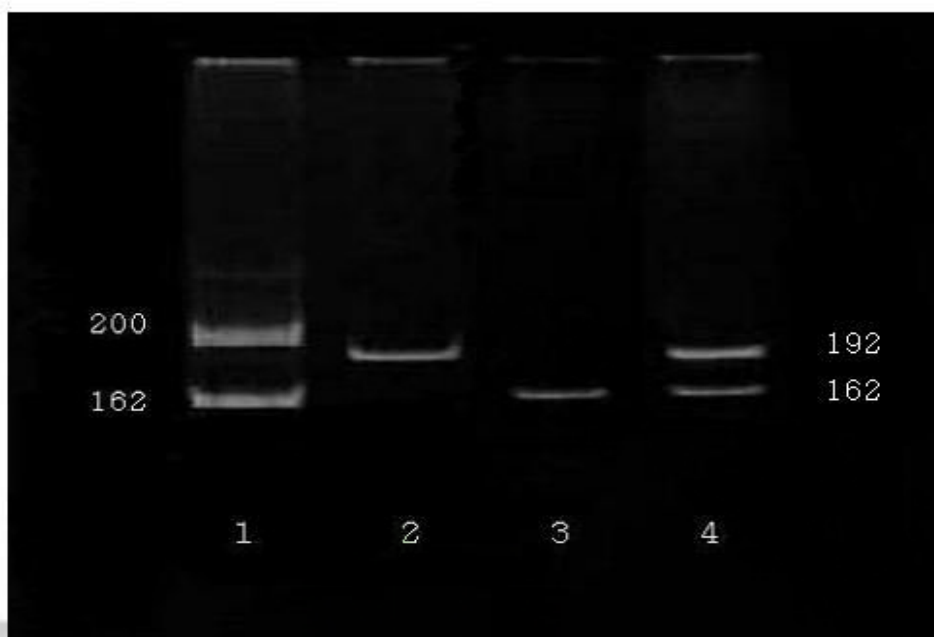


Fig 5. PCR-RFLP band patterns of GH gene fragment digested with Tsp509I for the SNP C1518T. Lane 1, Size marker(200, 162bp); lane 2, TT(192bp); lane 3, CC(162bp); lane 4, CT(192bp/162bp).

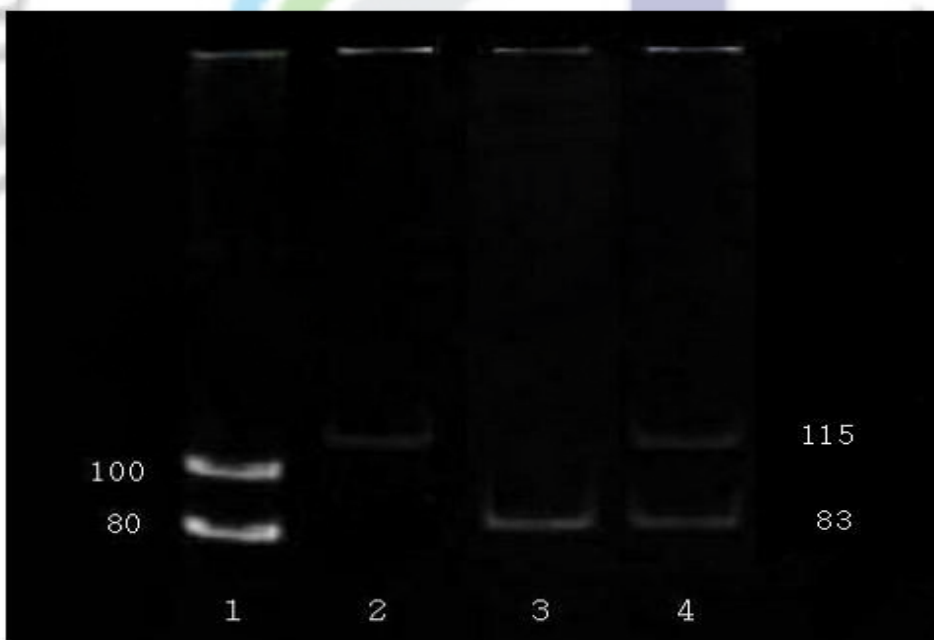


Fig 6. PCR-RFLP band patterns of GH gene fragment digested with BsikAI for the SNP G1745A. Lane 1, Size marker(100, 80bp); lane 2, AA(115bp); lane 3, GG(83bp); lane 4, AG(115bp/83bp).

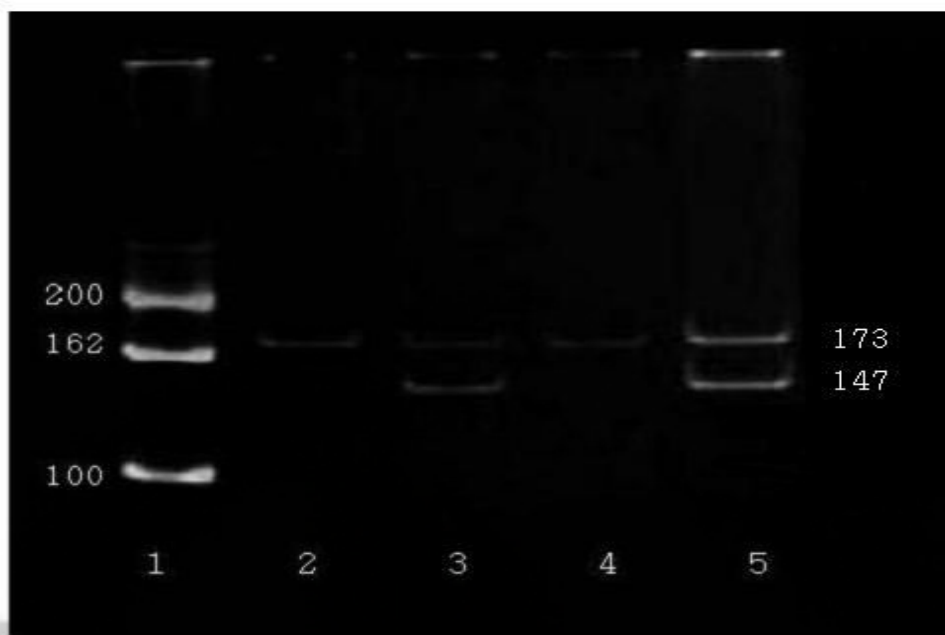


Fig 7. PCR-RFLP band patterns of GH gene fragment digested with BstUI for the SNP T1778C. Lane 1, Size marker(200, 162, 100bp); land 2, TT(173bp); lane 3, CT(173bp/147bp); lane 4, TT(173bp) ; lane 5, CT(173bp/147bp).



Fig 8. PCR-RFLP band patterns of GHR gene fragment digested with BspH 1 for the SNP C1172T. Lane 1, Size marker(372, 295bp); lane 2, CC(331bp); lane 3, CT(331bp/303bp); lane 4, CC(331bp); lane 5, CT(331bp/303bp).

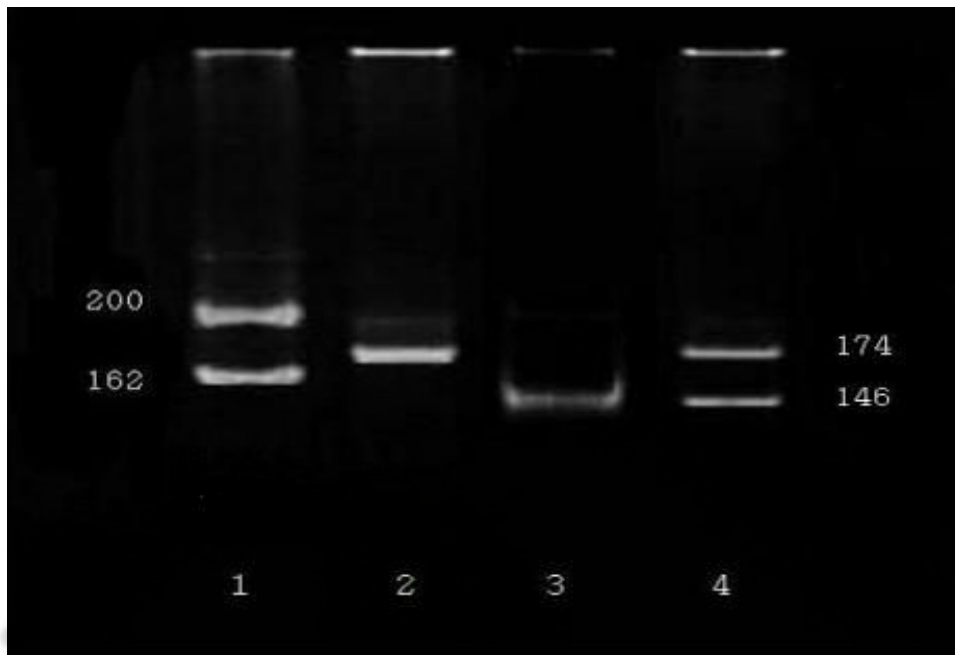


Fig 9. PCR-RFLP band patterns of GHR gene fragment digested with HhaI for the SNP C1562G. Lane 1, Size marker(200, 162bp); lane 2, CC(174bp); lane 3, GG(146bp); lane 4, CG(174bp/146bp).



Table 4. GH and GHR polymorphisms and allele frequencies in horse

Gene	SNP	Polymorphism	Frequency	Primer(5'→3')
GH	SNP1	C1518T	0.59/0.41	CCTGACCCAGGAAAGATCTGACTCTTA TGCTTGAGGATCTGCCAGC
	SNP2	G1745A	0.88/0.12	GATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGGT CACAGCTGCTTTCCACGAAGC
	SNP3	T1778C	0.90/0.10	CAGGAGCTGGAAGACGGCAG CGACACTTCATGACCCGAGGTACGTCCG
GHR	SNP1	C1172T	0.96/0.04	ATCACTTAATATCCTTGGGGCAAAGGATCA TGCCAGTGAACCTCGGATTGCTT
	SNP2	C1562G	0.90/0.10	CCGGGCCAAAAAACAAGACAGGGATAGC AAAGCTTGGCTCGACACGTGAT

Table 5. Genotype and allele frequencies of GH gene digested with Tsp509I for the SNP C1518T

		Jeju Horse	Crossbred*	Thoroughbred	Overall
Genotype	TT	30 (15.5)	7 (7.5)	18 (22.8)	55 (15.0)
	CT	102 (52.6)	45 (48.4)	46 (58.2)	193 (52.7)
	CC	62 (31.9)	41 (44.1)	15 (19.0)	118 (32.3)
Allele	T	162 (41.8)	59 (31.7)	82 (51.9)	303 (41.4)
	C	226 (58.2)	127 (68.3)	76 (48.1)	429 (58.6)

\* Crossbred (Jeju Horse×Thoroughbred)  
Percentages are in parentheses.



Table 6. Genotype and allele frequencies of GH gene digested with BsiHKA I for the SNP G1745A

		Jeju Horse	Crossbred*	Thoroughbred	Overall
Genotype	AA	-	1 (1.6)	-	1 (0.3)
	AG	37 (19.0)	23 (36.5)	20 (25.3)	80 (23.7)
	GG	158 (81.0)	39 (61.9)	59 (74.7)	256 (76.0)
Allele	A	37 (9.5)	25 (19.8)	20 (12.7)	82 (12.2)
	G	353 (90.5)	101 (80.2)	138 (87.3)	592 (87.8)

\* Crossbred, Jeju Horse×Thoroughbred  
Percentages are in parentheses.

Table 7. Genotype and allele frequencies of GH gene digested with BstU I for the SNP T1778C

		Jeju Horse	Crossbred*	Thoroughbred	Overall
Genotype	TT	158 (81.4)	37 (72.5)	59 (77.6)	254 (79.1)
	CT	36 (18.6)	14 (27.5)	17 (22.4)	67 (20.9)
	CC	-	-	-	-
Allele	T	352 (90.7)	88 (86.3)	135 (88.8)	575 (89.6)
	C	36 (9.3)	14 (13.7)	17 (11.2)	67 (10.4)

\* Crossbred, Jeju Horse×Thoroughbred  
Percentages are in parentheses.

Table 8. Genotype and allele frequencies of GHR gene digested with BspH1 for the SNP C1172T

		Jeju Horse	Crossbred*	Thoroughbred	Overall
Genotype	CC	171 (89.1)	99 (91.7)	79 (100.0)	349 (92.1)
	CT	21 (10.9)	9 (8.3)	-	30 (7.9)
	TT	-	-	-	-
Allele	C	363 (94.5)	207 (95.8)	158 (100.0)	728 (96.0)
	T	21 (5.5)	9 (4.2)	-	30 (4.0)

\* Crossbred, Jeju Horse×Thoroughbred  
Percentages are in parentheses.

Table 9. Genotype and allele frequencies of GHR gene digested with Hha I for the SNP C1562G

		Jeju Horse	Crossbred*	Thoroughbred	Overall
Genotype	CC	188 (96.4)	74 (69.2)	48 (61.5)	310 (81.6)
	CG	7 (3.6)	32 (29.9)	27 (34.6)	66 (17.4)
	GG	-	1 (0.9)	3 (3.9)	4 (1.0)
Allele	C	383 (98.2)	180 (84.1)	123 (78.8)	686 (90.3)
	G	7 (1.8)	34 (15.9)	33 (21.2)	74 (9.7)

\* Crossbred, Jeju Horse×Thoroughbred  
Percentages are in parentheses.

Table 10. Least squares means and standard errors of body weight by GH and GHR genotype and SNPs

Gene	SNP	Genotype			
			CC	CT	TT
GH	C1518T	n	103	147	37
		bwt*	265.9±2.61	267.7±2.50	274.0±4.45
	G1745A	n	197	60	1
		bwt	266.7±2.06	269.9±3.37	282.5
	T1778C	n	195	50	-
		bwt	266.7±2.05	270.6±3.35	-
GHR	C1172T	n	270	30	-
		bwt	267.6±1.84	268.6±5.59	-
	C1562G	n	262	39	1
		bwt	264.8 <sup>a</sup> ±1.97	280.0 <sup>b</sup> ±4.75	302.9 <sup>ab</sup>

Means with different superscript in the same row differ(p<0.05).

\* bwt, body weight(kg).

## V. 요약

본 연구는 제주도내 제주마 집단에 있어서 성장에 영향을 주는 유전자로 알려진 성장호르몬(Growth Hormone)과 성장호르몬 수용체(Growth Hormone Receptor)유전자의 염기서열분석을 통하여 다형성을 확인하고, 타 품종인 Thoroughbred 품종 및 교잡마(제주마 × Thoroughbred)와 비교 분석하여 제주마의 유전적 특성을 밝히고자 수행되었다.

마필집단은 제주도 축산진흥원에서 관리되고 있는 제주마 195두와 제주마와 Thoroughbred 품종 교잡마 111두, 제주도내 사육되고 있는 순수 Thoroughbred 품종 80두를 대상으로 하였다. 개체별 혈액 표본을 입수하고, Genomic DNA를 추출한 후 유전자 증폭과 Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis(TTGE) 분석과 염기서열을 분석하였다. 변이체에 대한 인자형 분석은 RFLP 방법으로 하였으며, 성장호르몬 유전자는 Tsp509 I, BsiAI, BstUI의 제한효소를 이용하였고, 성장호르몬 수용체 유전자는 BspH I, HhaI의 제한효소를 이용하였다.

RFLP로 확인되는 성장호르몬 유전자는 exon 5 부위에 2개(G1745A, T1778C)와 intron 부위에 1개(C1518T)의 Single Nucleotide Polymorphisms(SNP)를 확인하였고, 성장호르몬 수용체 유전자는 exon 10 부위에 2개(C1172T, C1562G)의 SNP를 확인하였다. 확인된 SNP인자들은 제주마, 교잡마, Thoroughbred 품종에서 대부분 인자형과 인자의 빈도에 차이가 없었으나, 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP 가운데 C1172T SNP는 Thoroughbred의 경우 CC형만 관찰되었다. 성장호르몬 유전자에서 C1518T의 변이체는 C가 0.59, T가 0.41의 빈도로 비교적 고른 분포를 보였고, G1745A의 SNP는 G가 0.88, A가 0.12, T1778C의 SNP는 T가 0.90, C가 0.10로 나타났다. 성장호르몬 수용체 유전자의 C1172T SNP는 C가 0.96, T가 0.04, C1562G의 SNP는 C가 0.90, G가 0.10의 빈도로 한쪽으로 우점되는 현상을 보였다.

성장호르몬 유전자와 성장호르몬 수용체 유전자의 exon부위의 나타난 SNP들은 codon 형성에 변화를 주었지만, 아미노산 변화에는 영향을 주지 않았다.

SNP 인자형들과 체중과의 연관성 분석에서는 성장호르몬 수용체 유전자 C1562G SNP에서 CC 인자형이 CG의 인자형보다 유의적으로 체중이 15.2kg

낮은 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 그러나 성장호르몬 유전자의 C1518T, G1745A, T1778C SNP와 성장호르몬 수용체 유전자의 C1172T SNP 인자형에서는 체중 사이에 유의차가 없는 것으로 나타났다( $p > 0.05$ ).

결론적으로 요약한다면, 제주마의 성장호르몬에서 3개(C1518T, G1745A, T1778C), 성장호르몬 수용체 유전자에서 2개(C1172T, C1562G)의 염기서열 변이체를 발견하였으며, 인자형과 인자빈도에 있어서 품종 간의 차이는 성장호르몬 수용체 유전자의 C1172T SNP에서 Thoroughbred의 경우 CC유전자형만 나타남을 확인하였다. 또한, 성장호르몬 수용체 유전자의 SNP C1562G는 제주마의 체중과도 관련되어 마커(MAS)로 활용될 가능성을 보여주고 있었다. 그러나 MAS로 이용에는 체중 이외의 성장관련형질(체고, 체장 등)에 대한 분석과 미확인된 염기서열에 대해서도 조사가 필요한 것으로 생각되었다.

## ABSTRACT

### DNA Sequence Polymorphism for the Growth Hormone and Growth Hormone Receptor Genes in Jeju Horse

**Sung-Mi Kim**

Department of Animal Biotechnology, Graduate School  
Jeju National University, Jeju, Korea

This study was carried out to investigate the DNA sequence polymorphisms for the Growth Hormone (GH) and Growth Hormone Receptor (GHR) genes, and to analyse the relation between the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the genes and body weights in Jeju horses.

A total of 386 genomic DNA samples was extracted from the blood samples of 195 Jeju horses, 80 Thoroughbred horses, and 111 crossbreds between Jeju horses and Thoroughbred horses. The partial sequences of the GH and GHR genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the designed primers, and then polymorphic DNA band types were screened using the PCR products by the method of Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE). The polymorphic DNA bands from the TTGE results were cloned and sequenced to identify SNPs. The results are as follows:

Three SNPs (SNP G1745A and T1778C in exon 5; SNP C1518T in intron) for GH gene and two SNPs (SNP C1172T and C1562G in exon 10) for GHR gene were detected by sequencing for the DNA band variants of TTGE.

RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) method using the restriction enzymes Tsp509I, BsiAI and BstUI for three SNPs of GH gene,



and the enzyme BspH 1 and HhaI for two SNPs of GHR gene was used to individually genotype the each SNP for the groups of Jeju horses, Thoroughbred breed and crossbreds. All of the four SNPs except the SNP C1172T for the GHR genes were observed in all three groups of Jeju horses, Thoroughbred horses, and crossbreds. In Thoroughbred breed, only the CC type for the SNP C1172T was observed in this study.

The allele frequencies for the four SNPs (G1745A, T1778C, C1518T for GH gene, and C1562G for GHR gene) showed highly skewed distribution to one allele of base variants while the allele frequencies of SNP C1518T were 0.59 and 0.41 for the variant C and T, respectively.

All the four SNPs recognized in the exons of GH(G1745A, T1778C) and GHR(C1172T, C1562G) genes did not result in a change to the amino acid sequence.

In the statistical analysis of the relation between SNP genotypes and body weights in Jeju horses and crossbreds, the SNP C1562G for the GHR gene showed the significant difference between the genotypes ( $p < 0.05$ ) while the other SNPs (C1518T, G1745A and T1778C for GH gene; C1172T for the GHR gene) did not shown any significant differences between the genotypes ( $p > 0.05$ ) for the body weight. The least-square mean body weight of CC genotype (264.8kg) in the SNP C1562G was significantly lower than that of the CG genotype (280.0kg) for the GHR gene, suggesting that the SNP C1562G would be used for Marker Assisted Selection.

In practical use of the SNP C1562G for the GHR gene in MAS, It is considered that additional data and research would be required to clearly define the relation between the SNP allele variants and quantitative traits, such as body weight, body hight, and other body measurements of horses.

## 참고문헌

- Arman, A., Ozon, A., Isguven, P. S., Coker, A., Peker, I. and Yordam, N. 2008. Novel splice site mutation in the growth hormone receptor gene in Turkish patients with Laron-type dwarfism. *Journal of pediatric Endocrinol Metabolism*. 21(1):47-58
- Ascacion-Martinez, J. A., Barrera-Saldana, H. A. 1994. Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone. *Gene*. 143(2):299-300
- Baumann, G. 1999. Mutations in the growth hormone releasing hormone receptor: a new form of dwarfism in humans. *Growth Hormone & IGF Research*. 9:24 - 29.
- Barta, A., Richards, R. I., Baxter, J. D. and Shine, J. 1981. Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78:4867 - 4871.
- Breier, B. H., Vickers, M. H., Gravance, C. G. and Casey, P. J. 1996. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology*. 137(9):4061-4064.
- Breier, B. H., Vickers, M. H., Gravance, C. G. and Casey, P. J. 1998. Therapy with Growth Hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? *Endocrine Journal*. 45:53-60.
- Buonomo, F. C., Ruffin, D. S., Brendemeuhl, J. P., Veenhuizen, J. J. and



- Sartin, J. L. 1996. The effects of bovine Somatotropin (bST) and porcine Somatotropin (pST) on Growth Factor and metabolic variables in horses. *Journal of Animal Science*. 74:886-894.
- Burnside, J., Liou S. S. and Cogburn L. R. 1991. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens. *Endocrinology*. 128(6):3183-3192.
- Byrne, C. R., Wilson, B. W. and Ward, K. A. 1987. The isolation and characterisation of the ovine growth hormone gene. *Australian Journal of Biological Sciences*. 40:459 - 468.
- Carter-Su, C., Schwartz, J. and Smit, L. S. 1996. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual Review Physiology*. 58:187-207.
- Charlton, H. M., Clark, R. G., Robinson, I. C. A. F., Porter Goff, A. E., Cox, B. S., Bugnon, C. and Bloch, B. A. 1988. Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *The Journal of Endocrinology*. 119:51-58.
- Das, P., Meyer, L., Seyfert, H. M., Brockmann, G. and Schwerin, M. 1996. Structure of the growth hormone-encoding gene and its promoter in mice. *Gene*. 169:209 - 213.
- Deng, X. S., Wan, J., Chen, S. Y., Wang, Y., Lai, S. J., Jiang, M. S. and Xu, M. 2008. The correlations between polymorphism of growth hormone receptor gene and butcher traits in rabbit. *Yi Chuan*. 30(11):1427-1432

- DeNoto, F. M., Moore, D. D. and Goodman, H. M. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: Possible alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. 9:3719 - 3730.
- Di Stasio, L., Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Albera, A. and Rolando, A.. 2005. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Animal Genetics*. 36:138 - 140.
- Donahue, L. R., Beamer, W. G. 1993. Growth hormone deficiency in 'little' mice results in aberrant body composition, reduced insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3), but does not affect IGFBP-2, -1 or -4. *The Journal of Endocrinology*. 136:91-104.
- Du, Z. H., Bai, X. J. 2007. Association analysis between SNPs of the growthhormone gene and antler production in spotted deer. *Yi Chuan*. 29(3):337-342.
- Elvinger, F., Hansen, P. J., Head, H. H. and Natzke, R. P. 1991. Actions of bovine somatotropin on polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes in cattle. *Journal of Dairy Science*. 74:2145 - 2152.
- Fiddes, J. C., Seeburg, P. H., DeNoto, F. M., Hallewell, R. A., Baxter, J. D. and Goodman, H. M. 1979. Structure of genes for human growth hormone and chorionic somatomammotropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:4294 - 4298.

- Ge, W., Davis, M. E., Hines, H. C., Irvin, K. M. and Simmen, R. C. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*. 81:641 - 648.
- Gertner, J. M. 1992. Growth Hormone actions on fat distribution and metabolism. *Hormone Research*. 38:41-43.
- Gluckman, P. D., Breier, B. H. and Davis, S. R. 1987. Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the remnant. *Journal of Dairy Science*. 70:442-466.
- Grochowska, R., Zwierzchowski, L., Snochowski, M. and Reklewski, Z. 1999. Stimulated growth hormone(GH) release in Friesian cattle with respect to GH genotypes. *Reproduction, nutrition, development*. 39:171-180.
- Hess-Dudan, F., Vacher, P. Y., Bruckmaier, R. M., Weishaupt, M. A., Burger, D. and Blum, J. W. 1994. Immunoreactive insulin-like growth factor I and insulin in blood plasma and milk of mares and in blood plasma of foals. *Equine Veterinary Journal*. 26:134-139.
- Ip, S. C., Zhang, X. and Leung, F. C. 2001. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 226:458-462
- Kaji, H. 1998. GH receptor gene mutations and growth failure. *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical medicine*. 56:1830-1835

- Kelley, K. W. 1989. Growth Hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 38:705-713.
- Kelley, K. W. 1990. The Role of growth hormone in modulation of the immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 594:95-103.
- Kim, K. I., Yang, Y. H., Lee, S. S., Park, C., Ma, R., Bouzat, J. L. and Lewin, H. A. 1999. Phylogenetic relationships of Cheju horses to other horse breeds as determined by mtDNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics*. 30:102-108.
- Kim, N. Y., Lee, S. S. and Yang, Y. H. 2002. Polymorphisms of the Exons 13, 15 and 16 of Transferrin Gene in Cheju Horses. *Journal of Animal and Technology of Korea*. 44:391-398.
- Kioka, N., Manabe, E., Abe, M., Hashi, H., Yato, M., Okuno, M., Yamano, Y., Sakai, H., Komano, T., Utsumi, K. and Iritani, A. 1989. Cloning and sequencing of goat growth hormone gene. *Agricultural and biological chemistry*. 53:1583 - 1587.
- Kuhnlein, U., Ni, L., Weigend, S., Gavora, J. S., Fairfull, W. and Zadworny, D. 1997. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Animal Genetics*. 28:116-23.
- Lagziel, A., Lipkin, E., Ezra, E., Soller, M. and Weller, J. I. 1999. An MspI polymorphism at the bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. *Animal Genetics*. 30:296 - 299.

- Lechniak, D., Machnik, G., Szydlowski, M. and Switonski, M. 1999. Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. *Theriogenology*. 52:1145 - 1152.
- LeRoith, D., Yanowski, J., Kaldjian, E. P., Jaffe, E. S., LeRoith, T., Purdue, K., Cooper, B. D., Pyle, R. and Alder, W. 1996. The effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system of aged female monkeys. *Endocrinology*. 137:1071-1079.
- Maj, A., Oprzadek, J., Oprzadek, A., Dymnicki, E. and Zwierzchowski, L. 2004. Polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with meat production traits in cattle. *Animal Research*. 53:503 - 514.
- Maj, A., Oprzadek, J., Dymnicki, E. and Zwierzchowski, L. 2006. Association of the polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in polish black-and-white cattle. *Meat science*. 72:539 - 544.
- Malinowski, K., Christensen, R. A., Konopka, A., Scanes, C. G. and Hafs, H. D. 1997. Feed intake, body weight, body condition score, musculation, and immunocompetence in aged mares given equine somatotropin. *Journal of Animal Science*. 75:755 - 760.
- McIlwain, D. L., Hoke, V. B., Kopchick, J. J., Fuller, C. R. and Lund, P. K. 2004. Differential inhibition of postnatal brain, spinal cord and body growth by a growth hormone antagonist. *BMC Neuroscience*. 23:6

- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16:1215.
- Noguchi, T. 1991. Retarded cerebral growth of hormone-deficient mice. *Comparative Biochemistry Physiology*. 98:239 - 248.
- Qin, Q. M., Xu, S. Z. and Gao, X. 2007. Analysis of the correlations between growth hormone receptor gene polymorphism and body size indexes in cattle. *Yi Chuan*. 29:190-194.
- Roskam, W. G., Rougeon, F. 1979. Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene. *Nucleic Acids Research*. 7:305 - 320.
- Sherman, E. L., Nkrumah, J. D., Murdoch, B. M., Li, C., Wang, Z., Fu, A. and Moore, S. S. 2008. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *Journal Animal Science*. 86(1):1-16.
- Stewart, F., Tuffnell, P. P. 1991. Cloning of cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Endocrinology*. 6:189-196.
- Sticker, L. S., Thompson, D. L. Jr., Fernandez, J. M., Bunting, L. D. and Depew, C. L. 1995. Dietary protein and (or) energy restriction in mares:



- plasma Growth Hormone, IGF- I , prolactin, cortisol, and thyroid hormone responses to feeding, glucose and epinephrine. *Journal of Animal Science*. 73:1424-1432.
- Strobel, J. S., Thomas, M. J. 1994. Human growth hormone. *Pharmacological Review*. 46(1):1-34.
- Tanaka, M., Hosokawa, Y., Watahiki, M. and Nakashima, K. 1992. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene*. 112:235 - 239.
- Thompson, D. L. Jr., Rahmanian, M. S., Depew, C. L., Burleigh, D. W., Desouza, C. J. and Colborn, D. R. 1992. Growth Hormone in mare and stallions: pulsatile secretion, response to Growth Hormone Releasing Hormone, and effects of exercise, sexual stimulation and pharmacological agents. *Journal of Animal Science*. 70:1201-1207.
- Viitala, S., Szyda, J., Blott, S., Schulman, N., Lidauer, M., Mäki-Tanila, A., Georges, M. and Vilkki, J. 2006. The Role of the Bovine Growth Hormone Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics*. 173(4): 2151 - 2164.
- Vize, P. D., Wells, J. R. 1987. Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. *Gene*. 55:339 - 344.
- Woychik, R. P., Camper, S. A., Lyons, R. H., Horowitz, S., Goodwin, E. C. and Rottoman, F. M. 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Research*. 10:7197 - 7210.

- Yang, Y. H., Kim, K. I., Cothran, E. G. and Flannery, A. R. 2002. Genetic Diversity of Cheju Horses(Equus caballus) Determined by Using Mitochondrial DNA D-loop Polymorphism. *Biochemical Genetics*. 40:175-186.
- Zhao, G. F., Chen, H., Lei, C. Z., Zhang, C. L., Zhang, L., Lan, X. Y., Fang, X. T. and Kang, X. T. 2007. Study on SNPs of GHR gene and its associations with growth traits in Qinchuan cattle. *Yi Chuan*. 29:319-323
- Zhou, Y., Xu, B. C., Maheshwari, H. G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T. E., Baumann, G. and Kopchick, J. J. 1997. A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene(the Laron mouse). *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:13215-13220.
- 남도영. 2003. 마문화 연구총서 v 濟州馬 牧場史. 한국마사회.
- 양영훈. 2002. Gompertz 성장곡선에 의한 제주마의 발육표준. *제주대학교 아열대 농업생명과학연구지*. 18(2):53-60.
- 양영훈, 김준, 조덕준. 1996. 제주 재래마 성장능력추정. *제주대학교 동물과학연구소. 동물과학논총*. 11:95-101
- 양영훈, 정창조, 이현중, 강태숙. 1991. 제주 재래마 혈통정립 및 혈통등록을 위한 조사연구 II. 제주재래마의 제위측정치에 대한 혈통등급의 고정효과. *한국축산학회지*. 22(6):438-443.

장택지. 2007. 제주마이야기. 제주문화

정창조, 양영훈, 김중계, 강민수. 1991. 제주재래마 혈통정립 및 혈통등록을 위한  
조사연구 I. 제주마의 지역별 성별, 연령별 체형 측정치. 한국축산학회지.  
33(6):418-422.

제주도. 2002. 제주도 제주마.



## 감 사 의 글

“우리에게는 각각 주어진 길이 있다. 하늘이 내려준 존엄한 길이 있다. 어떤 길 인지는 알 수 없지만 다른 사람은 갈수 없다. 나만이 걸을 수 있는, 두 번 다시 걸을 수 없는 소중한 이길, 넓을 때도 있고, 좁을 때도 있다. 오르막이 있는가 하면 내리막도 있다. 평탄할 때도 있는가하면 더듬더듬 땀을 흘리며 가야 할 때도 있다. 이 길이 과연 좋은 것인지 나쁜 것인지 판단이 서지 않을 때도 있다. 위로를 받고 싶을 때도 있을 것이다. 하지만 어차피 이길 밖에는 없잖은가? 포기 하라는 것이 아니다. 지금 서있는 이길, 지금 걷고 있는 이길, 어쨌든 이 길을 쉬 지 않고 가야 하는 것이다. 나만이 갈수 있는 소중한 길이 아닌가. 나에게 주어진 소중한 길, 타인의 길에 마음을 빼앗겨 어쩔 줄 모르고 서있어 봐야 길은 조금도 열리지 않는다. 길을 얻기 위해서는 우선 걸어야 한다. 마음을 다잡고 열심히 걸어야만 한다. 설령 그것이 먼 길이라 여겨져도 쉽 없이 걸으면 새로운 길이 반드시 열리는 법이다.”

동행이인이라는 책의 마지막을 장식했던 말입니다. 저의 대학원생활은 제가 앞으로 나아가는데 있어 거쳐 가야만 했던 주어진 길이었던 것이 아닌가 싶습니다. 힘들 때도 있었고 포기하고 싶을 때도 있었지만 주위의 많은 분들이 있었기에 제가 지금 이 자리에 설수 있었던 거 같습니다. 대학원을 마무리하며 그분들께 조금이나마 감사를 전하고자 이 글을 씁니다.

2년 동안의 공부과정을 끝내면서 그동안 많은 어려움 속에서 얻어진 결과를 논문으로 완성하기 위해 자리를 잡았을 때 그동안 무엇을 했으며 어떻게 써야하나 하는 막연한 생각이 들었습니다. 그러나 지도교수님이신 양영훈 교수님의 배려 깊은 지도에 용기를 낼 수 있었습니다. 양영훈 교수님~! 그 동안의 가르침에 제자로서 정말 깊은 감사의 말씀을 전합니다. 또한 바쁘신 일정임에도 논문을 심사하여 주시고 많은 조언과 유익한 지도로 논문을 교정해주신 정동기 교수님과 류연철 교수님께도 깊이 감사드립니다. 그리고 학교생활을 하는 동안 따뜻한 사랑과 격려를 아끼지 않으시고 바른길로 이끌어주신 이현종 교수님, 강태숙 교수님, 김문철 교수님, 김규일 교수님, 강민수 교수님께도 감사드립니다. 바쁘신 와

중에도 실험에 도움을 주신 이성수 연구사님, 김남영 연구사님께도 감사의 말씀을 드리고 sample를 얻는데 도움을 주시고 용기를 북돋아 주신 제주경마공원 직원분들께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

언제나 학과를 위해 고생하시고 학교생활에 큰 도움을 주신 윤미정 조교선생님과 강동근 조교선생님께도 감사드리고 항상 옆에서 힘이 되었던 우리 유전육종학 실험실에 미경언니, 정말 고마워하는 거 알죠?? 실험에 많은 도움을 줬던 충남오빠, 훈이오빠, 그리고 일 다니라 바쁜 와중에도 항상 언니를 챙겨주었던 미나와 순희, 개구장이 승호와 지선이에게도 진심으로 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 같이 대학원생 생활을 하고 많은 걱려를 했던 강태훈, 권태준, 정진우, 김동석, 김경균, 강용준, 안철수, 고경보, 배재호 오빠와 우리 만학도 이신 강옥득 언니에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 다른 과이지만 항상 힘이 되었던 고우리 선생님께도 감사의 말을 전합니다. 같은 과에서 많은 것을 함께했던 소형이와 세현이, 정말 고마워하는 거 알지? 그리고 둘도 없는 친구인 어진이와 옥희에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 이름은 말하지 않았지만 주위에 도움을 주신 분들께 진심으로 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

이 모든 것을 이룰 수 있도록 뒤에서 지켜봐주시고 제가 하고 싶은 일을 모두 할 수 있도록 도와주신 부모님께도 말로써는 다 표현을 못하지만 정말 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 그리고 영국 멀리에서도 동생이 잘되길 바라면서 힘을 줬던 우리 문찬이오빠, 그리고 항상 무한한 힘이 날수 있도록 도와주고 믿어준 우리 막내 문철이에게도 고마움을 표현하고 싶습니다. 그리고 무엇보다 힘들거나 지칠 때 다시 일어설 수 있게 끊임없는 격려와 사랑을 해준 진호오빠에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

앞으로 저를 믿고 지켜봐준 사람들에게 실망시키지 않도록 포기하지 않고 끊임없는 노력으로 사회에 당당히 설수 있는 씩씩한 김성미가 되어 이 고마움을 보답하고 싶습니다.

2010년 2월

김 성 미