

BT·IT 융합기술 및 DNA data base를
이용한 한우 원산지 검증기술 개발

Development of Individual Traceability system using DNA
database of the BT·IT Technology in Hanwoo

연구기관

국립한경대학교

농림부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “BT.IT 융합기술 및 DNA database를 이용한 한우 원산지 검증 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 10월 09일

주관연구기관명 : 한경대학교

총괄연구책임자 : 이 학 교

연 구 원 : 공 홍 식

연 구 원 : 전 광 주

연 구 원 : 오 재 돈

연 구 원 : 이 승 규

연 구 원 : 장 현 용

연 구 원 : 조 기 행

연 구 원 : 최 규 명

연 구 원 : 김 기 범

연 구 원 : 양 대 용

연 구 원 : 윤 영 탁

연 구 원 : 이 원 복

연 구 원 : 정 진 형

협동연구기관명 : 부산대학교

협동연구책임자 : 조 병 옥

위탁연구기관명 : (주)젠다스

위탁연구책임자 : 이 성 희

요 약 문

I. 제 목 : BT..IT 융합기술 및 DNA database를 이용한 한우 원산지 검증기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

일본 및 미국 등 인수공통 병원 소의 광우병의 빈발을 계기로 소고기 안전성에 관한 국민적 관심이 증폭되고 있어 소비자의 식탁에 오르는 소고기가 안전한지의 신뢰를 줄 수 있는 신뢰시스템의 구축이 시급한 상황이다. 이와 아울러 국내소비량 상당부분의 소고기가 도입되고 있는 국내의 경우는 외산 소고기의 한우육으로 둔갑이 비변한 상황이며 좀처럼 이러한 유통구조의 개선이 어려운 것이 현실이다. 최근 한우 집단 내에서도 다양한 홍보 콘텐츠로 포장된 지역 및 광역 한우브랜드가 출현되어 보다 부가가치가 높은 한우 산업으로의 도약이 기대되고 있지만 브랜드간의 차별성 및 선명성을 보장할 수 있는 개체식별 시스템이 부재한 현실이다. 따라서 본연구의 목적은 사육단계-도축단계-유통단계에서 생축의 이동 및 도체 및 고기의 이동에 따라 개체의 이력을 추적하는 시스템에서 활용될 수 있는 개체식별 표준화시스템을 개발 하는 것을 목적으로 수행하게 되었다. 이러한 결과를 제공할 경우 특정 브랜드들이 원산지 추적을 통하여 좀 더 신뢰도 높은 브랜드가치가 보장된 한우를 소비자들에게 제공하는 것이 가능하다. 이를 위해 본 연구에서는 한우의 특이적인 유전적 특이성 분석에 의한 유전자 감식 마커 시스템 개발과, 분자수준에서의 한우 원산지 추적, 동일성 검정 및 친자확인을 위한 유전학적 개체 인식 시스템 개발하는 것으로 구성되어있다. 또한 분석 비용 측면에서 기존의 분석 비용보다 보다 저렴한 한우 개체식별 분석 kit를 개발하며, 실험 기관 및 실험 장비간 정보를 호환하여 동일성 여부를 판단하기 위한 표준화시스템을 설계하여 이러한 특정 한우 집단의 원산지 추적 활용을 위한 유전체 정보 DB를 구축하고 한우의 유전특성 파악 및 생물학적 개체식별 파악을 통한 브랜드 인증시스템 설정하는 것을 주요 목적으로 연구가 진행 되게 되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2005)	유전자감식용 유전표지 설정 및 개체식별검증 유전통계 분석 및 동일 성검정 자동화시스템 개 발	<ul style="list-style-type: none"> ● 한우 품종의 유전적 특성 분석 ● 브랜드별 유전자 특성분석(9개 브랜드:1000두) ● 개체식별 기술 개발 ● 분석 기기별 MS typing 조건 설정 ● 브랜드 선정 기준 및 특성에 따른 농가 선정 및 시료의 채취
	DNA 분석기기 및 유전 자형에 따른 표준화 시 스템 개발 및 생산이력 시스템 모니터링	<ul style="list-style-type: none"> ● 기관, 지역별 DNA Comparison Test 실시 ● 생산이력 시스템 모니터링을 위하여 BioTaq 부착 ● 생산 유통모형별 시료 확보 및 개체시스템 적용기술 개발
	DNA 감식기법을 위한 표 준 진단 Kit 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● MS marker 1차 선정 및 labeled oligo 제작 ● Kit 구성을 위한 구성제품 개발

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2006)	유전자감식용 유전표지 설정 및 개체식별검증 유전통계 분석 및 동일성 검정 자동화시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 한우 유전적 특징 분류 기준 확립 ● 개체식별 기술 적용 ● 한우 MS 유전자들의 분석 기기별 data특성 분석 ● 9개 지역 브랜드 한우의 시료 확보 및 개 체시스템 적용기술 개발 ● 유통단계별 개체인식 정보의 D/B화 및 검색 시 스템 구축
	DNA 분석기기 및 유전 자형에 따른 표준화 시 스템 개발 및 생산이력 시스템 모니터링	<ul style="list-style-type: none"> ● 기관 및 지역별 DNA Comparison Test 실시 및 표준 설정 ● 비교결과에 따른 기준안 마련 및 오류검정 ● BioTaq의 추적 및 문제점파악
	DNA 감식기법을 위한 표준 진단 Kit 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 진단 Kit의 기술 적용 ● Kit 구성을 위한 구성제품 개발 ● DB화에 필요한 DB변환 기준안 마련

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2007)	유전자감식용 유전표지 설정 및 개체식별검증 유전통계 분석 및 동일성 검정 자동화시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 통계분석 시스템 구축 ● MS 유전자형별 각 분석기기의 표준지표 설정 ● 개체식별 기술의 실용화 ● 유통 모형별 원산지 및 개체 인식 정보 검색 시스템 확립 ● 국가단위의 한우 개체별 유전자표지 설정 정보 D/B 구축 ● 분석기기간 data변환의 자동화를 위한 프로그램 개발
	DNA 분석기기 및 유전 자형에 따른 표준화 시 스템 개발 및 생산이력 시스템 모니터링	<ul style="list-style-type: none"> ● 분석기기별 data 판독에 대한 Comparison Test ● 개발된 유전표지의 수치화 및 표준화 설정 ● 생산이력추적의 출발인 BioTaq의 유효성 검증 및 업그레이드 및 현장적용 추진
	DNA 감식기법을 위한 표준 진단 Kit 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 진단 Kit의 실용화 ● 국내 및 국제적 공인 획득

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

본 연구는 BT:IT 기술을 이용한 한우의 원산지 검증시스템을 개발하기 위해 한우 집단 특성에 적합한 최적 마커 조합을 설정하였다 (13개선정). 이들 마커조합을 사용하여 한우 개체식별을 할 경우 통계적으로 유의한 수준의 식별력이 보장될 수 있는 것으로 확인 되었다. 부가적으로 23개 브랜드 한우간의 유전적 유연관계를 분석하여 지역적 차별성이 존재하고 있다는 것과 외래품종과의 유전적 차별성을 분석하는 몇 가지의 모수는 99.71%의 품종식별력(CPD: cumulative power of discrimination)을 나타내는 것으로 확인되었다. 한우 원산지 검증에 활용에 필요한 대용량의 DNA 개체정보를 표준화하고 이를 D/B화하였으며 이들 정보를 통해 다양한 유전 통계량을 제공할 수 있도록 관련 프로그램에 대한 모듈을 개발하였으며 이들 S/W는 Identity Test, Paternity Test, Breed Discrimination Test, Population Statistics 등을 수행하도록 각각의 메뉴가 구성되어 있다. 또한 DNA 분석을 통한 원산지 검증 시스템에 활용하기 위한 분석 Kit를 국산화 하여 경제적이면서 실용적인 분석이 가능하도록 하였다. 본 연구 결과를 통해 제작된 분석 Kit는 총 13개의 MS marker로 구성이 되었으며 Labeled Size Standard를 개발하여 분석기기 또는 기관 등의 차이에서 나타나는 오류를 최소화하여 분석된 data의 신뢰도를 높일 수 있도록 하였다.

2. 연구결과 활용 및 건의

2008년부터 국가단위에서 전두수의 한우를 대상으로 쇠고기 이력추적 시스템사업이 실행되어지고 있다. 이러한 사업의 주된 내용은 현재 농가의 사육단계에서 확인된 이표(바코드기반) 정보를 근거로 등급판정소에서 유통점까지 한우의 물류흐름을 파악하는 것으로 되어있다. 또한 등급판정소에서 도축된 일부 시료와 유통점에서 판매되는 임의의 시료를 DNA검사 기법에 의하여 개체진위여부를 부분검사(1-2%)를 수행하도록 시행되고 있는 상황이다. 그러나 현행 국내 소이표식별 체계가 미흡하여 농가 단계의 한우가 정확하게 유통점 또는 소비자의 식탁에서 확인 될 수 있는지의 여부를 모니터링 해야 할 필요가 있다. 현재는 특정 기관(등급판정소)을 통해 한정적으로 수행되고 있는 도축단계와 유통 단계 간 동일성 검정은 정확한 개체식별 번호가 사육-이동-도축-유통 단계까지 무결성을 가진다는 전제가 보장되어야 하나 이는 완전한 이표 기록체계가 완성되기까지 상당한 시간이 지나야 할 것으로 판단된다. 따라서 본연구결과는 2단계의 기술적 적용이 가능할 것으로 판단된다. 첫째로 본 연구에서 개발된 DNA 기반의 개체식별 시스템은 현행 도축단계와 유통단계간 한우 동일성 검정체계에 활용 될 경우 도축되는 전체의 시료를 D/B화 하고 유통점에서 채취된 시료의 DNA정보와 진위여부를 확인하는데 활용될 수 있다. 기존의 체계에서는 대상 시료들을 동시에 분석해야 하는 한계를 가지고 있으나, 본연구에서 제안된 표준화 분석시스템은 실험자, 실험기기, 실험 기관의 차이를 완벽하게 표준화시켜 하나의 동일한 결과를 산출해줄 수 있으며 분석 비용면에서 기존의 30,000원에 비해 60% 이상의 절감이 가능할 것으로 판단된다. 둘째로 사육단계에서 도입이 가능할 것으로 판단된다. 국내 한우 전 두수 또는 특정지역의 한우집단을 대상으로 시행되어지게 된다면 하나의 특정기관에서 소화하기엔 힘들 것으로 사료된다. 이 경우 지역별 또는 각 클러스터별 분석을 실시하고 이를 하나의 기관에서 통합하는 방식을 통해 문제를 해결할 수 있을 것이다. 이때 각 분석기관 별 분석 데이터에 대한 오차와 오류가 나타날 가능성이 높다. 이를 위해 본 연구에서 개발된 분석 kit를 이용하여 오차와 오류범위를 최소화 할 수 있을 것으로 기대되며 또한 개발된 유전통계분석 프로그램을 활용하여 대량의 data를 통합하고 손쉽게 분석하는 것이 가능하다. 또한 개발된 유전통계분석 프로그램은 동일성 검정뿐만 아니라 친자 확인 및 집단 유전특성 분석 등이 가능하여 여러 연구에 활용가치를 높일 것으로 기대되어진다.

쇠고기 이력 추적 시스템을 통해 얻어진 막대한 D/B는 기존의 국내 한우 개량 사업에 혈통확인정확도 제고를 위한 자료로 활용될 것이며 분자 육종 기법이 접목에도 크게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

(영문요약문)

The purpose of this study was development of individual traceability system of HANwoo using the DNA database. To test and set up applicability of Hanwoo individual traceability system, 13 microsatellite markers were selected and genetic parameters that can deduce genetic characteristics of specific population, were estimated from allele frequencies of these microsatellite markers. We analyzed genetic structure for development of traceability system in Hanwoo. 23 brand populations of Hanwoo were assessed for development of individual identification on the basis of DNA information. Proven sire population have been characterized by using 13 microsatellite markers. Identity probability using these markers showed very reasonable criteria for individual identification. This indicates the selected microsatellite markers are appropriate and effective for use in the Hanwoo traceability system. Additionally, frequencies of microsatellites markers were used to estimate heterozygosities and genetic distances. Genetic distances among various populations were obtained using Nei's DA distance method. Also, the 4 foreign breeds(Angus, Herford, Charolais, Holstein) were assessed for establishment genetic relationships. Some kinds of parameter was estimated for predicting the cumulative power of discrimination (CPD) existing among the Hanwoo and other foreign breeds. This study developed genetic statistical analysis program for dealing with mass scale DNA data that can be based for individual identification. This program was designed to do specific task with manu of Identity Test, Paternity Test, Breed Discrimination Test and Population Statistics. The achievement of present work draw up the development of identification kit that can be able to do one-step identification. We successfully developed the methods and 4 kinds of kit set for identification of Hanwoo. Each kit is very accurate and expensive. All genotypic data and identification code that were produced from using the kits, can be standardized without reference to any analyzer and analyzing instruments.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. General Introduction	7
Chapter 2. Current status of technical developments	12
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development	17
1) DNA typing marker selection and Individual identification genetic statistics analysis and development of auto analysis system for traceability	17
2) Development of standard system on gene type and DNA analyzer and traceability monitoring	66
3) Development of Standard diagnosis kit for DNA typing	98
Chapter 4. Achievement degree of objective and Contribution degree to related field	149
Chapter 5. Goal achievement and impacts on related fields	150
Chapter 6. Collected scientific and technical informations from Overseas	154
Chapter 7. References	156

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

1) 기술적 측면

○ 가축의 개체 식별은 기본적으로 우수한 종축의 진위여부를 확인하기 위해 동원되는 수단이며 아울러 단위 면적당 가축의 사육규모가 확대되면서 악성 질병의 확산을 막기 위한 초동 방역에서의 신속한 격리를 위한 추적을 위한 식별 수단으로 활용되고 있다.

○ 식품안전사고 및 인수 공통전염병의 다발에 따라 생산에서 식탁(farm to table)까지 이러한 위해요소의 추적 검증이 요구되는 시점에서 가축의 개체식별은 매우 중요한 요소이기도하다.

○ 최근 광우병, 구제역 등의 발병으로 인하여 소비자들이 보다 위생적이고 안전한 축산물에 대한 요구가 급속히 늘고 있으며 최근 많은 지역에서 보다 육질이 우수한 한우육을 각기 브랜드화 하여 수입육이나 일반 한우에 대하여 차별화를 시도하고 있으며 이는 생산자들의 엄격한 사양관리와 혈통관리에 의한 고급화된 한우육 생산을 가능하게 함으로서 국민적인 호응을 얻고 있으며 이는 각 지자체의 주요 사업 중의 하나로 떠오르고 있는 실정이다.

○ 가축의 귀표나 몸체에 문신을 새기는 방법의 개체식별이 이루어져 왔으나 이표의 탈락이나 도축이후에 대한 개체 확인 여부를 규명하기 위해서는 생체상태에서의 개체 확인이 필연적이며 이를 위해 개체 혈액형 분석 기법을 동원해왔으며 정확도의 향상(정확도), 대단위 분석시료의 처리(대용량성) 및 정보의 표준화 용이성에 적합한 유전자 감식 기법이 최근에 가장 강력한 수단으로 채택되고 있다. 특히, 현행 외모나 표현형적 특성에 근거한 서류(혈통증명서) 중심의 혈통등록 제도의 한계로 인해 종축개량 수단으로 등록기관에서 효과적으로 활용 할 수 있는 유전자 감식 기법을 응용한 한우 특성에 근거를 둔 친자확인 시스템의 개발 및 분석체계의 설정이 시급한

실정이다.

- 이에 부모로서의 혈통정보를 확인할 수 있고(친자확인, 혈통확인) 마지막 소비자 판매 단계에서 적용되어 브랜드로 표기된 것과 동일한 것인지를 확인할 수 있는 방법이 시급히 필요한 실정이다.

- 한우 개체 식별 체계에 의해 발생하는 유전정보를 포함한 각종 자료는 데이터베이스(DB)에 저장·관리되고 생산 및 소비 정보를 위한 자료로 활용되어야 하므로 효율적인 자료수집 저장 및 활용체계의 구축 또한 중요한 과제이며 이를 한우 혈통정립 및 유통질서 확립에 적용하여 소비자와 생산자간의 상호 신뢰의 기반을 구축하여 차별화된 브랜드 개발을 유도하고 소비자 및 생산자의 이익을 확대할 수 있다.

- 최근 생명공학의 눈부신 발전에 힘입어 유전적 마커에 의한 개체식별이 용이하여졌으며 이와 같은 첨단 기법은 한우육 유통단계에서 발생할 수 있는 각종의 혼란이나 조작을 찾아낼 수 있는 방법으로 이용할 수 있으며 적절한 국가단위의 분석시스템과 지방자치 단위에서 혼용 할 수 있는 분석 체계 설정으로 효과적인 인증 시스템의 개발이 요구된다.

- 또한 생우 상태로 수입되는 외국산 육우로부터 한우육의 구별할 수 있는 과학적 분자 마커 개발이 시급한 실정이며 개발된 첨단기법을 실제의 유통과정에 적용하여 믿을 수 있는 브랜드 한우육을 소비자가 믿음을 가지고 구입할 수 있도록 하는 것이 시급한 과제이다.

- 따라서 본 연구는 다양한 DNA다형 관찰 기법을 바탕으로 한우집단의 유전적 특성을 규명하고 이에 근거한 유전자 감식 기법에 소요되는 마커 시스템의 효율적 설정이 매우 시급하여 이를 이용한 한우개체의 추적 및 동일성을 검정하고자 하는 것이며, 이를 바탕으로 한우육 유통구조의 왜곡을 개선할 뿐 아니라, 생산자의 적절한 가격보장과 소비자의 보호가 가능하게 될 것이며, 한우육에 대한 신뢰를 견지하여 국내 한우 생산 기반을 유지하는 데 도움이 될 것이다.

2) 경제·산업적 측면

○ 국민소득이 증대함에 따라 쇠고기 수요가 급증 할 뿐 아니라 최근에는 질적으로도 우수한 고기를 선호하는 경향을 보이고 있고 2001년부터 외국산 쇠고기의 수입이 완전 자유화됨으로서 국내의 열악한 한우산업 구조로는 저렴한 생산비와 안정적인 사육시설, 위생적인 도축, 가공시설을 완비한 선진 축산물 수출국과의 경쟁에서 살아남을 수 있는 경쟁력이 절대적으로 부족한 현실이다.

Table 1. 대한민국 쇠고기 수출입 동향

단위 : (T, 천\$)

구분	수출			수입			국내총 생산량
	물량	금액	주요수출국	물량	금액	주요수입국	
2000	131	761	일본,리비아	263,781	795,016	미국,호주, 뉴질랜드, 캐나다	210,000
2001	38	114	일본,리비아	208,017	555,392	"	
2002	74	116	콩고,중국	358,032	946,808	"	

※ 자료 : '93~'94 농축산물 수출입동향 (농촌진흥청), 국내외수출입통계 (2003, 농수산물유통공사)

○ 국내 고유 유전자원으로서의 한우는 우루과이라운드에 대비한 관련 단체나 생산자들의 노력에 힘입어 수입육이나 젓소육에 비해 국민적인 선호도가 높을 뿐 아니라 시장가격이 높게 형성되어 산업 경쟁력이 점차 확립되어 가는 시점으로 판단되나 1997년 쇠고기 수입 쿼터 확대 이후 한우육의 소비둔화나, 시장 유통과정에서의 국내산 젓소나 수입육의 한우로 둔갑하는 경우가 30-40%에 이르는 것으로 추정되고 있고 더욱이 『2001년 쇠고기 수입 완전 자유화』 이후에는 수출국들의 적극적인 국내시장개척과 더불어 외국산 쇠고기의 낮은 가격 때문에 국내 소비량이 증가하게 되고 한우의 생산기반이 붕괴되는 사태가 예견되어 왔다.

○ 이에 정부는 한우 정책 추진방향을 축산물종합처리장(LPC)을 중심으로 생산·도축·가공·판매기능을 연계하여 위생적이고 브랜드화 된 고급육 유통체계를 구축하는데 역점을 두고 있다.(농림부, 2000. 1.)

○ 이러한 정부시책에 부응하여 여러 생산자 단체와 지방자치단체에서는 보다 육질이 우수한 한우를 생산하여 각기 브랜드화 하여 수입육이나 일반 한우에 대하여 차별화를 시도하고 있다.(표 주요 브랜드 한우 현황 참조)

○ 그러나 최근, 병든 소의 유통, 젓소고기 및 저등급육을 특등급으로 둔갑하여 유통시키는 사례가 빈번해짐으로서 소비자에 대한 한우육의 신뢰도 저하가 사회적인 문제로 대두되고 있는 실정이며, 이러한 국내 육류유통의 현실은 한우육의 브랜드화 및 고급육 생산을 통한 수입육과의 경쟁력 제고를 유명무실케 하고 있다.

○ 고의적인 원산지 오기 (수입육우 또는 외국 품종육 -> 한우육 둔갑) 및 가짜 한우 브랜드육의 출현 (일반 한우육 -> 브랜드 한우육 둔갑)으로 한우 산업의 기반이 신뢰를 잃어가고 있는 실정으로 이제 막 국민들로부터 신뢰를 받기 시작하는 한우 브랜드화를 통한 고급육 사업을 적극적으로 보호해야할 필요성이 제기되고 있다.

○ 한우이외의 쇠고기(국내산 육우 및 수입쇠고기)가 한우고기로 둔갑 판매되는 사례가 점차 증가하고 있는 실정이며, 쇠고기의 수입 및 수입 생우의 도입량이 점차 증가함으로서 수입쇠고기 판매전문점의 폐지에 따른 부정유통 사례가 더욱 빈번할 것으로 예상된다.

○ 이러한 시점에서의 유통의 마지막 단계인 판매 과정에서의 한우육 또는 브랜드육의 진위 여부 확인은 그간 국민으로부터 신뢰받지 못하고 있던 축산유통의 정립에 새로운 이정표를 세울 수 있을 것이라 기대되며 이를 통하여 생산업자와 소비자를 보호하며 정상적이고 믿을 수 있는 축산 유통체계를 확립하여 국내 축산업 발전에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 또한 한우육 시장의 보호를 위해, 농촌진흥청 축산연구소를 중심으로 그 동안 국내의 여러 연구자들에 의해 한우 품종의 유전자 수준의 특이성을 확인하여 이를 바탕으로 시장 유통과정에서의 한우 고기의 차별성을 확인하기 위한 방법 개발이 수년간 시도되어왔으나 아직 실용화에는 어려움이 있다.

○ 따라서 쇠고기의 부정유통을 차단하고 건전한 유통문화를 만들어 소비자 보호는 물론 한우 사육농가의 안정적 수입을 보호해 볼 수 있는 과학적인 기술개발을 위해 기존 개발 기술의 보완, 새로운 분석기술의 개발 및 현장 적용시험을 통한 실용화가 필요한 시점이다.

3) 사회·문화적 측면

○ 현대에는 식문화의 서구화와 국민소득의 증가에 따라 동물성 식품의 비율이 우리들의 식단에서 더욱 높아지고 있는 추세이며 1990년대 1인당 육류 소비량을 살펴보면 1990년에 19.9kg이었던 것이 2000년에는 30.5kg으로 꾸준한 증가를 보이고 있으며 이 중 또한 쇠고기 소비량도 1990년에 4.1kg이던 것이, 2000년에는 8.4kg으로 증가되고 있다.

○ 이와 같은 쇠고기 소비 증가와 더불어 고급육에 대한 수요가 폭발적으로 신장되어 현재 고급육 생산을 슬로건으로 내건 여러 한우 브랜드가 각 지역별 또는 생산 단체별로 구성되어 국민들의 신뢰를 바탕으로 성장하고 있다.

○ 브랜드 한우에 대한 국민들의 차별적 인식과 고급육에 대한 소비자들의 욕구는 필연적으로 브랜드 변조 및 외국산육의 한우로의 변조 등의 부작용을 불러오고 있는 실정이나 이를 객관적이고 과학적인 통제가 어려운 실정이다.

○ 한우와 유우, 육우간의 품종간 및 국내 난립된 브랜드한우 집단간 유전적 차별성의 분석을 통한 특정 고급 브랜드 한우의 식별 및 차별화 육종기술의 개발이 시급하다.

○ 국내 유통되는 젓소고기 및 수입쇠고기가 한우고기로 유통되는 것을 방지할 수 있는 한우고기의 판별기술 개발이 요구된다.

○ 이에 해당 브랜드 한우를 정육점 또는 백화점과 같은 마지막 유통단계에서 확인할 수 있는 기술 및 시스템 개발은 좋은 한우육을 생산하는 농가를 보호함은 물론 믿을 수 있는 축산 유통과정을 확보함으로써 국가 산업적, 문화적으로도 그 파급 효과가 클 것으로 기대된다.

제 2 장 국내의 기술개발 현황

○ 선진국의 경우 이표를 통한 식별체계의 한계를 보완하여 개체의 진위여부를 최종 검증하는데 혈액형 중심의 분석체계를 확장하여 최근에는 DNA 수준에서의 개체 식별 분석 기법을 활용하고 있으며 이러한 분석 기법의 정확도에 근거하여 혈통 정확도 확보수단을 넘어서 생산자에서 소비자까지 연계 되는 meat moving chain의 추적 검증 기법에까지 활용도를 확장 시키고 있다.

○ 영국의 경우 특정 브랜드의 원산지 추적을 위해 상용화 활용 중에 있는 것으로 보도된 바 있으며 싱가포르 및 일본의 몇몇 브랜드주체의 경우 원산지추적을 위해 도축전에 시료(고기시료)를 냉동보관한 후 유통과정의 일부 시료와 유전자 감식정보를 비교하는 방식의 원산지 추적시스템에 활용하고 있다.

○ 유럽의 경우 가축의 개체식별과 등록에 관한 규정을 제정하여 12개 회원국들이 이를 준수할 수 있도록 기술교류 및 행정지원을 하고 있다.

○ 유럽 국가 연합 15개 회원국은 2000년 1월 1일부터 어떤 개체라도 생후 20일 이전에 개체인식번호를 부착하도록 하였고, 개체인식번호는 개체인식시스템(beef labeling system)에 의하여 부여한다.

○ 국내의 경우에는 혈통에 대한 혈액형 및 유전자감식 결과를 혈통부에 개체명호와 병기하여 혈통정확도를 위한 검증체계가 구축되어 있지 않으며 단지 검정(당대검정 및 후대검정)에 소요되는 후보종축의 친자 확인 및 종축 개체 진위여부확인을 위해 일시적으로 해당 사업 주관 부서에서 추진하고 있는 실정이다.

○ 국가단위 한우 및 검정소 검정을 위해 집합 검정에 소요되는 검정우 구입시 친자 부정 사례가 전체 분석 대상 개체 대비 상당부문 친자오류가 발생하고 있는 실정이며 혈통등록 전담 부서에서 정기적으로 등록우에 대한 혈통 정확도의 모니터링 및 혈통등록서에 병기하고 이들 정보를 연계한 D/B화 작업 시급하다.

○ 혈액형 및 유전자감식 기법의 표준화, 분석 시스템의 통합화, 및 분석정보의 공신력을 보완할 수 있는 제도화를 위한 전담 센터의 지정과 분석정보의 종합적 활용(가축개량, 위생, 방역을 위한 추적 검증을 위한 통합 시스템) 시스템 운영에 필요한 제도적 장치가 전무하고 현재 개별적으로 기관차원에서 실험실 운영된다.

○ 대규모 분석 물량을 처리하고 이들 분석 결과를 여러 기관이 공유하거나 상호 검증할 수 있는 체계가 부재된다.

○ 혈액 내 단백질 유전다형이 개체마다 상이하고 혈청학적 응집 반응이 개체별로 다양한 유전양식에 근거하여 개체를 식별하고 친자를 확인하는 방법으로 현재 국내에서는 가축개량사업소에서 친자 확인을 위한 기법에 유일하게 활용하고 있으나 대용량의 정보 처리 능력 및 개체 식별과 친자 확인 정확도면에서 유전자 분석기법보다 떨어지는 한계를 보이고 있다.

○ 국내의 가축 개체식별 시스템 연구 및 실행 담당 부서 업무 내역

· 축산연구소 : - 소의 유전자원 다양성 분석을 위한 연구 (유전자원 연구)

- 국내 검정우 혈통기반에 의한 유전평가 (국가 가축개량 기반 연구)

- 개체 식별 및 친자 확인 기법의 표준화 설정

(국가 가축개량 기반연구 ISAG 공인; 2001)

- 한우의 능력 개량 유전표지 개발

(type II marker에 의한 접근: QTL mapping)

· 가축개량사업소 : 국내 유일의 한우 및 젃소 종모우 생산 및 보증 종모우 정액보급

- 국내 최초 혈액형에 의한 가축개체식별 시스템 구축

(ISAG 공인;1988)

- 한우 당대 및 후대검정 대상우에 대한 친자확인 (혈액형 분석 기법)

- 당후대 검정기관의 재정비(축산연구소: 후대검정, 가축개량사업소;

당대검정) 및 분석기법의 한계로 조직 축소

· 대 학 : - 한우의 양적 형질 개량을 필용한 유전자 표지 분석을 위해 유전자 감식 방법을 적용하여 연구추진

- 유전자 감식 기법에 의한 일부 경기지역의 한우의 DNA 동일성분석 부분적

적용 활용

- 한우의 유전적 다양성 연구를 위한 유전자 감식 기법 활용 및 친자 확인 및 개체 식별 관련 마커 개발

· 축산물 등급 판정소 : 소 원산지 추적관련 국가단위 시범사업을 추진하는 과정에서 DNA 동일성 분석 센터 구축 중

○ 기타 품종 식별 분자 표지를 활용한 유전자 감식 체계를 통한 한우와 젓소여부를 판정하는 민간 연구소 및 minisatellite를 통한 DNA 지문을 활용한 한우 개체 능력 예측 정보를 제공하는 연구소가 있으며 인체의 DNA 감식에 의한 친자확인을 산업적으로 활용하고 있는 벤처기업 (GenDocs 등)이 한우의 개체식별과 관련된 관심을 보이고 연구개발 중에 있다.

○ 현재까지 개발한 기술에 대한 문제점 보완 및 새로운 마커 시스템 (MS 마커, SNP 마커 적용 등)을 활용한 기술개발로 보다 신뢰도가 높으면서 한우에서는 오류가 없는 실용화 기술 개발이 요구되며 지방단위와 국가단위에서 적절히 채택될 수 있는 상호간의 인증시스템 및 상호 비교시스템과 아울러 대단위 유전자 감식 기술에 적용할 지방의 분석체계 설정 연구가 지속적으로 설정될 필요가 있다.

○ 현재 한경대학교 유전정보 연구소에서는 지역 브랜드를 통해 수집한 한우 600두에서 13개의 MS 유전자를 이용하여 각 개체들의 유전자 정보를 D/B화 하였으며, 후대검정 우 집단 850두의 염색체 1번, 5번, 14번의 MS 유전자 50개 좌위에 대한 screening을 수행하여 각 좌위별로 한우에서의 allele frequency와 Linkage disequilibrium map을 작성함으로써 screening 뿐만 아니라 통계적 개념의 접목을 통한 기반 자료의 구축에 핵심역량을 입증하였다.

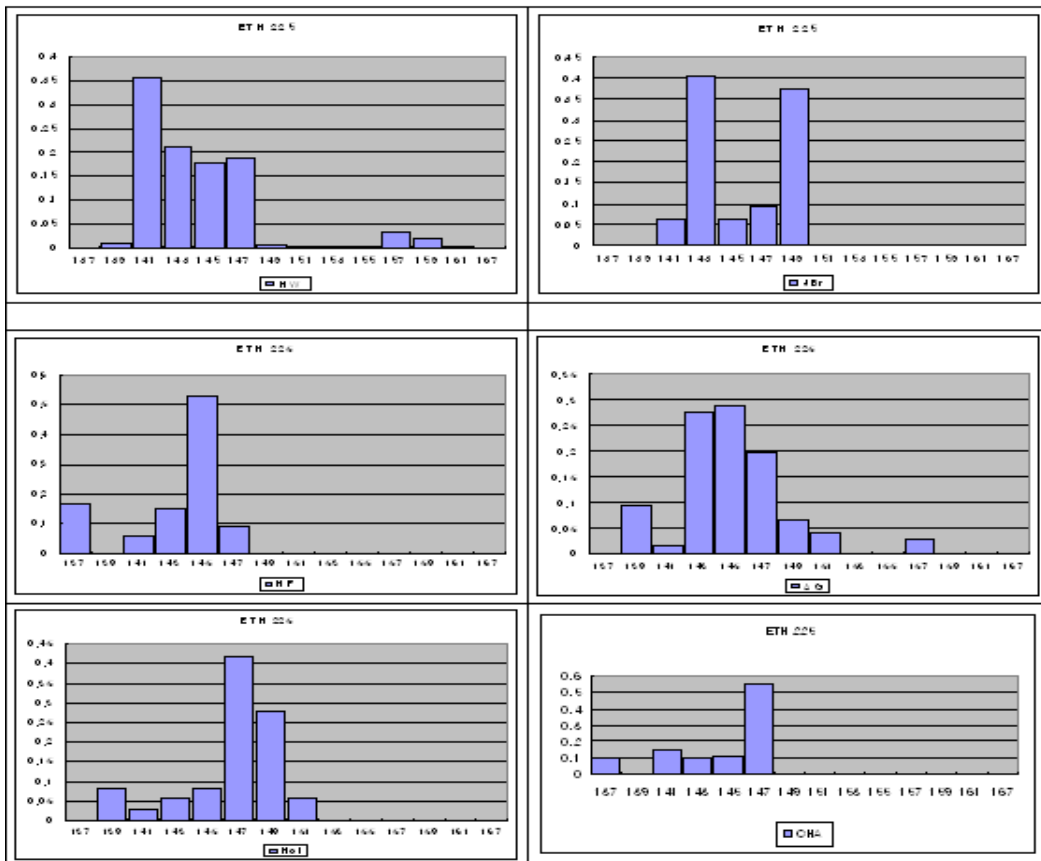
○ 분석 체계는 단위실험실 차원에서 독자적으로 추진되는 것이 아니고 분석 방법의 표준화 및 한우에 적합한 마커의 개발 적용, 분석 결과 대한 반복적이고 제도적인 상호 인증 등을 위해 국가 및 대학 및 관련 사업소간의 긴밀하고 체계적인 연계체계를 가지고 운영된다.(분석 결과의 신뢰성 정확도 신속성 등의 확보를 위해 필수적임)

○ 현재 국제동물 유전학회 중심으로 국내외 연구자간 분석 기법의 표준화 및 해

석방법의 표준화를 위한 시도가 이루어지고 있으며 표준 분석 기법은 젓소에서 개발된 마커를 기준으로 설정되어 활용 중(한우의 경우 유전자 발현 양상이 젓소 집단과 매우 상이하여 품종 특이적인 분석 방법과 마커의 설정이 요구된다.(일본의 화우는 국제 동물 유전학회 추천 마커이외에 추가로 3종을 개발 활용)

○ 최종적인 분석(실험실 결과)을 위해 결과해석을 위한 통계적 해석 절차는 수많은 유전자 감식 분석사례를 통해 축적된 know-how가 요구되며 정확도를 필요로 한다.(우연히 다른 개체가 동일한 유전자형을 보일 수 있는 개연성에 대한 오류 검색을 위한 고급 통계이론에 의한 분석 시스템이 요구됨 따라서 사람의 경우 전문화된 분석실을 국가차원에서 인증하고 이들에 대한 위탁 분석을 실시하여 판정에 활용함)

Fig 1. 품종별 MS 유전자형의 발현빈도 차이 분석



○ 한우와 다른 품종들 간의 분석결과를 확인한 결과 분석 대상 좌위의 출현빈도는 분석에 공시된 품종별로 매우 상이한 출현 양상을 보인다(그림 참조). 따라서 개체 식별을 위해서는 특정 품종에 대한 대립 유전자의 발현 빈도를 고려한 microsatellite 좌위의 선정이 매우 중요할 것으로 보인다. 또한 개체 식별력은 이들 선정된 microsatellite 좌위에 따라 다양하게 나타날 것으로 생각된다. 따라서 유전표지의 설정에 따른 개체 식별력을 확인하는 것은 개체 식별 시스템 설정에 매우 중요한 전제가 될 것이며 한우의 유전특성을 반영한 한우 특이적 발현 양상을 보이는 좌위들의 선정은 매우 중요하다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

< 제 1 세부과제 : 유전자감식용 유전표지 설정 및 개체식별검증 유전통계 분석 및 동일성검정 자동화시스템 개발 >

1. 한우 유전적 특징 분류 기준 확립

1) 한우 품종의 유전적 특성 분석

① MS marker 선정 및 제작

한우 microsatellite 좌위의 발현빈도는 다른 품종들 간의 매우 상이한 출현 양상을 보인다. 개체 식별력은 이들 선정된 microsatellite 좌위에 따라 다양하게 나타날 것으로 예상되며 따라서 유전표지의 설정에 따른 개체 식별력을 확인하는 것은 개체 식별 시스템 설정에 매우 중요한 전제가 될 것이다. 또한 한우의 유전특성을 반영한 한우 특이적 발현 양상을 보이는 좌위들의 선정은 매우 중요하다. 본 연구에서는 이러한 이유로 microsatellite 좌위들에 대한 발현양상 확인을 위해 microsatellite 좌위들을 선정하여 모니터링을 실시하였다.

Table 2. MS marker 선정을 위한 각 유전좌위의 특성 분석

No.	Locus	No of alleles	Range (bp)	He	PIC
1	BM1824*	7	178-192	0.676	0.673
2	BM2113	9	123-143	0.702	0.717
3	ETH10*	9	212-224	0.781	0.748
4	ETH225*	9	141-159	0.633	0.672

5	ETH3*	10	105–125	0.782	0.770
6	INRA23*	11	198–218	0.770	0.786
7	SPS115*	8	242–258	0.738	0.773
8	TGLA122*	23	137–181	0.867	0.871
9	TGLA126*	9	116–122	0.710	0.675
10	TGLA227*	20	76–104	0.806	0.857
11	TGLA53*	20	152–186	0.485	0.834
12	BMS4049	7	95–113	0.6088	0.5082
13	BMS4008	12	157–181	0.8106	0.8226
14	BMS4032	10	90–114	0.6974	0.6863
15	MCM130	11	105–129	0.6090	0.7085
16	BMS1170	7	216–228	0.7276	0.7087
17	BMS4012	10	102–222	0.8020	0.7542
18	BMS4030	15	158–184	0.8372	0.8056
19	DIK2659	11	178–198	0.5526	0.4831
20	DIK2284	16	248–280	0.7287	0.8085
21	DIK5103	12	179–205	0.5233	0.4978
22	BMS4006	15	97–131	0.9120	0.8469
23	DIK4367	12	111–141	0.7410	0.7695
24	BMS1941	9	112–128	0.5709	0.6485
25	BMS1747	9	85–97	0.6865	0.6774
26	ILSTS011	4	266–270	0.5415	0.4303
27	BL1009	13	155–179	0.8624	0.7946
28	RM180	6	119–133	0.7466	0.4988
29	BL1029	13	144–170	0.8151	0.7766
30	RM011	9	95–136	0.7171	0.6771
31	DIK4230	12	176–198	0.6596	0.6274

32	DIK4438	6	233-237	0.3446	0.3644
33	DIK5082	9	182-190	0.6765	0.6350
34	DIK5080	15	193-211	0.7569	0.7520
35	DIK2964	17	179-203	0.8444	0.8618
36	CA084	9	128-142	0.713	0.684
37	DIK4782	11	155-172	0.848	0.831
38	BMC1009	20	179-289	0.684	0.748
39	DIK4329	15	198-235	0.859	0.816
40	DIK1048	9	120-132	0.656	0.644
41	DIK5248	10	189-200	0.825	0.786
42	DIK2400	19	229-265	0.917	0.905
43	DIK2718	8	177-195	0.668	0.599
44	MNB-71	12	196-218	0.804	0.830
45	DIK2828	10	228-248	0.812	0.750

② 시료확보(브랜드 선정기준 및 특성에 따른 농가 선정 및 시료의 채취)

한우의 집단 간의 유전적 특성을 분석하기 위하여 브랜드한우집단(23개 브랜드), 종모우 집단 그리고 지역별 한우암소집단(8개 지역)의 한우 DNA를 이용하여 각 집단별 유전특성을 분석하였다. 브랜드 한우집단은 9개의 국내 한우브랜드를 대상으로 1148두 이상의 시료를 확보하였으며 1000두이상의 시료를 분석하여 연구에 활용하였다. 지역별 한우 암소집단은 8개의 지역을 대상으로 총 231두를 공시하여 활용하였다. 국내의 재래가축종의 하나인 한우에 대한 타 품종간의 유전적 유연관계에 대한 연구는 몇몇 이루어진 바 있으나 지역별 또는 집단별 한우들 간의 유전적 유연관계에 대한 연구의 거의 전무한 실정이다. 따라서 국내 한우집단의 유전적 다양성과 지역별, 집단별 한우집단의 상호 유전적 유연관계에 관한 분석 결과는 향후 한우산업의 다양한 생존전략을 구축하는데 매우 유용한 정보를 제공하게 될 것으로 보인다. 또한 이러한 한우집단간의 각 유전표지별 발현양상 분석은 한우집단에서의 최적의 개체식별을 위한 유전표지 설정에 매우 중요한 자료가 된다.

③ 한우 브랜드 별 유전특성 분석

본 연구는 국내 23개 브랜드를 대상으로 시료를 수집하여 각 브랜드의 유전적 특성을 분석하여 이를 통한 유연관계를 분석하여 제시하고자 실행하였다. 현재 국내에 많은 한우브랜드가 시판되고 있으나 아직까지 각 브랜드에 대한 유전적 차별성과 유연관계가 조사된 바 없는 실정이다. 각 브랜드의 유전적 차별성의 분석은 지역 특화 브랜드로 성장하기 위해 반드시 필요한 사항이며 이를 통해 생산이력 시스템 설정의 기본 자료로서 매우 중요한 연구라 할 수 있다.

Table 3. 23개 한우 브랜드 집단별 유전적 특성 분석

브랜드	지역	Sample size	exHz	obsHz	No. Alleles
KJC	전북	6	0.7948	0.7576	5.27
KHC	경남	46	0.7927	0.7569	9.82
NHH	경남	57	0.7456	0.6954	9.18
DKR	강원	55	0.7767	0.7603	9.55
SJK	경북	19	0.7921	0.7943	7.55
SJH	전남	66	0.7897	0.7438	9.73
SHH	전남	326	0.7817	0.7521	12.45
ASM	경기	18	0.7929	0.7879	7.36
YJK	경기	16	0.7705	0.7330	6.82
YPK	경기	37	0.7689	0.7592	8.36
YJH	경북	27	0.7724	0.6869	8.91
IKM	경기	15	0.7597	0.7818	6.73
JSH	전북	115	0.7768	0.7542	10.36
JSK	전북	15	0.7891	0.6970	7.64

브랜드	지역	Sample size	exHz	obsHz	No. Alleles
PJC	경기	10	0.7541	0.6818	5.82
PKS	경북	59	0.7749	0.7442	9.45
HDS	경남	30	0.7565	0.7333	8.00
HIR	강원	22	0.7697	0.7355	7.73
HWR	경기	13	0.7648	0.7483	7.45
HPK	전남	19	0.7668	0.7273	6.45
HKH	경남	92	0.7837	0.7540	11.27
HKN	강원	18	0.7967	0.8131	7.18
HSH	강원	67	0.7848	0.7544	9.73

23개의 브랜드별 11개 MS marker들에 대한 유전특성을 Table 2에서 제시하였다. 분석결과 NHH의 기대이형질성이 가장 낮게 나타났으며 PJC는 관측이형질성이 가장 낮은 것으로 확인되었다. 반면 HKN 한우의 경우 기대이형질성과 관측이형질성 모두 가장 높은 것으로 나타났다. 평균 대립유전자의 수에 있어서는 KJC가 가장 작았으며 SHH가 가장 많은 것으로 나타났다. 하지만 KJC의 경우 개체수가 상대적으로 적은 상태에서 관측된 대립유전자가 적을 수 밖에 없는 것으로 사료되며, 상대적으로 개체수가 적은 집단들 내에서는 평균대립유전자의 수가 적게 나타났음을 알 수가 있다. SJK, IKM 그리고 HKN 3개의 브랜드를 제외한 모든 브랜드에서 관측이형질성이 기대이형질성이 낮게 나타났으며 특히 NHH, YJH, JSK, PJC에서는 그 차이가 상대적으로 큰 것으로 나타났다.

다음의 Table 3-5는 11개의 MS 유전좌위의 대립유전자형 빈도를 바탕으로 하여 각 브랜드별 유전적 거리에 대한 matrix를 작성한 것이다. Table 5의 DA distances의 matrix를 보면 23개 브랜드들의 평균 유전적거리가 0.082 ± 0.036 으로 나타났다. 각 브랜드 집단들의 유전적거리가 비교적 가까운 편이며 이는 브랜드별 한우들이 유전적으로 유사하다는 것을 알 수 있었다. PJC와 KJC가 0.2로 유전적 거리가 가장 먼 것으로 나타났다. PJC의 경우 경기도 북부지역에 위치하고 KJC의 경우 전북에 위치하고 있어 지역간의 거리로 인한 개체들의 이동이 적었던 것으로 추정된다. JSH와 SHH는 0.014로 유전적거리가 가장 가까운 것으로 나타났으며 JSH는 전북, SHH는 전남에 위치하고 있어 이러한 결과가 나타난 것으로 추정된다. 또한 상당히 가까운 유전적 거리를 나타낸 브랜드는 SHH와 SJH, HKH와 SHH, HSH와 SHH이며 유전적 거리는 세 집단 모두 0.016으로 나타났다. SHH의 경우 본 분석에 활용된 개체가 가장 많아 다수의 대립유전자를 나타내어 이러한 결과가 나타난 것으로 추정된다.

Table 4. 23개 브랜드의 표준유전적거리(standard genetic distances) matrix.

	KJC	KHC	NHH	DKR	SJK	SJH	SHH	ASM	YJK	YPK	YJH	IKM	JSH	JSK	PJC	PKS	HDS	HIR	HWR	HPK	HKH	HKN	HSH	
KJC																								
KHC	0.019																							
NHH	0.100	0.019																						
DKR	0.024	0.005	0.026																					
SJK	0.013	-0.013	0.001	0.003																				
SJH	0.005	-0.005	0.020	0.010	-0.018																			
SHH	0.029	0.003	0.025	0.006	0.001	-0.001																		
ASM	0.030	0.029	0.096	0.038	0.027	0.017	0.031																	
YJK	0.039	-0.010	0.023	-0.002	-0.018	-0.006	-0.002	0.017																
YPK	-0.021	0.020	0.062	0.045	0.024	0.025	0.039	0.074	0.040															
YJH	0.077	0.048	0.050	0.041	0.045	0.029	0.030	0.076	0.040	0.090														
IKM	0.077	0.021	0.021	0.028	0.026	0.026	0.020	0.078	0.042	0.082	0.051													
JSH	0.046	-0.008	0.026	0.011	0.011	0.003	0.005	0.043	0.001	0.048	0.042	0.015												
JSK	0.000	-0.020	0.026	0.002	0.013	-0.008	-0.010	0.043	-0.007	0.021	-0.002	-0.001	-0.029											
PJC	0.043	0.075	0.058	0.049	0.023	0.042	0.046	0.067	0.021	0.111	0.102	0.075	0.052	0.058										
PKS	0.041	-0.003	0.022	0.004	-0.005	0.002	0.005	0.047	-0.006	0.041	0.053	0.011	0.003	-0.004	0.067									
HDS	0.109	0.024	0.051	0.041	0.051	0.024	0.028	0.037	0.034	0.098	0.040	0.057	0.027	0.010	0.099	0.052								
HIR	0.012	0.008	0.035	0.026	0.002	0.006	0.026	0.055	-0.002	0.043	0.079	0.075	0.019	0.023	0.025	0.021	0.034							
HWR	-0.009	0.022	0.027	-0.004	-0.004	0.029	0.017	0.076	0.015	0.053	0.084	0.039	0.022	0.027	0.051	0.010	0.085	0.024						
HPK	0.049	0.025	0.022	0.017	0.022	0.015	0.028	0.078	0.034	0.048	0.048	0.065	0.031	0.014	0.075	0.027	0.057	0.054	0.052					
HKH	-0.002	0.006	0.026	0.000	0.002	0.004	0.004	0.032	0.002	0.033	0.049	0.032	0.006	-0.015	0.030	0.007	0.036	0.019	0.001	0.018				
HKN	0.088	0.026	0.058	0.056	-0.009	0.011	0.028	0.010	0.020	0.088	0.074	0.028	0.033	0.040	0.042	0.022	0.077	0.083	0.089	0.071	0.041			
HSH	0.019	0.005	0.026	0.007	0.004	-0.003	0.003	0.040	-0.002	0.050	0.008	0.034	0.005	-0.022	0.064	0.008	0.028	0.033	0.015	0.022	0.009	0.042		

Table 5. 23개 브랜드의 DA유전적 거리(DA distances) matrix.

	KJC	KHC	NHH	DKR	SJK	SJH	SHH	ASM	YJK	YPK	YJH	IKM	JSH	JSK	PJC	PKS	HDS	HIR	HWR	HPK	HKH	HKN	HSH	
KJC																								
KHC	0.152																							
NHH	0.162	0.048																						
DKR	0.140	0.048	0.036																					
SJK	0.160	0.081	0.068	0.074																				
SJH	0.133	0.042	0.035	0.034	0.063																			
SHH	0.137	0.035	0.029	0.022	0.062	0.016																		
ASM	0.148	0.072	0.083	0.073	0.105	0.062	0.061																	
YJK	0.177	0.079	0.066	0.068	0.093	0.064	0.056	0.086																
YPK	0.129	0.062	0.053	0.057	0.079	0.048	0.043	0.090	0.085															
YJH	0.181	0.098	0.084	0.076	0.116	0.079	0.061	0.120	0.098	0.103														
IKM	0.199	0.099	0.079	0.083	0.123	0.085	0.077	0.134	0.116	0.114	0.122													
JSH	0.147	0.032	0.032	0.027	0.071	0.024	0.014	0.071	0.060	0.052	0.074	0.068												
JSK	0.166	0.069	0.071	0.063	0.106	0.063	0.051	0.106	0.078	0.085	0.087	0.107	0.048											
PJC	0.200	0.130	0.098	0.108	0.127	0.103	0.098	0.138	0.115	0.145	0.148	0.120	0.097	0.134										
PKS	0.146	0.039	0.037	0.033	0.084	0.030	0.023	0.070	0.062	0.063	0.078	0.080	0.024	0.063	0.109									
HDS	0.185	0.062	0.063	0.062	0.111	0.049	0.043	0.077	0.090	0.089	0.086	0.106	0.044	0.072	0.124	0.059								
HIR	0.157	0.064	0.060	0.063	0.096	0.050	0.052	0.090	0.080	0.079	0.108	0.115	0.049	0.088	0.105	0.051	0.064							
HWR	0.153	0.079	0.070	0.056	0.102	0.071	0.061	0.118	0.112	0.086	0.120	0.105	0.060	0.109	0.144	0.075	0.104	0.103						
HPK	0.138	0.076	0.064	0.065	0.096	0.061	0.062	0.094	0.099	0.080	0.105	0.124	0.069	0.096	0.139	0.068	0.087	0.099	0.099					
HKH	0.136	0.040	0.033	0.026	0.073	0.025	0.016	0.063	0.064	0.051	0.075	0.081	0.021	0.059	0.102	0.028	0.050	0.057	0.060	0.060				
HKN	0.174	0.082	0.077	0.079	0.100	0.064	0.060	0.083	0.078	0.093	0.115	0.106	0.064	0.091	0.120	0.064	0.088	0.088	0.134	0.098	0.068			
HSH	0.140	0.046	0.039	0.032	0.076	0.027	0.016	0.072	0.066	0.053	0.065	0.089	0.019	0.051	0.112	0.031	0.046	0.062	0.069	0.067	0.026	0.075		

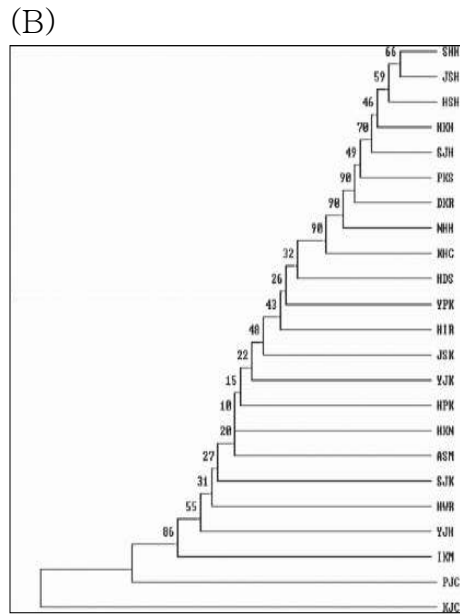
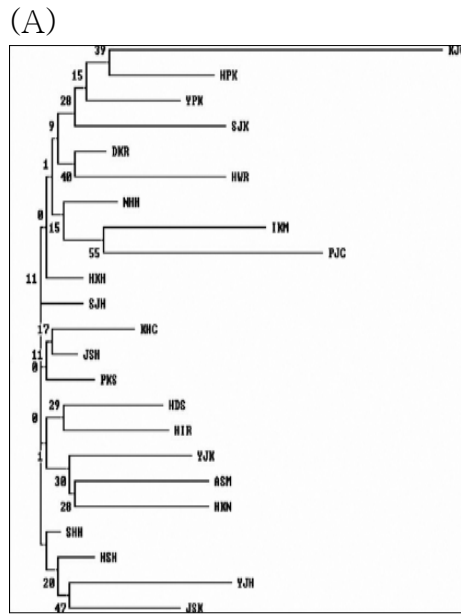


Fig 2. 23개 브랜드간의 유전적 거리를 이용한 분지도 작성
(A):DANJ tree, (B):DAUPGMA tree.

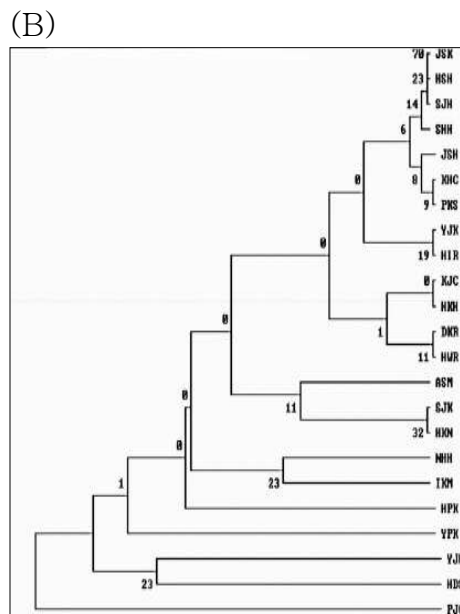
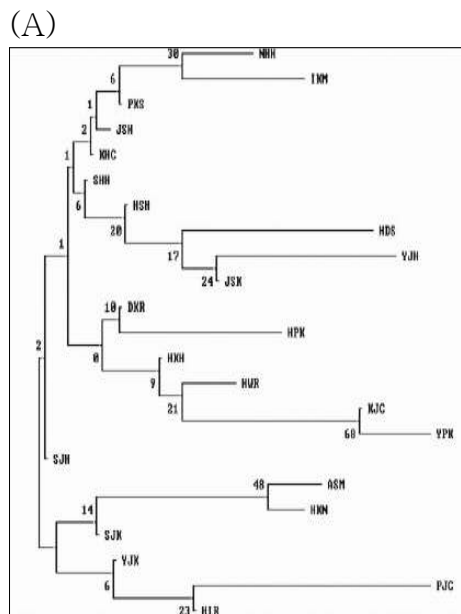


Fig 3. 23개 브랜드간의 유전적 거리를 이용한 분지도 작성
(A):STDNJ tree, (B):STDUPGMA tree.

Fig 2, 3는 23개 브랜드들의 DA genetic distance matrix와 STD genetic distance matrix를 근거로 하여 NJ와 UPGMA의 clustering 방법을 이용한 Dispan 프로그램을 활용하여 브랜드별 계통분지도를 작성하였다. 또한 Fig 2, 3를 확인해본 결과 각 도별 브랜드 간의 유전적 거리가 비교적 가까워 그룹을 형성하고 있는 경향치를 보이는 하지만 각 도내에 있는 브랜드들이 명확하게 그룹을 형성하기 보다는 여러 브랜드들이 같은 도내에 위치한다 하더라도 흩어져서 분지되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 Fig 4, 5의 개체들의 분지도를 확인해 봄으로써 더욱 확실하게 알 수가 있었다. 이는 브랜드 내 개체들이 그룹으로 묶인다 하여도 대립유전자별 빈도 결과가 매우 유사하여 유전적 거리의 정도차이가 미비하며 각각의 브랜드의 한우 개체들이 다른 한우들과 특별히 차별적인 특징을 나타내지 않고 있음을 추정할 수 있었다. 이러한 이유로 Fig 4, 5에서 각 개체들이 곳곳에 산재되어 나타난 것으로 사료된다. 뒤쪽의 연구결과에도 제시하였지만 한정된 종모우 집단을 이용하고 있는 우리나라의 종모우제도와 선호도가 높은 종모우들을 이용한 개량이 이러한 결과를 초래한 원인 중 하나라고 할 수 있겠다.

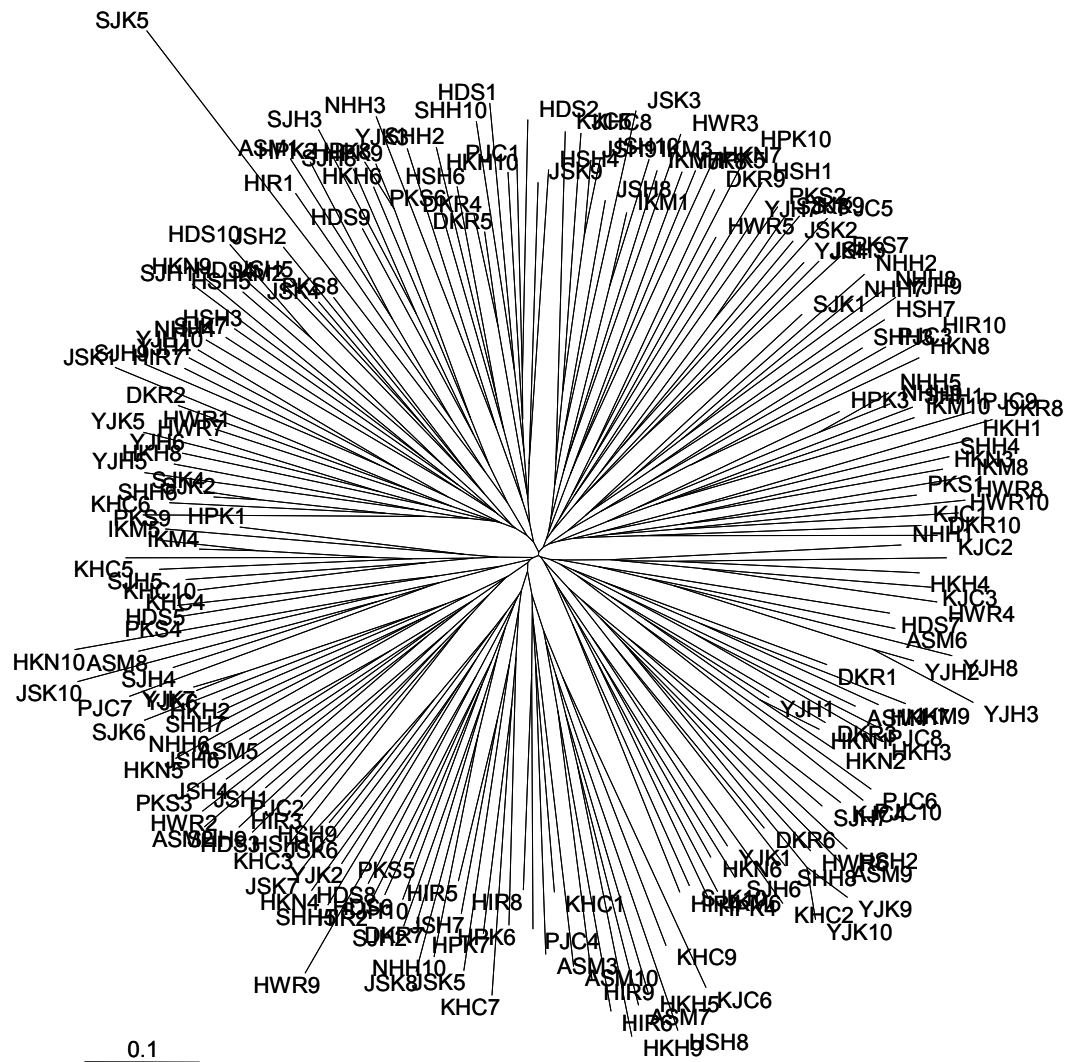


Fig 4. 23개 브랜드내 한우개체들의 유전적 거리를 이용한 분지도 작성

④ 종모우 집단의 유전특성 분석

Table 5는 국내에서 사용되고 있는 종모우 40두의 정액에서 DNA를 정제하여 10개의 MS 유전자를 이용하여 유전적 특성을 분석하여 제시하였다. 종모우 집단의 유전자 좌위별 변이도는 0.05(BM1824)–0.006(TGLA122)으로 나타났으며 평균 0.014로 상당히 낮게 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. BM1824의 경우 0.05로 비교적 높았지만 대부분의 MS 유전자좌위에서 0.01이하로 낮게 나타나고 있음을 확인할 수 있다. 기대이형질성(ExHz)의 평균은 0.75이며 관측이형질성(obsHz)은 0.73으로 나타났다. TGLA125는 가장 낮은 기대이형질성(0.620)과 관측이형질성(0.616)을 나타냈으며 반면 TGLA53은 기대이형질성(0.806)과 관측이형질성(0.792)이 가장 높은 것으로 나타났다. 모든 MS 유전자좌위에서 종모우 집단의 기대이형질성은 관측이형질성보다 높은 것으로 확인되었다.

Table 6. 10개의 MS 유전자를 이용한 한우 종모우 집단 분석

Loci	Gst	ExHz	ObsHz
BM1824	0.0500	0.7206	0.6845
BM2113	0.0203	0.7908	0.7747
ETH10	0.0022	0.7498	0.7481
ETH225	0.0110	0.7841	0.7754
ETH3	0.0101	0.6290	0.6226
SPS115	0.0088	0.7712	0.7644
TGLA122	0.0065	0.7958	0.7907
TGLA125	0.0070	0.6209	0.6165
TGLA227	0.0077	0.7844	0.7783
TGLA53	0.0172	0.8066	0.7927
Total	0.0148	0.7453	0.7347

Gst: coefficient of genedifferentiation,

exHz :expected total heterozygosity,

obsHz: observed heterozygosity.

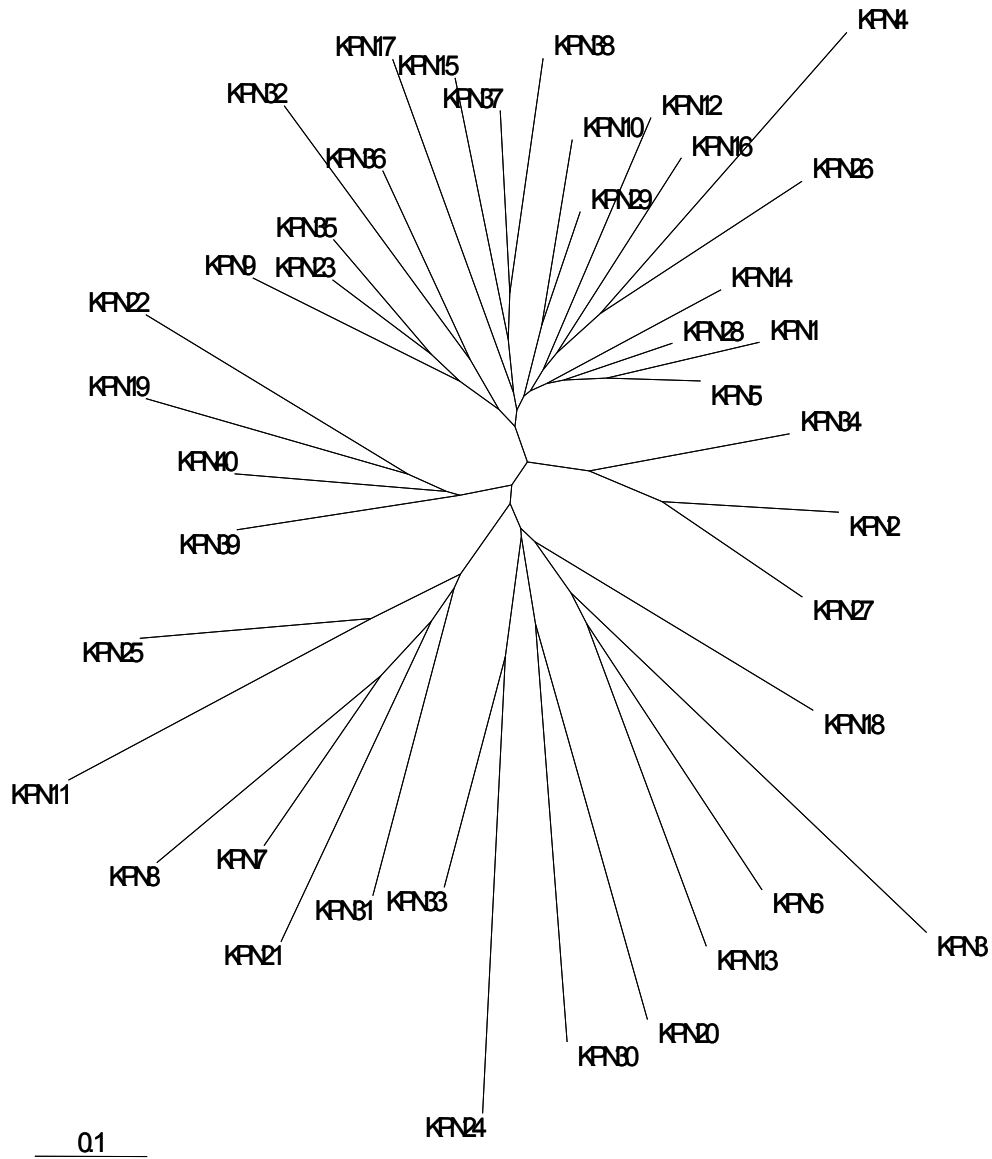


Fig 6. 한우 종모우 집단 개체들의 유전적 거리를 이용한 분지도 작성

Fig 5는 종모우들의 개체별 유전적 거리에 대한 추정치를 계산하여 이를 바탕으로 하여 Phylip package를 이용하여 계통분지도를 작성한 것이다. 크게는 5개의 그룹으로 나누어져 있음을 확인할 수 있었다. 이는 종모우집단이 비교적 다양하지 못한 유전적 특징을 잘 반영하고 있다고 할 수 있다. 브랜드 한우의 경우 전반적으로 넓게 분포하고 있는 반면 종모우의 경우 몇몇 개체를 제외한 다수의 개체들이 하나의 그

를 이루어 나타나고 있음을 확인할 수 있었으며, 조사한 결과 종모우들의 아버지와 조부가 다양하지 못하여 한정된 개체들내에서 지속적인 개량이 이루어진 것으로 추정된다. 종모우의 혈통을 조사한 결과 40두의 종모우 집단에서 부의 숫자는 18개체이며 KPN 147은 종모우집단중 7두의 아버지이며 KPN219 역시 7두의 아버지로 나타났다. 조부의 경우 KPN136은 종모우 부의 10두의 아버지로 나타나 종모우 집단 자체가 다양하지 못한 유전적 구조를 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 현재 전국적으로 한우 생산은 한정적인 종모우 집단을 바탕으로 이루어지고 있으며 이 또한 선호도가 높은 종모우 위주로 인공수정이 이루어지고 있다. 여기에 종모우 집단 자체 내에서도 공통선조가 편중되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 점은 유전적 거리가 매우 가까운 몇 안 되는 종모우들을 이용함으로써 국내 한우의 유전적 다양성을 감소하게 하는 것으로 사료된다. 또한 브랜드 간의 가까운 유전적 거리로 인해 브랜드별 특별한 유전적 특징을 갖는데 어려움이 있는 것으로 추정된다.

⑤ 한우와 오래 품종간의 유전특성분석

Table 7. 한우 브랜드 집단별 MS marker의 대립유전자 이형접합도 비교

Locus	Population Brands									Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
BM1824	0.7606	0.7143	0.7727	0.6667	0.6404	0.5630	0.7290	0.7143	0.6491	0.69
BM2113	0.7746	0.5000	0.6364	0.7273	0.7191	0.7899	0.7196	0.6607	0.6316	0.68
ETH10	0.7746	0.8333	0.7727	0.7803	0.7640	0.7731	0.7664	0.8214	0.7368	0.78
ETH225	0.6479	0.6905	0.6136	0.6667	0.6067	0.6723	0.6075	0.7143	0.5439	0.64
ETH3	0.8451	0.7619	0.8409	0.8258	0.6966	0.7899	0.7664	0.8571	0.7544	0.79
INRA23	0.7746	0.8333	0.7500	0.7424	0.7416	0.7815	0.8505	0.6964	0.7895	0.77
SPS115	0.7183	0.6905	0.8409	0.7348	0.7191	0.7731	0.7103	0.8214	0.7018	0.75
TGLA122	0.7746	0.8571	0.8864	0.8712	0.8539	0.8487	0.9065	0.8750	0.9123	0.87
TGLA126	0.7746	0.6429	0.8182	0.6364	0.6180	0.6975	0.7009	0.6607	0.7018	0.69
TGLA227	0.7887	0.7619	0.7955	0.8485	0.7753	0.8319	0.8131	0.8571	0.7544	0.80
TGLA53	0.5493	0.5476	0.4773	0.4545	0.4944	0.4958	0.5607	0.5000	0.5439	0.51

1: 팔공상강 한우, 2: 안성 마춤한우, 3: 양평 개군한우, 4: 대관령 한우 5: 횡성 한우
6: 장수 한우, 7: 섬진강 뜨레한우, 8: 하동 솔잎한우, 9: 남해 화전한우

Table 6은 9개의 한우 브랜드 집단별 MS marker 발현 특성을 분석한 것으로 총 11개의 marker 중 ETH10, ETH3, INRA23, SPS115, TGLA122 그리고 TGLA227 marker는 모든 9개의 브랜드에서 높게 발현이 되었음을 확인할 수 있었다. 그 중에서 TGLA53은 이형접합률의 평균이 0.51로 가장 낮게 나타났다. TGLA53은 브랜드 전반에 걸쳐 낮은 값을 나타내고 있어 한우집단에서의 원산지추적시스템의 marker로 활용하기에는 다소 부족한 면이 있음을 확인하였다. TGLA122는 각 브랜드에서의 이형접합빈도가 가장 높은 것으로 나타났으며 TGLA227 역시 높은 성적을 확인할 수 있었다. ETH225의 경우 8개의 브랜드에서 0.6-0.7사이의 성적을 나타냈으나 남해화전한우에서만은 0.54의 성적을 나타내고 있어 지역간의 유전적다형성의 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 원산지추적시스템에 활용할 marker 선정에 중요한 지표가 될 것이다. 한우에 사용될 marker의 선정은 모든 한우집단에서 높은 다형성을 보유하고 있어야 하며 높은 개체식별력을 보유하고 있어야 한다. 이러한 한우집단에서의 높은 개체식별력을 보유하고 있는 marker는 많은 연구와 실험분석을 필요로 하며 본 연구의 목표라 할 수 있다.

Table 8. 한우 브랜드 대상 집단 및 종모우 집단 간의 대상 MS marker별 대립유전자 유전특성 정보

Locus	Proven sire			Brand population		
	No of allele	He	PIC	No of allele	He	PIC
BM1824	6	0.7179	0.6677	7	0.676	0.623
BM2113	9	0.8718	0.7640	9	0.702	0.677
ETH10	9	0.7692	0.7117	9	0.781	0.707
ETH225	6	0.6250	0.7248	9	0.633	0.632
ETH3	8	0.9500	0.6120	10	0.782	0.732
SPS115	6	0.8000	0.7292	8	0.738	0.743
TGLA122	7	0.8718	0.7964	23	0.867	0.858
TGLA126	7	0.7895	0.5679	9	0.710	0.636
TGLA227	12	0.9250	0.7775	20	0.806	0.841
TGLA53	10	0.8000	0.7949	20	0.485	0.818
Total	8.00	0.81	0.71	12.40	0.72	0.73

Table 7은 한우 브랜드 집단과 종모우 집단을 MS marker 10개를 비교한 것으로서 한우 브랜드 집단은 평균 대립유전자의 수가 약 12개이고 종모우의 평균 대립

유전자의 수가 약 8개로 나타났으며 종모우 집단에 비하여 브랜드집단이 좌위당 발현되어진 대립유전자의 수가 많은 것을 알 수 있습니다. 전체적인 이형접합률을 볼 때 브랜드집단에 비해 종모우집단의 값이 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 비록 대상 집단의 수는 적으나 각 브랜드내에서 육종이 이루어진 브랜드집단에 비해 전국적으로 우수한 개체를 선발한 종모우 집단에서 높은 다형성을 보이고 있는 것으로 생각된다. 또한 종모우집단과 지역별 암소집단 그리고 브랜드집단간의 대립유전자의 범위, 대립유전자의 수, 이형접합률, 유효대립유전자 및 PIC를 대상으로 비교한 내용이기도 하다.

Table 9. 각 한우 집단 간의 유전적 차별성 비교

Locus	Observed features	Breeds			Means
		Proven sire	cow population	Brand population	
ETH225	Allele number	6	12	9	9.00
	Allele size range (bp)	138-162	139-161	136-156	136-162
	h_i	0.6250	0.6612	0.633	0.64
	N_e	1.600	1.512	1.579	1.56
	PIC	0.7248	0.7275	0.632	0.69
ETH10	Allele number	9	11	9	9.67
	Allele size range (bp)	202-224	210-230	208-226	202-230
	h_i	0.7692	0.6827	0.781	0.74
	N_e	1.300	1.464	1.280	1.35
	PIC	0.7117	0.7095	0.707	0.71
SPS115	Allele number	6	8	8	7.33
	Allele size range (bp)	245-257	243-259	245-259	243-259
	h_i	0.8000	0.8112	0.738	0.78
	N_e	1.250	1.233	1.355	1.28
	PIC	0.7292	0.7829	0.743	0.75
BM1824	Allele number	6	9	7	7.33
	Allele size range (bp)	180-192	177-193	180-192	177-193
	h_i	0.7179	0.6873	0.676	0.69
	N_e	1.393	1.455	1.479	1.44
	PIC	0.6250	0.6390	0.632	0.63

○ 지역별 한우 암소 집단의 유전적 변이성 및 차별성

한우의 지역별 유전적 다양성 및 집단 간의 유연관계를 평가하기 위하여 8개의 지

역(경기, 강원, 충남, 충북, 전남, 전북, 경남, 경북)에서 분석에 필요한 공시축을 선발하였다. 각 집단 간의 보다 정확한 유연관계를 평가하기 위해 비교적 지역 간의 이동이 적은 번식우를 대상으로 하여 분석을 실시하였다. 서로 다른 염색체상에 존재하는 microsatellite marker들을 이용하여 분석에 사용하였다.

Table 10. 지역별 한우 암소 집단의 유전적 변이성 비교

Population	Pop size	Heterozygosity		#Alleles
		Exp Hz	Obs Hz	
KG	43	0.699	0.719	6.00
KW	21	0.691	0.784	4.80
CUN	29	0.733	0.765	6.40
CUB	30	0.711	0.749	5.80
CEN	19	0.716	0.815	4.40
CEB	15	0.679	0.862	4.20
KYN	53	0.720	0.711	6.80
KYB	21	0.722	0.696	5.20
Total	231	0.709	0.762	5.30

KG:KyongGi KW:KangWon CUN:ChungNam CUB:ChungBuk CEN:CheonNam
CEB:CheonBuk KYN:KyongNam KYB:KyongBuk.

Table 5는 각 집단별 분석된 대립유전자의 이형접합율과 기대되는 대립유전자의 이형접합율 그리고 대립유전자의 평균수를 제시하였다. 관측된 대립유전자의 이형접합율을 보면 전북(CEB)과 전남(CEN)에서 가장 높게 나타났지만 기대되는 이형접합율은 전체 평균보다 낮은 값을 나타내고 있다. 이는 전북과 전남지역에서 보유하고 있는 평균 대립유전자의 수가 적기 때문에 기인한 결과라고 할 수 있다. 이는 다른 지역에 비해 분석대상의 수가 적기 때문이기도 하지만 불편한 교통이나 지리적인 환경적 요인에 의해 이동이 적어 자연적으로 폐쇄적인 선발교배가 이루어진 것으로 추정할 수 있다. 이는 강원지역의 결과에서도 유사한 현상을 보이고 있는데 강원지역 역시 지역적 환경 요인으로 인해 비교적 축군의 이동이 낮아 선발교배가 제한적으로 이루어 졌음을 확인시켜주는 결과라 할 수 있겠다. 반면 충남지역의 기대되는 대립유전자의 이형접합율이 가장 높은 것으로 나타났는데 이는 한우개량사업소 등 국내 한우 유전자원의 이동이 비교적 활발할 수 있는 요인이 상존하고 있다는 결과로 설명되어 질 수 있다.

Table 11. 지역별 한우 암소 집단간의 유전적 차별성 분석

	KG	KW	CUN	CUB	CEN	CEB	KYN	KYB
KG	—							
KW	0.053	—						
CUN	0.054	0.101	—					
CUB	0.038	0.050	0.044	—				
CEN	0.036	0.077	0.081	0.060	—			
CEB	0.129	0.137	0.154	0.138	0.149	—		
KYN	0.035	0.053	0.046	0.031	0.058	0.104	—	
KYB	0.045	0.102	0.049	0.066	0.074	0.139	0.059	—

KG:KyongGi KW:KangWon CUN:ChungNam CUB:ChungBuk CEN:CheonNam
 CEB:CheonBuk KYN:KyongNam KYB:KyongBuk

Table 10은 공시된 대상 집단들 간의 유연관계를 조사하기 위하여 분석된 microsatellite marker별 대립유전자들의 발현빈도를 근거로 하여 DA genetic distance를 DISPAN 프로그램을 이용하여 계산하여 제시한 것이다. 경남지역과 충북 지역간의 유전적 거리는 0.031로 가장 가까운 것으로 나타났으며 전북과 충남지역 사이의 유전적거리가 0.154로 가장 먼 것으로 나타났다. 재미있는 사실은 전북지역과 다른 지역들과의 유전적거리가 모든 지역에서 0.154-0.104로 대체적으로 멀리 떨어져 있음을 확인할 수 있었다. 전북지역과 다른 지역들과의 유전적 거리의 평균은 0.136으로 나타났다. 강원지역 역시 다른 지역들과의 유전적 거리의 평균이 0.082로 대체적으로 멀게 나타나고 있다. 반면 경기와 경남지역은 다른 지역들과 유전적 거리의 평균이 각각 0.056과 0.055로 가까운 것으로 나타났으며 이 두 지역간의 유전적 거리는 0.035로 비교적 가까운 것으로 나타났다. 각 집단간의 유연관계를 보다 더 이해하기 위해서 분석되어진 DA genetic distance matrix를 이용하여 STDUPGMA Tree를 작성하여 Fig. 1에 제시하였다.

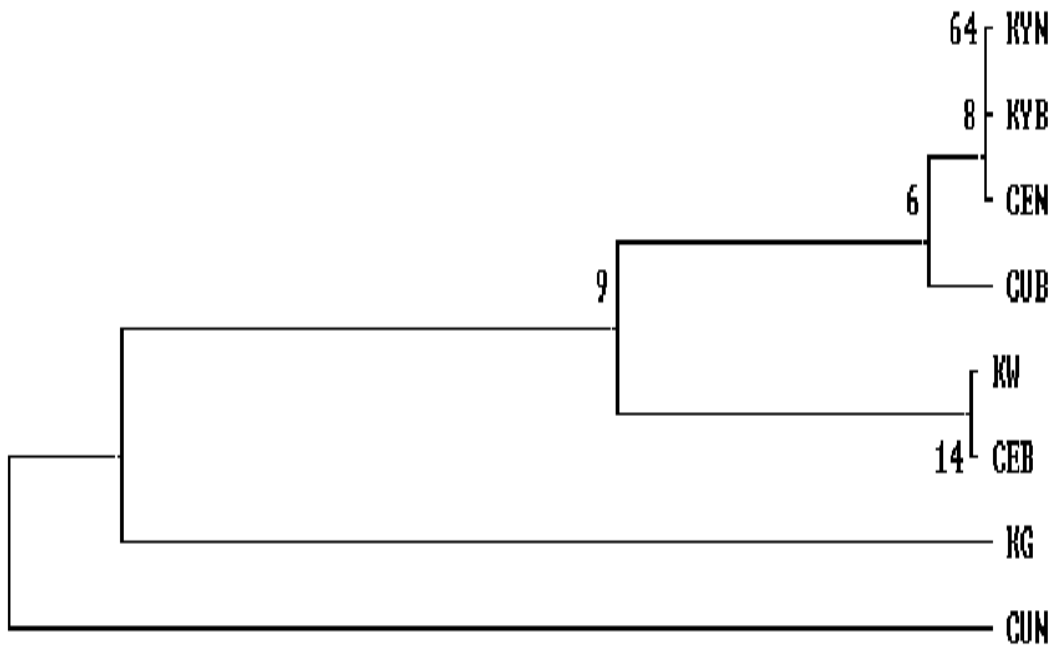


Fig 7. STDUPGMA tree, 지역별 한우 암소 집단간의 유전적 유연관계 분석
 KG:KyongGi, KW:KangWon, CUN:ChungNam, CUB:ChungBuk, CEN:CheonNam,
 CEB:CheonBuk, KYN:KyongNam, KYB:KyongBuk.

각 cluster에 나타난 수치는 1000회의 반복을 통한 bootstrap value를 percentage로 나타낸 것이다. 현재 국가단위 보증종모우의 선발 및 공급체계에 의해 상당한 유전적 균일성이 진행되어 온 것으로 알려지고 있지만 Fig. 3에서 보는 바와 같이 비교적 암소 집단에서는 지역적인 유전적 차별성이 상존해 있음을 볼 수가 있었다. 즉 국내의 한우 유전자원은 경기권, 충남권, 경남북 및 전북권과 강원권 등의 4부류로 분리되는 경향을 보이고 있다. 그러나 보다 정확한 유전자원 분류에 대한 평가는 보다 많은 지역별 분석 대상 두수를 통한 연구가 진행 될 때 정확한 결과를 예측할 수 있을 것으로 보인다.

○ 한우품종 적정 MS marker 설정을 위한 외래품종과의 유전적 특성 비교 분석

개체 식별을 위한 최적의 유전자표지의 설정을 위해서 분석 대상 집단에서 나타난 이형접합도 뿐만 아니라 각 좌위별 대립 유전자 출현빈도가 극단으로 치우치지 않고 고른 분포를 보이는 것이 가장 바람직하다. 그러나 대부분의 유전자표지의 대립유전자

발현 특성은 유전집단(품종)에 따라 매우 다양하게 나타나고 있다. 특히 국내외적으로 친자 확인을 위한 유전자표지로서의 사용이 권장되고 있는 몇몇 marker는 젖소(Holstein 종) 집단에서 활용이 용이한 것으로 나타나고 있다. 따라서 국제적으로 통용되는 유전 표지의 일부분은 표준 유전 양상의 비교를 위해 한우에서 활용이 필요하지만 개체식별이 높은 유전표지의 추가 발굴 및 이들의 활용이 매우 중요한 것으로 생각된다. 아래의 표는 한우 종모우 집단, 브랜드 한우집단 및 4종의 외래품종 집단에 대한 유전표지별 대립유전자의 발현빈도를 조사하여 제시한 것이다.

Table 12. 한우집단과 대조 외래품종간의 MS marker 대립유전자 발현 빈도 특성 비교

Locus		Population / Breeds				
TGLA126 proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL	
107		0.0015				
109	0.0526					
113		0.0811	0.1400	—	—	
115	0.0132	0.0216	0.3108	0.2400	0.5122	0.4500
117	0.5132	0.5045	0.4459	0.4800	0.0488	0.4250
119	0.0132	0.1389	0.0541	0.0400	0.1951	—
121		0.0054	0.0135	0.0800	0.0244	0.1250
123	0.3158	0.0864	0.0946	0.0200	0.2195	—
125	0.0789	0.2068	—	—	—	—
127		0.0285	—	—	—	—
129	0.0132	0.0062	—	—	—	—
11	7	9	6	6	5	3
TGLA227 proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL	
64	0.0125					
68	0.0125	0.0008				
70		0.0008				
72		0.0023				
76	0.0625	0.0015				
78	0.0625	0.0517	0.0139	—	0.0750	—
80	0.0125	0.0100				
82	0.3250	0.1960				
84	0.0875	0.1196				
86		0.0733	0.2361	0.0833	0.2750	0.1000
88		0.0108				
90		0.0069	0.1667	0.1042	0.0375	0.0250
92		0.0054				

Locus			Population / Breeds			
TGLA227	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
94	0.2500	0.1427	0.3333	0.6875	0.5250	0.2500
96	0.0375	0.1752				
98		0.0185				
100	0.1125	0.1744	0.2500	0.1250	0.0875	0.6250
102		0.0008				
104		0.0023				
108	0.0125	0.0062				
110		0.0008				
114	0.0125					
22	12	20	5	4	5	4
BM1824	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
180	0.0256	0.0255	0.1447	0.2188	0.1829	0.1500
182	0.4359	0.4730	0.2895	0.0156	0.3293	0.2250
184	0.2051	0.2647	0.2105	0.5938	0.3049	0.2500
186	0.0897	0.0594	–	–	0.0122	–
188		0.0015	–	–	–	–
190	0.2179	0.1690	0.3553	0.1719	0.0732	0.3500
192	0.0256	0.0069	–	–	0.0854	0.0250
194			–	–	0.0122	–
8	6	7	4	4	7	5
BM2113	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
122			0.0526	–	–	–
124	0.0256	0.0147				
126	0.0897	0.0301	0.0263	0.0909	0.1585	0.2750
128			0.0526	0.0152	–	0.1500
130		0.0069	–	–	–	–
132	0.0256	0.0965	–	–	0.3902	–
134	0.3077	0.2299	0.1974	0.1061	0.0610	–
136	0.1923	0.1736	0.3026	0.1515	0.0976	0.4000
138	0.2436	0.4352	0.1316	0.0606	0.1951	0.1000
140	0.0769	0.0108	0.1842	0.4848	0.0854	0.0750
142	0.0256		0.0526	0.0758	0.0122	–
144	0.0128		–	0.0152	–	–
146		0.0023	–	–	–	–
13	9	9	8	8	7	5
BM1824	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
180	0.0256	0.0255	0.1447	0.2188	0.1829	0.1500
182	0.4359	0.4730	0.2895	0.0156	0.3293	0.2250

Locus		Population / Breeds				
BM1824	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
184	0.2051	0.2647	0.2105	0.5938	0.3049	0.2500
186	0.0897	0.0594	–	–	0.0122	–
188		0.0015	–	–	–	–
190	0.2179	0.1690	0.3553	0.1719	0.0732	0.3500
192	0.0256	0.0069	–	–	0.0854	0.0250
194			–	–	0.0122	–
8	6	7	4	4	7	5
BM2113	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
122			0.0526	–	–	–
124	0.0256	0.0147				
126	0.0897	0.0301	0.0263	0.0909	0.1585	0.2750
128			0.0526	0.0152	–	0.1500
130		0.0069	–	–	–	–
132	0.0256	0.0965	–	–	0.3902	–
134	0.3077	0.2299	0.1974	0.1061	0.0610	–
136	0.1923	0.1736	0.3026	0.1515	0.0976	0.4000
138	0.2436	0.4352	0.1316	0.0606	0.1951	0.1000
140	0.0769	0.0108	0.1842	0.4848	0.0854	0.0750
142	0.0256		0.0526	0.0758	0.0122	–
144	0.0128		–	0.0152	–	–
146		0.0023	–	–	–	–
13	9	9	8	8	7	5
ETH10	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
202	0.0128					
204	0.0128					
208	0.0256	0.0077				
210	0.0128	0.011	–	–	–	–
212		0.0131	–	–	–	–
214			0.0132	–	–	0.0250
216	0.1795	0.2785	0.0132	0.0758	–	–
218	0.3974	0.3557	0.6579	0.2424	0.9634	0.1500
220	0.2179	0.1636	0.2632	0.1970	0.0244	0.6250
222	0.0256	0.0255	0.0526	0.4697	–	0.0250
224	0.1154	0.1435	–	–	–	0.1250
226		0.0008	–	0.0152	0.0122	0.0500
12	9	9	5	5	3	6

Locus		Population / Breeds				
ETH225	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
136		0.0116				
138	0.0375	0.0077	–	–	–	–
140	0.2500	0.5062	0.0921	0.1667	0.0976	0.0833
142	0.3250	0.1181	0.0132	–	–	0.0278
144	0.2000	0.2207	0.2763	0.0606	0.1463	0.0556
146	0.1625	0.0910	0.2895	0.1515	0.0976	0.0833
148		0.0162	0.1974	0.5303	0.1098	0.4167
150		0.0008	0.0658	0.0909	0.5488	0.2778
152			0.0395	–	–	0.0556
156		0.0278	–	–	–	–
158			0.0263	–	–	–
162	0.0250					
ETH3	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
95		0.0008				
99		0.0008				
103			–	–	0.0244	–
113	0.0250		–	0.0167	–	–
115	0.4250	0.3056	–	–	–	–
117	0.3750	0.2708	0.3553	0.4333	0.3049	0.5750
119	0.0250	0.0787	0.0921	0.5500	0.1220	–
121	0.0125	0.0008	0.3026	–	0.1829	–
123	0.0500	0.1744	–	–	0.0610	–
125	0.0750	0.1644	0.2500	–	0.2805	0.0750
127		0.0023	–	–	–	0.2000
129			–	–	0.0244	0.1500
135	0.0125	0.0015				
13	8	10	4	3	7	4
SPS115	proven sire	Brand	AG	HF	CHA	HOL
245	0.3571	0.3681	–	–	–	–
247	0.0429	0.0525	0.5000	0.0909	0.5000	0.5625
249	0.1714	0.1343	–	–	–	–
251	0.1143	0.1366	0.0909	0.0909	0.2500	0.2188
253	0.2429	0.2014	0.0909	–	0.0500	–
255		0.0008	–	0.2273	–	0.1250
257	0.0714	0.1057	–	–	–	0.0938
259		0.0008	0.3182	0.5909	0.2000	–
8	6	8	4	4	4	4

HW: 한우, AN: 앵거스, HF: 헤어포드, CH: 샤를레, HOL: 홀스타인.

Table 12는 종모우와 브랜드집단을 포함한 한우집단과 앵거스(Angus), 헤어포드(Hereford), 샤롤레(Charolais) 그리고 홀스타인(Holstein)을 포함한 외래품종의 발현된 대립유전자 발현 빈도를 비교한 것으로 외래품종의 경우 발현된 대립유전자 수가 한우집단의 비하여 적을 뿐만 아니라 그 범위 또한 적게 나타났다. 반면 한우집단은 TGLA227 좌위에서 22개(64-114)의 대립유전자가 발현된 것을 비롯하여 ETH225, TGLA126, BM2113, ETH10 좌위는 9개 그리고 ETH3 좌위는 10개로 다양하게 나타난 것을 알 수 있다. TGLA 126의 117대립유전자는 한우집단에서 그 발현빈도가 상당히 높게 나타나고 있으며 반면 샤롤레(CHA)에서는 매우 낮은 발현빈도를 나타내고 있다. 또한 외래품종 모두에서 115대립유전자의 발현빈도가 상당히 높게 나타남에 비하여 한우 집단에서는 상당히 낮은 발현빈도를 보이고 있다. BM1824의 경우도 182대립유전자의 발현빈도가 외래품종들과 확연한 차이를 보이고 있음을 확인하였다. ETH10의 경우 앵거스(AG)와 샤롤레(CHA) 품종에서 218대립유전자의 발현빈도가 매우 높게 검출되었다. ETH225의 148대립 유전자와 ETH3의 119대립유전자의 발현빈도는 다른 모든 품종에서는 낮게 나타났지만 헤어포드집단에서만 특별히 높게 나타난 것을 확인하였다. SPS115의 245대립유전자의 경우 한우집단에서의 발현빈도가 비교적 높게 검출 되었지만 다른 모든 외래품종에서는 전혀 검출되지 않았다. 또한 247대립유전자의 경우 한우집단에서는 낮은 발현빈도를 보였으나 앵거스, 샤롤레, 홀스타인집단에서 높은 발현빈도를 보이고 있다. 이러한 각 marker별 대립유전자의 특이적인 발현빈도는 각 품종을 구분할 수 있는 척도로 사용이 될 수 있다. 따라서 각 품종별 특이적인 유전양상을 보유한 marker를 분석하여 선정한다면 품종간에 구분에 있어 강력한 수단으로 활용될 수 있을 것이다. 또한 이러한 marker를 몇 종을 사용하였을 때 가장 효율성이 있을 것인지에 대한 연구 역시 필요하다.

Fig 8, 9는 TGLA227과 ETH225 유전표지의 각 품종에 대한 대립유전자 발현빈도를 그래프로 나타내어 비교한 결과이다.

TGLA227의 경우 한우에서 대립유전자의 발현양상이 매우 다양하게 검출되었다. 한우 품종에서 검출된 대립유전자는 20개였고 앵거스, 헤어포드, 샤롤레의 경우 4-5개의 대립유전자가 검출되었다. 이결과는 한우품종의 유전적 다양성의 폭이 매우 넓게 분포하고 있음을 단적으로 보여주는 예라 하겠다. 또한 20개의 대립유전자 중 발현 빈도가 현저하게 낮은 것들이 많이 나타났는데 이러한 결과는 차후 marker로 활용하는데 있어 오류가 나타날 확률도 높아 결과의 신뢰도에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

ETH225의 경우 대립유전자의 발현양상이 품종별로 많은 차이가 있음을 여실히 보여주고 있다. 한우의 경우 140 대립유전자의 발현빈도가 상당히 높았으며 헤어포드는 148 대립유전자, 샤롤레는 150 대립유전자의 발현빈도가 상당히 높아 품종간

의 유전적 차이가 있음을 잘 보여주고 있으며 이러한 marker들을 선발하여 개체 식별에 사용할 경우 한우 품종 내에서의 개체 식별뿐만 아니라 품종간의 구분에 있어서도 좀 더 많은 연구를 통해 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

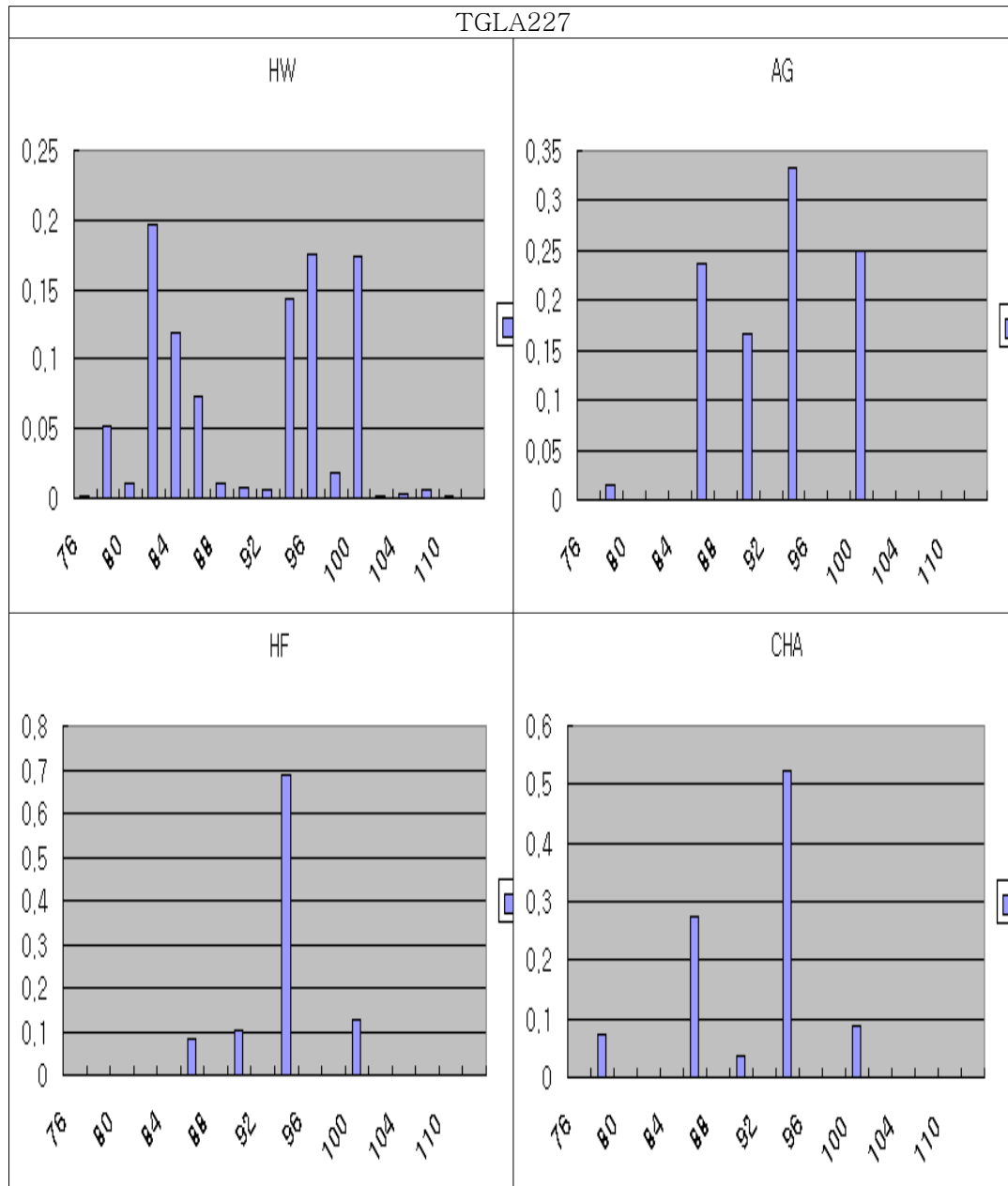


Fig 8. TGLA227 유전표지의 품종간의 대립유전자 발현빈도 차이 비교
HW: 한우, AN: 앵거스, HF: 헤어포드, CHA: 샤를레.

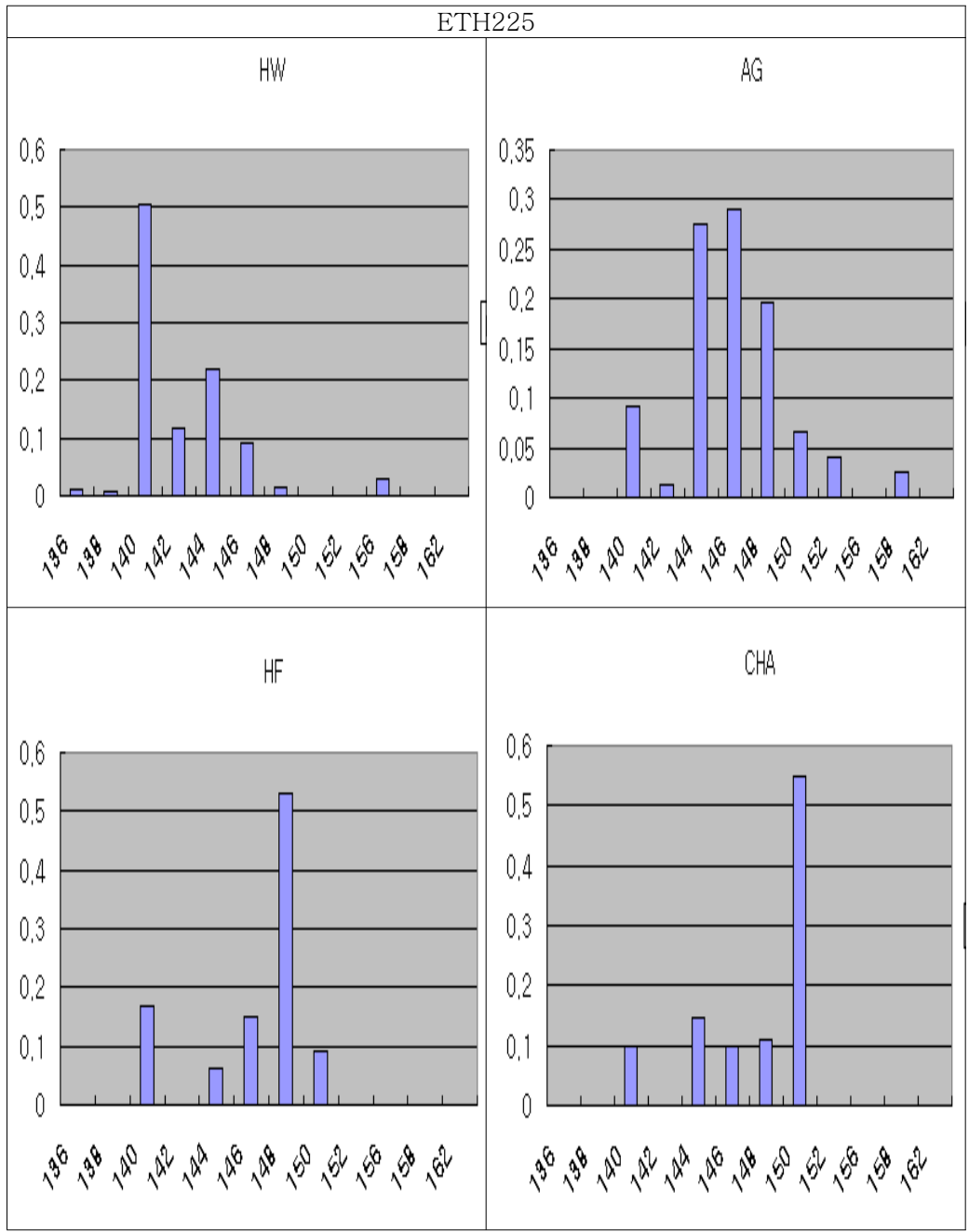


Fig 9. ETH225 유전표지의 품종간의 대립유전자 발현빈도 차이 비교
 HW: 한우, AN: 앵거스, HF: 헤어포드, CHA: 샤롤레.

Table 13. 한우집단과 외래품종간의 유전적 변이성 정보를 통한 집단식별력(CPD)

Locus	Observed features	Breeds					Total
		HW	AN	HF	CH	HOL	
TGLA122	Allele number	8	6	12	10	9	9.00
	h_i	0.824	0.962	0.849	0.847	0.924	0.88
	N_e	1.213	1.039	1.177	1.180	1.082	1.14
	PIC	0.817	0.962	0.848	0.847	0.924	0.88
TGLA126	Allele number	7	6	6	5	3	5.40
	h_i	0.797	0.685	0.684	0.648	0.601	0.68
	N_e	1.254	1.459	1.461	1.543	1.663	1.48
	PIC	0.781	0.661	0.662	0.622	0.558	0.66
TGLA227	Allele number	4	5	4	5	4	4.40
	h_i	0.728	0.742	0.493	0.634	0.536	0.63
	N_e	1.373	1.347	2.028	1.577	1.865	1.64
	PIC	0.703	0.719	0.477	0.607	0.507	0.60
BM1824	Allele number	7	4	4	7	5	5.40
	h_i	0.642	0.724	0.569	0.752	0.741	0.69
	N_e	1.557	1.381	1.757	1.329	1.349	1.47
	PIC	0.607	0.699	0.540	0.732	0.718	0.66
BM2113	Allele number	7	8	8	7	5	7.00
	h_i	0.737	0.809	0.712	0.763	0.726	0.75
	N_e	1.356	1.236	1.404	1.310	1.377	1.34
	PIC	0.716	0.796	0.699	0.748	0.704	0.73

	Allele number	9	5	5	3	6	5.60
ETH10	h_i	0.778	0.494	0.675	0.071	0.567	0.52
	N_e	1.285	2.024	1.481	14.084	1.763	4.13
	PIC	0.761	0.463	0.650	0.070	0.550	0.50
	Allele number	9	8	5	5	7	6.80
ETH225	h_i	0.727	0.785	0.656	0.646	0.728	0.71
	N_e	1.375	1.273	1.524	1.547	1.373	1.42
	PIC	0.708	0.785	0.656	0.646	0.728	0.70
	Allele number	6	4	3	7	4	4.80
ETH3	h_i	0.771	0.711	0.509	0.775	0.601	0.67
	N_e	1.297	1.406	1.964	1.290	1.663	1.52
	PIC	0.753	0.683	0.452	0.757	0.577	0.64
	Allele number	7	4	4	4	4	4.60
SPS115	h_i	0.750	0.632	0.582	0.775	0.601	0.67
	N_e	1.333	1.582	1.718	1.290	1.663	1.52
	PIC	0.735	0.601	0.557	0.615	0.587	0.62
	Allele number	7	5	5	5	5	5.40
Among loci mean	h_i	0.750	0.727	0.636	0.656	0.669	0.69
	N_e	1.338	1.416	1.612	2.794	1.533	1.74
	PIC	0.731	0.707	0.615	0.627	0.650	0.67
	CPD	-	-	-	-	-	99.64%

HW: 한우, AN: 앵거스, HF: 헤어포드, CH: 샤롤레, HOL: 홀스타인.

Table 13은 한우집단과 외래품종간의 마커별 이형접합도, 유효대립유전자수 그리고 다형성을 비교한 것으로 ETH10 좌위의 경우 전체적으로 이형접합도와 다형성이 다른 좌위에 비하여 낮게 나타났으며 특히 외래품종중 샤롤레는 극단적으로 적은 값이 나타났다. 전체적으로는 한우집단이 외래품종에 비하여 이형접합률과 다형성의 값이 높게 나타난 것을 확인할 수 있다. 각 marker별 품종간의 이형접합률을

이용하여 CPD 값을 분석하였다. CPD는 marker를 활용하여 분석을 통해 각 개체들의 집단 내에서 구분할 수 있는 확률을 나타내는 것으로 본 결과에서 제시된 바에 의하면 분석된 9개의 marker를 이용하여 개체의 품종을 구분할 수 있는 확률이 99.64%로 나타났다.

2. 개체식별을 위한 통계분석 시스템 구축

1) 분석 기기간의 data 변환의 자동화를 위한 프로그램 개발

① 개체식별검증 유전통계분석 시스템

○ 기초 raw data set format (Excle file format)

No	D	site	dam	Name	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53											
1	000189801962	002006994245	000162999472	강원	14	14	20	20	22	22	23	25	23	23	20	20	21	24	26	26	17	18	15	22	27	34
2	0001898295808	000189833901	000170080543	강원	13	17	15	15	19	22	23	26	22	23	24	24	21	23	24	24	17	17	14	19	27	31
3	000189836384	000189188599	000182264887	강원	14	14	19	19	19	22	23	24	22	22	15	23	21	23	29	47	17	18	14	15	31	33
4	000189841425	000194500829	000170080536	강원	12	13	15	18	18	20	25	25	23	27	20	24	21	21	43	43	18	21	20	20	25	31
5	0001898298199	000203350858	000186281347	강원	13	17	15	19	19	19	26	26	22	23	18	20	21	25	25	26	17	20	15	20	27	32
6	0001898299462	000194712475	000197189601	강원	13	14	21	21	19	22	23	25	23	27	20	21	21	24	21	43	17	21	15	16	27	33
7	000189833871	000203350803	000197194155	강원	14	17	20	21	19	22	23	23	22	23	20	20	21	24	21	25	17	21	15	22	27	31
8	0001898297529	000203350865	000197188703	강원	13	17	18	18	19	20	23	26	22	23	20	24	21	21	24	26	17	17	15	15	23	27
9	000196501271	000194500836	000197188437	강원	13	17	17	18	19	19	23	26	22	22	17	24	25	27	21	24	17	17	15	17	27	27
10	000197182978	000194503578	000196297772	강원	14	17	18	21	18	19	23	26	22	23	18	20	21	27	24	26	20	21	14	14	27	33
11	000189803645	000194721026	000197188420	강원	13	17	21	21	12	19	25	25	22	23	19	21	24	24	25	29	17	17	14	14	27	31
12	000197187164	000182018398	000189846062	강원	14	17	18	19	19	19	23	26	22	26	18	24	25	25	24	24	17	20	14	14	27	32
13	000200839684	000194721019	000197154289	강원	16	17	21	21	21	22	23	26	23	27	20	21	21	24	21	26	17	21	12	15	31	31
14	000197193776	000182018411	000200839479	강원	13	17	15	15	19	22	24	26	23	26	18	20	21	27	25	25	17	17	14	14	27	27
15	000197147854	000186616628	000197175802	강원	13	17	18	18	19	20	23	26	22	23	17	18	21	25	24	29	17	20	15	20	27	30
16	000189803814	000165911937	000203351602	강원		21	21	18	20	25	25	22	27			21	21	24	24	17	17	20	22	28	28	
17	000189848707	000163088141	000200569765	강원	14	14	20	20	18	19	23	25	24	27	21	23	21	21	25	30	17	17	14	19	23	28
18	000189849988	000165593386	000197175666	강원	13	17	21	21	18	19	25	26	26	27	20	24	21	21	24	24	17	21	20	22	25	34
19	000189848677	000174500016	000196297642	강원	13	14	15	15	18	19	23	26	23	23	18	24	21	25	24	29	17	20	15	20	27	31
20	000184987890	000167988111	000193749700	강원	14	14	18	21	19	19	25	26	23	24	18	20	21	21	24	34	20	22	14	22	27	33
21	000189848691	000177819771	000197189526	강원	12	13	18	21	15	20	23	25	23	27	20	22	21	23	34	43	17	20	12	20	25	27
22	000189822769	000165918912	000196289142	강원	17	17	19	20	22	22	24	25	26	27	20	20			25	26	17	20	15	20	23	32
23	000189848714	000174499808	000194504841	강원	13	14	18	19	19	19	25	26	23	26	18	20	21	24	24	30	17	20	14	15	23	27
24	000189848721	000174500023	000197169382	강원	13	13	21	24	19	19	23	23	26	27	20	20	21	25	25	26	17	21	15	19	23	27
25	000189848738	000182265198	000189838319	강원	13	13	21	21	19	19	23	23	23	26	20	20	21	25	25	26	17	21	15	19	21	25
26	000189848745	000194719573	000197168415	강원	14	14	19	21	18	21	23	25	22	27	21	24	25	25	26	17	17	14	14	23	31	
27	000189848752	000188616574	000194501758	강원	13	13	21	21	20	22	24	26	22	23	20	21	21	21	29	43	17	21	20	22	32	34
28	000189848769	000194719597	000197166343	강원	13	17	18	20	19	22	23	25	23	23	20	21	23	25	21	24	17	20	14	14	23	27
29	000189848592	000194719603	000170095776	강원	14	17	19	20	18	20	23	24	26	26	17	20	23	25	26	29	17	18	14	26	23	34
30	000185003391	000194502007	000197168453	강원	14	14	12	21	18	20	23	24	22	23	20	24	21	21	30	43	20	21	14	22	25	27
31	000189174059	000195379981	000188619537	강원	14	14	21	21	16	19	23	23	22	23	23	24	21	25	29	30	18	21	14	19	23	33
32	000189809593	000177510265	000188618776	강원	14	17	19	20	17	22	24	26	27	27	21	24	23	27	24	25	17	17	14	22	32	32
33	000189179610	000197721439	000170095752	강원	14	17	19	21	19	22	25	26	23	27	16	20	21	21	25	25	18	18	12	22	29	32
34	000189179603	000177256620	000188618745	강원		18	20	19	19	25	25	22	23			21	21	21	37	17	21	14	15	23	27	
35	000189186045	000186298987	000189799313	강원	13	16	21	26	18	19	23	25	26	26	20	20			21	26	17	21	16	22	23	27
36	000189820246	000194707105	000194504858	강원	13	14	20	21	19	22	23	23	22	23	20	24	24	24	21	30	17	17	15	20	29	31
37	000189178705	000177511460	000194709260	강원	14	16	21	21	19	22	23	25	23	27	20	20	21	24	26	29	20	21	15	15	23	27

시스템에서 지원되는 DNA 파일은 Microsoft社의 EXCEL 파일을 직접 입력 받을 수 있도록 하였으며 위의 그림과 같은 포맷으로 입력 받을 수 있다. 데이터의 양은 엑셀 파일에 기록되어 있는 것에 따르며 마커의 종류 및 순서는 엑셀 파일에 정의된 것에 따른다.

○ 개체식별검증 유전통계분석 및 동일성검정 시스템 프로그램 화면

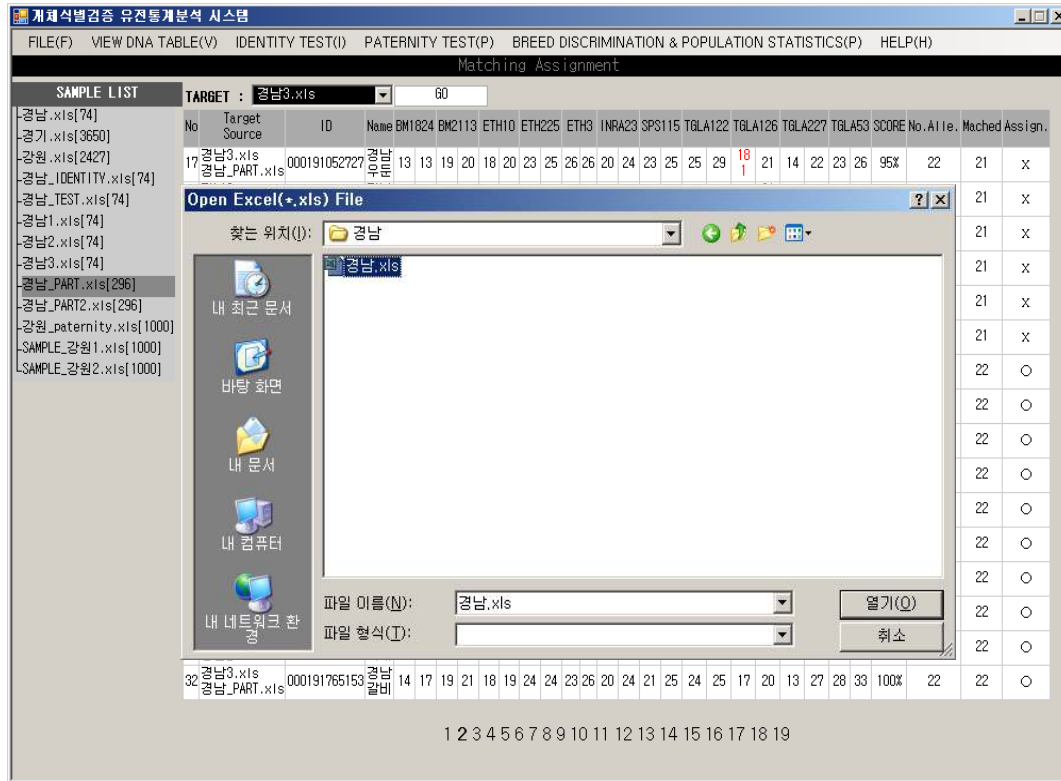
SAMPLE LIST	No	Barcode	sire	dam	Name	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53											
경남.xls[74]					경남	15	17	21	21	18	18	25	25	26	26	20	22	23	25	24	29	17	20	14	19	24	35
-경기.xls[3650]	1	000201682913			경남	15	17	21	21	18	18	25	25	26	26	20	22	23	25	24	29	17	20	14	19	24	35
-강원.xls[2427]					경남	13	18	21	21	15	22	23	23	22	26	20	21	21	25	21	26	17	17	19	20	23	33
-경남_IDENTITY.xls[74]	2	000192205672			경남	13	18	21	21	15	22	23	23	22	26	20	21	21	25	21	26	17	17	19	20	23	33
-경남_TEST.xls[74]	3	000201699720			경남	13	14	20	20	18	18	24	25	26	26	20	21	23	24	25	29	17	21	12	20	29	29
-경남1.xls[74]	4	000192201827			경남	13	17	21	21	19	20	23	25	26	27	24	24	23	24	24	26	17	17	20	20	30	34
-경남2.xls[74]	5	000195716342			경남	12	14	19	21	18	18	21	24	22	27	24	24	24	27	25	26	17	21	14	14	23	23
-경남3.xls[74]	6	000201699829			경남	16	17	15	20	18	18	23	23	23	26	20	24	25	27	21	25	17	21	15	19	29	35
-경남_PART.xls[296]	7	000199508516			경남	16	17	20	20	18	22	23	23	22	23	20	22	24	24	21	29	17	21	15	20	23	27
-경남_PART2.xls[296]	8	000201680292			경남	14	17	19	20	18	19	25	26	24	26	20	20	24	25	24	25	17	21	12	20	23	35
-강원_paternity.xls[1000]	9	000201050620			경남	13	14	15	19	20	22	23	25	22	27	20	24	21	25	24	34	16	18	14	22	34	34
-SAMPLE_강원1.xls[1000]	10	000199508530			경남	14	17	21	21	18	18	23	24	23	26	17	20	21	23	26	29	18	21	14	20	31	35
-SAMPLE_강원2.xls[1000]	11	000201050613			경남	13	14	18	21	18	20	23	26	23	27	20	20	21	21	21	29	17	21	14	22	23	24
	12	000201050590			경남	14	14	21	21	19	21	26	26	22	26	20	24	21	23	34	37	18	21	12	18	23	27
	13	000201050545			경남	13	13	21	21	18	18	23	25	26	27	20	21	24	27	29	40	17	20	14	14	23	33
	14	000193359541			경남	12	17	20	21	19	19	24	25	26	27	18	20	21	27	24	34	17	18	19	21	29	33
	15	000199506031			경남	13	17	21	21	18	18	23	23	23	26	20	22	21	23	24	26	17	18	19	22	23	32
	16	000199508523			경남	17	17	15	19	19	22	23	25	23	23	20	21	23	24	21	25	20	21	19	20	29	35
	17	000192052375			경남	13	14	19	20	19	19	25	25	23	27	16	21	27	27	26	26	17	17	14	22	23	23
	18	000191255746			경남	13	14	18	19	19	20	23	23	22	23	21	24	21	27	28	43	17	17	12	14	23	27
	19	000201059883			경남	14	17	20	21	19	20	23	25	24	27	18	21	21	24	26	29	17	21	14	19	29	33
	20	000201059876			경남	13	13	19	19	18	20	23	25	23	27	20	24	22	27	26	29	17	18	14	17	32	34

시스템에서 지원되는 분석과정은 크게 IDENTITY TEST(동일성 검정), PATERNITY TEST(친자확인), BREED DISCRIMINATION TEST(품종식별 검정), POPULATION STATISTICS(집단유전학적 통계량)으로 분류된다. 초기화면에서 각 분류를 선택하면 해당되는 분석을 수행할 수 있는 창을 활성화할 수 있으며, 시스템을 종료하기 위해서는 [FILE] 메뉴를 이용하면 된다.

본 프로그램에서는 이상의 모든 기능을 지원하며, Microsoft Visual Studio 2005 및 PHP등을 이용하여 개발하였다. 프로그램을 동작하기 위한 플랫폼으로는 Microsoft Windows XP, Vista 등을 이용할 수 있다. 사용하는 데이터베이스는 MySQL을 사용

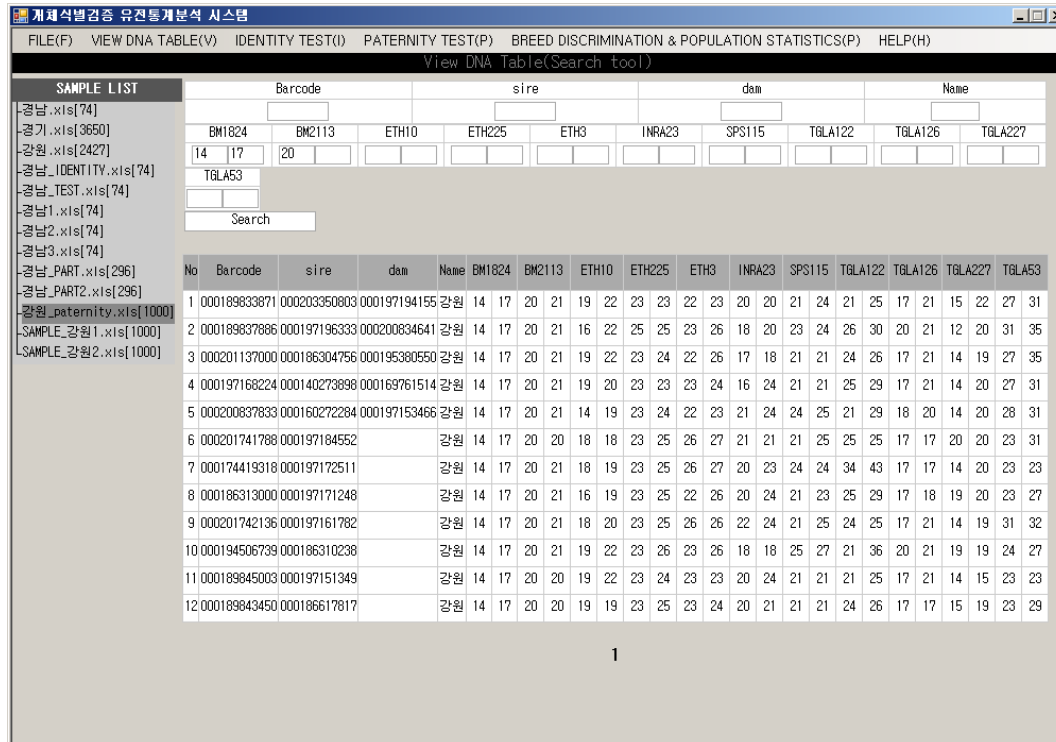
하였고 웹서버는 Apache를 사용하였다. 즉, Windows XP의 PC에서 본 시스템을 실험하기위해 추가적인 프로그램의 구입은 불필요하다.

○ 엑셀파일에서 DNA 데이터를 직접 입력



엑셀파일에서 DNA 데이터를 직접 입력 받아 이를 Database에 바로 Insert 한다. Database에 입력 받은 DNA Sample은 Database에서 작업이 이루어지므로 실험할 Sample은 한번만 입력하면 된다. 이렇게 입력받은 Sample은 왼쪽의 SAMPLE LIST에 파일명과 개체수가 표시되므로 이를 클릭하면 그 내용을 확인할 수 있다.

○ Database에서 검색



기본 화면에서는 SAMPLE LIST와 선택된 SAMPLE의 내용이 화면에 표시된다. 이때 내용에서 검색을 원할 경우 View Table의 View Search Table을 선택하면 그 내용을 검색할 수 있다. 이는 다수의 시료를 검사하지 않고 몇 개의 시료를 검사해 동일성을 검사할 때 유용하게 쓰일 수 있다.

② 통계분석 시스템 구축 (Matching Assignment)

IDENTITY TEST(동일성 검정)의 하위 메뉴인 Matching Assignment에서는 분석된 시료간 동일 좌위를 가진 개체를 비교하고, 새로운 분석 시료 정보를 기존 data 내의 정보와의 비교를 지원한다. 먼저 오른쪽의 SAMPLE LIST에서 분석할 시료 DNA TABLE을 선택하면 오른쪽 테이블 창에 그 실험 내용이 테이블 형태로 DISPLAY된다. 원본 즉, 기존 시료정보를 "TARGET"에서 선택하고 "GO" 버튼을 클릭하면 두 SAMPLE를 비교한 화면이 아래의 그림과 같이 뜬다. 이때 비교한 Allele의 개수 등의 결과가 테이블의 오른쪽 부분에 표시 된다.

○ Matching Assignment 화면 1

The screenshot shows a software window titled '개체식별검증 유전통계분석 시스템' (Individual Identification Genetic Statistical Analysis System). The main menu includes FILE(F), VIEW DNA TABLE(V), IDENTITY TEST(I), PATERNITY TEST(P), BREED DISCRIMINATION & POPULATION STATISTICS(P), and HELP(H). The current view is 'Matching Assignment'.

The 'SAMPLE LIST' on the left includes files like '경남.xls[74]', '경원.xls[3650]', '경원_IDENTITY.xls[74]', '경원_TEST.xls[74]', '경원1.xls[74]', '경원2.xls[74]', '경원3.xls[74]', '경원_PART.xls[296]', '경원_PART2.xls[296]', '경원_paternity.xls[1000]', 'SAMPLE_강원1.xls[1000]', and 'SAMPLE_강원2.xls[1000]'. The 'TARGET' is set to '강원.xls' with a value of '60'.

No	Target Source	ID	Name	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53	SCORE	No. Alle.	Mached	Assign.											
1	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000189801962	강원 강원	14	14	20	20	22	22	23	25	23	23	20	20	21	24	26	26	17	18	15	22	27	34	100%	22	22	○
2	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000196295808	강원 강원	13	17	15	15	19	22	23	26	22	23	24	24	21	23	24	24	17	17	14	19	27	31	100%	22	22	○
3	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000189836384	강원 강원	14	14	19	19	19	22	23	24	22	22	15	23	21	23	29	47	17	18	14	15	31	33	100%	22	22	○
4	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000189841425	강원 강원	12	13	15	18	18	20	25	25	23	27	20	24	21	21	43	43	18	21	20	20	25	31	100%	22	22	○
5	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000196298199	강원 강원	13	17	15	19	19	26	26	22	23	18	20	21	25	25	26	17	20	15	20	27	32	100%	22	22	○	
6	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000196299462	강원 강원	13	14	21	21	19	22	23	25	23	27	20	21	21	24	21	43	17	21	15	16	27	33	100%	22	22	○
7	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000189833871	강원 강원	14	17	20	21	19	22	23	23	22	23	20	20	21	24	21	25	17	21	15	22	27	31	100%	22	22	○
8	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000196297529	강원 강원	13	17	18	18	19	20	23	26	22	23	20	24	21	21	24	26	17	17	15	15	23	27	100%	22	22	○
9	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000196301271	강원 강원	13	17	17	18	19	19	23	26	22	22	17	24	25	27	21	24	17	17	15	17	27	27	100%	22	22	○
10	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000197182978	강원 강원	14	17	18	21	18	19	23	26	22	23	18	20	21	27	24	26	20	21	14	14	27	33	100%	22	22	○
11	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000189803645	강원 강원	13	17	21	21	12	19	25	25	22	23	19	21	24	24	25	29	17	17	14	14	27	31	100%	22	22	○
12	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000197187164	강원 강원	14	17	18	19	19	19	23	26	22	26	18	24	25	25	24	24	17	20	14	14	27	32	100%	22	22	○
13	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000200839684	강원 강원	16	17	21	21	21	22	23	26	23	27	20	21	21	24	21	26	17	21	12	15	31	31	100%	22	22	○
14	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000197193776	강원 강원	13	17	15	15	19	22	24	26	23	26	18	20	21	27	25	25	17	17	14	14	27	27	100%	22	22	○
15	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000197147854	강원 강원	13	17	18	18	19	20	23	26	22	23	17	18	21	25	24	29	17	20	15	20	27	30	100%	22	22	○
16	강원.xls SAMPLE_강원1.xls	000189809814	강원 강원			21	21	18	20	25	25	22	27			21	21	24	24	17	17	20	22	28	28	81%	22	18	x

Page navigation: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 ... 63

③ Identity Test

Identity test는 쇠고기의 이력 정보가 생산 → 도축 → 가공 → 판매 단계를 거치면서 정확하게 전달되고 있는지를 확인할 수 있는 방법으로 개체마다 DNA 구조가 다르고, 동일 개체에서는 동일한 DNA 구조로 되어있는 점을 이용, 생산·도축·가공된 고기와 판매되고 있는 고기가 일치하는지의 여부를 지원한다. Identity test는 Identity test의 Matching Assignment를 이용하지만 시료의 이름을 입력하는 엑셀파일에서 '생산', '도축', '가공', '판매' 등으로 정의한다. 다만 이 방법으로 부위별 동일성검사 시에는 '우둔', '사태', '갈비', '등심' 등으로 설정하여 각 실험 목적에 따라 유연하게 사용할 수 있다.

○ Matching Assignment 화면 2

SAMPLE LIST	No	Target Source	ID	Name	BM1824	BM2113	ETH10	ETH25	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53	SCORE	No. Alle.	Mached	Assign.											
-경남3.xls[74]	17	경남3.xls	000191052727	경남3.xls	13	13	19	20	18	20	23	25	26	26	20	24	23	25	25	29	18	21	14	22	23	26	95%	22	21	x
-경남_PART.xls[296]	21	경남_PART.xls	000191255746	경남_PART.xls	13	14	18	19	19	20	23	22	23	21	24	21	27	28	43	17	17	12	14	23	27	95%	22	21	x	
-경남3.xls[74]	18	경남3.xls	000191052727	경남3.xls	13	13	19	20	18	20	23	25	26	26	20	24	23	25	25	29	18	21	14	22	23	26	95%	22	21	x
-경남_PART.xls[296]	20	경남_PART.xls	000191052727	경남_PART.xls	13	13	19	20	18	20	23	25	26	26	20	24	23	25	25	29	18	21	14	22	23	26	95%	22	21	x
-경남3.xls[74]	19	경남3.xls	000191052727	경남3.xls	13	13	19	20	18	20	23	25	26	26	20	24	23	25	25	29	18	21	14	22	23	26	95%	22	21	x
-경남_PART.xls[296]	22	경남_PART.xls	000191255746	경남_PART.xls	13	14	18	19	19	20	23	22	23	21	24	21	27	28	43	17	17	12	14	23	27	95%	22	21	x	
-경남3.xls[74]	20	경남3.xls	000191052727	경남3.xls	13	13	19	20	18	20	23	25	26	26	20	24	23	25	25	29	18	21	14	22	23	26	95%	22	21	x
-경남_PART.xls[296]	23	경남_PART.xls	000191255746	경남_PART.xls	13	14	18	19	19	20	23	22	23	21	24	21	27	28	43	17	17	12	14	23	27	100%	22	22	o	
-경남3.xls[74]	24	경남3.xls	000191255746	경남3.xls	13	14	18	19	19	20	23	22	23	21	24	21	27	28	43	17	17	12	14	23	27	100%	22	22	o	
-경남_PART.xls[296]	25	경남_PART.xls	000191524996	경남_PART.xls	14	14	19	21	19	21	23	26	22	23	16	20	25	27	25	34	17	17	20	22	24	30	100%	22	22	o
-경남3.xls[74]	26	경남3.xls	000191524996	경남3.xls	14	14	19	21	19	21	23	26	22	23	16	20	25	27	25	34	17	17	20	22	24	30	100%	22	22	o
-경남_PART.xls[296]	27	경남_PART.xls	000191524996	경남_PART.xls	14	14	19	21	19	21	23	26	22	23	16	20	25	27	25	34	17	17	20	22	24	30	100%	22	22	o
-경남3.xls[74]	28	경남3.xls	000191524996	경남3.xls	14	14	19	21	19	21	23	26	22	23	16	20	25	27	25	34	17	17	20	22	24	30	100%	22	22	o
-경남_PART.xls[296]	29	경남_PART.xls	000191765153	경남_PART.xls	14	17	19	21	18	19	24	24	23	26	20	24	21	25	24	25	17	20	13	27	28	33	100%	22	22	o
-경남3.xls[74]	30	경남3.xls	000191765153	경남3.xls	14	17	19	21	18	19	24	24	23	26	20	24	21	25	24	25	17	20	13	27	28	33	100%	22	22	o
-경남_PART.xls[296]	31	경남_PART.xls	000191765153	경남_PART.xls	14	17	19	21	18	19	24	24	23	26	20	24	21	25	24	25	17	20	13	27	28	33	100%	22	22	o
-경남3.xls[74]	32	경남3.xls	000191765153	경남3.xls	14	17	19	21	18	19	24	24	23	26	20	24	21	25	24	25	17	20	13	27	28	33	100%	22	22	o
-경남_PART.xls[296]		경남_PART.xls		경남_PART.xls																										

SAMPLE LIST에서 선택된 DNA 샘플은 TARGET에서 선택된 샘플과 DNA가 일치하는지 검사를 수행한다. DNA가 일치 하지 않을 경우 붉은색으로 각각의 일치 하지 아니하는 MS가 표시 되어 그 내용을 쉽게 알 수 있다. 또한 검사대상 allele의 수와 일치된 allele의 수 SCORE 등을 별도 표시 하여 일반 동일성 검증, 유통단계의 동일성검증 및 부위별 동일성 검증에 유연하게 사용할 수 있다.

④ Paternity Test

SAMPLE LIST		Sire & Dam : 강원.xls		GO		Paternity Test																			
No	ID Sire Dam	Name	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53	SCORE	No. Alle.	Mached	Assign.								
1	000189801962	강원	14 14	20 20	22 22	23 23	25 23	23 20	20 21	21 21	25 26	26 17	18 15	22 27	34 36%	22	8								
	002008994245	강원	13 13	18 21	18 19	23 24	22 26	20 21	21 25	24 24	17 18	14 20	25 33	36%	22	8	x								
	00016299472	강원	13 17	21 22	18 22	25 25	22 22	- -	- -	24 43	17 17	15 22	23 25	36%	22	8									
2	000196295808	강원	13 17	15 15	19 22	23 26	22 23	24 24	21 23	24 24	17 17	14 19	27 31	54%	22	12									
	000189833901	강원	14 16	20 21	19 22	23 23	26 20	21 21	21 21	26 29	17 21	15 20	31 33	54%	22	12	x								
	000170080543	강원	13 14	20 20	19 22	23 23	23 27	21 21	21 22	21 26	20 20	14 19	24 25	54%	22	12									
3	000189836384	강원	14 14	19 19	19 22	23 24	22 22	15 23	21 23	29 47	17 18	14 15	31 33	59%	22	13									
	000189188599	강원	14 14	20 21	18 22	23 23	23 20	20 21	21 21	24 26	17 21	15 20	23 27	54%	22	12	x								
	000182264687	강원	13 14	18 21	18 18	23 30	22 22	16 20	21 21	26 29	18 21	14 20	23 27	63%	22	14									
4	000189841425	강원	12 13	15 18	18 20	25 25	23 27	20 24	21 21	43 43	18 21	20 20	25 31	27%	22	6									
	000194500829	강원	13 18	14 21	18 19	23 30	23 26	20 21	23 25	26 30	17 17	12 20	23 23	45%	22	10	x								
	000170080536	강원	14 14	19 21	18 18	23 23	22 26	17 17	- -	30 30	17 20	14 19	27 30	9%	22	2									
5	000196298199	강원	13 17	15 19	19 19	26 26	22 23	18 20	21 25	25 26	17 20	15 20	27 32	77%	22	17									
	000203350858	강원	13 17	19 20	19 19	25 26	22 23	18 20	24 25	26 34	18 21	19 20	25 35	81%	22	18	x								
	000186281347	강원	13 13	18 21	19 21	23 25	22 26	20 20	27 27	25 43	17 19	18 20	23 32	72%	22	16									
6	000196299462	강원	13 14	21 21	19 22	23 25	23 27	20 21	21 24	21 43	17 21	15 16	27 33	45%	22	10									
	000194712475	강원	13 13	20 21	18 18	23 24	22 26	20 21	21 21	24 29	17 18	14 20	27 33	63%	22	14	x								
	000197189601	강원	- -	19 21	20 21	23 25	23 23	- -	- -	26 30	18 20	20 22	23 23	27%	22	6									
7	000189833871	강원	14 17	20 21	19 22	23 23	22 23	20 20	21 24	21 25	17 21	15 22	27 31	72%	22	16									
	000203350803	강원	12 14	20 20	19 22	25 25	22 23	- -	24 25	21 29	20 21	19 19	27 31	72%	22	16	x								
	000197194155	강원	13 17	18 19	19 22	24 25	23 26	18 20	21 25	24 25	17 21	14 20	27 28	72%	22	16									
8	000196297529	강원	13 17	18 18	19 20	23 26	22 23	20 24	21 21	24 26	17 17	15 15	23 27	68%	22	15									
	000203350865	강원	17 17	20 21	16 19	26 26	26 20	21 23	24 26	30 17	20 12	20 27	35 63%	22	14	x									
	000197188703	강원	13 17	18 21	19 22	25 25	23 23	20 24	21 21	24 29	20 21	14 14	23 27	72%	22	16									
9	000196301271	강원	13 17	17 18	19 19	23 26	22 22	17 24	25 27	21 24	17 17	15 17	27 27	50%	22	11									
	000194500836	강원	- -	21 21	19 19	23 23	- -	20 21	22 25	25 26	17 18	14 20	23 23	36%	22	8	x								
	000197188437	강원	13 17	18 21	18 22	24 24	22 23	17 20	- -	21 29	17 21	14 20	27 28	63%	22	14									
10	000197182978	강원	14 17	18 21	18 19	23 26	22 23	18 20	21 27	24 26	20 21	14 14	27 33	72%	22	16									
	000194503578	강원	- -	20 21	19 21	24 26	23 23	- -	- -	26 36	17 21	12 13	23 27	63%	22	14	x								
	000196297772	강원	14 14	21 21	19 20	23 25	24 27	20 21	21 25	24 29	18 21	20 22	25 33	81%	22	18									

친자확인을 위한 Paternity Test이다. 검사를 위한 SAMPLE를 SAMPLE LIST에서 선택한 후 부모 SAMPLE를 Sire & Dam에서 선택한 후 "GO"를 클릭하면 Marker 별 Allele의 유전자를 검사하여 친자확인 유무를 검사할 수 있다. sample의 순서는 검사를 위한 개체, 부개체, 모개체이다. 만약 부나 모의 개체에서 발견 할 수 없는 유전자가 확인될 경우 붉은색으로 표시하고 Score 및 Matching allele를 표기한다.

⑤ BREED DISCRIMINATION and POPULATION STATISTICS

○ Gene frequency

SAMPLE LIST		Gene Frequency													
1	BM1824 H_exp = 0.71964 PIC = 0.671452 DI = 0.28 PD = 0.72 CDI = 0.28 CPD = 0.72 MEC = 0.502198 CNEC = 0.557399	Allele	BLANK	12	13	14	15	16	17	18	23				
		Count	64	57	751	627	81	21	389	9	1				
		Frequency													
			0.032	0.029	0.376	0.314	0.041	0.011	0.195	0.004	0.001				
2	BM2113 H_exp = 0.74227 PIC = 0.706776 DI = 0.257359 PD = 0.742641 CDI = 0.07206 CPD = 0.92794 MEC = 0.555007 CNEC = 0.614734	Allele		12	14	15	17	18	19	20	21	22	24	26	
		Count	7	11	195	11	219	431	288	823	9	2	3		
		Frequency													
			0.004	0.005	0.098	0.005	0.110	0.216	0.144	0.411	0.004	0.001	0.002		
3	ETH10 H_exp = 0.74548 PIC = 0.705567 DI = 0.254147 PD = 0.745853 CDI = 0.018314 CPD = 0.961696 MEC = 0.539828 CNEC = 0.925013	Allele	BLANK	12	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
		Count	12	1	15	19	20	4	529	748	289	56	304		
		Frequency													
			0.006	0.001	0.007	0.009	0.010	0.002	0.265	0.374	0.144	0.028	0.152		
4	ETH225 H_exp = 0.721134 PIC = 0.677122 DI = 0.278505 PD = 0.721495 CDI = 0.005101 CPD = 0.994899 MEC = 0.51961 CNEC = 0.962895	Allele	BLANK	21	22	23	24	25	26	27	28	30	31		
		Count	8	18	7	827	274	506	317	1	4	29	9		
		Frequency													
			0.004	0.009	0.004	0.413	0.137	0.253	0.159	0.001	0.002	0.015	0.004		
5	ETH3 H_exp = 0.747097 PIC = 0.706693 DI = 0.25253 PD = 0.74747 CDI = 0.001288 CPD = 0.999112	Allele	BLANK	18	21	22	23	24	25	26	27	28			
		Count	22	1	7	576	716	103	5	308	250	12			
		Frequency													

Breed Discrimination And Population Statistics의 Gene frequency에서는 약 10가지 통계량을 한반에 계산할 수 있다.

가) 이형접합도(heterozygosity)

집단의 다형성 정도를 측정하기 위한 가장 기본적인 지수이며, 이형접합자(heterozygote)의 발현정도에 나타낸 값이다. 이는 조사대상 집단에서 실제로 관측되어지는 이형접합자 발현빈도인 관측이형접합도(observed heterozygote)와 대립유전자 빈도를 이용하여 집단에서 추정되는 기대이형접합도(expected heterozygote)로 구분된다.

$$\text{관측이형접합도}(obs-H) = (\text{이형접합자 관측수})/n$$

$$\left[\frac{2i-1}{k} - \frac{k-1}{2} \right]$$

기대이형접합도($\exp-H$) = (27)

U : 관측된 표본수,
P_i : 대립유전자 빈도

나) 다형정보력(PIC : polymorphism information content)

두 유전자좌간의 연관(linkage)을 검토하는 과정에서 나온 척도이다. 원래는 질병을 일으키는 우성대립유전자(dominant allele)를 가지고 있는 유전자와 그것과 연관된 공우성대립유전자(codominant allele)를 가지고 있는 유전자의 관계에서 연관연구에 대한 정보력을 측정하기 위해 제시된 값이다.

$$\text{다형정보력(PIC)} = 1 - \left(\sum_{i=1}^k P_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^k P_i)^2}{n} \right)$$

다) 식별지수(DI : Diserimination Index)와 개체식별력(PD : Power of Discrimination)

집단에서 임의로 선택된 두 사람이 같은 유전자형을 나타낼 확률에 바탕을 두고 있다. 식별지수는 형사소송의 경우 개인식별과정에서 각 용의자에 대해 서로 다른 사람인데도 같은 유전자형을 나타낼 확률인 짝확률(match probability)을 구하는 것과 같은 원리이며, 따라서 이런 확률값은 작을수록 이 유전자를 이용한 개인식별결과의 신뢰성을 높이는 것이 된다.

$$\text{식별지수(DI)} = \frac{\sum_{i=1}^k x_i^2}{n^2} = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{x_i}{n}}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k P_i^2$$

k : 조사대상 유전자좌에서 나타나는 유전자형의 개수, n : 전체 관측 표본
x₁, x₂, x₃,.....,x_k : 각 유전자형 범주당 관측수, P_i : 대립유전자 빈도

$$\text{개체식별력(PD)} = 1 - \text{식별지수(DI)}$$

또한 M개의 유전자좌로 구성된 검사체계에서는 유전자좌 간 독립성(independence) 가정에 의해 누적 식별지수(CDI)는 $\sum_{i=1}^M DI_i$ 로 계산되어지며, 누적개체식별력은 $1 - \prod_{i=1}^M (1 - DI_i)$ 로 계산되어 진다. 식별지수나 개체식별력은 형사소송의 경우에서 개인

식별을 적용하고자 할 때 검사체계를 구성할 유전자좌의 선택기준이 될 수 있다.

라) 평균부권배제력(MEC:mean excusion chance)

친자확인에서 친부가 아닌 사람을 얼마나 잘 배제할 수 있는가에 대한 부권배제력을 ‘모’와 ‘자’의 유전자형에 대해 모든 가능한 경우를 고려하여 계산한 값이 평균부권배제력이다.

$$\text{평균부권배제력(MEC)} = \sum_{i=1}^M P(P) + \sum_{i < j} (P) (P) (P) (P)$$

또한 M 개의 유전자좌로 구성된 검사체계에서는 누적평균부권배제력(CMEC)은 $1 - \prod_{i=1}^M (1 - MEC_i)$ 로 계산된다.

마) 유전자좌의 독립성 검정

집단의 유전적 특성으로 사전 연구에서 고려되어 질 수 있는 것이 대립유전자들간의 독립성 검정(independence test)이다. 대립유전자의 독립성 검정으로는 유전자좌내의 Hardy-Weinberg 검정과 유전자좌 간의 Linkage Equilibrium 검정이 있다. 이는 일반적인 적합도 검정법이나 정확검정법으로 검정될 수 있다.

⑥ Genotype frequency 화면

SAMPLE LIST	Genotype	Genotype Frequency																														
		Count	12,13	12,14	12,15	12,17	13,13	13,14	13,15	13,17	13,18	14,14	14,15	14,17	15,17	16,17	17,17	14,19	15,18	15,19	15,20	15,21	16,19	18,19	18,20	18,21	19,19	19,20	19,21	20,20	20,21	21,21
1 BM1824 H_obs(18/74) =0.243243 HardyWeinb.=26.11 df:14, X^2:23.68	Genotype Count	2	1	2	1	12	18	9	6	5	5	1	8	1	2	1																
	Frequency	0.03	0.01	0.03	0.01	0.16	0.24	0.12	0.08	0.07	0.07	0.01	0.11	0.01	0.03	0.01																
2 BM2113 H_obs(27/74) =0.364865 HardyWeinb.=12.9 df:14, X^2:23.68	Genotype Count	14	19	15	18	15	19	15	20	15	21	16	19	18	19	18	20	18	21	19	19	19	20	20	20	21	21	21	21	21		
	Frequency	0.03	0.01	0.04	0.03	0.04	0.01	0.04	0.01	0.05	0.04	0.07	0.16	0.03	0.14	0.30																
3 ETH10 H_obs(21/74) =0.283784 HardyWeinb.=23.11 df:12, X^2:21.03	Genotype Count	1	1	3	12	9	5	8	9	8	4	6	2	6																		
	Frequency	0.01	0.01	0.04	0.16	0.12	0.07	0.11	0.12	0.11	0.05	0.08	0.03	0.08																		
4 ETH225 H_obs(21/74) =0.283784 HardyWeinb.=3.37 df:13, X^2:22.36	Genotype Count	21	23	21	24	21	25	23	23	23	24	23	25	23	26	23	30	24	24	25	24	26	25	25	25	26	26	26	26			
	Frequency	0.01	0.01	0.01	0.16	0.14	0.27	0.11	0.01	0.04	0.07	0.03	0.07	0.05	0.01																	
5 ETH3 H_obs(14/74) =0.189189 HardyWeinb.=5.42 df:12, X^2:21.03	Genotype Count	2	11	2	10	4	6	2	9	7	2	3	6	10																		
	Frequency	0.03	0.15	0.03	0.14	0.05	0.08	0.03	0.12	0.09	0.03	0.04	0.08	0.14																		
6 INRA23 H_obs(16/74) =0.216216 HardyWeinb.=28.7 df:20, X^2:31.41	Genotype Count	16	17	16	18	16	20	16	21	16	24	17	18	17	20	17	21	17	23	18	20	18	21	18	24	20	20	20	21	21	24	21
	Frequency	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.04	0.03	0.01	0.05	0.01	0.03	0.14	0.11	0.07	0.24	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	0.01	0.07	
7 SPS115 H_obs(11/74) =0.148649 HardyWeinb.=7.76 df:16, X^2:26.3	Genotype Count	21	21	21	23	21	24	21	25	21	27	21	28	22	25	22	27	23	24	23	25	23	27	24	24	24	25	24	27	25	27	27
	Frequency	0.09	0.09	0.08	0.15	0.12	0.01	0.01	0.01	0.01	0.05	0.07	0.03	0.01	0.05	0.07	0.03	0.01	0.05	0.07	0.03	0.01	0.05	0.07	0.03	0.09	0.01	0.07	0.03	0.09	0.01	

Breed Discrimination And Population Statistics의 Genotype frequency에서는 약 3 가지 통계량을 한반에 계산할 수 있다. 집단별 특성을 파악하기 위한 분석을 지원한다. 이를 위해서 유전자형 빈도와 대립유전자 빈도를 계산하고 이를 이용하여 개인 식별을 위한 통계량등을 계산한다. 또한 개체식별력, 평균부권배제력의 누적통계량 값을 계산하게 된다. 또한 독립성 검정으로 유전자와 내 Hardy-Weinberg 검정을 실시하고 유전자와 간 Linkage Equilibrium 검정에 대한 분석을 실시한다.

바) 대립유전자와 유전자형 빈도의 계산

○ 대립유전자 빈도

집단에서 나타나는 대립유전자의 상대빈도를 이용하여 추정하는데, 이는 그 집단의 유전자형에 대한 관측을 이용하여 조사한다. 예를 들어 한 유전자좌에서 나타날 수 있는 대립유전자가 A_1, A_2 라고 할 때, 가능한 유전자형은 A_1A_1, A_1A_2, A_2A_2 이 된다. 이 때 각 유전자형의 발현확률을 각각 P_{11}, P_{12}, P_{22} 라고 할 때, Hardy-Weinberg 법칙을 가정하여 대립유전자 A_1 의 발생확률은 $P_1 = P_{11} + \frac{1}{2} P_{12}$ 로 구한다. 따라서 대립유전자 A_i 의 발생확률 P_i 는 다음 식과 같다.

$$P_i = P_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{j \neq i} P_{ij}$$

식별력 측정을 위한 통계량의 계산은 개인식별을 위한 통계량들은 집단의 다형성 정도를 측정하기 위한 것이며, 각 유전자좌에서의 대립유전자 빈도와 유전자형 빈도를 이용하여 계산되어진다. 개인식별을 위한 통계량들은 다음과 같다.

사. Hardy-Weinberg 검정

유전자좌 내의 독립성 검정인 Hardy-Weinberg 검정은 모든 세대에서 각 대립유전자 빈도가 같은가에 대한 것이다. 예를 들어 대립유전자 A, B를 가진 유전자좌가 있을 때 대립유전자 빈도와 독립성 가설에서 유전자형 빈도의 확률이 다음과 같이 계산되어진다.

$$\Pr(n_{AA}, n_{AB}, n_{BB} \mid n_A, n_B) = \frac{n! \binom{n}{n_A, n_B} p_A^{n_A} p_B^{n_B}}{n! p_A^{n_A} p_B^{n_B}}$$

일반적으로 나타내면 다음과 같다.

$$\Pr(\{n_g\} | \{n_a\}) = \frac{12! \prod_{i=1}^{12} \pi_i^{n_i} n_i!}{(2!)^6 \prod_{g=1}^6 n_g!}$$

그러나 정확검정 시 두 대립유전자를 가진 유전자좌에서 모든 가능한 유전자형 배열을 조사하는 것은 어려운 일이 아니지만, 많은 대립유전자를 가진 유전자좌들에서는 유전자형 배열을 모두 고려하는 것이 어려우므로, 이러한 경우에는 Permuting에 의한 임의표본을 이용하여 근사적인 정확검정을 수행한다.

⑧ Breed Discrimination And Population Statistics의 True to type Test

No	ID	Name	BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115	TGLA122	TGLA126	TGLA227	TGLA53	Breed Exclusion Rate	True to Type Assignment Rate												
438	000186306422	강원	13	17	19	21	19	22	23	23	26	20	20	23	24	21	29	17	17	19	20	30	31	0.14997064352211	85%		
439	000184993013	강원	17	18	21	21	18	19	23	23	26	27	21	21	23	24	29	43	17	21	19	20	31	32	0.20896988498739	79.1%	
440	000195384855	강원	14	14	20	20	14	19	23	23	26	26	19	19	-	-	24	30	17	18	14	14	33	33	0.27792097824256	72.21%	
441	000167158033	강원	13	18	14	21	18	19	23	26	23	27	20	21	21	24	30	43	17	17	12	20	24	31	0.20337260527654	79.66%	
442	000186306453	강원	14	17	19	20	14	19	23	26	23	26	20	21	21	25	25	29	17	17	15	26	27	33	0.19989654705602	80.01%	
443	000167158057	강원	13	13	19	20	14	22	23	23	23	27	16	18	18	24	24	25	25	17	17	14	19	20	27	0.19969790013071	80.03%
444	000167158093	강원	13	13	20	21	18	20	23	25	23	26	22	24	21	24	24	43	19	21	14	20	23	23	0.1976796637898	80.23%	
445	000167158107	강원	14	17	19	19	18	19	25	26	24	25	17	24	23	23	29	29	17	21	14	20	23	23	0.25120771544208	74.88%	
446	000167158064	강원	14	17	19	21	19	19	23	24	18	26	16	20	-	-	21	25	18	20	19	20	27	27	0.27224727529906	72.78%	
447	000167345785	강원	14	17	19	18	19	25	26	21	25	17	24	23	23	29	29	17	21	14	20	23	23	0.25568215312171	74.43%		
448	000165912347	강원	14	17	19	20	18	19	25	26	21	25	17	24	23	23	29	29	17	21	14	20	23	23	0.26086674320635	73.91%	
449	000165912316	강원	13	14	18	19	15	20	23	24	22	24	21	24	23	27	24	25	17	17	15	17	23	27	0.23798797381731	76.2%	
450	000185016117	강원	13	17	19	21	16	18	25	25	22	23	22	23	23	24	21	24	17	21	20	22	31	0.24795615361236	75.2%		
451	000174172213	강원	13	13	20	21	18	20	23	23	22	26	21	21	21	24	25	40	17	22	15	19	26	30	0.20252999236654	79.75%	
452	000165912361	강원	13	13	15	20	18	22	23	25	22	23	24	24	27	27	25	34	17	18	15	19	23	27	0.20667480037432	79.33%	
453	000167345778	강원	13	14	19	20	19	19	24	30	23	27	20	24	-	-	24	29	17	21	14	14	23	25	0.22779282569849	77.22%	
454	000167155421	강원	13	14	20	20	14	19	23	25	26	27	20	20	24	25	25	30	17	17	14	26	27	27	0.17794323151143	82.21%	
455	000194705910	강원	-	-	20	20	19	20	25	25	22	23	-	-	-	24	25	17	20	14	15	23	27	0.33340582439335	66.66%		
456	000186318524	강원	14	14	20	21	18	18	23	24	23	23	20	24	21	27	25	26	17	21	16	20	23	27	0.16574133925696	83.43%	

True to type Test는 한우의 진위 여부를 테스트하기 위한 것으로 검사를 위한 샘플을 선택한 후 “True to type”에서 한우 식별을 위한 한우 샘플을 식별하면 그 확률을 표시한다. 이때 True to typ에 발현 하지 않은 allele pattern이 발견되면 이것은 Cut of allele로써 붉은 색으로 표시 된다.

⑨ 주요 Program Source

○ Sample Table & Sample Search Table

```
$rt1 = sql_query("SELECT * FROM sample WHERE idx=$sample_idx");
$cr1 = sql_fetch_array($rt1);
    $ne = $cr1[idx];
    $pieces = explode(",", $cr1[locus]);

    echo "<TABLE WIDTH=100% border=0 cellpadding=1 cellspacing=1><T
R><TD ALIGN=left>";
    if($SEARCH){
        $pieces = array_values($pieces);
        $inputs = $search_text = $search_slt = "";
        echo "<FORM METHOD=POST ACTION=$PHP_SELF?SEARCH=$SEAR
CH&sample_idx=$sample_idx>";
        echo "<TABLE WIDTH=100% border=0 cellpadding=1 cellspacing=1 bgcolor=#CCCCCC><TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF><TD>Barcode<TD>sire<T
D>dam<TD>Name\n";
            echo "<TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF><TD><INPUT na
me=Barcode SIZE=8 VALUE='$Barcode'>";
            echo "<TD><INPUT name=Sire SIZE=8 VALUE='$Sire'><TD>
<INPUT name=Dam SIZE=8 VALUE='$Dam'><TD><INPUT name=Region SIZE
=6 VALUE='$Region'>";
            echo "</TABLE><TABLE WIDTH=100% border=0 cellpadding=1
cellspacing=1 bgcolor=#CCCCCC>\n";
            echo "<TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF>";

            if($Barcode){ $search_text .="&Barcode=$Barcode"; $search_slt.="
AND barcode like '%$Barcode%';}
            if($Region ){ $search_text .="&Region =$Region" ; $search_slt.="
AND region ='$Region';}
```

```

        if($Sire ) { $search_text .="&Sire   =$Sire"   ; $search_slt.="
AND sire   ='$Sire";}
        if($Dam ) { $search_text .="&Dam   =$Dam"     ; $search_sl
t.=" AND dam   ='$Dam";}

        for($j=0;$j<count($pieces)-1;$j++){
            echo "<TD>".$pieces[$j];
            $v1 = "$pieces[$j]_1";
            $v2 = "$pieces[$j]_2";
            $inputs .= "<TD><INPUT name=$v1 SIZE=4 VALUE='
".$v1."><INPUT name=$v2 SIZE=4 VALUE='".$v2.">\n";
            if($v1){ $search_text .="&".$v1."=".$v1; $search_slt.="
AND $v1='".$v1."'";}
            if($v2){ $search_text .="&".$v2."=".$v2; $search_slt.="
AND $v2='".$v2."'";}
            if(($j+1)%10==0) {
                echo "<TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF>
$inputs";

                echo "</TABLE>";
                echo "<TABLE border=0 cellpadding=1 cellspaci
ng=1 bgcolor=#CCCCCC><TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF>";
                $inputs="";
            }
            $SCALE = 14;
        }
        echo "<TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF>".$inputs;
        echo "</TABLE>\n";
        echo "<INPUT type=submit value='   Search   '>";
        echo "</FORM>";

    }
    echo "</TABLE>";

    echo "<CENTER><TABLE WIDTH=100% border=0 cellpadding=1 cellspa

```

```

cing=1 bgcolor=#CCCCCC><TR align=center BGCOLOR=#aaaaaa HEIGHT=33><T
D>No<TD>Barcode<TD>sire<TD>dam<TD>Name";
    for($j=0;$j<count($pieces)-1;$j++) echo "<TD colspan=2>".$pieces[$j];

    $rt2 = sql_query("SELECT count(*) AS ct FROM table_$$sample_idx WHERE
1 $search_sl");
    $cr2 = sql_fetch_array($rt2);
    $count_list = $cr2[ct];

    $rt2 = sql_query("SELECT * FROM table_$$sample_idx WHERE 1 $search_sl
t LIMIT ".$($PAGE*$SCALE).",$SCALE");

    while($cr2 = sql_fetch_array($rt2)){
        $i++;
        echo "<TR align=center BGCOLOR=#FFFFFF HEIGHT=25><T
D>".$($PAGE*$SCALE+$i)."<TD>$cr2[barcode]<TD>$cr2[sire]<TD>$cr2[dam]<T
D>$cr2[region]";
        for($j=0;$j<count($pieces)-1;$j++) {
            $col = $pieces[$j];
            echo "<TD width=22>"; echo ($cr2[$col.'_1'])? $cr2[$co
l.'_1']:"&nbsp;";
            echo "<TD width=22>"; echo ($cr2[$col.'_2'])? $cr2[$co
l.'_2']:"&nbsp;";
        }
        flush();
    }
    echo "</TABLE>";

```

○ Breed Discrimination And Population Statistics 9] Genotype frequency

```

for($i=0;$i<count($pieces)-1;$i++){
    $keys = array_keys(${$pieces[$i]});
    sort ($keys);
    $value = array_keys(${$pieces[$i]});

```

```

        echo "<TABLE border=0 cellpadding=1 cellspacing=1 style='table
-layout:fixed;'>";
        echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF
FF ><TD WIDTH=22 ROWSPAN=4 >".($i+1)."<TD WIDTH=99 ROWSPAN=4 >
<B>$pieces[$i]</B><BR>H_obs(";
        echo $A[hobs_ho][($pieces[$i])]."/".($A[hobs_ho][($pieces[$i])] +
$A[hobs_he][($pieces[$i])])."=";
        echo round(($A[hobs_ho][($pieces[$i])]/($A[hobs_ho][($pieces[$
i])]+$A[hobs_he][($pieces[$i]))]),6);

        $temp0 = $temp1 = $temp2 = $temp3 = "";
        for($hw=$j=0;$j<count($keys);$j++){
            $v3 = ${$pieces[$i]}[($keys[$j])];
            $temp0 .= "<TD WIDTH=33 >";
            $temp0 .= ($keys[$j]!="0,0")? "$keys[$j]":"<FONT COL
OR=RED>BLANK";
            $temp1 .= "<TD>".number_format($v3);

            $mm = explode(",", $keys[$j]);
            $m1 = $B[($pieces[$i])][($mm[0])];
            $m2 = $B[($pieces[$i])][($mm[1])];

            if($mm[0]==$mm[1]) {
                $e = pow($m1/($count_list*2),2) * $count_list; /
/$e 기대값, $count_list 개체수
            } else {
                $e = 2 * ($m1/($count_list*2)) * ($m2/($count_l
ist*2)) * $count_list; ;
            }

            $hw += pow($v3-$e,2)/$e;

            $temp2 .= "<TD>".number_format($v3/($count_list),2,'!'
');

```

```

        $temp3 .= "<TD VALIGN=BOTTOM HEIGHT=33><TABLE WIDTH=99% VALIGN=BOTTOM HEIGHT=100% border=0 cellpadding=0 cellspacing=0 ><TR><TD HEIGHT=".(100-(int)($v3/($count_list*2)*300))."%><TR><TD HEIGHT=".(int)($v3/($count_list*2)*300)."% BGCOLOR=GREEN></TABLE>\n";
    }
    echo "<BR>HardyWeinb.=" .round($hw,4);
    echo "<BR>df:".--$j;
    echo ", X ^ 2:".round($CHI[$j],2);

    echo "<TD WIDTH=60 BGCOLOR=#bbbbff>Genotype $temp0";
    echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF FF><TD WIDTH=60 BGCOLOR=#bbbbff>Count $temp1";

    echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF FF><TD WIDTH=60 ROWSPAN=2 BGCOLOR=#bbbbff>Frequency $temp3";
    echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF FF> $temp2</TABLE>";

}

```

○ Breed Discrimination And Population Statistics의 Gene frequency

```

$di = $mec = 1;
for($i=0;$i<count($pieces)-1;$i++){
    $keys = array_keys(${$pieces[$i]});
    sort ($keys);
    $value = array_keys(${$pieces[$i]});
    $pi = $pic = $mec1 = $mec2 = 0;
    echo "<TABLE border=0 cellpadding=1 cellspacing=1 style='table
-layout:fixed;'>";
    $temp0 = $temp1 = $temp2 = $temp3 = "";
    for($j=0;$j<count($keys);$j++){
        $v3 = ${$pieces[$i]}[($keys[$j])];
    }
}

```

```

$stemp0 .= "<TD WIDTH=55 >";
$stemp0 .= ($keys[$j])? "$keys[$j]":"<FONT COLOR=RED>BLANK";

$stemp1 .= "<TD>".number_format($v3);
$stemp2 .= "<TD>".number_format($v3/($count_list*2),3,'.
');

$stemp3 .= "<TD VALIGN=BOTTOM HEIGHT=33><TABLE WIDTH=99% VALIGN=BOTTOM HEIGHT=100% border=0 cellpadding=0 cellspacing=0 ><TR><TD HEIGHT=".(100-(int)($v3/($count_list*2)*100))."%><TR><TD HEIGHT=".(int)($v3/($count_list*2)*100)."% BGCOLOR=GREEN></TABLE>\n";

$spi += pow($v3/($count_list*2),2);

$mec1 += ($v3/($count_list*2)) * pow((1-$v3/($count_list*2)),2);

if($j<count($keys)-1){
    $v4 = ${pieces[$i]}[($keys[$j+1])];
    $mec2 += pow( ($v3/($count_list*2)) * ($v4/($count_list*2)) ,2) *
        ( 3 * ($v3/($count_list*2)) + 3 * ($v4/($count_list*2)) - 4 );
}

if($j<count($keys)-1) {
    for($k=$j+1;$k<count($keys);$k++) {
        $v4 = ${pieces[$i]}[($keys[$k])];
        $pic += 2 * pow($v3/($count_list*2),2)
* pow($v4/($count_list*2),2);
    }
}
}

```



```

$hexp = (2*$count_list*(1-$pi))/(2*$count_list-1);
echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF
FF><TD WIDTH=22 ROWSPAN=4>."($i+1)."<TD WIDTH=111 ROWSPAN=4>
<B>$pieces[$i]</B><BR></CENTER>";
//echo "(n:$count_list,k:$j,ΣPi:".round($pi,2).",ΣΣ2PiPj:".round($pi
c,6).")<BR>";

echo "<TABLE WIDTH=90% border=0 cellpadding=0 cellspacing
=0 ALIGN=CENTER>";
echo "<TR><TD>H_exp<TD>=<TD>".round($hexp,6);
echo "<TR><TD>PIC<TD>=<TD>".round((1-$pi-$pic),6);
echo "<TR><TD>DI<TD>=<TD>".round(((1-$pi-(1/$count_list))/
(1-1/$count_list)),6);
echo "<TR><TD>PD<TD>=<TD>".round(1-((1-$pi-(1/$count_lis
t))/(1-1/$count_list)),6);
$di *= ((1-$pi-(1/$count_list))/(1-1/$count_list));
echo "<TR><TD>CDI<TD>=<TD>".round($di,6);
echo "<TR><TD>CPD<TD>=<TD>".round(1-$di,6);
$mec *= (1-$mec1 + $mec2);
echo "<TR><TD>MEC<TD>=<TD>".round($mec1+$mec2,6);
echo "<TR><TD>CMEC<TD>=<TD>".round(1-$mec,6);
echo "</TABLE>";

echo "<TD WIDTH=60 BGCOLOR=#bbbbff>Allele $temp0";
echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF
FF><TD WIDTH=60 BGCOLOR=#bbbbff>Count $temp1";
echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF
FF><TD WIDTH=60 BGCOLOR=#bbbbff ROWSPAN=2>Frequency $temp3";
echo "<TR VALIGN=MIDDLE ALIGN=CENTER bgcolor=#FFFF
FF>$temp2</TABLE>";

}

```

○ Breed Discrimination And Population Statistics의 True to type Test

```

echo "<CENTER><TABLE WIDTH=100% border=0 cellpadding=1 cellspacing=1 bgcolor=#CCCCCC><TR align=center BGCOLOR=#aaaaaa HEIGHT=33><TD>No<TD>ID<BR>R>Sire<BR>Dam<TD>Name";
for($j=0;$j<count($pieces)-1;$j++) echo "<TD colspan=2>".$pieces[$j];
echo "<TD>Breed Exclusion Rate<TD>True to Type Assignment Rate";

$rt2 = sql_query("SELECT count(*) AS ct FROM table_$$sample_idx WHERE 1 $search_slt");
$cr2 = sql_fetch_array($rt2);
$count_list = $cr2[ct];

$rt2 = sql_query("SELECT * FROM table_$$sample_idx WHERE 1 $search_slt LIMIT ".$PAGE*$SCALE).",$SCALE");

while($cr2 = sql_fetch_array($rt2)){
    $i++;
    $count = $score1 = $score2 = 0;
    $er = 1;
    echo "\n<TR align=center valign=middle BGCOLOR=#FFFFFF HEIGHT=25><TD>".($PAGE*$SCALE+$i)."<TD>$cr2[barcode]<TD>$cr2[region]";
    for($j=0;$j<count($pieces)-1;$j++) {
        $col = $pieces[$j];
        $count++;

        echo "<TD width=22>" ;
        if($cr2[$col.'_1']) {
            echo $cr2[$col.'_1'];
            $er *= 1 - ( $B[$col][($cr2[$col.'_1'])] / ($count_list
* 2) );

        } else echo "-";

        echo "<TD width=22>" ;
        if($cr2[$col.'_2']) {

```

```

        echo $scr2[$col.'_2'];
        $ser *= 1 - ( $B[$col][($scr2[$col.'_2'])] / ($count_list
* 2) );
        } else echo "-";

    }
    echo "<TD>".$ser;
    echo "<TD>".round((1-$ser)*100,2)."%";

    flush();
}
echo "</TABLE><BR>\n<FONT SIZE=2>";

```

< 제 1 협동과제 : DNA 분석기기 및 유전자형에 따른 표준화 시스템 개발 및 생산이력 시스템 모니터링 >

1. 생산 유통 모형별 시료 확보 및 개체식별 시스템 적용 기술 개발

1) 생산단계에서의 시료 확보 및 분석결과

완전한 쇠고기 생산 이력추적 시스템의 구축을 위해서는 생산단계부터 이력정보를 구축하여야 하며 DNA 동일성여부의 확인을 시료 채취가 필요하다. 본 과제에서는 적합한 생산단계에서의 DNA 동일성 검사용 시료채취 방법을 개발하기 위해 이표를 부착할 때 조직의 일부를 함께 채취할 수 있는 Biopsy Tag를 포함한 여러 가지 방법에 대하여 비용, 취급의 용이성, 유전정보 분석의 정확성 및 시료보관의 용이성 등에 대한 조사를 실시하였다.

① 시료채취

시료채취는 축산연구소 축산자원개발부의 협조를 받아 젓소 10두 각각에 대하여 표 1과 같이 5가지의 방법으로 실시하였다. 모근채취는 꼬리에서 약 3개 이상의 털을 모근이 부착된 상태로 채취하였으며, 표피세포는 접착식부직포를 이용하여 콧등부분의 표피세포를 채취하였다. 사람의 경우 구강세포 및 타액에서의 DNA 추출은 멸균된 면봉을 주로 이용하는데 같은 방법으로 소의 타액을 채취하였다. 조직은 이표부착을 하면서 조직을 동시에 채취할 수 있는 Biopsy Taq(이표, TypiFix, Germany)를 이용하여 채취하였다. 마지막으로 혈액은 의료용 란셋과 paper를 이용하여 소의 콧등부분에서 미량 채취하여 사용하였다.

② DNA 추출

상기 방법에 따라 채취된 각 시료에서의 DNA 추출은 비용 및 시간을 고려하여 채취방법에 적합한 몇 가지 방법으로 실시하였다. 먼저 모근 및 표피세포 시료는

Chelex와 Proteinase K를 처리하여 DNA를 추출 하였으며, 구강상피세포 시료는 SDS법을 사용하여 DNA를 추출하여 이용하였다. Biopsy Tag으로부터의 DNA 추출은 제품공급사에서 제공되는 Kit(Agrobiogene사, Germany)를 이용하였으며, 마지막으로 paper를 이용하여 채취된 혈흔은 직경 1mm의 천공기를 이용하여 paper disc 4-5개를 얻은 후 특수용액을 이용하는 방법으로 DNA를 추출하였다.

③ 시료채취의 장단점 비교

생산단계에서의 DNA 동일성 검사를 위한 시료채취의 경우 정확성, 경제성, 신속성등이 요구되는데 시료채취 과정이 소에게 스트레스를 가하지 않는 쉬운 과정이어야 하며, 저가의 도구를 이용해야한다는 점과 안전하고 정확하게 유전물질 즉, DNA를 저비용으로 빠르게 추출해 낼 수 있어야 한다. 나아가 생산부터 소비까지 이력추적 기간 동안 언제든지 보존되어 있는 원 시료를 이용하여 동일성 여부를 검증할 수 있도록 장기 보관이 가능하여야 한다. 이러한 측면에서 각 채취방법에 따른 장단점을 비교하였으며 그 결과는 표 16과 같다.

가) 모근

모근 채취의 경우 시료채취와 채취된 시료로부터의 DNA를 추출하는 과정은 매우 용이하여 경제적긴 하지만 적당한 보관방법이 없기 때문에 채취 후 매우 빠르게 DNA가 손상되어 장기 보존이 어렵기 때문에 추후 원 시료를 다시 검증할 필요가 있을 경우 검증작업이 실패할 수 있는 심각한 문제점을 갖고 있다.

나) 표피세포 및 타액

사람의 경우에는 쉽게 표피세포 및 타액 시료를 채취 할 수 있고 채취된 시료로부터 DNA를 추출해 낼 수 있으나, 소의 경우에는 채취 시 소의 움직임으로 인하여 채취가 용이하지 않았으며 여러 경로에 의한 오염의 가능성이 크기 때문에 적절한 채취방법은 아닌 것으로 판단된다.

다) 이각을 이용한 방법

Biopsy Tag의 경우, 시료채취와 동시에 이표 관리 번호를 부여할 수 있다는 장점을 가지고 있지만 독일 회사에서 특허권을 가지고 있어 수입에 의존할 수밖에 없고

유사한 제품 제작이 어려우며 고가라는 점에서 경제성이 크게 떨어진다. 또한 DNA 추출을 하기 위해서는 마찬가지로 고가의 Kit를 사용해야 하며 DNA 추출을 위해 채취된 모든 조직을 사용하여야 하므로 차후 재검증을 위한 시료 보관이 불가능하다는 단점을 가지고 있다.

라) 혈액

혈액을 이용한 DNA 동일성 검사는 다른 시료로부터 추출한 DNA를 이용하는 경우보다 정확도가 높지만 채취가 어렵다는 단점이 있었다. 이점을 보완하기 위하여 일반적으로 소로부터 혈액을 채취하는 방법인 주사기를 이용한 대량의 혈액채취 방법이 아닌 의료용 랜셋과 paper를 이용하여 극미량의 혈액을 소의 콧잔등에서 채취하는 방법을 사용하였으며 비교적 용이하게 채취를 할 수 있다. 또한 인체에 사용하는 일회용 의료용 랜셋을 사용하므로 교차 오염에 대한 위험이 없으며 소에게도 스트레스로 작용하진 않는다. DNA 추출 또한 매우 간단한 시약만으로 신속하게 추출할 수 있으며, 무엇보다도 건조된 상태로 장시간 시료의 보관이 용이하다는 장점이 있다.



<모근채취>



<일회용 난셋 및 FTA paper>



<표피세포 채취>



<타액 및 구강세포 채취>

Fig 10. 채취 부위 및 방법을 달리하여 시료를 채취하는 모습

④ DNA 추출 결과 비교

여러 방법에 따라 채취된 시료로부터 DNA 추출한 결과는 표 14 및 15와 같다. Biopsy Tag을 이용하여 채취된 조직으로부터 가장 많은 양의 DNA가 추출되었으며 표피세포, 모근, 타액 그리고 혈액 순으로 나타났는데 혈액의 경우 건조된 혈액이 묻어있는 paper disc에서 직접 DNA를 추출하였으므로 다른 방법으로 채취한 시료보다 DNA 추출에 사용된 시료의 양이 적어 가장 적은 양의 DNA 양이 추출되었다. 그러나 동일성 검사의 결과에 큰 영향을 미치는 순도의 경우 표피세포와 타액에서의 추출한 DNA의 경우 일정하지 않은 반면 모근, 조직, 혈액에서는 비교적 균일한 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 DNA 동일성 검사 시 필요한 적정 DNA 농도는 1-100 ng/ul정도이며, 1-5ng/ul의 최소농도에서도 충분하게 각 마커의 대립유전자 증폭됨(reference? 또는 profiling 그림삽입)을 고려할 때 조직, 모근 및 혈액으로부터 추출한 DNA는 동일성 검사를 위한 시료 채취 방법으로 적합한 것으로 사료된다. 그러나 위에서 언급된 것처럼 모근과 조직의 경우에는 차후 검증용 시료의 장기보관이 불가능하며 경제성에 있어서도 조직을 채취하는 데 이용되는 Biopsy Tag의 가격이 비싸다는 큰 문제점을 갖고 있기 때문에, 시료채취방법으로 혈액을 이용한 방법이 가장 적합한 것으로 사료된다(표 3).

Table 14. 샘플 채취 방법 및 DNA 추출 결과

방법	채취방법	도구	final vol.	평균 농도(ng/ul)	총농도
1	모근	꼬리털	60ul	8.77	522
2	표피세포	접착식부직포	300ul	12.86	3,853
3	타액	면봉	120ul	5.36	643
4	조직	이표	60ul	92.55	5,550
5	혈액	의료용 란셋 및 paper	disk 4ea	4.08	82

Table 15. 추출된 DNA의 분석 결과

개체	모근		부직포		면봉		이표		FTA Paper	
	ng/ul	260/280	ng/ul	260/280	ng/ul	260/280	ng/ul	260/280	ng/ul	260/280
04150	6.8	1.66	7.5	1.01	8.1	1.79	104.1	1.6	3.2	1.8
05027	6.1	1.89	27.4	1.53	16.5	1.94	102.7	1.6	2.5	1.5
04189	12.6	1.62	4.3	2.04	0	0	86.7	1.53	4.1	1.92
04171	9.6	1.68	15.9	1.58	4.1	1.44	113.3	1.57	5	1.56
04182	7.7	1.5	23.8	1.41	8.1	2.12	82.5	1.59	2.9	1.99
04131	10	1.62	7.6	1.38	0.7	13.97	88.7	1.58	3.8	1.89
04103	18.9	1.72	20.7	1.57	3.1	1.93	69.9	1.55	4.3	1.76
05029	5.6	2.08	6.7	1.61	0.2	0.33			6.5	1.55
05001	4	1.65	6.5	1.57	9.4	1.71			2.9	2.51
05044	6.4	1.7	8.2	1.49	3.4	1.91			5.6	1.61

Table 16. 각 채취방법에 따른 장단점 비교

채취방법	장점 및 단점				
	이력정보	경제성	추출 용이성	분석 정확도	샘플보관
모근	++	+++	+++	+	+
표피세포	++	+++	+++	+	+
타액	++	+	++	+	+
조직	++	-	++	+++	-
혈액	++	++	+++	+++	+++

2) 유통 및 소비 단계에서의 시료확보

① 유통 단계에서의 시료 확보 및 DNA 분석(동일성 검사)

도축 전 생산단계에서 혈액시료를 확보하여 DNA를 확보하여 MS 유전자 좌위를 분석하여 D/B화 하였다. 판매장에서 판매되고 있는 고기시료와 정보를 수집하여 생산단계의 유전정보와 동일성 검정을 실시하였다.

Table 17. 동일성검정을 위해 수집된 시료의 정보

바코드정보	도축정보	시료정보	분석ID
175429279	생산단계시료	혈액	P0702001
175429262	생산단계시료	혈액	P0702002
175429286	생산단계시료	혈액	P0702003
169422521	생산단계시료	혈액	P0702004
175429255	생산단계시료	혈액	P0702005
175429279	B1+	사태	S0703001
175429262	B1+	사태	S0703002
175429286	C1+	사태	S0703003
169422521	C1	사태	S0703004
175429255	C1+	사태	S0703005
175429279	B1+	안창	S0703006
175429262	B1+	안창	S0703007
175429286	C1+	안창	S0703008
171978795	C1	안창	S0703009
168088193	C1+	안창	S0703010

동일성 검정을 위해 판매장에서 판매가 되고 있는 5개체의 생육을 대상으로 각각 2개의 부위에서 시료를 부착된 바코드 정보와 함께 수집을 하였다. 판매장에서 수집해온 시료는 바코드정보에 따라 생산단계에서 얻은 유전정보와 유전정보의 동일성을 검정하였다. 분석결과 5개체에서 수집된 총 10개의 판매장 시료중 생산단계에서 얻은 유전정보와 일치하는 것은 총 6개이며 일치하지 않는 것은 4개로 나타났다.

Table 18. 동일성 검정 유전자 분석정보 및 판정결과

바코드정보	분석ID	M1		M2		M3		M4		M5		M6		M7		M8		M9		M10		판정결과
170424279	P0702001	295	295	222	224	147	155	88	98	183	185	131	131	141	145	221	221	147	155	151	151	생산단계
170424279	S0703001	295	295	222	224	147	155	88	98	183	185	131	131	141	145	221	221	147	155	151	151	일치
170424279	S0703006	295	295	222	224	147	155	88	98	183	185	131	131	141	145	221	221	147	155	151	151	일치
175429262	P0702002	295	295	222	228	143	145	96	96	183	183	141	143	123	123	241	243	131	131	151	153	생산단계
175429262	S0703002	291	291	222	222	137	137	96	98	181	183	183	183	121	123	221	221	131	155	155	155	불일치
175429262	S0703007	291	291	222	222	137	137	96	98	181	183	183	183	121	123	221	221	131	155	155	155	불일치
175429286	P0702003	291	299	222	224	147	153	88	88	172	172	181	183	143	143	253	255	161	163	151	155	생산단계
175429286	S0703003	291	299	222	224	147	153	88	88	172	172	181	183	143	143	253	255	161	163	151	155	일치
175429286	S0703008	291	299	222	224	147	153	88	88	172	172	181	183	143	143	253	255	161	163	151	155	일치
171978795	P0702004	291	295	222	228	137	153	88	98	187	191	181	181	141	141	221	225	155	155	153	155	생산단계
171978795	S0703004	291	295	222	228	137	153	88	98	187	191	181	181	141	141	221	225	155	155	153	155	일치
171978795	S0703009	291	295	222	228	137	153	88	98	187	191	181	181	141	141	221	225	155	155	153	155	일치
168088193	P0702005	291	291	222	222	137	137	96	98	181	183	183	183	121	123	221	221	131	155	155	155	생산단계
168088193	S0703005	295	295	222	228	143	145	96	96	183	183	141	143	123	123	241	243	131	131	151	153	불일치
168088193	S0703010	295	295	222	228	143	145	96	96	183	183	141	143	123	123	241	243	131	131	151	153	불일치

4개의 시료에서 불일치 판정이 나와 판매장에서 수집해온 바코드 정보를 무시하고 유전자분석을 통해 얻어진 유전정보만을 활용하여 생산단계 시료에서 얻은 유전정보 D/B에서 동일한 정보를 갖고 있는 개체를 추적한 결과 일치하는 개체가 있음을 확인 하였다.

모든 시료들의 유전정보는 생산단계에서 얻은 D/B에 일치하는 개체가 있었으며 단지 유통과정에서 바코드 정보가 서로 뒤바뀐 것으로 판명되었다. 유통단계에서 실수로 인해 바코드정보가 바뀔수 있으며 이는 생산단계의 유전정보 D/B가 구축되어 있을 경우 오류를 바로 잡을 수 있음을 확인하였다.

Table 19. 생산단계유전정보 D/B를 이용한 개체추적분석 및 오류수정 결과.

의뢰정보			개체추적분석결과		
분석ID	바코드정보	시료정보	바코드	판정	비고
S0703001	175429279	사태	175429279	일치	-
S0703002	175429262	사태	168088193	일치	바코드정보오류수정
S0703003	175429286	사태	175429286	일치	-
S0703004	171978795	사태	171978795	일치	-
S0703005	168088193	사태	175429262	일치	바코드정보오류수정
S0703006	175429279	안창	175429279	일치	-
S0703007	175429262	안창	168088193	일치	바코드정보오류수정
S0703008	175429286	안창	175429286	일치	-
S0703009	171978795	안창	171978795	일치	-
S0703010	168088193	안창	175429262	일치	바코드정보오류수정

3) 소비단계에서의 조리방법에 따른 DNA 비교 분석실험(등판에서 자료 빼내겠음)

○ 실험 방법

동일한 시료(개체식별번호:000193717419)를 확보하여 중량 0.1g으로 세분하여 시료의 양념상태별 DNA와 양념상태별 조리된 시료로 구분한 후에 3일 동안 상온에서 보관(썩힌 시료는 상온에서 7일 보관)하여 DNA 추출, 농도측정 및 증폭을 통하여 DNA 유전자 분석하였다.

○ 실험결과

완전 탄화된 시료와 완전 썩은 시료는 DNA검사가 불가능하며, 상온에서 7일정도 보관한 시료는 곰팡이가 피어 원시료 보다 많은 양의 DNA가 추출되었으나 오염물질의 혼합으로 인한 결과라 할수 있다. 하지만사용 마커가 소의 특이성마커이기 때문에 분석에는 영향을 미치지 않는다. 또한 식초나 콜라에 숙성시켜 조리된 시료에서 추출된 DNA는 생고기 시료에 비해 적은양의 DNA가 추출되었으나 분석은 가능하고, 삶은 고기와 갈비탕 등에서도 분석이 가능하여 DNA분석이 유효했으며 추출된 DNA량과 allele height의 상관관계는 높지 않다.

Table 20. 조리방법별로 분류된 시료 및 추출된 DNA량

시료번호	조리방법별로 구분된 시료	추출된DNA양(ng/ul)	추출된DNA총량(ng)
1	생고기시료(검사용시료)	16.74	1,423
2	간장조림시료	12.10	1,029
3	고추장조림시료	19.82	1,685
4	10%식초에 3일 숙성	1.83	156
5	10%콜라에 3일 숙성	5.74	488
6	10%청하에 3일 숙성	25.23	2,145
7	10%소주에 3일 숙성	23.28	1,979
8	일반적인 구이	19.35	1,645
9	건조된 시료(보관용시료)	10.66	906
10	상온에서 7일 동안 썩힌시료	96.51	8,203
11	완전 탄화된 시료	5.18	440
12	삶은 시료	37.68	3,203
2-1	간장조림 후 구이	34.40	2,924
3-1	고추장조림 후 구이	22.33	1,898
4-1	10%식초조림 후 구이	15.95	1,356
5-1	10%콜라조림 후 구이	18.11	1,593
6-1	10%청하조림 후 구이	31.84	2,706
7-1	10%소주조림 후 구이	5.33	453

○ 추출된 DNA량과 allele height의 비교

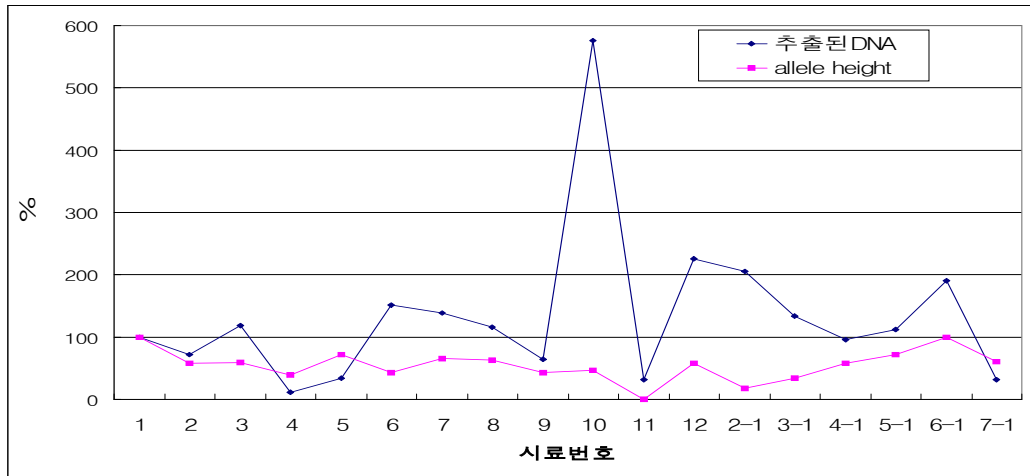


Fig 11. 시료마다의 추출된 DNA와 allele height 분석 결과

2. 분석 기관 및 기기별 표준화 comparison test 실시

1) 분석 기관별 분석 표준 설정 및 comparison test

① Microsatellites 분석기관

본 비교실험에는 축산과학원 본원과, 축산과학원 가축유전자원시험장 그리고 축산물등급판정소가 참여하였다. 세 개의 기관은 모두 동일한 자동 전기영동 장치인 ABI Genetic Analyzer 3130xl을 보유하고 있고, microsatellite 분석을 통한 유전자 감식에 대한 높은 기술력을 보유하고 있기 때문에 분석기관에 따른 profiling값을 비교하고자 하였다. .

② 분석 시료 및 microsatellites 마커

분석기관에 따른 profiling 결과를 비교하기위한 DNA 시료는 한경대학교로부터 분양받았으며, 총 96 샘플을 표 1중 TGLA227, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH225, BM18249등 9개의 microsatellite 마커 프라이머를 이용하여 증폭하였다. PCR 증폭조건은 기기분석 조건과 동일 하였다.

③ 증폭산물의 profiling

증폭된 산물은 80배 증류수로 희석하여 세 개의 기관에서 동일하게 희석된 증폭산물 1ul 와 Standard size standard GeneScan LIZ500 및 Hi-Di Formade(AppliedBiosystems, USA)혼합물을 1:9로 희석하여 profiling을 실시하였다.

4) 비교 결과

동일한 시료에 대한 동일한 증폭산물은 세 개의 기관에서 각 마커별로 약 $\pm 0.5bp$ 정도의 차이를 나타냈으나, 전체적으로 모든 기관에서 증폭산물의 크기가 거의 동일하게 나타났다(Fig. 12).

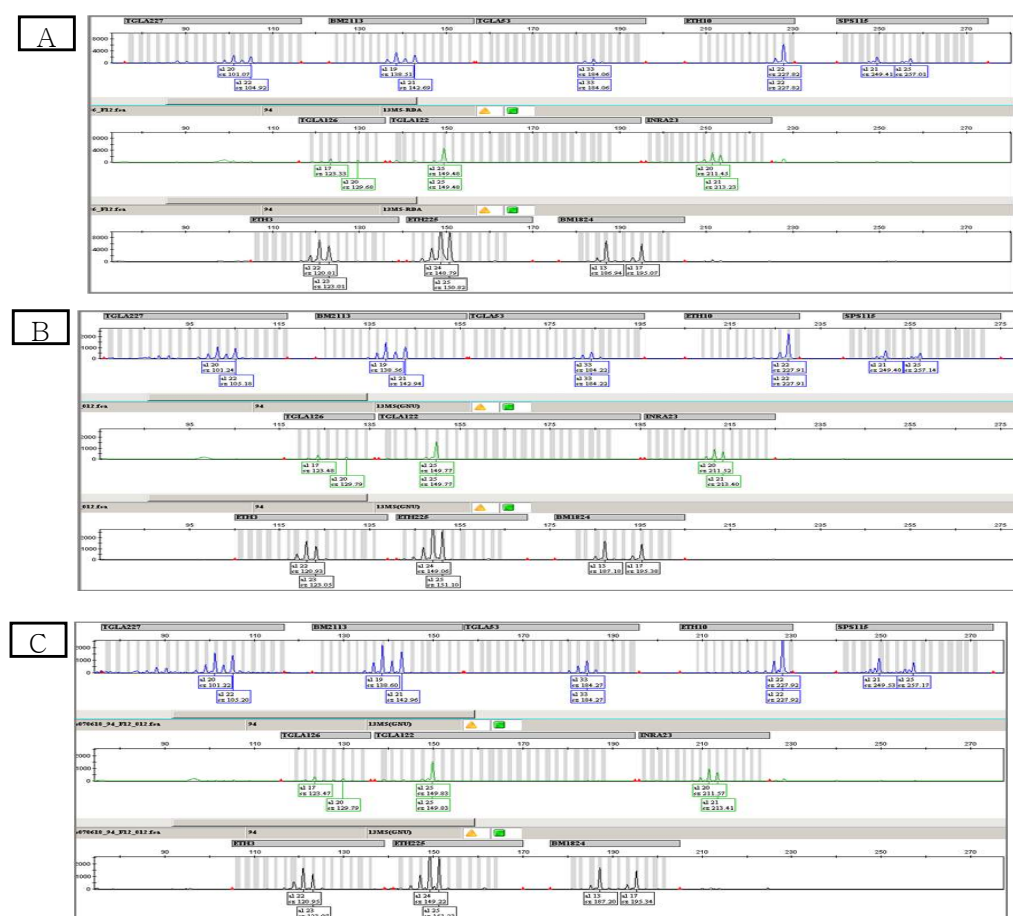


Fig 12. 세 기관의 동일 기종으로 하나의 DNA 시료를 분석한 결과.
 A : 축산과학원 본원, B : 축산과학원 가축유전자원시험장, C : 축산물등급판정소

2) 분석기기별 data 관독에 대한 Comparison Test

DNA 동일성 검증을 포함하는 쇠고기 개체 이력추적시스템을 완전하게 실시하기 위해서는 각 기관, 지역별로 표준화된 data의 도출이 필연적이다. 표준화된 정보를 만들어내기 위해서는 많은 부분에서 통일된 작업이 필요하지만, 우선적으로 각 분석 기기에 따른 최종 data의 오차를 보정하는 작업이 선행되어야 한다.

① 1차 비교

가) 분석기기

본 연구에서는 1차적으로 가장 범용으로 보급되고 사용되어지고 있는 Applied Biosystems사와 Amersham Bioscience사의 자동 염기서열 분석장치인 ABI 3100, ABI 3100 Avant와 MagaBACE간의 차이를 비교하여 향후 표준화작업을 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

나) 분석 시료 확보 및 Microsatellites 마커 선정

표준화 작업을 위한 한우 DNA 시료는 축산물등급판정소로부터 분양을 받았으며, 분석에 필요한 마커는 시범시행되고 있는 쇠고기이력추적시스템에 적용되고 있는 11개의 마커를 이용하였다(Table 20).

Table 19. 쇠고기이력 추적시스템의 DNA 시료.

브랜드	DNA 시료수	Concentration(ng/ul)
팔공상강	10	5ng/ul, 10ul
양평개군	10	5ng/ul, 10ul
안성마춤	10	5ng/ul, 10ul
황성	10	5ng/ul, 10ul
장수	10	5ng/ul, 10ul
섬진강뜨레	10	5ng/ul, 10ul
남해화전	10	5ng/ul, 10ul
하동솔잎	10	5ng/ul, 10ul
대관령	10	5ng/ul, 10ul
총 계	90	

Table 20. Information of Microsatellites

MS name	Ch#	Dye Label	Size range(bp)	Annealing temp	Source
TGLA227	18	B(FAM)	76 ~ 104(bp)	56°C	UniSTS:250914
BM2113	2	B(FAM)	123 ~ 143(bp)	58°C	UniSTS:250697
TGLA53	16	B(FAM)	154 ~ 188(bp)	60°C	UniSTS:250986
ETH10	5	B(FAM)	212 ~ 224(bp)	58°C	UniSTS:250848
SPS115	15	B(FAM)	246 ~ 260(bp)	58°C	UniSTS:279634
TGLA126	20	G(VIC)	116 ~ 122(bp)	58°C	UniSTS:250991
TGLA122	21	G(VIC)	137 ~ 181(bp)	58°C	UniSTS:250911
INRA23	3	G(VIC)	196 ~ 222(bp)	61°C	UniSTS:251120
ETH3	19	Y(NED)	105 ~ 125(bp)	60°C	UniSTS:250763
ETH225	9	Y(NED)	141 ~ 159(bp)	60°C	UniSTS:250852
BM1824	1	Y(NED)	178 ~ 192(bp)	58°C	UniSTS:44288

다) 분석 방법

확보된 90두 각각에 대한 11개 마커의 다형성 분석을 위하여, Multiplex PCR 반응은 주형 DNA 10ng을 사용하였으며, Taq DNA polymerase 0.5U(Gold Taq, ABI), Primer mix 8.75ul를 사용하였다. PCR 조건은 95에서 15분간 denaturation을 1회 실시하였고, 95도씨 1분 denaturation, 56도씨 1분간 annealing, 72도씨에서 50초간 elongation과정을 31회 반복하였다. 최종 72도씨에서 1시간, 60도씨에서 1시간 추가로 extension시킨 후, 8도씨에서 과정을 종료하였다. PCR 산물은 30X dilution시킨 후, Applied Biosystems사와 Amersham Bioscience사 각각의 프로토콜에 따라 유전자형 분석을 실시 하였다.

라) 기기 간 원시정보 차이

Applied Biosystems사의 ABI 3100과 ABI 3100 Avant와 Amersham Bioscience사의 MegaBACE 자동염기서열 분석장치간의 data차이를 비교해본 결과 Table 21과 같았으며, 각 마커에 따라 allele 크기 정보가 서로 다르게 나타났다. 즉, 약 2-7bp의 염기 크기의 변화가 관찰되었으며, 이는 각 기기간의 미세한 전기영동 장치의 차이에 의한 mobility 또는 신호 검출장치등의 차이로 인한 것으로 사료되며, 이는 향후 좀 더 많은 샘플과 다양한 기기간의 비교가 DNA 동일성 검정 표준화 작업에 필수적이라 판단된다.

Table 21. ABI 3100, ABI 3100 Avant 그리고 MagaBACE 간의 대립유전자 크기 비교

Marker	ABI 3100 Allele	ABI 3100 Avant Allele	MagaBACE Allele
BM1824	A1	3.56±0.3	4.46±0.2
	A2	3.56±0.32	4.56±0.21
BM2113	A1	4.29±0.25	4.33±0.31
	A2	4.43±0.21	4.32±0.33
ETH10	A1	5.66±0.23	4.67±0.26
	A2	5.89±0.25	4.67±0.26
ETH225	A1	4.60±0.22	3.55±0.23
	A2	4.5±0.25	3.58±0.21
ETH3	A1	4.34±0.21	4.14±0.21
	A2	4.35±0.23	4.15±0.21
INRA23	A1	6.39±0.37	4.43±0.36
	A2	6.78±0.48	4.43±0.32
SPS115	A1	7.07±0.17	6.67±0.19
	A2	6.9±0.2	6.54±0.21
TGLA122	A1	4.32±0.31	5.34±0.21
	A2	4.04±0.37	5.12±0.31
TGLA126	A1	4.84±0.06	4.11±0.16
	A2	4.85±0.06	4.14±0.17
TGLA227	A1	3.04±0.20	4.02±0.23
	A2	2.95±0.12	4.44±0.26
TGLA53	A1	2.64±0.32	2.38±0.37
	A2	2.59±0.33	2.37±0.37

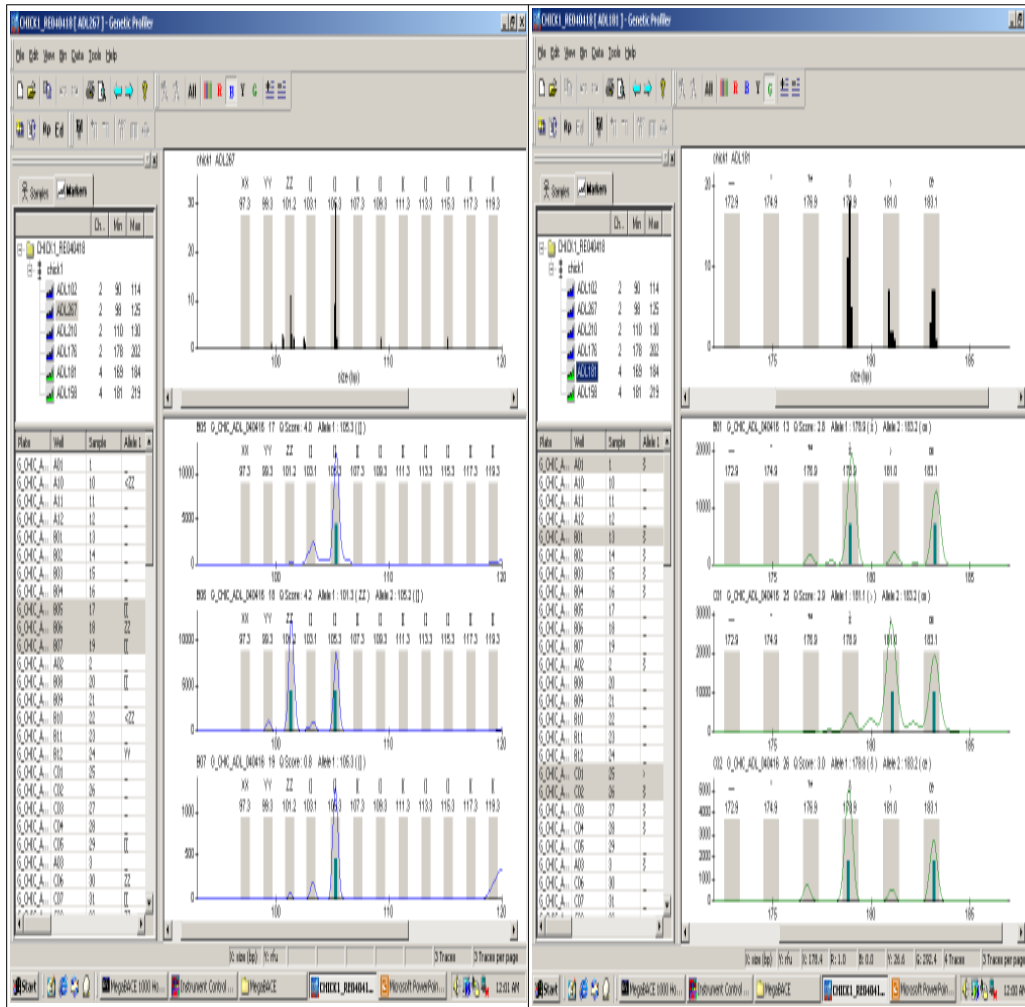


Fig 12. Mega BACE analysis result image

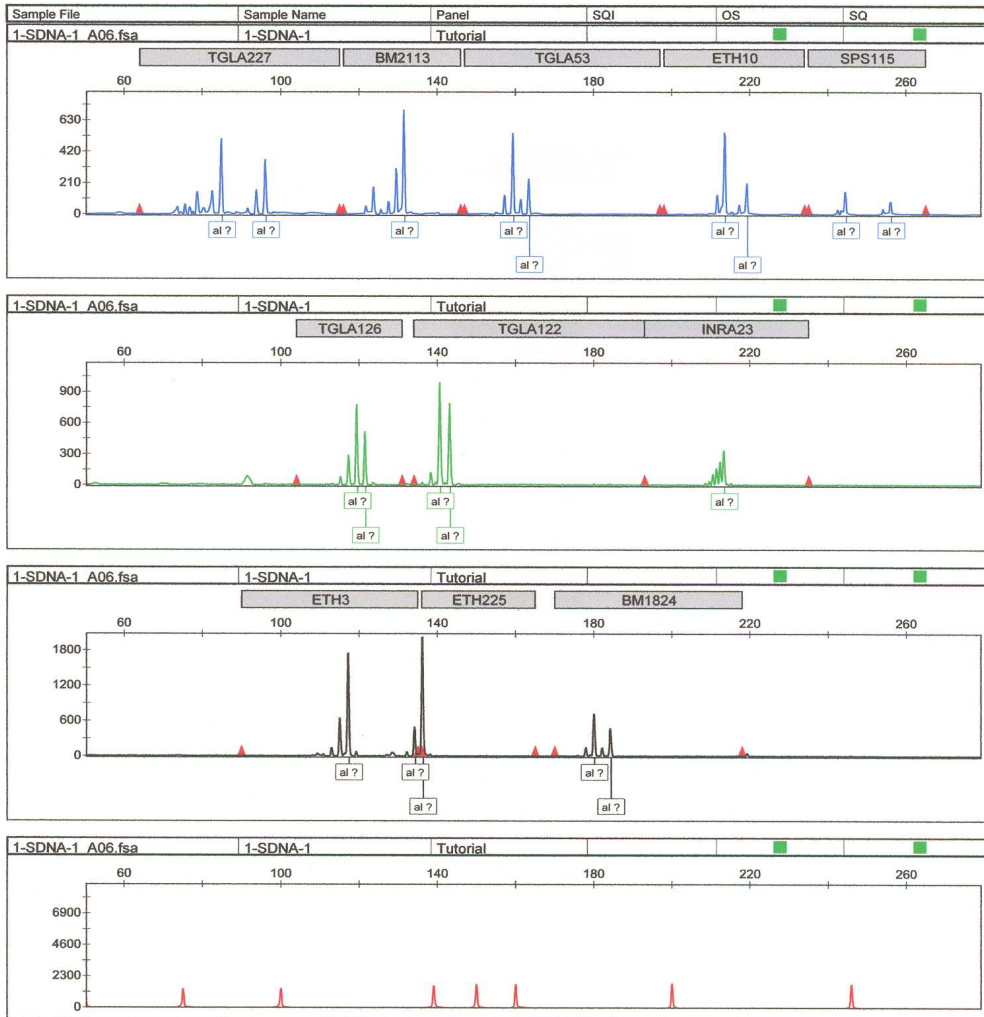


Fig 13. ABI analysis result image

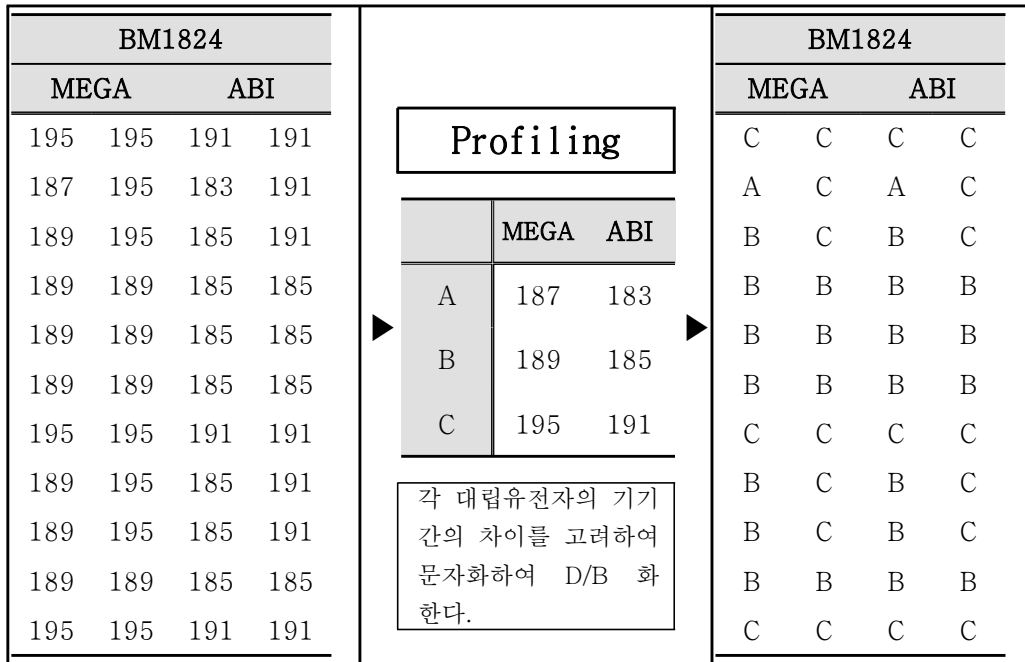


Fig 14. 각 기기 간의 대립유전자 차이에 대한 Profiling 모식도

생산이력시스템의 원산지 추적을 위해 각 Marker별 Genotype을 결정함에 있어 모든 실험을 하나의 실험실 또는 하나의 기계를 사용하여 완료하기엔 불가능을 알고 있다. 하지만 각 제조사의 분석기기 또는 같은 제조사라 할지라도 각 실험실별 결과의 차이가 나는 것을 확인할 수 있었으나 아직 이러한 차이에 대한 기준이 확실하게 잡혀있는 상황이 아니다. 위 그림은 각 제조사별 MS Marker의 Genotype 결과의 차이를 나타냈으며 이러한 결과들은 어느 한 기준을 잡아 조정하였을 때 같은 결과가 도출되었음을 나타낸 것이다. 차후 이러한 기준설정을 위해 각 분석기관들 간의 비교 실험이 반드시 필요하며 Data들을 교류, 교환 및 참고함에 있어 매우 중요한 요소 중 하나이다.

② 2차비교

가) 분석 기기

자동 전기영동 장치의 종류에 따른 Microsatellite의 profiling의 비교는 현재 국내에 널리 보급되어 있는 대표적 기종인 ABI Genetic Analyzer 310, 3100 그리고, 3130xl 세 기종을 이용하였다.

나) 분석 시료 및 Microsatellites 마커 선정

기기에 따른 profiling 결과를 비교하기 위한 DNA 시료는 축산물등급판정소로부터 총 40 샘플을 분양받았으며, 분석에 사용된 Microsatellites marker와 각 마커별 oligonucleotide는 표 1과 같다. 각 마커의 선정은 한우 다형성이 높고, 증폭이 확실하며 전체 게놈의 고른 부위에 위치한 염색체로부터 선정하였다. 또한 각각의 마커들의 증폭 크기가 중첩되므로, 분석을 용이하게 하기 위하여 네 개의 형광물질로 각 마커의 forward primer의 5'쪽에 표지하였다. TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115등은 5'-FAM으로, TGLA122, TGLA126, INRA23은 VIC으로, ETH3, ETH225, BM1824는 NED로 형광표지를 하여 실험에 사용하였다.

③ 분석방법

PCR 증폭은 다음과 같은 조건을 사용하였다. 먼저 95°C에서 15분간 denaturation을 1회 실시하였고, 95°C 1분 denaturation, 56°C 1분간 annealing, 72°C에서 50초간 elongation과정을 31회 반복하였다. 최종 72°C에서 1시간, 60°C에서 1시간 추가로 extension시킨 후, 8°C에서 과정을 종료하였다. 증폭된 산물은 80배 증류수로 희석하여 희석된 증폭산물 1ul와 Standard size standard GeneScan LIZ500및 Hi-Di Formade(AppliedBiosystems, USA) 혼합물을 1:9로 희석하여 두 개의 기기에서 동일하게 profiling을 실시하였다.

Table 22. Microsatellites marker and oligonucleotides

	Microsatellite	Chromosome	Forward Primer		Reverse Primer	
FAM(B)	TGAL227	18	CGAATTCCAAATCTGTT AATTTGCT	25bp	ACAGACAGAAACTCAATG AAAGCA	24bp
	BM2113	2	GCTGCCTTCTACCAAAT ACCC	21bp	CTTCCTGAGAGAAGCAAC ACC	21bp
	TGLA53	16	GCTTTCAGAAATAGTTT GCATTCA	24bp	ATCTTCACATGATATTAC AGCAGA	24bp
	ETH10	5	G TTCAGGACTGGCCCTGC TAACA	23bp	CCTCCAGCCCACTTTCTCT TCTC	23bp
	SPS115	15	AAAGTGACACAACAGCT TCTCCAG	24bp	AACGAGTGCCTAGTTTG GCTGTG	24bp
VIC	TGLA126	20	CTAATTTAGAATGAGAG AGGCTTCT	25bp	TTGGTCTCTATTCTCTGA ATATTCC	25bp

(G)	TGLA122	21	CCCTCCTCCAGGTAAATC AGC	21bp	AATCACATGGCAAATAAG TACATAC	25bp
	INRA23	3	GAGTAGAGCTACAAGAT AAACTTC	24bp	TAACTACAGGGTGTTAGA TGAACT	24b P
NE D(Y)	ETH3	19	GAACCTGCCTCTCCTGCA TTGG	22bp	ACTCTGCCTGTGGCCAAG TAGG	22bp
	ETH225	9	GATCACCTTGCCACTAT TTCCT	22bp	ACATGACAGCCAGCTGCT ACT	21bp
	BM1824	1	GAGCAAGGTGTTTTTCC AATC	21bp	CATTCTCCAAGCTGCTTCC TTG	21bp

④ 비교 결과

동일한 시료에 대한 동일한 증폭산물은 세 종의 기기간에 각 마커별 차이를 비교한 결과, 체적으로 ABI3130xl의 기종에서 증폭산물의 크기가 크게 나타났으며, 3100, 310 순으로 점차 낮아졌다. Table 2, 3에서 보는바와 같이 각 마커에 따라서 크기의 차이는 매우 다양했으며, BM1824의 경우 2bp에서 2.7bp사이에서 크기 변화가 나타났으나, INRA23의 경우에는 1.4bp에서 5.4bp까지 일정하지 않게 크기 변화를 보이는 마커도 관찰 되었다.

이러한 결과는 동일한 증폭산물이라 하더라도 전기영동 장치의 기종에 따라서 매우 다른 profiling값을 나타낼 수 있다. 따라서 이러한 값들을 데이터베이스화하여 통합 관리 운영하기 위해서는 새로운 기준안에 의한 절대값으로의 전환이 필요함을 보여준다.

Table 22. 전기영동 기기에 따른 6종의 microsatellites marker의 Profiling 값

기기	Microsatellites Marker											
	BM1824		BM2113		ETH10		ETH225		ETH3		INRA23	
ABI 310	182.4	184.5	125.2	135.6	215.5	217.4	138	140	117.2	125.5	212.5	212.5
	+2.7	+2.7	+3.7	+2.7	+3.3	+3.2	+4.1	+4.1	+3.1	+3.7	+5.4	+5.4
ABI 3100	185.1	187.2	128.9	138.3	218.8	220.6	142.1	144.1	120.3	129.2	217.9	217.9
	+2.2	+2	+1.7	+2.2	+1.1	+1.2	+2.1	+2.4	+2.3	+1.9	+1.4	+1.4
ABI 3130XL	187.3	189.2	130.6	140.5	219.9	221.8	144.2	146.5	122.6	131.1	219.3	219.3

Table 23. 전기영동 기기에 따른 5종의 microsatellites marker의 Profiling 값

기기	Microsatellites Marker									
	SPS115		TGLA122		TGLA126		TGLA227		TGLA53	
ABI 310	244.6	250.4	134.3	144.3	117.4	117.4	96.4	96.4	167.6	177.6
	+2.6	+2.7	+2.6	+1.9	+4.1	+4.1	+0.7	+0.7	+2.2	+2
ABI 3100	247.2	253.1	136.9	146.2	121.5	121.5	97.1	97.1	169.8	179.6
	+2.2	+2.1	+3.3	+3.3	+1.8	+1.8	+3.8	+3.8	+2.4	+2.5
ABI 3130XL	249.4	255.2	140.2	149.5	123.3	123.3	100.9	100.9	172.2	182.1

3) 비교결과에 따른 기준안 마련 및 오류 검정(유전표지의 수치화 및 표준화 실험)

① Allelic ladder 적용을 통한 기관 및 기기별 표준안

동일한 PCR산물을 동일한 분석기기에서 계속적으로 반복하여 분석한다 해도 peak의 크기(bp)는 매번 달라지게 된다. 즉, 그러한 데이터는 통합하여 관리하거나, 동일성을 알아보려고 할 때는 매우 비효율적인 시스템이다. 이러한 근본적인 문제를 해결할 수 있는 방법이 allelic ladder를 적용시키는 방법이다. 즉, peak들이 나타날 수 있는 최소 또는 최대의 범위를 하나의 allele number로 지정해주고, 그 범위안에 위치하는 peak들은 무조건 하나의 숫자로 표시되는 절대값으로 변환하여 주는 것을 말한다. 본 비교실험에는 단순한 size 비교가 아닌 allele값으로 데이터를 보정한 후, 그 결과를 비교하여 추후, 표준화된 통합 DB구축 가능성에 대해 알아보려고 하였다.

가) Microsatellites 분석기관

본 비교실험에는 한경대학교와 축산과학원 본원 그리고 경상대학교가 참여하였으며 세 개의 기관은 모두 동일한 자동 전기영동 장치인 ABI Genetic Analyzer 3130xl을 보유하고 있고, microsatellite 분석을 통한 유전자 감식에 대한 높은 기술력을 보유하고 있기 때문에 분석기관에 따른 profiling값을 비교하고 나아가 allele 절대값으로 변환 하였을 시 데이터 통일 가능성에 대해 알아보았다.

나) Allelic ladder

allelic ladder는 경상대학교에서 제공하였으며, 11개의 microsatellite marker에 대한 각각의 allelic ladder 정보는 Table 4와 같다.

Table 24. 각 마커별 allelic ladder의 갯수

MS name	Ch#	Dye Label	Size range(bp)	Allele number
TGLA227	18	B(FAM)	76 ~ 104(bp)	16
BM2113	2	B(FAM)	123 ~ 143(bp)	12
TGLA53	16	B(FAM)	154 ~ 188(bp)	19
ETH10	5	B(FAM)	212 ~ 224(bp)	12
SPS115	15	B(FAM)	246 ~ 260(bp)	9
TGLA126	20	G(VIC)	116 ~ 122(bp)	8
TGLA122	21	G(VIC)	137 ~ 181(bp)	19
INRA23	3	G(VIC)	196 ~ 222(bp)	13
ETH3	19	Y(NED)	105 ~ 125(bp)	17
ETH225	9	Y(NED)	141 ~ 159(bp)	14
BM1824	1	Y(NED)	178 ~ 192(bp)	11

다) 분석 시료 및 microsatellites 마커 및 profiling

분석기관에 따른 profiling 결과를 비교하기 위한 DNA 시료는 한경대학교로부터 분양받았으며, 총 20샘플을 Table 1의 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824등 11개의 microsatellite 마커 프라이머를 이용하여 증폭하였다. PCR 증폭조건 및 분석조건은 기기분석 조건과 동일 하였다.

라) 비교 결과

동일한 시료에 대한 동일한 증폭산물을 세 개의 기관에서 allelic ladder를 적용하여 분석한 결과, 거의 모든 값이 allele number로 보정이 되었으며(Table 5) 이는 세 기관에서 똑같은 데이터 값을 보유하게 되었음을 의미한다. 즉, 향후 데이터를 통합적으로 관리 및 운영할 수 있음을 보여주는 결과이다.

Table 25. Allelic Ladder로 보정한 디지털 데이터

	환경대학교				축산과학원				경상대학교			
		Allele	Size		Allele	Size		Allele	Size			
1	BM1824	13 13	187.6	187.6	13 13	186.9	186.9	13 13	187.3	187.3		
	BM2113	18 21	136.8	143.1	18 21	136.5	142.8	18 21	136.7	143.0		
	BOV_X	X X	119.3	119.3	X X	119.1	119.1	X X	119.3	119.3		
	BOV_Y											
	ETH10	19 19	222.3	222.3	19 19	222.0	222.0	19 19	222.3	222.3		
	ETH225	23 25	147.0	151.4	23 25	147.0	151.3	23 25	147.0	151.4		
	ETH3	24 24	125.3	125.3	24 24	125.0	125.0	24 24	125.2	125.2		
	INRA23	20 24	211.8	219.4	20 24	211.3	219.0	20 24	211.6	219.3		
	SPS115	23 27	253.6	261.4	23 27	253.1	261.0	23 27	253.5	261.3		
	TGLA122	29 43	158.8	188.1	29 43	158.3	187.5	29 43	158.6	187.9		
	TGLA126	17 17	123.7	123.7	17 17	123.2	123.2	17 17	123.5	123.5		
	TGLA227	20 22	101.6	105.5	20 22	101.1	104.9	20 22	101.4	105.3		
	TGLA53	23 25	164.6	168.7	23 25	164.1	168.2	23 25	164.4	168.5		
2	BM1824	13 17	187.5	195.7	13 17	186.8	195.1	13 17	187.3	195.5		
	BM2113	20 21	140.9	143.1	20 21	140.6	142.8	20 21	140.8	143.0		
	BOV_X	X X	119.3	119.3	X X	119.3	119.3	X X	119.4	119.4		
	BOV_Y								0.0	0.0		
	ETH10	18 21	220.4	226.1	18 21	220.1	225.7	18 21	220.4	226.1		
	ETH225	23 24	147.0	149.2	23 24	146.8	148.9	23 24	147.0	149.2		
	ETH3	23 27	123.0	131.5	23 27	122.9	131.4	23 27	123.0	131.5		
	INRA23	16 20	204.4	211.8	16 20	203.9	211.4	16 20	204.3	211.7		
	SPS115	21 27	249.8	261.4	21 27	249.3	260.8	21 27	249.7	261.2		
	TGLA122	29 29	158.7	158.7	29 29	158.2	158.2	29 29	158.5	158.5		
	TGLA126	17 21	123.7	132.2	17 21	123.3	131.9	17 21	123.6	132.1		
	TGLA227	20 22	101.5	105.5	20 22	100.9	105.0	20 22	101.3	105.3		
	TGLA53	27 30	172.7	178.6	27 30	172.0	178.0	27 30	172.4	178.4		
3	BM1824	13 17	187.5	195.7	13 17	186.9	195.1	13 17	187.3	195.5		
	BM2113	13 19	127.2	138.7	19 19	138.5	138.5	19 19	132.9	138.7		
	BOV_X	X X	119.3	119.3	X X	119.3	119.3	X X	119.4	119.4		
	BOV_Y								0.0	0.0		
	ETH10	19 22	222.2	227.9	19 22	222.1	227.9	19 22	222.3	228.0		
	ETH225	26 26	153.3	153.3	26 26	153.1	153.1	26 26	153.3	153.3		
	ETH3	24 27	125.3	131.6	24 27	125.1	131.4	24 27	125.3	131.6		
	INRA23	16 20	204.3	211.7	16 20	203.9	211.5	16 20	204.2	211.7		
	SPS115	20 24	247.7	254.8	21 25	249.4	256.9	21 25	248.7	256.0		
	TGLA122	24 29	147.6	158.8	24 29	147.2	158.1	24 29	147.5	158.5		
	TGLA126	17 21	123.7	132.2	17 21	123.5	131.9	17 21	123.7	132.1		
	TGLA227	14 22	88.5	105.5	14 22	88.0	105.0	14 22	88.3	105.3		

	TGLA53	27	33	172.6	184.5	27	33	172.0	183.9	27	33	172.4	184.3
4	BM1824	13	17	187.6	195.7	13	17	187.1	195.2	13	17	187.4	195.5
	BM2113	21	21	143.1	143.1	21	21	142.9	142.9	21	21	143.1	143.1
	BOV_X	X	X	119.3	119.3	X	X	119.2	119.2	X	X	119.3	119.3
	BOV_Y											0.0	0.0
	ETH10	19	19	222.4	222.4	19	19	222.0	222.0	19	19	222.3	222.3
	ETH225	23	26	147.0	153.3	23	26	146.8	153.1	23	26	147.0	153.3
	ETH3	24	24	125.3	125.3	24	24	125.1	125.1	24	24	125.3	125.3
	INRA23	20	24	211.8	219.5	20	24	211.4	219.0	20	24	211.7	219.3
	SPS115	22	25	251.8	257.6	22	25	251.3	257.0	22	25	251.6	257.4
	TGLA122	29	29	158.7	158.7	29	29	158.3	158.3	29	29	158.6	158.6
TGLA126	18	22	125.9	134.4	18	22	125.6	133.9	18	22	125.8	134.2	
TGLA227	12	20	84.1	101.6	12	20	83.7	101.1	12	20	83.9	101.4	
TGLA53	27	27	172.7	172.7	27	27	172.2	172.2	27	27	172.5	172.5	
5	BM1824	14	18	189.7	197.8	14	18	189.1	197.3	14	18	189.5	197.7
	BM2113	18	21	136.7	143.1	18	21	136.6	142.9	18	21	136.7	143.1
	BOV_X	X	X	119.4	119.4	X	X	119.2	119.2	X	X	119.3	119.3
	BOV_Y											0.0	0.0
	ETH10	15	19	214.8	222.3	15	19	214.4	222.1	15	19	214.7	222.3
	ETH225	23	23	147.0	147.0	23	23	146.9	146.9	23	23	147.0	147.0
	ETH3	22	24	121.0	125.3	22	24	120.9	125.1	22	24	121.0	125.3
	INRA23	20	24	211.8	219.5	20	24	211.5	219.0	20	24	211.8	219.3
	SPS115	21	23	249.9	253.8	21	23	249.4	253.2	21	23	249.7	253.6
	TGLA122	26	43	152.2	188.1	26	43	152.0	187.6	26	43	152.2	188.0
TGLA126	17	17	123.8	123.8	17	17	123.4	123.4	17	17	123.7	123.7	
TGLA227	15	20	90.7	101.6	15	20	90.2	101.2	15	20	90.5	101.5	
TGLA53	23	27	164.7	172.7	23	27	164.2	172.3	23	27	164.5	172.6	
6	BM1824	17	18	195.7	197.8	17	18	195.2	197.3	17	18	195.5	197.6
	BM2113	18	21	136.7	143.1	18	21	136.6	142.9	18	21	136.7	143.1
	BOV_X	X	X	119.3	119.3	X	X	119.4	119.4	X	X	119.4	119.4
	BOV_Y											0.0	0.0
	ETH10	19	21	222.3	226.1	19	21	222.1	225.8	19	21	222.3	226.1
	ETH225	23	23	147.2	147.2	23	23	146.7	146.7	23	23	147.0	147.0

	ETH3	22	24	120.9	125.2	22	24	120.9	125.3	22	24	121.0	125.3
	INRA23	20	21	211.8	213.7	20	21	211.5	213.4	20	21	211.7	213.7
	SPS115	24	25	255.5	257.4	24	25	255.1	257.0	24	25	255.4	257.4
	TGLA122	25	26	150.1	152.2	?	25	142.9	149.8	?	25	146.5	151.1
	TGLA126	17	18	123.7	125.8	17	18	123.4	125.6	17	18	123.6	125.8
	TGLA227	14	20	88.5	101.6	14	20	88.0	101.2	14	20	88.3	101.5
	TGLA53	34	35	186.5	188.5	34	35	186.2	188.2	34	35	186.4	188.4
	BM1824	13	14	187.6	189.7	13	14	187.2	189.3	13	14	187.5	189.6
	BM2113	15	21	131.0	143.1	15	21	130.7	142.7	15	21	130.9	142.9
	BOV_X	X	X	119.4	119.4	X	X	119.2	119.2	X	X	119.4	119.4
	BOV_Y											0.0	0.0
	ETH10	18	20	220.4	224.2	18	20	220.2	224.1	18	20	220.4	224.2
	ETH225	23	23	146.9	146.9	23	23	146.7	146.7	23	23	146.9	146.9
7	ETH3	23	26	123.1	129.5	23	26	123.0	129.3	23	26	123.1	129.4
	INRA23	18	24	208.1	219.4	18	24	207.8	219.2	18	24	208.1	219.4
	SPS115	24	27	255.6	261.4	24	27	255.1	260.9	24	27	255.5	261.2
	TGLA122	24	34	147.6	169.4	24	34	146.9	169.0	24	34	147.3	169.3
	TGLA126	18	18	125.8	125.8	18	18	125.5	125.5	18	18	125.7	125.7
	TGLA227	20	20	101.6	101.6	20	20	101.1	101.1	20	20	101.4	101.4
	TGLA53	31	34	180.6	186.6	31	34	180.2	186.3	31	34	180.5	186.5
	BM1824	13	14	187.7	189.7	13	14	187.1	189.2	13	14	187.5	189.5
	BM2113	21	21	143.1	143.1	21	21	143.0	143.0	21	21	143.1	143.1
	BOV_X	X	X	119.4	119.4	X	X	119.4	119.4	X	X	119.5	119.5
	BOV_Y											0.0	0.0
	ETH10	18	19	220.4	222.3	18	19	220.1	222.0	18	19	220.4	222.3
	ETH225	23	25	147.0	151.4	23	25	146.8	151.1	23	25	146.9	151.3
8	ETH3	26	27	129.5	131.6	?	27	129.5	131.6	?	27	129.6	131.7
	INRA23	15	24	202.5	219.4	15	24	202.2	219.1	15	24	202.4	219.4
	SPS115	24	25	255.6	257.6	24	25	255.1	257.0	24	25	255.5	257.4
	TGLA122	29	43	159.2	188.2	?	43	158.8	187.7	?	43	159.1	188.0
	TGLA126	17	21	123.8	132.3	17	21	123.6	132.0	17	21	123.8	132.2
	TGLA227	14	20	88.6	101.7	14	20	88.1	101.2	14	20	88.4	101.5
	TGLA53	31	34	180.7	186.6	31	34	180.3	186.3	31	34	180.6	186.5
9	BM1824					13	13	186.8	186.8				
	BM2113					20	21	140.7	142.8				

	BOV_X				X	X	119.2	119.2					
	BOV_Y												
	ETH10				19	21	221.9	225.7					
	ETH225				24	25	149.1	151.2					
	ETH3				22	23	120.8	122.8					
	INRA23				15	16	202.1	203.9					
	SPS115				21	23	249.3	253.1					
	TGLA122				21	27	140.3	153.9					
	TGLA126				17	18	123.3	125.4					
	TGLA227				22	22	105.0	105.0					
	TGLA53				27	30	172.0	177.9					
	<hr/>												
	BM1824	13	14	187.5	189.6	13	14	186.9	188.9	13	14	187.3	189.3
	BM2113	18	21	136.8	143.2	18	21	136.5	142.8	18	21	136.7	143.0
	BOV_X	X	X	119.3	119.3	X	X	119.2	119.2	X	X	119.3	119.3
	BOV_Y											0.0	0.0
	ETH10	19	19	222.3	222.3	19	19	222.0	222.0	19	19	222.3	222.3
	ETH225	23	25	147.1	151.4	23	25	146.8	151.2	23	25	147.0	151.4
10	ETH3	22	26	121.0	129.4	22	26	120.7	129.3	22	26	120.9	129.4
	INRA23	18	23	208.1	217.5	18	23	207.7	217.1	18	23	208.0	217.4
	SPS115	21	23	249.9	253.7	21	23	249.3	253.1	21	23	249.7	253.5
	TGLA122	25	29	150.2	158.7	25	29	149.5	158.1	25	29	149.9	158.5
	TGLA126	17	20	123.8	130.0	17	20	123.3	129.8	17	20	123.6	130.0
	TGLA227	15	19	90.6	99.5	15	19	90.0	98.8	15	19	90.3	99.2
	TGLA53	27	27	172.6	172.6	27	27	172.1	172.1	27	27	172.4	172.4

② 국가 단위의 비교실험을 통한 표준화 작업

매년 국제동물유전공학회에서는 전 세계적으로 소 품종에 대해 microsatellites 유전자 검사를 실시하는 기관들을 대상으로 비교실험을 실시하고, 시험 결과를 공지한다. 따라서 본 과제에서는 ‘Cattle Comparison Test 2007-2008(Sociedad Rural Argentina)’ 본 시험에 사용된 비교검정용 DNA를 확보하여, 본 과제에서 개발된 시스템이 국제적 공인을 받을 수 있는지의 여부를 1차적으로 확인하고자 하였다. 검정용 DNA는 reference sample을 포함하여 총 21두였으며, Table 26과 같다.

Table 26. List of breeds tested

Sample No	Breeds	Sample No	Breeds
Control	Reference sample		
01	Holstein	11	Holestein crossbred
02	Blonde D'Aquitaine	12	Angus crossbred
03	Holstein	13	Brangus
04	Jersey/Angus crossbred	14	Black Red Simmental
05	Limousine/Hereford crossbred	15	Charolais
06	Limousine/Hereford crossebred	16	Brangus
07	Angus crossbred	17	Blonde D'Aquitaine
08	Hereford crossbred	18	Braford
09	Brangus crossbred	19	Angus
10	Angus crossbred	20	Black Red Simmental

Table 27은 reference sample의 각 microsatellite별 allele값과 본 과제의 개발된 시스템으로 도출한 결과 값을 보여준다. 표에서 보여주는 바와 같이 서로 정확하게 결과가 일치함을 알 수 있었다.

Table 27. Genotypes for Reference sample

Marker	제 시 값		비교 결과	
	A1	A2	A1	A2
TGLA227	83	87	83	87
BM2113	125	129	125	129
TGLA53	160	162	160	162
ETH10	221	223	221	223
SPS115	248	248	248	248
TGLA126	115	121	115	121
TGLA122	151	171	151	171
INRA23	208	210	208	210
ETH3	103	117	103	117
ETH225	140	144	140	144
BM1824	178	180	178	180

또한 Table 28은 나머지 20두에 대한 profiling값을 보여주며, 향후 ISAG에서 발표하는 결과 값과 최종 비교검정하고, 2009년도에 실시하는 비교시험에 정식으로 임하여 국제적인 공신력을 확보할 계획이다.

Table 28. ISAG 20두에 대한 Profiling결과

샘플	TGLA227		BM2113		TGLA53		ETH10		SPS115		TGLA126		TGLA122		INRA23		ETH3		ETH225		BM1824	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1	89	103	128	128	160	160	219	223	248	254	115	115	143	148	208	210	117	117	149	151	188	189
2	83	89	131	133	154	168	219	219	248	248	115	115	146	146	201	201	117	119	149	151	180	180
3	97	103	126	126	166	168	217	223	248	252	115	122	148	152	208	210	117	128	127	127	180	188
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-7
5	89	91	131	139	166	172	221	221	252	260	115	124	142	146	208	214	117	119	151	151	188	188
6	87	93	131	137	166	170	219	221	254	254	115	117	142	150	208	208	117	119	144	144	178	178
7	87	97	125	129	158	160	213	224	248	248	113	119	142	161	206	208	117	117	144	149	178	188
8	83	95	131	135	154	160	217	219	248	256	117	119	142	161	206	214	117	126	140	149	182	182
9	75	81	133	140	154	154	219	219	248	248	115	115	139	163	199	214	115	117	149	149	182	188
10	87	91	126	142	160	176	209	219	248	252	124	124	142	153	214	214	117	120	140	144	180	182
11	83	87	129	137	160	166	219	219	248	252	115	117	142	163	210	210	117	130	144	150	180	180
12	87	97	127	135	160	168	213	217	248	248	122	126	148	150	214	214	120	126	144	150	182	182
13	77	97	137	144	160	160	-	-	-	-	115	117	-	-	-	-	-	-	140	160	-	-7
14	81	87	127	131	170	172	215	221	254	260	115	115	152	152	201	214	126	126	140	140	178	178
15	81	89	126	135	168	176	217	217	248	260	115	124	142	175	206	218	117	128	144	150	178	178
16	75	97	126	135	170	176	-	-	-	-	115	126	142	146	-	-	117	117	146	160	178	182
17	83	97	131	133	154	168	217	219	248	252	115	115	146	152	208	208	117	120	148	150	180	180
18	77	79	135	135	160	168	-	-	-	-	115	122	142	142	-	-	117	117	141	141	-	-7
19	81	81	133	135	154	160	219	221	248	254	113	117	150	182	206	206	120	126	150	151	178	182
20	81	81	131	131	160	172	215	219	248	254	115	117	142	142	206	214	126	126	140	148	178	182

3. BioTaq을 통한 생산이력시스템 모니터링

1) 생산단계 개체식별 체계 설정을 위한 현장 육종자원 조사

본 연구는 생산단계 개체식별 체계 설정을 위해 현장에서 이루어지고 있는 혈통관리 및 육종자원에 대하여 실태를 조사하여 문제점을 파악하기 위해 실시하였다. 이러한 현장의 실태를 조사하기 위해 남양주시와 밀양시 등에 위치한 한우 농가를 대상으로

하였으며 400두의 한우를 대상으로 혈통과 개체정보를 수집하였다.

Table 29. 대상 농가 한우집단의 혈통정보 내역

미등록우	기초등록우	혈통등록우	총두수
253두 (63%)	100두 (25%)	47두 (12%)	400두 (100%)

Table 30. 대상 농가 보유 혈통우들에 대한 종모우 및 자손 수

부명호	냉도체중 (kg)	배최장근 단면적(cm ²)	근내지방도	개체 두수 (자손수)
KPN-249	-0.529	0.698	0.395	4
KPN-305	6.686	1.371	0.426	8
KPN-330	2.771	1.513	0.807	5
KPN-336	1.731	1.627	0.633	7
KPN-348	-4.363	1.258	0.722	3
KPN-358	14.981	0.733	-0.294	6
KPN-363	2.352	0.43	0.035	4
KPN-387	2.083	3.923	0.432	2
KPN-388	10.759	5.113	0.345	3
KPN-407	5.065	3.182	0.396	2
KPN-452	6.783	2.643	0.326	3

2) 생산이력시스템 모니터링을 위한 BioTaq 부착(1차년도)

생산이력제 실시를 위한 DNA 시료를 확보하기 위해 홍천일대의 한우 집단에 BioTaq을 부착하였다. BioTaq을 부착함으로써 조직시료에 대한 보관과 이동, 분석이 용의하여 이력정보를 기입하여 생산단계에서 도축단계까지의 정보를 연계할 수 있다.



Fig 15. 대상 한우의 BioTaq 부착 사진

3) 생산이력 시스템 모니터링을 통한 오류 검정(1차년도)

① 도축전 생산단계에서 혈액시료를 확보하여 DNA를 확보하여 MS 유전자 좌위를 분석하여 D/B화 하였다. 판매장에서 판매되고 있는 고기시료와 정보를 수집하여 생산단계의 유전정보와 동일성 검정을 실시하였다.

② 동일성 검정을 위해 판매장에서 판매가 되고 있는 5개체의 생육을 대상으로 각각 2개의 부위에서 시료를 부착된 바코드 정보와 함께 수집을 하였다. 판매장에서 수집해온 시료는 바코드정보에 따라 생산단계에서 얻은 유전정보와 유전정보의 동일성을 검정하였다. 분석결과 5개체에서 수집된 총 10개의 판매장 시료는 생산단계에서 얻은 유전정보와 일치하는 것으로 나타났다.

Table 31. 동일성검정을 위해 수집된 시료의 정보

바코드정보	도축정보	시료정보	분석ID
175429241	생산단계시료	혈액	P0701001
175429259	생산단계시료	혈액	P0701002
175429288	생산단계시료	혈액	P0701003
169422521	생산단계시료	혈액	P0701004
175429266	생산단계시료	혈액	P0701005
175429241	B1+	우둔	S0702001
175429259	B1+	우둔	S0702002
175429288	C1+	우둔	S0702003
169422521	C1	우둔	S0702004
175429266	C1+	우둔	S0702005
175429241	B1+	안창	S0702006
175429259	B1+	안창	S0702007
175429288	C1+	안창	S0702008
169422521	C1	안창	S0702009
175429266	C1+	안창	S0702010

Table 32. 동일성 검정 유전자 분석정보 및 판정결과

바코드정보	분석ID	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	판정결과										
175429241	P0701001	295	295	224	228	145	147	136	136	170	172	88	96	191	191	255	259	160	164	131	131	생산단계
175429241	S0702001	295	295	224	228	145	147	136	138	170	172	88	96	191	191	255	259	160	164	131	131	일치
175429241	S0702006	295	295	224	228	145	147	136	138	170	172	88	96	191	191	255	259	160	164	131	131	일치
175429259	P0701002	291	295	222	222	147	147	140	142	170	170	96	100	183	191	255	259	160	164	131	133	생산단계
175429259	S0702002	291	295	222	222	147	147	140	142	170	170	96	100	183	191	255	259	160	164	131	133	일치
175429259	S0702007	291	295	222	222	147	147	140	142	170	170	96	100	183	191	255	259	160	164	131	133	일치
175429288	P0701003	291	295	222	224	143	155	138	140	172	176	88	88	183	191	251	253	156	170	131	131	생산단계
175429288	S0702003	291	295	222	224	143	155	138	140	172	176	88	88	183	191	251	253	156	170	131	131	일치
175429288	S0702008	291	295	222	224	143	155	138	140	172	176	88	88	183	191	251	253	156	170	131	131	일치
169422521	P0701004	291	295	222	228	143	145	138	140	176	176	96	98	183	185	255	259	164	166	131	151	생산단계
169422521	S0702004	291	295	222	228	143	145	138	140	176	176	96	98	183	185	255	259	164	166	131	151	일치
169422521	S0702009	291	295	222	228	143	145	138	140	176	176	96	98	183	185	255	259	164	166	131	151	일치
175429266	P0701005	295	295	222	222	153	153	138	140	172	172	88	94	183	191	255	255	154	166	131	135	생산단계
175429266	S0702005	295	295	222	222	153	153	138	140	172	172	88	94	183	191	255	255	154	166	131	135	일치
175429266	S0702010	295	295	222	222	153	153	138	140	172	172	88	94	183	191	255	255	154	166	131	135	일치

4) BioTaq의 유효성 검증, 업그레이드 및 현장적용 추진

부산대학교에서는 밀양초우의 DNA 동일성 검사를 위하여 밀양축협 생축장에서 직접 기르고 관리되고 있는 한우와 밀양축협한우프라자 한우의 귀에 이표 관리번호가 새겨진 BioTaq을 부착하여 시료를 얻었어, BioTaq에서 채취한 조직 시료에서 DNA를 추출 하여 농도를 측정하고 증폭과정을 거쳐 DNA를 분석한 결과를 디지털화 하였다.



Fig 16. 부산대에서 진행되고 있는 밀양초우의 DNA 동일성 검사 추진 체계



Fig 17. 부산대에서 진행되고 있는 밀양초우의 DNA 동일성 검사 추진 체계를 통하여 동일성이 인증되어 판매되는 한우 육

< 제 1 위탁과제 : DNA 감식기법을 위한 표준 진단 Kit 개발 >

1. MS marker 선정 및 labeled oligo 제작

1) MS marker 선정 및 labeled oligo 제작

① 마커선정

분석에 필요한 마커는 선행연구결과와 ISAG(International Society for Animal Genetics) 및 Roslin 연구소에서 제안한 마커와 Applied Biosystems사의 StockMarks에 사용되는 마커를 참고하여 20개를 선정하였다.

Table 33. Information of Microsatellites

No.	Locus	Oligo labeling	<i>N</i>	Size range(bp)
1	TGLA227	FAM	163	82~112
2	SPS115	FAM	163	248~270
3	ETH3	TAMRA	163	121~133
4	BM1818	TAMRA	163	166~278
5	BM4305	FAM	163	147~171
6	TGLA122	JOE	163	136~186
7	ETH10	TAMRA	163	215~231
8	BM2113	FAM	163	128~158
9	ILSTS028	TAMRA	163	136~164
10	BM1824	TAMRA	162	178~198
11	ETH185	JOE	163	228~244
12	ILSTS006	FAM	160	281~309
13	BL1009	FAM	163	159~185
14	ILSTS103	FAM	161	220~302

No.	Locus	Oligo labeling	<i>N</i>	Size range(bp)
15	ILSTS013	JOE	159	123~143
16	TGLA126	JOE	163	122~132
17	ETH225	TAMRA	162	141~163
18	TGLA53	JOE	163	156~188
19	INRA23	JOE	163	126~222
20	BMS1747	JOE	162	91~105

② 올리고머 제작

경제적이고 효율적인 분석을 위하여, 증폭물질의 예상 크기를 고려하여, 정방향 올리고의 5'쪽에 세가지의 형광물질을 부착하여 제작하였다(Table 23).

가) 다형성 분석

○ 한우 시료 확보

유전적 다형성 분석을 위한 한우시료는 축산물등급판정소로부터 축산물 이력추적 시스템 시범사업에 참여하고 있는 9개 브랜드 400두에 대한 DNA를 분양을 받았다 (Table 22)

Table 34. 소고기이력 추적시스템의 DNA 시료.

브랜드	DNA	Concentration(ng/ul)
팔공상강	33	5ng/ul, 10ul
양평개군	33	5ng/ul, 10ul
안성마춤	27	5ng/ul, 10ul
횡성	52	5ng/ul, 10ul
장수	54	5ng/ul, 10ul
섬진강뜨레	51	5ng/ul, 10ul
남해화전	27	5ng/ul, 10ul
하동솔잎	54	5ng/ul, 10ul
대관령	69	5ng/ul, 10ul
총 계	400	

○ 분석 방법

확보된 400두 각각에 대한 20개 마커의 다형성 분석을 위하여, 각 마커 올리고의 annealing temperature, PCR product size, 또는 부착된 형광물질등을 고려하여 4개의 조합으로 나누어 진행하였다(Table 24).. 각 조합별 Multiplex PCR 반응은 주형 DNA 10ng을 사용하였으며, Taq DNA polymerase 0.5U(Gold Taq, ABI), 각 조합별로 올리고 0.7, 0.4, 0.8, 0.2umole을 사용하였다. PCR 조건은 95에서 15분간 denaturation을 1회 실시하였고, 95도씨 1분 denaturation, 56도씨 1분간 annealing, 72도씨에서 50초간 elongation과정을 31회 반복하였다. 최종 72도씨에서 1시간, 60도씨에서 1시간 추가로 extension시킨 후, 8도씨에서 과정을 종료하였다. PCR 산물은 30X dilution시킨후, 자동염기서열 분석장치(ABI 3100, Applied Biosystems사, USA)를 이용하여 자동 전기영동 시킨후, 분석프로그램인 Genemapper V3.7(Applied Biosystems사, USA)로 분석을 실시하였다.

Table 35. Groups of microsatellites markers amplified in multiplex PCRs.

Multiplex PCR SET			
SET 1	SET 2	SET 3	SET 4
TGLA227 BM4305 SPS115		BM2113 BL1009 ILSTS 103 ILSTS006	BL1009
ETH3 ETH10 BM1818	ETH225	ILSTS028 BM1824	
TGLA122	TGLA126 TGLA53 INRA23	BMS1747 ILSTS013	ETH185

다형성 분석을 위해 진행된 multiplex PCR은 그림 18과 같은 유형으로 반응이 나타났으며 20개의 마커 모두 증폭이 확인이 되었다. ETH3, ETH225, ILSTS006등에서는 유전자의 증폭이 다소 약하게 나타났으나, 대립유전자의 확인은 가능한 것으로 판단되었다.

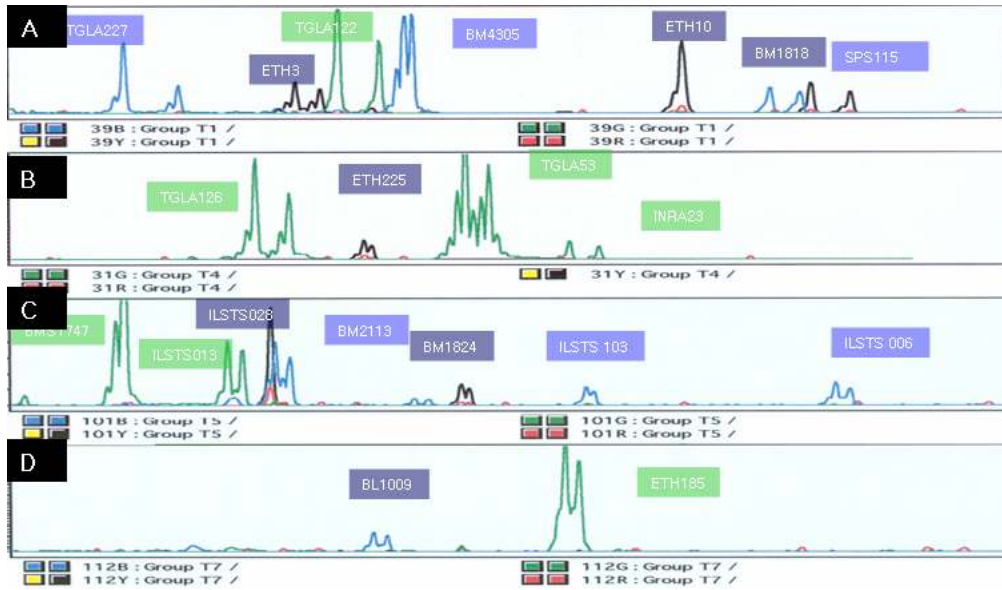


Fig 18. 각 조합별로 실시한 multiplex PCR의 microsatellites profile.

A : SET 1, B : SET 2, C : SET 3, D : SET 4

○ 다형성 지수 분석결과

Table 36. 다형성 지수 분석결과 순위

순위	Locus	N	No. of alleles	Size range(bp)	PIC
1	TGLA53	362	15	156~188	0.867
2	TGLA122	362	18	136~186	0.850
3	BL1009	362	15	159~185	0.836
4	TGLA227	362	12	82~112	0.835
5	SPS115	362	9	248~270	0.828
6	BM4305	362	13	147~171	0.798
7	ILSTS103	362	12	220~302	0.767
8	ETH185	362	9	228~244	0.760
9	INRA23	362	14	126~222	0.759
10	ETH3	362	6	121~133	0.741

순위	Locus	N	No. of alleles	Size range(bp)	PIC
11	ETH225	362	8	141~163	0.728
12	ETH10	362	11	215~231	0.722
13	ILSTS006	362	13	281~309	0.721
14	BM2113	362	10	128~158	0.716
15	ILSTS013	362	7	123~143	0.703
16	BMS1747	362	6	91~105	0.702
17	BM1824	362	8	178~198	0.631
18	BM1818	362	11	166~278	0.623
19	TGLA126	362	6	122~132	0.618
20	ILSTS028	362	6	136~164	0.354

2. Kit 구성을 위한 구성제품 및 조건 개발

1) Taq DNA Polymerase 및 reaction buffer 조성 조건

① Microsatellites 마커 선정

분석에 필요한 마커는 시험시행되고 있는 쇠고기이력추적시스템에 적용되고 있는 11개의 마커를 이용하였다(Table 25).

② MS typing 조건

가) Multiplexing PCR Condition

11개의 마커를 한번의 PCR반응으로 완전한 정보를 확보하기위해서 다음과 같은 조건을 사용하였다. 먼저 95℃에서 15분간 denaturation을 1회 실시하였고, 95℃ 1분 denaturation, 56℃ 1분간 annealing, 72℃에서 50초간 elongation과정을 31회 반복하였다. 최종 72℃에서 1시간, 60℃에서 1시간 추가로 extension시킨 후, 8℃에서 과정을 종료하였다.

나) Taq DNA Polymerase 선정

○ Taq DNA Polymerase 종류별 비교

DNA의 특정 부분을 증폭할 시에는 많은 변수들이 따르지만 무엇보다도 중요한 역할을 하며, 또한 매우 고가의 시약으로 유전자 동일성 검사시 상당부분의 비용을 담당한다. *Thermus aquaticus*로부터 분리된 Taq DNA Polymerase는 그 종류가 매우 다양하며, 그에 따라 DNA를 증폭양상 또한 상이하다. PCR 증폭과정은 기본적으로 고온과 저온을 오가며 진행되기 때문에 열에 민감하다 할 수 있으며, A-addition 효율, 증폭 에러율등이 종류에 따라 많은 차이를 보인다. 따라서 Taq DNA Polymerase는 좀 더 내열성이 강하고, 원하는 타겟 부위를 정확하게 증폭해 낼 수 있는 기능 즉, proof reading기능이 있어야 하며, A-addition에 민감해야만 한다. 본 연구에서는 proof reading기능이 있는 것과 hot start용으로 제조되어 판매되는 제품들을 비교하여 최적의 것을 탐색하고자 하였으며, 여러 종류의 일반 Taq DNA Polymerase 와 hot start PCR용 Taq DNA Polymerase를 이용하여 증폭 효율을 살펴본 결과 그림 19, 그림 20과 같이 종류에 따라 상이한 결과를 보였다.

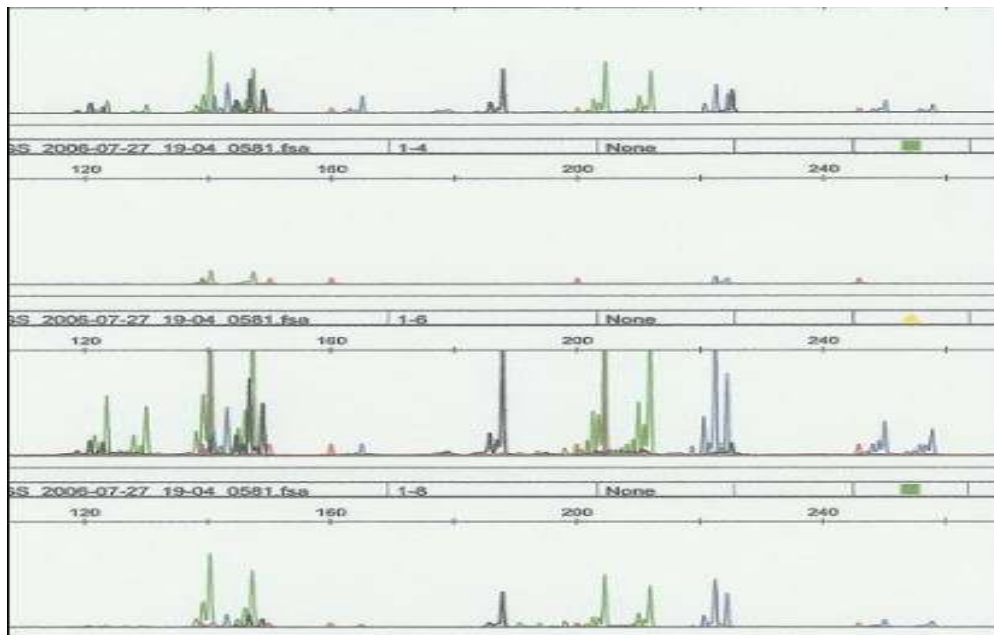


Fig 19 . Taq DNA Polymerase의 종류에 따른 microsatellites profile.

A : A사 Hot-Taq DNA Polymerase(국내), B : A사 Taq DNA Polymerase(국내), C : (주)젠닥스 Hot-Taq DNA Polymerase(국내), D : (주)젠닥스 Taq DNA Polymerase

○ Taq DNA Polymerase 종류에 따른 마커별 증폭 활성화도 비교

선행연구결과, hot start용 효소류들이 다중 증폭에 좀 더 효과적임을 알 수 있었으나, 특히 마커의 경우 효소마다 미세한 증폭의 양상 차이가 나타난다. 대부분의 마커 영역에서 정확한 allele를 증폭해 내었지만 TGLA53과 TGLA126 마커의 경우에는 증폭량의 차이가 비교적 큼을 확인할 수 있었다(그림. 1).

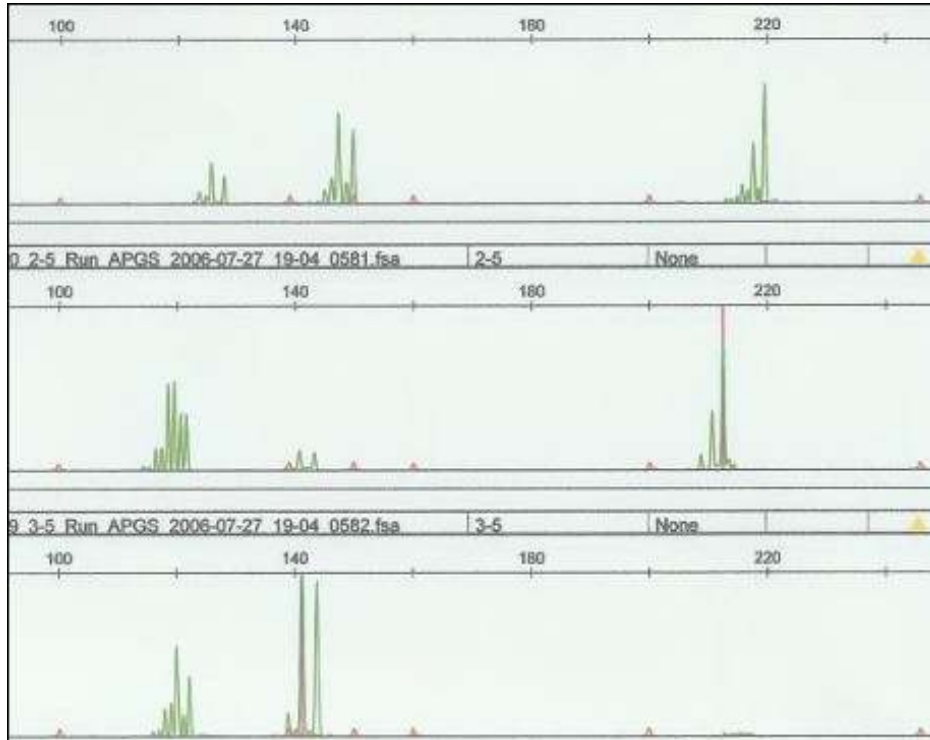


Fig 20. 세 종류의 hot start Taq DNA polymerase의 마커별 증폭 양상.

A : (주)젠닥스, B : A사, C : C사

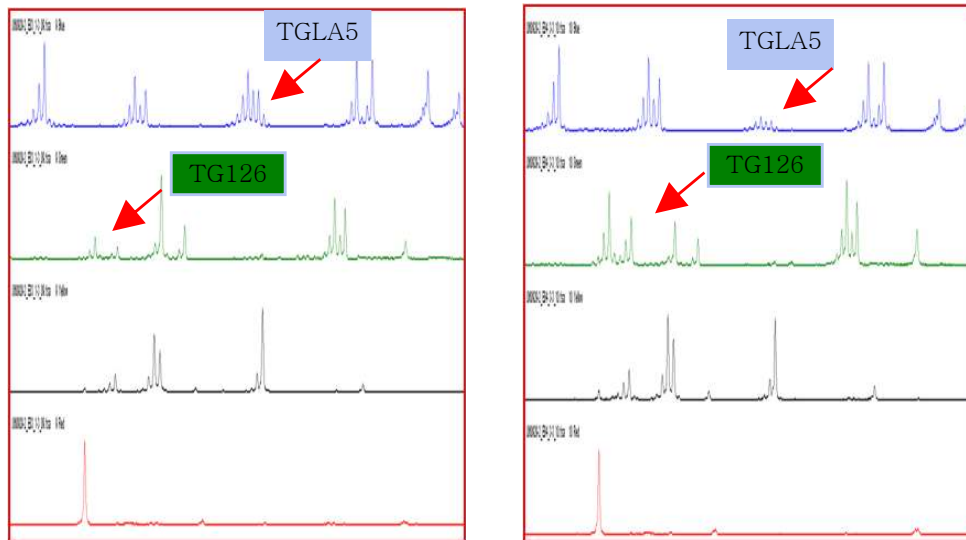


Fig 21. 두종류의 hot start Taq DNA polymerase의 마커별 증폭 양상.
 A : B사, 0.5U, B : (주)젠닥스, 0.5U

③ Reaction buffer 조성

PCR을 수행함에 있어 가변적으로 응용할 수 있는 부분중, MgCl₂ 농도는 매우 중요하며, 특히 multiplex PCR시에는 많은 마커들이 한꺼번에 증폭되어야 하기 때문에, 좀 더 적절한 농도의 buffer 조성이 필요하다. 일반적으로 Mg²⁺는 dNTP와 복합체를 형성하여 효소의 실질적인 substrate로 이용되며, free Mg²⁺의 농도는 dNTP, free pyrophosphate, EDTA같은 이온 결합 물질의 농도에 영향을 받게 된다. MgCl₂의 일반적인 사용은 1.5mM이며, 과도한 Mg²⁺의 사용은 primer의 비특이적인 결합과 noise를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 이러한 농도 조성을 조사하여 보다 효과적인 multiplex 조건을 탐색하고자 하였다. 아래 그림 처럼 농도가 변함에 따라 각 마커들의 증폭양상이 다르게 나타남을 볼 수 있으며, 1.5mM 또는 1.7mM배에서 비교적 안정적인 마커들의 증폭이 관찰되었다.

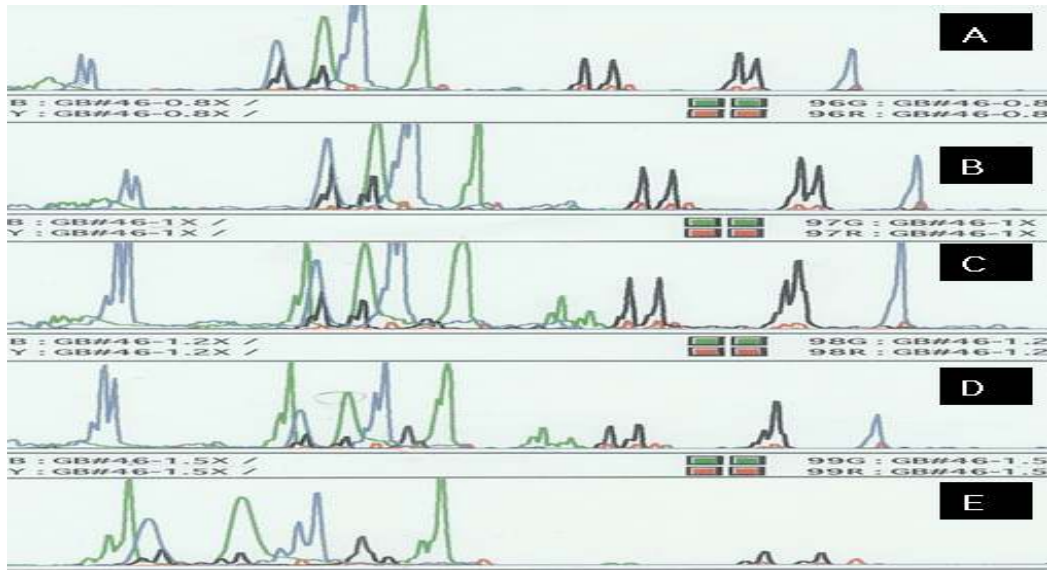


Fig 22. $MgCl_2$ 농도의 변화에 따른 microsatellites profile.

A : 1.3mM, B : 1.5mM C : 1.7mM, D : 1.9mM, E : 2.1mM

또한 dNTPs mix의 농도에 따라 PCR 증폭양상이 매우 다양하게 나타나는데 높은 dNTP농도는 free Mg^{2+} 을 감소시켜 효소의 반응을 방해하고 primer의 annealing을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 더불어 dNTP의 불균형은 Taq DNA Polymerase의 fidelity를 감소시켜 error rate가 증가시키게 되므로 적절한 농도의 확인이 필요하다. 2.5mM stock을 농도별로 확인한 결과 1X에서 가장 이상적인 것으로 나타났다.

일반적으로 PCR 반응에 필요한 Salt농도는 40mM정도인데, 70~100mM 정도까지는 PCR product dml 양을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 높은 salt농도에서 longer DNA의 denaturation이 느려지게 됨으로 특히 multiplex PCR시에 보다 긴 product를 만들기 위해서는 salt의 농도를 낮추어주고, 반대로 짧은 product를 얻고자 할 때에는 salt의 농도를 높여준다. 실험결과 본 multiplex PCR 시스템에는 60mM정도의 농도가 적당하였으며, 농도가 낮을 수록 증폭률이 현저히 떨어지는 것으로 나타났다.

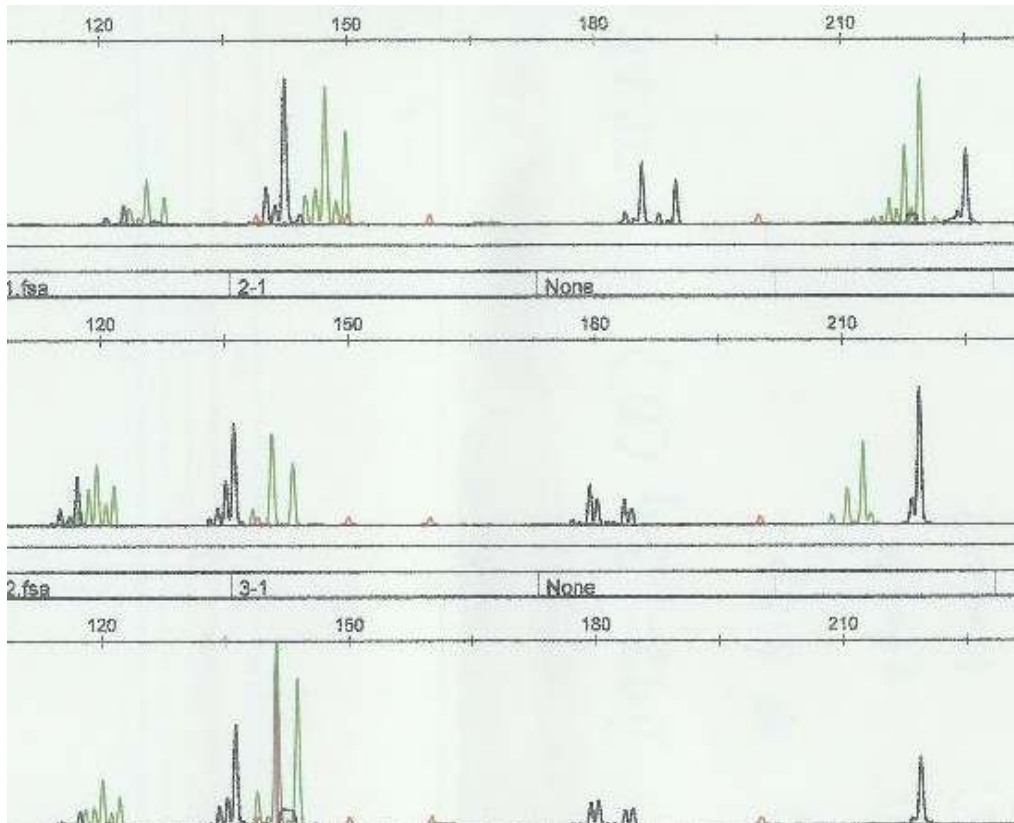


Fig 23. 2.5mM dNTPs 농도의 변화에 따른 microsatellites profile.

A : 1X, B : 1.2X, C : 1.4X

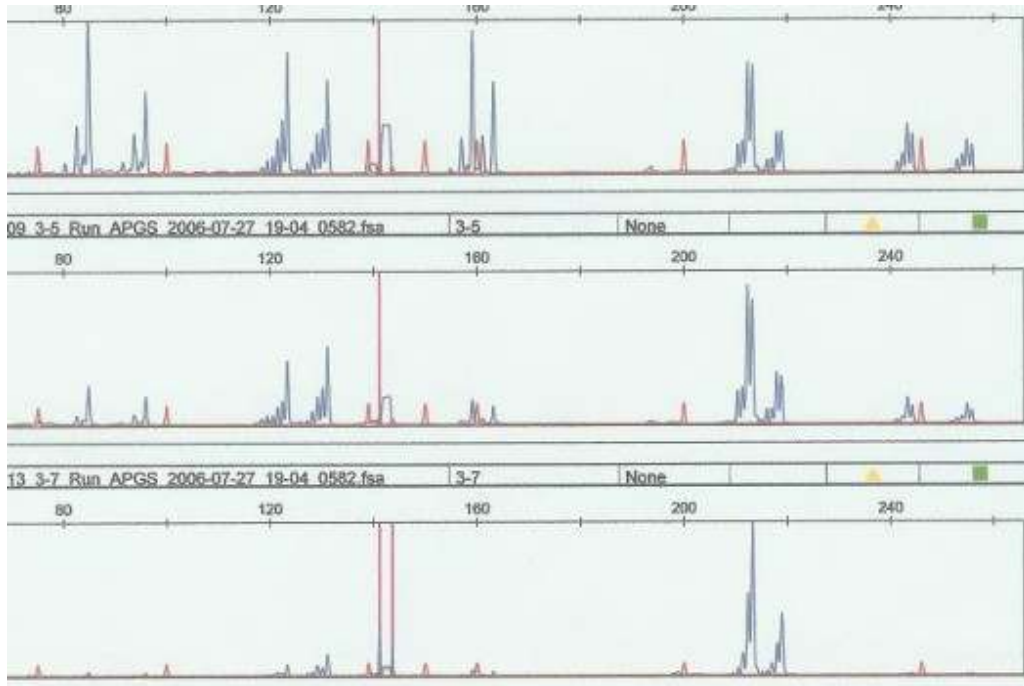


Fig 24. KCl 농도의 변화에 따른 microsatellites profile.
 A : 60mM, B : 50mM, C : 40mM

④ 11개 마커 동시증폭을 위한 Multiplexing PCR 조건

앞서의 조사로부터 선정된 Taq DNA Polymerase, reaction buffer 농도 및 PCR Cycle조건 등을 바탕으로 multiplex PCR을 수행하여 11개 마커를 1회 반응으로 안정적으로 증폭될 수 있도록 하였으며, 그림 20 처럼 11개의 마커가 모두 증폭이 됨을 확인 하였으며, 축산물등급판정소와의 대립유전자 비교에서도 정보가 정확히 일치함을 확인하였다.

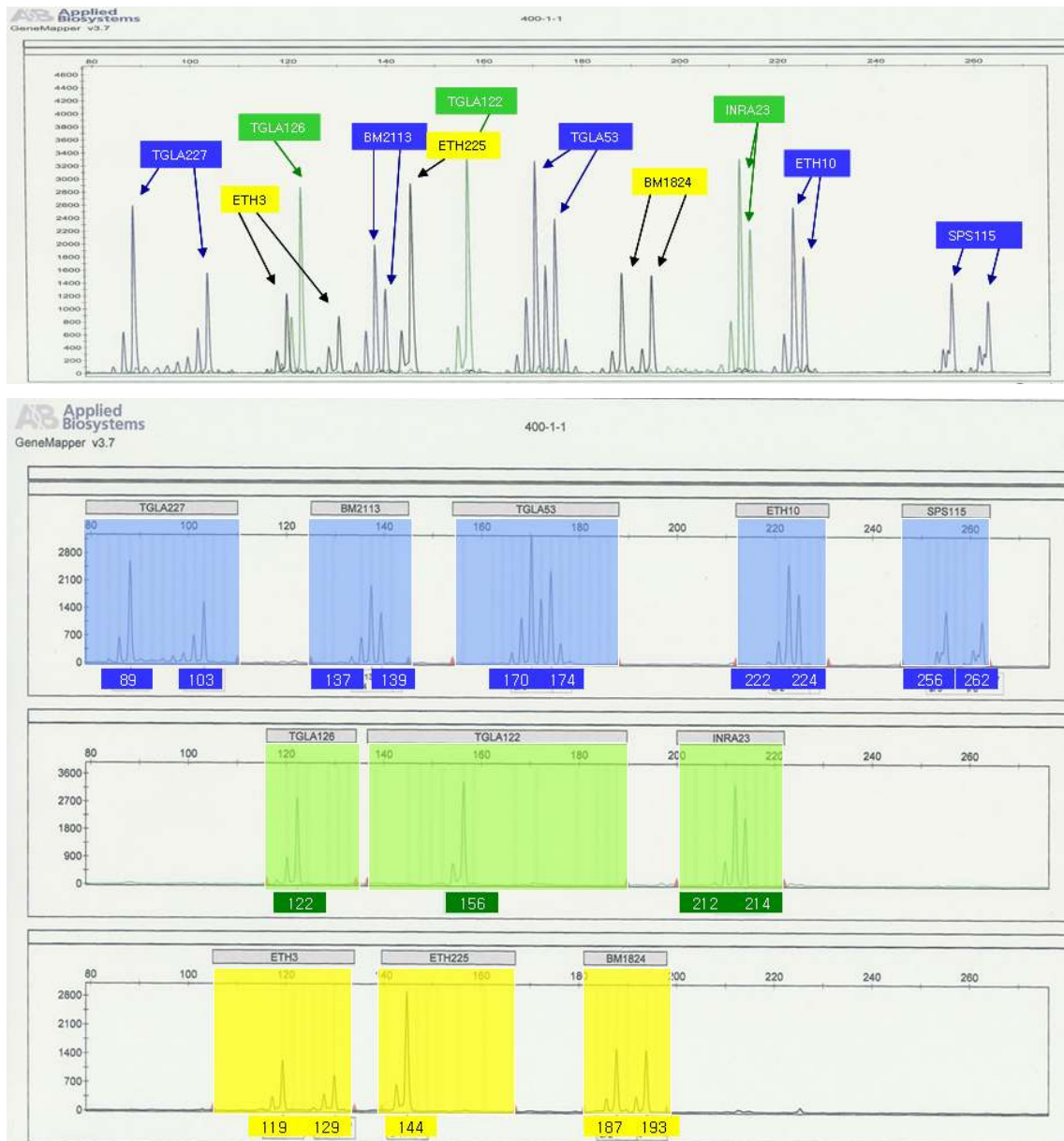


Fig 25. PCR reaction buffer농도의 변화에 따른 microsatellites profile.

11개 마커에 대한 Multiplex PCR후, PCR 산물을 자동염기서열 분석장치 ABI 3100(Applied Biosystems사, USA)으로 전기영동 하였으며, GeneMapper v3.7(Applied Biosystems사, USA) 프로그램으로 분석하였다.

2) Labeled Size Standard 개발

labeled size standard는 유전자 다형성 분석시 크기 분별자의 역할로 반드시 필요하며, 기존의 size standard는 감식키트와 마찬가지로 전량 수입에 의존하고 있으며, 국내제품은 전무한 상황이다. 이에 국산 한우 개체식별 키트와 더불어 형광물질로 lable된 size standard를 국산화 하고자 하였다.

① Template DNA

labeled size standard개발을 위한 여러 가지 방법이 있으나, 본 과제에서는 PCR에 기초한 방법으로 개발코자 하였다. 이를 위해서는 우선 PCR의 주형이 될 수 있는 template DNA가 선택되어야 하는데, 흔히 cloning을 위해 사용되는 2.8kb pT7Blue(R) Vector(Invitrogen,, USA)를 선정하였다.(그림)

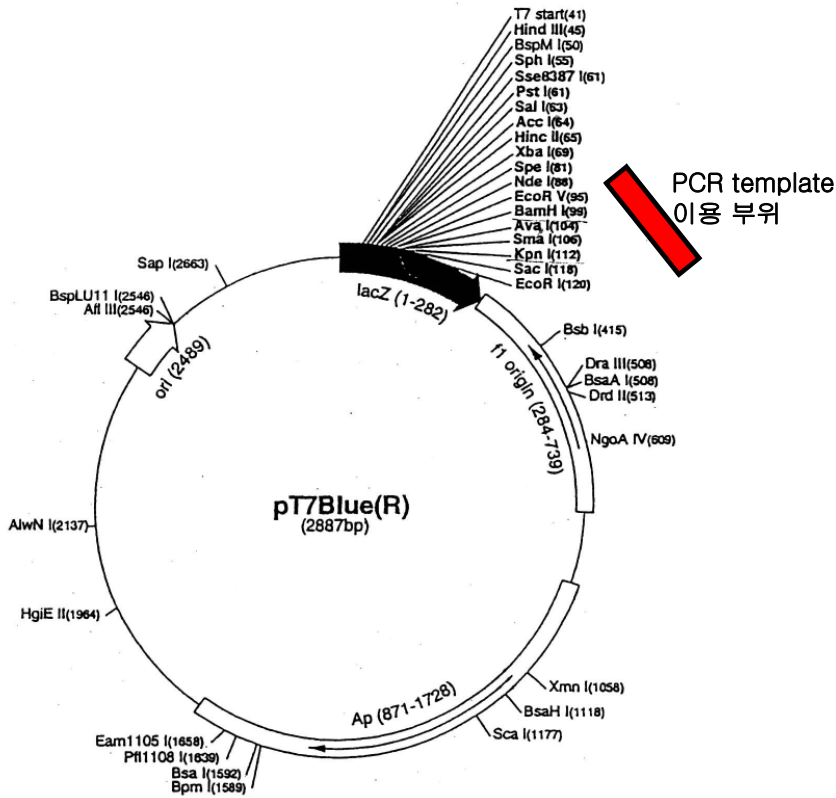


Fig 26. pT7Blue(R) vector map

ori-F-ROX

GAGTGTGTGTT CCAGTTTGGGA ACAAGAGTCC ACTATTAAAG AACGTGGACT CCAACGTCAA AGGGCGAAAA ACCGTCTATC
50R

AGGGCGATGG CCCACTACGT GAACCATCAC CCTAATCAAG TTTTTTGGGG TCGAGGTGCC GTAAAGCACT AAATCGGAAC
72R 100R 139R 150R 160R

CCTAAAGGGA GCCCCCGATT TAGAGCTTGA CGGGGAAAGC CGGCGAACGT GGCAGAAAAG GAAGGGAAGA AAGCGAAAGG
200R

AGCGGGCGCT AGGGCGCTGG CAAGGTAGC GGTACGCTG CGCGTAACCA CCACACCGC CGCGCTTAAT GCGCCGTAC
250R 300R

AGGGCGCGTC AGGTGGCACT TTTGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG
340R 350R 400R

TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTT
450R

TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTT
490R 500R

② 각 size에 대한 Insert fragment의 Primer design

Size standard를 이루는 각 size fragments들의 primer는 vector sequence를 기초로 하여 아래처럼 design하였다. 먼저 ROX dye와 TAMRA dye로 labling된 Forward primer를 결정하고, 각 size에 해당하는 reverse primer를 결정하였다. Forward primer는 하나로 통일하고, reverse primer는 각각의 size에 맞게 설계하였다.

③ Insert fragments의 증폭

각 size에 대한 PCR 증폭은 아래의 조건으로 실시하였으며, 그림 에서 처럼 2% agrose gel에 전기영동하여 완전하게 증폭이 됨을 확인하였다.

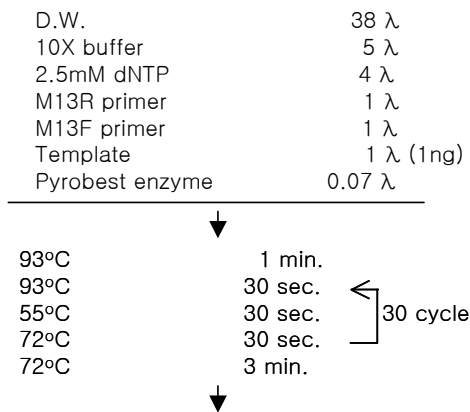


Fig 27. 각 size fragments들의 전기영동

④ 각 size fragments들의 정제 및 농축

PCR을 수행한 각 size fragments들은 target product외에 비특이적 밴드들과 올리고 dimer등이 존재하기 때문에 일정한 품질을 확보하기 위해서는 정제과정이 필수적이며, 또한 각 fragments들의 농도가 상이하기 때문에 적절한 농축과정을 통해 일정한 농도를 맞추어야 한다.

정제방법은 EtOH precipitation법으로 수행하였으며, 먼저 PCR Product 50ul에 3N NaOAc 5ul, 100% EtOH 125ul를 첨가한 후 13,000rpm에서 20분간 원심분리를 수행한 후, 상층액을 버린다음 다시 70% EtOH로 washing 과정을 거친다. 남아있는 EtOH를 충분히 제거한후, 0.1X TE로 녹여낸다.

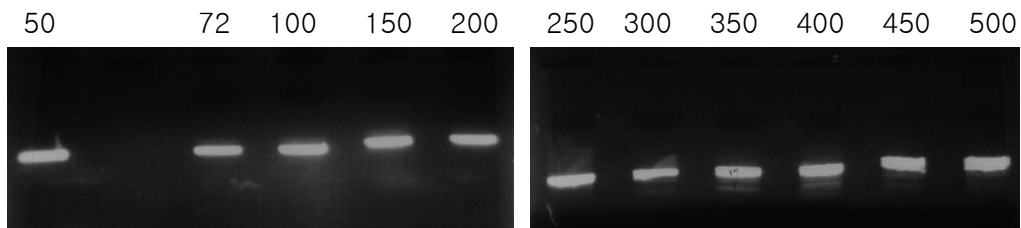


Fig 28. 각 size fragments들의 정제 후 agarose gel 전기영동모습

⑤ 각 size fragments의 확인

정제된 product는 Hi-Di formamide와 섞어서 자동전기영동분석장치에서 분석을 실시하며, 정확한 size를 확인하기 위하여 GeneScan 500-ROX(AppliedBiosystems사, USA)와

mix하여 비교분석한다. ROX dye와의 구별을 위하여 TAMRA로 labling된 primer를 사용하였으며, 확인결과 그림 에서 처럼 미세한 차이는 있으나 거의 정확하게 일치하는 것으로 나타났다.

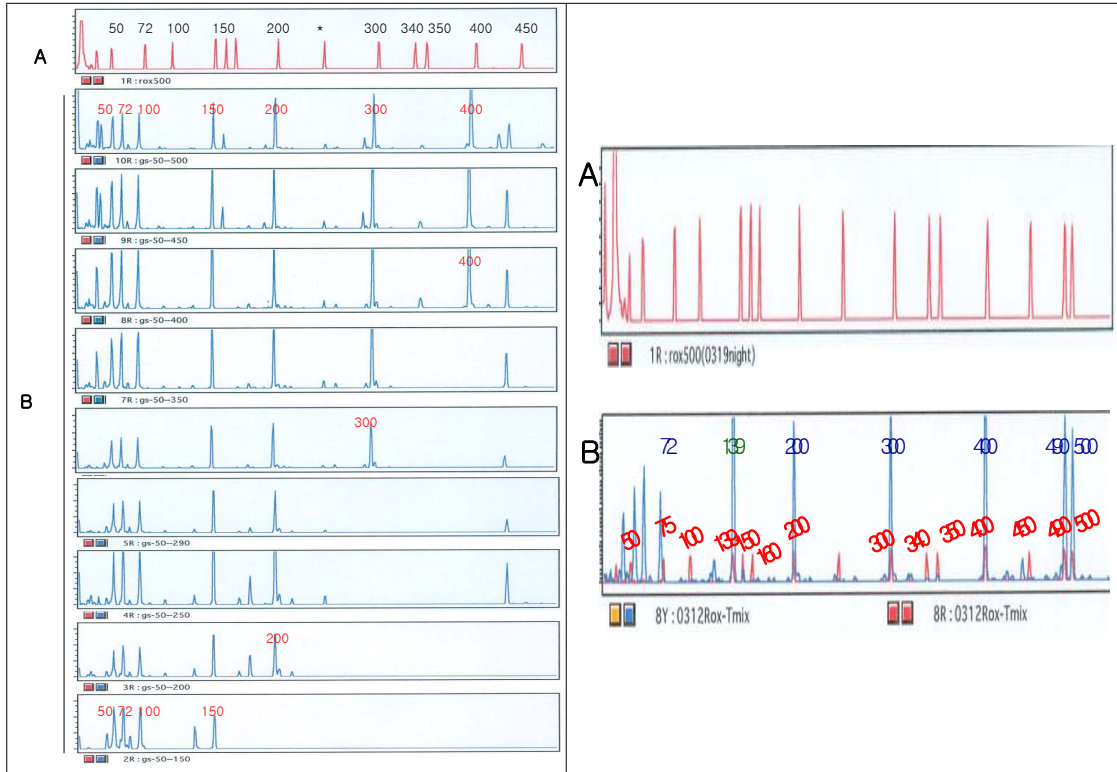


Fig 29.. 개발중인 size standard(GeneSizer50)의 자동전기영동장치에서의 분석모습
 A : GeneScan500-ROX(AppliedBiosystems, USA), B : GeneSizer 50

⑥ labeled size standard의 완성

각각의 fragments들은 1차 mix한 후에 각각의 높이를 조정해야만 한다. 즉, 임의의 높이를 설정하여 차이가 나는 size에 대하여 용량을 재조정후 최종적으로 Hi-Di formamide와 섞어서 자동전기영동분석장치에서 분석을 실시하였다. 그림 에서 처럼 일정하게 높이가 조정된 labeled size standard를 완성하였다.

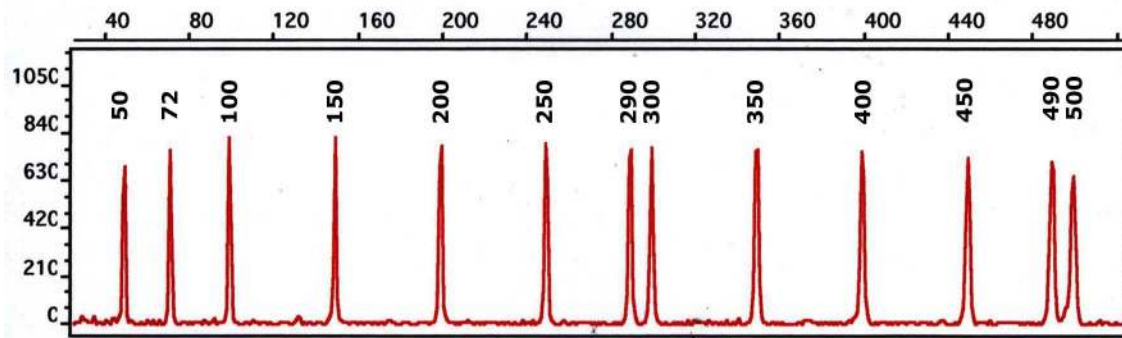


Fig 30. GeneSizer50의 완성된 모습

3) Kit 구성에 필요한 accessory 개발

본 과제에서 개발된 키트를 이용하여 서로 다른 기관과 기기를 이용하여 한우의 microsatellites를 분석하고 정보를 표준화하고 공유하기 위해서는 자동분석에 필요한 Panel 및 Binset이 필요하다. Panel 이라함은 분석에 사용된 마커 명칭, 마커의 label color 및 마커가 나타날 수 있는 범위등을 모두 포함하는 data file을 말하며, Binset은 각 각의 마커에서 나타날 수 있는 allele을 지정해주고, 또한 각 allele이 나타나는 size범위를 지정해주는 data file이다. 즉, 서로 다른 분석환경에서도 항상 표준화된 값을 도출할 수 있는 기준자의 역할을 하게 된다.

① GeneMapper용 Panel

가) 11개 마커 Oneplex system 용

Kit type: MICROSATELLITE

Chemistry Kit	GenDocs_MS	null							
Panel	11MS_Oneplex	null							
TGLA227	blue	76.0	117	-	2	0.0	none	none	
	false								
BM2113	blue	123.0	156.5	-	2	0.0	none	none	
	false								
TGLA53	blue	157.0	196.0	-	2	0.0	none	none	
	false								
ETH10	blue	205.0	230.33	-	2	0.0	none	none	
	false								
SPS115	blue	240.0	275.0	-	2	0.0	none	none	
	false								
TGLA126	Green	116.0	136.0	-	2	0.0	none	none	
	false								
TGLA122	Green	137.0	195.0	-	2	0.0	none	none	
	false								

INRA23	Green	196.0	225.0	-	2	0.0	none	none
ETH3	Yellow	105.0	139.0	-	2	0.0	none	none
ETH225	Yellow	141.0	170.0	-	2	0.0	none	none
BM1824	Yellow	176.0	205.0	-	2	0.0	none	none

나) 13개 마커 Oneplex system 용

Version GM v 4.0

Kit type: MICROSATELLITE

Chemistry Kit GenDocs_MS Discrimination

Panel 13MS_Oneplex none

TGLA227	blue	76.0	115.0	-	2	0.0	none	none
BM2113	blue	123.0	156.0	-	2	0.0	none	none
TGLA53	blue	157.0	196.0	-	2	0.0	none	none
ETH10	blue	211.0	231.0	-	2	0.0	none	none
SPS115	blue	240.0	273.0	-	2	0.0	none	none
TGLA126	Green	116.0	136.0	-	2	0.0	none	none
TGLA122	Green	137.0	193.5	-	2	0.0	none	none
INRA23	Green	196.0	227.0	-	2	0.0	none	none
ETH3	Yellow	105.0	137.0	-	2	0.0	none	none
ETH225	Yellow	141.0	165.0	-	2	0.0	none	none
BM1824	Yellow	178.0	201.46	-	2	0.0	none	none
CA209	Red	113.0	150.0	-	2	0.0	none	none
BM741	Red	185.5	200.0	-	2	0.0	none	none

② GeneMapper용 Binset

가) 11개 마커 Oneplex system 용

Version GM v 4.0

Chemistry Kit GenDocs_11MS

BinSet Name	GenDocs_MS_BIN			
Panel Name	11MS_Oneplex			
Marker Name	TGLA227			
9	77.47	0.5	0.5	dark gray
10	79.67	0.5	0.5	dark gray
11	81.87	0.29	0.34	dark gray
12	84.06	0.28	0.34	dark gray
13	86.24	0.27	0.37	dark gray
14	88.38	0.31	0.32	dark gray
15	90.63	0.26	0.42	dark gray
16	92.81	0.28	0.36	dark gray
17	95.03	0.3	0.37	dark gray
18	97.24	0.33	0.34	dark gray
19	99.42	0.34	0.37	dark gray
20	101.46	0.32	0.39	dark gray
21	103.4	0.27	0.39	dark gray
22	105.43	0.29	0.37	dark gray
23	107.45	0.28	0.38	dark gray
24	109.45	0.5	0.5	dark gray
25	111.45	0.5	0.5	dark gray
26	113.5	0.5	0.5	dark gray
27	115.5	0.5	0.5	dark gray
Marker Name	BM2113			
12	125.13	0.25	0.26	dark gray
13	127.18	0.27	0.24	dark gray
14	129.12	0.26	0.26	dark gray
15	131.14	0.22	0.23	dark gray
16	132.97	0.24	0.23	dark gray
17	134.81	0.21	0.27	dark gray
18	136.79	0.28	0.26	dark gray
19	138.77	0.26	0.23	dark gray
20	140.94	0.26	0.23	dark gray
21	143.12	0.26	0.25	dark gray
22	145.29	0.25	0.3	dark gray
23	147.46	0.26	0.31	dark gray

24	149.6	0.5	0.5	dark gray
25	151.77	0.5	0.5	dark gray
26	153.64	0.21	0.35	dark gray
27	155.62	0.21	0.31	dark gray

Marker Name TGLA53

20	158.42	0.35	0.43	dark gray
21	160.38	0.5	0.5	dark gray
22	162.38	0.4	0.45	dark gray
23	164.41	0.28	0.35	dark gray
24	166.4	0.26	0.33	dark gray
25	168.32	0.3	0.33	dark gray
26	170.4	0.26	0.32	dark gray
27	172.38	0.3	0.35	dark gray
28	174.35	0.27	0.35	dark gray
29	176.34	0.26	0.35	dark gray
30	178.37	0.29	0.35	dark gray
31	180.37	0.28	0.35	dark gray
32	182.33	0.3	0.35	dark gray
33	184.41	0.3	0.35	dark gray
34	186.4	0.5	0.5	dark gray
35	188.28	0.3	0.35	dark gray
36	190.23	0.26	0.35	dark gray
37	192.25	0.3	0.4	dark gray
38	194.25	0.5	0.5	dark gray

Marker Name ETH10

12	209.01	0.27	0.25	dark gray
13	210.89	0.27	0.25	dark gray
14	212.76	0.25	0.25	dark gray
15	214.57	0.25	0.26	dark gray
16	216.53	0.26	0.26	dark gray
17	218.39	0.25	0.27	dark gray
18	220.18	0.25	0.26	dark gray
19	222.19	0.25	0.25	dark gray
20	224.1	0.25	0.25	dark gray
21	226.01	0.25	0.25	dark gray

22	227.98	0.26	0.25	dark gray
23	229.88	0.5	0.45	dark gray

Marker Name SPS115

17	241.97	0.5	0.5	dark gray
18	243.82	0.3	0.37	dark gray
19	245.67	0.5	0.5	dark gray
20	247.53	0.3	0.36	dark gray
21	249.45	0.5	0.5	dark gray
22	251.41	0.31	0.39	dark gray
23	253.43	0.3	0.4	dark gray
24	255.25	0.31	0.38	dark gray
25	257.17	0.3	0.38	dark gray
26	259.09	0.5	0.5	dark gray
27	261.0	0.28	0.39	dark gray
28	262.9	0.5	0.5	dark gray
29	264.8	0.5	0.5	dark gray
30	266.7	0.5	0.5	dark gray
31	268.6	0.5	0.5	dark gray
32	270.5	0.5	0.5	dark gray

Marker Name TGLA126

15	119.37	0.31	0.37	dark gray
16	121.46	0.3	0.31	dark gray
17	123.56	0.28	0.31	dark gray
18	125.66	0.31	0.35	dark gray
19	127.77	0.31	0.3	dark gray
20	129.89	0.3	0.3	dark gray
21	132.0	0.3	0.35	dark gray
22	134.15	0.31	0.36	dark gray

Marker Name TGLA122

20	138.5	0.5	0.5	dark gray
21	140.7	0.28	0.28	dark gray
22	142.9	0.27	0.35	dark gray
23	145.27	0.27	0.37	dark gray
24	147.63	0.3	0.31	dark gray
25	149.98	0.25	0.3	dark gray

26	152.09	0.25	0.37	dark gray
27	154.27	0.3	0.35	dark gray
28	156.5	0.28	0.35	dark gray
29	158.45	0.32	0.36	dark gray
30	160.63	0.35	0.37	dark gray
31	162.71	0.5	0.5	dark gray
32	164.86	0.32	0.41	dark gray
33	167.03	0.34	0.4	dark gray
34	169.1	0.5	0.5	dark gray
35	171.2	0.37	0.4	dark gray
36	173.24	0.38	0.4	dark gray
37	175.39	0.5	0.5	dark gray
38	177.53	0.4	0.4	dark gray
39	179.71	0.33	0.4	dark gray
40	181.7	0.5	0.5	dark gray
41	183.8	0.5	0.5	dark gray
42	185.82	0.35	0.4	dark gray
43	187.85	0.5	0.5	dark gray
44	189.85	0.5	0.5	dark gray

Marker Name INRA23

12	196.3	0.1	0.5	dark gray
13	198.55	0.5	0.5	dark gray
14	200.4	0.5	0.5	dark gray
15	202.24	0.26	0.3	dark gray
16	204.1	0.5	0.5	dark gray
17	205.96	0.26	0.31	dark gray
18	207.75	0.26	0.3	dark gray
19	209.63	0.27	0.3	dark gray
20	211.51	0.28	0.3	dark gray
21	213.42	0.27	0.28	dark gray
22	215.41	0.28	0.28	dark gray
23	217.27	0.26	0.32	dark gray
24	219.22	0.29	0.28	dark gray
25	221.02	0.25	0.27	dark gray
26	222.91	0.26	0.26	dark gray

Marker	Name	ETH3		
15	106.36	0.5	0.5	dark gray
16	108.46	0.5	0.5	dark gray
17	110.56	0.5	0.5	dark gray
18	112.66	0.5	0.5	dark gray
19	114.76	0.25	0.24	dark gray
20	116.85	0.25	0.28	dark gray
21	118.95	0.5	0.5	dark gray
22	121.05	0.25	0.27	dark gray
23	123.18	0.26	0.28	dark gray
24	125.46	0.25	0.25	dark gray
25	127.38	0.27	0.26	dark gray
26	129.41	0.28	0.27	dark gray
27	131.55	0.25	0.29	dark gray
28	133.75	0.5	0.5	dark gray
29	135.95	0.27	0.26	dark gray
Marker	Name	ETH225		
21	142.43	0.33	0.31	dark gray
22	144.7	0.32	0.34	dark gray
23	146.89	0.3	0.31	dark gray
24	149.13	0.34	0.32	dark gray
25	151.22	0.31	0.31	dark gray
26	153.25	0.32	0.32	dark gray
27	155.5	0.5	0.5	dark gray
28	157.75	0.5	0.5	dark gray
29	160.0	0.5	0.5	dark gray
30	162.31	0.37	0.34	dark gray
31	163.91	0.33	0.35	dark gray
Marker	Name	BM1824		
10	181.02	0.5	0.5	dark gray
11	183.14	0.34	0.34	dark gray
12	185.26	0.5	0.5	dark gray
13	187.38	0.37	0.29	dark gray
14	189.43	0.36	0.33	dark gray
15	191.49	0.35	0.32	dark gray

16	193.56	0.36	0.31	dark gray
17	195.66	0.38	0.33	dark gray
18	197.61	0.32	0.31	dark gray
19	199.61	0.5	0.5	dark gray
20	201.62	0.36	0.25	dark gray

나) 13개 마커 Oneplex system 용

Version GM v 4.0

Chemistry Kit GenDocs_13MS

BinSet Name GenDocs_MS_BIN

Panel Name 13MS_Oneplex

Marker Name TGLA227

9	77.4	0.57	0.49	dark gray
10	79.56	0.43	0.47	dark gray
11	81.42	0.45	0.45	dark gray
12	83.6	0.5	0.45	dark gray
13	85.77	0.45	0.45	dark gray
14	87.89	0.5	0.4	dark gray
15	90.12	0.45	0.45	dark gray
16	92.26	0.45	0.44	dark gray
17	94.44	0.45	0.45	dark gray
18	96.66	0.45	0.42	dark gray
19	98.79	0.47	0.4	dark gray
20	100.88	0.41	0.48	dark gray
21	102.82	0.44	0.43	dark gray
22	104.8	0.5	0.41	dark gray
23	107.04	0.5	0.46	dark gray
24	109.6	0.5	0.4	dark gray
25	111.96	0.5	0.4	dark gray
26	114.12	0.5	0.4	dark gray

Marker Name BM2113

14	128.76	0.45	0.45	dark gray
15	130.78	0.45	0.45	dark gray
16	132.67	0.45	0.45	dark gray
17	134.48	0.45	0.45	dark gray

18	136.46	0.45	0.45	dark gray
19	138.46	0.45	0.45	dark gray
20	140.61	0.45	0.45	dark gray
21	142.8	0.45	0.45	dark gray
22	144.95	0.45	0.45	dark gray
23	147.07	0.45	0.45	dark gray
24	149.0	0.4	0.4	dark gray
25	151.0	0.4	0.4	dark gray
26	153.29	0.4	0.4	dark gray
27	155.29	0.4	0.4	dark gray
12	124.74	0.34	0.31	dark gray
13	126.8	0.45	0.45	dark gray

Marker Name TGLA53

20	157.97	0.34	0.48	dark gray
21	160.3	0.4	0.4	dark gray
22	161.96	0.4	0.45	dark gray
23	163.9	0.47	0.53	dark gray
24	165.85	0.5	0.52	dark gray
25	167.86	0.38	0.42	dark gray
26	169.9	0.5	0.48	dark gray
27	171.85	0.5	0.47	dark gray
28	173.88	0.46	0.49	dark gray
29	175.87	0.42	0.46	dark gray
30	177.8	0.5	0.44	dark gray
31	179.8	0.5	0.51	dark gray
32	181.8	0.5	0.49	dark gray
33	183.85	0.5	0.51	dark gray
34	185.8	0.5	0.5	dark gray
35	187.82	0.44	0.4	dark gray
36	189.77	0.34	0.44	dark gray
37	191.79	0.46	0.4	dark gray
38	194.0	0.69	0.56	dark gray

Marker Name ETH10

18	220.0	0.29	0.27	dark gray
19	222.01	0.3	0.25	dark gray

20	223.9	0.3	0.28	dark gray
21	225.81	0.3	0.27	dark gray
22	227.79	0.3	0.27	dark gray
23	229.68	0.5	0.45	dark gray
14	212.54	0.28	0.28	dark gray
15	214.36	0.27	0.3	dark gray
16	216.32	0.3	0.27	dark gray
17	218.2	0.29	0.29	dark gray

Marker Name SPS115

17	242.0	0.4	0.54	dark gray
18	243.64	0.4	0.4	dark gray
19	245.8	0.6	0.52	dark gray
20	247.35	0.32	0.45	dark gray
21	249.2	0.55	0.55	dark gray
22	251.23	0.4	0.45	dark gray
23	253.26	0.45	0.32	dark gray
24	255.07	0.5	0.45	dark gray
25	257.0	0.5	0.45	dark gray
26	258.9	0.45	0.49	dark gray
27	260.95	0.4	0.5	dark gray
28	263.34	0.52	0.54	dark gray
29	265.4	0.56	0.62	dark gray
30	267.47	0.66	0.58	dark gray
31	268.99	0.4	0.4	dark gray
32	270.99	0.4	0.4	dark gray

Marker Name TGLA126

14	117.15	0.5	0.5	dark gray
15	119.08	0.4	0.5	dark gray
16	121.17	0.4	0.5	dark gray
17	123.27	0.4	0.5	dark gray
18	125.4	0.4	0.5	dark gray
19	127.5	0.4	0.5	dark gray
20	129.63	0.4	0.5	dark gray
21	131.76	0.5	0.45	dark gray
22	133.91	0.45	0.45	dark gray

Marker	Name	TGLA122		
44	189.55	0.5	0.5	dark gray
45	191.6	0.5	0.5	dark gray
20	138.0	0.5	0.5	dark gray
21	140.31	0.45	0.5	dark gray
22	142.47	0.4	0.45	dark gray
23	144.84	0.45	0.45	dark gray
24	147.0	0.5	0.5	dark gray
25	149.53	0.45	0.45	dark gray
26	151.65	0.5	0.45	dark gray
27	153.82	0.45	0.45	dark gray
28	156.05	0.45	0.45	dark gray
29	158.0	0.5	0.5	dark gray
30	160.3	0.5	0.5	dark gray
31	162.6	0.5	0.5	dark gray
32	164.39	0.4	0.53	dark gray
33	166.56	0.4	0.5	dark gray
34	168.7	0.6	0.6	dark gray
35	170.66	0.45	0.52	dark gray
36	172.76	0.46	0.55	dark gray
37	175.15	0.6	0.6	dark gray
38	177.06	0.46	0.48	dark gray
39	179.01	0.5	0.49	dark gray
40	181.3	0.5	0.5	dark gray
41	183.5	0.5	0.5	dark gray
42	185.31	0.46	0.48	dark gray
43	187.5	0.5	0.5	dark gray

Marker	Name	INRA23		
27	224.8	0.5	0.5	dark gray
12	197.0	0.4	0.4	dark gray
13	198.85	0.4	0.4	dark gray
14	200.7	0.55	0.4	dark gray
15	202.06	0.31	0.45	dark gray
16	204.0	0.5	0.4	dark gray
17	205.8	0.45	0.4	dark gray

18	207.6	0.4	0.4	dark gray
19	209.47	0.4	0.4	dark gray
20	211.5	0.5	0.5	dark gray
21	213.27	0.45	0.33	dark gray
22	215.26	0.4	0.4	dark gray
23	217.14	0.5	0.4	dark gray
24	219.03	0.5	0.4	dark gray
25	220.91	0.5	0.45	dark gray
26	222.79	0.4	0.4	dark gray

Marker Name ETH3

26	129.2	0.4	0.5	dark gray
27	131.25	0.4	0.4	dark gray
28	133.36	0.55	0.55	dark gray
29	135.67	0.4	0.4	dark gray
15	106.34	0.55	0.55	dark gray
16	108.41	0.55	0.55	dark gray
17	110.48	0.55	0.55	dark gray
18	112.55	0.55	0.55	dark gray
19	114.41	0.45	0.5	dark gray
20	116.5	0.45	0.4	dark gray
21	118.36	0.55	0.55	dark gray
22	120.71	0.5	0.45	dark gray
23	123.0	0.5	0.5	dark gray
24	125.16	0.5	0.45	dark gray
25	127.07	0.4	0.4	dark gray

Marker Name ETH225

21	142.65	0.4	0.5	dark gray
22	144.69	0.4	0.4	dark gray
23	146.75	0.55	0.5	dark gray
24	149.05	0.5	0.4	dark gray
25	151.1	0.5	0.45	dark gray
26	153.14	0.5	0.4	dark gray
27	155.24	0.47	0.59	dark gray
28	157.3	0.55	0.4	dark gray
29	159.65	0.5	0.41	dark gray

30	161.6	0.55	0.41	dark gray
31	163.6	0.5	0.4	dark gray

Marker Name BM1824

10	180.65	0.55	0.55	dark gray
11	182.65	0.5	0.41	dark gray
12	184.8	0.65	0.55	dark gray
13	186.8	0.6	0.5	dark gray
14	188.9	0.6	0.5	dark gray
15	190.9	0.5	0.39	dark gray
16	192.95	0.5	0.38	dark gray
17	195.0	0.6	0.39	dark gray
18	197.0	0.5	0.31	dark gray
19	199.1	0.55	0.55	dark gray
20	201.1	0.5	0.36	dark gray

Marker Name CA209

-11	115.3	0.5	0.5	dark gray
-12	117.3	0.5	0.5	dark gray
-13	119.3	0.5	0.5	dark gray
-14	121.5	0.5	0.5	dark gray
-15	123.3	0.5	0.5	dark gray
-16	125.3	0.5	0.5	dark gray
-17	127.35	0.5	0.55	dark gray
-18	129.1	0.5	0.5	dark gray
-19	131.1	0.5	0.5	dark gray
-20	133.1	0.5	0.5	dark gray
-21	135.1	0.5	0.5	dark gray
-22	137.1	0.5	0.5	dark gray
-23	139.1	0.5	0.5	dark gray
-24	141.1	0.5	0.5	dark gray
-25	143.2	0.5	0.5	dark gray
-26	145.2	0.5	0.5	dark gray
-27	147.1	0.5	0.5	dark gray
-28	149.1	0.5	0.5	dark gray

Marker Name BM741

-19	196.68	0.5	0.5	dark gray
-----	--------	-----	-----	-----------

-20	198.65	0.5	0.5	dark gray
-14	186.57	0.45	0.5	dark gray
-15	188.57	0.5	0.5	dark gray
16	190.57	0.45	0.45	dark gray
17	192.62	0.45	0.4	dark gray
18	194.68	0.45	0.45	dark gray

3. 표준 진단 키트 개발완료

한우 DNA 동일성 검사를 위한 표준 진단 키트는 총 4개의 키트 개발을 완료하였으며, 각각의 키트는 아래와 같이 일부 마커가 교체되거나 추가된 형태의 것과 multiplex형태를 바꾼 경우이다.

1) 키트 I-11개 마커 Oneplex system I

①Microsatellites Marker list

첫 번째 키트의 마커는 표 와 표 와 같이 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824이며 각 마커의 염색체위치는 1번부터 21번까지 가능한 넓게 분포되도록 하였다. 각 마커 데이터의 명확한 구분을 위해 FAM, VIC, NED dye로 labling하였다.

Table 37. 키트 I의 microsatellites marker 정보

Locus	Lable	N	No. of alleles	Size(bp)	He	PIC
TGLA227	B(FAM)	351	13	76~115	0.830	0.808
BM2113	B(FAM)	339	11	123~156	0.744	0.708
TGLA53	B(FAM)	315	17	158~196	0.872	0.858
ETH10	B(FAM)	345	8	212~230	0.761	0.720
SPS115	B(FAM)	351	7	240~270	0.766	0.733
TGLA126	G(VIC)	318	7	116~136	0.661	0.616
TGLA122	G(VIC)	334	19	137~195	0.863	0.847
INRA23	G(VIC)	347	11	196~222	0.756	0.721

Locus	Lable	N	No. of alleles	Size(bp)	He	PIC
ETH3	Y(NED)	298	8	105~137	0.759	0.720
ETH225	Y(NED)	345	8	141~170	0.651	0.609
BM1824	Y(NED)	357	7	176~200	0.656	0.600

② Microsatellites Marker의 다형성 지수 및 올리고 정보

각 마커의 올리고는 Roslin연구소(<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>)와 International Society for Animal Genetics(http://www.isag.org.uk/ISAG/all/02_PVpanels_LPCGH.doc)등에서 제안한 소의 다형성 분석용 초위성체 유전자좌들을 기초로 하여 선정하였다.

Table 38. 키트 I의 microsatellites marker 정보

유전자좌	염색체위치	(bp)	프라이머 서열	
TGLA227	18	76~104	F	CGAATTCCAAATCTGTAAATTTGCT
			R	ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA
BM2113	2	123~143	F	GCTGCCTTCTACCAAATACCC
			R	CTTCCTGAGAGAAGCAACACC
TGLA53	16	154~188	F	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA
			R	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA
ETH10	5	212~224	F	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA
			R	CCTCCAGCCACTTTCTCTTCTC
SPS115	15	246~260	F	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG
			R	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG
TGLA126	21	95~121	F	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT
			R	TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC
TGLA122	21	137~181	F	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC
			R	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC
INRA23	3	196~222	F	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC
			R	TAACTACAGGGTGTAGATGAACT
ETH3	19	90~118	F	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG
			R	ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG
ETH225	9	141~159	F	GATCACCTTGCCACTATTTCTCCT
			R	ACATGACAGCCAGCTGCTACT
BM1824	1	178~192	F	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC
			R	CATTCTCCAAGTCTTCTCCTTG

③ Multiplexing PCR 조건의 단계별 표준화

가) PCR 혼합물의 제조

DNA 동일성 검사의 경우, 전 과정이 중요하지만, 특히 유전자 증폭과정인 PCR 반응은 그 혼합물의 조성에 따라 매우 다른 증폭산물을 만들어낸다. 즉, 주형 DNA의 순도 및 양에 따라 특정 마커의 증폭이 이루어지지 않을 수도 있으며, 이는 동일성 검사시 치명적인 문제로 작용하게 된다. 따라서 주형 DNA는 최소 20ng이상을 사용해야한다. 또한 multiplexing PCR은 많은 마커 부위를 증폭해야함과 동시에 비특이산물의 생산을 최대한 억제해야하므로 hot-start용 Taq DNA polymerase를 사용함이 이상적임을 확인한 바 있다. 기타 증폭에 이용되는 각 시약들의 조성 조건은 아래와 같다.

PCR Primer mix	8.25 μ l
10X Buffer	1.5 μ l
dNTP mix	1.2 μ l
MgCl ₂	1.0 μ l
Taq(5U/ μ l)	0.4 μ l(1-2U)
Template DNA	5-50ng
DMSO	0.25 μ l
DW up to	15.0 μ l

나) PCR 혼합물의 증폭과정

유전자 증폭에 사용되는 기기는 기본 원리는 같지만 각 기기마다 미세한 차이를 보이기 때문에, 다양한 기기에서 범용으로 사용이 가능한 증폭과정의 제공이 무엇보다 중요하다. 따라서, 반응온도를 3개(56-58 $^{\circ}$ C)로 설정하여 분석하는 단계별 유전자증폭(touch-down PCR)방법을 실시하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리한 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 58 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 cycle로 하여 4회 반복하고, 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 57 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 cycle로 하여 4회 반복 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 56 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 cycle로 하여 24회 반복하였다. 그리고 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 신장시킨 후 8 $^{\circ}$ C에서 과정을 종료한다.

Thermal cycling (Touchdown)	Pre-Denaturation		95°C, 15min
	4cycle	Denaturation	94°C, 60sec
		Annealing	58°C, 75sec
		Elongation	72°C, 60sec
	4cycle	Denaturation	94°C, 60sec
		Annealing	57°C, 75sec
		Elongation	72°C, 60sec
	24cycle	Denaturation	94°C, 60sec
		Annealing	56°C, 75sec
		Elongation	72°C, 60sec
	Final Extension		65°C, 30min
Store		8°C, forever	

다) 증폭산물의 분석

PCR 반응에 의한 증폭산물은 80배 증류수로 희석하여 희석된 증폭산물 1ul와 Standard size standard GeneScan LIZ500(AppliedBiosystems, USA, Pat. No.) 및 Hi-Di Formamide(AppliedBiosystems, USA, Pat. No.) 혼합물을 1:9로 희석하여 원시료로 사용하였다. 준비된 원시료는 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA, MegaBase, Beckman 등)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneMapper version 4.0(Applied Biosystems, USA) 등 분석프로그램을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 자료를 취합하고 분석한다.

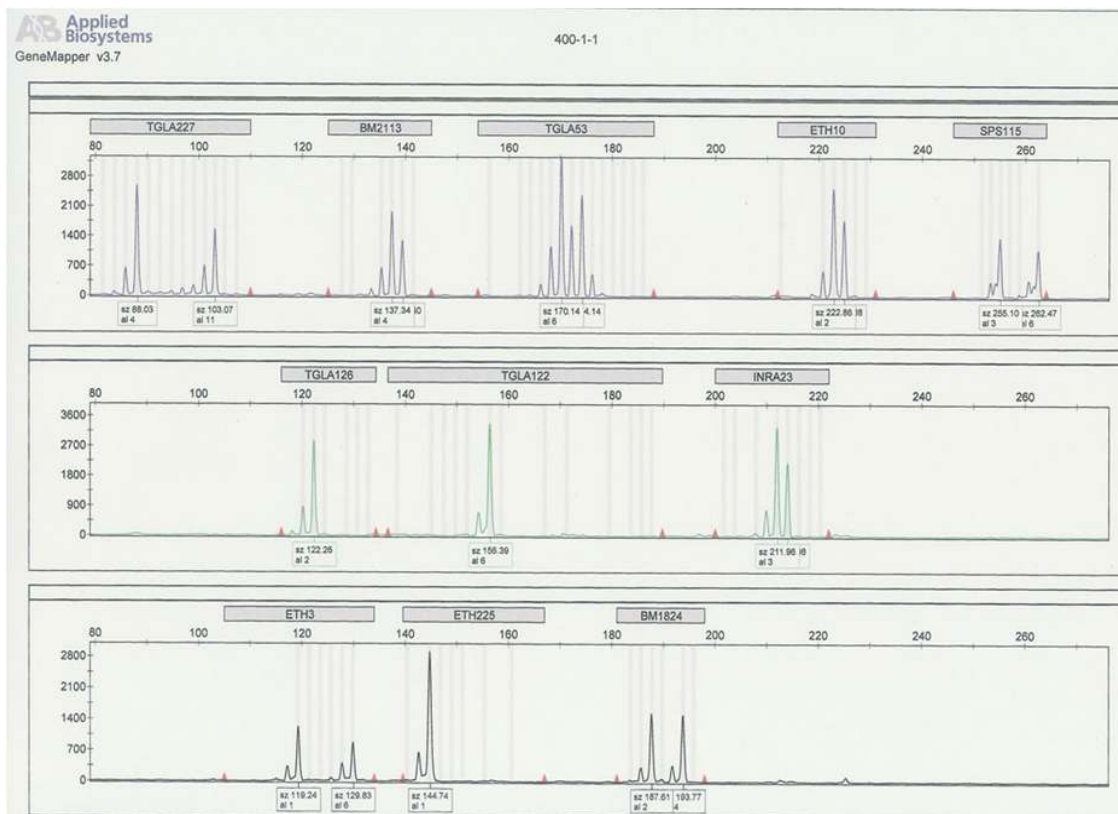


Fig 37.. Example of electrophoresis on an ABI Genetic Analyzer 3130xl and analysis of Kit I using GeneMapper 4.0.

2) 키트 II-11개 마커 Oneplex system II

① Microsatellites Marker list

두 번째 키트의 마커는 표 와 표 와 같이 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, RM011, TGLA122, INRA23, BMS4032, ETH225, BM1824이며 각 마커의 염색체위치는 1번부터 21번까지 가능한 넓게 분포되도록 하였다. 각 마커 데이터의 명확한 구분을 위해 FAM, VIC, NED dye로 labling하였다.

첫 번째 키트와는 두 개의 마커가 서로 다르며, TGLA126과 ETH3를 빼고 한우 다형성이 높은 RM011과 BMS4032를 새롭게 추가하였다.

Table 39. 키트 II의 microsatellites marker 정보

Locus	Lable	N	No. of alleles	Size(bp)	He	PIC
TGLA227	B(FAM)	351	13	76~115	0.830	0.808
BM2113	B(FAM)	339	11	123~156	0.744	0.708
TGLA53	B(FAM)	315	17	158~196	0.872	0.858
ETH10	B(FAM)	345	8	212~230	0.761	0.720
SPS115	B(FAM)	351	7	240~270	0.766	0.733
RM011	G(VIC)	318	12	95~121	0.700	0.715
TGLA122	G(VIC)	334	19	137~195	0.863	0.847
INRA23	G(VIC)	347	11	196~222	0.756	0.721
BMS4032	Y(NED)	298	11	90~118	0.625	0.632
ETH225	Y(NED)	345	8	141~170	0.651	0.609
BM1824	Y(NED)	357	7	176~200	0.656	0.600

② Microsatellites Marker의 다형성 지수 및 올리고 정보

각 마커의 올리고는 Roslin 연구소(<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>) 그리고, 미국국립생물공학정보센터(NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=250746>), International Society for Animal Genetics(http://www.isag.org.uk/ISAG/all/02_PVpanels_LPCGH.doc)등에서 제안한 소의 다형성 분석용 초위성체 유전자좌들을 기초로 하여 선정하였다.

Table 40. Microsatellites Marker의 다형성 지수 및 올리고 정보

유전자좌	염색체위치	(bp)	프라이머 서열	
TGLA227	18	76~104	F	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT
			R	ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA
BM2113	2	123~143	F	GCTGCCTTCTACCAAATACCC
			R	CTTCCTGAGAGAAGCAACACC
TGLA53	16	154~188	F	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA
			R	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA
ETH10	5	212~224	F	G TTCAGGACTGGCCCTGCTAACA
			R	CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC
SPS115	15	246~260	F	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG
			R	AACGAGTGTCCCTAGTTTGGCTGTG

유전자좌	염색체위치	(bp)	프라이머 서열	
RM011	14	95~121	F	AGAAATTGCCCCAAAGAGATGTT
			R	GATCAAACCCCTGGAGGAGTC
TGLA122	21	137~181	F	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC
			R	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC
INRA23	3	196~222	F	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC
			R	TAACTACAGGGTGTTAGATGAACT
BMS4032	1	90~118	F	CGGACACAACCTGAGCAACTC
			R	AGATGGCCAACAAACACATG
ETH225	9	141~159	F	GATCACCTTGCCACTATTTCTCCT
			R	ACATGACAGCCAGCTGCTACT
BM1824	1	178~192	F	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC
			R	CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG

③ Multiplexing PCR 조건의 단계별 표준화

PCR을 포함한 분석과정은 첫 번째 키트와 동일하다.

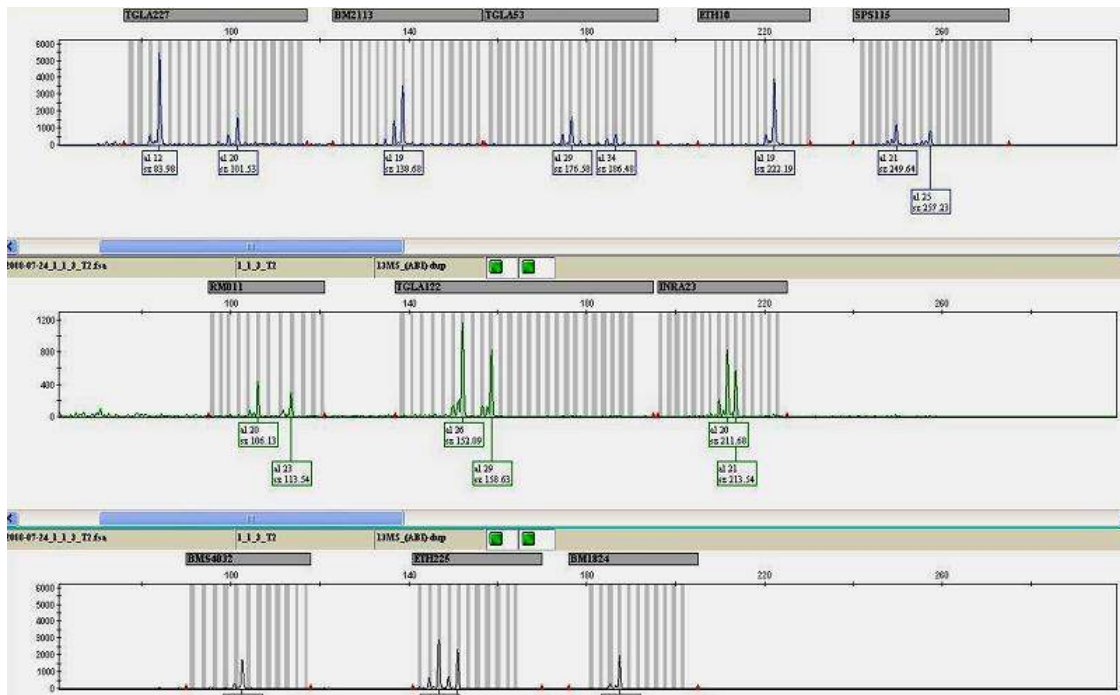


Fig 38. Example of electrophoresis on an ABI Genetic Analyzer 3130xl and analysis of Kit II using GeneMapper 4.0.

3) 키트 III-13개 마커 Oneplex system

① Microsatellites Marker list

세 번째 키트의 마커는 표 와 표 와 같이 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209, BM741 총 13개이며 각 마커의 염색체위치는 3번부터 19번까지 가능한 넓게 분포되도록 하였다. 각 마커 데이터의 명확한 구분을 위해 FAM, VIC, NED dye로 labling하였다. 첫 번째 키트의 마커에 한우 다형성이 높은 CA209와 BM7412를 새롭게 추가하였다.

Table 41. 키트 III의 microsatellites marker 정보

Locus	Lable	N	No. of alleles	Size(bp)	He	PIC
TGLA227	B(FAM)	351	13	76~115	0.830	0.808
BM2113	B(FAM)	339	11	123~156	0.744	0.708
TGLA53	B(FAM)	315	17	158~196	0.872	0.858
ETH10	B(FAM)	345	8	212~230	0.761	0.720
SPS115	B(FAM)	351	7	240~270	0.766	0.733
TGLA126	G(VIC)	318	7	116~136	0.661	0.616
TGLA122	G(VIC)	334	19	137~195	0.863	0.847
INRA23	G(VIC)	347	11	196~222	0.756	0.721
ETH3	Y(NED)	298	8	105~137	0.759	0.720
ETH225	Y(NED)	345	8	141~170	0.651	0.609
BM1824	Y(NED)	357	7	176~200	0.656	0.600
CA209	R(PET)	343	11	113~150	0.467	0.447
BM741	R(PET)	251	3	186~196	0.326	0.275

② Microsatellites Marker의 다형성 지수 및 올리고 정보

각 마커의 올리고는 Roslin 연구소(<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>) 그리고, 미국국립생물공학정보센터(NCBI,National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=250931>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=48737>), International Society for

Animal Genetics(http://www.isag.org.uk/ISAG/all/02_PVpanels_LPCGH.doc)등에서 제안한 소의 다형성 분석용 초위성체 유전자좌들을 기초로 하여 선정하였다.

Table 42. Microsatellites Marker의 다형성 지수 및 올리고 정보

유전자좌	염색체위치	(bp)	프라이머 서열	
TGLA227	18	76~104	F	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT
			R	ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA
BM2113	2	123~143	F	GCTGCCTTCTACCAAATACCC
			R	CTTCCTGAGAGAAGCAACACC
TGLA53	16	154~188	F	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA
			R	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA
ETH10	5	212~224	F	G TTCAGGACTGGCCCTGCTAACA
			R	CCTCCAGCCC ACTTTCTCTTCTC
SPS115	15	246~260	F	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG
			R	AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG
TGLA126	21	95~121	F	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT
			R	TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC
TGLA122	21	137~181	F	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC
			R	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC
INRA23	3	196~222	F	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC
			R	TA ACTACAGGGTGT TAGATGAACT
ETH3	19	90~118	F	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG
			R	ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG
ETH225	9	141~159	F	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT
			R	ACATGACAGCCAGCTGCTACT
BM1824	1	178~192	F	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC
			R	CATTCTCCA ACTGCTTCCTTG
CA209		113~150	F	GTAGAAGTTAGTGACTGTCATCC
			R	CCTCAGAGCCCCATACATTTCC
BM741		186~196	F	GCCCCTGAAGGAATGGTG
			R	CCAAAAGGTCTCTATCTCCAAA

③ Multiplexing PCR 조건의 단계별 표준화

PCR을 포함한 분석과정은 첫 번째 키트와 동일하다.

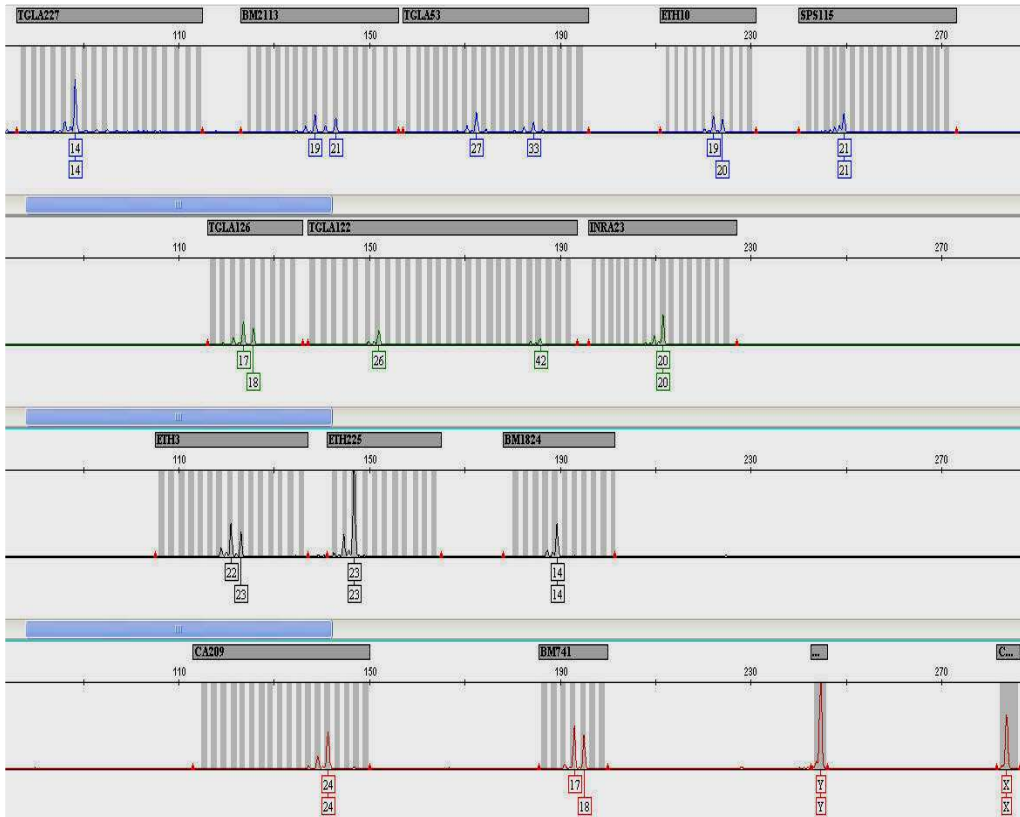


Fig 39. Example of electrophoresis on an ABI Genetic Analyzer 3130xl and analysis of Kit III using GeneMapper 4.0.

4. 키트 IV-11개 마커 Two-group Multiplex system

1) Marker list

네 번째 키트의 마커는 두 번째 키트의 것과 동일하다. 하지만 11개의 마커를 두 그룹으로 나누어 PCR반응을 두 번하는 시스템이다. 즉, 양쪽 그룹에 BM2113, ETH225을 중복 시켜서 결과에 대한 교차확인이 가능하다. 마찬가지로 각 마커 데이터의 명확한 구분을 위해 FAM, VIC, NED dye로 labling하였다.

Table 43. 키트 IV의 microsatellites marker 정보

Locus	Lable	N	No. of alleles	Size(bp)	He	PIC
TGLA227	B(FAM)	351	13	76~115	0.830	0.808
BM2113	B(FAM)	339	11	123~156	0.744	0.708
TGLA53	B(FAM)	315	17	158~196	0.872	0.858
ETH10	B(FAM)	345	8	212~230	0.761	0.720
SPS115	B(FAM)	351	7	240~270	0.766	0.733
RM011	G(VIC)	318	12	95~121	0.700	0.715
TGLA122	G(VIC)	334	19	137~195	0.863	0.847
INRA23	G(VIC)	347	11	196~222	0.756	0.721
BMS4032	Y(NED)	298	11	90~118	0.625	0.632
ETH225	Y(NED)	345	8	141~170	0.651	0.609
BM1824	Y(NED)	357	7	176~200	0.656	0.600

2) Microsatellites Marker의 다형성 지수 및 올리고 정보

각 마커의 올리고 정보는 키트 II와 같다.

3) Two-Group Multiplex system

Group I에는 TGLA227, TGLA53, SPS115, TGLA122, BM1824와 중복 마커인 BM2113, ETH225, Group II에는 ETH10, RM011, INRA23, BMS4032와 중복 마커인 BM2113, ETH225를 조합하였다.

Table 44. Two-Group Multiplex 정보

Group I	Group II	
TGLA227	ETH10	
TGLA53	RM011	
SPS115	INRA23	
TGLA122	BMS4032	
BM1824		
BM2113	BM2113	Crossed check
ETH225	ETH225	Crossed check

4) Multiplexing PCR 조건의 단계별 표준화

Group I과 II는 아래의 조건과 같이 PCR 혼합물을 각각 제조해야하며, 증폭조건 및 분석조건은 다른 키트들의 것과 동일하다.

PCR Primer mix	4 μ l
10X Buffer	1.5 μ l
dNTP mix	1.2 μ l
MgCl ₂	1.0 μ l
<i>Taq</i> (5U/ μ l)	0.4 μ l (1-2U)
Template DNA	5-50ng
DMSO	0.25 μ l
DW up to	15.0 μ l

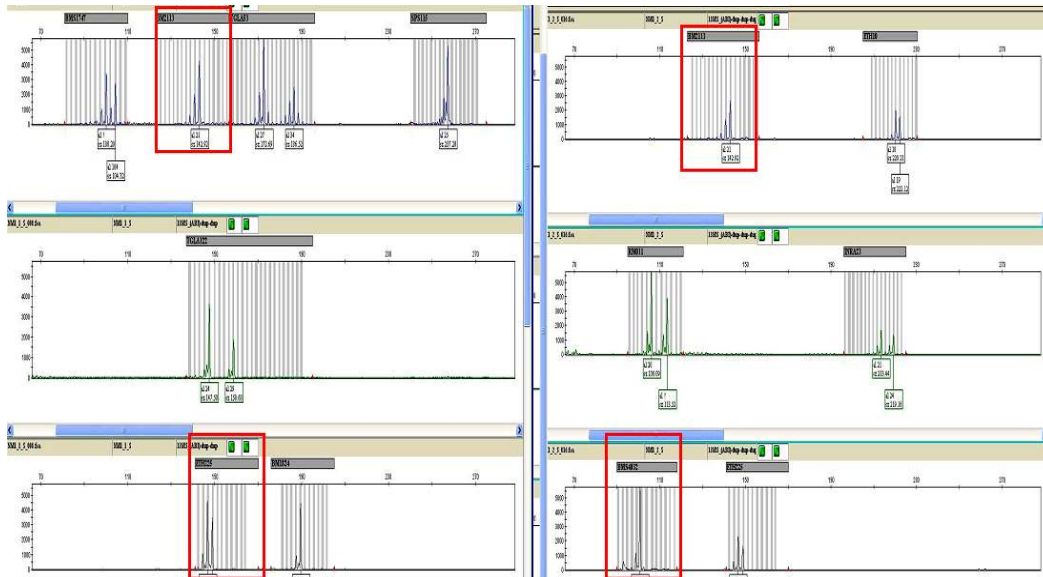


Fig 40. Example of electrophoresis on an ABI Genetic Analyzer 3130xl and analysis of Kit IV using GeneMapper 4.0.

4. 개발된 키트의 기술적용

1) 타 진단시스템과의 비교

① 표준진단 키트의 정확성

한우 및 소품종 전반에 걸쳐 전세계적으로 유전자 감식에 일반적으로 이용되는 제품(StockMarks™, AppliedBioSystems사, USA)과 비교하였을 시, 본 과제에서 개발된 키트는 모든 시료에서 크기의 차이는 있었지만 동일한 분석 양상을 보임을 관찰하였다(Table 3). 크기의 차이는 각 마커를 증폭하는 프라이머 서열의 차이로 인한 것으로, 유전자 동일성 검사를 위한 자료로 사용하는데는 아무런 문제가 없으며, 오히려 각 마커의 피크 형태는 분석하기에 더 용이한 파형을 보였다. 이상의 결과는 좀 더 많은 시료를 통해 검증해야겠지만 개발중인 표준진단 키트의 정확성은 매우 안정적임을 보여주는 것이다.

Table 45. 타 동일성 검사 제품과의 비교

		BM1824	BM2113	ETH10	ETH225	ETH3	INRA23	SPS115
1	A	185.0 189.1	128.6 136.5	218.0 223.7	142.3 142.3	122.6 122.6	219.2 219.2	249.3 260.9
	B	180.2 184.3	123.8 131.6	213.6 219.3	136.2 136.2	117.1 134.3	212.5 212.5	244.5 256.2
		4.9 4.8	4.9 4.9	4.4 4.4	6.1 6.1	5.5 (11.7)	6.8 6.8	4.8 4.7
2	A	187.3 189.2	130.6 140.5	219.9 221.8	144.2 146.5	122.6 131.1	219.3 219.3	249.4 255.2
	B	182.4 184.5	125.2 135.6	215.5 217.4	138.0 140.0	117.2 125.5	212.5 212.5	244.6 250.4
		4.9 4.7	5.4 4.9	4.4 4.5	6.3 6.5	5.4 5.6	6.7 6.7	4.8 4.8
3	A	187.3 189.3	142.6 142.6	221.8 227.6	146.4 150.9	122.6 122.6	211.7 211.7	253.2 255.1
	B	182.0 184.0	137.0 137.0	219.0 225.0	140.0 144.0	117.0 117.0	205.0 205.0	252.0 254.0
		5.3 5.3	5.6 5.6	2.8 2.6	6.3 6.9	5.6 5.6	6.7 6.7	1.2 1.1
4	A	189.2 195.3	138.3 142.7	220.0 221.8	146.3 146.3	120.4 122.5	217.4 217.4	255.1 255.1
	B	184.0 190.0	133.0 137.0	215.0 217.0	140.0 140.0	115.0 117.0	210.0 210.0	250.0 250.0
		5.2 5.3	5.3 5.7	4.9 4.8	6.3 6.3	5.4 5.5	7.4 7.4	5.1 5.1
5	A	189.5 189.5	134.4 142.6	219.9 221.8	146.3 148.8	122.6 129.0	211.6 219.2	249.3 257.0
	B	184.4 184.4	129.3 137.1	215.5 217.4	140.1 142.3	117.1 123.4	204.9 212.5	244.6 252.2
		5.0 5.0	5.1 5.5	4.4 4.4	6.3 6.5	5.5 5.6	6.8 6.7	4.7 4.8
6	A	189.3 191.3	142.7 142.7	221.9 227.6	146.3 146.3	120.4 122.5	213.6 219.3	255.1 257.1
	B	184.4 186.5	137.1 137.1	217.3 223.1	140.1 140.1	115.0 117.0	206.7 212.4	250.2 252.2
		4.9 4.8	5.6 5.6	4.6 4.5	6.2 6.2	5.4 5.5	6.9 6.9	4.9 4.9
7	A	189.2 191.3	142.7 142.7	221.7 221.7	146.6 146.6	120.4 122.5	211.6 211.6	249.3 255.1
	B	184.4 186.4	137.1 137.1	217.3 217.3	140.2 140.2	115.0 117.1	204.8 204.8	244.4 250.1
		4.9 4.8	5.6 5.6	4.5 4.5	6.5 6.5	5.4 5.4	6.9 6.9	4.9 5.0
8	A	185.1 187.1	142.7 142.7	221.9 229.6	146.5 148.7	122.6 122.6	211.7 217.4	249.4 257.1
	B	180.2 182.2	137.1 137.1	217.3 225.2	140.1 142.4	117.2 117.2	204.8 210.5	244.4 252.0
		4.9 4.9	5.6 5.5	4.5 4.4	6.5 6.3	5.4 5.4	6.9 6.9	4.9 5.0
9	A	187.2 187.2	140.5 142.7	223.7 227.6	146.5 148.6	129.0 129.0	204.2 204.2	257.1 257.1
	B	182.2 182.2	135.2 137.2	221.0 225.0	140.2 142.3	123.5 123.5	198.8 198.8	252.2 252.2
		5.0 5.0	5.4 5.5	2.7 2.6	6.3 6.3	5.5 5.5	5.4 5.4	4.9 4.9
10	A	187.1 191.2	136.3 142.7	221.8 227.6	146.3 146.3	120.4 120.4	211.6 219.2	255.1 257.0
	B	182.4 186.6	131.2 137.1	217.4 223.2	140.1 140.1	114.8 114.8	205.8 213.5	250.4 252.3
		4.7 4.7	5.2 5.5	4.3 4.4	6.2 6.2	5.6 5.6	5.7 5.7	4.7 4.7
11	A	187.1 189.2	138.3 142.7	221.8 221.8	146.4 146.4	122.5 128.9	219.3 219.3	253.2 257.0
	B	182.3 184.4	133.2 137.1	217.4 217.4	140.2 140.2	117.0 123.3	212.5 212.5	248.4 252.3
		4.8 4.8	5.1 5.6	4.4 4.4	6.3 6.3	5.5 5.6	6.8 6.8	4.8 4.8
12	A	187.1 195.3	136.3 142.7	221.8 221.8	146.3 146.3	120.6 120.6	213.6 219.2	257.1 260.9
	B	182.3 190.6	131.2 137.1	217.4 217.4	140.1 140.1	115.2 115.2	206.7 212.5	252.2 256.1
		4.8 4.7	5.1 5.6	4.4 4.4	6.2 6.2	5.4 5.4	6.8 6.7	4.8 4.8
13	A	189.2 195.3	138.3 140.5	221.8 227.6	148.7 152.9	120.5 120.5	213.5 219.3	251.2 260.9
	B	184.3 190.4	133.2 135.1	217.3 223.1	142.3 146.8	115.2 115.2	206.7 212.4	246.4 256.1
		4.9 4.9	5.2 5.4	4.5 4.5	6.4 6.0	5.3 5.3	6.8 6.9	4.8 4.8
14	A	191.2 195.2	136.4 138.4	219.9 219.9	146.4 146.4	129.0 131.1	204.2 213.5	249.3 260.9
	B	186.4 190.5	131.2 133.2	215.5 215.5	140.2 140.2	123.4 125.5	197.4 207.2	244.5 256.0
		4.8 4.8	5.2 5.2	4.4 4.4	6.2 6.2	5.5 5.6	6.8 6.3	4.8 4.9

15	A	187.0	187.0	130.6	142.7	221.8	223.7	146.6	148.8	131.1	131.1	211.6	217.3	249.3	260.9
	B	182.1	182.1	125.5	137.1	217.3	219.2	140.2	142.5	125.5	125.5	205.1	211.3	244.5	256.1
		4.9	4.9	5.1	5.6	4.5	4.5	6.4	6.3	5.6	5.6	6.5	6.0	4.9	4.8
16	A	187.2	189.3	136.3	138.3	221.8	221.8	148.7	152.8	122.6	122.6	204.2	211.7	257.0	260.9
	B	182.1	184.2	131.3	133.2	217.2	217.2	142.4	146.7	117.1	117.1	197.3	205.7	252.1	256.4
		5.1	5.1	5.1	5.2	4.6	4.6	6.3	6.1	5.4	5.4	7.0	6.0	4.9	4.5
17	A	189.2	195.3	138.3	142.6	223.7	227.6	146.4	146.4	122.7	124.8	213.5	219.2	249.3	260.9
	B	184.5	190.6	133.2	137.1	219.3	223.2	140.2	140.2	117.0	119.2	206.8	212.5	244.6	256.2
		4.6	4.7	5.1	5.5	4.4	4.4	6.2	6.2	5.7	5.6	6.7	6.7	4.6	4.7
18	A	187.1	189.2	142.6	142.6	221.8	221.8	146.5	150.9	120.4	122.6	213.5	213.5	249.3	255.1
	B	182.4	184.5	137.2	137.2	217.4	217.4	140.2	144.6	115.0	117.2	206.8	206.8	244.5	250.3
		4.7	4.7	5.4	5.4	4.4	4.4	6.3	6.2	5.4	5.4	6.7	6.7	4.7	4.8
19	A	187.0	189.1	138.3	142.6	219.9	223.7	148.7	150.9	128.9	131.1	215.5	219.2	249.3	249.3
	B	182.4	184.5	133.2	137.1	215.5	219.3	142.4	144.6	123.4	125.6	209.7	213.5	244.6	244.6
		4.5	4.6	5.2	5.5	4.4	4.4	6.3	6.3	5.5	5.6	5.8	5.7	4.7	4.7
20	A	195.3	195.3	142.6	142.6	221.8	227.6	146.5	150.8	128.9	128.9	213.4	217.3	249.2	256.9
	B	190.6	190.6	137.1	137.1	217.5	223.2	140.1	144.5	123.4	123.4	206.8	210.6	244.6	252.2
		4.8	4.8	5.5	5.5	4.3	4.4	6.4	6.3	5.5	5.5	6.7	6.7	4.6	4.7
21	A	189.2	191.2	138.3	142.6	219.9	221.8	146.6	152.8	129.0	131.1	211.6	213.5	249.3	249.3
	B	184.4	186.5	133.2	137.2	215.5	217.3	140.1	146.7	123.4	125.5	204.8	206.7	244.6	244.6
		4.8	4.7	5.1	5.4	4.4	4.5	6.6	6.1	5.6	5.6	6.8	6.7	4.7	4.7
22	A	187.1	195.2	140.5	140.5	221.8	225.5	146.3	146.3	120.5	129.0	204.1	211.6	249.2	256.9
	B	182.2	190.4	135.1	135.1	217.3	221.1	140.1	140.1	115.0	123.4	197.4	205.2	244.4	252.2
		4.8	4.8	5.4	5.4	4.4	4.4	6.3	6.3	5.5	5.6	6.7	6.4	4.7	4.7
23	A	187.0	187.0	142.6	142.6	219.8	221.7	146.5	146.5	129.0	129.0	204.1	219.1	249.2	256.9
	B	182.2	182.2	137.1	137.1	215.4	217.3	140.1	140.1	123.4	123.4	197.4	213.4	244.4	252.1
		4.8	4.8	5.5	5.5	4.4	4.4	6.4	6.4	5.5	5.5	6.8	5.7	4.8	4.7
24	A	187.1	189.2	140.5	142.6	219.9	221.8	146.5	150.9	120.5	122.6	213.5	219.2	249.2	255.0
	B	182.3	184.4	135.2	137.1	215.4	217.3	140.1	144.6	115.0	117.1	207.2	213.4	244.4	250.1
		4.8	4.8	5.3	5.5	4.5	4.5	6.4	6.2	5.5	5.4	6.3	5.8	4.9	4.9
25	A	187.0	187.0	140.5	142.7	219.9	219.9	146.8	146.8	120.4	128.9	211.7	219.3	249.3	255.1
	B	182.4	182.4	135.2	137.1	215.6	215.6	140.1	140.1	115.3	123.3	205.0	213.6	244.7	250.4
		4.5	4.5	5.3	5.5	4.4	4.4	6.8	6.8	5.1	5.6	6.7	5.7	4.7	4.7
26	A	189.2	191.3	140.5	142.6	219.9	223.7	146.4	146.4	120.4	131.1	211.6	219.3	249.3	257.0
	B	184.4	186.4	135.2	137.2	215.5	219.3	140.2	140.2	115.0	125.5	205.8	213.5	244.6	252.3
		4.8	4.8	5.2	5.4	4.4	4.4	6.2	6.2	5.5	5.6	5.8	5.8	4.7	4.7
27	A	187.0	189.1	138.3	140.5	221.8	223.7	146.3	146.3	120.4	128.9	211.6	215.5	249.3	255.1
	B	182.4	184.4	133.3	135.1	217.4	219.3	140.1	140.1	114.9	123.3	204.9	208.8	244.5	250.3
		4.6	4.7	5.0	5.4	4.4	4.4	6.3	6.3	5.5	5.6	6.7	6.7	4.8	4.7
28	A	187.1	197.2	130.6	142.6	214.3	221.8	146.6	150.9	122.6	129.0	211.6	219.2	257.0	260.8
	B	182.2	192.5	125.1	137.7	209.8	217.3	140.2	144.7	117.1	123.4	204.8	212.4	252.2	256.0
		4.9	4.8	5.5	4.9	4.4	4.5	6.4	6.3	5.5	5.6	6.9	6.8	4.8	4.8
29	A	189.1	191.1	128.6	142.6	221.8	221.8	146.7	148.8	120.5	122.7	211.6	211.6	249.2	256.9
	B	184.2	186.3	123.6	137.2	217.4	217.4	140.2	142.4	115.0	117.1	204.8	204.8	244.4	252.1
		4.9	4.8	5.0	5.4	4.4	4.4	6.5	6.3	5.5	5.6	6.8	6.8	4.8	4.8
30	A	187.0	189.1	138.3	142.6	219.9	221.8	151.0	161.7	122.6	122.6	202.2	211.6	249.2	251.2
	B	182.2	184.2	133.1	137.1	215.4	217.3	144.7	156.3	117.2	117.2	195.5	205.4	244.4	246.3
		4.8	4.9	5.2	5.5	4.4	4.4	6.3	5.5	5.4	5.4	6.8	6.2	4.8	4.9

31	A	187.1	197.3	140.5	142.6	219.9	221.8	146.6	146.6	120.5	129.0	211.6	213.5	249.2	251.2
	B	182.2	192.5	135.1	137.1	215.3	217.3	140.2	140.2	115.0	123.4	205.2	207.8	244.3	246.3
		4.9	4.8	5.4	5.5	4.6	4.5	6.4	6.4	5.5	5.7	6.4	5.7	4.9	4.9
32	A	187.0	187.0	142.6	142.6	219.9	219.9	146.5	150.7	120.4	128.9	213.5	219.3	253.1	257.0
	B	182.4	182.4	137.2	137.2	215.5	215.5	140.2	144.5	115.3	123.4	206.8	212.5	248.4	252.3
		4.7	4.7	5.3	5.3	4.4	4.4	6.3	6.2	5.1	5.5	6.7	6.8	4.7	4.6
33	A	187.1	195.2	140.4	142.6	219.9	223.7	146.5	146.5	122.6	128.9	211.6	213.5	249.2	249.2
	B	182.3	190.5	135.1	137.3	215.4	219.2	140.1	140.1	117.2	123.3	205.3	207.8	244.5	244.5
		4.8	4.7	5.3	5.3	4.5	4.4	6.5	6.5	5.4	5.6	6.3	5.7	4.7	4.7
34	A	187.0	189.1	136.4	140.5	227.6	227.6	146.6	152.8	122.7	124.8	211.5	219.2	255.0	256.9
	B	182.4	184.4	131.2	135.3	223.1	223.1	140.1	146.7	117.1	119.2	205.6	213.5	250.3	252.2
		4.7	4.7	5.2	5.1	4.4	4.4	6.5	6.2	5.5	5.6	5.9	5.7	4.7	4.7
35	A	187.1	189.2	130.6	140.5	219.9	223.7	146.5	152.8	120.4	122.5	211.6	219.2	257.0	257.0
	B	182.4	184.4	125.6	135.1	215.5	219.3	140.1	146.7	115.0	117.0	205.6	213.4	252.2	252.2
		4.7	4.7	5.0	5.3	4.5	4.4	6.4	6.1	5.4	5.5	6.0	5.8	4.7	4.7
36	A	187.0	189.1	130.6	142.6	219.9	219.9	146.5	150.9	122.6	131.0	215.4	219.2	249.2	251.1
	B	182.3	184.4	125.5	137.1	215.5	215.5	140.1	144.5	117.1	125.4	208.8	212.4	244.5	246.4
		4.7	4.7	5.0	5.5	4.4	4.4	6.5	6.3	5.5	5.6	6.7	6.8	4.8	4.7
37	A	189.0	189.0	136.2	136.2	219.8	219.8	146.3	148.8	122.6	131.1	204.1	215.4	249.2	256.9
	B	184.4	184.4	131.2	131.2	215.4	215.4	140.2	142.4	117.3	125.6	197.4	209.2	244.5	252.1
		4.5	4.5	5.0	5.0	4.4	4.4	6.1	6.4	5.4	5.4	6.7	6.2	4.8	4.8
38	A	187.0	195.2	138.3	142.6	219.9	221.7	146.7	152.6	122.5	122.5	211.7	213.4	249.2	260.8
	B	182.2	190.4	133.1	137.1	215.5	217.3	140.1	146.6	117.1	117.1	205.9	207.7	244.4	256.2
		4.8	4.8	5.2	5.5	4.4	4.4	6.7	6.0	5.4	5.4	5.8	5.7	4.8	4.6
39	A	187.1	195.2	138.3	142.6	221.8	223.7	148.7	150.9	122.6	122.6	213.4	219.2	249.2	249.2
	B	182.3	190.5	133.3	137.2	217.4	219.2	142.4	144.6	117.2	117.2	206.7	212.4	244.4	244.4
		4.9	4.7	5.0	5.4	4.4	4.5	6.3	6.3	5.4	5.4	6.8	6.8	4.8	4.8

* A : 키트 I-11개 마커 Oneplex system I

** B : StockMarks™(AppliedBiosystems, USA)

② 분석된 피크 유형의 비교

분석이 끝난 데이터의 피크 유형을 살펴보면 11개의 microsatellites marker 모두에서 증폭이 이루어져 깨끗한 분석 파형을 보여주고 있으며, 전반적으로 서로 매우 유사한 모습을 보인다(그림. 6).

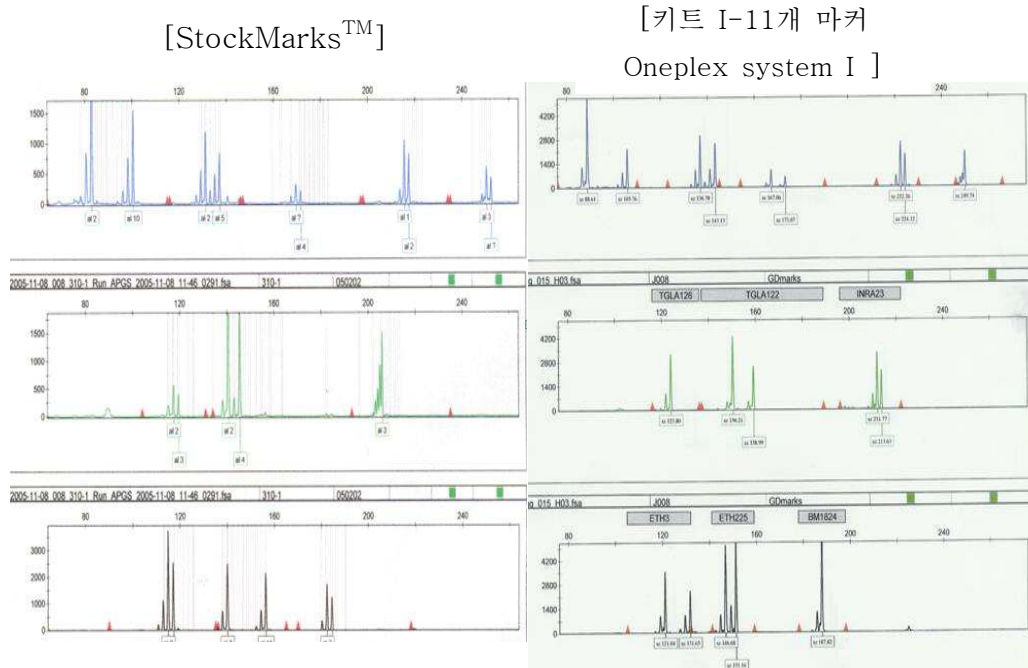


Fig 41. Example of electrophoresis on an ABI Genetic Analyzer 3130xl and analysis of PCR Product by StockMarks™ and Kit I.

그러나, 일부의 마커들에서는 stutter band의 개수 및 모습에서 다소 다른 파형을 나타내고 있다. 특히 INRA23의 경우, StockMarks™의 경우에는 총 4개의 main peak를 보이지만 개발중인 키트에서는 2개의 peak만 나타나는 특징을 보인다(Fig 41). 즉, 전자의 경우 1-bp stutter peak이고, 후자의 경우는 2-bp stutter peak 패턴을 보여주고 있다. 이러한 stutter peak는 실제 peak이 어느 것인지 모호한 경우가 많기 때문에 분석에 어려움을 주게 되며, 특히 1-bp stutter가 많이 나타나는 경우는 증폭 효소에 의한 영향이 많고 또한 locus-specific하게 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러한 관점에서 개발중인 표준화된 진단 키트는 위와 같은 단점을 제거하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

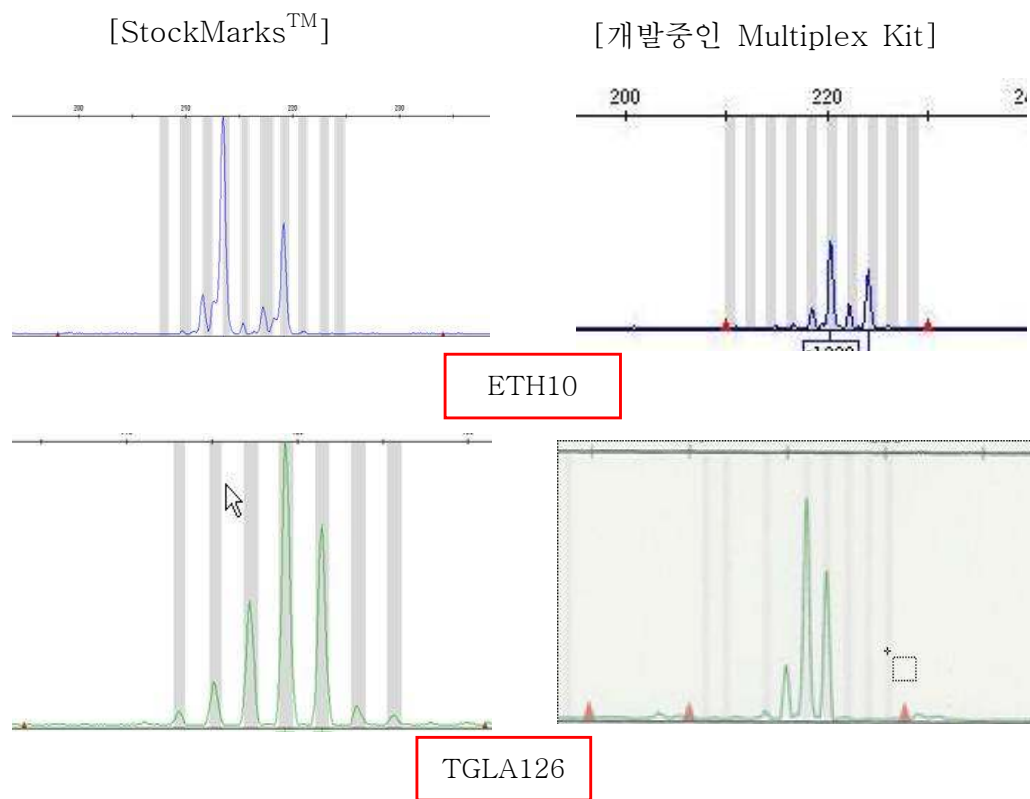


Fig 42. Various typical pattern for dinucleotide repeat heterozygote

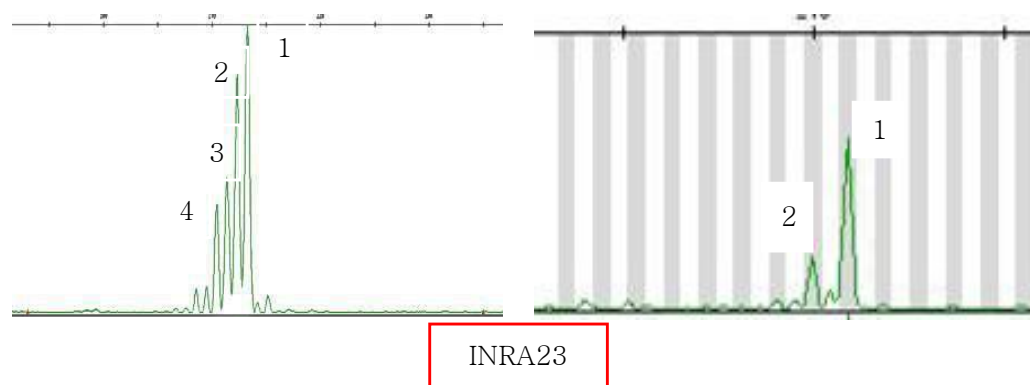


Fig 43.. typical pattern for dinucleotide repeat homozygote.

③ 타 진단키트와의 데이터 보정

가) 실제 감식현장 보급 및 한우 관련 연구집단에 system에 제공

○ 실제감식현장 보급을 위한 비교평가

개발된 키트의 안정성 및 정확성을 실제 감식현장에서 확인하고자 축산물등급판정소의 DNA를 공급받아 (주)휴먼패스, miDNA, GTNR 등 세 분석업체에 대해 비교실험을 실시하였다. 표에서 처럼 모든 분석업체가 동일한 결과값을 도출하였음을 확인하였으며, 이러한 사실은 본 과제에서 개발된 키트는 어느 기관, 어느 장비를 사용하더라도 정확하게 서로의 데이터가 표준화되고 공유될 수 있음을 확인하였다.

Table 46. 각 분석기관의 유전자 분석결과

Smple Name	분석 기관	BM1824		BM2113		ETH10		ETH225		ETH3		INRA23		SPS115		TGLA 122		TGLA 126		TGLA 227		TGLA53	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1	A	13	17	20	21	18	19	23	26	22	26	16	20	21	27	26	43	17	20	16	19	23	32
	B	13	17	20	21	18	19	23	26	22	26	16	20	21	27	26	43	17	20	16	19	23	32
	C	13	17	20	21	18	19	23	26	22	26	16	20	21	27	26	43	17	20	16	19	23	32
	D	13	17	20	21	18	19	23	26	22	26	16	20	21	27	26	43	17	20	16	19	23	32
2	A	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
	B	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
	C	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
	D	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
3	A	14	16	20	21	18	22	23	24	23	24	20	20	24	27	24	26	17	21	16	20	27	32
	B	14	16	20	21	18	22	23	24	23	24	20	20	24	27	24	26	17	21	16	20	27	32
	C	14	16	20	21	18	22	23	24	23	24	20	20	24	27	24	26	17	21	16	20	27	32
	D	14	16	20	21	18	22	23	24	23	24	20	20	24	27	24	26	17	21	16	20	27	32
4	A	12	13	15	26	20	22	23	25	26	27	21	24	25	25	21	30	20	21	19	22	27	34
	B	12	13	15	26	20	22	23	25	26	27	21	24	25	25	21	30	20	21	19	22	27	34
	C	12	13	15	26	20	22	23	25	26	27	21	24	25	25	21	30	20	21	19	22	27	34
	D	12	13	15	26	20	22	23	25	26	27	21	24	25	25	21	30	20	21	19	22	27	34
5	A	14	17	18	21	19	22	25	25	22	26	18	20	21	27	24	24	17	20	15	15	23	27
	B	14	17	18	21	19	22	25	25	22	26	18	20	21	27	24	24	17	20	15	15	23	27
	C	14	17	18	21	19	22	25	25	22	26	18	20	21	27	24	24	17	20	15	15	23	27
	D	14	17	18	21	19	22	25	25	22	26	18	20	21	27	24	24	17	20	15	15	23	27
6	A	13	14	21	21	15	19	23	25	23	26	20	24	21	23	26	43	17	17	19	20	27	34
	B	13	14	21	21	15	19	23	25	23	26	20	24	21	23	26	43	17	17	19	20	27	34
	C	13	14	21	21	15	19	23	25	23	26	20	24	21	23	26	43	17	17	19	20	27	34
	D	13	14	21	21	15	19	23	25	23	26	20	24	21	23	26	43	17	17	19	20	27	34
7	A	13	14	19	21	18	22	25	28	23	26	20	20	24	25	24	25	18	18	20	22	33	34
	B	13	14	19	21	18	22	25	28	23	26	20	20	24	25	24	25	18	18	20	22	33	34
	C	13	14	19	21	18	22	25	28	23	26	20	20	24	25	24	25	18	18	20	22	33	34
	D	13	14	19	21	18	22	25	28	23	26	20	20	24	25	24	25	18	18	20	22	33	34

8	A	13	14	20	21	16	22	23	25	22	23	20	21	21	23	29	30	17	18	14	22	23	23
	B	13	14	20	21	16	22	23	25	22	23	20	21	21	23	29	30	17	18	14	22	23	23
	C	13	14	20	21	16	22	23	25	22	23	20	21	21	23	29	30	17	18	14	22	23	23
	D	13	14	20	21	16	22	23	25	22	23	20	21	21	23	29	30	17	18	14	22	23	23
9	A	14	15	20	21	20	21	23	23	22	26	20	24	23	23	29	34	17	18	14	18	23	30
	B	14	15	20	21	20	21	23	23	22	26	20	24	23	23	29	34	17	18	14	18	23	30
	C	14	15	20	21	20	21	23	23	22	26	20	24	23	23	29	34	17	18	14	18	23	30
	D	14	15	20	21	20	21	23	23	22	26	20	24	23	23	29	34	17	18	14	18	23	30
10	A	12	14	15	19	19	19	25	25	23	26	20	21	24	25	26	34	17	21	19	20	23	35
	B	12	14	15	19	19	19	25	25	23	26	20	21	24	25	26	34	17	21	19	20	23	35
	C	12	14	15	19	19	19	25	25	23	26	20	21	24	25	26	34	17	21	19	20	23	35
	D	12	14	15	19	19	19	25	25	23	26	20	21	24	25	26	34	17	21	19	20	23	35

A : 축산물등급판정소, B : (주)휴먼패스, C : (주)miDNA, D : (주)GTNR

○ 한우관련 연구집단에 대한 비교 평가

역시 개발된 키트의 안정성 및 정확성을 한우 유전자 연구관련 기관 등에 확인하고자 축산물등급판정소의 DNA를 공급받아 상지대학교, 순천대학교, 충북가축위생연구소 세 기관에 대해 비교실험을 실시하였다. 표 에서처럼 모든 분석기관이 거의 동일한 결과값을 도출하였으나 한 기관만이 하나의 마커에서 불일치한 결과를 도출하였다. 이는 분석키트의 문제가 아닌 분석자의 미숙련으로 인한 단순 오류임을 확인하였다.

Table 47. 각 분석기관의 유전자 분석결과

Smple Name	분석 기관	BM1824		BM2113		ETH10		ETH225		ETH3		INRA23		SPS115		TGLA1 ₂₂		TGLA1 ₂₆		TGLA2 ₂₇		TGLA5 ₃	
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2
1	A	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
	B	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
	C	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
	D	14	14	20	21	19	22	23	24	23	23	20	24	21	22	24	26	17	21	14	14	23	28
2	A	13	14	15	19	18	19	24	26	22	26	24	24	24	25	25	26	20	20	15	15	27	27
	B	13	14	15	19	18	19	24	26	22	26	24	24	24	25	25	26	20	20	15	15	27	27
	C	13	14	15	19	18	19	24	26	22	26	24	24	24	25	25	26	20	20	15	15	27	27
	D	13	14	15	19	18	19	24	26	22	23	24	24	24	25	25	26	20	20	15	15	27	27
3	A	13	15	18	21	20	22	24	25	22	26	15	20	21	21	25	29	21	22	14	15	27	33
	B	13	15	18	21	20	22	24	25	22	26	15	20	21	21	25	29	21	22	14	15	27	33
	C	13	15	18	21	20	22	24	25	22	26	15	20	21	21	25	29	21	22	14	15	27	33
	D	13	15	18	21	20	22	24	25	22	26	15	20	21	21	25	29	21	22	14	15	27	33
4	A	13	14	21	26	18	20	24	25	23	27	20	22	21	25	24	29	17	21	12	19	32	35
	B	13	14	21	26	18	20	24	25	23	27	20	22	21	25	24	29	17	21	12	19	32	35

	C	13	14	21	26	18	20	24	25	23	27	20	22	21	25	24	29	17	21	12	19	32	35
	D	13	14	21	26	18	20	24	25	23	27	20	22	21	25	24	29	17	21	12	19	32	35
5	A	15	17	15	21	20	20	23	24	24	26	17	20	21	25	25	29	17	22	15	19	28	31
	B	15	17	15	21	20	20	23	24	24	26	17	20	21	25	25	29	17	22	15	19	28	31
	C	15	17	15	21	20	20	23	24	24	26	17	20	21	25	25	29	17	22	15	19	28	31
	D	15	17	15	21	20	20	23	24	24	26	17	20	21	25	25	29	17	22	15	19	28	31
6	A	13	15	18	18	18	19	23	23	26	27	20	21	24	27	24	26	17	21	14	18	27	33
	B	13	15	18	18	18	19	23	23	26	27	20	21	24	27	24	26	17	21	14	18	27	33
	C	13	15	18	18	18	19	23	23	26	27	20	21	24	27	24	26	17	21	14	18	27	33
	D	13	15	18	18	18	19	23	23	26	27	20	21	24	27	24	26	17	21	14	18	27	33
7	A	13	17	19	19	18	19	24	26	23	27	21	21	21	21	24	29	17	17	22	22	23	32
	B	13	17	19	19	18	19	24	26	23	27	21	21	21	21	24	29	17	17	22	22	23	32
	C	13	17	19	19	18	19	24	26	23	27	21	21	21	21	24	29	17	17	22	22	23	32
	D	13	17	19	19	18	19	24	26	23	27	21	21	21	21	24	29	17	17	22	22	23	32
8	A	14	14	19	21	20	22	23	26	22	23	24	24	21	22	21	24	21	22	12	19	31	33
	B	14	14	19	21	20	22	23	26	22	23	24	24	21	22	21	24	21	22	12	19	31	33
	C	14	14	19	21	20	22	23	26	22	23	24	24	21	22	21	24	21	22	12	19	31	33
	D	14	14	19	21	20	22	23	26	22	23	24	24	21	22	21	24	21	22	12	19	31	33
9	A	14	17	19	21	20	22	24	25	22	27	20	24	25	25	25	29	17	20	17	26	29	34
	B	14	17	19	21	20	22	24	25	22	27	20	24	25	25	25	29	17	20	17	26	29	34
	C	14	17	19	21	20	22	24	25	22	27	20	24	25	25	25	29	17	20	17	26	29	34
	D	14	17	19	21	20	22	24	25	22	27	20	24	25	25	25	29	17	20	17	26	29	34
10	A	12	14	18	21	19	22	23	25	22	23	20	20	21	24	25	26	17	17	15	19	27	32
	B	12	14	18	21	19	22	23	25	22	23	20	20	21	24	25	26	17	17	15	19	27	32
	C	12	14	18	21	19	22	23	25	22	23	20	20	21	24	25	26	17	17	15	19	27	32
	D	12	14	18	21	19	22	23	25	22	23	20	20	21	24	25	26	17	17	15	19	27	32

A : 축산물등급판정소, B : 상지대학교, C : 충북가축위생연구소, D : 순천대학교

○ 대규모 DB사업과 연계하여 진단 Kit 제공

본 과제에서 개발된 키트는 향후 농림부에서 시범사업으로 실시하는 「최고기 이력 추적시스템 사육단계 DNA 검사」 사업등에 제공할 계획임.

5. 국내 및 국제적 공인 획득

- 1) 국내 공인 획득을 위하여 11개 마커 Oneplex system II 와 13개 마커 Oneplex system 에 대하여 각각 특허출원을 하였음.

Table 48. 특허 출원 정보

출원 번호	발명의 명칭	출원일자
10-2008-0097566	한우의 개체식별방법 및 키트	2008. 10. 06
10-2008-0097569	한우의 개체식별방법 및 키트	2008. 10. 06

2) Cattle Comparison Test 2007-2008(Sociedad Rural Argentina)

매년 국제동물유전공학회(ISAG)에서는 전 세계적으로 소 품종에 대해 microsatellites 유전자 검사를 실시하는 기관들을 대상으로 비교시험을 실시하고, 시험 결과를 공지한다. 따라서 본 과제에서는 ‘Cattle Comparison Test 2007-2008(Sociedad Rural Argentina)’ 본 시험에 사용된 비교검정용 DNA를 확보하여, 본 과제에서 개발된 시스템이 국제적 공인을 받을 수 있는지의 여부를 1차적으로 확인하고자 하여, 제1협동과제에 개발된 시스템을 제공하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
1차년도(2006)	● 한우 품종의 유전적 특성 분석 및 분석기법 확립	20
	● 진단 Kit개발을 위한 Marker 선정 타당성	20
	● 브랜드 한우 시료의 채취 - 지역별, 특성별 브랜드 선정	15
	● 브랜드 밀소의 혈통 정보, 유전 능력 및 일반 능력 조사	10
	● 브랜드 한우의 유통 및 생산단계 관련자료 확보	10
	● 분석기기별 MS typing 분석 조건 설정	15
	● 생산단계 분석을 위한 개체 식별 검증(BioTaq, Bar-code 등)	10
2차년도(2007)	● 한우 유전적 특징 분류 기준 확립 - MS haplotype의 비교 분석 - 브랜드별 집단의 유전적 특징 분류 - KPN 종모우에 대한 유전자표지를 이용한 특징 분류	20
	● 분석기기별 MS 유전자형 특징 및 오류분석	20
	● 표준화된 진단 Kit의 개발 및 현장 적용	20
	● 유통단계별 개체인식 정보의 D/B화 및 검색 시스템 구축	20
	● 기관 및 지역별 Comparison Test	20
	● 통계분석 시스템 개발모듈 설정	20
3차년도(2008)	● 국가단위 비교실험을 통한 분석 데이터 표준화 시스템 설계	15
	● 표준화된 진단 Kit의 실용화	15
	● 유통 모형별 원산지 및 개체 인식 정보 검색 시스템 확립	15
	● 개발된 유전자표지의 수치화 및 표준화 설정	15
	● 한우 개체별 유전자표지 설정 정보 D/B 구축	10
	● 분석기기별 Comparison Test 실시 표준 설정	10
	최종평가	● 한우 개체식별 및 동일성 검정이 가능한 시스템 개발되었는지 여부
● 개체식별을 위한 진단 Kit의 표준화 및 기술의 실용화가 이루어졌는지의 여부		20
● 유통단계에서 특정 브랜드의 개체를 인증할 수 있는 정보의 검색 가능성		15
● 실제의 한우육의 부정유통을 감시, 적발할 수 있는지의 여부		15
● 한우 생산 정보와 유전정보의 통합 D/B 개발 여부		15
● 기관 및 지역간, 분석기기별 표준 설정과 생산이력 검증		15

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본연구결과를 현행 시행되고 있는 소이력제의 동일성 분석사업에 도입할 수 있도록 시책건의함. 이에 앞서 국내 관련 시험연구기관 및 분석기관간의 본 개발 기술의 비교 검증을 추진(판정주관 : 축산과학원 , 검사주관:축산물등급판정소)

<시책건의 1>

- 한우 도축단계-유통단계 간 동일성 검정을 위한 DNA 검사기법 적용
 - 장점 : 분석 비용절감 (30,000원에서 10,000원으로 절감효과 기대)
도축단계에서의 DNA 정보를 D/B화하여 유통단계에서 채취된 시료를 분석하여 비교 검증한 후 동일성 불일치가 발생 할 경우 도축단계 개체들의 분석 완료된 D/B를 검색하여 어떠한 지역의 개체인가를 역추적하여 활용 가능

<시책건의 2>

- 한우 사육단계-도축단계-유통단계 간 동일성 검정을 위한 DNA 검사기법 적용
 - 장점 : 분석 비용절감 (30,000원에서 10,000원으로 절감효과 기대)
사육단계에서의 DNA 정보를 D/B화하여 도축단계 및 유통단계에서 채취된 시료를 분석하여 비교 검증한 후 동일성 불일치가 발생 할 경우 도축단계 개체들의 분석 완료된 D/B를 검색하여 어떠한 지역의 개체인가를 역추적하여 활용 가능

2. 한우 개체식별 DNA 정보를 표준화할 수 있는 멀티플렉싱 키트를 상업화하고 DNA 정보를 근거로 개체간 동일성 검정 및 다양한 통계처리가 가능 전산화 모듈을 기술이전 하여 관련 전문 회사로부터 완전한 특허 유전통계분 S/W 로 개발하여 시판

<기술이전 1>

- 한우 개체식별용 멀티플렉싱키트 산업화
 - 13종의 one-stop 멀티플렉싱 DNA 증폭키트 상품화

<기술이전2>

- 한우 개체식별용 DNA 정보를 이용한 유전통계처리 전용 S/W
 - 동일성검정, 친자확인, 품종식별, 유전통계량 계산 메뉴를 제공하는 국산S/W

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 외국의 가축 개체식별 관련 유전자분석 체계

<일본>

일본의 경우 2원적 고비용 분석 체계를 구축 활용중임

- 지역단위의 브랜드 주체를 중심으로 개체의 동일성 분석 기법을 채택하여 안전성 확보를 위한 수단으로 추진 (지역 대학 및 관련 벤처 기업; 분석 담당, 지자체: 정보 연계시스템구축)
- 국가차원에서 원산지 추적 검증을 위해 화우 유전자감식 방법을 채택하여 활용중이며 기존의 가축 혈통 검증 체계에서 친자 확인분석을 담당하던 기관(가축개량사업단: 혈액형분석 연구소)의 기능을 확장하여 국가 분석 센터를 주관하고 있으며 원산지 추적과 관련된 제도 및 시스템 전반의 운영은 국가가 직접 관장 (농림수산성 :가축 개량센터)

<미국>

- 혈통의 정확도(친자확인 : 젖소, 육우)검증을 통한 종축의 검정에 활용하고 있으며 분석 기관으로 미국 내 4개 대학이 지정되어 분석결과를 축종별 품종 등록 협회에 전송하고 종축의 혈통 기록 및 능력검정 D/B와 함께 저장되고 개체별로 발행되는 혈통부에 기재되어 종축의 진위 확인 기초 정보로 활용하고 있으며 최근 광우병 파동의 영향으로 감염 가축의 생산단계 역추적을 위한 시스템 보완(기존의 이표 부착을 통한 개체 정보 연계)을 위해 RF-ID 기법 및 유전자감식 기법을 적용하기 위한 시스템 구축중 (분석 주체 : 대학, 활용주체 : 종축 등록기관 및 수출입 업자, 분석 결과의 정확도 검증 : 국가)
- International Organization for Standardization(ISO11784-ISO11785-ISO14223)는 국가 표준화기구의 연합이다. 국제 표준을 준비하는 작업은 ISO TC(technical committee)를 통하여 이루어진다. TC가 다루는 주제에 관심이 있는 각 회원국은 TC에서 대표할 권한을 가짐
- United States Department of Agriculture National Animal Identification System인 NAIS는 한 개체가 다른 근원이 다른 premisees로부터 온 개체

와 접촉하거나 commingle할 때 그 개체를 인식하고 추적하기 위해 계획된 국가 프로그램

<유럽 : 프랑스, 덴마크, 네덜란드, 호주, 뉴질랜드>

- 국가주도로 이미 생산단계의 생축 및 소고기 물류 단계까지의 meat moving chain에 대한 추적 시스템이 구축 운영 (방역, 개량, 위생적 통합 시스템)
- 원산지 추적에 대한 최종 검증체계의 보완을 위해 DNA 감식 기법을 체계화하고 이들 분석정보를 활용 단계 진입
- 개체식별, 친자 확인 및 도체 및 생체간의 동일성검정 등과 관련된 분석기법의 주체는 가축개량관련 연구 부서에서 전담하고 국가시스템에의 활용을 위한 표준화 및 체계화를 위한 연구를 진행하고 있으며 원산지의 추적과 관련된 시스템의 활용 주체는 방역 위생 관련 기관에서 주관하여 추진
 - 호주의 이력추적제도는 모든 소에 대하여 개체식별번호가 표시된 귀표를 장착하여 생산에서 도축, 그리고 가공장까지의 이동사항을 신고하고 관리하며 소의 이동시 농가는 소의 개체정보가 수록된 출하자증명서(NVD)를 발급(매도자) 및 보관(매수장)하고, 이동정보는 인터넷(NLIS)을 통해 신고하는 제도 사용
 - 뉴질랜드는 출생후 30일 이상된 소가 이동시에는 귀표장착의 의무와 가축상태증명서(ASD)발급으로 축군의 이동경로 추적이 가능하며, 혹시 귀표가 없거나 ASD가 없는 소는 도축대상 또는 착유대상에서 제외되며, 가축이동시 ASD 보관의무를 가짐

제 7 장 참고문헌

Arranz, J. J., Bayon, Y. and San Primitivo, F. 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Anim. Genet.* 27: 415-419.

Behl R, Sherora NJ, Behl J, Tandia MS and Vijn RK. 2002. Microsatellite Sequences of mammals and their applications in genome analysis in pigs—a review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15:1822-1830.

Blott SC, Williams JL and Haley CS. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82:613- 619.

Bowling, A. T. 1996. Nine equine dinucleotide repeats at microsatellite loci UCDEQ136, UCDEQ405, UCDEQ412, UCDEQ425, UCDEQ437, UCDEQ467, UCDEQ487, UCDEQ502 and UCDEQ 505. *Anim. Genet.* 28:370-371.

Canon J, Checa ML, Carleos C, Vega-Pla JL, Vallejo M and Dunner S. 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim. Genet.* 31: 39-48.

Fan B, Wang ZG, Li YJ, Zhao XL, Liu B, Zhao SH, Yu M, Li MH, Chen SL, Xiong TA and Li K. 2002. Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. *Anim. Genet.* 33:422-427.

Hanslik, S., Harr, B., Brem, G. and Schlotterer, C. 2000. Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary New World and Old World Holstein Friesian populations. *Anim. genet.* 31:31-38.

H. T. Lim, H. S. Min, W. G. Moon, J. B. Lee, J. H. Kim, I. C. Cho, H. K. Lee, Y. W. Lee, J. G. Lee and J. T. Jeon. 2005. Analysis and Selection of

Microsatellite Markers for Individual Traceability System in Hanwoo. *J. Anim Sci & Technol(Kor)* 47(4) 491–500.

Kim, K. S., Yeo, J. S. and Choi, C. B. 2002. Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data. *Anim. Genet.* 33: 201–204.

Loftus, R. T., Ertugrul, O, Harba, A, H., El-Barody, M. A. A., MacHugh, D. E., Pa rk. S. D. E. and Bradley, D. G. 1999. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin : the Near East. *Molecular Ecology* 8, 2015–2022.

MacHugh DE, Loftus RT, Cunningham P and Bradley DG. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Anim. Genet.* 29:333–340.

MacHugh, D. E., R. T. Loftus, D. G. Barley, P. M. Sharp and P. Cunningham. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. Royal Soc. Lond. Series B.* 256:25–31.

Martinez, A. M., J. V. Delgado, A. Rodero and J. L. Vega-pla. 2000. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellite. *Anim. Genet.* 31:295–301.

Martin-Burriel, I., Garcia-Muro, E. and Zaragoza, P. 1999. genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Anim. Genet.* 30:177–182.

Olowofeso OJ, Wang Y, Shen JC, Chen KW, Sheng HW, Zhang P and Wu R. 2005. Estimation of the cumulative power of discrimination in Haimen chicken populations with ten microsatellite markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18: 1066–1070.

Pandey, A. K., M. S. Tanita, D. Kumar, B. Misra, P. Choudhary and R. K. Vijh. 2002. Microsatellite analysis of three poultry breeds of India. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15:1536–1542.

Peelman, L. J., Mortiaux, F., Van Zeveren, A., Dansercoer, A., Mommens, G.,

Coopman, 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.* Jun;29(3):161-7.

Sirchia S. M., I. Garagiola, C. De-Andreis, I. Gazzoli, M. Gramegna and G. Colucci. 1996. Characterization of four microsatellites in an Italian population and their application to paternity testing. *Mol Cell Probes.* 10(2):155-158.

Yoon D. H., J. D. Oh, J. H. Lee, H. S. Kong, B. W. Cho, J. D. Kim, K. J. Jeon, C. Y. Jo, G. J. Jeon and H. K. Lee. 2005. Establishment of individual identification system based on the microsatellite polymorphism in Hanwoo. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* vol 18, 6:762-766

Zhang JH, Xiong YZ and Deng CY. 2005. Correlations of genic heterozygosity and variances with heterosis in a pig populations revealed by microsatellites DNA marker. *Asian- Aust. J. Anim. Sci.* 18:620-625.

김경석, 엄지현, 최창분. 2001. Microsatellite 분석을 통한 한우의 유전적 다양성. *한국동물자원과학지* 43: 599-608.

정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 2000. AFLP marker를 이용한 한우의 유전자 지문 분석. *한국동물자원과학회지* 42(4):391-406.

정의룡, 김우태, 김연수, 한상기. 2001. VNTR Marker를 이용한 한우의 유전적 다양성 및 친자감별. *한국동물자원과학회지* 43(1):35-44.

윤두학, 박응우, 이승환, 이학교, 오성중, 정일정, 홍기창. 2005. Microsatellite loci 분석에 의한 한우와 타 품종간의 유전적 유연관계. *한국동물자원과학회지* 47(3):341-354.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.