

# 초위성체 DNA표지인자를 이용한 국내 육우집단의 품종특성 및 개체식별 체계설정

김상욱\*† · 장희경\*† · 김관석\* · 김종주\*\* · 전진태\*\*\* · 윤두학\*\*\*\* · 강성호\*\*\*\*\* · 정효일\*\*\*\*\* · 정일정\*\*\*\*\*

충북대학교 농업생명환경대학 축산학과\*, 영남대학교 생명공학부\*\*, 경상대학교 응용생명과학부\*\*\*, 농촌진흥청 국립축산과학원\*\*\*\*, 전북대학교 화학과 이화학연구소\*\*\*\*\*, 연세대학교 기계공학과\*\*\*\*\*, 한경대학교\*\*\*\*\*

## Establishment of Genetic Characteristics and Individual Identification System Using Microsatellite loci in Domestic Beef Cattle

Sang Wook Kim\*† , Hee Kyung Jang\*† , Kwan Suk Kim\* , Jong Joo Kim\*\* , Jin Tae Jeon\*\*\* , Du Hak Yoon\*\*\*\* , Seong Ho Kang\*\*\*\*\* , Hyo Il Jung\*\*\*\*\* and Il Cheong Cheong\*\*\*\*\*

College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University\*, School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan\*\*, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University\*\*\*, National Institute of Animal Science, RDA\*\*\*\*, Department of Chemistry and Research Institute of Physics and Chemistry, Chonbuk National University\*\*\*\*\*, Department of Mechanical Engineering, Yonsei University\*\*\*\*\* , Hankyong National University\*\*\*\*\*

### ABSTRACT

DNA marker information is used to identify or distinguish cattle breeds or individual animal. The purpose of this study was to apply Bovine Genotypes Kit Version 1.1/2.1 to bovine DNA samples (National Institute of Animal Science) taken from Australian / American beef (n=148), Holstein beef (n=170) and Hanwoo cattle (n=177) bred in Jeongeub, Jeonbuk, Korea, so that it could distinguish Hanwoo breed. The Bovine Genotype Kits consist of 16 ISAG MS markers, which were used to build a database of genotypes in each group. Genotyping results were analyzed using MS Tool kit and Phylip program to create phylogenetic tree. The GeneClass 2.0 was used to estimate breed identification. These analyses found that this kit had 100% capacity to distinguish Hanwoo beef, 95.3% capacity to differentiate Australian / American beef and 90% capacity to identify Korean Holstein steer beef. Hence, it is expected that 16 commercial microsatellite markers is useful to categorize genetic characteristics of Hanwoo breed and also identify Hanwoo individuals and the origin of beef. In particular, it is expected that these markers will be advantageous in discriminating domestic Holstein beef from Australian / American beef.

(Key words : Hanwoo, Microsatellite, Individual identification, GeneClass analysis, Phylogenetic analysis)

### I. 서 론

쇠고기의 육안적 식별이 불가능한 점을 이용하여 수입 우육 (냉장 및 냉동육) 및 수입생육 (국내산 육우)의 쇠고기를 한우고기로서 둔갑 유통하는 사례가 빈번히 발생하고 있기에, 쇠고기 둔갑유통을 방지하기 위한 과학적인 감식 기법의 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

건전한 축산물 유통문화와 체계적인 혈통관리 및 가축 질병차단을 위하여 귀표에 고유의 숫자를 기입하여 위해 소의 식별에 이용하는 방법이 발전하여 최근에는 전자 칩

을 통해 개체가 가질 수 있는 고유의 정보를 전자적으로 연계할 수 있는 다양한 시스템이 시도되고 있다 (Seo 등 2000). 하지만 이 과정에서도 귀표의 탈락이나 의도적인 위·변조 가능성으로 인해 개체진위 여부를 귀표만으로 확인하기 어려운 실정이다.

최근에는 DNA 수준에서 유전자 감식방법이 공식 활용되면서 가축의 개체 식별 및 친자 확인을 위한 검증 수단으로 광범위한 활용이 추진되고 있다 (Fries and Durstewitz 2001). 개체마다 유전적 다양성에 근거하여 소가 가지고 있는 DNA 변이의 형태를 분석하는 일련의 유전자 감식

† These authors contributed equally to this work.

Corresponding author : Il Cheong Cheong, Hankyong National University, Ansong 456-749, Korea. Tel: 031-670-5490, Fax: 031-670-5491, E-mail: cheongic1@gmail.com

방법이 개체식별 및 유전적 특성을 확인하기 위한 강력한 수단으로 제공되고 있다 (Baker 등 1997; Blott 등 1999; Li 등 2000; Bjornstad 등 2003; Machugh 등 1998; Yoon 등 2005a).

Yoon 등 (2005b)의 보고에 따르면 11종의 microsatellite marker를 이용하여 한우와 타 품종간의 유전적 다양성 및 특성, 유전적 거리 추정 및 분지도 작성 등을 통하여 한우 등 동북아시아 소 품종들의 유전적 유연관계를 보고한 바 있다. 동북아시아지역 (*Bos Taurus*)에 속하는 한우는 유럽지역에 (*Bos Taurus*) 속하는 헤어포드, 앵거스, 리무진, 홀스타인, 카롤라이스과의 유전적 거리 (0.282, 0.250, 0.230, 0.227, 0.206)를 보고 하였으며, 동북아시아 품종들과 *Bos indicus* 품종들 간의 유전적 거리가 유럽계통 및 아프리카계통의 *Bos Taurus* 품종과 *Bos indicus* 품종들과의 거리만큼이나 유전적으로 상이하였고, 유럽계 소 품종 및 아프리카 *taurines* 품종들과도 유전적 거리가 인정되어 한우가 *Bos Taurus* 및 *Bos indicus* 품종들의 교잡에 의해 형성되지 않았음을 시사하였다. 또한 동북아시아 소 품종들은 지역적 별개의 가축화 기원의 가능성이 있음을 보고 함과 동시에 한우의 차별성을 제시하였다 (Yoon 등 2005b). 또한 우리나라의 경기, 전남, 전북, 경남, 경북, 강원 등 지역별 한우집단의 유전적 특성과 유연관계 분석이 보고 되었고 그 결과는 유전적 거리가 0.032~0.021로 관찰 되었으며 지역별 한우집단의 유전적 배경이 좁게 나타나고 있음을 시사하였다 (Oh 등 2008).

현재 Microsatellite marker를 이용해 쇠고기 생산이력추적의 가능성을 Lee 등 (2004)과 Yoon 등 (2005a)에 의해 보고되었고, 한우와 수입산 쇠고기의 품종식별력을 연구함과 동시에 부정유통을 차단할 수 있는 DNA 수준의 기술력 등이 일부 이루어 지고 있다 (Oh 등 2008). 특히 Oh 등 (2008)의 보고에 따르면 9종의 Microsatellite marker 이용하여 한우, 앵거스, 헤어포드, 홀스타인, 샤롤레 5품종의 분석을 하였으며 통계적 분석인 집단간 누적 식별력을 추정 한 결과를 99.71%로 추정함으로써 높은 활용성을 시사 하였다.

그러나 이러한 방법 역시 고가의 정교한 자동화된 분석 장비로부터 생산된 아날로그형 정보와 다시 이들 정보를 디지털 정보로 전환하여 최종 DNA profile을 형성하는 과정에서 해석상의 오류를 발생시키는 여러 요인이 잠재하고 있어 체계화되고 공인된 여러 실험실간의 교차 검증 시스템의 운용이 매우 중요하며, 법적인 형평성을 가릴 정도의 검정력 및 신뢰성을 얻기 위해서는 한우, 젃소 및 수입우 집단의 유전적 특성 및 개체식별을 가장 잘 표현할 수 있는 최적의 유전자 표지(MS, Microsatellite) 인자를 검증하고 이들을 다수 확보하여 이를 분석할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 한우 집단과 젃소 및 수입우간 유전

적 차별성을 재분석하고 이에 근거한 한우 집단에서 개체의 식별에 가장 적절한 유전자 표지(MS)를 설정하고 유전자 표지에 따른 오류 확률을 통계적으로 가장 최소화하여 보다 효율적인 개체 식별 체계 검증을 통한 유전자 감식 시스템을 이용한 국내산 육우의 판별과 이력추적 시스템의 적용 모델을 제시하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료, DNA 추출 및 농도측정

본 연구에 사용한 공시재료는 농촌진흥청 국립축산과학원에서 제공한 호주산 및 미국산 수입우 260두와 Holstein 266두의 분리된 genomic DNA sample을 이용하였으며, 국내 한우시료는 전라북도 정읍지역 한우사육농가로부터 한우 190두의 혈액 10 ml로부터 DNA Purification kit (SolGent co., Ltd) 를 이용하여 genomic DNA를 분리하여 이용하였다. DNA 정량 분석은 spectrophotometer (Pharmacia Biotech, England)를 이용하여 260 nm~280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA의 농도와 순도를 확인하였다.

### 2. Microsatellite 표지인자 결정

Microsatellite marker는 ISAG (국제동물유전학회)에서 소의 유전적 다형성 연구를 위해 개체 식별 및 친자 감정 등에 활용하도록 권장하는 11종의 microsatellite marker를 포함하여 제작한 Finnzymes (DIAGNOSTICS)사의 Bovine Genotypes Version 1.1 Kit (TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824)와 Bovine Genotypes Version 2.1 Kit (BM1818, CSR60, HAUT27, CSSM66, ILST006)를 사용하여 총 16종의 microsatellite marker를 이용하였다 (Table 1).

### 3. Microsatellite를 이용한 PCR 수행 및 Genotyping 수행 및 유전자형 분석

PCR 반응액 조성은 PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)와 2.5 mM dNTPs, 3pmol fluorescent dye labeling primer pairs, 10 ng의 template DNA, 0.5U h-Taq DNA polymerase (SolGent co., Ltd)와 ddH<sub>2</sub>O를 사용하여 총 반응액은 10 $\mu$ l로 하였다. PCR 반응에는 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Co., USA)를 사용하였고, PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 pre-denaturation 한 후 95 $^{\circ}$ C에서 20초간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 40초간 annealing, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 33cycles 수행한 후 마지막으로 60 $^{\circ}$ C에서 60분간 최종

Table 1. List of microsatellite markers used in this study

Locus	Chromosomal location	Size range, bp	Annealing temperature, °C	Reference (UniSTS, No)	No. of alleles	Ht
TGLA227 <sup>†</sup>	18	63 to 115	60	UniSTS:250914	20 (17)	0.884
BM2113 <sup>†</sup>	2	116 to 146	60	UniSTS:250697	14 ( 8)	0.759
TGLA53 <sup>†</sup>	16	147 to 197	60	UniSTS:250986	19 (14)	0.838
ETH10 <sup>†</sup>	5	198 to 234	60	UniSTS:250848	11 ( 7)	0.776
SPS115 <sup>†</sup>	15	235 to 265	60	UniSTS:279634	12 ( 7)	0.652
TGLA126 <sup>†</sup>	20	104 to 132	60	UniSTS:250991	14 ( 6)	0.711
TGLA122 <sup>†</sup>	21	133 to 193	60	UniSTS:250911	26 (15)	0.833
INRA23 <sup>†</sup>	3	194 to 236	60	UniSTS:	18 (11)	0.841
ETH3 <sup>†</sup>	19	89 to 131	60	UniSTS:250763	14 (10)	0.678
ETH225 <sup>†</sup>	9	132 to 166	60	UniSTS:250852	18 ( 6)	0.799
BM1824 <sup>†</sup>	1	170 to 218	60	UniSTS:44288	15 ( 7)	0.759
BM1818 <sup>‡</sup>	23	248 to 276	60	UniSTS:14056	9 ( 7)	0.723
CSRM60 <sup>‡</sup>	10	79 to 115	60	UniSTS:251062	17 ( 9)	0.703
HAUT27 <sup>‡</sup>	26	120 to 115	60	UniSTS:251732	13 (10)	0.788
CSSM66 <sup>‡</sup>	14	171 to 209	60	UniSTS:251104	14 ( 9)	0.824
ILSTS006 <sup>‡</sup>	7	277 to 309	60	UniSTS:250879	9 ( 7)	0.735

<sup>†</sup> Bovine Genotypes™ Panel 1.1 kit, F-840S/L

<sup>‡</sup> Bovine Genotypes™ Panel 2.1 kit, F-840S/L

( ) Number of alleles that is found in Hanwoo population

Ht : Expected total heterozygosity.

extention 과정을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 증폭된 단편의 크기가 예상된 allele size 범위 내에 존재하는지, PCR조건의 적정성 여부를 확인하기 위하여 EtBr (ethidium bromide)이 포함된 2% agarose gel에 전기영동하고 UV 상에서 관찰하였다

PCR 산물은 적정량의 deionized water로 희석하고 DNA : Hi-Di formamide : size standard (Genescan-500 ROX TAMRA) 를 1µl : 9.25µl : 0.25µl 비율로 혼합하여 95°C 이상에서 3분간 denaturation 시키고, ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 분석하였다. 전기영동시 Performance Optimized Polymer 4 (POP4) (Applied Biosystems, USA)와 10×Buffer (with EDTA)를 1×로 희석하여 사용하였고, run time은 22분으로 하였다. 유전자형은 Gen typer software version 2.5 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다.

4. 통계분석

Gen typer Software에 의해 결정되어진 microsatellite marker별 대립 유전자들은 microsatellite Toolkit software (Park, 2000)를 이용하여 분석 집단별 및 개체별로 정리한 후 관측 이형질성 (observed heterozygosity), 대립 유전자 빈도 (allele frequency), 각 locus별 대립 유전자의 수 및 품종 집단별 대립 유전자 수를 산출하였다. 각각의 분석

Microsatellite 좌위별 동형접합도 (homozygosity; Ho), 이형 접합도 (heterzygosity; hi)는 다음과 같이 표시된다.

$$Ho = \sum P_i^2, hi=1 - Ho$$

여기서 Pi는 microsatellite 좌위 각각의 대립 유전자 빈도이다. 또한 분석된 모든 microsatellite marker 들의 평균 이형질성(H)은 다음과 같이 산출하였다.

$$H = \sum H_j/r$$

여기서 H<sub>j</sub>는 j번째 microsatellite marker의 이형질성이며 r은 분석 대상 microsatellite marker 수이다. 집단간 누적 식별력(Cumulative power of discrimination; CPD)는 Fan 등 (2002)이 제시한 바에 따라 다음과 같이 산출하였다.

$$CPD = (1 - [(1 - H_a)(1 - H_b)(1 - H_c)(1 - H_d)(1 - H_e)]) \times 100\%$$

여기서 H<sub>a</sub>에서 H<sub>e</sub>까지는 개별 MS의 전체 평균이형질 성인데, 본 연구에서는 총 16개의 MS를 이용하여 계산하였고, 각각의 집단별 다형정보지수(polymorphic information content; PIC)는 다음과 같이 계산되었다.

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^K P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j+1}^k 2P_i^2 P_j^2$$

여기서  $P_i, P_j$ 는 각각  $i$ 번째  $j$ 번째 대립 유전자가 나타나 는 확률이며,  $n$ 은 대립 유전자의 개수이다.

집단간 유연관계 분석을 위한 Da genetic distances의 추정 은 Nei 등 (1983)의 방법을 사용하는 집단유전학 분석프 로그램인 DISPAN (Ota, 1993) package를 이용하여 계산하 였으며, DISPAN을 이용하여 UPGMA (unweighted pair- group method with arithmetic average) 방법을 통해 집단간 의 유전적 거리를 근거로 한 phylogenetic tree를 작성하였 다 (Sneath and Sokal 1973). 전체집단의 개체별 유전적거리 의 추정치를 근거로 하여 모든 개체간의 Neighbor-Joining phylogenetic dendrogram 를 작성은 simple allele-sharing 측 정 수준을 통하여 개체별 대립유전자의 빈도를 근거로 집 단 유전학적 분석 프로그램인 Phylip ver.3.65를 이용하였 다.

개체별 품종식별에 대한 통계분석은 Bayesian methods (Rannala and Mountain 1997) 적용한 GeneClass2 (INRA/ France) 프로그램을 이용하여 품종할당력 (inclusion power) 통계량을 추정하였다.

### III. 결과 및 고찰

16종 marker를 통해 품종 특이성에 근거한 개체 확인

유용성 분석을 위해 서로 다른 유전적 특성을 가지고 있 는 3품종집단 (한우, 젃소, 수입우)에서 유전자 표지별 이 형접합도를 계산하였다. 전체적 결과를 요약하면 유전자 좌위별 대립유전자 수는 BM1818과 ILSTS006 좌위에서 9 개로 가장 적었으며 TGLA122에서는 가장 많은 26종의 대 립유전자가 발견되었고, 유전자 좌위별 이형접합도는 0.652 (SPS115) 0.884 (TGLA227)로 산출되어 친자확인 또는 개 체 확인을 위한 적절한 대립 유전자의 발현빈도로 인정되 었다 (Table 2). 한우 집단내에서의 개체 및 품종 식별 설 정을 위해서 대립 유전자 출현 특성을 추가적으로 확인하 였는데, 분석된 한우집단의 좌위들의 출현 대립 유전자수 는 최소 6종에서 최고 17종까지 나타났고, 전체 집단별로 (한우, 젃소, 수입우) 출현된 유전자표지 (MS)별 대립유전자 수와 한우 집단에서 발현된 대립유전자수는 다소 상이한 것으로 나타났으며 이는 집단별 유전적 특성이 반영된 결 과로 사료된다.

구체적으로는 BM1824, TGLA126 좌위와 INRA23의 경 우 젃소 및 수입우집단 보다 한우 집단에서는 약간 낮은 다양성을 보였다. CSRM60 좌위의 대립 유전자들이 발현 빈도가 극단적인 양상을 보이고 있으며 출현된 대립 유전 자의 경우도 나타났다. 이러한 양상은 ETH3에서도 유사한 경향을 보이고 있으며, 즉 분석대상 유전자표지별 집단 간 대립유전자 발현양상을 비교해보면 특이한 집단별 품종특 이성을 발견할 수 있었다 (Fig. 1).

Table 2. Expected and observed heterozygosity obtained from 16 microsatellites in 3 beef cattle populations

Locus	Populations								
	Hanwoo (domestic)			Holstein (domestic)			Imported beef		
	Ex H	Ob H	PIC	Ex H	Ob H	PIC	Ex H	Ob H	PIC
TGLA227 <sup>†</sup>	0.857	0.887	0.839	0.842	0.817	0.821	0.832	0.837	0.811
BM2113 <sup>†</sup>	0.676	0.723	0.635	0.725	0.722	0.677	0.875	0.837	0.859
TGLA53 <sup>†</sup>	0.849	0.881	0.830	0.834	0.852	0.811	0.832	0.735	0.813
ETH10 <sup>†</sup>	0.802	0.757	0.772	0.707	0.686	0.674	0.818	0.735	0.789
SPS115 <sup>†</sup>	0.724	0.780	0.686	0.470	0.420	0.440	0.761	0.728	0.733
TGLA126 <sup>†</sup>	0.639	0.605	0.590	0.689	0.651	0.641	0.804	0.816	0.773
TGLA122 <sup>†</sup>	0.832	0.791	0.810	0.802	0.627	0.778	0.864	0.816	0.847
INRA23 <sup>†</sup>	0.780	0.819	0.753	0.882	0.728	0.868	0.860	0.748	0.843
ETH3 <sup>†</sup>	0.626	0.661	0.576	0.604	0.586	0.521	0.805	0.803	0.775
ETH225 <sup>†</sup>	0.774	0.785	0.735	0.833	0.633	0.810	0.792	0.741	0.762
BM1824 <sup>†</sup>	0.631	0.610	0.584	0.850	0.722	0.831	0.797	0.803	0.766
BM1818 <sup>‡</sup>	0.725	0.718	0.682	0.743	0.675	0.695	0.701	0.653	0.645
CSRM60 <sup>‡</sup>	0.675	0.695	0.648	0.609	0.574	0.580	0.825	0.782	0.800
HAUT27 <sup>‡</sup>	0.723	0.638	0.679	0.806	0.793	0.776	0.834	0.633	0.811
CSSM66 <sup>‡</sup>	0.788	0.763	0.756	0.788	0.799	0.754	0.896	0.823	0.883
ILSTS006 <sup>‡</sup>	0.782	0.774	0.750	0.705	0.698	0.649	0.719	0.633	0.687

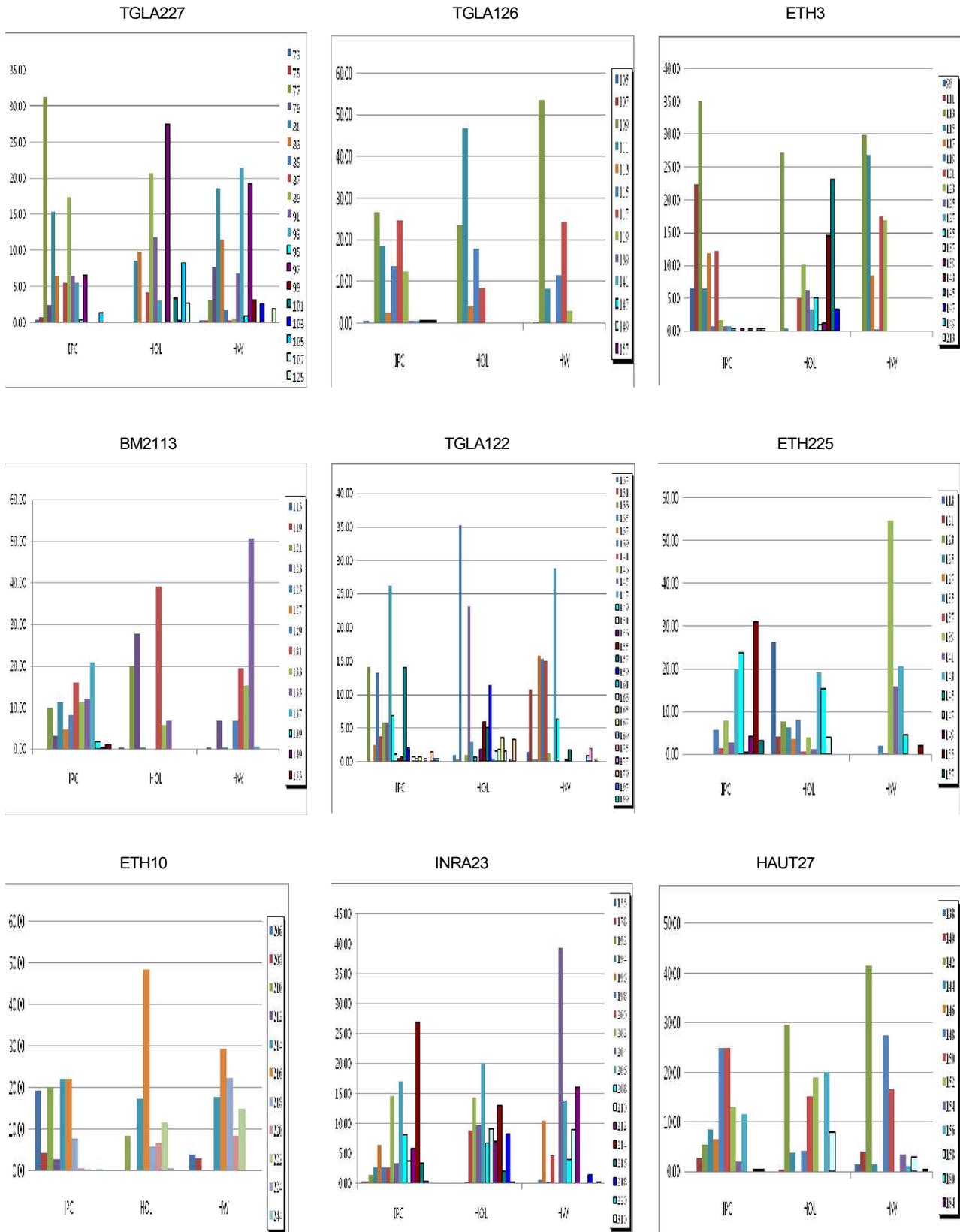
<sup>†</sup> Bovine Genotypes™ Panel 1.1 kit, F-840S/L

<sup>‡</sup> Bovine Genotypes™ Panel 2.1 kit, F-840S/L

Ex H: expected heterozygosity

Ob H: observed heterozygosity

PIC: Polymorphism Information Content



이상의 한우 집단 내 대립유전자 빈도가 다른 집단과 다른 양상을 보이는 몇몇 유전표지(MS)가 존재하였다. INRA23 좌위는 204 대립유전자의 발현양상은 한우(0.40) 집단에서는 매우 높게 나타났으며, 수입우(0.03) 및 젖소(0.09) 집단에서는 현저히 낮게 나타났으며 이 경우에 한우 집단의 품종 특이성을 확인해주는 표지인자라고 설명될 수 있다. 또한 BM2113 역시 한우집단이 젖소와 수입우 집단보다 135 대립유전자의 현저히 많이 나타났으며, 발현 빈도의 차이는 0.39~0.44로 크게 나타났다. TGLA53 역시 한우 특이적인 179 대립유전자가 높게 나타났으며, 수입우집단에서는 0.003, 젖소 집단에서는 전혀 발현되지 않는 것으로 분석되었다. HAUT27은 한우집단과 수입우 집단의 142 대립유전자 빈도의 차이는 매우 크게 분석되어졌다. 또한 ETH3의 경우 117 대립유전자의 분포양상은 분석대상 품종 모두에서 비슷한 출현양상을 나타냈으나, 115 대립유전자의 경우에는 한우집단(0.27), 수입우집단(0.06), 젖소집단(0.003)의 빈도 차이가 크게 나는 결과를 나타내었다. 이상의 결과는 소 5품종(한우, 앵거스, 헤어포드, 샤롤레, 젖소)에서 분석되어진 기존의 연구결과와 동일함을 나타내었다(Oh 등 2008). BM1824와 ETH225 경우에도 기존의 연구보고와 같은 양상을 나타내었다(Oh 등 2008; Yoon 등 2005b). 분석에 사용된 16종 중 7종 이상이 한우 품종별 대립유전자 발현양상이 품종에 따라 매우 상이하며 일부 대립유전자들은 극단적인 발현특성을 보였으며 이는 한우집단의 유전적 구조 및 조성이 매우 다르다는 것을 반증하는 결과라고 사료된다.

그리고 16종의 microsatellite marker의 결과에는 젖소와 수입우집단의 특이한 집단별 품종 특이성 또한 관찰할 수 있었다. TGLA227 좌위에 대한 품종별 대립유전자 발현 특성을 보면 전체 20종의 대립유전자가 나타났는데, 수입우 집단에서는 77 대립 유전자의 발현 빈도가 0.31로 매우 높은 출현 양상을 보였으며 반면 한우집단에서 0.03로 현저히 낮은 출현빈도를 나타내었으며 젖소 집단에서는 전혀 발현되지 않는 것으로 분석되었다. 또한 TGLA122 역시 젖소집단에서는 0.23의 빈도로 145 대립유전자가 나타났다. 하지만 수입우집단에서는 0.05의 빈도로 현저히 낮게 나타났으며, 한우집단에서는 나타나지 않았다. 그리고 ETH3의 145 대립유전자의 빈도는 오직 젖소 집단에서만 0.23의 빈도로 발현되었다. ETH225 역시 113, 121, 123, 125, 127 대립유전자는 오직 젖소 집단에서만 발현 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 본 microsatellite marker의 분포 특성을 이용하면 국내산 한우나 젖소고기를 외래 수입우 품종집단으로부터 식별할 수 있어 국내산 육우산업을 보호할 수 있는 수단이 될 수 있는 것으로 사료된다.

16종의 microsatellite marker로 부터의 대립유전자 빈도

를 근거로 하여 Da genetic distance(Nei 등, 1983)와 standard genetic distance는 DINPAN 프로그램을(Ota 1993) 이용하여 계산하였는데, 품종 거리를 보이는 그룹은 한우 집단과 젖소 및 수입우 집단에서 Da genetic distance와 standard genetic distance에서 0.257와 0.237로 분석되었다. 또한 젖소집단과 수입우집단과의 유전적 거리는 Da genetic distance와 standard genetic distance에서 모두 0.210의 유전적 거리로 나타났다. 또한 197두 전체에 대한 simple allele-sharing 측정수준을 이용하여 neighbor-joining tree를 작성하였을 때, 각 품종 집단별로 강력한 군집을 형성하고 있으며, 특히 한우집단은 독특하면서도 강력한 군집을 이루고 있어 유전적으로 한우의 고유한 특징을 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 2).

소 품종 집단에서 개체 식별에 용이한 수준의 대립유전자 16종의 유전 표지를 대상으로 누적 개체 식별력(CPD) 제시하였다(Table 3). 각 마커별 품종간의 이형접합률을 이용하여 각개체들의 집단내에서 품종을 식별 구분할 수 있는 확률이 99.06%으로 나타났다. 이는 재래돼지 집단에서 10종의 마커를 활용할 경우 최고 96.40%까지 누적 품종 식별력을 보인다는 결과를 제시한 Fan 등(2005)의 결과보다는 높은 수치를 보였으며, 가끔 집단내어 9~11개의 microsatellite marker를 이용한 누적 품종식별력이 98.75%로 나타낸것과 비교하여 다소 높게 추정되었다(Olowofeso 등 2005). 하지만 소 집단내에서 9종의 마커를 활용하여 99.71%(Oh 등 2008)의 누적품종식별력의 통계적 수치보다는 다소 낮게 추정되었다.

MS 마커의 품종 분별의 정확도 및 신뢰도를 추정하기 위해서 Bayesian methods(Rannala and Mountain 1997)을 적용한 GeneClass2(INRA/France) 프로그램의 품종할당력(inclusion power)을 9개와 16개의 마커를 각각 이용해 분석한 결과는 Table 4에 나타내었다. 9개의 MS 마커를 이용하였을 때 한우식별 정확성(총 177두)이 100%는 114두(64.4), 95% 이상 정확성을 가진 175두(98.9)와 95% 미만 2두(0.6)로 분석되었다. 하지만 16개의 MS marker를 이용하였을 경우는 100% 정확성으로 판별되는 두수는 170두(96%), 95% 이상의 정확성은 경우에는 177두 모두 한우품종으로 판정되었다. 이상의 결과 16개의 MS 마커를 이용할 경우 한우품종의 식별이 완벽히 되는 것으로 나타났다.

또한 젖소 집단 184두에 대한 9개의 microsatellite marker를 이용한 분석결과로는 젖소인 정확성 확률이 100% 일 경우 74두(40.2), 95% 이상 일 경우 146두(79.3), 95% 미만일 경우는 21두(11.4)로 나타났지만 16개의 microsatellite marker를 이용하였을 경우는 정확성 100%는 112두(65.9%), 95% 이상 정확성은 153두(90%), 95% 미만은 9두(5.3%)로 판정되었다. 젖소 집단의 품종식별판정은 9종의 마커를 이용한 경우보다 16개의 마커를 이용하는

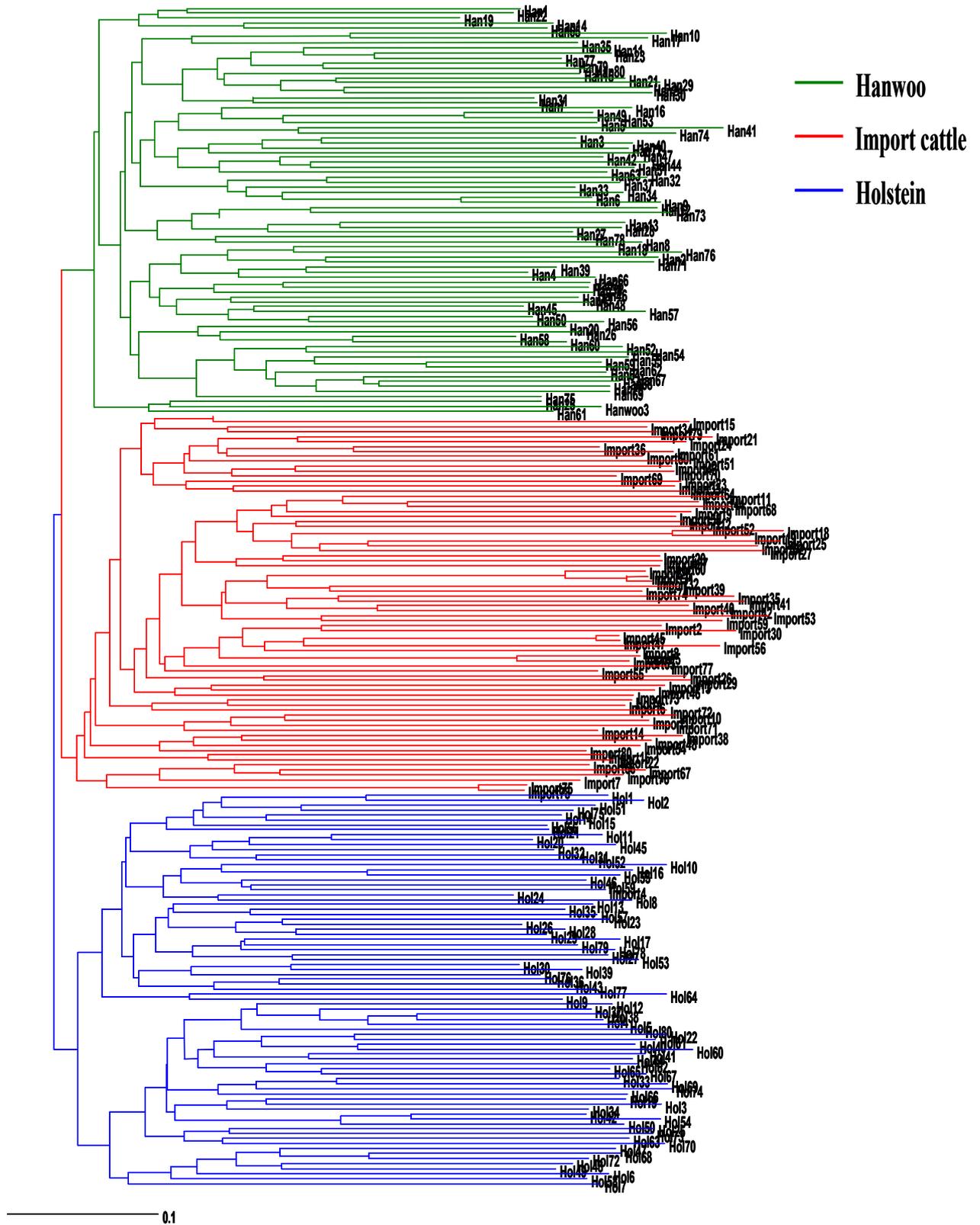


Fig. 2. A neighbor joining dendrogram was constructed from allele-sharing distances among 277 individuals in 3 beef cattle populations.

Table 3. Characterization of genetic variability and cumulative power of breeds discrimination (CPD)

Locus	Observed features	Breed, No.			
		Hanwoo (177)	Holstein (169)	Import cattle (147)	Cross breeds mean
TGLA227	Allele number	16	11	14	13.67
	$h_i$	0.857	0.842	0.832	0.84
	$N_e$	4	3	3	3.33
	PIC	0.839	0.821	0.811	0.82
BM2113	Allele number	8	7	12	9.00
	$h_i$	0.676	0.725	0.875	0.76
	$N_e$	3	3	5	3.67
	PIC	0.635	0.677	0.859	0.72
TGLA53	Allele number	14	12	18	14.67
	$h_i$	0.849	0.834	0.832	0.84
	$N_e$	4	5	2	3.67
	PIC	0.830	0.811	0.813	0.82
ETH10	Allele number	14	12	18	14.67
	$h_i$	0.802	0.707	0.818	0.78
	$N_e$	4	3	4	3.67
	PIC	0.772	0.674	0.789	0.74
SPS115	Allele number	7	6	12	8.33
	$h_i$	0.724	0.470	0.761	0.65
	$N_e$	4	2	4	3.33
	PIC	0.686	0.440	0.733	0.62
TGLA126	Allele number	6	5	13	8.00
	$h_i$	0.639	0.689	0.804	0.71
	$N_e$	3	3	5	3.67
	PIC	0.590	0.641	0.773	0.67
TGLA122	Allele number	20	18	15	17.67
	$h_i$	0.832	0.802	0.864	0.83
	$N_e$	5	3	4	4.00
	PIC	0.810	0.778	0.847	0.81
INRA23	Allele number	11	12	16	13.00
	$h_i$	0.780	0.882	0.860	0.84
	$N_e$	4	3	3	3.33
	PIC	0.753	0.868	0.843	0.82
BM1818	Allele number	10	7	13	10.00
	$h_i$	0.626	0.604	0.805	0.68
	$N_e$	2	2	3	2.33
	PIC	0.576	0.521	0.775	0.62
ETH3	Allele number	6	12	15	11.00
	$h_i$	0.774	0.833	0.792	0.80
	$N_e$	4	4	4	4.00
	PIC	0.735	0.810	0.762	0.77
ETH225	Allele number	7	12	10	9.67
	$h_i$	0.631	0.850	0.797	0.76
	$N_e$	3	2	3	2.67
	PIC	0.584	0.831	0.766	0.73
BM1824	Allele number	7	7	6	6.67
	$h_i$	0.725	0.743	0.701	0.72
	$N_e$	3	3	3	3.00
	PIC	0.682	0.695	0.645	0.67
CSRM60	Allele number	9	6	16	10.33
	$h_i$	0.675	0.609	0.825	0.70
	$N_e$	2	3	3	2.67
	PIC	0.648	0.580	0.800	0.68
HAUT27	Allele number	10	8	11	9.67
	$h_i$	0.723	0.806	0.834	0.79
	$N_e$	3	4	4	3.67
	PIC	0.679	0.776	0.811	0.76
CSSM66	Allele number	9	9	14	10.67
	$h_i$	0.788	0.788	0.896	0.82
	$N_e$	3	4	3	3.33
	PIC	0.756	0.754	0.883	0.80
ILSTS006	Allele number	7	7	8	7.33
	$h_i$	0.782	0.705	0.719	0.74
	$N_e$	5	3	4	4.00
	PIC	0.750	0.649	0.687	0.70
Among loci mean	Allele number	9.31	9.19	13.00	10.50
	$h_i$	0.762	0.771	0.827	0.79
	$N_e$	3.412	3.118	3.529	3.353
	PIC	0.708	0.708	0.787	0.73
CPD		—	—	—	99.06%

$h_i$  : mean heterozygosity,  $N_e$  : mean effective number of allele, PIC : mean polymorphic information content.

Table 4. Analysis of individual identification system using 9 and 16 Microsatellite markers in 3 domestic beef cattle populations

Breed	No. of sample	Correct Assignment (9 microsatellite makers)			Correct Assignment (16 microsatellite makers)		
		100%	>95%	<95%	100%	>95%	<95%
Hanwoo population	177	64.4 (n=114)	98.9 (n=175)	0.6 (n=2)	96 (n=170)	100 (n=177)	0 (n=0)
Holstein population	184	40.2 (n=74)	79.3 (n=146)	11.4 (n=21)	65.9 (n=112)	90 (n=153)	5.3 (n=9)
Australian/American cattle population	189	72.5 (n=114)	90.5 (n=171)	2.1 (n=4)	87.8 (n=130)	95.3 (n=141)	2.0 (n=3)

\* Microsatellite makers were referenced from Oh et al., 2008  
 n = Number of observation

것이 정확한 판정을 높일 수 있었다.

수입우 집단 역시 189두를 대상으로 9개의 microsatellite marker를 이용한 결과로는 수입우 판정 정확성 확률이 100% 일 경우는 114두 (72.5%), 95% 이상 정확성은 171두 (90.5%), 95% 미만은 4두 (2.1) 로 나타났으며 16개의 microsatellite marker 를 이용하였을 경우는 정확성 100% 을 가진 결과가 130두 (87.8), 95% 이상 정확성은 141두 (95.3)으로 나타났으며 95% 미만은 3두 (2.0%)로 판정되었다 (Table 4). 따라서 9종의 마커를 이용하여 통계적인 수치를 구한 누적 품종식별력은 본 실험에 사용된 16종의 마커를 이용할 경우보다 0.65%의 다소 높게 추정되었지만 명확하게 품종을 식별하는 능력은 16개의 마커를 사용하였을 때의 결과가 더욱 정확한 품종판정능력을 보였다.

최적의 개체 식별 시스템의 설정을 위해서는 개체 식별력이 높은 개별유전 표지를 최적화하여 설정하는 것이 바람직하다. 본 연구결과에 따르면 16종의 microsatellite marker를 이용하여 정확도가 높은 개체 및 품종 식별이 가능할 것으로 사료되며, 또한 16종의 microsatellite marker 국내산 육우집단에 적용할 경우 효율적인 국내산 육우 품종 식별 및 개체 식별 시스템이 마련될 것으로 예측된다.

#### IV. 요약

소 품종 판별을 위해 DNA 마커 정보는 품종을 구별하거나, 형질을 구분하는데 있어 꾸준히 이용되고 있다. 본 연구에서는 Finnzymes (DIAGNOSTICS)사의 Bovine Genotypes Kit Ver1.1/2.1을 농촌진흥청 국립축산과학원이 보유한 호주산 및 미국산 수입우 DNA 샘플 148두/국내산 육우 DNA 샘플 (Holstein) 170두와 정읍지역 한우 DNA 샘플 177두에 적용하여 한우품종 식별력을 분석 하였다. Bovine Genotype Kit 1.1은 11개의 ISAG MS 마커로 이루어져 있

으며, 여기에 5개 MS 마커가 추가된 ver2.1 Kit를 사용하여 집단별 유전자형 데이터를 구축하였고, MS Tool kit 분석 및 Phylip program 분석을 수행하여 Phylogenetic tree를 작성하였고, Genotype 분석 프로그램인 GeneClass 2.0 (INRA/France)을 이용하여 품종 식별력을 추정하였다. 분석 결과 95% 이상의 정확성을 가진 한우 식별력은 100%로 나타났고, 호주산 수입우 95.3%, 국내산 육우는 90%의 높은 식별력을 각각 나타내었다. 따라서 Finnzymes 사의 상용화된 16종의 MS 마커는 한우집단의 유전적 특징을 객관적으로 구분하여 수입쇠고기/젓소고기/한우쇠고기에서 간편하게 한우개체 및 품종식별에 활용될 수 있는 가능성과 특히 국내에서 비육된 육우(젓소)를 수입산 쇠고기로부터 식별할 수 있는 장점이 있을 것으로 사료된다.

#### V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원 (과제명 : Bovine Genotype Panel을 이용한 한우육 판별 및 판정 마커의 분석체계 수립)에 의해 수행되었으며, 본 연구에 사용된 정읍지역 한우 DNA 시료는 2008년 농림기술개발사업 (과제명 한우 육량육질 조기선발용 DNA kit 산업화기술개발)에서 제공받았습니다.

#### VI. 인용 문헌

1. Baker, J. S. F., Tan, S. G., Selvaraj, O. S. and Mukherjee, T. K. 1997. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Genet.* 28:1-1.
2. Bjornstad, G., Nilsen, N. O. and Roed, K. H. 2003. Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horse. *Aniam.*

- Genet. 34:55-58.
3. Blott, S. C., Williams, J. L. and Haley, C. S. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*. 82:613-619.
  4. Fan, B., Wang, Z., Li, Y. Z., Zhao, X., Liu, B., Zhao, S. H., Yu, M., Li, M., Chen S., Xiong, T. and Li, K. 2002. Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Anim. Genet.* 33:422-427.
  5. Fan, B., Chen, Y., Moran, C., Zhao, S., Liu, B., Zhu, M., Xiong, T. and Li, K. 2005. Individual-breed assignment analysis in swine populations by using microsatellite markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18:1529-1534.
  6. Fries, R. and Durstewitz, G. 2001. Digital DNA signatures: SNPs for animal tagging. *Nat. Biotechnol.* 19, 508.
  7. Lee, H. K., Jean, G. J., Kong, H. S., Oh, J. D., Choi, I. S., Kim, C. D., Jo, C. Y., Yoon, D. H., Shin, H. D. and Lee, J. H. 2004. Application of DNA test for individual traceability in Hanwoo. *Korea J. Food. Sci. Ani. Resour.* 1:8-14.
  8. Li, K., Chen, Y., Moran, C., Fan, B., Zhao, S. and Peng, Z. 2000. Analysis of diversity and genetic relationships between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed. *Anim. Genet.* 31:322-325.
  9. Machugh, D. E., Loftus, R. T., Cunningham, P. and Bradley, D. G. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29:333-340.
  10. Nei, M., Taima, F. and Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19:153-170.
  11. Oh, J. D., Lee, J. A., Kong, H. S., Park, K. D., Yoon, D. H., Jean, G. J. and Lee, H. K. 2008. Estimation of Genetic characteristic and cumulative power of breed discrimination using microsatellite marker in Hanwoo. *J. Emb. Trans.* 3:203-209.
  12. Olowofeso, O., Wang, Y., Shen, J., Chen, K., Sheng, H., Zhang, P. and Wu, R. 2005. Estimation of the cumulative power of discrimination in Haimen chicken populations with microsatellite markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18:1066-1070.
  13. Ota, T. 1993. DINPAN. Pennsylvania State University, PA. USA.
  14. Park, D. D. E. 2000. Microsatellite Toolkit For MS Excel 97 or 2000.
  15. Rannala, B. and Mountain, J. L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:9197-9201.
  16. Seo, K. S., Y. M. Cho. and H. K. Lee. 2000. Development of Network System for the Application of HACCP in Livestock production Stage. *J. Agroinformatics.* 1:1-4.
  17. Sneath P. H. A. and Sokal R.R. 1973. *Numerical Taxonomy.* Freeman, San Francisco, USA.
  18. Yoon, D. H., Kong, H. S., Oh, J. D., Lee, J. H., Cho, B. W., Kim, J. D., Jeon, K. J., Jo, C. Y. Jeon, G. J. and Lee, H. K. 2005a. Establishment of an Individual Identification System Based on Microsatellite Polymorphisms in Korean Cattle (Hanwoo). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18, 762-766.
  19. Yoon, D. H., Park, E. W., Lee, S. H., Oh, S. J., Cheong, I. C. and Hong, K. C. 2005b. Assessment of genetic diversity and relationships between Korean cattle and other cattle breeds by microsatellite loci. *Korea. J. Anim. Sci & Technol.* 47:341-354.
- (접수일자 : 2009. 7. 1. / 수정일자 : 2009. 8. 13. / 채택일자 : 2009. 8. 15.)