

## Multiplex PCR을 이용한 한우 개체식별 microsatellite marker system 설정

오재돈 · 이승규 · 홍윤숙 · 박미현 · 임현진 · 소현경  
이학교\* · 최강덕 · 전광주.

한경대학교 유전정보연구소.

### 서 론

Multiplex PCR(다중증폭)기법은 일반 PCR기법을 변형한 형태로서 두개 또는 그이상의 유전자내 지역을 각각의 primer를 이용하여 동시에 증폭시키는 방법이다. 이 방법은 한번의 PCR을 통해 DNA의 여러 지역을 증폭시킬 수 있어 매우 경제적인 방법이다. 1988년 처음 발표(Chamberlain et al., 1988)된 이후 지속적인 연구를 통해 발전해왔다. 다중증폭을 이용하여 DNA 검사를 위해 여러 지역을 증폭하는데 성공하였으며 분석을 통해 염기유전자 일부의 결실지역과 변이지역 그리고 다형성 및 QTL 탐색에 이용되어지고 있다(Anonymous., 1992; Henegariu et al., 1994; Mansfield et al., 1993; Mutirangura et al., 1993; Shuber et al., 1993; Crisan, D., 1994). 따라서 본 연구는 다양한 DNA다형관찰 기법을 바탕으로 한우집단의 유전적 특성을 규명하고 이에 근거한 한우개체의 추적, 동일성을 검정 및 친자확인을 위한 유전학적 개체 인식 시스템에 소요되는 마커 시스템을 효율적이고 경제적으로 설정하여 이를 이용하고자 하는 것이며, 또한 Microsatellite DNA Marker Values의 오차 범위를 통계를 통해 산출하고 이에 따라 오차 범위 안의 값들을 일정한 Code 형태로 변환하여 DataBase화하는 방법을 정의 하고 있다. 더불어 개체 식별 친자 확인 세대 검증 등에 다양하게 이용할 수 있는 기법을 정의 하고 있다.

### 재료 및 방법

#### 1. 공시재료 및 표지유전자

공시재료는 후보 유전자 표지(MS)의 소 품종별 발현 특성의 분석을 위해 한우를 포함한 외래 품종 집단(3품종)을 분석에 공시하였으며 소에서 개발된 microsatellite marker 중국계 축산 연구소에서 개발된 marker와 ISAG(국제동물유전학회)에서 소의 유전적 다양성 연구를 위해 개체 식별 및 친자 감정 등에 활용하도록 권장하는 marker등 총 21종의 microsatellite를 사용하였다.

## 2. microsatellite 유전자형 분석

20개 marker의 최적의 온도조건을 설정하기 위하여 우선 single marker로 Gradient PCR을 실시하였다. 설정된 온도와 각각의 형광 염색된 microsatellites의 색상과 크기별 분포 등을 고려하여 그룹을 조합하여 multiplex PCR을 수행하였다. 증폭산물을 Amersham bioscience Loading Solution과 550R Size standard를 섞은 Mixture와 잘 혼합하여 95℃ 상에서 3분간 denaturation시킨 후 ice에 3분간 보관, megabace(Amersham Bioscience)를 사용하여 gene scan을 실시하였다. Genetic profiler를 이용하여 각 PCR 단편들의 크기를 3차원 최소자승법(Third order least squares method)으로 분석하였고 microsatellites loci별 대립유전자들의 정확한 크기를 결정하였다.

## 3. 통계분석

$$\text{Het} = 1 - \sum_{i=1}^n \tilde{P}_i^2$$

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n \pi_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \pi_i^2 \pi_j^2$$

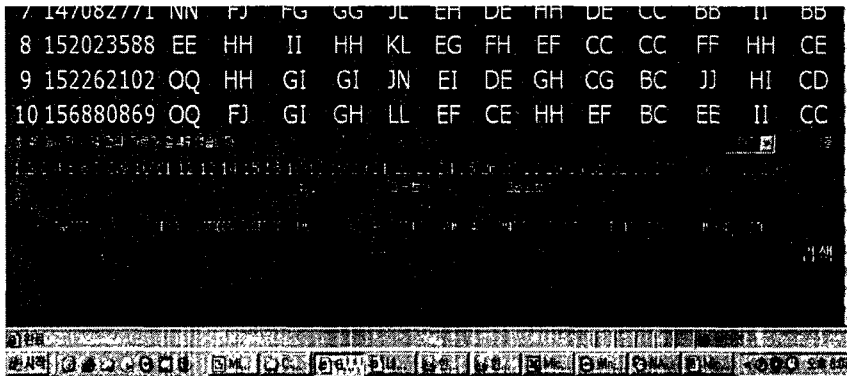
## 4. 오차식별의 설계

산술적인 최빈값(Mode;MO)을 기준으로 1.0의 Marker Values를 갖고 산술적 평균(Mean;  $\bar{X}$ )을 구할 수 있다. 평균  $\bar{X}$ n (최소값으로부터 n번째  $\bar{X}$ )를 기준으로 0.5의 범위(Range; R)를 구할 수 있는데 실험 통계적으로 이 범위 안 쪽에 Marker Values들이 정규 분포 곡선에 가깝게 존재함을 알 수 있다[표1]. 즉,  $\bar{X}$ n0.5의 범위 밖에 있는 값은 신뢰가 떨어지는 Marker Values라고 할 수 있다. 앞서 주어진 130.9, 131.2, 131.5, 131.7, 131.9와 같은 값들 중 산술 평균( $\bar{X}$ n)이 131.4일 경우 131.9를 제외한 나머지 값들이 오차 범위 안의 값으로써 신뢰할 수 있다. 앞선 예와 같이 신뢰 할 수 있는 Marker Values를 취사선택하여 좀더 정확한 실험의 결과를 얻을 수 있다. 따라서 각 Marker의 최빈수를 기준으로 평균을 구하는 것이 매우 중요하다.

## 결과 및 고찰

분석 결과 21개의 microsatellite marker에서 대립유전자는 총 231개가 관찰 되었으며, 각 marker별 관찰된 allele은 8~18개로 다양하게 나타났다. 또한 Heterozygosity는 BL23에서 0.84로 가장 높게 나타났으며, PIC값은 BL1009에서 0.828로 가장 높게 나타났다. ILSTS028은 관찰된 allele의 개수는 13으로 높았으나 Heterozygosity와 PIC값이 각각 0.36과 0.35로 가장 낮게 나타났다. 이는 allele의 개수가 많더라도 출현빈도가 극단적으로 편중되어 있음을 시사한다. 따라서 개체식별을 위한 marker로서의 활용가치가 가장 낮음을 알 수 있었다. Marker의 유용성을 판단하기 위하여 PIC값을 기준으로 하여 내림차순으

로 정렬하여 제시하였다. ILSTS028 과 ILSTS013을 제외한 19개의 marker들은 Heterozygosity와 PIC값이 0.6 이상으로 개체식별을 위한 marker로서의 유용성이 인정되었다.



그림[1] 프로파일링을 통해 코드화 한 결과

Heterozygosity 그리고 PIC값을 고려하여 최종적으로 BMS1747, BM2113, BL1009, ILSTS103, BM1824, TGLA126, ETH3, ETH225, TGLA227, TGLA53, SPS115, BL23, ETH10, ILSTS00을 이용하여 두개의 조합을 결정하였다. 분석을 통한 genotype 결과를 프로파일링을 통해 코드화 한 결과를 그림[1]에서 제시하였다.

## 요 약

본 연구에서 제시한 14개의 MS Marker를 Multiplex PCR증폭하여 genotyping 함으로서 개체식별이 높고 한우에서의 오류를 최소화 할 수 있는 marker system을 구축 할 수 있으며 본 연구에서 제시한 방법을 통해 프로파일링을 통하여 코드화 함으로서 분석의 오류를 최소화 하고 또한 여러 실험실에서 생성된 data들과 공유 및 비교하는데 있어 문제가 없으며 다른 연관된 연구 및 분석에 있어서 더욱 유리한 것으로 판단되어 진다.

## 참 고 문 헌

Chamberlain, J. S., R. A. Gibbs, J. E. Ranier and C. T. Caskey. 1990. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy, p. 272-281. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White(Eds.), PCR protocols. A Guide to Methode and Applications. Academic Press, San Diego.

- Chamberlain, J. S., R. A. Gibbs, J. E. Ranier, P. N. Nguyen and C. T. Caskey. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acides Res.* 16:11141-11156.
- Crisan, D. 1994. Molecular diagnostic testing for determination of myeloid lineage in acute leukemias. *Ann. Clin. Lab.Sci.* 24:355-363.
- Henegariu, O., P. Hirschmann, K. Kilian, S. Kirsch, C. Lengauer, R. Maiwald, K. Mielke and P. Vogt. 1994.. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletion in AZF, A genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia* 26:91-106
- Mansfield, E. S., J. M. Robertson, R. V. Lebo, M . Y. Lucero, P.E. Mayrand, E. Rappaport, T. Parrella, M.Sartore, S. Surrey and P. Forina. 1993. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am.J. Med. Genet.* 48:200-208.
- Nei, M.(1972) Genetics distance between populations, *Am. Nat.* 106: 283-292.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.