PCR-RFLP를 이용한 한우 주조직적합성복합체 유전자의 다형성에 관한 연구

김종배
(한동대학교 생의학연구소)

The Detection of BoLA-DRB polymorphism in Korean native cattles by using PCR-RFLP

Jong-Bae Kim
Institute of Biomedical Research Center Han Dong University

적 요

본 연구는 우리나라 고유가축인 한우를 대상으로 하여 한우의 MHC class Ⅱ 유자중 DRβ exon2 영역에 대하여 PCR을 실시한 후 그 산물을 일정 제한효소로 절단하고 그 절단단편을 분류하여 DR 유전자의 다형성 관계를 알아보고자 실시하였다. 이와함께 위 유전자 영역에서 한우와 외국소의 유전자 다형성 비교를 겸하였다. 총 60두의 한우 혈액으로 부터 Genomic DNA를 추출하였고, MHC class Ⅱ DRβ exon 2유전자에 대한 PCR을 실시하여 310bp 가량의 산물을 얻었다. 제한효소중 Pst Ⅰ으로 PCR 산물을 절단하여 217bp 와 93bp로 절단되는 형태와 절단 부위가 없는 두가지 절단형태를 얻었고 이들 절단형태들이 60두 한우에 대하여 분포되어 3개의 대립형질형으로 구분되었다. 제한효소 Hae Ⅲ에 의하여 178,80,52bp 절단형태, 230,80bp 절단형태와 201,29,80bp의 3가지 절단 형태를 얻었고 이들 절단형태들이 60두 한우에 대하여 분포되어 4개의 대립형질형으로 구분되었다. 제한효소 Pst Ⅰ, Hae Ⅲ에 의한 다형성 연구에 기초하여 한우 MHC class Ⅱ DRβ유전자에 대하여 모두 5개의 대립형질을 분류하였고 이들 대립형질이 60두 한우내에 10개의 대립형질형으로 조합분포 되어 있음을 알 수 있었고 한우의 경우에 있어서는 최소한 3개이상의 DRβ부유전자 영역이 존재함을 알 수 있었다.

Ⅰ. 서 론

소의 MHC (Bovine Lymphocyte Antigen; BoLA)에 대한 연구는 사람의 MHC (Human Lymphocyte Antigen) 연구를 기초로 하여 이루어 지고 있으며 이러한 연구결과에 의해 DP, DQ, DR, DN, DI, DY등의 부유전자 영역(Subregion gene)으로 구분하고 각 부유전자 영역별로도 , α,βsubunit에 대한 유전자가 따로 존재하고 있는 것으로 보고됐다(Andersson,등 1988; Muggli-Cockett,등 1989; Stone,등 1990).

BoLA class Ⅱ 유전자중 DQ, DR부유전자 영역은 다형성 연구가 가장 활발하게 진행되고 있다. 다형성을 연구하는 방법은 단백질을 대상으로 1차원 IEF (Isoelectric Focusing; Joosten,등 1989)를 실시하여 단백질 차원으로 접근하는 경우와 유전자를 대상으로 하는 경우로 나눈다. 그리고 유전자를 대상으로 하는 방법에는 Southern blot을 통한 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법이 널리 쓰이고 있으며(Andersson,등 1986 a, b; Muggli-Cockett,등 1988), 최근엔 효소중합연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction; PCR)을 유전자 다형성 연구에 이용하고 있는데 PCR을 이용한 다형성 연구는 PCR-RFLP, PCR-SSCP(Single Strand Conformational Polymorphism) 그리고 RAPD (Rapid Amplified Polymorphisms DNA)등으로 나누고 있다. RAPD는 유전자상에 반복적으로 존재하는

Minisatellites 유전자를 primer로 사용하여 비특이적으로 증폭되는 단편들간의 차이를 이용하여 다형성을 파악하는 방법이다(Nakamura,등 1993; Ellegren,등 1993). PCR-SSCP는 PCR을 실시한 산물을 단일가닥으로 분리한 후 Polyacrylamide gel에 전기영동하여 염기배열의 차이가 있을 경우 전개되는 시료의 이동거리 차이가 발생하는 원리를 이용하여 다형성을 파악하는 기법을 말한다(Joosten,등 1989; Neibergs,등 1993).

그리고 PCR-RFLP기법은 한 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 작성하여 PCR을 통해 유전자 산물을 다량으로 얻은 후 일정한 제한 효소로 절단하여 그 절단되는 형태의 차이로 대상 유전자의 다형성을 파악하는 기법으로 기존의 RFLP방법보다 간편하고 신속하게 다형성 연구를 수행할 수 있는 장점을 지니고 있다(Maeda,등 1989; Uryu,등 1990).

MHC 유전자 다형성 연구의 중요성은 다형성 연구에 의한 형태별 분류와 사람이나 기타 포유류의 질병저항성, 그리고 여러가지 중요한 면역작용이 밀접한 관계가 있다는 보고 때문이다(Lewin, 1989). 최근에는 MHC 다형성과 질병저항성간의 구체적인 연계를 밝히고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Ronningen,등 1991; Rodu,등 1991; Schellander,등 1992).

본 연구는 PCR-RFLP기법을 이용하여 한우 MHC class Ⅱ DR 부유전자 영역중 β-subunit중에 β_1-domain을 구성하는 exon 2 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용하여 PCR을 실시하고 그 PCR산물을 Pvu Ⅱ, Taq Ⅰ, Pst Ⅰ, Hae Ⅲ, Rsa Ⅰ 등의 제한효소로 절단하여 제한효소에 따른 한우 MHC 유전자의 다형성을 알아보고자 실시하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 한우 혈액 시료

본 연구에 사용한 한우는 대관령 고령지 시험장에서 종보존중인 한우개체의 사양관리 실적을 토대로 하여 선발하였다. 총 60두를 선발 하였으며 선발의 기준은 되도록 제한된 가계내에서 많은 세대에 걸친 개체들을 선택하였다. 이와같은 선발의 이유는 일정한 한 가계나 제한된 수의 가계내에서 여러대의 번식을 이룬 개체를 선발함으로써 특정 유전자 영역에서의 다형성 관계를 좁은 범위에서 점차 많이 발견할 수 있기 때문이다.

2. 증폭영역과 Primer의 선정

한우 Genomic DNA 의 준비는 BRL사의 Genomic DNA 추출방법에 따라 실시하였으며, TE 완충액(Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.0)에 0.4mg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

PCR을 실시하기 위한 primer의 선정은 Groenen등(1990)이 Cloning하고 염기서열을 분석한 DRB3 A1 clone의 염기서열을 기초로 하여 선정하였다. 5′primer는 32mers로써 염기배열은 5′-ATGGATCCT-CTC-TCTGCAGCAGCACATTTCCT-3′으로 5′말단에 11개의 intron염기배열을 포함하고 있으며 3′primer는 24mers로써 염기배열은 5′-GAA -TTCGCGCTCACCTCG-CCGCTG-3′으로 5′말단에 5개의 intron염기배열을 포함하고 있다(Sigurdardottir,등 1991; van Eijk,등 1992). 증폭되는 영역은 구체적으로 MHC class Ⅱ DRβ의 β_1-domain 영역으로 이 부위는 세포나 조직으로부터 기인한 항원(Endogeneous Antigen) 을 T cell 에 제시하여 T cell을 활성화 시켜 줄때 α-subunit의 α_1-domain과 함께 항원과 결합하는 부위로써 유전자 다형성이 가장 많이 발견되는 것으로 보고된 영역이다(Muggli-Cockett,등 1988).

3. 한우 MHC DRB exon 2 영역 증폭

PCR조건은 최종반응 부피 100μl를 기준으로 하여 10×PCR 완충용액(Perkin Elmer Cetus)을 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.01% Gelatin이 되도록 하였으며, 각각의 dNTP를 100μM농도로 하였고, 각 primer는 0.2μM을 넣어주었다. Genomic DNA는 800ng을 넣어주었고 이상의 반응요소들을 PCR용 tube에 넣은 후 95℃(95℃)에서 5분간 Denaturation시킨 후 급냉하고 이후 Taq DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus) 4unit을 넣고 PCR을 실시하였다. 반응은 94℃에서 1분간 Denaturation 하고 60℃에서 2분간 Annealing하며 72℃에서 1분간 Extension하여 총 30 cycle을 실시하였다. 마지막 Extension은 72℃에서 5분간 실시하였다. 그리고 모든 효소중합연쇄반응은 Thermolyne사의 기기를 사용하였다.

4. 증폭한 DNA 의 제한효소 절단 및 결과판독

PCR을 실시한 산물의 염기수는 310bp정도의 크기로 다형성 조사를 위하여 여러가지 제한효소로 절단 후 전기영동을 실시하여 파악하였다. 증폭하여 얻어낸 PCR 산물 100㎕ 에서 20㎕를 우선 전기영동을 실시하여 정확한 산물의 획득여부를 확인한 후 제한효소 절단을 위하여 phenol 처리와 ethanol침전 방법을 이용하여 순도를 높였고, 최종 50㎕ 로 농축하였다. 제한효소에 의한 절단 조건은 15㎕의 PCR산물을 이용하여 제조사의 절단 지침에 의하여 실시하였다. 그들 제한효소중에 유전자 다형성이 관찰되는 Pst Ⅰ과 Hae Ⅲ에 의한 다형성과 이들 제한효소의 조합에 의해 구분되는 대립형질들(alleles)을 분석하였다.

작은 단편들의 확인을 위해 ϕ X174 DNA를 Hinf Ⅰ 제한효소로 절단한 것(Promega)을 유전자 표지물질(marker)로 사용하였고, 절단하지 않은 PCR 산물을 Positive Control로 사용하였다. 그리고 전기영동은 Mini-gel kit(Hoefer)을 사용하였으며 gel은 3% Nusieve agarose(FMC)를 사용하였다. Gel staining은 Ethidium Bromide (0. 5 g/ml)을 gel 형성시 넣어주었고, U. V transilluminator (Fotodyne)상에서 band를 확인하여 Polaroid 667 film (Polaroid Corp)으로 결과보존 하였다.

Ⅲ. 결과 및 비고

1. PCR 산물의 확인

한우 MHC 유전자 증폭을 위해 외국우의 DRβ 유전자의 염기배열을 기본으로 작성한 Primer에 의한 PCR의 실시는 PCR산물을 얻는데 어려움이 없었다. 산물의 농도를 Spectrophotometer를 이용하여 Abs_{260}으로 측정한 결과 약간의 차이가 발견되기는 하였으나 대략 0.25㎍/㎕인 것으로 확인되었다. PCR 산물의 전기영동 결과는 Fig.1 과 같다. PCR 산물의 band는 ϕ X174/Hinf Ⅰ marker의 311bp band와 거의 유사한 위치를 나타내고 있다.

2 . Pst Ⅰ에 의한 다형성 관찰

Pst Ⅰ에 의한 절단 형태별 분류는 ①,② 와 같이 2가지(Fig. 3)를 관찰하였다. Pst Ⅰ제한효소에 대한 절단 부위가 없는 ①을 대립형질형(Allelic pattern) a 로 보고 ②와 같이 217bp와 93bp로 절단되는 형태를 Allelic pattern b로 분류하였다. 그리고 이 두가지 형태가 한 시료에 동시에 증폭되는 경우를 c 로 하여 모두 3개의 allelic patterns로 구분하였다(Fig. 2). Pst Ⅰ에 의한 각 allelic patterns별 한우시료수는 Table 1과 같다.

① 과 같은 형태로 절단되는 경우는 염기배열 조사결과 PCR 산물 310bp 중에 3′말단에 절단부위가 있는 것으로 밝혀졌다(Groenen,등 1990). ① 와 ② 에서와 같이 Pst Ⅰ에 의한 제한절단을 시도함으로써 유전자 다형성을 관찰하였다.

Table 1. The distribution of allelic patterns(Pst Ⅰ) in Korean native cattles' DRβ exon 2 gene.

	Allelic Patterns		
	a	b	c
No. of Samples	15	29	16
Total	60		

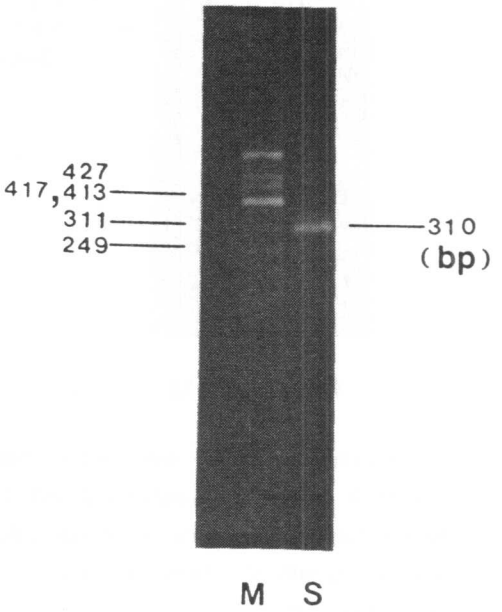

Fig. 1. PCR products of DRB exon 2 genes. Marker sizes were indicated on the left side and the PCR products' size on the right side.
M : ϕ X174/Hinf Ⅰ
S : PCR products

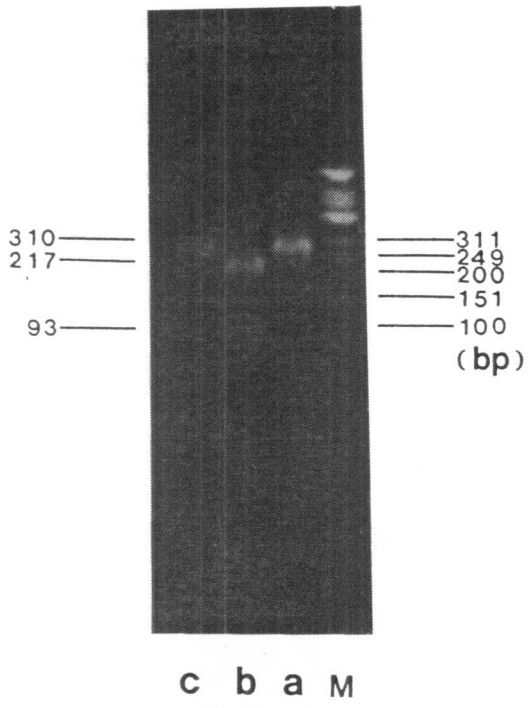

Fig. 2. Allelic patterns of Korean native cattles' DRB /β exon 2 obtained by digestion with Pst Ⅰ. Marker sizes were indicated on the right side, and the fragments size on the left side.

M : ϕ ×174/Hinf Ⅰ

a : allelic pattern a

b : allelic pattern b

c : allelic pattern c

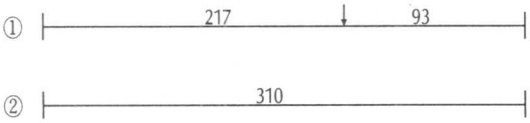

Fig. 3. Restriction Enzyme sites of DRβ exon 2 region of Korean native cattles by Pst Ⅰ. '↓ 'indicated the position of restriction site and the arbic numbers mean the size of fragmentds

3. Hae Ⅲ에 의한 다형성 관찰

Pst Ⅰ을 이용하여 Allelic patterns을 관찰하고 Allele을 분류하기 위하여 Hae Ⅲ 를 사용하여 다형성을 관찰하였다.

Hae Ⅲ에 의한 allelic patterns의 관찰은 Fig. 5 에서와 같이 a,b,c,d 의 4가지 Allelic patterns으로 나타났다. a의 경우는 PCR 산물에 두개의 절단부위가 있어서 178, 80, 52bp 3개의 단편으로 절단되어 Fig. 4의 ①과 같은 절단형태를 나타내었고 이러한 결과를 보인 한우시료는 Table 2에서와 같이 전체 한우시료중 32두로 가장 많은 경우로 관찰되었다.

Fig. 4의 ①과 같은 결과는 van Eijk 등(1992)이 동일한 제한효소로 자국우(10종 168두 ; Angus, Ayrshire, Brown-Swiss, Gelbrieh, Guernsey, Jersey, Holstein-Friesian, Polled Hereford, Simmental 과 South Devon)에 대해 실시한 다형성 조사 결과인 a 형태와 동일한 것으로 조사되었다. b의 경우는 a와는 달리 178, 52bp간 절단부위가 생략되어 230,80bp 두개 단편으로 절단되는 모양으로 Fig. 4의 ②와 같은 절단형태이다. 이 결과도 van Eijk 등(1992)의 결과에서 b의 경우와 동일하였다. c은 a와 b가 함께 나타나는 Allelic pattern을 발견할 수 있었다. 이러한 다른 Allelic pattern을 지니는 한우개체는 전체시료중 10두로 나타났다(Table 2). d의

Table 2. The distribution of allelic patterns(Hae Ⅲ) in Korean native cattles' DRβ exon 2 gene.

	Allelic Patterns			
	a	b	c	d
No. of Samples	32	15	10	3
Total	60			

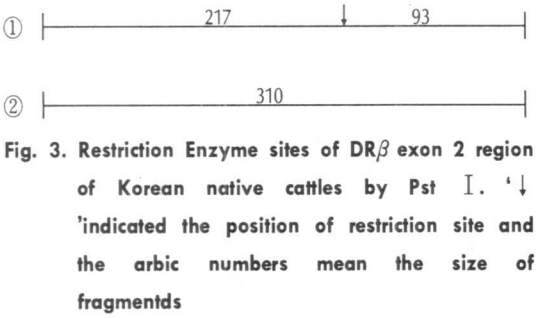

Fig. 4. Restriction Enzyme sites of DRβ exon 2 region of Korean native cattles by Hae Ⅲ. '↓' indicates the position of restriction sites and the arabic numbers mean the size of fragments.

경우에서도 3개의 유전자 단편들이 혼합된 형태로 나타나고 있다. Hae Ⅲ에 의해 나타나는 DRβ exon 2 유전자 영역에서의 다형성 위치를 Fig. 4에 모두 나타내었다. 모두 3 부위에 걸쳐 유전자 다형성을 나타내고 있다. 위와같이 ①,②,③의 모든 절단형태가 한 allelic patterns에 나타나 있는데 이러한 결과로써 추측할 수 있는 것은 한우는 최소한 3개이상의 DRβ subunit이 존재할 수 있다는 것이다.

DRβ subunit은 외국우에 대한 연구에서도 3개의 subunit이 존재하고 이중 한 subunit이 pseudogene으로 존재한다고 보고하고 있는데 한우의 경우에서는 pseudogene의 존재를 확인하지 않았으나 그들의 결과와 어느정도 일치하고 있다(Stone,등 1990).

실질적으로 Hae Ⅲ에 의한 본 실험에서 얻은 제한효소별 절단단편 분류는 ①,②,③ 3가지로 나타났다. 이같은 결과는 van Eijk 등의 결과에서 6가지 절단 단편형태중 3가지 절단 단편형태가 일치함을 알 수 있었고, 위 유전자 영역에 대한 한우만의 독특한 유전자 다형성은 관찰되지 않았다. 보다 다양한 한우가계의 시료를 대상으로 동일한 실험을 실시하면 보다 많은 다형성을 발견할 수 있으리라 생각하며 위에서 사용한 제한효소이외에 다른 제한효소를 사용함으로써 보다 자세한 한우 MHC 유전자 alleles을 파악할 수 있으리라 생각한다.

4 . 한우 DRB 유전자 Alleles의 분류

한우 DRB 유전자를 대상으로 Pst Ⅰ 과 Hae Ⅲ 제한효소를 이용하여 다형성 관찰을 실시함으로써 모두 5개의 alleles이 존재함을 발견하였다. Pst Ⅰ에 의해 5′으로 부터 217bp 위치에 절단 부위가 있는 경우와 이 부위가 없는 경우만으로 나누어진 alleles이 Hae Ⅲ에 의해 절단부위가 5′으로 부터 178bp 201bp 230bp 위치에 존재하는 경우로 모두 5개의 alleles으로 존재함을 파악하였다(Fig. 6).

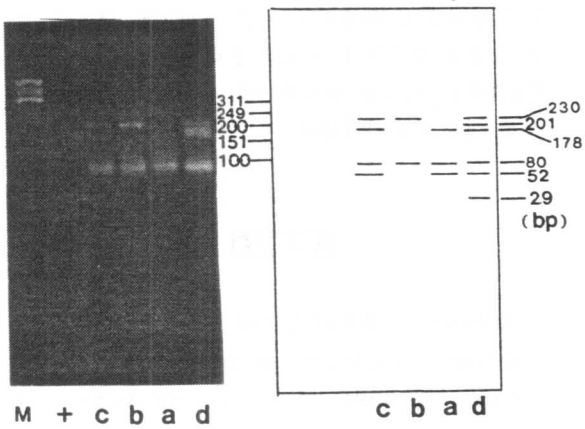

Fig. 5. Allelic patterns of Korean native cattles' DRβ exon 2 obtained by digestion with Hae Ⅲ. Marker sizes were indicated on the left side and the fragments size on the right side. Fragments less than 50bp were not clearly resoved by the gel system used.

M : ϕ ×174/Hinf Ⅰ
\+ : positive control
a : allelic pattern a
b : allelic pattern b
c : allelic pattern c
d : allelic pattern d

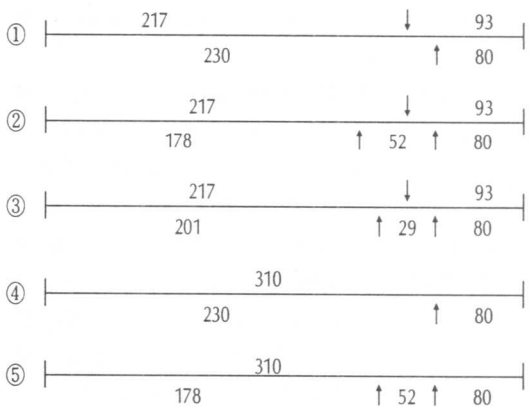

Fig. 6. The five different DRβ exon 2 alleles in Korean native cattles. '↓', '↑'indicates the position of restriction sites. Upper side numbers mean the fragments size restricted by Pst Ⅰ and below side numbers mean the fragments size restricted by Hae Ⅲ.

그리고 한우 시료별로 DRβ exon 2 영역에 대한 alleles이 조합분포되어 10가지 allelic patterns이 한우중에 나타남을 발견하였다(Table 3). 이들 각각의 Allelic patterns은 염기서열 분석을 통해 확인하는 과정이 필요하다.

Table 3. The comprision of distribution and allelic-patterns at the region of DRB exon 2 in Korean native cattles.

Allele types of Korean native cattles' DRB exon 2	유형		시료수 (n=60)
	Pst Ⅰ	Hae Ⅲ	
DRB−PbHa	b	a	21
DRB−PbHb	b	b	2
DRB−PbHc	b	c	3
DRB−PbHd	b	d	3
DRB−PcHa	c	a	5
DRB−PcHb	c	b	6
DRB−PcHc	c	c	5
DRB−PaHa	a	a	6
DRB−PaHb	a	b	7
DRB−PaHc	a	c	2

Allelic patterns에 관한 명명은 DRβ 유전자 영역임을 나타내는 DRB을 표기하고 Pst Ⅰ에 의한 allelic pattern a,b,c와 Hae Ⅲ에 의한 allelic pattern a,b,c,d를 연결하여 분류하였다.

Pst Ⅰ에 의한 결과는 3가지 allelic patterns로 국한되었으나 Hae Ⅲ에 의하여 4가지로 다시 구분할 수 있었고, Pst Ⅰ의 allelic patterns c는 Hae Ⅲ에 의하여 3가지로 다시 구분할 수 있었다. Pst Ⅰ의 allelic patterns a 역시 Hae Ⅲ에 의하여 2가지로 세분할 수 있었다. DRB-PbHa allele의 경우가 한우에서 가장 많이 존재하는 allelic patterns로 나타났고 다른 allele들의 경우는 비교적 고른 분포를 보이고 있으며 한우에 있어서는 Pst Ⅰ에 의한 allelic pattern a,c를 나타내며 Hae Ⅲ의 allelic pattern d를 나타내는 경우가 발견되지 않았다. 그리고 한우는 우리나라 토착환경에서 계속 적응하여 왔기 때문에 전술한 allelic patterns중 특히 DRB-PbHa 의 경우 한우중 가장 흔한 형태를 보이고 있기 때문에 이러한 allele을 지닌 한우가 토착환경에 가장 적응을 잘할 수 있는 개체일 가능성이 높다. 이러한 Allelic pattern을 응용적 측면에서 살펴보면 외국우에 대하여 동일한 실험을 실시하여 한우에서 발견되면서 외국우에서 발견되지 않는 allelic pattern이라면 한우와 도입우를 구별할 수 있는 일종의 유전자 Marker로써 활용할 수 있으리라 사려된다. 그러므로 이러한 alleles들과 토착환경에 기인한 질병, 증체률, 질병저항성등의 표현형들과 연계된 연구는 앞으로 계속 추진해 볼 가치가 있으며 이러한 결과를 사양,육종에 이용하게 되면 유전적인 면에서 사양, 육종에 응용하게 되므로 종래의 사양,육종 연구 방법들과는 시각을 달리하면서 우수한 한우를 선발할 수 있으리라 사려된다.

참고문헌

1. Andersson, L., Bohme J., Rask L. and Peterson P. A. Genomic hybridization of bovine major histocompatibility genes : 1. Extensive polymorphism of DQ$\alpha$and DQβ genes. *Animal Genetics* **17**: 95-112, 1986a.
2. Andersson, L., Bohme J., Peterson P. A. and Rask L. Genomic hybridization of bovine class Ⅱ major histocompatibility complex genes : 2. Polymorphism of DR genes and linkage disequilibrium in the DQ-DR region. *Animal Genetics* **17**:295-304, 1986b.
3. Andersson, L., Lunden A., Sigurdardottir S., Davies C. J. and Rask L. Linkage relationships in the bovine MHC region recombination frequency betwwen calss Ⅱ subregions. *Immunogenetics* **27**:273-280, 1988.
4. Bethesda Research Laboratories Genomic DNA Isolation System : Instruction Manual.

5. Ellegren, H., C. J. Davies, and L. Andersson. Strong association between polymorphisms in an intronic microsatellite and in the coding sequence of the BoLA-DRB3 gene : implications for microsatellite stability and PCR-based DRB3 typing. *Animal Genetics* **24**:269-275, 1993.
6. Groenen, M. A. M., van der Poel J. J., Dijkhor R. J. A. and Giphart M. J. The nucleotied sequence of bovine MHC class Ⅱ DQB and DRB genes. Immunogenetics **31**:37-44, 1990.
7. Hood, L., M. Steinmetz, and B. Malissen. Genes of the major histocompatility complex of the mouse. *Annual Review of Immunology* **1**:529-568, 1983.
8. Jeffreys, A. J., and D. B. Morton. DNA fingerprints of dogs and cats. Animal Genetics **18**:1, 1987.
9. Joosten, I., Sanders M. F., van der Poel A., Williams J. L., Hepkema B. G. and Hensen E. J. Biochemically defined polymorphism of bovine MHC class Ⅱ antigens *Immunogenetics* **29**:213-216, 1990.
10. Lewin, H. A Disease resistance and immune response genes in cattle : Strategies for their detection and evidence of their existence *J. Dairy Sci.* **72**:1334-1348, 1989.
11. Maeda, M., Murayama N., Ishii H., Uryu N., Ota M., Tsuji K. and Inoko H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* **34**:290-298, 1989.
12. Muggli-Cockett, N. E. and Stone R. T. Identification of genetic variation in the bovine major histocompatibility complex DR -like genes using sequenced bovine genomic probes. *Animal Genetics* **20**:361-370, 1988.
13. Muggli-Cockett, N. E. and Stone R. T. Partial nucleotide sequence of a bovine major histocompatibility class Ⅱ DRβ-like gene. *Animal Genetics* **20**:361-370, 1989.
14. Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, and R. White. Variable Number of Tandem Repeat(VNTR) markers for Human Gene Mapping. *Science* **235**:1616-1622, 1987.
15. Neibergs, H. L., A. B. Dietz and J. E. Womack 15. Single-strand conformation polymorphisms(SSCPs) detected in five bovine genes. *Animal Genetics* **24**: 81-84, 1993.
16. Rodu, B., C. Christian, R. C. Snyder, R. Ray and D. M. Miller Simplified PCR-based detection and typing strategy for Human Papillomaviruses utilizing a single oligonucleotide primer set. *Bio Techniques* **10**:632-636, 1991.
17. Ronningen, K. S., A. Spurkland, T. Iwe, F. Vartdal, and E. Thorsby. Distribution of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and DQA1, DQB1 genotypes among Norwegian patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* **37**:105-111, 1991.
18. Schellander, K., J. Peli, T. A. Taha, E. Kopp & B. Mayr Diagnosis of bovine freemartism by the polymerase chain reaction method. *Animal Genetics* **23**:549-551, 1992.
19. Stone, R. T. and Muggli-Cockett N. E. Partial nucleotide sequence of a novel major histocompatibility complex class Ⅱβ-chain gene,BoLA-DIB *Animal Genetics* **21**:353-360, 1990.
20. Uryu, N., Maeda M., Ota M., Tsjuji K. and Inoko H A simple and rapid method for HLA-DRB and DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* **35**:20-31, 1990.