

Construction of DNA marker for traceability in Hanwoo

*Jae chul Kwon*¹, *Yu-mi Choi*², *Sung-won Rhee*³,
*Jung-Sou Yeo*⁴, *Jea-young Lee*⁵

Abstract

Considering all the factors involved in beef production, individual identification using DNA marker testing is the most appropriate solution to give all the breeders' information to the consumers. After taking into account the genealogical information from the Hanwoo, only animals that did not share some parent or grandparent were analysed 33 from the 305 initially sampled. Ten major microsatellite markers were selected from allele amplified and their frequencies, H(Heterozygosity) and PIC(Polymorphism information content) with Hardy-Weinberg equilibrium. Next, in order to evaluate the power of the markers selected on the individual animal identification, the match probability(MP) and the relatedness coefficient(R) were computed.

1. 서론

우리의 고유한 유전자원인 한우는 오랫동안 농촌경제 측면에서의 필요성과 국민들의 관심으로 유지, 개량, 보존되어 왔다. 특히 닭, 돼지, 소의 경제 동물 가운데 우리나라 고유의 품종으로 유지, 보존되어 오면서 동물산업 전반을 지배하고 있는 유일한 재래가축으로서 질적인 면에서 국제적인 경쟁력을 잠재하고 있는 것으로 인정 받고있다.

그러나 최근 들어 축산물의 둔갑 판매가 기승을 부리는 현상은 국내 축산업의 어려움을 가중시키고 있다. 과거에는 국산품을 외국산으로 속여 파는 경우가 주로 문제의 중심이었다. 1950년대에는 일본에서조차도 자국산에 USA라는 상표를 붙여 미국산으로 워히도록 교묘한 상술을 사용한 적이 있을 정도로 공산품은 국산의 둔갑 판매의 대명사였다. 현재에는 젓소고기가 한우육으로의 둔갑육판매, 이표조작으로 인한 질병검사 조작 등으로 인해 소비자들에게 신뢰성을 주지 못하며 실정이다.

¹Graduate, Department of statistics, Yeungnam University, Kyungsan, Korea. E-mail : esjtk@yumail.ac.kr

²Graduate, Department of statistics, Yeungnam University, Kyungsan, Korea. E-mail : chldbal84@yumail.ac.kr

³Department of statistics, Yeungnam University, Kyungsan, Korea. E-mail : rswsky@yumail.ac.kr

⁴Professor, Department of Animal Resources and Biotechnology, Yeungnam University, Kyungsan, Korea.

E-mail : jsyeo@yumail.ac.kr

⁵Professor, Department of statistics, Yeungnam University, Kyungsan, Korea. E-mail : jlee@yumail.ac.kr

일본의 경우 2001년 9월 광우병 발생 이후 가축개체식별 긴급 정비사업을 추진해 2002년 6월 일본 국내에서 사육하는 모든 소에 대해 등록을 마쳤다. 또한, 2003년 6월부터 쇠고기 이력추적시스템 도입을 추진해 2004년 12월 생산·가공·유통등 전 분야에 대한 이력추적시스템 구축을 완료했다. EU의 경우도 1997년 소의 개체식별제도를 도입해 1998년 1월부터는 이를 의무화해 각 개체마다 패스포트를 부여하고 질병사항 등을 기록해 이동시 이를 수반토록 의무화했으며, 이후 유통 단계에도 실시를 의무화했다. 또한, 올해 1월부터는 시중에 유통·판매되는 모든 식품과 사료에 대해 생산이력제 적용을 의무화하고 있다. 국내에서는 지난해 총 9개의 한우부분 우수브랜드를 선정해 올 3월부터 시범적으로 이체도를 도입·운영해오고 있다. 따라서 둔갑육판매 방지와 쇠고기 안정성을 위해서 한우의 생산·도축·가공·유통과정의 각 단계별 정보를 기록·관리, 문제발생시 이동경로를 따라 추적 또는 소급하여 신속한 원인규명 및 조치를 가능하게 하는 생산이력체계를 산·학·연·관 협동으로 구축이 적실히 필요할 것이다.

기존의 개체의 동일성 검사에 사용된 방법으로 혈액형 및 생화학적인 지표의 다형성 분석방법을 사용하였다. 그러나 소에 있어서 혈액형검사는 정확한 부계혈통을 결정하지 못하는 단점이 있다.(GLowatzki-Mullis) 이로 인해 DNA다형성에 기초한 다양한 유전적 분석방법들이 개발되었으며 이를 이용하여 개체간의 동일성 검사가 이루어지고 있다.(Peelman, 1998) 분석방법들 중 DNA marker의 사용은 개체의 동일성 검사에서 유용한 도구로 보여지고 있다. 결과적으로 DNA marker는 쇠고기 동일성 검사에 사용될 수 있다.

본 연구에 공시된 한우는 농협 중앙회 가축개량사업소로부터 한우 집단의 혈연정보가 정확히 기재된 국가 후대검정우 26-29차 36가계 305두중 조부와 부가 서로 각각 다른 33두 개체를 이용하여 실시하였다. 이 논문의 목적은 한우를 중심으로 쇠고기 이력체계에서 개체식별에 유리한 DNA marker의 정보(H, PIC)를 알아내고, 그 DNA marker의 정보를 이용하여 여러 가지 DNA marker의 조합들의 검정력(MP, R)을 알아보고, 현실 data에서의 선택된 조합에 적용한 결과분석을 고려하여 최종적으로 개체식별에 유용한 DNA marker의 조합을 찾는 것이다.

2. Informativeness(DNA marker 정보력의 측도)

DNA marker의 정보력이란 개체식별의 측면에서 보았을때 다양성의 측도라고 할 수 있다. 다양한 종류의 alleles를 가지고 있는 DNA marker가 개체식별에 유용하다고 할 수 있다. 이 정보력의 측도로 H(Heterozygosity), PIC(Polymorphism Information Content)를 사용한다. H, PIC값은 DNA marker가 얼마나 많은 alleles가 균일하게 퍼져있는가를 나타내는 척도라고 할 수 있고, 1에 가까울수록 개체식별에 유용한 DNA marker라고 할 수 있다.

2.1 H(Heterozygosity)

기대 대립유전자의 다양성으로 이형접합 개체의 예상되는 비율이며 다음 (1)식과 같다. 이 값은

Hardy-Weinberg Equilibrium 법칙을 만족될 때 사용할 수 있다.

$$H = (1 - \sum_{i=1}^n p_i^2) \quad (1)$$

where n = no. of alleles of locus

p_i = estimated allelic frequency of allele i of locus k.

2.2 PIC(Polymorphism Information Content)

부모로부터 자손에 전달되는 대립유전자를 구별해 낼 수 있는 확률이며 다음 (2)식 과 같다.

$$PIC = (1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2) \quad (2)$$

where n = no. of alleles of locus

$p_{i(j)}$ = estimated allelic frequency of allele $i(j)$ of locus

3. Evaluation

개체식별에 유용하다고 선택된 DNA marker들의 검정력을 평가하기 위해서는 MP(Match Probability), R(Relatedness coefficient)을 사용한다.

3.1 MP(Match probability)

Hardy-Weinberg Equilibrium 법칙을 만족하는 동물간의 동일한 alleles를 가질 확률을 말하며, 다음 (3)식과 같다.

$$MP = \prod_{k=1}^m (\sum_{i=1}^n (p_{k,i}^2)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n (2p_{k,i} p_{k,j})^2) \quad (3)$$

where m = no. of loci

n = no. of alleles of locus k

$p_{k,i}$ = estimated allelic frequency of allele $i(j)$ of locus k.

3.2 R(Relatedness coefficient)

동물들 사이의 유사성을 나타내는 경험적 측도값으로, 다음 식(5)와 같다.

$$R(i, j) = \frac{v(i, j)}{w(i)} \quad (\text{Queller and Goodnigh. 1989}) \quad (5)$$

$$v(i, j) = \sum_{k=1}^2 \sum_{p=1}^2 \sum_{l=1}^r \sum_{m=1}^{s_l} \begin{cases} 0 & \text{if } x_k \neq y_p \neq m \\ [1 - f(m, l)] & \text{if } x_k = y_p = m \end{cases}$$

$$w(i) = \sum_{k=1}^2 \sum_{l=1}^r \sum_{m=1}^{s_l} \begin{cases} 0 & \text{if } x_k \neq m \\ [1 - f(m, l)] & \text{if } x_k = m \end{cases}$$

r = number of markers

s_r = number of alleles of marker r

m = each one of the alleles of marker r

x_k = allele present in i th animal, k th position, l th locus

y_p = allele present in j th animal, p th position, l th locus

$f(m, l)$ = alleles frequency of marker m at l th locus

3.3 Percentage of animal incorrectly identified

R값이 0.85가 넘으면 DNA marker가 더 필요하다(Cunningham et al.,(1999)). 위에서 구한 R값을 사용하여 Percentage of animal incorrectly identified를 다음 (6)식과 같이 구할 수가 있다.

$$\text{Percentage of animal incorrectly identified} = \frac{I_{A(R)}}{\text{Total number of compares}} \quad (6)$$

$$I_A = \begin{cases} 1 & R \in A \\ 0 & R \notin A \end{cases} \quad A = \{R | R > 0.85\}$$

4. 결과

국가 후대 검정우 26-29차 36가계 305두중 부와 조부가 다른 33두를 사용하였고, R값은 실제 개체들간의 유사성을 나타내는 경험적인 값이므로 부와 조부가 섞인 현실적 자료 305두에 적용하여 검정력을 평가하였다. 우선 부와 조부가 다른 33두의 Chromosomes에서 155개의 DNA marker를 사용하였고. 이 DNA marker들 중 Hardy-Weinberg Equilibrium의 검정에 만족되지 않는 DNA marker들은 사전에 제외하였다. 제외한 marker들 중에서 H값과 PIC값이 높은 DNA marker[표1]를 알아보았다. 개체식별에 유용한 DNA marker를 TGLA44, BMS2519, ILSTS035, BMS1242, HUI223, BMS941, BMS2116, BMS1675, HW-YU2-CA-95, HW-YU2-CA-03로 선택하였다. 이들 marker들을 사용하여 5개를 한 조합으로 하는 32개의 후보 조합을 만들 수 있다. 이 조합들의 MP값을 모두 구하여 그 중 확률 값이 가장 낮은 조합은 다음[표2]와 같다.

이 다섯 개(TGLA44, ILSTS035, HUI223, BMS1675, HW-YU2-CA-03)의 marker를 사용했을 때 MP값은 백만분의 1로 나타났다. 모집단이 [표1]과 같은 alleles의 프로파일과 frequency를 가지고 있고 임의로 두 개체의 alleles를 발생시켰을 때의 확률이므로 현실data와는 차이가 나는 이론적인 값이라

고 할 수 있다. 그래서 국가 후대 검정우 305두에 선택된 조합의 R값을 적용하여 Percentage of animal incorrectly identified 를 구하였다. 그 결과는 다음 [표3]과 같다.

한 개의 DNA marker(HW-YU2-CA03)를 사용하였을 때 개체를 불확실하게 식별할 Percentage는 약13.7%이고, 다섯 개의 DNA marker(TGLA44, ILSTS035, HUIJ223, BMS1675, HW-YU2-CA-03)를 사용했을 때 0.2%로 나타났다. 다른 모든 후보조합을 통해 Percentage of animal incorrectly identified를 모두 구하였다. 그 중 Percentage가 가장 낮은 조합[표4]과 그 조합의 MP[표5]값을 구해보았다.

[표 1] 조부가 다른 한우 33두에 대한 DNA marker의 Allele frequencies

| Marker | Alleles amplified | | | | | | | | | | H | PIC |
|--------------|-------------------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | | | |
| BMS2519 | μ | 0.226 | 0.016 | 0.081 | 0.177 | 0.242 | 0.161 | 0.081 | 0.016 | | 0.8195 | 0.7947 |
| | σ | 0.053 | 0.016 | 0.034 | 0.048 | 0.054 | 0.047 | 0.034 | 0.016 | | | |
| TGLA44 | μ | 0.097 | 0.129 | 0.210 | 0.210 | 0.161 | 0.177 | 0.016 | | | 0.8282 | 0.8047 |
| | σ | 0.037 | 0.042 | 0.052 | 0.052 | 0.047 | 0.048 | 0.016 | | | | |
| ILSTS035 | μ | 0.059 | 0.324 | 0.147 | 0.088 | 0.088 | 0.206 | 0.088 | | | 0.8043 | 0.7824 |
| | σ | 0.0410 | 0.081 | 0.0616 | 0.049 | 0.049 | 0.070 | 0.049 | | | | |
| BMS1242 | μ | 0.206 | 0.029 | 0.206 | 0.235 | 0.118 | 0.206 | | | | 0.8027 | 0.7856 |
| | σ | 0.0704 | 0.029 | 0.070 | 0.073 | 0.056 | 0.070 | | | | | |
| HUIJ223 | μ | 0.076 | 0.106 | 0.258 | 0.015 | 0.106 | 0.227 | 0.076 | 0.121 | 0.015 | 0.8328 | 0.8125 |
| | σ | 0.0339 | 0.039 | 0.0560 | 0.015 | 0.039 | 0.053 | 0.033 | 0.041 | 0.015 | | |
| BMS941 | μ | 0.016 | 0.032 | 0.177 | 0.29 | 0.113 | 0.065 | 0.161 | 0.081 | 0.065 | 0.8296 | 0.8095 |
| | σ | 0.016 | 0.022 | 0.048 | 0.058 | 0.040 | 0.031 | 0.047 | 0.034 | 0.031 | | |
| BMS1675 | μ | 0.061 | 0.039 | 0.212 | 0.121 | 0.076 | 0.076 | 0.015 | 0.045 | | 0.7677 | 0.7401 |
| | σ | 0.029 | 0.061 | 0.051 | 0.041 | 0.032 | 0.032 | 0.015 | 0.025 | | | |
| BM3507 | μ | 0.081 | 0.097 | 0.339 | 0.048 | 0.242 | 0.194 | | | | 0.7706 | 0.7506 |
| | σ | 0.034 | 0.037 | 0.060 | 0.027 | 0.054 | 0.050 | | | | | |
| HW-YU2-CA-95 | μ | 0.207 | 0.138 | 0.069 | 0.293 | 0.293 | | | | | 0.7615 | 0.7483 |
| | σ | 0.053 | 0.045 | 0.033 | 0.060 | 0.060 | | | | | | |
| HW-YU2-CA03 | μ | 0.183 | 0.183 | 0.017 | 0.333 | 0.233 | 0.050 | | | | 0.7651 | 0.7285 |
| | σ | 0.050 | 0.050 | 0.016 | 0.061 | 0.055 | 0.028 | | | | | |

[표 2] 조부가 다른 한우 33두에 대한 누적 MP 값

| NO. Marker | DNA marker | 누적 MP |
|------------|--------------|----------|
| 1 | TGLA44 | 0.053092 |
| 2 | ILSTS035 | 0.003352 |
| 3 | HUIJ223 | 0.000162 |
| 4 | BMS1675 | 0.000013 |
| 5 | HW-YU2-CA-03 | 0.000001 |

[표 3] 한우 305두의 Percentage of animal incorrectly identified

| no. of marker | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|-------------|---------|----------|---------|---------|
| DNA marker | HW-YU2-CA03 | TGLA44 | ILSTS035 | HUIJ223 | BMS1675 |
| (%) | 13.7446 | 5.74094 | 4.50496 | 0.7129 | 0.25022 |

%=Percentage of animal incorrectly identified

[표 4] 한우 305두의 Percentage of animal incorrectly identified

| no. of marker | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|-------------|---------|----------|---------|----------|
| DNA marker | HW-YU2-CA03 | BMS2519 | ILSTS035 | BMS941 | BMS1675 |
| (%) | 13.7446 | 4.38093 | 3.71657 | 0.11109 | 0.022649 |

[표 5] 한우 305두에 대한 누적 MP값

| NO. Marker | DNA marker | 누적 MP |
|------------|--------------|----------|
| 1 | HW-YU2-CA-03 | 0.053092 |
| 2 | BMS2519 | 0.003624 |
| 3 | ILSTS035 | 0.000178 |
| 4 | BMS941 | 0.000015 |
| 5 | BMS1675 | 0.000001 |

[표 4]의 결과에서는 다섯 개의 DNA marker(BMS2519, ILSTS035, BMS941, BMS1675, HW-YU2-CA-03)를 사용했을 때 0.02%로 처음 선택한 조합보다 개체식별에 더 유용하다고 할 수 있고, [표 5]의 결과를 처음 선택한 조합의 MP값[표 3]과 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않고 있다. 그래서 최종적으로 MP값과 R값을 모두 고려했을 때 최종적으로 선택한 다음의 DNA marker(BMS2519, ILSTS035, BMS941, BMS1675, HW-YU2-CA-03)가 개체식별에 가장 유용하다고 할 수 있다.

5. 결론

국가 후대 검정우 26-29차 36가계 305두의 Chromosomes에서 155개의 DNA marker를 사용하여 개체식별에 유용한 DNA marker(TGLA44, BMS2519, ILSTS035, BMS1242, HUIJ223, BMS941, BMS2116, BMS1675, HW-YU2-CA-95, HW-YU2-CA-03)를 찾았고, 그 조합들중 MP값과 R값을 고려했을 때 개체식별에 가장 유리한 조합(BMS2519, ILSTS035, BMS941, BMS1675, HW-YU2-CA-03)을 찾았다. 이 조합을 305두에 적용한 Percentage of animal incorrectly identified는 대략적으로 10000두 중 2두정도로 나타난다. 즉 5개의 Marker로는 개체식별에 다소 불충분하다고 할 수 있다. 그러므로 marker수를 더 늘려 개체식별에 불규명 확률을 줄여야한다고 본다.

참고문헌

- [1] GLowatzki-Mullis, M. L., Gaillard, C., Wigger, G. and Fries, R. (1995). Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genome* 26:7-12.
- [2] Peelman, L. J., Mortiaux, F., Van, Zeveren, A., Dansercoer, A., Mommens, G., Coopmam, F., Bouquet, Y., Burny, A., Renaville, R and portetelle, D. (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in Four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet.* 29:161-167.
- [3] A. Arana, B. Soret, I. Lasa, L. Alfonso (2002) Meat traceability using DNA markers : application to the beef industry. *Meat Science* 61, 367-373
- [4] Weir, K. M. (1993). *Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data.* Sunderland,

Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.

- [5] Queller, D. C., & Goodnight, K. F. (1989). Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43(2), 258-275
- [6] Cunningham, E. P., Meghen, C., Scott, C., Bradley, D. G., MacHugh, D. E. & Loftus, R. T. (1999). DNA Traceability techniques for the meat industry. In F. Toldra, & D. J. Troy(Eds.) *New developments in guaranteeing the optimal sensory quality of meat* (pp. 1-7), 5-7 May 1999. Valencia (Spain).
- [7] Hak-Kyo Lee. (2005) Establishment of an individual identification system based on microsatellite polymorphisms in korean cattle(Hanwoo) *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2005. Vol 18, No.6 : (762-766)
- [8] J. T. Jeon (2005). *Analysis and selection of microsatellites markers for individual traceability system in Hanwoo.*
- [9] Ott. Jurg (1999). *Analysis of human genetic linkage*, 3rd ed. The Johns Hopkins university press.