

소 동일성 검사에 적용 가능한 14 Microsatellite marker와 60 Single Nucleotide Polymorphism marker 간의 판별 효율성 비교

임현태* · 서보영* · 정은지* · 유채경* · 윤두학** · 전진태*

경상대학교 응용생명과학부 (BK21)*, 농촌진흥청 국립축산과학원**

A Comparison of Discriminating Powers Between 14 Microsatellite markers and 60 SNP Markers Applicable to the Cattle Identification Test

Hyun Tae Lim*, Bo Yeong Seo*, Eun Ji Jung*, Chae Kyoung Yoo*, Duhak Yoon** and Jin Tae Jeon*

Division of Applied Life Science (BK21 program), Graduate School of Gyeongsang National University*, National Institute of Animal Science, R. D. A.**

ABSTRACT

When 14 microsatellite (MS) markers were applied in the identifying test for 480 Hanwoo, the discriminating power was estimated as 3.43×10^{-27} based on the assumption of a random mating group (PI). This rate is 1,000 times higher than that of 60 single nucleotide polymorphism (SNP) markers. On the other hand, the power of the 60 SNP markers was estimated as 4.69×10^{-20} and 8.02×10^{-12} on the assumption of a half-sib mating group ($PI_{half-sibs}$) and a full-sib mating group (PI_{sibs}), respectively. These powers were 10 times and 10,000 times higher than those of the 14 MS markers. The results indicated that the total number of alleles (MS vs SNP = 146 vs 120) acted as a key factor for the discriminating power in a random mating population, and the total number of markers (MS vs SNP = 14 vs 60) was a dominant influence on the power in half-sib and full-sib populations. In the Hanwoo population, in which it was assumed that the entire population is the enormous half-sib group formed by the absolute genetic contribution of a few nuclear bulls, there will be only a 10 times difference in the discriminating power between the 14 MS markers and the 60 SNP makers. However, the probability of not excluding a candidate parent pair from the parentage of an arbitrary offspring, given that only the genotype of the offspring (PNE_{pp}) was 1,000 times higher as shown by the 14 MS markers than that by the 60 SNP markers. The strong points of SNP makers are the stability of the variation (low mutation rate) and automation of high-throughput genotyping. In order to apply these merits for the practical and constant Hanwoo identity test, research and development are required to set a cost-effective platform and produce a homemade apparatus for SNP genotyping.

(Key words : Microsatellite (MS), Single Nucleotide Polymorphism (SNP), Traceability, Discriminating power)

I. 서 론

2003년 12월 25일 미국 워싱턴주 Mabton시 소재 농장의 소가 광우병으로 확인되어 미국산 쇠고기의 수입이 금지되었고, 2005년 2월 수입재개를 위한 한미 광우병 전문가 협의회를 개최하였으나, 그 해 6월 미국산 소에서 광우병이 재차 확인됨에 따라 미국의 검사체계에 대한 문제가 제기되는 등 최근 쇠고기 수입과 관련하여 안전성 문제가 크게 대두되었다. 미국의 광우병 발생으로 중단되었던 미국 쇠고기의 수입이 한·미 FTA 협상과 연계된 협상에 의하여 Quality System Assessment 프로그램에 따라

검증된 작업장에서 작업한 30개월 미만 소의 등뼈, T-bone 스테이크 및 갈비 등을 포함한 쇠고기 수입이 재개되었다. 또한 2009년 7월 한·EU FTA 협상이 완료됨에 따라 유럽으로 부터도 가격 경쟁력이 높은 축산물들이 국내로 수입될 수 있는 상황이 되었다. 따라서 우리나라 한우산업의 경쟁력 제고가 절실하며 확고한 국내 시장 점유를 위해서는 우수한 한우 육종 개량 사업과 적절한 시장차별화 제도의 정착 및 경영안정 장치를 강화해야 할 것이다. 한우를 우수한 품종으로 개량하기 위해서는 정확한 혈통 검증을 통한 유전적 개량이 필수이며, 정확한 혈통 검증을 위한 수단으로 DNA marker를 이용한 친자감정의 도입이 필

Corresponding author : Jin Tae Jeon, Department of Animal Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Gyeongnam, Korea. Tel: 055-751-5516. Fax: 055-756-7171, E-mail: jtjeon@gnu.ac.kr

요하다. 그리고 시장차별화 및 경영안정 장치의 일환인 쇠고기 이력추적제는 소와 쇠고기의 생산, 도축, 가공, 유통과정의 각 단계별 정보를 기록하고 관리하여 문체의 발생 시에 이동경로를 따라 추적하여 신속한 원인규명을 가능하게 하는 제도로서, 소비자는 인터넷을 통하여 구입한 쇠고기의 원산지, 품질 등의 이력을 알 수 있는 시스템이다. 이런 쇠고기 이력추적제를 뒷받침하기 위해 과학적인 검증 기법의 필요성이 대두되고 있으며, 그 해결책이 DNA marker를 이용한 대립유전자형 분석을 통한 개체식별이다.

소의 개체 다형성 분석에 적합한 DNA marker로서의 microsatellite (MS)의 경우 국제동물유전학회 (International Society for Animal Genetics, http://www.isag.org.uk/02_PVpanels_LPCGH.doc)와 Roslin 연구소 (<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>) 등에서 소의 다형성 분석용 MS marker들을 추천하고 있으며, 추천된 marker는 다형성 분석 연구에 활용되고 있다. 또한 지난 10년간 MS marker를 이용하여 성공적으로 소의 동일성과 혈연관계 검증에 활용되었다 (Glowatzki-Mullis 등, 1995; Usha 등, 1995; Ajmone-Marsan 등, 1997; Heyen 등, 1997; Williams 등, 1997). 또한 DNA marker의 효율적인 분석에 적합한 Multiplex PCR은 여러 가지 primer를 혼합해 동일한 조건에서 DNA 단편을 증폭시키는 방법으로 1998년에 처음으로 시작되었다 (Chamberlain 등, 1998). 이 방법은 변이와 다형성 분석 또는 양적인 평가, Reverse-Transcription (R-T) PCR 등 많은 부분에 적용되어 성공적으로 수행되었다 (Crisan 등, 1994; Mansfield 등, 1993; Mutirangura 등, 1993; Shuber 등, 1993). 그리고 최근 MS marker를 대체하고 보다 효율적인 대용량 유전체 분석에 활용되고 있는 single nucleotide polymorphism (SNP) marker는 소의 전체 염색체 염기서열 해독을 통해 많은 수가 발굴되어 연구에 활용 가능한 DNA chip의 형태로 보급되고 있다. 현재 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 SNP database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_batchSearch.cgi?org=9823&type=SNP)에는 약 200만 여개 이상의 SNP이 보고되어 있으며, 이중 염색체에 위치 할당 등 특성이 파악된 SNP들을 이용하여 Illumina사의 경우 Bovine 50K SNP chip을 상용화 하여 보급하고 있으며, Affymetrix사의 경우 Bovine 25K SNP Kit와 Bovine 10K SNP Kit를 상용화 하여 보급하고 있다. 또한 SEQUENOM사의 경우 multiplex matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) 방법을 이용하여 대량의 SNP를 분석할 수 있는 시스템을 구축하고 있다. 또한 미국 쇠고기의 혈연관계 검증 및 이력추적을 위해 2002년 Michael 등이 32종의 SNP marker를 이용한 연구 결과를 보고 하였으며, Werner 등은 2003년 유럽지역의 젓소를

대상으로 38종의 SNP marker를 이용하여 혈연관계 검증에 대한 연구 결과를 보고하였다. 그리고 미국의 농무성에서는 혈연관계 검증 및 이력추적에 활용하기 위해 23품종 192두를 대상으로 121종의 SNP marker를 Agricultural Research Service (ARS)를 통하여 제안하였으며 (http://cgemm.louisville.edu/USDA/cattle/marc_snps_parent_trace_id.html), 또한 효율적 검증을 위해 60종의 SNP를 이용하여 MALDI-TOF MS 방법을 이용한 대립유전자형 분석을 제안하였다 (http://www.ars.usda.gov/research/projects/projects.htm?ACCN_NO=409004).

따라서 본 연구는 소 동일성 검사에 MS와 SNP marker 간의 판별 효율성과 상용화를 위한 비용 등을 비교하여 현재 쇠고기 이력추적제에 적용 중인 MS marker의 적합성을 확인하고, 객관적으로 측정된 자료를 토대로 추후 SNP marker로 전환할 경우 필요한 연구개발 요소를 파악하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 동물

한우의 혈액은 경상남도의 23개 지역 한우농가에서 총 480두의 번식우 혈액을 채취하여 분석에 사용하였다. Genomic DNA의 분리는 Genomic DNA 추출 키트 (Promega, USA)를 이용하였다.

2. MS marker의 정보

대립유전자형 분석을 위해 사용된 MS marker는 Applied Biosystems사의 Stockmarkers™의 MS marker와 International Society for Animal Genetics (국제동물유전학회, http://www.isag.org.uk/02_PVpanels_LPCGH.doc), Roslin 연구소 (<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>)에서 제안한 소의 다형성 분석용 marker 및 임 등 (2005)이 제한한 MS marker 중 14개를 선발하여 이용하였다 (Table 1).

3. SNP marker의 정보

미국 농무부 ARS를 통하여 제안한 121종의 SNP marker (http://cgemm.louisville.edu/USDA/cattle/marc_snps_parent_trace_id.html) 중 37종을 선발하고, Werner 등 (2003)이 보고한 연구에 이용한 38종 중 23종을 선발하여 총 60종의 SNP marker를 구성하고 NCBI SNP database를 통해 각각의 marker에 대한 염기서열을 확보하여 대립유전자형 분석에 사용하였다 (Table 2).

4. MS marker의 Multiplex-PCR 조성 및 PCR 조건

Multiplex-PCR의 조성은 template DNA 2 μ l, primer mix 8.25 μ l, Hot start Taq DNA polymerase (Bioneer, Korea) 0.4 μ l, 10x buffer 1.5 μ l, 2.5mM dNTPs 1.2 μ l, MgCl2 1.1 μ l DMSO 0.25 μ l, 증류수 0.3 μ l를 첨가하여 최종 15 μ l의 반응액을 사용하였으며, PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 denaturation을 실시한 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 58 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1cycle로 하여 총 9cycle, 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 57 $^{\circ}$ C에서 75초, 56 $^{\circ}$ C에서 60초를 1cycle로 하여 총 5cycle, 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 56 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1cycle로 하여 총 25cycle을 반복하는 Touch down PCR 방법을 이용하였고, 이후 65 $^{\circ}$ C에서 30분 extension 후 8 $^{\circ}$ C에서 종료하였다.

5. MS marker의 대립유전자형 분석

Multiplex-PCR 산물을 ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 전기영동하고 (Fig. 1), GeneScan version 3.7 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자별로 분류한 후 Microsoft Excel (Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다.

6. SNP marker의 Multiplex-PCR 및 대립유전자형 분석

MassARRAY (SEQUENOM[®], USA)를 이용한 대량 SNP 분석을 위해 Application Note (SEQUENOM[®], 2005) 중 MassARRAY를 이용한 iPLEX[™] 분석 방법을 실험에 적용

하였으며, SEQUENOM[®]에서 제공하는 분석 프로그램을 이용하여 데이터를 보정하였다 (Fig. 2).

7. 자료의 통계분석체계 설정

DNA marker들의 대립유전자 정보를 이용하여 Weir와 Hill (2002) 추정법에 의한 *F*-통계량 (F_{ST} , F_{IT} , 및 F_{IS})은 FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001)과 GENEPOP version 3.4 (Raymond와 Rousset, 1995)를 사용하여 계산하였고, DNA marker의 다형성지수인 heterozygosity (*He*)와 polymorphic information content (*PIC*), exclusion probability (*PE*) 그리고 Hardy-Weinberg equilibrium은 Cervus version 2.0 (Marshall 등, 1998)을 이용하여 추정하였다. 또한 추정된 *F*-통계량에 근거하여 무작위 교배집단, 반형매 교배집단 그리고 전형매 교배집단에서의 동일개체 출현가능확률은 API-CALC version 1.0 (Ayres와 Overall, 2004)을 사용하여 계산하였다. 또한 사용된 marker의 독립성 검증을 위해 marker 간 linkage disequilibrium에 의한 연관은 Linkage Disequilibrium Analyzer 1.0 (Keyue 등, 2003)와 Multiallelic Interallelic Disequilibrium Analysis Software v1 (Tom 등, 2006)를 이용하여 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

MS marker는 Table 1과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 14개의 MS와 2개의 sexing marker들을 하나의 multiplex group으로 묶어 한 번의 PCR과 한 번의 전기영동에 의하여 크기와 형광 표식자별로 분류되도록 하였다. 이와 같이 16

Table 1. Information of the 14 microsatellite markers used in this study

Locus	Chr.	Label	No. of Allele	N	<i>He</i>	<i>PIC</i>	Hardy-Weinberg equilibrium(<i>P</i> -value)	Size range (bp)
TGLA227	18	FAM	14	471	0.830	0.808	0.8352	76~104
BM2113	2	FAM	11	471	0.622	0.568	0.3721	123~143
TGLA53	16	FAM	17	469	0.878	0.866	0.4210	154~188
ETH10	5	FAM	8	471	0.739	0.722	0.4710	212~224
SPS115	15	FAM	10	471	0.811	0.743	0.2699	246~260
BMS1747	14	VIC	7	471	0.715	0.653	0.8186	85~105
TGLA126	20	VIC	7	470	0.689	0.643	0.9639	116~122
TGLA122	21	VIC	18	471	0.858	0.850	0.6818	137~181
INRA23	3	VIC	10	471	0.754	0.711	0.4513	196~222
ETH3	19	NED	8	470	0.755	0.741	0.7803	105~125
ETH225	9	NED	8	471	0.652	0.624	0.7817	141~159
BL1009	14	NED	11	471	0.866	0.829	0.5017	164~197
BM4305	8	PET	11	471	0.788	0.758	0.2493	147~171
BM1824	1	PET	7	470	0.717	0.629	0.3349	178~192

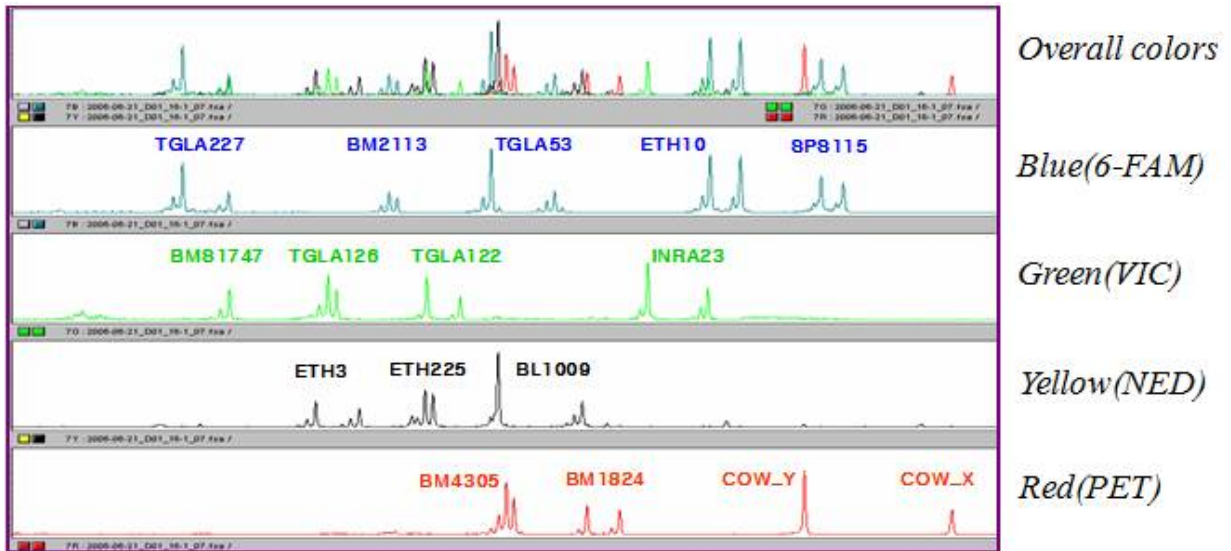


Fig. 1. GeneScan analysis of the 14 MS + 2 sexing markers from a multiplex PCR on an ABI3100 DNA sequencer.

개의 marker를 동시 전개하는 기법은 분석 단가와 분석 인력을 효율화 시켰다. 그러나 실험상의 효율성과는 다르게 일반적인 MS genotyping의 단점으로 자동 유전자 좌위 calling system이 존재하나 보다 정확한 판정을 위하여 재차 실험자가 확인해야 하는 번거로움은 상존하고 있다. 반면 60개의 SNP marker는 3개의 mutplexing group (Table 1)안에 31, 25, 4개로 묶었으며, PCR 내부 primer를 이용한

single base extension과 extension 산물의 질량차이를 이용한 분리 3단계로 이루어진 분석 절차에 의하여 최종적으로 Fig. 2에 보여진 결과를 얻을 수 있었다. 본 SNP 분석 방법은 3단계의 실험과정으로 번거로움이 있었으나 실험 후 처리과정이 자동화 되어있는 장점 또한 있는 것으로 파악되었다.

MS와 SNP marker를 이용하여 한우 480두에 대한 대립

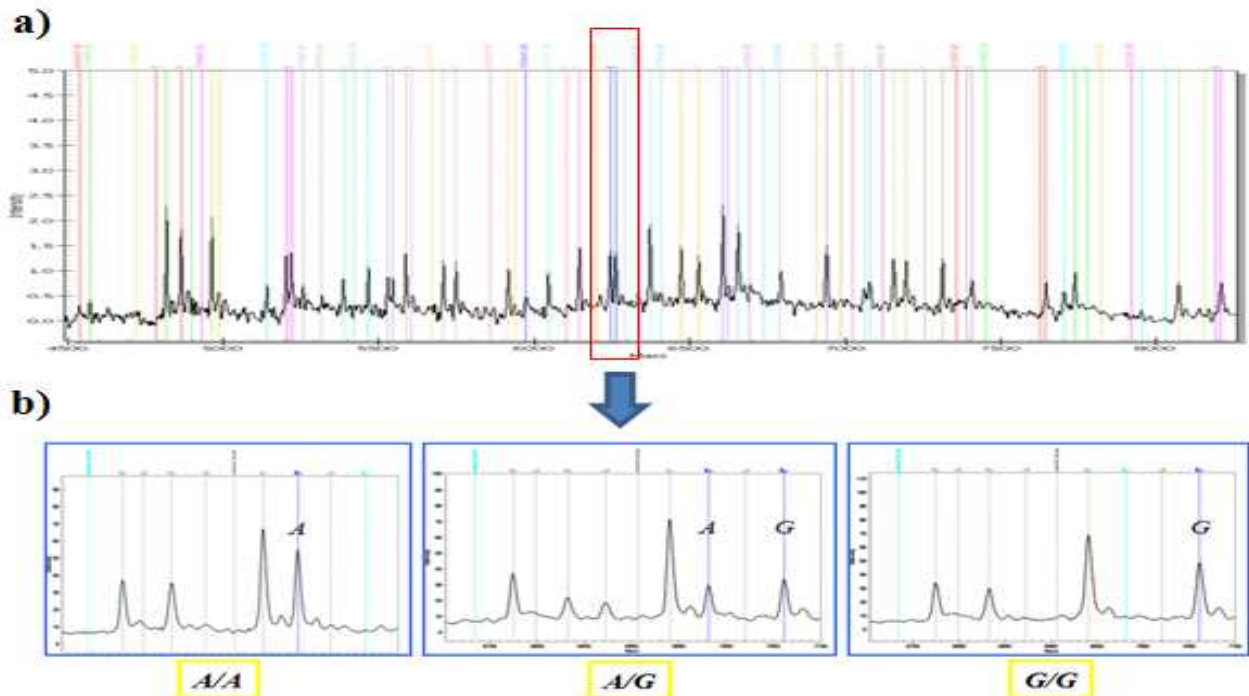


Fig. 2. a) A raw MassSpec Spectra of multiplexed 25 SNP markers among the 60 SNP markers and b) an example of genotyping using the SNP marker derived from the AF440365 sequence.

유전자형을 분석하여 추정된 H_e , PIC 값과 대립유전자 수, Hardy-Weinberg equilibrium P -value 등은 Table 1과 2에 나타내었다. MS marker의 경우 H_e 추정치는 0.622~0.878의 범위이었으며, SNP marker의 경우는 0.092~0.542의 범위로 예견한 바와 같이 SNP 보다 MS에서 다양한 대립유전자가 존재하여 더 높은 다형성 지수를 보이는 것으로 나타났으며, Hardy-Weinberg equilibrium 검증 결과 MS의 경우 0.2493~0.9639의 범위로 Hardy-Weinberg equilibrium에 위배 되는 marker가 없었고, SNP의 경우 0.0221~0.9806로 DQ470475만이 $P < 0.05$ 를 나타내었다. 그리고 marker 간의 독립성 검증을 위해 추정된 r^2 값이 MS의 경우 0~0.3326, SNP의 경우 0~0.0588로 나타나 marker 간의 중등도 이하의 Linkage disequilibrium이 있는 것으로 확인하였다. FSTAT version 2.9.3과 GENEPOP version 3.4 프로그램을 이용하여 F -통계량 (F_{ST} , F_{IT} , F_{IS})을 추정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 여기서 F_{IS} 는 이형접합체의 감소 정도를 나타내는 척도로써 근친도 정도를 대변하는 지수이며, 양의 값은 근친도가 존재함을, 음의 값은 존재하지 않음을 나타낸다. 또한 F_{ST} 는 고정지수로서 genetic drift에 의한 subpopulation의 이형접합체 감소 추이를 나타내는 지수이며, F_{IT} 는 전체집단에 대한 개체들의 모든 근친도 값을 나타내는 지수로 이들을 통하여 집단 간 유전변이와 집단 내 개체들의 근친 정도를 파악하는데 이용할 수 있는데, 분석결과 F_{IS} 와 F_{IT} 의 값에서 MS는 -0.0186과 -0.0020으로 음의 값을 SNP의 경우 0.0001과 0.0024로 양의 값을 나타내었다. 즉, MS marker로 추정된 근친도는 음의 값으로 존재하지 않음을 나타낸 반면 SNP marker의 경우는 0 또는 낮은 양의 값을 나타내어 동형접합체의 빈도가 MS marker로 추정된 경우 보다 높았다. 이러한 결과는 F_{ST} 에서도 반영되어 각 농장 간 한우집단의 유전적 차이는 MS marker의 경우 1.63%인 반면 SNP marker로 추정된 경우 0.22%로 MS marker로 추정된 경우가 농장 단위로 구분되는 한우 집단 간 유전적 차이를 보다 잘 설명할 수 있는 것으로 나타났다. F -통계량 중 F_{IS} 와 F_{ST} 값을 토대로 API-CALC version 1.0을 이용해 무작위 교배집단과 반형매 교배집단 그리고 전형매 교배집단 (probability of identity; PI , probability of identity from half sibs; $PI_{half-sibs}$, and probability of identity from sibs; PI_{sibs})으로 가정하여 두 종류의 DNA marker에 대한 동일한 개체 출현확률 값을 분석하여 Table 4에 나타내었다. 무작위 교배집단으로 가정한 경우 MS는 3.43×10^{-27} 으로 SNP의 2.09×10^{-24} 에 비해 약 1,000배의 높은 판별율을 보였고, 반형매 교배집단과 전형매 교배집단의 경우 SNP가 약 10배와 10,000배의 높은 판별율을 나타내었다. 이러한 결과는 무작위 교배집단에서는 사용된 marker의 전체 대립유전자수 (MS : SNP = 146 : 120)에 의하여 판별효율이 결정되는 반면, 혈연관계

가 높은 반형매와 전형매 집단에서는 비슷한 총 대립유전자수일 경우 marker의 수 (MS : SNP = 14 : 60)가 많은 경우가 더 높은 판별율을 보이는 것으로 나타났으며, 또한 marker의 전체 대립유전자 수와 분석에 사용된 marker의 수에 대한 연관관계를 규명하기 위해 Table 2에 나타낸 SNP marker의 minor allele frequency를 추정하고 minor allele frequency가 0.1 이하인 2개의 marker를 제외한 58개의 SNP, 그리고 0.2 이하인 13개의 marker를 제외한 47개의 SNP를 이용하여 무작위 교배집단, 반형매교배집단 그리고 전형매 교배집단으로 가정하여 분석한 결과 58개의 SNP의 경우 2.95×10^{-24} , 4.70×10^{-20} , 4.52×10^{-12} 그리고 47개의 SNP의 경우 7.05×10^{-22} , 1.56×10^{-18} , 4.31×10^{-12} 로 나타나 minor allele frequency가 0.1 이하인 2개의 marker를 제외한 58개의 SNP 경우 60개의 SNP의 판별율과 차이가 없었으나 minor allele frequency가 0.2 이하인 13개의 marker를 제외한 47개의 SNP의 경우 무작위 교배집단과 반형매 교배집단에서 약 100배의 낮은 판별율을 나타내 분석에 사용되는 marker의 수에 영향을 받는 것으로 나타났고, 전형매 교배집단의 경우 분석에 사용된 marker의 수가 줄었음에도 판별율이 변함이 없는 것으로 보아 분석에 사용되는 marker의 수와 더불어 대립유전자 빈도에 영향을 받는 것으로 나타났다. CERVUS version 2.0 프로그램을 이용하여 두 종류의 DNA marker별 H_e 와 PIC 추정치 그리고 친자감정률 (probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed; PE_{pu} 와 probability of paternity exclusion; PE)을 분석하여 Table 5에 나타내었다. H_e 와 PIC 추정치의 경우는 하나의 변이를 가진 SNP에 비하여 여러 가지의 경우의 수를 가진 MS가 월등히 높은 값을 나타내었다. 후보 부모 집단에서 친 부모일 가능성이 낮은 개체를 배제하는 방식인 exclusion method로 추정된 친자감정률에서는 MS와 SNP 모두 100%에 가깝게 추정되어 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 likelihood ratio에 의하여 가능한 후보 부모들로부터 가장 확률이 높은 부모를 찾는 inclusion method로 추정된 부모를 동시에 찾는 경우를 가정한 Parent Pair 값 (PNE_{pp})의 경우 MS는 1.66×10^{-9} , SNP의 경우 0.03×10^{-6} 으로 SNP 보다 MS가 약 1,000배 정도 정확히 감정할 수 있는 것으로 나타내었다. 두 종류의 DNA marker에 대한 무작위 교배집단과 반형매 교배집단 그리고 전형매 교배집단 3가지 전체로 추정된 판별율의 의미는 국내의 한우우 집단을 적은 두수의 보증종모우들의 절대적인 유전적 기여에 의한 거대한 반형매 집단으로 가정하고 한국 농촌경제연구원에서 발행하는 축산관측 2009년 6월호를 기준으로 국내 한우우의 사육두수는 258만 5천두로 이를 고려해 보더라도 반형매 교배집단의 경우 MS는 4.18×10^{-19} , SNP의 경우 4.69×10^{-20} 의 확률로 동일개체가 출현할 가능성이 없는 것으로 보아도 무방할 것

Table 2. Information of the 60 SNP markers used in this study

Multiplexing Group	Locus	Chr.	N	<i>He</i>	<i>PIC</i>	Minor allele frequency	Hardy-Weinberg equilibrium (<i>P</i> -value)
1	AF440371	9	477	0.249	0.216	0.1436	0.8951
	AF440377	2	471	0.467	0.345	0.3312	0.2820
	AF440380	3	476	0.481	0.371	0.4359	0.6688
	AJ496636	3	478	0.410	0.333	0.3033	0.5547
	AJ496772	18	464	0.418	0.334	0.3039	0.8479
	AJ496774	25	471	0.316	0.253	0.1815	0.2116
	AJ496785	8	478	0.421	0.336	0.3086	0.7962
	AJ505161	23	477	0.302	0.252	0.1803	0.7537
	AJ506786	1	453	0.285	0.245	0.1733	0.9686
	AY776154	2	453	0.453	0.356	0.3631	0.6846
	AY841151	2	464	0.453	0.355	0.3599	0.7426
	AY842473	3	478	0.464	0.363	0.3912	0.6197
	AY842474	3	476	0.445	0.337	0.3109	0.4514
	AY849380	6	478	0.502	0.364	0.3975	0.3372
	AY850194	8	469	0.493	0.375	0.4936	0.7837
	AY853303	13	477	0.526	0.373	0.4602	0.2303
	AY858890	17	476	0.479	0.362	0.3866	0.9018
	AY863214	18	478	0.483	0.374	0.4759	0.5240
	AY914316	18	477	0.444	0.325	0.2851	0.0629
	AY919868	20	465	0.542	0.375	0.4839	0.0818
	AY937242	23	473	0.524	0.375	0.4968	0.3337
	AY939849	24	478	0.515	0.365	0.3996	0.1359
	AY941204	25	478	0.502	0.373	0.4540	0.8507
	DQ381153	1	478	0.500	0.371	0.4341	0.7685
	DQ404149	1	477	0.484	0.368	0.4140	0.9806
	DQ404151	1	478	0.515	0.375	0.5000	0.5828
	DQ404152	2	476	0.454	0.337	0.3109	0.2376
	DQ404153	29	478	0.354	0.289	0.2270	0.9636
	DQ422950	3	471	0.488	0.366	0.4055	0.8541
	DQ468384	5	464	0.513	0.375	0.4784	0.6131
DQ470475	5	477	0.436	0.369	0.4235	0.0221	
2	AF440365	4	468	0.479	0.372	0.4487	0.5108
	AF440366	9	478	0.441	0.341	0.3211	0.8662
	AF440368	1	465	0.249	0.216	0.1441	0.9437
	AF440372	5	471	0.444	0.359	0.3747	0.2711
	AF440381	14	477	0.092	0.098	0.0545	NA ¹⁾
	AJ496635	6	454	0.403	0.331	0.2928	0.4633
	AJ496762	16	475	0.427	0.329	0.2980	0.5844
	AJ496765	19	478	0.425	0.337	0.3107	0.8992
	AJ496767	21	455	0.332	0.264	0.1945	0.2656
	AJ496768	11	473	0.416	0.317	0.2717	0.3051
	AJ496773	29	478	0.481	0.373	0.4603	0.5199
	AJ496782	12	477	0.233	0.211	0.1394	0.6048
	AJ505159	16	473	0.410	0.332	0.3002	0.6483
	AY761135	1	465	0.475	0.362	0.3860	0.9619
	AY851163	11	472	0.458	0.371	0.4364	0.1423
	AY853302	13	475	0.446	0.374	0.4716	0.0257
	AY856094	29	453	0.488	0.375	0.4801	0.6618
	AY857620	16	472	0.269	0.241	0.1684	0.4585
	AY916666	19	476	0.328	0.291	0.2290	0.1374
	AY929334	23	472	0.119	0.109	0.0614	NA ¹⁾
AY943841	1	464	0.463	0.365	0.3998	0.4883	
DQ381152	17	463	0.216	0.210	0.1382	0.0620	
DQ404150	1	450	0.269	0.232	0.1589	0.9498	
DQ435443	3	472	0.299	0.251	0.1790	0.8415	
DQ485413	4	477	0.518	0.375	0.4937	0.4898	
3	AJ505155	20	471	0.389	0.328	0.2919	0.2144
	AY842475	4	473	0.505	0.372	0.4471	0.6996
	AY849381	6	472	0.475	0.362	0.3856	0.9464
	AY860426	17	461	0.432	0.356	0.3633	0.1663

¹⁾ NA : Not analyzed.

Table 3. Estimates of overall F -statistics in the Hanwoo population used in this study

Marker type	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
14 MS	-0.0186	0.0163	-0.0020
60 SNP	0.0001	0.0022	0.0024

Table 4. Expected probability of identity among genotypes of random individuals (PI), probability of identity among genotypes from random half-sibs ($PI_{half-sibs}$), probability of identity among genotypes from random sibs (PI_{sibs})

Marker type	PI	$PI_{half-sib}$	PI_{sibs}
14 MS	3.43×10^{-27}	4.18×10^{-19}	3.98×10^{-8}
60 SNP	2.09×10^{-24}	4.69×10^{-20}	8.02×10^{-12}

Table 5. Estimates of average heterozygosity indices and powers in parentage tests in the Hanwoo population were used in this study. The exclusionary power of the second parent (PE), the parent exclusion power of both parents (PE_{pu}) and the probability of not excluding a candidate parent pair from the parentage of an arbitrary offspring, given only the genotype of the offspring (PNE_{pp}), are unconfirmed

Marker type	He	PIC	PE_{pu}	PE	PNE_{pp}
14 MS	0.7588	0.7245	0.99920	1.00000	1.66×10^{-9}
60 SNP	0.4159	0.3243	0.99692	0.99998	0.03×10^{-6}

으로 사료된다.

동일개체출현 확률과 친자감정률로 파악한 14 MS marker와 60 SNP marker의 효율은 분석집단과 분석방법에 따라 각기 다른 특성을 나타내고 있어 어느 특정 marker type이 보다 우수하다 단정할 수 없었다. 실험과정상의 편이성은 MS marker가 우수하였고, 실험결과 후처리 과정은 SNP marker가 보다 편리 하였다. 분석비용은 투입된 재료비 기준으로 MS marker가 SNP marker의 25% 수준으로 낮았으며, 분석용 기기의 국내 보급률 또한 MS marker의 genotyping용 장비가 약 20배 높은 것으로 파악되었다. 그러나 SNP marker의 장점인 marker의 안정성, 대량분석의 자동화 등을 감안할 경우 보다 간편하고 저렴한 분석방법과 장비가 개발된다면 MS marker를 대체할 수 있리라 사료된다. 또한 SNP genotyping의 상대적 고가의 가격은 현재 적용 가능한 분석법이 외국에서 개발되었고 재료비와 분석장비 등에 분석방법의 특허료 포함과 연관되어 있는바 국내에서 저가로 활용가능한 분석방법의 연구개발이 필요할 것으로 사료된다.

IV. 요약

14개의 microsatellite (MS) marker를 사용 할 경우 무작위 교배 집단 (PI) 가정 하에 3.43×10^{-27} 의 판별율을 보여 60개의 single nucleotide polymorphism (SNP) marker에 비해 약 1,000배의 높은 판별 효과를 나타내는 것으로 파악되었다. 그러나, 60개의 SNP marker의 경우 반형매 교배 집

단 ($PI_{half-sibs}$)으로 가정할 경우 4.69×10^{-20} 과 전형매 교배 집단 (PI_{sibs})으로 가정 할 경우 8.02×10^{-12} 으로 14개의 MS marker에 비해 약 10배와 10,000배의 높은 판별 효과를 나타내는 것으로 추정되었다. 이러한 결과는 무작위 교배 집단에서는 사용된 marker의 전체 대립유전자수 (MS : SNP = 146 : 120)에 의하여 판별효율이 결정되는 반면, 혈연관계가 높은 반형매와 전형매 집단에서는 비슷한 총 대립유전자수일 경우 marker의 수 (MS : SNP = 14 : 60)가 많은 경우가 더 높은 판별율을 보이는 것으로 나타났다. 한육우의 경우 소수의 보증 종모우를 이용해 인공수정을 통해 형성된 거대한 반형매 집단으로 가정하였을 경우 MS와 SNP marker의 판별율은 10배 정도의 차이로 큰 차이를 보이지 않을 것으로 예견되나, likelihood ratio를 이용 하는 inclusion 방법에 의하여 부모를 동시에 찾을 확률은 MS marker가 1,000 배 정도 더 효율적인 것으로 나타났다. SNP marker의 장점인 변이의 안정성, 유전자형 분석의 자동화 및 대용량화 등을 한육우의 동일성 검사에 활용하기 위해서는 분석비용 절감 방안과 분석방법 및 장비의 국산화 등 실용 및 상용화적 측면에서의 연구개발이 필요하다고 사료된다.

V. 사 사

본 연구에 참여한 대학원생은 교육과학기술부 2단계 BK21 사업의 장학금을 수혜 받았으며, 농촌진흥청 바이오 그린21사업 (과제번호:20070501034006)의 지원에 의해 이

루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

VI. 인 용 문 헌

- Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M., Vecchiotti-Antaldi, G. and Bertoni, G. 1997. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Anim. Genet.* 28:418-426.
- Ayres, K. L. and Overall, A. D. J. 2004. API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. *Molecular Ecology Notes* 4:315-318.
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. and Caskey, C. T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids 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.
- Glowatzki-Mullis, M. L., Gaillard, C., Wigger, G. and Fries, R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genet.* 26:7-12.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Heyen, D. W., Beever, J. E., Da, Y., Evert, R. E. and Green, C. 1997. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.* 28:21-27.
- Keyue, D., Kaixin, Z., Fuchu, H. and Yan S. 2003. LDA - A java-based linkage disequilibrium analyzer. *Bioinformatics* 19: 2147-2148.
- Mansfield, E. S., Robertson, J. M., Lebo, R. V., Lucero, M. Y., Mayrand, P. E., Rappaport, E., Parrella, T, Sartore, M., Surrey, S. and Fortina, P. 1993. Duchenne Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am. J. Med. Genet.* 48:200-208.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7:639-655.
- Michael P. Heaton, Gregory P. Harhay, Gary L. Bennett, Roger T. Stone, W. Michael Grosse, Eduardo Casas, John W. Keele, Timothy P.L. Smith, Carol G. Chitko-McKown and Will W. Laegreid 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome* 13:272-281.
- Mutirangura, A. F., Greenberg, M. G., Butler, S., Malcolm, R. D., Nicholls, A., Chakravarti and Ledbetter, D. H. 1993. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region: molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum. Mol. Genet.* 48: 200-208.
- Raymond M. and Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1. 2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86:248-249.
- SEQUENOM® Application Note. 2005. iPLEX™ Assay: Increased plexing efficiency and flexibility for MassARRAY® system through single base primer extension with Msaa-Modified terminators.
- Shuber, A. P., Skoletsky, J., Stern, R. and Handelin, B. L. 1993. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.* 2:153-158.
- Tom, R. G., Santiago, R., Carlos, Z. and Ian, N. M. D. 2006. MIDAS: software for analysis and visualisation of interallelic disequilibrium between multiallelic markers. *BMC Bioinformatics* 7: 227.
- Usha A. P., Simpson S. P. and Williams J. L. 1995. Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim. Genet.* 26:155-161.
- Weir, B. S. and Hill, W. G. 2002. Estimating F-statistics. *Annu. Rev. Genet.* 36:721-50.
- Werner, F. A. O., Durstewitz, G., Habermann, F. A., Thaller, G., Kraemer, W., Kollers, S., Buitkamp, J., Georges, M., Brem, G., Mosner, J. and Fries, R. 2003. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Anim. Genet.* 35:44-49.
- Williams J. L., Usha A. P., Urquhart B. G. and Kilroy M. 1997. Verification of the identity of bovine semen using DNA microsatellite markers. *Vet. Rec.* 140:446-449.
- 임현태, 민희식, 문원근, 이재봉, 김재환, 조인철, 이학교, 이용욱, 이정규, 전진태. 2005. 한우 생산이력제에 활용 가능한 Microsatellite의 분석과 선발. *동물자원과학회지.* 47(4):491-500.

(접수일자 : 2009. 8. 4. / 수정일자 : 2009. 10. 13. /

채택일자 : 2009. 10. 15.)