

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001389-01

주요 가축/반려/멸종위기동물의 개체특성 확인용 종합

DNA 마커세트 상용화

(Commercializing total DNA marker packages to identify
individual characteristics in major
domestic/companion/endangered animals.)

경상대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “주요 가축/반려/멸종위기동물의 개체특성 확인용 종합 DNA 마커세트 상용화”의 보고서로 제출합니다.

2012년 04월 09일

주관연구기관명 : 경상대학교

주관연구책임자 : 양 한 술

세부연구책임자 : 이 정 규

연 구 원 : 임 현 태

연 구 원 : 이 상 훈

연 구 원 : 이 재 봉

연 구 원 : 정 은 지

연 구 원 : 유 채 경

연 구 원 : 박 문 성

연 구 원 : 윤 순 영

연 구 원 : 유 병 호

연 구 원 : 김 정 근

연 구 원 : 박 은 준

연 구 원 : 최 미 란

협동연구기관명 : (주) 젠닥스

협동연구책임자 : 최 규 명

요 약 문

I. 제 목 : 주요 가축/반려/멸종위기동물의 개체특성 확인용 종합 DNA 마커세트 상용화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

주요 가축 및 반려, 멸종위기동물들에 대한 종 특성마커, 개체식별마커 연구는 산발적으로 여러 기관들에 의하여 수행되어 왔으며, 이러한 연구를 통해 얻어진 산재된 분자마커들은 관련 연구 및 산업화에 별 도움이 되지 않고 있는 상황이며, 몇몇 축종의 경우 외국에서 개발된 제품을 수입해 사용하고 있으나, 외국 품종을 대상으로 개발된 제품으로는 국내 고유의 품종에 적용하기에는 무리가 있으며, 또한 allelic ladder가 없음으로 data를 표준화하고 서로 공유할 수가 없는 상황이다. 앞으로 한우뿐만 아니라 돼지 등에도 이력추적제가 전면실시 될 계획으로 이력추적제를 뒷받침하기 위해 DNA 마커에 의한 검증시스템 도입이 예상됨에 따라 국내 현실에 맞는 DNA 분석 마커 개발이 필요하다. 그리고 반려동물의 경우 인간의 삶의 질이 향상되고 여가생활의 관심이 증가하면서 반려동물을 사육하는 사람이 많아짐에 따라 이력추적, 개체 혈연관계, 계통유전학적 분석 및 품종판별에 활용할 수 있는 DNA 마커가 필요하며, 멸종 위기동물의 경우 생태계의 먹이사슬 구조에서 최상위 계층의 조절자 역할을 하고 있는 수달 등 멸종위기동물이 사라진다면 생태계 먹이사슬이 파괴가 될 것이고 여기서 발생하는 피해는 인간들에게 직접적인 영향을 미칠 것으로 생각되 이런 멸종위기동물 보전을 위해 근친도 및 계통학적 분류 등의 과학적 검증을 위해 DNA 마커 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 DNA 마커의 산업화의 한계점을 극복해 이력추적, 개체 혈연관계, 계통유전학적 분석 및 품종판별에 활용할 수 있는 표준 마커 세트를 확립 후 키트화를 통해 국내 동물관련 DNA 마커 연구에 대한 사업 활성화를 추진하기 위함이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 가축(돼지, 닭, 오리)용 DNA 분석 마커 선발 및 키트 개발

▶ 돼지 개체식별용 DNA 마커 효율성 비교 및 현장 적용 검증

- 상업돈군 및 실험축군을 대상으로 기 개발된 13종의 microsatellites (MS) 마커를 대상으로 개체식별 및 친자감별력 검증

- 돼지 개체식별용 DNA 마커 효율성 검증을 위해 13종 MS와 37종 single nucleotide polymorphism (SNP) 개체식별력 추정

- 돼지 MS Allelic ladder 개발

▶ 닭, 오리 개체식별을 위한 DNA 마커 선발 및 키트 개발

- 닭과 오리를 대상으로 후보 MS 마커 선정
- 후보 MS를 대상으로 유전적 다형성 분석을 통해 MS 마커 선발
- 대립유전자형 해석의 용이성 등을 고려한 마커 선발
- 마커별 최적 PCR 증폭조건 확인
- Multiplex PCR을 통한 마커의 증폭과 식별력 검증 및 시제품 출시

2 반려동물(말)용 DNA 분석 마커 선발 및 키트 개발

- ▶ 말 개체식별을 위한 DNA 마커 선발 및 키트 개발
 - 말을 대상으로 후보 MS 마커 선정
 - 후보 MS를 대상으로 유전적 다형성 분석을 통해 MS 마커 선발
 - 대립유전자형 해석의 용이성 등을 고려한 마커 선발
 - 마커별 최적 PCR 증폭조건 확인
 - Multiplex PCR을 통한 마커의 증폭과 식별력 검증 및 시제품 출시

3. 멸종위기동물(수달)용 DNA 분석 마커 선발 및 키트 개발

- ▶ 국내 수달 개체식별용 MS 발굴 및 성(性) 감별 마커 개발
 - NCBI 등에 보고된 수달의 후보 MS 마커 선정
 - 후보 MS를 대상으로 유전적 다형성 분석을 통해 MS 마커 선발
 - 대립유전자형 해석의 용이성 등을 고려한 마커 선발
 - 마커별 최적 PCR 증폭조건 확인
 - Multiplex PCR을 통한 마커의 증폭 및 식별력 검증
 - 수달 성감별을 위한 ZFX, ZFY 유전자를 이용한 마커 개발
- ▶ 수달 whole mtDNA를 이용한 계통유전학적 분석
 - 수달 mtDNA 분석용 primer 제작을 위한 염기서열 확보
 - 수달 whole mtDNA (D-loop, CYTB, ND2, ND4 등)의 염기서열 확보를 통한 국내 수달의 계통 유전학적 분석 및 다형성분석

4. 종 식별 및 혼입육 정성/정량확인용 DNA 분석 마커 선발 및 키트 개발

- ▶ 종 식별 마커 및 키트 개발
 - 축종별 mtDNA 분석을 통한 종 특이적 변이 선발
 - 축종별 Species-specific primers 개발
 - 6종의 mtDNA 유전자의 개체식별력 추정
 - 자동 전기영동장치를 이용한 분석 키트 개발
- ▶ 혼입육 정성/정량확인 체계 및 키트 개발

- 혼입육 식별가능 마커 발굴
- 축종별 Species-specific primers 개발
- 자동 전기영동장치를 이용한 혼입육 식별
- 축종별 농도에 따른 standard curve작성
- 혼입육 농도별 standard curve작성
- 자동 전기영동장치를 이용한 분석 키트 개발

IV. 연구개발결과

본 연구 과제를 통하여 개발된 DNA 분석 키트 및 마커들은 가축(돼지, 닭, 오리, 종 판별, 혼합육 판별), 반려동물(말), 멸종위기동물(수달)을 대상으로 다양성을 갖추고 있어 다양한 연구 분야에서 활용할 수 있다.

- 가축의 경우 돼지, 닭, 오리를 대상으로 하고 있고 돼지의 경우 이력추적제를 대비하여 상업돈군을 대상으로 각각의 DNA 마커 효율성을 검증하여 13종의 MS와 37종의 SNP 모두 국내 양돈산업에 적용이 가능한 것으로 분석되었고, 닭과 오리의 경우 닭은 15종의 MS 마커, 오리는 12종의 MS 마커를 확보하여 향후 원산지 정보를 이용한 개체추적 시스템을 통해 가축 질병의 확산과 방역 위생 산업에 활용 가능하도록 DNA 분석 키트를 개발하였다.
- 종 판별 및 혼합육 판별의 경우 6종의 품종(소, 돼지, 닭, 개, 말, 오리)을 대상으로 mitochondrial DNA cytochrome B 를 대상으로 염기서열 분석을 통해 품종 특이적인 region의 primer를 제작해 DNA 마커 개발 및 시제품을 제작하였다.
- 반려동물인 말의 경우 국내 우수한 말들의 혈통관리 및 유전학적 연구에 활용 할 수 있도록 10종의 MS와 2종의 성(性) 감별 마커로 구성된 친자확인 및 개체식별 DNA 분석 키트를 개발하였다.
- 멸종위기동물인 수달의 경우 국내 최대 수달 서식지로 알려진 경상남도 진주시에 위치한 진양호에 서식 중인 수달을 대상으로 개체식별용 MS 마커 및 성(性) 감별 마커를 개발하고 수달 whole mtDNA (D-loop, CYTB, ND2, ND4 등)의 염기서열 분석을 실시하여 이를 통해 국내 수달의 계통 유전학적 분석 및 유전적 다형성분석의 기초를 마련하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 과제를 통하여 개발된 DNA 분석 키트 및 마커들은 가축(돼지, 닭, 오리, 종 판별, 혼합육 판별), 반려동물(말), 멸종위기동물(수달)을 대상으로 다양성을 갖추고 있어 다양한 연구 분야의 연구자들이 사용할 수 있도록 다양한 환경에 맞추어 공급할 수 있도록 여러 형태로 확장해 나가고자 함.
- 주요가축 개체식별 키트들은 국가 연구기관 및 육류생산 브랜드에 직접적으로 판매가 될 수

있을 것으로 예상되며, 소규모 유통업체, 지자체등을 대상으로 자체적으로 키트를 이용하여 분석 서비스도 가능함.

- 반려동물이자 경제동물인 말의 경우, 최근 말 산업 육성법이 국회를 통과하는 등 산업적 성장 가치가 매우 크고 비약적 발전이 기대되는 축종이기 때문에 여러 지자체에서도 말 생산이나 승마의 보급 등 지역경제 활성화를 위한 다양한 시도가 이루어지고 있음. 따라서 본 과제에서 개발된 개체식별키트는 향후 마사회는 물론 지역 단위의 말 산업 등에 적극 적용하여 협통 확인에 의한 육종체계의 발전 및 말에 관한 여러 연구 분야에 활용될 수 있도록 준비할 계획임.
- 또한 닭관련 산업의 발전과 함께 오리 산업이 크게 발전하고 있지만 그에 반하여 다른 가축에 비하여 유전적 연구는 빈약한 상황이므로 개발된 오리 및 오리고기의 개체식별기술이 산업에 적용될 수 있도록 준비할 계획임.
- 종식별 또는 혼입육 판별 기술은 국내산 축산물 중 혼합육으로 제조된 축산물의 진위 여부 판별이 가능하여 단속기관 및 업체에 기술이전 및 키트 판매가 가능하며, 법의학 분야의 증거물 검정 등에도 활용될 수 있도록 함.
- 수달의 계통유전학적 분석 기술은 관련 연구자와 연구기관 등에 기술이전이 가능할 것으로 예상되며 학문적, 산업적 이용의 확대를 위해 적극적인 기술교육등을 실시할 계획임.
- 개발된 각 축종별 DNA 분석 키트의 특허출원을 통한 지적재산권을 우선 확보하고 상용화 하여 관련 산업의 발전에 크게 활용될 수 있도록 할 것임.
- 특히, 돼지 개체식별 기술 및 제품은 쇠고기이력관리제가 성공적으로 정착하는데 중요한 역할을 했던 소 개체식별 기술 및 제품과 마찬가지로, 향후 돼지이력관리제에서 아주 중요하게 사용될 수 있을 것으로 예상되므로 적극적인 홍보를 계획하고 있음.
- 본 과제에서 개발된 기술 및 제품들은 다양한 축종의 협통 및 사양 관리, 원산지 추적등에 사용될 수 있으므로 국가기관, 지자체기관 및 분석업체등에 제품 판매 및 서비스 확대를 극대화 하고자 함
- 무엇보다도 원산지 정보가 중요한 축산물의 이력관리에 폭넓게 사용될 수 있도록 기술 및 제품을 계속적으로 보완 할 것이며, 본 과제의 성과물이 동물 또는 축산물의 올바른 생산, 유통 그리고 소비체계의 확립에 기여할 수 있도록 할 계획임.
- 전염성 가축 질병등의 확산 방지와 방역, 위생체계 관리에 큰 도움이 될 것임.

SUMMARY

The DNA analysis kits and markers developed in this study may be used in differentiating a diversity of species, such as livestock (pigs, chickens, and ducks), companion animals (horses), and endangered animals (otters), and therefore may be utilized in various research fields.

- Relevant livestock includes pigs, chickens, and ducks. In regard to pigs, the efficiency of each DNA marker in differentiating a commercial herd was examined in order to prepare for the introduction of tracing system, and the applicability of microsatellite (MS) markers, for 13 species, and single-nucleotide polymorphism (SNP) markers, for 37 species, was verified for the domestic pig industry. In addition, 15 MS markers for chickens and 12 MS markers for ducks were obtained. The DNA analysis kit was developed so that it could be used for the prevention of disease transmission, and for the quarantine and hygiene industry, using an object tracking system that uses origin information.
- For species and mixture meat differentiation, the mitochondrial DNA cytochrome B gene sequences of six species (cows, pigs, chickens, dogs, horses, and ducks) were analyzed, and species-specific primers were devised; DNA markers were developed and prototypes were manufactured.
- For horses, a DNA analysis kit for paternity testing and individual identification, consisting of ten MS markers and two sex differentiation markers, was developed for pedigree management and genetic research on domestic horses.
- For otters, an endangered species, MS markers for individual identification and sex differentiation were developed by studying those (*Lutra Lutra*) living in Jinyang Lake, located in Jinju, Gyeongsangnam-do, which is known as the largest habitat for otters in Korea. Analysis of all their mtDNA sequences (*D-loop*, *CYTB*, *ND2*, and *ND4*) was conducted, thereby laying the foundation for phylogenetic and genetic polymorphism analyses of domestic otters.

Different entities may make use of the DNA markers and analysis kits that were developed based on the above study results, and for diverse purposes. National research institutes and meat manufacturers may utilize the kits for the individual identification of major livestock. The DNA analysis kits for species and mixture meat differentiation may be used to judge whether mixture meat manufactured with domestic livestock is genuine. Transfer of this technology to regulatory institutions may increase the reliability of livestock products by strengthening transparency in the

manufacturing process. The DNA analysis kit for horses, a companion animal, may be utilized for pedigree management and genetic research through a linkage with the Korea Racing Authority (KRA) and local horse riding clubs. The DNA markers for otters may be utilized by researchers and research institutes, through technology transfer and education, as the basic material for endangered species research. This study obtained results that can be employed by diverse researchers.

CONTENTS

Chapter 1. General Introduction	1
1. The Needs and Purpose of Research and Development	1
Chapter 2. The Current Status of Domestic and Overseas Technology Development	6
1. The Current Status of Domestic Product Manufacturing and Markets	6
2. The Current Status of Overseas Product Manufacturing and Markets	7
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development	9
1. The Development of DNA Markers for the Individual Identification of Pigs ..	9
2. The Selection of MS Markers and the Development of Kits for the Individual Identification of Horses	19
3. The Selection of MS Markers and the Development of Kits for the Individual Identification of Chickens	25
4. The Selection of MS Markers and Development of Kits for Individual Identification of Ducks	26
5. The Selection of MS Markers and the Development of Kits for Species Identification	29
6. The Development of DNA Markers for the Qualitative and Quantitative Identification of Mixture Meat	33
7. The Development of DNA Markers for Otters(<i>Lutra Lutra</i>)	41
Chapter 4. Achievement degree of objective and Contribution degree to related field	58
Chapter 5. Research and Development Performance and Plans for Utilization ..	61

Chapter 6. Overseas Scientific and Technological Information Collected in the Research and Development Process	63
Chapter 7. References	65

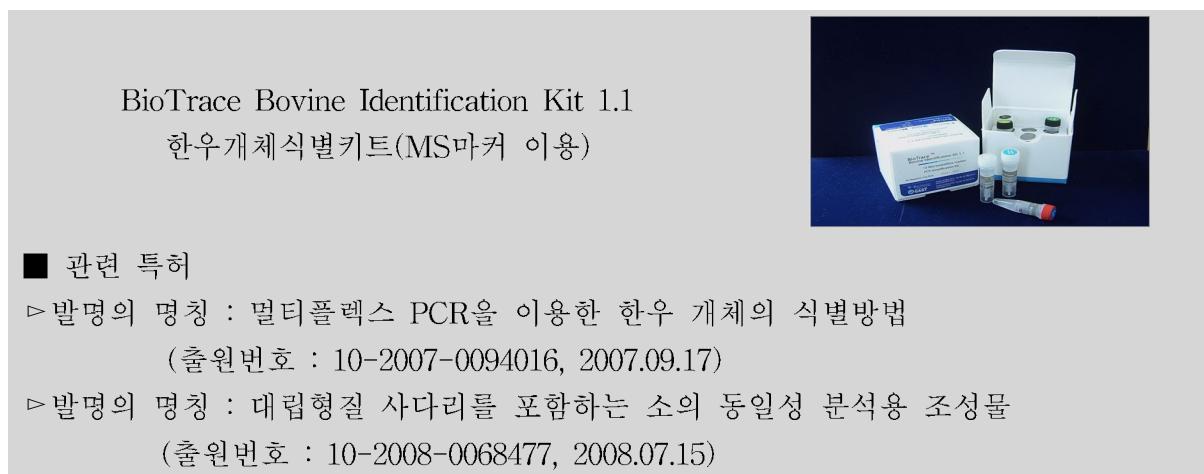
목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발의 필요성 및 목적	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	6
1. 국내 제품생산 및 시장 현황	6
2. 국외 제품생산 및 시장 현황	7
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	9
1. 돼지 개체식별을 위한 DNA 마커 개발	9
2. 말 개체식별을 위한 MS 마커 선발 및 키트 개발	19
3. 닭 개체식별용 MS 마커 선발 및 키트 개발	25
4. 오리 개체식별을 위한 MS 마커 선발 및 키트 개발	26
5. 종 식별용 DNA 마커 선발 및 키트 개발	29
6. 혼입육 정성/정량 확인용 DNA 마커 개발	33
7. 멸종위기 동물인 수달(<i>Lutra lutra</i>)의 DNA 마커 개발	41
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	58
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	61
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	63
제 7 장 참고문헌	65

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성 및 목적

- 주요 가축 및 반려동물, 멸종위기동물들에 대한 종 특성마커, 개체식별마커 연구는 산발적으로 여러 기관들에 의하여 수행되어 왔으며, 산재된 분자마커들은 연구 및 산업화에 별 도움이 되지 않고 있는 상황임
- 몇몇 축종의 경우 외국에서 개발된 제품을 수입해 사용하고 있으나, 외국의 품종을 대상으로 개발된 제품으로 국내 고유의 품종에 적용하기에는 무리가 있으며, 또한 allelic ladder 가 없음으로 data를 표준화하고 서로 공유할 수 없음
- 국내에서 2007년 개발된 한우 개체식별키트는 allelic ladder로 인하여 국내의 서로 다른 기관 및 기기, 시험자가 사용을 하여도 서로 공유할 수 있는 방안을 제시한바 있음
 - 2007년 본 연구팀(경상대학교, (주)젠탁스)은 한경대학교와 공동으로 생산단계 DNA 동일성 검사 키트 “BioTraceTM Bovine Identification Kit 1.1” 개발 출시한바 있음



BioTrace Bovine Identification Kit 1.1
한우개체식별키트(MS마커 이용)

■ 관련 특허

- ▷ 발명의 명칭 : 멀티플렉스 PCR을 이용한 한우 개체의 식별방법
(출원번호 : 10-2007-0094016, 2007.09.17)
- ▷ 발명의 명칭 : 대립형질 사다리를 포함하는 소의 동일성 분석용 조성물
(출원번호 : 10-2008-0068477, 2008.07.15)

- 이 제품은 농림수산식품부 「쇠고기 이력추적시스템 사육단계 DNA 검사」 사업에 DNA 동일성 검사 표준 시약으로 선정되어 사용되고 있음
- 한우뿐만 아니라 향후 돼지 등에도 이력추적제가 전면실시 될 것이며, DNA 마커에 의한 이력추적제 검증시스템의 도입이 예상되고 있음
- 2004년 농림기술센터(ARPC) 연구과제“돼지 광역브랜드 개발을 위한 교배조합별 육질·생산성 연구”를 통해 돼지 개체식별 및 브랜드 식별을 위한 초위성체 DNA마커를 13종을 선발하여 성감별 마커 2종을 추가해 특허 출원을 하였으며 경상대학교 학교기업 GAST에 기술이전을 시행하였음

■ 관련 특허

- ▷ 발명의 명칭 : 마이크로세틀라이트 마커를 이용한 돼지의 개체식별 및 브랜드유
식별 방법(출원번호 : 10-2007-0075426)

- 따라서 본 연구에서는 DNA 마커의 산업화의 한계점을 극복해 생산이력, 개체 혈연관계, 계통유전학적 분석 및 품종판별에 활용할 수 있는 표준 마커 세트를 확립하여 키트화를 이루어 국내 동물관련 DNA 마커 및 판별 연구에 대한 사업 활성화를 추진하고자 함

가. 가축(소, 돼지, 닭, 말)용 DNA 마커의 필요성

- 가축의 경우도 최근에는 축산물의 생산량보다는 축산물의 안전성과 품질, 제품을 구매하는 데 있어 제품의 진위여부 등에 초점이 맞추어지게 되었음
- 따라서, 가축 및 축산물의 원산지 또는 품종판별법이 주요한 유통검증 체계로 부각되고 있고, DNA 마커는 이를 실현 가능하도록 하는 중요한 기법이 되었음
- 가축을 이용한 바이오신약, 바이오장기 등의 연구는 주로 증식을 위한 목적으로 복제를 활용하고 있음
- 복제동물의 상염색체, 모계 및 부계 유전자 검증을 통한 복제동물의 정확성 판정을 위하여 DNA 마커는 중요한 수단임
- 또한 가축의 기원, 이동, 분포 및 교류를 파악하기 위하여 DNA 마커는 현재까지 가장 강력한 기구로서 인정받아오고 있어 일반 연구자들이 범용적으로 활용할 수 있는 상업화된 키트 또는 분석 시스템이 필요함
- 말의 경우 레저산업의 발전 및 축산물 이용을 통해 고부가가치의 잠재력을 가진 가축으로 축산농가에 새로운 소득원으로 성장하였음. 따라서 마사회에서 관리하는 경주용 말 이외에도 제주지역과 일부내륙지방에서 사육되고 있는 조랑말 등에 대한 체계적인 관리가 필요함
- 말의 경제적 가치 측정에 혈통이 중요한 요소로 작용하는 점을 감안해서라도 과학적인 검증을 위한 DNA 마커 개발이 필요함. 외국에서 초위성체마커(Microsatellite, MS)를 이용한 개체식별용 DNA 마커가 키트화 되어 상용화 되고 있으나 키트 가격이 고가로 분석비용이 많이 드는 단점이 있음
- 또한 키트의 표준화가 이루어지지 않아 데이터를 표준화 시킬 수 없기 때문에 이런 단점을 보완하기 위해 DNA 마커 키트 국산화와 이에 맞는 키트 표준화 기술이 개발되어야 함

표 1-1. 주요 가축의 개체특성 확인용 DNA 분자마커 개발현황 및 적용분야

동물종	상염색체				중식별 및 모계검증			성판별 및 부계검증		적용분야
	MS	SNP	FG	PG	mtD	mtG	XG	YG	YR	
소	상용화	개발중	x	x	개발중	개발중	개발중	연구중	연구중	-쇠고기이력추적시스템 -브랜드육 식별
돼지	개발중	x	x	x	개발중	개발중	개발중	개발중	개발중	-돼지이력추적시스템 -브랜드육
닭	연구중	연구중	x	x	x	x	x	x	x	-사양 및 육종관리
말	상용화	연구중	x	x	연구중	연구중	x	연구중	x	-말 개체관리시스템 -혈통확인
적용 분야	-친자관계확인 -혈통검증 -개체식별 및 브랜드육 식별 등			-동물의 종구분 -동물성의약품 검증 -건강식품 확인 검증 -혈통보존 및 관리			-육종관리 -혈통 보존 및 관리			

주) 표내 영문 및 국문의 약식표기의 의미는 아래와 같음.

MS: Microsatellite, SNP: Single Nucleotide Polymorphism, FG: Functional gene, PG: Pseudogene, mtD: Mitochondrial DNA D-loop, mtG: Mitochondrial genes, XG: Genes on X chromosome, YG: Genes on Y chromosome, YR: Repetitive elements on Y chromosome
 상용화: 제품화된 키트로 판매중, 개발중: 제품으로 개발 중, 연구중: 실험실 단위에서 연구완료 및 활용중, x : 연구 중 또는 개발된 마커 없음

나. 반려동물(개, 고양이)용 DNA 마커의 필요성

- 인간의 삶의 질이 향상되고 여가생활의 관심이 증가하면서 개와 고양이 등의 반려동물을 사육하는 사람이 많아지고 있음
- 개와 고양이의 경우 사람과 같이 의식주를 같이 하며 가족과 같은 개념으로 키워 지고 있으며, 사람의 반려동물로 자리를 잡았음
- 하지만 가정경제가 어려워져 사육 비용이 부담스러워 지거나 개와 고양이가 병이 들어 사육하기가 부담스러워지는 경우 유기되는 반려동물들이 늘어나면서 사회적인 문제로 발생
- 이 같은 사회적 문제를 해결하기 위해 반려동물 관리를 위한 법이 제정되어 지자체별로 시행되고 있으며 RFID Chip이나 인식표를 활용하고 있음
 - 동물보호법 시행령(일부개정 2008. 10. 8 대통령령 제21095호)
 - ‘반려동물 등록제’ 성남서 첫 실시(조선일보, 2008. 10. 3)
- RFID Chip의 경우 개체의 몸속에 삽입해야 하여 동물 복지차원에서 문제가 될 수 있고, 인식표의 경우 분실 및 임의제거 등의 문제가 발생할 수 있어 이런 문제점을 보완하고 과학적인 검증과 관리를 위한 수단으로 DNA 마커를 개발하여 활용 할 수 있음.
 - ‘애완견 배설물과의 전쟁에서 DNA 활용한다’(고뉴스, 2008. 9. 19)
- 순종의 진위여부, 혈통등록의 정확성을 검증 및 보완하기 위한 수단으로 반려동물의 DNA 마커는 중요한 수단이 될 수 있음

표 1-2. 주요 반려동물의 개체특성 확인용 DNA 분자마커 개발현황 및 적용분야

동물종	상염색체				모계			부계		적용분야
	MS	SNP	FG	PG	mtD	mtG	XG	YG	YR	
개	상용화	연구중	X	X	연구중	X	X	X	X	-개 개체관리 시스템 -혈통확인
고양이	연구중	X	X	X	연구중	X	X	X	X	-고양이 개체관리 시스템 -혈통확인

다. 희귀야생동물(수달, 삵)용 DNA 마커의 필요성

- 대표적 희귀동물인 수달과 삵에 관한 DNA마커 관련 연구는 국내에서 거의 이루어진바 없음.
- 수달의 경우 천연기념물로 국내에 서식하는 두수가 아주 작음
- 수달과 삵은 호랑이, 늑대 등이 사라진 생태계 먹이사슬에서 육식동물 중 최상위 계층에 속해 생태계 먹이사슬을 조절하는 역할을 수행하고 있으나, 기초연구를 위한 최소한의 연구도 이루어지고 있지 않은 실정임
- 생태계의 먹이사슬 구조에서 최상위 계층의 조절자 역할을 하고 있는 이런 희귀야생동물들이 사라진다면 생태계 먹이사슬이 파괴가 될 것이고 여기서 발생하는 피해는 인간들에게 직접적인 영향을 미칠 것으로 사료됨
- 따라서 이런 희귀야생동물 보전을 위해 근친도 및 계통학적 분류 등의 과학적 검증을 위해 DNA 마커 개발이 필요
- 멸종위기에 있었으나 최근 먹이사슬의 최상위가 됨에 따라 개체수가 급증한 멧돼지의 경우 돼지 mtDNA의 D-loop지역을 이용한 계통유전학 연구를 본 연구기획 실험실에서 수행하였음

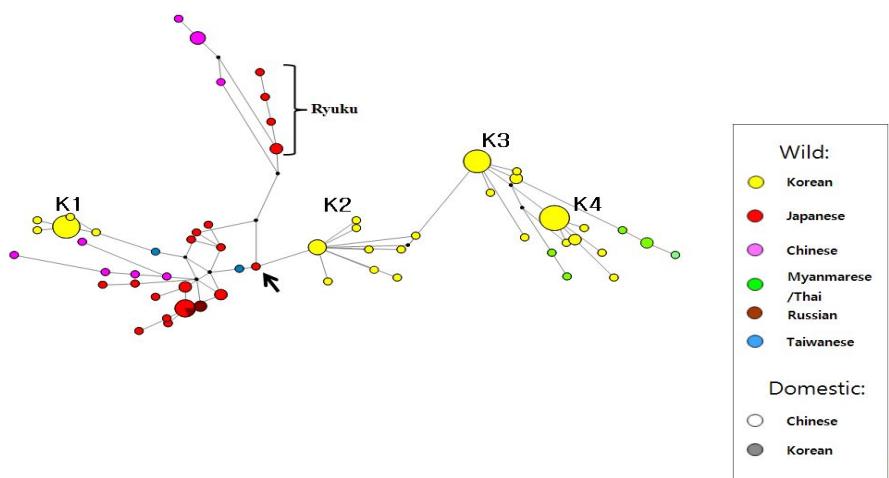


그림 1-1. 한국 맷돼지의 계통유연관계도. 우리나라 맷돼지는 4개의 그룹 (K1-K4)으로 구분되고, K1의 경우 일본, 중국 등의 맷돼지와 유사하며 K2의 경우 한국의 최초 도입된 돼지 집단으로 추정됨.

- 위의 예와 같은 분석을 멸종위기종에 활용하여 현 개체들간의 혈연관계등을 추정하여, 적극적 보존 및 중식방법 모색을 위한 기초자료로 활용할 수 있음

표 1-3. 주요 멸종위기동물의 개체특성 확인용 DNA 분자마커 개발현황 및 적용분야

동물종	상염색체				모계			부계		적용분야
	MS	SNP	FG	PG	mtD	mtG	XG	YG	YR	
수달	연구중	X	X	X	X	X	X	X	X	-계통유전학적연구 -유연관계확인
삵	연구중	X	X	X	X	X	X	X	X	-

라. 법의학적 측면에서의 주요 가축 및 동물의 DNA 마커의 필요성

- 법의학적으로 동물의 뼈, 헬흔, 체모 등에 대한 식별은 다양한 사건현장에서 매우 다양하게 이루어짐. 즉, 변사체의 위 내용물, 유실된 뼈조각등의 검정에 DNA 분자마커는 결정적인 역할을 하기도 함

Int J Legal Med (2002) 116: 286–288
DOI 10.1007/s00414-002-0302-2

CASE REPORT

Z. Pádár · B. Egyed · K. Kontadakis · S. Füredi · J. Woller
L. Zöldág · S. Fekete

Canine STR analyses in forensic practice

Observation of a possible mutation in a dog hair

그림 1-2. 개의 공격에 의한 7세 소년 사망사건에 대하여 개 식별 분자마커 이용한 사례에 대한 논문

- 회귀동물 또는 보호동물들에 대한 밀렵과 함께 식용 및 건강식품으로 둔갑하는 사례가 지속되고 있는 상황에서 이들에 대한 유전적 검정은 매우 중요함
 - ‘영양군, 야생동물 불법포획 집중 단속’(연합뉴스, 2008. 11. 20)
- 또한 최근 동물성 의약품 시장이 크게 확대되고 있으며, 건강식품 또한 마찬가지인 상황 이므로, 이러한 제품의 원재료에 대한 검정은 법적인 측면에서 매우 중요함
 - 인태반 의약품제제에 동물성태반을 혼입하는 경우 등

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내에서 생산되는 동물개체 식별키트는 본 연구팀의 세부과제 팀인 GAST, (주)젠탁스가 개발한 한우 친자확인 및 개체식별키트 'BioTrace™ Bovine Identification Kit 1.1' 이 유일함
- 국내의 주요 시장현황은 관련연구기관 및 연구자들에 의해 수입이 되어 사용되었으나, 최근에는 농림수산식품부 산하 농산물품질관리원, 축산물품질평가원, 가축위생연구소, 보건환경연구원 등에서 'BioTrace™ Bovine Identification Kit 1.1'을 수입품을 대체하여 주로 사용하고 있는 상황임
- 특히, '쇠고기 이력추적제'의 「쇠고기 이력추적시스템 사육단계 DNA 검사」 시범사업에 2007년부터 공식 표준시약으로 공급되어 사용되고 있음
- 한우 및 수입육 판별을 위해 43종의 MS 마커를 이용한 판별 키트인 "참 한우지기"를 본 연구팀에서 개발하여 농림수산식품부 산하 농산물품질관리원, 가축위생연구소, 보건환경연구원 등의 검사기관에서 활용하고 있음
- 한우 개체식별키트 이외에는 현재 연구단계에 있지만, 한우 이외의 돼지를 포함한 육류의 안정성 또한 지속적으로 문제제기가 될것으로 예상되므로 관련 산업 시장은 크게 확대 될 것으로 예상함
- 최근 안전한 육류 소비에 대한 욕구가 늘어나면서 많은 회사 및 단체에서 DNA마커를 기반으로 이력추적(Traceability)을 실시하고 이를 하나의 상표로 하여 육류를 판매하는 산업이 새로운 산업으로 성장하고 있음

표 2-1. 국내 DNA 분자마커를 이용한 동물 개체식별 키트 제품 현황

제품명	마커 숫자	Allelic ladder	제조사	장점	단점
BioTrace™ Bovine Identification Kit 1.1 (소 개체식별키트)	13 MS markers	있음	대한민국/ (주)젠탁스, GAST	<u>표준화 가능</u> <u>가격경쟁력</u>	-

표 2-2. 국내 DNA 분자마커를 이용한 동물 개체식별 키트 관련산업 현황

상품명	개요	판매처	비고
GAST	MS 마커 기반 한 이력추적제	대한민국/GAST	
한우 및 수입육 판별	MS 마커 기반 한 원산지추적	대한민국/GAST	

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 표 2-3에서 보는 바와 같이 주요 개체식별용 제품은 소, 개, 말에 대한 것 뿐임.
- 주로 MS마커를 이용한 제품들이며, SNP 마커를 활용한 제품은 출시되지는 않았지만 미국 USDA(United States Department Of Agriculture)에서 마커 SNP 60여개로 미국육우 및 젖소의 개체를 식별하고 추적하는 연구가 진행중임.
- 주로 미국의 AppliedBiosystems사에서 전 세계시장을 독점하고 있는 상황이며, 최근 들어 타회사에서 몇몇 제품을 출시하고 있거나 연구개발이 진행중임.
- 국내와 마찬가지로 국외에서도 마찬가지로 DNA마커를 기반으로 이력추적(Traceability)을 실시하고 이를 하나의 상표로 하여 육류를 판매하는 산업이 새로운 산업으로 성장하고 있음.

표 2-3. 국외 DNA 분자마커를 이용한 동물 개체식별 키트 제품 현황

제품명	마커 숫자	Allelic ladder	제조사	장점	단점
StockMarks for Cattle® Genotyping System (소 개체식별키트)	11 MS markers	없음	미국/ Applied Biosystems사	인지도 높음	표준화 불가능 고비용
StockMarks for Dogs Genotyping System (개 개체식별키트)	10 MS markers	없음	미국/ Applied Biosystems사	인지도 높음	표준화 불가능
StockMarks for Horse Equine Genotyping System (말 개체식별키트)	17 MS markers	없음	미국/Applied Biosystems사	인지도 높음	표준화 불가능
Bovine Genotypes™ Panels (소 개체식별키트)	11 MS markers	없음	핀란드/ FINNZYMES DIAGNOSTICS사	-	표준화 불가능
SNP 개체식별 solution	60 SNP markers	-	미국/USDA	-	-

표 2-4. 국외 DNA 분자마커를 이용한 동물 개체식별 키트 관련산업 현황

상품명	개요/마커	판매사
DNA TraceBack	MS 분자마커에 기반한 이력추적 solution	Ireland/IdentiGEN. Ltd
Prosampler	DNA 기반 이력추적제, MS마커	USA/Jenrik Ag, LLC
EID DNA Tracing	RFID Chip, DNA(MS)	EU/Safemeat
Cattle DNA Tests	MC1R(모색유전자)	GENESEEK
IGENITY™ MultiMARK™ Dairy	Coat color Multisire parentage 등	Igenity
GeneSTAR® Tenderness4	CAST, CAPN1등 형질관련유전자	Australia/Genetic Solution Pty. Ltd.
Genetic Visions®	BLAD, DUMPS(유전질병등)	Genetic Visions, Inc.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 돼지 개체식별을 위한 DNA 마커 개발

가. 돼지 개체식별을 위한 MS마커 산업적 활용성 검증

본 연구진이 기 구축한 돼지 개체식별을 위한 MS 마커 13종과 성감별이 가능한 2쌍의 primer를 추가하여 한번에 PCR이 가능하도록 구축한 Multiplex-PCR 시스템을 활용하여 (Figure 1), 상용축군 검증을 위해 경남 K종돈장의 계열농가의 (Landrace × Large White) × Duroc의 3원 교잡종 400두와 국립축산과학원 난지축산시험장의 제주재래돼지와 Landrace를 이용한 계통축군 1,238두를 활용하여 실시하였다.

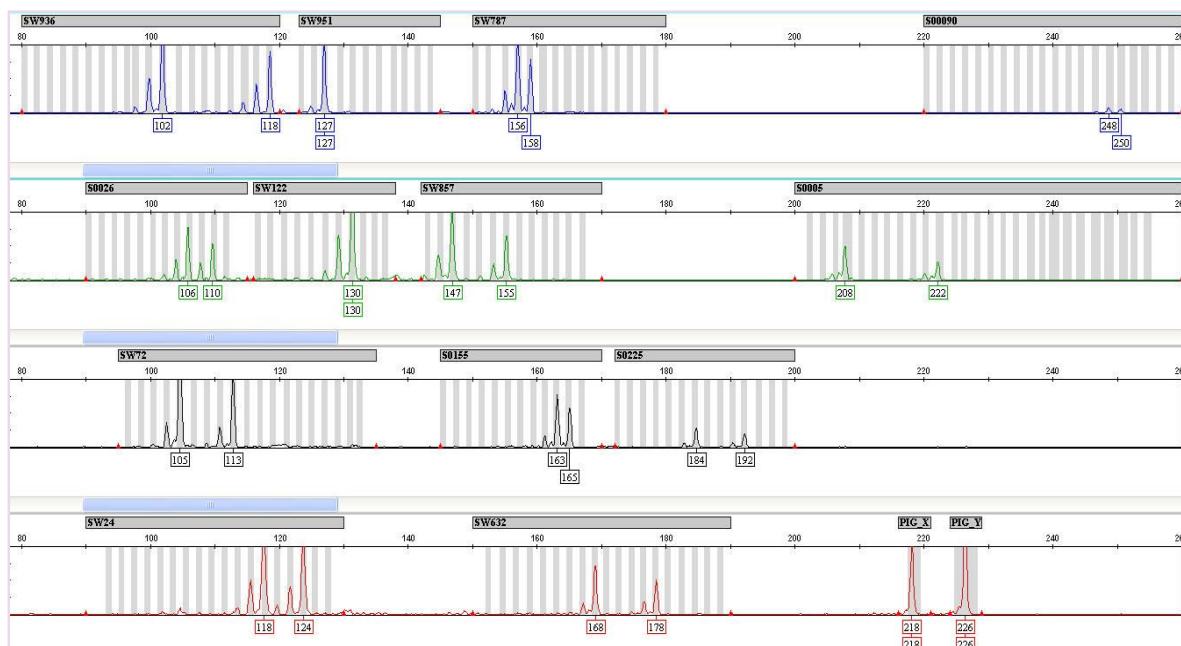


그림 3-1. Multiplex-PCR 시스템을 이용한 13종 MS 마커 대립유전자형 분석결과

13종의 MS 마커로 구성된 돼지 개체식별 마커의 대립유전자형 분석 결과를 활용하여 마커 다양성지수(He 와 PIC)는 CERVUS version 2.0 프로그램(Marshall 등, 1998)을 이용하여 분석하였고, F -통계량을 추정하기 위해 FSTAT version 2.9.3(Goudet, 2001)과 GENEPOL version 3.4 프로그램(Raymond와 Rousset, 1995)을 사용하였으며, API-CALC version 1.0 프로그램(Ayres와 Overall, 2004)을 이용해 동일개체 출현확률 계산하였다.

경남 K종돈장 3원 교잡종 400두를 이용하여 분석한 13종의 MS 마커의 종류와 마커별 allele의 분포와 He 및 PIC 추정치는 표 3-1에 나타내었다.

표 3-1. 돼지 개체식별용 13 MS 마커 및 대립유전자형 분포.

Locus	Chromosome	Annealing temp °C	N	No. of alleles	Size range(bp)	He	PIC
S0005	5	60°C	321	17	203~243	0.869	0.908
SW24	17	58°C	324	11	96~121	0.725	0.822
SW787	18	60°C	323	8	150~165	0.724	0.798
SW122	6	58°C	320	9	110~122	0.716	0.785
SW857	14	58°C	324	8	144~160	0.667	0.807
SW72	3	58°C	326	6	101~115	0.666	0.714
SW632	7	58°C	325	10	159~180	0.655	0.774
S0026	16	58°C	323	7	92~106	0.650	0.712
S0155	1	58°C	325	6	150~166	0.585	0.725
S00090	12	58°C	301	7	240~253	0.568	0.703
SW936	15	58°C	326	8	80~117	0.518	0.665
S0225	8	58°C	325	5	170~196	0.477	0.573
SW951	10	58°C	323	6	125~133	0.316	0.365

이 중 가장 많은 allele의 개수는 S0005에서 나타난 17개였으며, 가장 높은 He와 PIC 값을 갖는 MS 마커 역시 S0005로 He 값은 0.869이며, PIC 값은 0.908로 나타났다. 그리고 추정된 F -통계량을 이용하여 무작위, 반형매 그리고 전형매교배집단으로 가정하여 MS 유전자형의 동일한 개체 출현확률(probability of identity; PI, probability of identity from half sibs; $PI_{half-sibs}$, and probability of identity from sibs; PI_{sibs})과 친자감정확률 (probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed ; PE_{pu} 와 probability of paternity exclusion; PE)을 API-CALC version 1.0과 Cervus version 2.0을 이용하여 추정하였으며, 그 결과는 표 3-2에 나타내었다.

표 3-2. 무작위, 반형매 그리고 전형매교배집단으로 가정하여 동일 개체 출현확률 추정 결과.

No. of MS	PI	$PI_{half-sibs}$	PI_{sibs}	PE_{pu}	PE
13 MS	2.47×10^{-18}	6.39×10^{-13}	1.08×10^{-8}	0.999998	0.999669

13종의 MS 마커를 사용할 경우 무작위 교배집단(PI)에서는 2.47×10^{-18} , 반형매 교배집단($PI_{half-sibs}$)은 6.39×10^{-13} 그리고 전형매 교배집단(PI_{sibs})은 1.08×10^{-8} 으로 추정되었고, 친자확인율에서도 100%에 가까운 확률 값을 추정할 수 있었다. 이러한 추정치의 의미는 국내의 돼지 전체사두수가 2007년 기준으로 약 9,659,000두 임을 고려해 보더라도 국내의 상업돈군으로 활용되는 3원 교잡종에서도 충분한 개체식별 및 친자 감별이 가능하며, 이를 이용해 브랜드 식별 및 원산지 추정에 활용 가능하다고 사료되어 진다. 하지만 돼지의 경우는 소에 비해 개체 당 생산이윤이 낮기 때문에 전 개체에 대하여 개체식별을 위한 DNA 검사는 생산비용이 상승하는 요인으로 작용할 수 있어 브랜드 별로 실시하는 것이 적합하다고 판단되어(그림 3-2), 브랜드 단위 검증을 위해 제주재래돼지 19두와 Landrace 17두를 활용해 F_1 91두를 생산하고, 생산된 F_1 91두를 교배시켜 F_2 1111두를 생산한 전형매교배 축군으로 조성되어 있는 제주 난지 축산시험장의 계통축군 F_0 , F_1 그리고 F_2 전체 1,238두을 활용해 친자감별 및 동일개체 출현여부를 검증한 결과 100% 친자확인이 가능하였고 대립유전자형 분석결과 동일개체 출현이 없는 것을 확인하였다(그림 3-3).

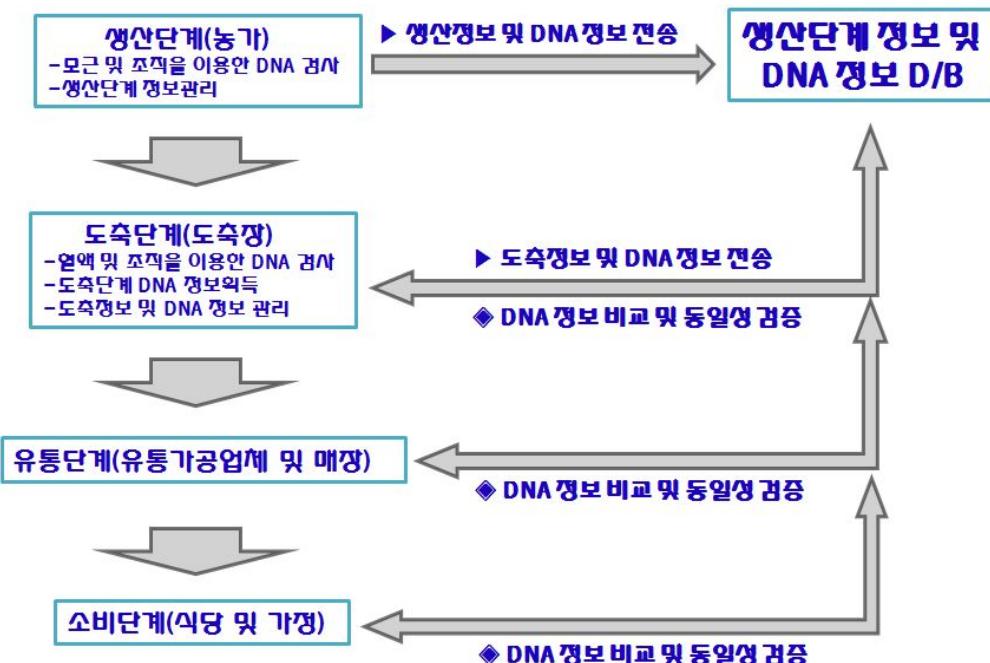


그림 3-2. 브랜드 단위의 돼지 개체추적 모식도

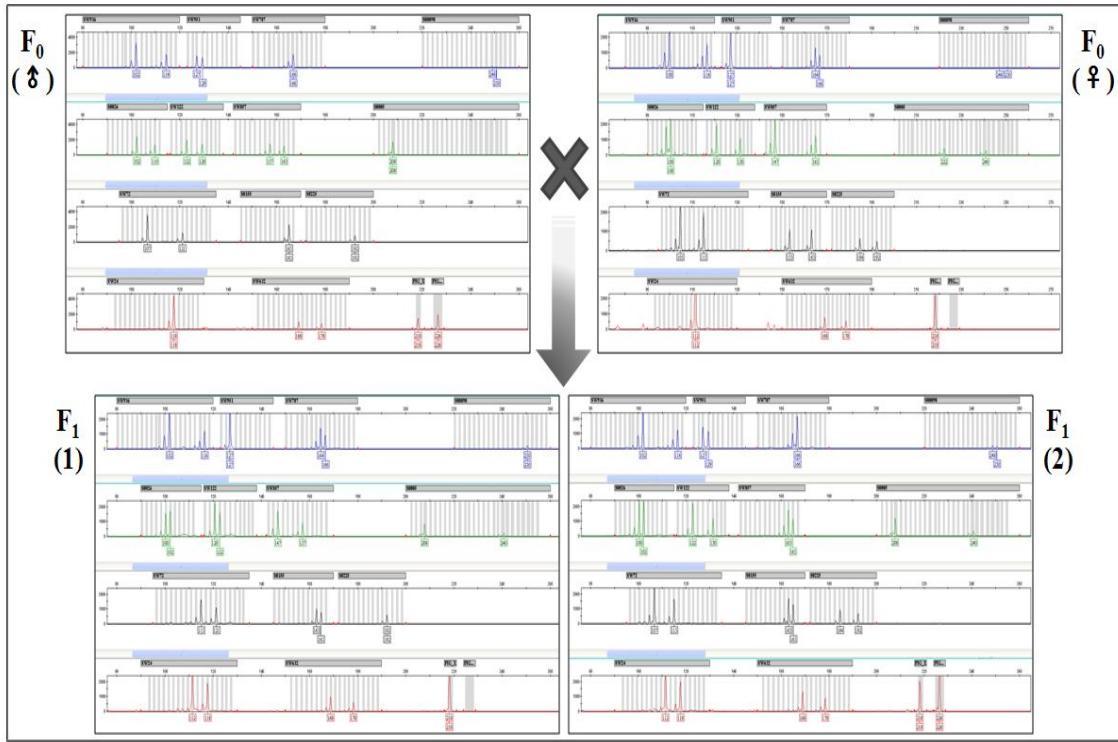


그림 3-3. 13종 MS 마커를 이용한 전형매교배집단 내에서 친자확인을 위한 대립유전자형 분석 결과

나. 돼지 개체식별용 MS 마커 상용화를 위한 Allelic Ladder 개발

13종의 MS 마커에 대한 상용축군 검증 결과를 통해 본 연구진이 기 확보한 돼지 개체식별 마커의 활용성을 검증하였고, 본격적인 상용화을 위해 MS 마커를 이용한 대립유전자형 분석 시 환경적 요인으로 발생하는 오차값을 보정하고 분석기관 및 분석기기에 상관없이 동일한 개체의 경우 동일한 데이터로 보정 할 수 있도록 표준 데이터를 만들 수 있는 allelic ladder를 개발하기 위해 마커별로 출현하는 대립유전자형을 5~10개 선발하여 전체 80개의 대립유전자형에 대한 시료를 확보하였다. 현재 allelic ladder 개발을 위해 각각의 대립유전자형 별로 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 사용해서 ligation을 실시한 후 Top 10 F' competent cell 내부로 형질전환을 시켜 Plasmid DNA추출 하여 염기서열 분석을 실시하였다. Plasmid DNA의 염기서열 분석은 ABI-3130xl (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였고, 마커별로 대립유전자형이 가지고 있는 반복서열 개수를 확인하고 반복서열 외부의 염기서열이 100% 일치하는 시료를 선발하는 과정을 통해 표준데이터 시료인 allelic ladder 제작에 대한 실험을 진행하였다(그림 3-4).

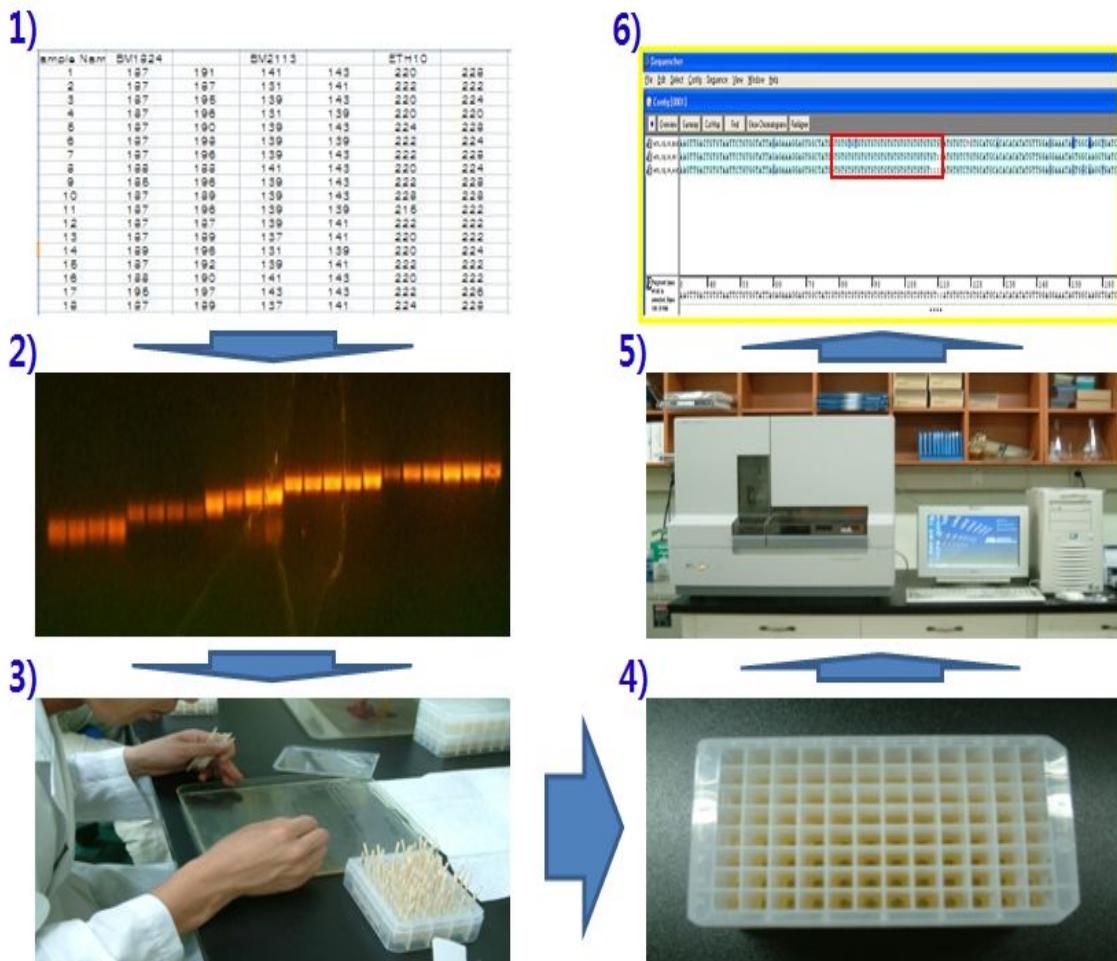


그림 3-4. Allelic Ladder 제작을 위한 대립유전자형 염기서열 확인 실험 모식도

다. 돼지 개체 식별 및 친자감별을 위한 DNA 마커별 효율성 비교 검증

제주재래돼지 (KNP) 19두와 Landrace 17두를 이용해 2 품종 상호 교배를 통해 KL 43두, LK 48두 총 91두의 F₁을 생산하였으며, F₁으로 생산된 KL과 LK의 암수를 상호 교배시켜 F₂ 1106두를 생산해 총 1,233두로 구성된 공시동물을 대상으로 본 연구진이 기 구축한 돼지 개체 식별을 위한 MS 마커 13종과 37종의 SNP 마커를 이용하여 DNA 마커 효율성을 비교 검증을 실시하였다.

37종의 SNP marker와 13종의 MS marker를 이용하여 돼지 1233두에 대한 대립유전자형을 분석하여 추정한 *He*, *PIC*, 대립유전자 수 그리고 Hardy-Weinberg equilibrium *P*-value 등은 표 3-3과 3-4에 나타내었다.

표 3-3. 37종 SNP 마커 다형성 분석 결과

No.	Locus	Chr.	N	No. of Allele	He	PIC	Hardy-weinberg equilibrium(P-value)
1	H3GA0000529	1	1230	2	0.495	0.372	0.00001
2	ALGA0014331	2	1230	2	0.486	0.368	NA ¹⁾
3	MARC0058243	3	1232	2	0.499	0.375	NA ¹⁾
4	ALGA0022682	4	1233	2	0.500	0.375	0.00001
5	M1GA0007436	5	1233	2	0.473	0.361	NA ¹⁾
6	ASGA0097732	6	1233	2	0.485	0.367	NA ¹⁾
7	DRGA0007462	7	1233	2	0.500	0.375	0.00001
8	ALGA0115248	8	1230	2	0.487	0.368	0.00003
9	ALGA0118446	9	1233	2	0.465	0.357	0.00001
10	DRGA0010491	10	1232	2	0.484	0.367	NA ¹⁾
11	MARC0038626	11	1232	2	0.496	0.373	0.00001
12	ALGA0116573	12	1233	2	0.484	0.367	0.00001
13	MARC0008127	13	1233	2	0.495	0.372	NA ¹⁾
14	H3GA0038597	14	1233	2	0.499	0.374	NA ¹⁾
15	H3GA0044196	15	1233	2	0.500	0.375	NA ¹⁾
16	H3GA0046834	16	1227	2	0.500	0.375	0.0004
17	MARC0017435	17	1214	2	0.500	0.375	0.0013
18	ALGA0096742	18	1232	2	0.499	0.374	NA ¹⁾
19	ALGA0005215	1	1233	2	0.500	0.375	NA ¹⁾
20	ASGA0011198	2	1231	2	0.449	0.348	NA ¹⁾
21	ALGA0117321	3	1233	2	0.479	0.364	0.00001
22	ASGA0018922	4	1233	2	0.495	0.373	0.0001
23	ASGA0054815	5	1233	2	0.499	0.374	0.00001
24	ASGA0027947	6	1232	2	0.479	0.364	NA ¹⁾
25	MARC0076000	7	1232	2	0.500	0.375	NA ¹⁾
26	ALGA0047611	8	1233	2	0.495	0.372	0.00001
27	ALGA0052832	9	1233	2	0.499	0.375	0.0011
28	MARC0056053	10	1218	2	0.500	0.375	NA ¹⁾
29	ALGA0062415	11	1233	2	0.499	0.375	0.0004
30	ASGA0054380	12	1233	2	0.498	0.374	0.00001
31	MARC0019359	13	1233	2	0.495	0.372	NA ¹⁾
32	MARC0073645	14	1227	2	0.499	0.374	0.00001
33	DRGA0006163	15	1232	2	0.496	0.373	0.0007
34	ALGA0091999	16	1232	2	0.494	0.372	NA ¹⁾
35	ASGA0076946	17	1232	2	0.499	0.374	NA ¹⁾
36	H3GA0050901	18	1233	2	0.476	0.362	NA ¹⁾
37	ASGA0007824	1	1232	2	0.494	0.372	NA ¹⁾
Total		-	-	74	0.492	0.371	-

¹⁾ NA : Not analyzed

표 3-4. 13종 MS 마커 다형성 분석 결과

No.	Locus	Chr.	N	No. of Allele	He	PIC	Hardy-weinberg equilibrium(P-value)
1	S0005	5	1114	10	0.795	0.775	0.00001
2	S00090	12	1099	5	0.616	0.550	0.00001
3	S0026	16	1126	6	0.750	0.716	0.00001
4	S0155	1	1126	5	0.565	0.506	0.0009
5	S0225	8	1104	3	0.476	0.390	NA ¹⁾
6	SW122	6	1126	7	0.693	0.640	0.00001
7	SW24	17	1124	5	0.753	0.714	0.00001
8	SW632	7	1126	5	0.570	0.517	0.0001
9	SW72	3	1126	5	0.712	0.666	0.00001
10	SW787	18	1121	5	0.643	0.599	0.00001
11	SW857	14	903	8	0.741	0.706	0.00001
12	SW936	15	1122	5	0.615	0.558	0.0009
13	SW951	10	1122	3	0.383	0.322	NA ¹⁾
Total		-	-	72	0.639	0.589	-

¹⁾ NA : Not analyzed

MS marker의 경우 *He* 추정치는 0.383~0.795의 범위이었으며, SNP marker의 경우는 0.449~0.500의 범위로 나타났고 *PIC* 추정치는 MS marker의 경우 0.322~0.775의 범위이었으며, SNP marker의 경우는 0.348~0.375의 범위로 나타나 일반적으로 알려진 바와 같이 SNP보다 MS marker에서 다양한 대립유전자가 존재하여 더 높은 다형성 지수를 보이는 것으로 나타났고, Hardy-Weinberg equilibrium의 경우 두 종류의 marker에서 모두 유의성이 높게 나타나거나 분석되지 않는 결과를 보였다. 이는 각각의 marker에서 특정한 대립유전자형의 출현빈도가 편중되어 있어 이러한 결과가 나타나는 것으로 사료되어 진다.

13종의 MS marker를 이용해 분석한 대립유전자형을 F_0 , F_1 그리고 F_2 로 세대 간 구분 하여 API-CALC version 1.0을 이용해 무작위 교배집단과 반형매 교배집단 그리고 전형매 교배집단 (probability of identity; *PI*, probability of identity from half sibs; *PI_{half-sibs}*, and probability

of identity from sibs; PI_{sibs})으로 가정하여 동일한 개체 출현확률 값을 추정한 결과 무작위 교배집단으로 가정한 경우 F_0 는 2.50×10^{-11} , F_1 은 4.53×10^{-11} 그리고 F_2 는 1.44×10^{-34} 로 나타났고 반형매 교배집단의 경우 F_0 는 8.62×10^{-9} , F_1 은 1.37×10^{-8} 그리고 F_2 는 3.84×10^{-23} 으로 나타났으며, 전형매 교배집단의 경우 F_0 는 4.00×10^{-5} , F_1 은 4.80×10^{-5} 그리고 F_2 는 2.18×10^{-8} 으로 나타났다. 이를 기준으로 몇 종의 SNP marker를 이용하면 MS marker와 동일한 수준의 동일개체 출현확률을 추정치 얻을 수 있는지 검증한 결과 F_0 의 경우 14종, F_1 의 경우 17종 그리고 F_2 의 경우 37종의 SNP marker를 이용할 경우 13종의 MS marker와 유사한 동일개체 출현확률 추정치를 유추할 수 있었다(그림 3-5).

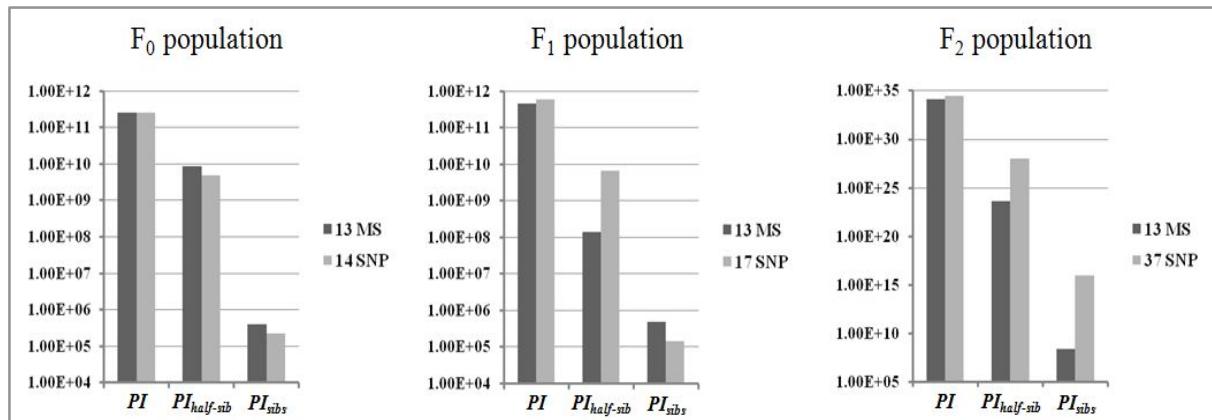


그림 3-5. 세대별 실험 축군을 대상으로 분석한 DNA 마커 개체식별력 검증 결과

F_0 와 F_1 의 경우 14종과 17종의 SNP marker가 13종의 MS marker와 유사한 동일개체 출현 확률치를 보인 결과는 2 품종 19두로 한정된 F_0 와 이를 이용하여 상호교배를 통해 생산된 소 규모의 F_1 91두를 대상으로 비교한 것으로 사용된 marker의 전체 대립유전자수 (MS : SNP = 72 : 34)가 한정되어 있고 개체 수가 작아 다양한 대립유전자형 조합이 만들어 질 수 없어 MS 와 SNP marker의 효율성이 큰 차이가 없이 비슷한 수의 marker를 이용하더라도 동일한 개체 식별효율이 나타나는 것으로 사료되며, 반면 F_2 의 경우 37종의 SNP marker가 13종의 MS marker와 유사한 동일개체 출현 확률치를 보인 결과는 F_2 의 개체 수가 F_1 보다 약 12배 증가한 1106두로 한정된 대립유전자형에서 보다 다양한 대립유전자형의 조합이 나타나기 때문인 것으로 사료되어 진다.

그리고 Cervus version 2.0을 이용해 친자감정확률 (probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed ; PE_{pu} 와 probability of paternity exclusion; PE) 추정치를 전체집단을 대상으로 13종의 MS와 37종의 SNP marker를 이용하여 분석한 결과 PE_{pu} 의 경우 MS marker는 0.9783이고 SNP marker는 0.9914였으며, PE 의 경우 MS marker는 0.9991이고 SNP marker는 0.9995로 나타났다. 또한 likelihood ratio에 의하여 가능한 후보 부모들로부터 가장 확률이 높은 부모를 찾는 inclusion method로 추정한 부모를 동시에 찾는 경우를 가정한

Parent Pair 핵 (PNE_{pp})의 경우는 MS와 SNP marker 둘 다 1.0000으로 추정 되었다.

또한 F_2 를 대상으로 13종의 MS와 37종의 SNP marker로 추정된 동일개체 출현확률 핵과 친자감별 추정치의 증가폭을 확인하기 위해 MS marker의 경우 marker의 수를 표 3-4의 순서대로 하나씩 순차적으로 증가시키고, SNP marker의 경우 13단계(1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34 그리고 37종)로 나누어 표 3-3의 순서대로 순차적으로 증가시켜 추정치 증가폭을 확인하였다(그림 3-6). 그 결과 동일개체 출현확률 추정치의 경우 SNP marker에서 일정한 비율로 추정치가 증가하였으나, MS marker의 경우 10종의 marker를 이용할 때 까지는 SNP marker에 비해 낮은 추정치를 보였으나 11종의 marker를 사용할 때부터 SNP marker와 유사한 동일개체 출현확률 추정치를 나타내었고, 친자감별 추정치의 경우 PE 와 PE_{pu} 모두 MS marker의 경우 5종, SNP marker의 경우 13종을 사용할 때부터 유사한 추정치를 보였으며, PE 는 10종의 MS와 28종의 SNP marker를 사용할 때부터 0.9964와 0.9967로 100%에 근접한 추정치를 나타내었고, PE_{pu} 는 12종의 MS와 34종의 SNP marker를 사용할 때부터 0.9765와 0.9813으로 100%에 근접한 추정치를 나타내었다.

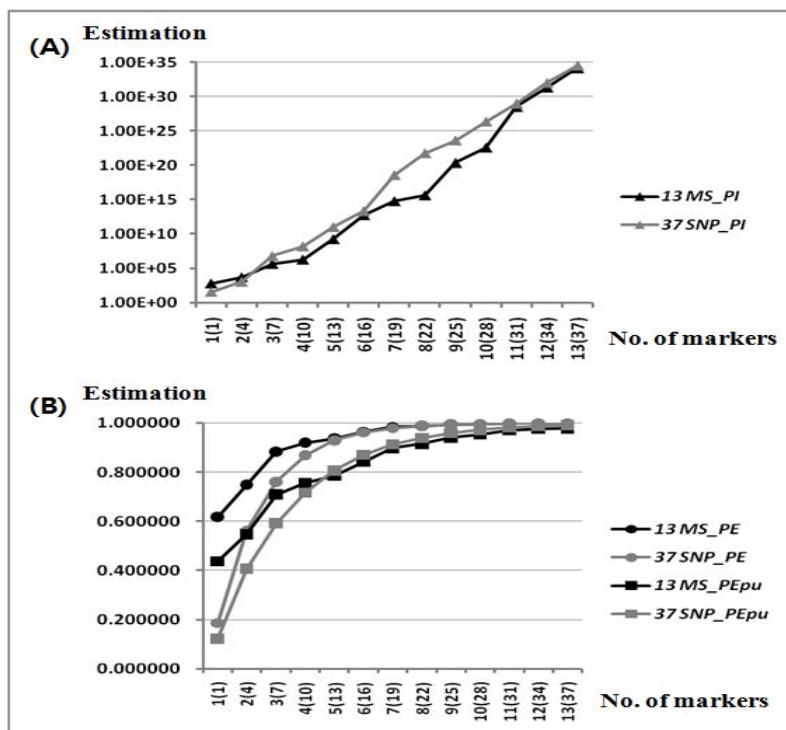


그림 3-6. DNA 마커 수 증가에 따른 개체식별 및 친자감별 능력 증가표

따라서 이상의 결과를 종합해 볼 때 브랜드나 지역단위로 한정된 부모집단 내 한정된 대립유전자형을 통해 대량의 비육돈이 생산되는 국내의 양돈산업 현장의 경우 효율적인 돼지 또는 돼지고기의 이력추적을 위해서는 DNA marker의 종류보다는 각각의 marker 특성, 분석집단의 크기, 유전자형 분석의 정확도와 비용, 분석된 자료 관리의 용이성 및 기존 분석 시스템과의

호환성 등을 고려하여 효율성과 경제성이 높은 marker를 선정해 marker 조합을 만드는 것이 필요할 것으로 사료되어진다.

라. 돼지 상용축군을 대상으로 현장 적용 검증을 통한 개체식별용 MS 키트 제품화

기 구축된 13종의 MS 마커를 Landrace, Large White와 Duroc 3품종의 3원 교잡 시스템을 이용해 비육돈을 생산하는 9개 농장을 대상으로 응돈으로 사용되는 Duroc 16두와 Landrace × Large White를 교배하여 생산한 F₁ 모돈 141두를 이용하여 비육돈 452두를 생산하여 총 609두를 공시 동물로 사용하였다. 609두의 대립유전자형을 분석한 결과를 Cervus version 2.0을 이용해 친자감정확률 (probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed ; PE_{pu})과 probability of paternity exclusion; PE) 추정치를 부모집단만 이용하여 분석한 결과 PE_{pu} 의 경우 0.999951이었으며, PE 일 경우 1.000000으로 나타났으며, 비육돈을 포함한 PE_{pu} 의 경우 0.999983이었으며, PE 일 경우 1.000000으로 나타나 100% 친자감정이 가능한 것으로 추정되었다.

이론 추정치를 검증하기 위해 F₁ 모돈과 Duroc 응돈에서 생산된 비육돈 452두를 대상으로 PAPA 2.0을 이용하여 친자를 검증한 결과 100% 친부모를 확인 할 수 있었다 (표 3-5).

이 검증에서는 PAPA 2.0의 친자감별 기준이 되는 error model을 최대 설정치인 No error로 설정하여 감별을 실시한 결과 한 쌍의 부모 조합 (allocation)만 감별된 개체는 93%로 420두였고, 두 쌍이상의 부모 조합 (ambiguous)을 제시한 개체는 7%로 32두였으며, 감별이 불가능 (null)한 개체는 0%로 감별되었다. 그리고 error model을 Uniform error=0.02로 설정하여 감별한 결과 한 쌍의 부모 조합 (allocation)만 감별된 개체는 98%로 443두였으며, 두 쌍이상의 부모 조합 (ambiguous)을 제시한 경우는 2%로 9두였고, 감별이 불가능 (null)한 경우는 0%로 감별되었다. 두 종류의 error model에서 나타난 두 쌍이상의 부모 조합 (ambiguous)을 제시한 41두의 경우 각각의 교배조합 정보를 검토한 결과 모두 부모 조합을 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 약 2~7%의 두 쌍이상의 부모조합 (ambiguous)을 제시한 경우는 한정된 부모집단 내 한정된 대립유전자형을 통해 대량의 비육돈이 생산되다 보니 대립유전자형의 가능한 경우의 수가 한정되어 나타나는 문제로서 각 농장에서 관리하고 있는 교배 및 개체 생산 정보를 통해 간단히 확인하여 해결할 수 있었다. 그리고 친자감별 결과의 신뢰성을 검증하기 위해 PAPA 2.0의 simulation option을 이용하여 부모집단이 가지고 있는 대립유전자형을 토대로 실제 감별에 이용한 비육돈 452두와 같은 두수의 가상의 비육돈을 설정하고 No error로 100회 반복하여 감별결과를 유추한 결과 한 쌍의 부모 조합 (allocation)만 제시할 확률은 95 ± 0.01%이고, 두 쌍이상의 부모 조합 (ambiguous)을 제시할 확률은 5 ± 0.01%이며, 감별이 불가능 (null)할 확률은 0%로 분석되었다.

표 3-5. 3원교잡 상용축군을 대상으로 분석한 친자감별 결과

	allocation (No. fo sample)	ambiguous (No. fo sample)	nulls (No. fo sample)
Power	No error 0.93 (420)	0.07 (32)	0.00 (0)
	Uniform error=0.02 0.98 (443)	0.02 (9)	0.00 (0)
Correctness under No error	0.95 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.00

따라서 이러한 결과를 기초로 Multiplex-PCR 조건 및 실험에 대한 재 검증을 통하여 돼지 및 돼지고기 이력추적용 친자감별 DNA 분석 키트 “참한돈지기”를 제작하여 제품화하였다(그림 3-7).



그림 3-7. 참한돈지기 시제품 사진

2. 말 개체식별을 위한 MS 마커 선발 및 키트 개발

가. Microsatellites 후보 마커

- (1) 말 개체식별을 위한 MS 마커는 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 미국국립생물정보센터)에 보고되어 있는 유전자좌, PCR annealing 온도, PCR 산물의 크기 등의 정보를 기준으로 후보 마커 16종을 선정하였다(표 3-6).
- (2) 증폭산물의 예상 크기 및 분석을 고려하여, 정방향 프라이머의 5'쪽에 네가지의 형광물질을 부착하여 제작하였다.

표 3-6. 말 개체식별용 1차 후보 MS 마커 리스트.

MS Name	Chromosome	Repeat Unit	비고
VHL20	30	(TG)17	UniSTS:506426
HTG04	9	(GT)14	UniSTS:504291
AHT004	24	(AC)28	UniSTS:506068
HMS07	1	(CA)18	UniSTS:503179
HTG06	15	(GT)19	UniSTS:505103
AHT005	8	(GT)16	UniSTS:504179
HMS6	4	(GT)15	GenBank: X74635.1
ASB23	3	(GT)16	UniSTS:503489
ASB2	15	(GA)8	UniSTS:505081
HTG10	21	(GT)16	UniSTS:505756
HTG07	4	(GT)20	UniSTS:503638
HMS3	9	(CA)23	UniSTS:504311
HMS2	10	(CA)16	GenBank: X74631.1
ASB17	2	(CA)24	UniSTS:503259
LEX03	X	(TG)20	UniSTS:506652
HMS01	15	(GT)14	UniSTS:505128

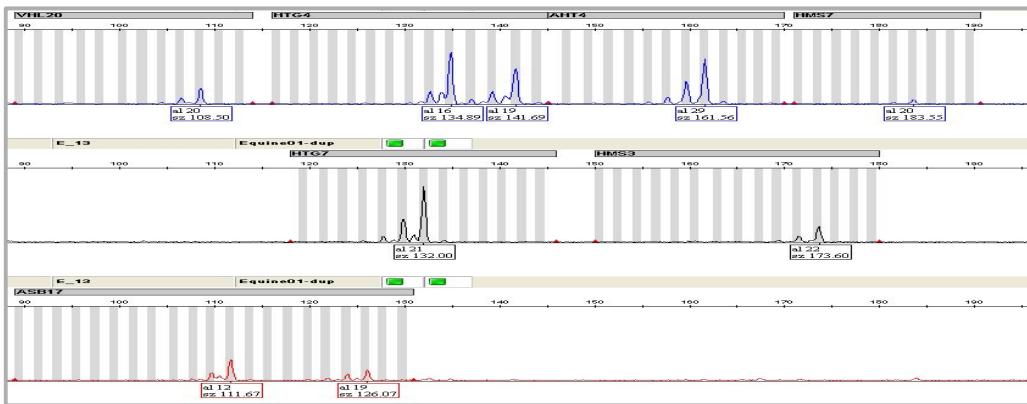
나. MS 마커 유전적 다형성 분석

(1) 16종의 후보 MS 마커 중에 PCR 산물 annealing 온도, primer dimer 형성 여부 등을 고려하여 최종적으로 11종의 마커를 선별하여 다형성 등을 분석하였다(그림 3-8). 다형성 분석을 위한 시료는 국립축산과학원 난지축산시험장에서 말 31두의 시료를 분양받았으며, 효율적인 분석을 위해 두 개의 Multiplex-PCR 그룹(표 3-7)으로 나누어 실시하였다.

표 3-7. 마커 다형성 분석을 위한 Multiplex-PCR 그룹.

Group A	Grouup B
VHL20	HTG10
HTG4	HMS2
AHT4	LEX3
HMS7	HMS1
HTG7	
HMS3	
ASB17	

<Group A>



<Group B>

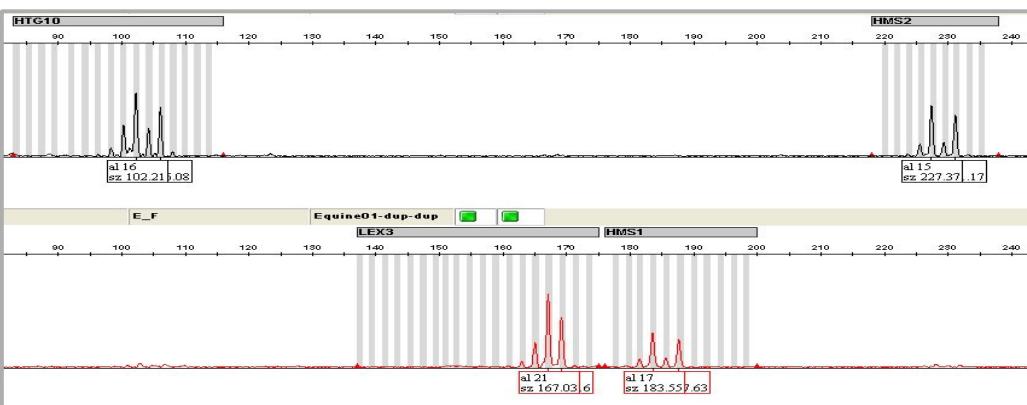


그림 3-8. 두 개의 Multiplex-PCR 그룹 대립유전자형 분석을 위한 전기영동 결과

- (2) 각 그룹의 PCR 반응은 주형 DNA 10ng, *Taq DNA polymerase* 0.5U(Gold Taq, ABI)를 사용하였으며, 최초 95에서 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.
- (3) PCR 산물은 30X dilution시킨 후, 자동염기서열 분석장치(ABI 3100, Applied Biosystems 사, USA)를 이용하여 자동 전기영동 시킨 후, 분석프로그램인 Genemapper V3.7(Applied Biosystems사, USA)로 분석을 실시하였다.
- (4) 대립유전자형 분석은 Cerver 2.0을 이용해 heterozygosity(*He*), polymorphic information content(*PIC*) 등을 산출하였다. ASB17이 0.871로 가장 높은 *He* 값을 나타내었고, HMS7의 경우 0.288로 가장 낮은 *He* 값을 나타냈다, 또한 각 마커별로 평균 5.5개의 allele이 확보되었으며, 평균 *He*값은 0.676, 평균 *PIC*값은 0.624로 나타났다.(표 3-8).

표 3-8. 11종 MS 마커 다형성 분석 결과.

Locus	No. of allele	N	Hets	Homs	<i>He</i>	<i>PIC</i>
AHT4	7	31	24	7	0.774	0.738
ASB17	8	31	27	4	0.871	0.759
HMS1	4	31	19	12	0.613	0.593
HMS2	5	31	25	6	0.806	0.685
HMS3	6	31	22	9	0.71	0.677
HMS7	3	31	8	23	0.258	0.265
HTG10	6	31	21	10	0.677	0.717
HTG4	4	31	23	8	0.742	0.524
HTG7	5	31	17	14	0.548	0.534
LEX3	8	31	22	9	0.71	0.745
VHL20	5	31	19	12	0.613	0.625

다. 말 개체식별을 위한 진단 키트 개발

(1) 말 개체식별을 위한 MS 마커는 1차년도에 선정한 11개 마커로부터 다형성이 매우 낮은 HMS7마커를 제외하고, HMS6DHK ABS2 마커를 새롭게 추가하였으며, 최종적으로 성감별 마커를 포함한 12개의 마커를 말 개체식별을 위한 MS마커로 최종 선정하였다(표 3-9).

표 3-9. 말의 대립유전자형 분석용 MS 마커 리스트

MS Name	GenBank Accession No.	Lable	PCR product(bp)
VHL20	UniSTS:506426	FAM	89~107
HTG4	UniSTS:504291	FAM	127~141
AHT4	UniSTS:506068	FAM	138~170
HMS6	GenBank: X74635.1	VIC	154~170
ASB2	UniSTS:505081	VIC	220~252
HTG10	UniSTS:505756	NED	83~105
HTG7	UniSTS:503638	NED	118~130
HMS3	UniSTS:504311	NED	150~174
HMS2	GenBank: X74631.1	NED	218~238

표 3-9. 계속

MS Name	GenBank Accession No.	Lable	PCR product(bp)
ASB17	UniSTS:503259	PET	89~131
LEX3	UniSTS:506652	PET	137~176
HMS1	UniSTS:505128	PET	178~190

(2) 말의 개체식별을 위하여 12개의 MS마커를 사용할 경우 동일개체 출현확률이 무작위 교배집단에서 동일개체가 출현할 확률은 5.52×10^{-10} 로 나타났다. 또한 반형매 교배집단 ($PI_{half-sibs}$)과 전형매 교배집단(PI_{sibs})에서는 9.4×10^{-8} 과 2.27×10^{-4} 으로 추정되었다. 2008년 말 현재 국내 말 사육두수는 전체 1,528농가에서 재래종 포함하여 약 22,881두가 사육되고 있기 때문에(농림수산식품통계연보, 2009) 전형매 교배집단 외에서는 11개의 마커를 사용할 경우, 동일개체 출현확률은 없다고 사료된다.

(3) 또한 한번에 Multiplex-PCR이 가능하도록 하여 12종의 마커를 1회 반응으로 안정적으로 증폭될 수 있도록 하였다(그림 3-9).

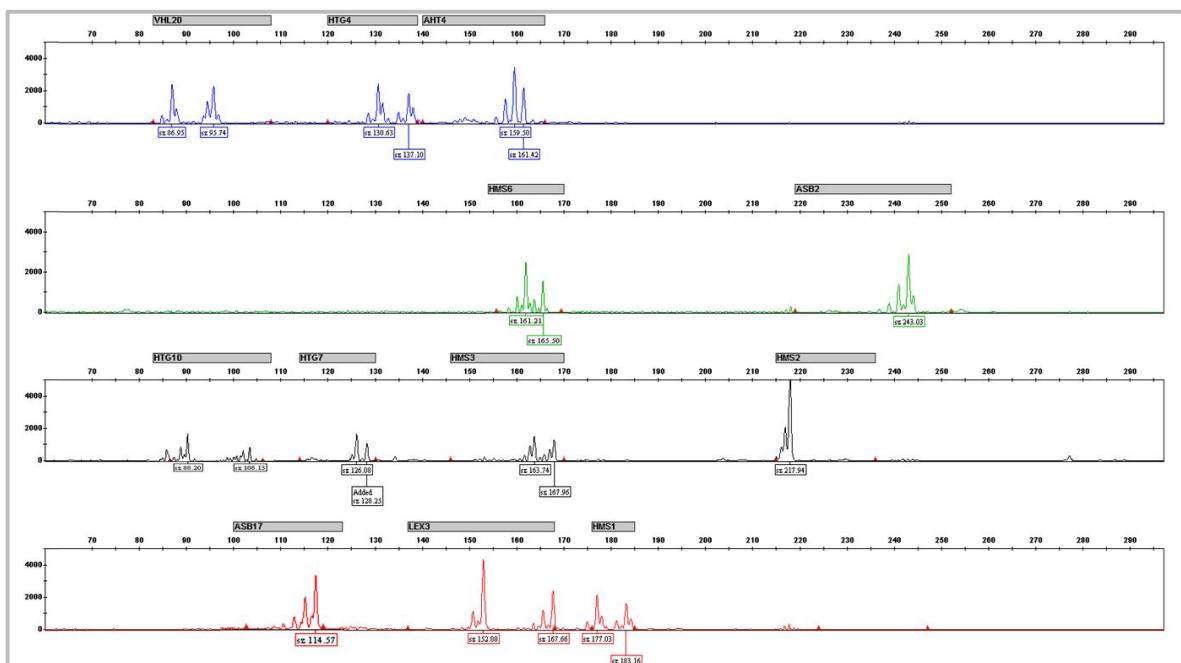


그림 3-9. 말 개체식별용 10종의 MS와 2종의 성감별 마커 Multiplex-PCR 결과

(4) 한번의 PCR증폭으로 12종의 마커를 동시에 증폭하기 위해 주형 DNA는 최소 5ng이상을 사용해야하며, 또한 multiplex-PCR은 많은 마커 부위를 증폭해야함과 동시에 비특이 산물의 생산을 최대한 억제해야하므로 hot-start용 Taq DNA polymerase을 사용하였다. 기타 증폭에 이용되는 각 시약들의 조성 조건은 아래와 같다.

PCR Primer mix	$6\mu\ell$
10X Buffer	$2\mu\ell$
dNTP mix	$1.5\mu\ell$
MgCl ₂	$1.5\mu\ell$
Taq(5U/ $\mu\ell$)	$0.4\mu\ell(1\text{-}2\text{U})$
Template DNA	5-50ng
DMSO	$0.25\mu\ell$
DW up to	$15.0\mu\ell$

(5) 유전자 증폭조건은 여러 기기에서 범용으로 사용이 가능하도록 annealing 반응온도를 3개 (56-58°C)로 설정하여 분석하는 단계별 유전자증폭(touch-down PCR)방법을 실시하였다. 먼저 95°C에서 15분간 처리한 후 94°C에서 60초, 58°C에서 75초, 72°C에서 60초를 1 cycle로 하여 4회 반복하고, 94°C에서 60초, 57°C에서 75초, 72°C에서 60초를 1 cycle로 하여 4회 반복 후 94°C에서 60초, 56°C에서 75초, 72°C에서 60초를 1 cycle로 하여 24회 반복하였다. 그리고 65°C에서 30분간 신장시킨 후 8°C에서 과정을 종료한다.

(6) Allelic ladder 개발

(가) 12종의 MS 마커에 대해서 마커별로 출현하는 대립유전자형을 조사하여 출현 빈도가 높은 대립유전자형을 우선으로 Allelic ladder 제작 하고자 마커별로 해당 대립유전자를 가지고 있는 시료를 이용해 PCR을 수행한 후, Agarose 전기영동 후 gel 정제를 통해 해당 size의 대립유전자 산물만을 획득 후 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 사용해서 ligation을 실시한 후 Top 10 F' competent cell 내부로 형질전환을 시켜 Plasmid DNA 추출 하여 염기서열 분석을 실시하였다.

(나) Plasmid DNA의 염기서열 분석은 ABI-3130xl (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였고, 마커별로 대립유전자형이 가지고 있는 반복서열 개수를 확인하고 반복서열 외부의 염기서열이 100% 일치하는 시료를 선별하는 과정을 통해 표준데이터 시료인 allelic ladder를 제작하였다.(그림 3-10).

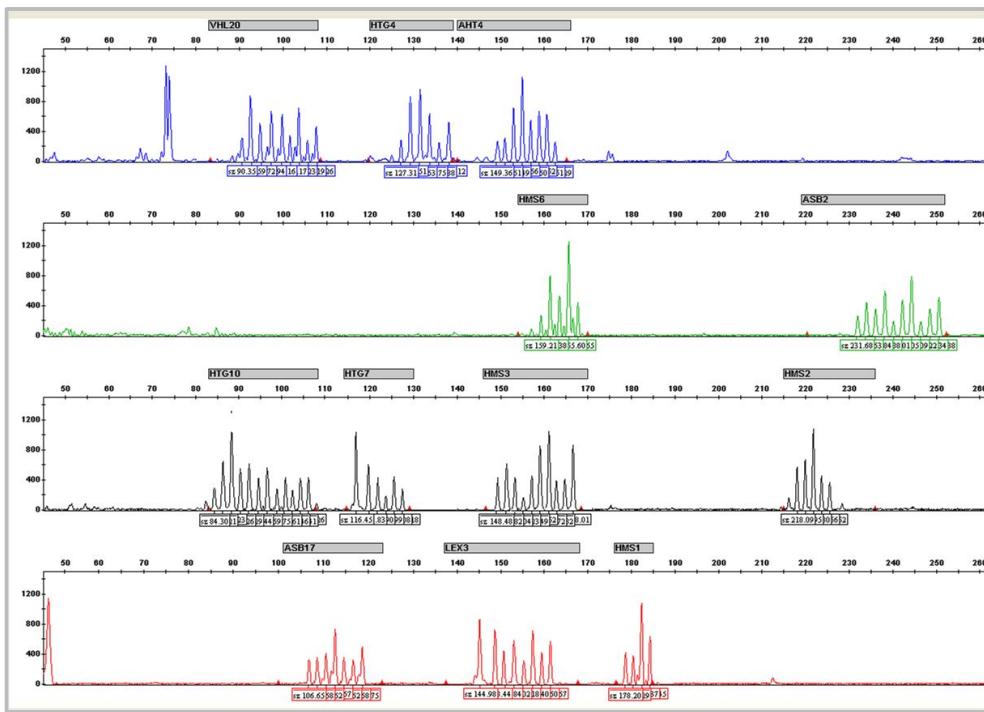


그림 3-10. 말 개체식별키트를 위한 allelic ladder

(7) 시제품 출시 및 특허출원

(가) 이러한 결과를 기초로 microsatellites 마커를 활용한 말 개체식별용 시제품을 출시하였으며, 특허를 출원하였다(그림 3-12).

3. 닭 개체식별용 MS 마커 선발 및 키트 개발

닭 개체식별을 위해 MS 마커를 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 미국 국립생물정보센터)에 보고되어 있는 마커 중 유전자좌, PCR annealing 온도, PCR 산물의 크기 등의 정보를 기준으로 후보 마커 15종을 선정하였다. 향후, 닭 이력관리제등이 실시된다면 후보마커들을 이용하여 마커별 다형성 및 개체식별 능력 등을 검증하고 개체식별기술이 가능할 것으로 판단된다.(표 3-10).

표 3-10. 닭 개체식별용 후보 MS 마커 리스트.

MS Name	Chromosome	Repeat Unit	비고
ADL0268	1	(GT)12	UniSTS:36879
ADL225	13	(CA)8	UniSTS:29076
MCW0004	3	(CA)28	UniSTS:280071

표 3-10. 계속

MS Name	Chromosome	Repeat Unit	비고
MCW0014	6	(AC)9	UniSTS:280076
MCW0016	3	(CA)16	UniSTS:280077
MCW0034	2	(CA)22	UniSTS:280087
MCW0069	26	(CA)11	UniSTS:280110
MCW0078	5	(CA)7	UniSTS:280115
MCW0081	5	(CA)7	UniSTS:280117
MCW0104	13	(CA)20	UniSTS:280128
MCW0111	1	(CA)7	UniSTS:280134
MCW0145	1	(CA)20(CAAA)6	UniSTS:280156
MCW0295	4	(AC)10	UniSTS:18220
MNT112	20	(TG)12	UniSTS:497092
MNT128	1	(CA)16	UniSTS:496866

4. 오리 개체식별을 위한 MS 마커 선발 및 키트 개발

가. Microsatellites 후보 마커 선발

- (1) 오리 개체식별을 위한 후보 MS 마커는 NCBI(National Center for Biotechnology Information, 미국국립생물정보센터)에 보고되어 있는 유전자좌, PCR annealing 온도, PCR 산물의 크기 등의 정보를 기준으로 후보 마커 20종을 선정하여(표 3-11), 국내 사육중인 오리에 대한 적용 가능성을 검증하였다.
- (2) 오리(*Anas platyrhynchos*) Genomic DNA는 품종이 확인된 50두의 근육조직을 확보하여 Genomic DNA 추출 키트(Promega, USA)를 이용하여 계凫 DNA의 분리하였다.

나. MS 마커의 유전적 다형성 분석

- (1) 마커별로 PCR 증폭여부를 검증한 결과 20종의 후보 마커 중 14종의 마커만이 국내에서 사육되는 오리(*Anas peking*)에서 반응이 나타나, 14종의 마커를 오리 50마리를 대상으로 대립유전자형 분석을 실시하였다(표 3-11).
- (2) 대립유전자형 분석 결과를 Cerver 2.0을 이용해 heterozygosity(*He*), polymorphic

information content(*PIC*) 등을 산출한 결과 AMU003이 0.740으로 가장 높은 *He* 값을 나타내었고, CAUD065와 CAUD127의 경우 0.100과 0.098로 매우 낮은 *He* 값을 나타내 다른 다형성이 높은 마커로 교체되어야 할 것으로 사료되며, 또한 각 마커별로 평균 7.5개의 allele이 확보되었으며, 평균 *He*값은 0.610, 평균 *PIC*값은 0.569로 나타났다.

(3) 또한 API-CALC version 1.0(Ayres와 Overall (2004) Molecular Ecology Notes 4:315-318)을 사용하여 동일개체 출현확률을 조사한 결과 무작위 교배집단에서 동일개체가 출현할 확률은 2.04×10^{-27} 으로 14종의 MS 마커를 사용할 경우 동일한 개체가 나타날 확률은 없다고 판 단된다. 또한 반형매 교배집단($PI_{half-sibs}$)과 전형매 교배집단(PI_{sibs})에서는 2.57×10^{-19} 과 2.27×10^{-8} 으로 추정되었다.

표 3-11. 오리(*Anas peking*) 개체식별용 14 종 MS 마커 대립유전자형 분석 결과

Locus	No. of alleles	N	<i>He</i>	<i>PIC</i>
AMU003	4	50	0.740	0.581
AMU060	4	50	0.360	0.397
AMU068	5	50	0.120	0.551
AMU123	9	50	0.280	0.395
CAUD004	14	50	0.680	0.756
CAUD013	13	50	0.680	0.765
CAUD055	8	50	0.600	0.741
CAUD065	4	50	0.100	0.293
CAUD074	9	50	0.400	0.536
CAUD076	8	49	0.592	0.638
CAUD083	8	49	0.571	0.679
CAUD086	8	49	0.347	0.713
CAUD120	9	49	0.694	0.766
CAUD127	2	41	0.098	0.161

다. 오리 개체식별을 위한 분석 키트 개발

(1) 유전자 개체식별 시스템을 진단키트화 하기 위해서 1회의 유전자 증폭만으로 분석이 가능하도록 다형성이 낮은 CAUD065와 CAUD127를 제외한 12개의 마커를 한번의 PCR 증폭 시킬수 있도록 Multiplex-PCR 시스템을 구축하였다(표 3-12, 그림 3-11)

표 3-12. 오리(*Anas peking*)의 대립유전자형 분석용 MS 마커 리스트.

Name	GenBank Accession No.	Lable	PCR product(bp)
CAUD065	AY493310	FAM	120-145
CAUD086	AY493331	FAM	175-195
CAUD055	AY493300	FAM	215-243
CAUD074	AY93319	VIC	108-124
CAUD004	AY493249	VIC	200-230
AMU006	AB180491	VIC	232-246
APH21	AJ515896	NED	132-160
AMU060	AB180542	NED	180-196
CAUD120	AY587039	NED	275-288
CAUD083	AY493328	PET	106-130
AMU003	AB180488	PET	186-206
CAUD130	AY587049	PET	237-265

(2) 유전자 증폭과정은 말 개체식별기술과 동일하게 하였다.

(3) Allelic ladder 개발

(가) 12종의 MS 마커에 대해서 마커별로 출현하는 대립유전자형을 조사하여 출현 빈도가 높은 대립유전자형을 우선으로 Allelic ladder 제작하고자 마커별로 해당 대립유전자를 가지고 있는 시료를 이용해 PCR을 수행한 후, Agarose 전기영동 후 gel 정제를 통해 해당 size의 대립유전자 산물만을 획득 후 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 사용해서 ligation을 실시한 후 Top 10 F' competent cell 내부로 형질전환을 시켜 Plasmid DNA 추출 하여 염기서열 분석을 실시하였다.

(나) Plasmid DNA의 염기서열 분석은 ABI-3130xl (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하였고, 마커별로 대립유전자형이 가지고 있는 반복서열 개수를 확인하고 반복서열 외부의 염기서열이 100% 일치하는 시료를 선발하는 과정을 통해 표준데이터 시료인 allelic ladder를 제작하였다.

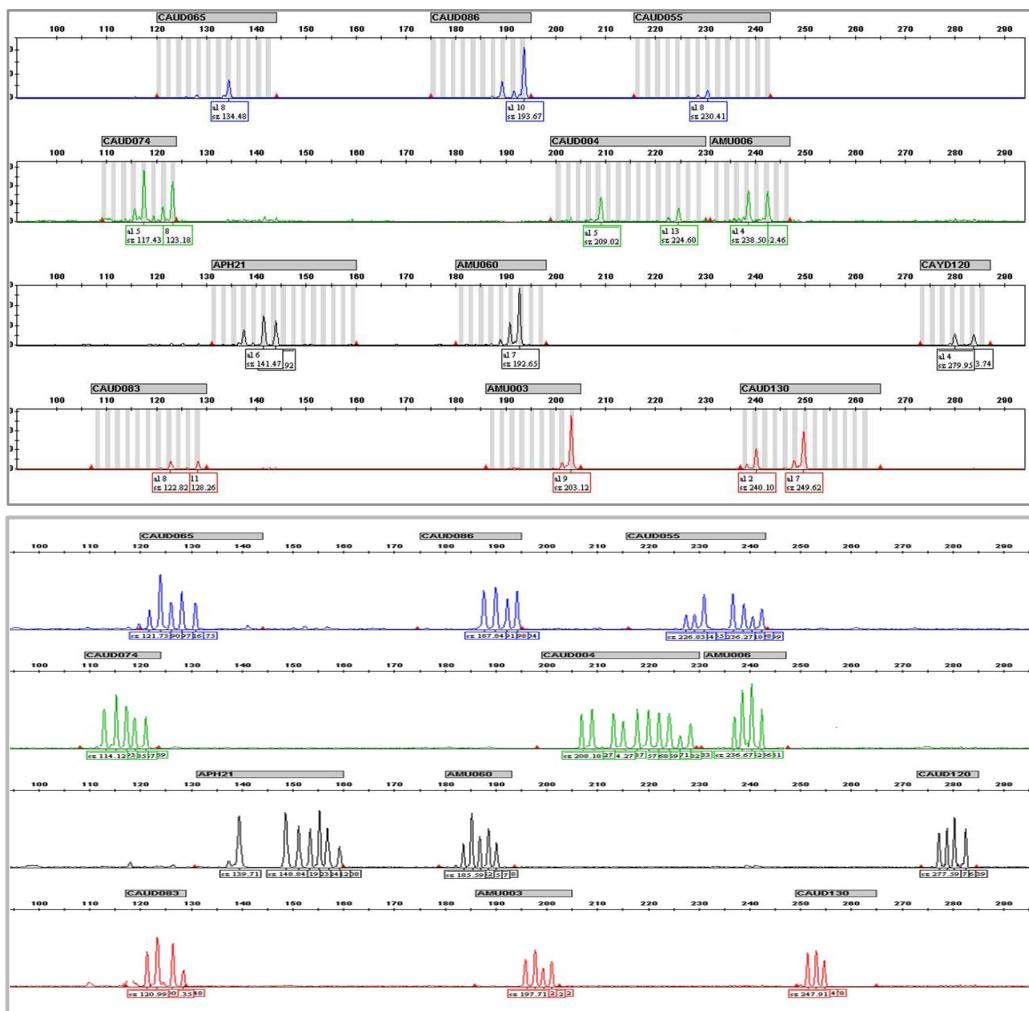


그림 3-11. 오리(*Anas peking*) 개체식별용 12종의 MS 마커 Multiplex-PCR 결과 및 allele ladder

(4) 시제품 출시 및 특허출원

(가) 이러한 결과를 기초로 microsatellites 마커를 활용한 오리 개체식별용 시제품을 출시하였으며, 특허를 출원하였다(그림 3-12).



그림 3-12. 말(좌) 및 오리(우) 개체식별을 위한 시제품 사진

5. 종 식별용 DNA 마커 선발 및 키트 개발

가. 축종별 mtDNA 분석을 통한 종 특이적인 유전자 선발 및 확보

- (1) 식별 되어질 축종의 선별은 직접 섭취나 가공 식품이 가능한 소, 돼지, 닭, 개, 말, 오리 총 6종을 선택 하였다(표 3-13).
- (2) 선정된 6종에 대하여 DB를 조사하고 유의한 마커를 검색하고자 하였으며, MS (Microsatellite) 마커, SNP (Single Nucleotide Polymorphism), 특정 유전자 염기서열 등 모든 부분에서 검색하고 동종간 특이성과 이종과의 대립성을 조사하여 가장 적절한 마커를 검색하였다.
- (3) 검색 결과 간단하면서 가장 효과적으로 종을 식별 할 수 있는 마커로는 미토콘드리아 (mitochondrial)의 유전자를 이용하는 것임을 확인할 수 있었다.

표 3-13. 종식별키트 개발을 개발 축종 리스트(표시 및 학명)

축 종	소	돼지	닭	개	말	오리
표 시	Bovine	Porcine	Gallus	Canine	Equine	Duck
학 명	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Canis lupus</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>

나. Species-specific primers 개발

- (1) 미토콘드리아(mitochondrial) DNA의 많은 유전자 중 종간 변이가 많은 CytB 유전자의 염기서열을 조사하고 유사종 혹은 동종의 염기서열을 확인하여 이종과의 특이성을 찾아 마커로 선별하고자 하였다.
- (2) 표 3-14와 같이 각 축종별 이용되어질 염기서열의 크기를 다르게 하여 Agarose gel 전기영동 장치로 확인 가능하도록 각각의 Primer를 제작 하였다.(표 3-15)

표3-14. 축종별 마커의 염기의 크기

종	소	닭	오리	개	말	돼지
size (bp)	166	286	411	584	667	739

표 3-15. 종 식별 마커 Primer 제작

종	Forward	5' → 3'	Len
Canine	Ca_F	ATTCGCAACCATAGCCACAGCA	22
Bovine	Bo_F	GCAATCCCATAACATCGGCACA	21
Porcine	Po_F	CCAGCCCCCTCAAACATCTCATC	23
Equine	Eq_F	ACGACAACTGCCTTCTCATCCG	22
Duck	Du_F	TTTCAGCCCTCCCATAACATCGG	22
Gallus	Ga_F	CCTGAGGGGGATTTCAGTCGAC	23
Canine	Ca_R	TGCTGCGTTGCTTAGATGTGTGG	23
Bovine	Bo_R	TGTTGGAGCCTGTTCTGTGGA	21
Porcine	Po_R	TATGGGGTGGGGTGTAGTGGG	23
Equine	Eq_R	GGATGGCGTAGGCAAACAGGAA	22
Duck	Du_R	TGTTTGGGATTGACCGCAGG	20
Gallus	Ga_R	GCTGGGGTGAAGTTCTGGGTC	23

다. 6종의 mtDNA 유전자의 개체식별력 시험

(1) 그림 3-13과 같은 조건으로 PCR을 수행하여 각 Primer의 정확성 및 가능성을 알아보았으며, 그림 3-14와 같이 정확한 크기에서 특이적인 유전자가 증폭됨을 확인할 수 있었다.

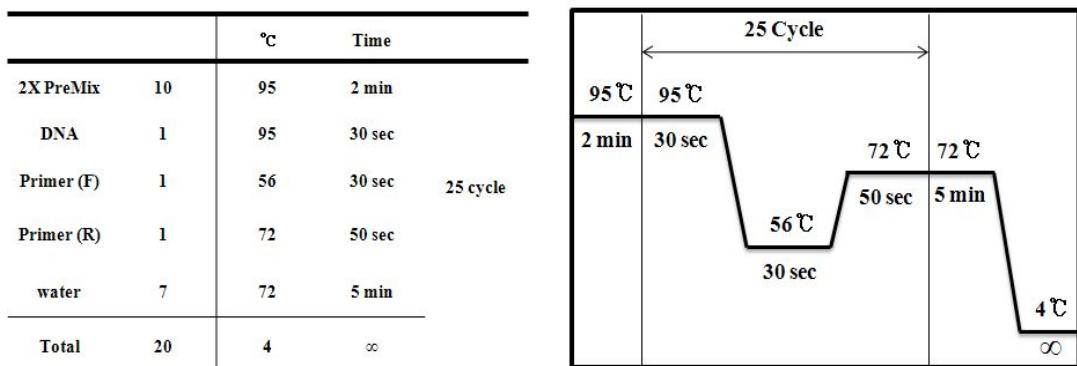


그림 3-13. 축종별 특이 유전자 증폭을 위한 조건

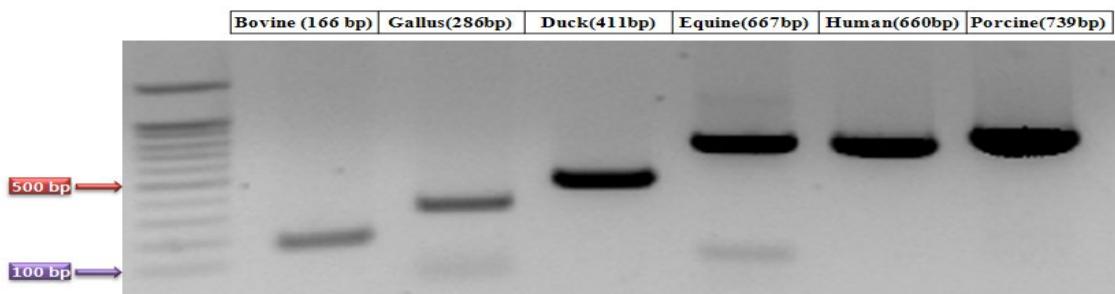


그림 3-14. 축종별 특이 primer에 의한 증폭 패턴

(2) 각 종별 4 sample 이상 사용하여 개발한 마커가 종 특이적으로 증폭이 되는지를 확인하

였으며, 그림 3-15와 같이 Bovine 2번 sample를 제외하고 모든 sample에서 종 특이적인 반응이 일어남을 확인하였다.

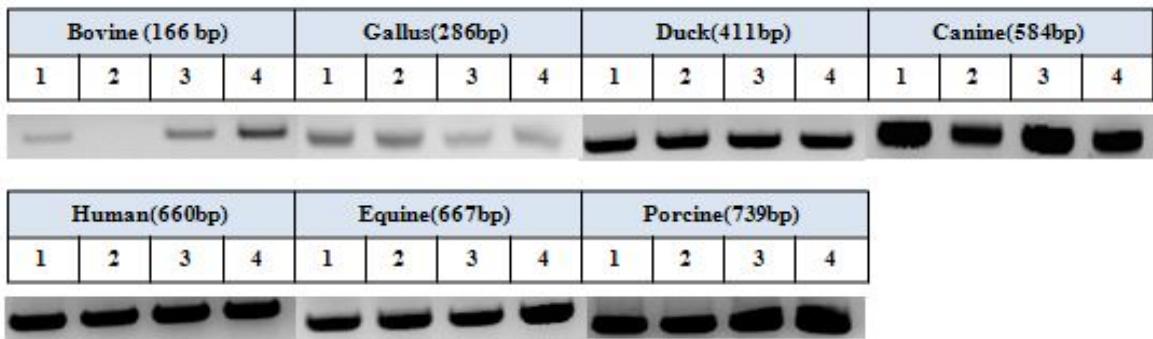


그림 3-15. 축종별 특이 primer에 의한 증폭 패턴

(3) 종 특이적으로 제작된 마커들을 하나의 mixture로 혼합하여 종간 특이적인 반응을 확인할 결과, 그림 3-16과 같이 종 특이적으로 제작한 마커들은 다른 종에서 비 특이적인 반응이 일어나지 않는 것을 확인하였다.

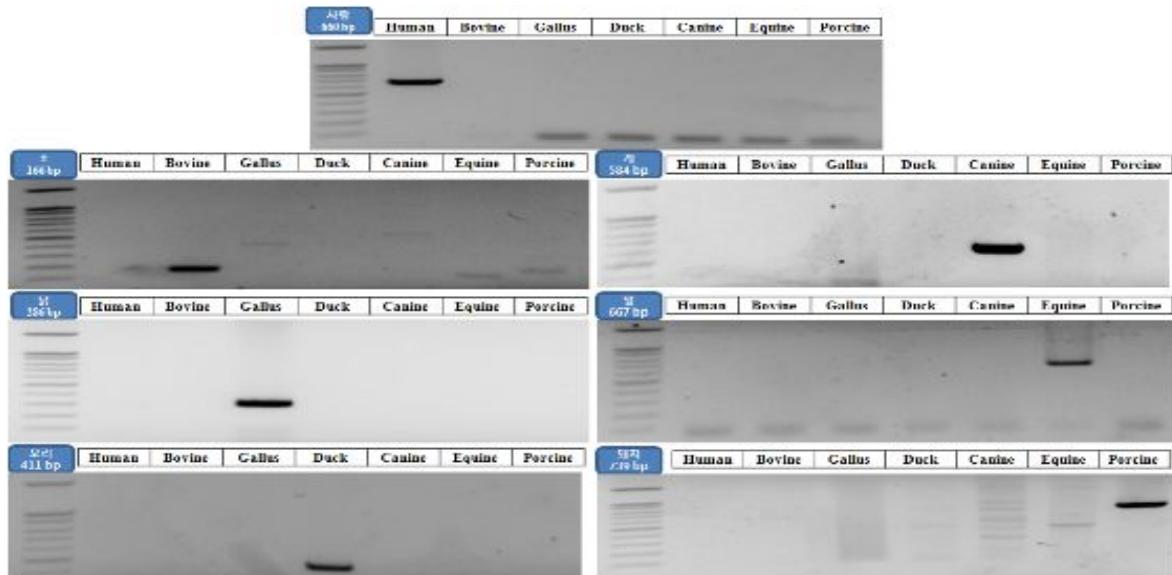


그림 3-16. 혼합된 마커들의 비특이적 증폭 확인

라. 종 식별 DNA 마커 Ladder 제작

(1) 제품에 포함되어 질 Ladder를 제작하였으며 Human을 제외한 6종을 선택하여 제작하였다 (그림 3-17).

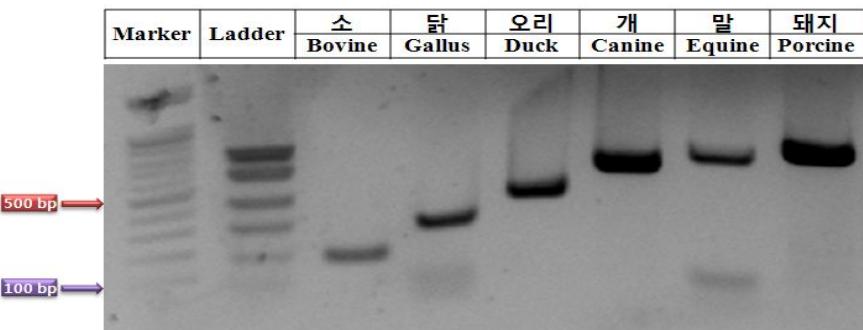


그림 3-17. 종식별용 마커의 positive-용 마커

마. 마커 검증 실험 및 감별력 검증

- (1) 혼합되어진 DNA를 이용하여 마커 들의 종 특이적 감별력을 검정하고자 하였으며, 시험에 사용된 DNA는 닭과 개, 오리와 말, 오리와 돼지를 각각 이용하였다.
- (2) 시험 결과 그림 3-18과 같이 각각의 마커들은 특이적으로 반응이 이루어짐을 확인하였으며 혼합된 DNA를 모두 감별할 수 있었다.

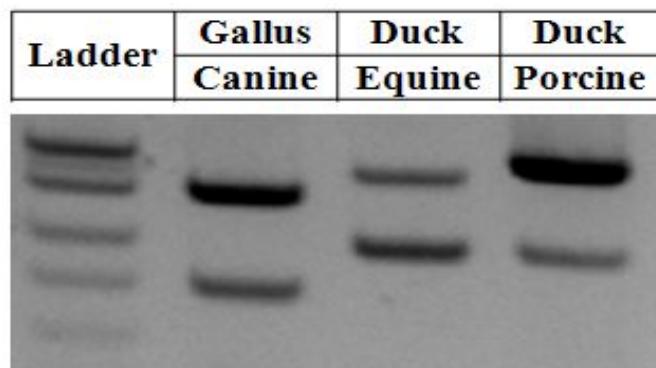


그림 3-18. 혼합 DNA에서의 종 식별 마커 시험

바. 종 식별용 DNA 분석 키트 개발

- (1) 6종의 축종 식별이 가능한 기술을 시제품화 하였으며, 제품은 Primer Mix, 10X Buffer, dNTP Mix, HotStart용 *Taq* DNA Polymerase 및 Positive Ladder로 구성되어 있음.
- (2) 제품은 Agrose gel을 이용한 전기영동에 사용가능한 일반적인 제품으로 빠르게 경제적으로 확인 할 수 있게 개발 하였으며, 더불어서 형광을 이용한 자동전기영동장치용 제품을 개발하여, 좀 더 정확하고 분석이 용이한 제품을 개발하였다(그림 3-19).



그림 3-19. 종식별을 위한 시제품 사진

6. 혼입육 정성/정량 확인용 DNA 마커 개발

가. 혼입육 식별가능 마커 발굴

- (1) 각종 축산물을 활용한 산업이 크게 발달하고, 그에 따른 축산물의 이력 및 안정성이 중 대해지는 시점에서 여러 축종의 축산물이 같이 이용되는 사례가 늘어날 것으로 예상된다. 따라서 이들이 인위적으로 또는 알 수 없는 경로를 통해 혼입되었을 때, 이들을 검정할 수 있는 수단이 필요하다고 판단하였다. 따라서, 종식별 마커로 사용된 미토콘드리아 DNA의 Cytb 유전자부위로부터 특이적인 primer를 개발하였으며, 개략적인 정량이 가능한 기술을 개발하고자 하였다.
- (2) 일반적으로 MS마커를 이용한 유전자감식장비로 가장 널리 사용되는 형광을 이용한 자동전기영동장치에 사용하기 위하여 forward Primer에 Dye를 부착하여 제작하였으며 형광 도를 측정하여 혼합 DNA들의 상대적인 비율을 측정하고자 하였다.
- (3) 먼저 각 축종별 DNA의 농도별 standard curve를 이용하여 미지의 시료에 대한 DNA 양을 간접적으로 측정하고자 하였다.

나. 축종별 Species-specific primers 제작

- (1) Dye(FAM)를 부착하여 형광을 사용하는 장비에서 사용가능하도록 제작하였다.

표 3-16. 식별에 이용되어질 마커 Size

종	소	개	닭	말	오리	돼지
size (bp)	166	213	286	359	411	468

표 3-17. 종 식별 마커 Primer 서열

종	Forward	5' -> 3'	L
Canine	Ca_F_fam	ATTCGCAACCATAAGCCACAGCA	22
Bovine	Bo_F_fam	GCAATCCCATAACATCGGCACA	21
Porcine	Po_F_fam	CCAGCCCCCTCAAACATCTCATC	23
Gallus	Ga_F_fam	CCTGAGGGGGATTTCAGTCGAC	23
Equine	Eq_F_fam	ACGACAACTGCCTCTCATCCG	22
Duck	Du_F_fam	TTTCAGCCCTCCCATAACATCGG	22
Canine	Ca_R_fam	GCTGCGATGATGAAAGGGAGG	21
Bovine	Bo_R_fam	TGTTGGAGCCTGTTCGTGGGA	21
Porcine	Po_R_fam	TCGTGTGAGGGTTGCTTGTCG	22
Gallus	Ga_R_fam	GCTGGGGTGAAGTTTCTGGGTC	23
Equine	Eq_R_fam	AATCGGGTAAGGGTGGCTTGTC	23
Duck	Du_R_fam	TGTTTGGGATTGACCGCAGG	20

(2) PCR 조건은 그림 3-20과 같으며 product size가 작아짐에 따라 Extension 시간을 50 sec에서 30 sec로 줄였으며 비특이적인 증폭과 소량으로도 측정가능함에 따라 cycle 수를 25에서 22 으로 줄였다.

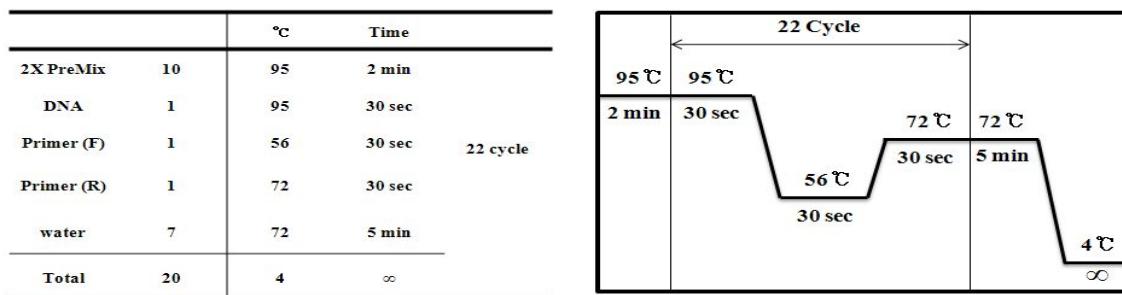


그림 3-20. PCR 조건

다. 6종의 mtDNA 유전자의 개체식별력 시험

(1) 제작된 Primer의 경우 각 Primer의 정확성 및 가능성을 알아보기 위하여 각 종별 5

sample 이상 사용하여 발굴한 마커가 종 특이적인지를 시험 하였다.

(2) 시험 결과 그림 3-21과 같이 정확한 size에서 band를 확인할 수 있었으며 모든 sample에서 종 특이적인 반응이 일어났다.

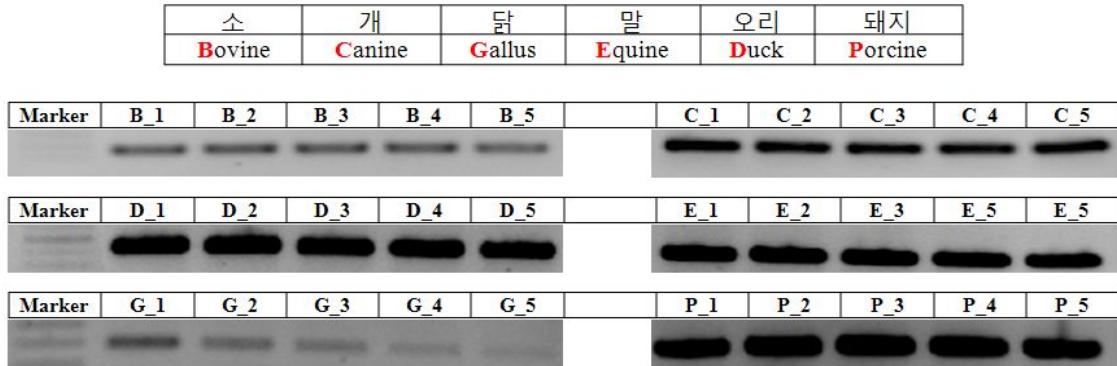
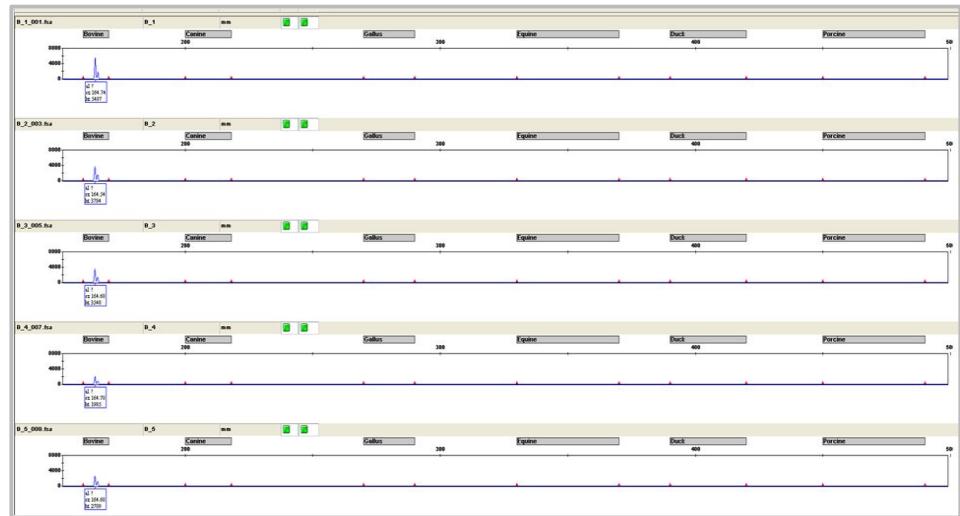


그림 3-21. Marker species-specific test

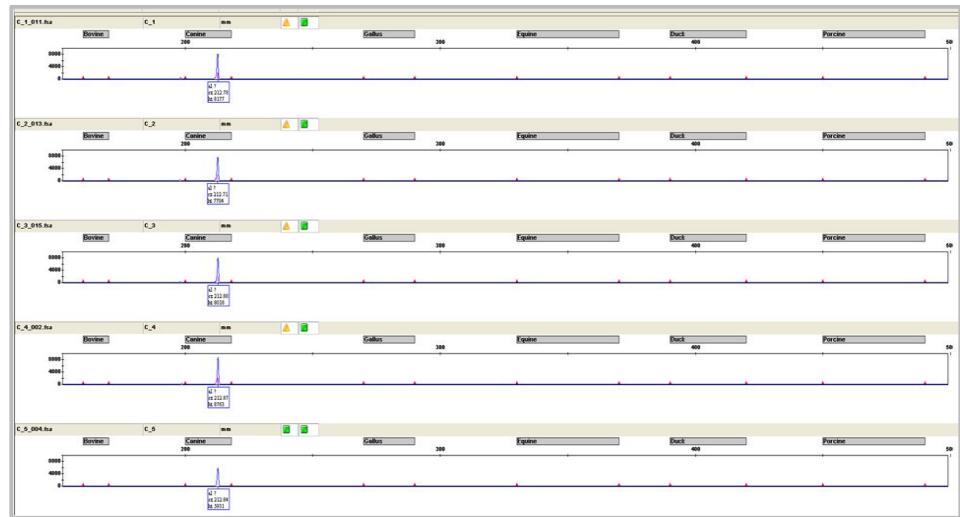
라. 형광측정 자동전기영동장치를 이용한 축종별 마커 특이성 확인

- (1) 종 특이적으로 제작된 마커들을 하나의 mixture로 혼합하여 종간 특이적인 반응을 시험하였다.
- (2) 그림 3-22 처럼 각 종 별로 5 sample 이상 반응하여 증폭결과는 Genetic Analyzer 3130xl(Appliedbiosystems, USA) 장비로 확인 하였다.
- (3) 전기영동결과 정확한 size의 product를 생산하였으며 종간 비 특이적인 반응은 일어나지 않았으며, 종 선택적 특이적인 반응만 일어남을 확인하였다.

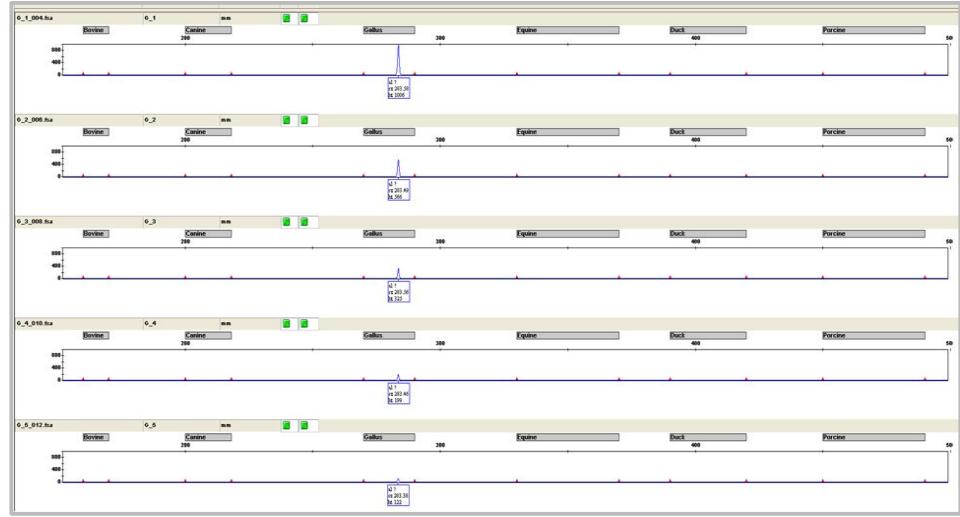
A

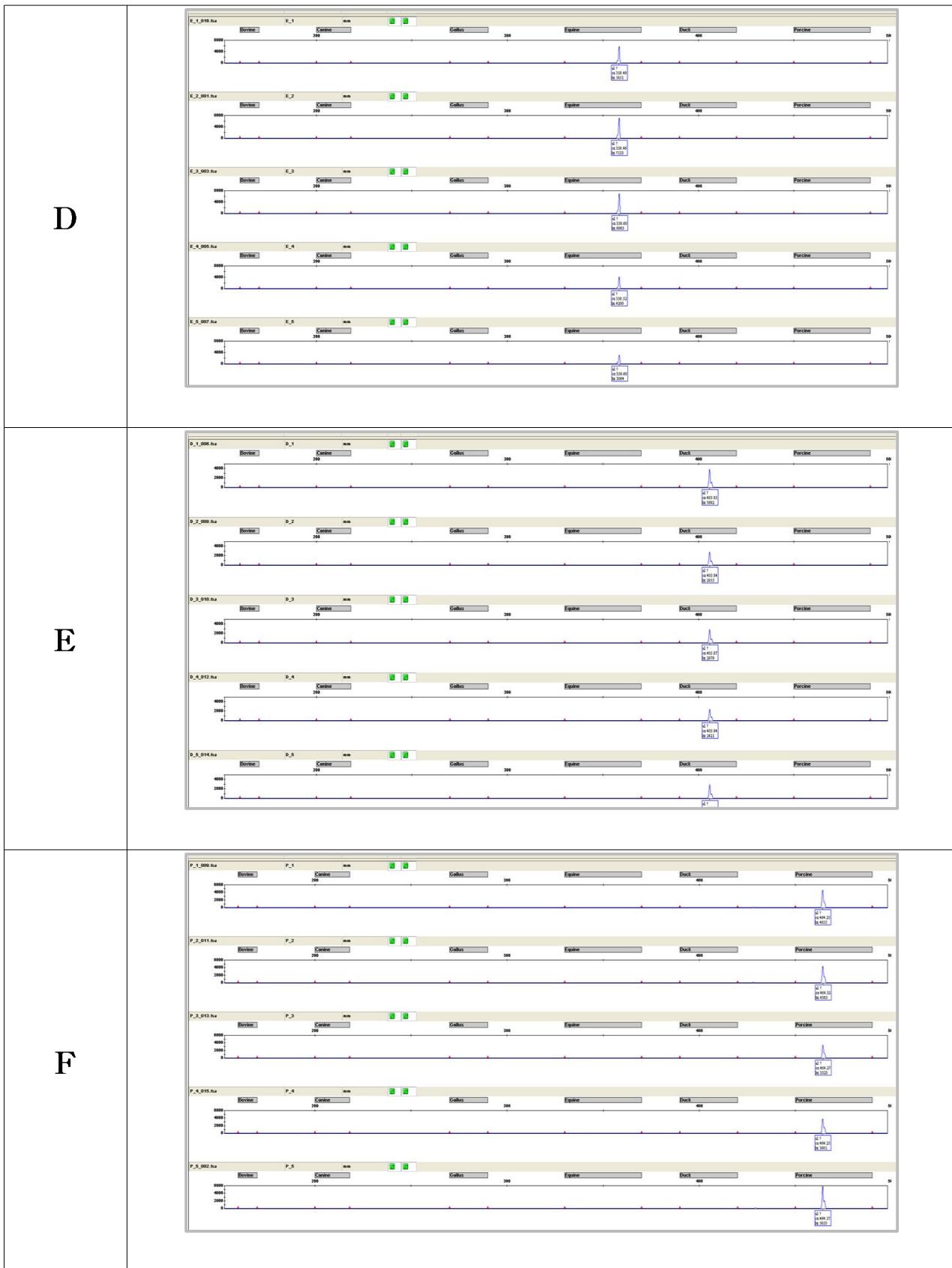


B



C





A: *Bos taurus* B: *Canis lupus* C: *Equus caballus* D: *Gallus gallus*, E: *Anas platyrhynchos*, F: *Sus scrofa*

그림 3-22. 형광측정 자동전기영동장치를 이용한 축종별 마커 특이성 확인

(5) 형광 자동전기영동 장치용 종식별 키트에 의한 혼입육 판별 시험

- (가) 여러 종의 DNA가 혼합 되어진 시료에서 식별가능여부를 확인하기 위하여 시험을 수행 하였다.
- (나) 사용된 시료는 소와 말 그리고 돼지 gDNA 혼합체, 닭과 개 그리고 돼지 혼합체, 소와 오리 그리고 닭 혼합체, 개와 말 그리고 오리 gDNA 혼합체의 시료를 사용하였다.
- (다) 시험 결과는 그림 3-23과 같으며 비 특이적인 반응이 이루어지지 않았으며 선택적으로 정확한 종 식별이 이루어졌음을 확인 할 수 있었다.

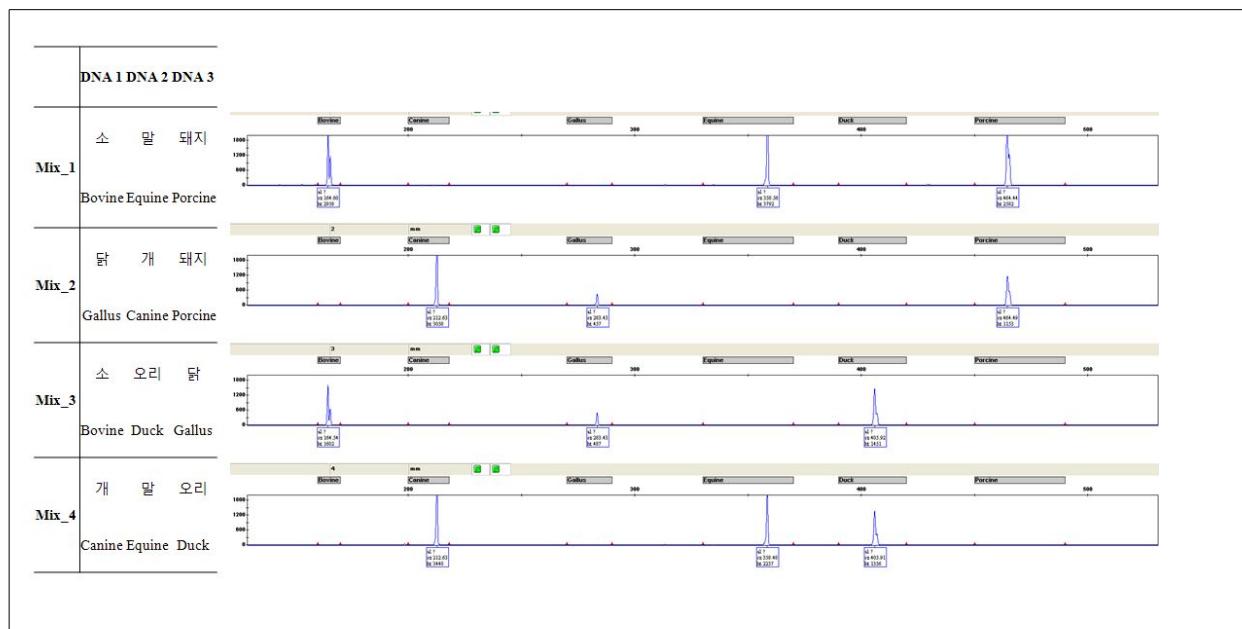


그림 3-23. 여러 종의 혼합 DNA를 이용한 식별 시험

마. 형광측정 자동전기영동장치를 이용한 축종별 농도에 따른 curve 확인

- (1) 정량을 하기 위해서 DNA 농도별 형광도 차이를 측정 하였으며, 장비는 Genetic Analyzer(Appliedbiosystems, 미국)
- (2) DNA 농도는 각 종별로 50 ng/ul, 25 ng/ul, 12.5 ng/ul, 6.25 ng/ul, 3.125 ng/ul로 5 종류의 농도를 사용하였다.
- (3) 농도는 Nano-drop 과 Gel 전기영동 사진으로 확인 하였다(그림 3-24).

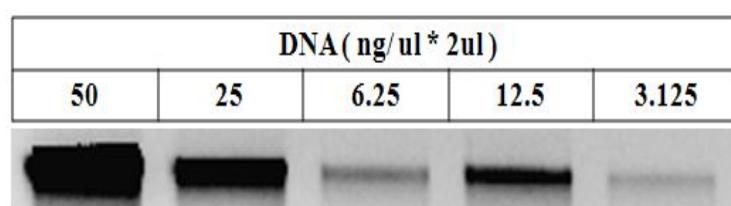


그림 3-24. Bovine DNA 농도 별 Gal 전기영동 사진

- (4) 각 종별로 5 농도씩 반응시켜 GA3130 장비를 사용하여 측정하였다.
- (5) 결과는 그림 3-25와 같으며 농도별 형광도가 차이나는 것을 확인 할 수 있었으며 DNA 농도가 낮을수록 형광도가 낮음을 확인하였다.
- (6) 다음 결과를 바탕으로 정량을 위한 standard curve를 작성 하였다.

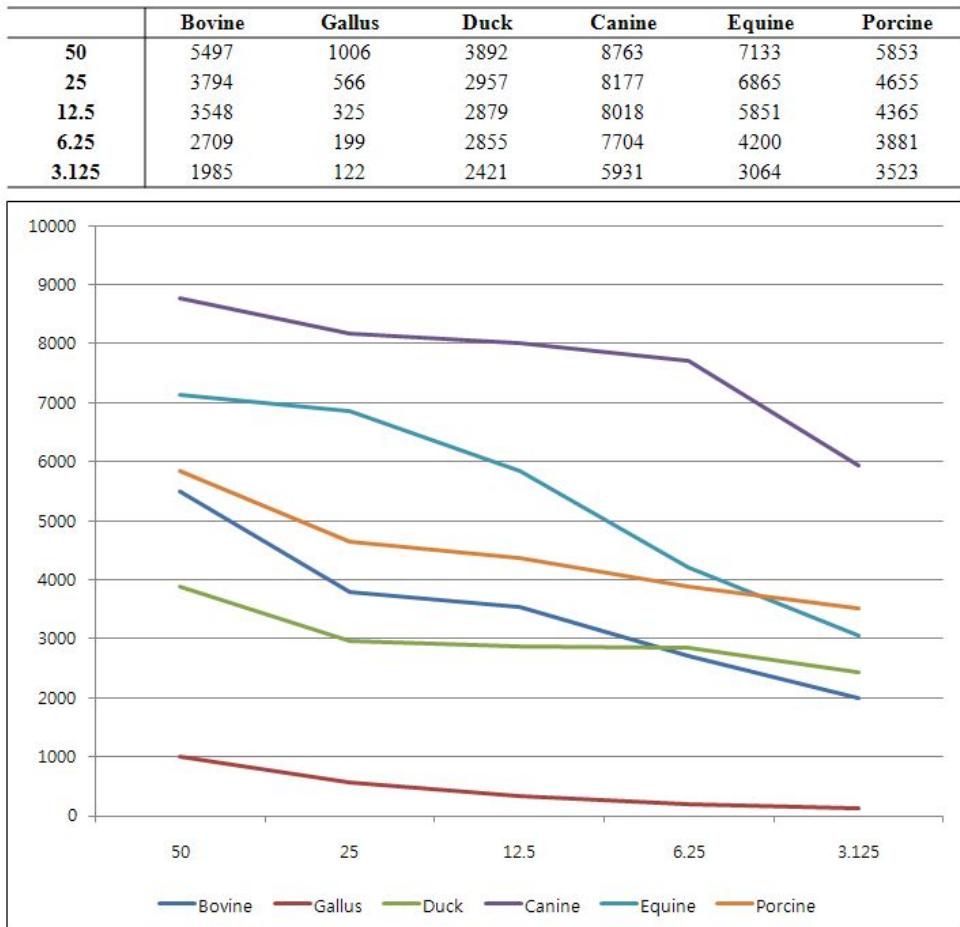


그림 3-25. 축종별 gDNA 농도에 따른 standard curve

바. 형광측정 자동전기영동장치를 이용한 축종별 농도에 따른 standard curve작성

- (1) standard curve의 정확도를 높이기 위하여 반복 실험을 수행 한 후 평균값을 이용하여 standard curve를 작성 하였다.
- (2) 결과는 그림 3-26과 같으며 아래 공식을 이용하여 종별 형광도 및 농도를 측정 할 수 있다.
- (3) 공식에서 Y 의 경우 형광도를 나타내며 X 는 농도를 나타낸다.

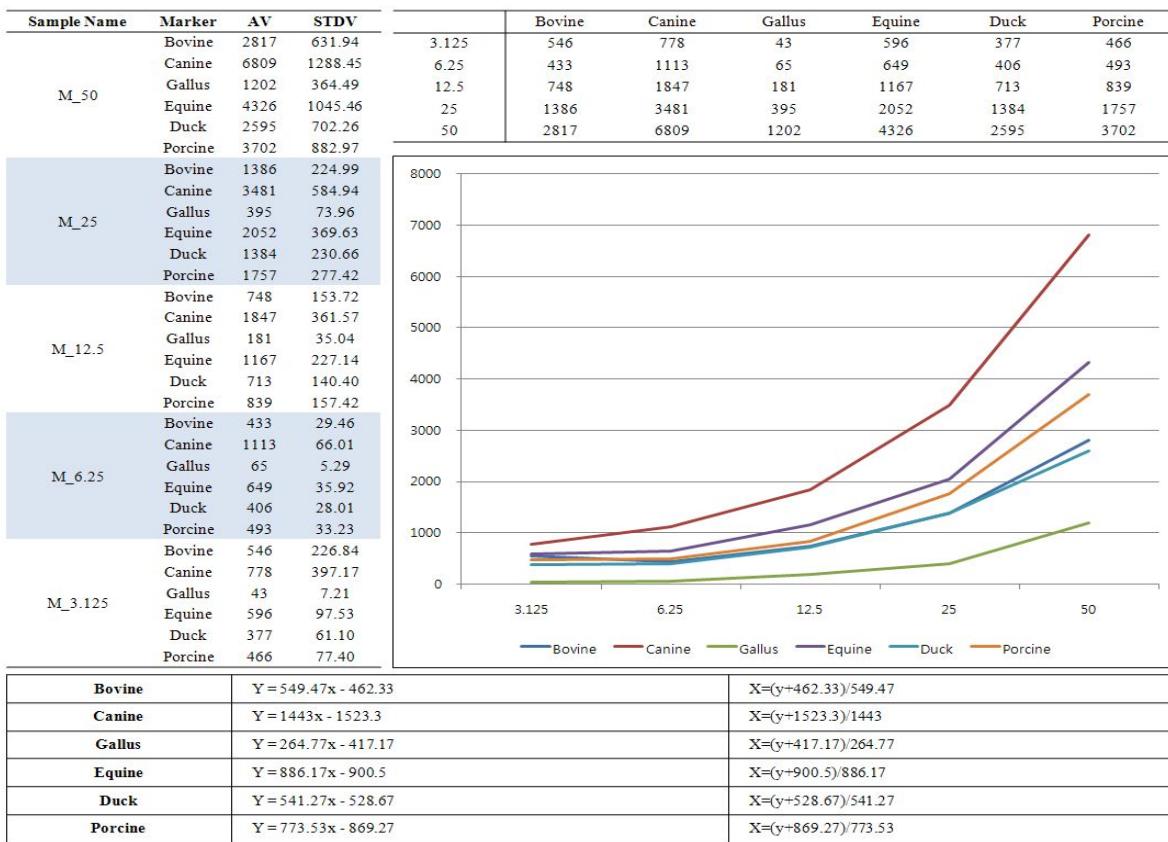


그림 3-26. 축종별 gDNA 농도에 따른 standard curve

사. 시제품 개발

- (1) 상기 결과를 이용하여 자동전기영동장치인 Genetic analyzer(Appliedbiosystems, USA)에서 사용가능한 키트를 개발 하였다(그림 3-27).
- (2) 제품 구성은 Primer Mix, 10X Buffer, dNTP Mix, HotStart용 Taq DNA Polymerase 및 Positive Ladder



그림 3-27. E_PLEX Species Quantitative analysis Kit

7. 멸종위기 동물인 수달(*Lutra lutra*)의 DNA 마커 개발

가. 국내 서식하는 수달(*Lutra lutra*)의 개체식별용 MS 마커 개발

경남 진주 인근지역에서 Road-Kill 된 수달(*Lutra lutra*) 9마리의 근육조직시료와 진양호와 거제지역에서 채취한 수달(*Lutra lutra*)를 분변시료 14개 총 23개의 시료를 (사)수달생태연구센터의 협조를 통해 채취하여, 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 이용하여 게놈 DNA의 분리하였다.

수달(*Lutra lutra*)의 개체식별에 효과적으로 사용될 수 있는 MS 마커를 선발하기 위해, NCBI (National Center for Biotechnology Information, 미국국립생물정보센터)에 보고되어 있는 수달의 다형성 분석용 MS 마커를 20개 선발하여(표 3-18), 국내 서식하고 수달(*Lutra lutra*)에 적용 가능성을 검증하였다.

표 3-18. 수달 대립유전자형 분석용 MS 마커 리스트.

Locus	Genbank Accession No.	Primer sequence	PCR product(bp)
RIO_01	AY268051	F:AAAAAAGGGCACCTCGAGACAAT R:CATGCTTGACCTTGAGCAAC	264-280
RIO_02	AY268052	F:GTAGAGTGGGGCGCCTAAG R:TGACCTTGAAGAGACATGC	184-198
RIO_03	AY268053	F:ATCAGCCTGAGTCCCTGAAC R:ACAGCCAGAACCAAAAGACA	194-218
RIO_04	AY268054	F:CAAGCACCAACTCCTCAAT R:CCACAAGCCAGATTCCCTCTC	255-273
RIO_05	AY268055	F:GGGTTAAAGCCTCTGCCTTC R:AGGGGATAACCGGATCATTT	316-354
RIO_06	AY268056	F:GCCAAGATGGCAACTACTCC R:GAAGCACATTCTCTCTCCATCA	252-264
RIO_07	AY268057	F:AAGCACTTCCAGATATCAGTTGC R:CCCAACTTGAGTGGACTTT	167-177
RIO_08	AY268058	F:TTTCCAGAGCCAATTGTCA R:CTTGCCTGCTGCTGACATTGAAG	204-214
RIO_09	AY268059	F:GCTCTATTATTAGGAGCAAACCA R:AGCTGGCTTGAATTCTCTC	252-256
RIO_10	AY268060	F:CATT CGTGGACATT CGGTAA R:GGCAAGGAATCCTGGTTATG	243-259
RIO_11	AY833262	F:TCTTCCACTTCAATTAGGTA R:GCCCAAGGTTCACTATCAG	156-168
RIO_12	AY833263	F:GTATCGTCCAGGCTGCTCTC R:CCACAGCCAGCTCTGAATAA	207-213

표 3-18. 계속

Locus	Genbank Accession No.	Primer sequence	PCR product(bp)
RIO_13	AY833264	F:GCTCAGCTGTGCAGAATGAT R:GCACACGTGGTAAGATGAGC	254-274
RIO_14	AY833265	F:CTACCAGCCGTTGTGAG R:GCTTGTCCCTCTACCTCTGC	286-294
RIO_15	AY833266	F:AGTCACAGTGGTGGTCTTG R:TCCTGATTCTGCTTGGTTCA	253-261
RIO_16	AY833267	F:GGTGCTTCTTAAGGAAGTGGAGC R:ATTATTGGGCATGGAAGCA	266-280
RIO_17	AY833268	F:GGTGCGAAGATAAGCAAGG R:CAAGTGTAAAGTGTGTGTGT	172-178
RIO_18	AY833269	F:TTCCATTGTCTCTGGCTTG R:CCCTCTCCACACTTGTGCTC	140-165
RIO_19	AY833270	F:GGTCCCAGGTGCAAATCTTA R:GATTGGGTCTTCCAATGGTT	273-285
RIO_20	AY833271	F:CTAGCTCTGCCACCTAACCCAG R:ACAGCGTGGTCCTGACCTT	245-259

검증 방법은 Road-Kill 된 수달(*Lutra lutra*) 9마리의 genomic DNA를 이용해 마커 별로 PCR 증폭여부를 검증하기 위해 Gradient PCR을 이용해 적정한 반응온도 검증을 실시하여 agarose gel 전기영동법을 이용하여 확인하였다(그림 3-28).

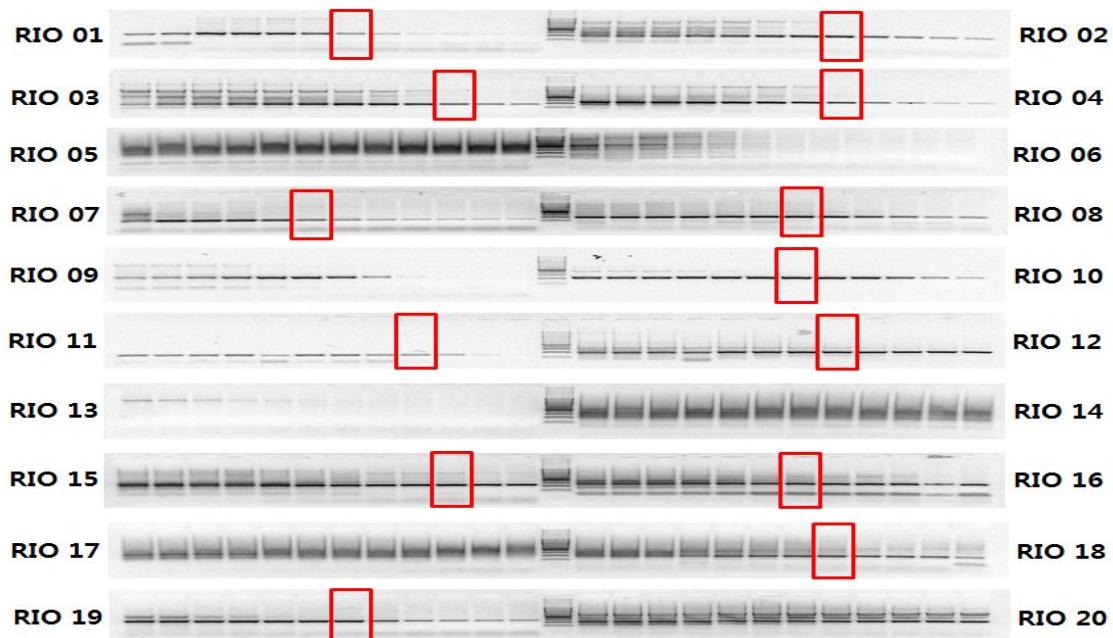


그림 3-28 국내에 서식하는 수달(*Lutra lutra*)의 대립유전자형 분석에 적용할 마커 선별을 위한 Gradient PCR을 전기영동 결과

확인 결과 20종의 후보 마커 중 13종의 마커만이 국내에 서식 하는 수달(*Lutra lutra*)에서 반응이 나타나 13종의 마커를 최종 선발하여(표 3-19), 한번에 PCR 증폭이 가능하게 일정한 비율로 마커별 primer양을 조절해 primer mix 조성을 확립하여 Touch down 방식의 Multiplex-PCR 시스템(그림 3-29)을 구축 후 Road-Kill 된 수달(*Lutra lutra*) 9마리에 대한 대립유전자형 분석을 실시하였다(표 3-20).

표 3-19. 국내에 서식 하는 수달(*Lutra lutra*)의 대립유전자형 분석용 MS 마커 리스트.

Name	GenBank Accession No.	Label	PCR product(bp)
RIO_18	AY833269	FAM	140-165
RIO_08	AY268058	FAM	204-214
RIO_01	AY268051	FAM	264-280
RIO_11	AY833262	VIC	156-168
RIO_02	AY268052	VIC	184-198
RIO_04	AY268054	VIC	255-273
RIO_03	AY268053	NED	194-218
RIO_10	AY268060	NED	243-259
RIO_16	AY833267	NED	266-280
RIO_07	AY268057	PET	167-177
RIO_12	AY833262	PET	207-213
RIO_15	AY833266	PET	253-261
RIO_19	AY833270	PET	273-285

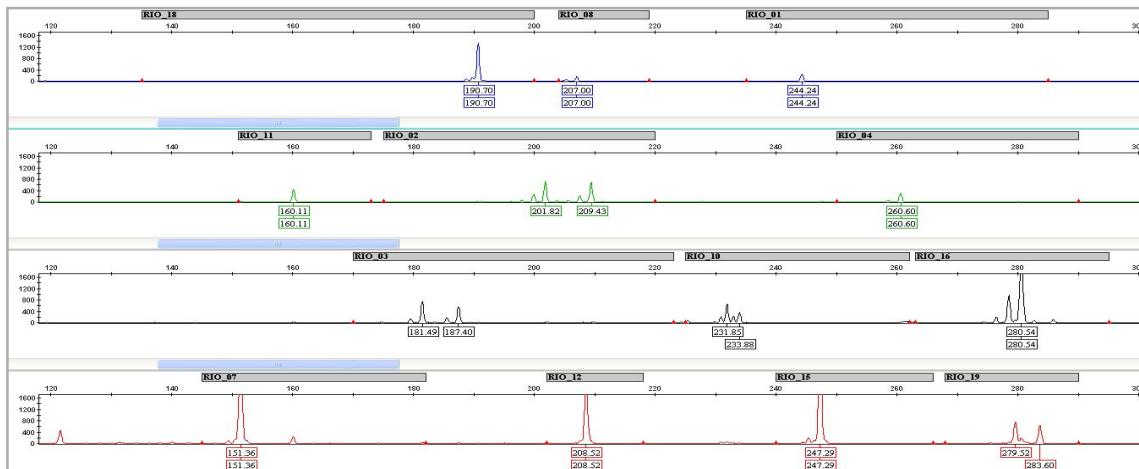


그림 3-29. 13종의 MS 마커를 이용해 국내에 서식 하는 수달(*Lutra lutra*)의 대립유전자형 분석 결과

표 3-20. Road-Kill 된 수달(*Lutra lutra*) 9마리의 대립유전자형 분석 결과

No.	RIO_01	RIO_02	RIO_03	RIO_04	RIO_07	RIO_08	RIO_10	RIO_11	RIO_12	RIO_15	RIO_16	RIO_18	RIO_19													
1	244	244	200	209	181	181	261	261	151	151	207	234	234	160	160	209	209	250	250	268	281	187	191	280	288	
2	244	244	200	202	181	181	261	281	151	151	207	207	232	234	160	160	209	209	247	250	281	287	187	191	271	280
3	244	244	177	202	182	182	261	261	151	151	207	207	232	232	160	160	209	209	247	250	280	280	187	191	275	279
4	-	-	202	209	181	187	-	-	151	151	-	-	232	234	160	160	209	209	247	250	281	287	191	191	-	-
5	244	244	200	209	181	181	261	261	151	151	205	207	232	234	160	160	209	209	247	250	281	281	187	191	275	280
6	244	244	202	209	181	181	260	264	151	151	205	208	232	232	160	160	209	209	247	250	278	295	191	191	279	279
7	244	244	202	202	181	181	265	275	151	151	205	205	232	234	160	160	209	209	247	250	281	285	187	191	284	288
8	244	244	200	202	181	187	261	275	151	151	205	207	232	234	160	160	208	208	247	250	281	281	191	191	276	288
9	244	244	202	209	181	187	261	261	151	151	207	207	232	234	160	160	209	209	247	247	281	281	191	191	280	284

Road-Kill 된 수달(*Lutra lutra*)의 경우 근육조직으로부터 양질의 genomic DNA 추출이 가능하여 Multiplex-PCR 시스템으로 13종의 마커에 대한 대립유전자형 분석이 이루어졌으나, 분변의 경우 양질의 genomic DNA 추출이 힘들어 대립유전자형 분석에 어려움이 있었다. 수달의 분변을 통한 대립유전자형 분석은 선발된 13종의 MS 마커 주변에 1차 PCR용 primer를 제작하여 1차 PCR을 수행하였고, 1차 PCR 산물을 이용하여 2차 PCR 후 최종 산물을 이용한 대립유전자형을 분석하는 방법을 적용하여 대립유전자형 분석에 성공하였다(그림 3-30).

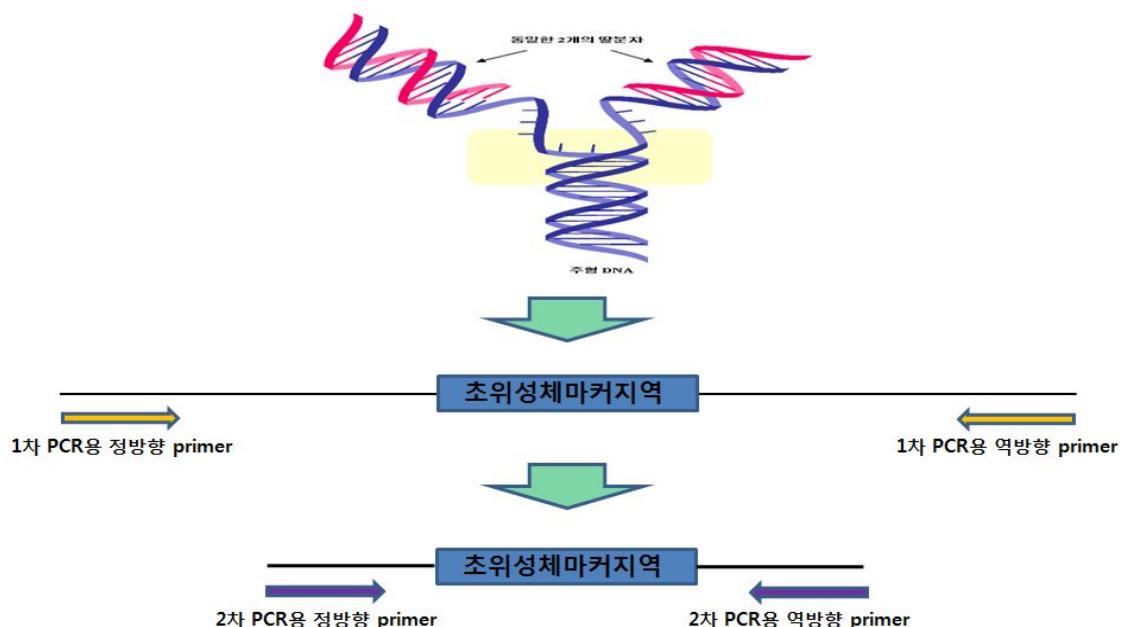


그림 3-30. 수달 분변을 이용한 대립유전자형 분석 방법 모식도

Road-Kill 된 수달(*Lutra lutra*) 시료 9개와 진양호와 거제도 지역에서 채집한 분변시료 14개에 대한 대립유전자형 분석 결과를 Cervus 3.0을 이용하여 동일개체 출현 확률 및 마커별 다형성지수인 heterozygosity(*He*)와 polymorphic information content(*PIC*)값을 분석한 결과 동일개체 출현확률은 0.85×10^{-6} 으로 13종의 MS 마커를 사용할 경우 동일한 개체가 나타날 확률은 없다고 사료되며, 마커별 다형성은 RIO_02가 8개로 allele 개수가 가장 많았으며, RIO_07의 경우 23개의 샘플모두 하나의 특정 대립유전자형(151bp)에 고정되어 있는 것을 알 수 있었으며, RIO_07을 제외한 마커 중에는 RIO_12가 Heterozygosity(*He*) 0.085로 가장 낮게 나타났다. 이는 마커의 다양성이 낮다는 의미로 국내에 서식하는 수달의 유전적 다양성을 분석하기에는 부적합한 마커이거나 또는 국내에 서식하는 수달의 유전자형이 특정한 allele에 고정되어 있는 것으로 사료된다(표 3-21). 그리고 13종의 초위성체마커에 대한 대립유전자분포를 이용해 Nei(1972)의 방법을 이용한 *D_A*유전적 거리지수를 추정하여 Neighbor -joining(NJ)방법에 의한 계통유연관계 tree를 추정하여, Phylip version 3.63을 이용하여 도식화한 결과 3개의 지역(Rode-Kill 그룹, 진양호, 거제도)으로 그룹이 형성되는 것을 확인하였다(그림 3-31).

표 3-21. 국내에 서식 하는 수달(*Lutra lutra*)의 대립유전자형 분석용 13종 MS 마커 특성.

Locus	Allele No.	N	<i>He</i>	<i>PIC</i>
RIO_01	3	23	0.3	0.262
RIO_02	8	23	0.832	0.792
RIO_03	3	23	0.484	0.407
RIO_04	5	17	0.369	0.344
RIO_07	1	23	0	0
RIO_08	2	10	0.442	0.332
RIO_10	2	23	0.414	0.323
RIO_11	3	23	0.677	0.588
RIO_12	2	23	0.085	0.080
RIO_15	2	23	0.322	0.265
RIO_16	6	9	0.562	0.508
RIO_18	2	23	0.496	0.367
RIO_19	6	15	0.729	0.655

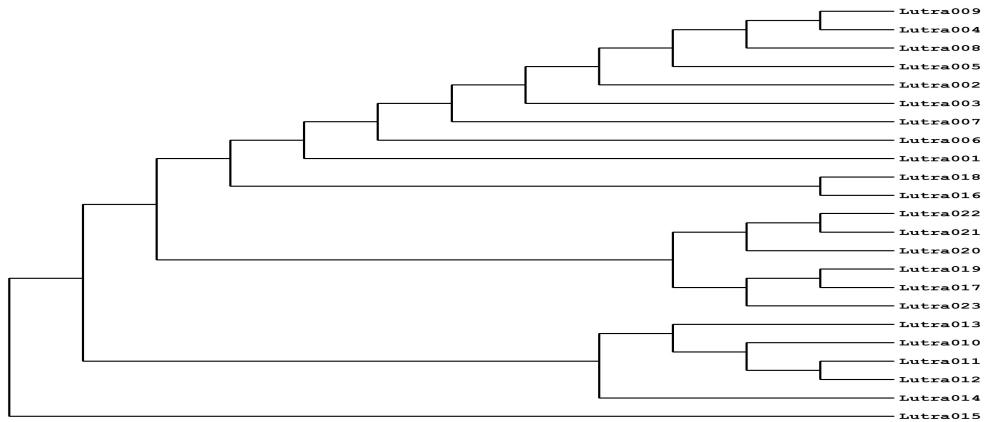


그림 3-31. D_A 유전적 거리지수를 이용한 23개 수달(*Lutra lutra*) 시료의 계통유연관계 tree

남한에 서식하는 수달(*Lutra lutra*)은 1982년 천연기념물 제330호와 2005년 멸종위기야생동물 I 급으로 지정되어 국가의 보호를 받고 있는 야생동물로서, 내륙지역 수 환경생태계 먹이사슬의 최상위층에 해당되며, 하천생태계의 건강도를 나타내는 지표종으로서 중요한 위치에 있다(낙동강유역환경청, 2006) 수달(*Lutra lutra*)의 경우 개체 확인 등을 위한 포획도 금지되어 있는 보호종으로서 서식 개체수 확인 등의 조사 방법이 흔적조사방식과 조사자의 지식과 경험에 의한 조사결과가 도출되어 과학적이지 못한 점을 보완하고자 DNA 분석을 통한 개체식별 마커를 개발하였고, 이를 활용한다면 과학적이고 객관적인 서식실태조사결과를 도출하는데 도움을 줄 수 있다고 사료되어진다.

나. 수달 개체식별을 위한 mtDNA 분석

본 연구에 사용한 25개의 수달 시료는 (사)수달생태연구센터의 도움으로 진주 인근 국도에서 Road-Kill 된 수달 사체에서 채취한 9개의 조직시료(Lutra_01부터 09까지)와 창녕 우포늪 인근 지역에서 Road-Kill 된 수달 사체에서 채취한 1개의 조직(Lutra_10) 그리고 진주인근 지역(진양호)에서 채취한 분변시료 8개(Lutra_11부터 18까지)와 거제지역에서 채취한 분변시료 7개(Lutra_19부터 25까지)로 구성되어 있으며, 조직 시료의 경우 proteinase K / phenol / chloroform / isoamylalcohol 방법으로 Genomic DNA를 추출하였으며, 분변 시료의 경우 Genomic DNA 추출 KIT (iNtRON. Korea)를 이용하여 Genomic DNA를 추출해 mtDNA 분석을 수행하였다.

수달 mtDNA D-loop 전체 1,087 bp 중에 676 bp의 부분의 염기서열을 분석하여 CLUSTAL W program을 이용해 multi-alignment를 수행한 결과 5개 지역에서 단염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)이 확인 되었으며, 총 6개의 haplotype으로 구분되었으며, 거제도에서 수집한 시료 7개의 경우 모두 동일한 haplotype을 나타내었으며, 진주인근지역에서 수집한 시료의 경우 5개의 haplotype이 관찰 되었다. 그 중 진주인근지역에서 수집한 시료 중 Lutra_18과 창녕 우포늪에서 수집한 시료 Lutra_10의 경우 거제도 지역에서 수집한 시료들과

동일한 haplotype 을 나타내었다(표 3-22).

표 3-22. 수달 D-loop 지역 분석 결과를 이용한 haplotype 추정 결과

haplotype	no. of frequencies	nucleotide position of D-loop sequence					Sample name
		405	449	471	493	559	
haplotype 01	6	C	C	C	C	T	Lutra_04, Lutra_06, Lutra_12, Lutra_13, Lutra_14, Lutra_15
haplotype 02	2	C	T	C	C	T	Lutra_07, Lutra_11
haplotype 03	5	C	C	T	C	T	Lutra_03, Lutra_05, Lutra_08, Lutra_09, Lutra_17
haplotype 04	1	C	C	C	T	T	Lutra_16
haplotype 05	2	C	C	T	T	T	Lutra_01, Lutra_02
haplotype 06	9	T	C	T	T	C	Lutra_10, Lutra_18, Lutra_19, Lutra_20, Lutra_21, Lutra_22, Lutra_23, Lutra_24, Lutra_25

또한 진주인근지역에서 수집한 17개의 시료에서 5개의 SNP가 관찰되었고 거제와 창녕지역에서 수집한 8개의 시료에서는 SNP가 발견되지 않았다(표 3-23). 이는 2004년 Cho 등이 연구한 한반도 야생멧돼지 결과와 비교해보면 한반도 야생멧돼지의 경우 9마리의 mtDNA D-loop 영역 중 일부인 477 bp를 분석한 결과 10개의 SNP가 관찰되어 본 연구에서 사용한 공시동물의 개체 수 보다 적은 공시동물과 짧은 D-loop 영역의 염기서열을 분석한 결과 임에도 불구하고 수달보다 다양한 SNP가 관찰 되었다는 것은 국내에 서식하는 수달이 다른 야생 동물에 비해 유전적 다양성은 낮고, 서식하는 개체의 수가 적다는 것으로 사료되어 진다. 특히, 거제와 창녕지역에 서식하는 수달에서는 SNP이 전혀 관찰되지 않고 모든 개체들이 동일한 haplotype 으로 추정되었으며, 이런 점은 거제와 창녕지역의 수달들이 아주 제한된 두수의 모계에서 유래되었음을 의미한다.

표 3-23. 수달 D-loop 지역의 유전적 다형성 분석 결과

	Jinju sample group	Changnyeong sample group	Geoje Island / total
No. of sequence	17	8	25
Variable sites ^a	5	0	5
Nucleotide diversity (π) ^b	0.002	0.000	
Nucleotide difference (κ) ^c	1.368	0.000	

^aVariable sites are single nucleotide polymorphism (SNP),

^bNucleotide diversity($\times 10^{-3}$) was calculated using only SNPs,

^cAverage number of nucleotide differences between haplotypes within a haplogroup.

이로 인하여 높은 근친도를 유지하고 있을 가능성이 있음을 의미한다고 사료되며, 이 지역 수달이 자연상태에서 지속 가능한 집단을 유지하는데 있어 중대한 위해 요소로 작용할 가능성이 있다. 따라서, 보다 면밀한 모계라인의 분석을 위하여 mtDNA의 전체 지역을 이용한 추가 분석을 반드시 수행하여, 위해 요소에 대한 보다 정확한 조사분석 및 대책이 반드시 필요한 것으로 사료된다.

분석된 haplotype을 기초로 parsimony consensus NJ tree method를 이용하여 계통수를 작성한 결과 크게 3개의 그룹으로 분류가 되며, 진주인근지역에서 수집한 시료가 두 개의 그룹으로 분류되고, 거제도 지역은 하나의 그룹으로 분류되는 것을 확인 할 수 있었다. 창녕 우포늪 지역에서 수집한 시료의 경우 거제도 그룹과 가까운 유연관계를 나타났으며, 거제도 그룹과 진주인근지역 그룹 간에는 유전적 차이가 있는 것으로 판단되며(그림 3-32A), Haplotype 을 NETWORK 4.5.1.6 Program 을 사용하여 도식화한 결과 대부분이 거제도 지역에서 수집한 시료들이 포함된 haplotype 06 그룹과 진주인근지역에서 수집된 시료 그룹인 haplotype 02 그룹이 가장 먼 유연관계를 나타내었으며, 진주인근지역에서 수집한 시료들로 구성된 haplotype 01, 02, 03, 04, 05 그룹은 가까운 유연관계를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(그림 3-32B).

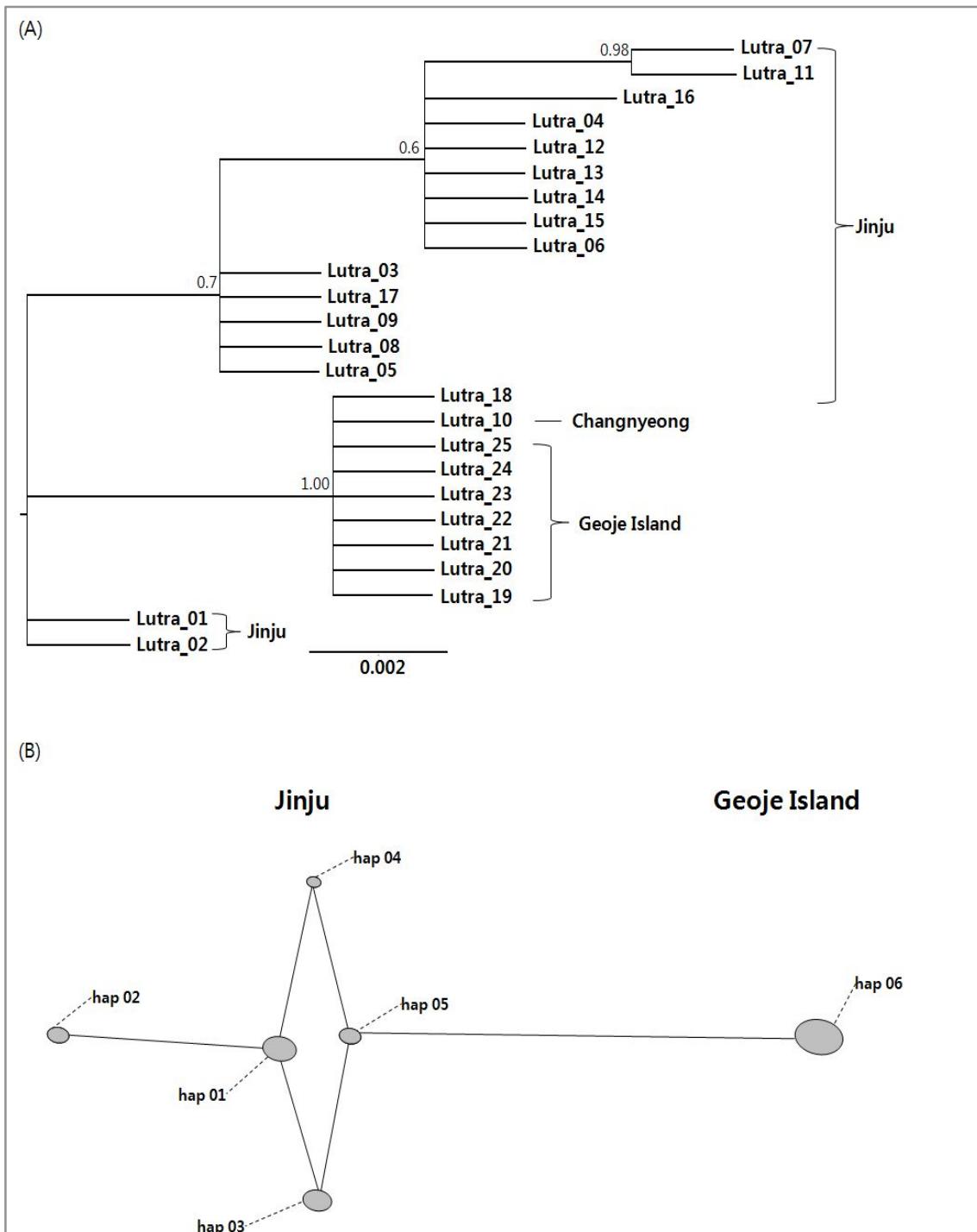


그림 3-32. 수달 D-loop 지역 변이를 이용한 개체별 및 haplotype별 유연관계 분석 결과

이러한 결과들을 종합 해볼 때 진주인근지역에서 수집한 시료의 경우 2개 이상의 모계집단으로부터 형성 되었고, 거제도 지역에서 수집한 시료의 경우 1개 이상의 모계집단으로부터 형성된 것으로 사료되어 진다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 경남지역에서 서식하는 수달의 경우 각각의 개체별 유전적 다형성은 높지 않고 유전적 거리는 매우 가까운 것으로 사료되며, 거제도와 진주 지역 사이의 유전적 유연관계의 경우 다소 거리가 있는 것으로 사료되어 진다. 따

라서 추가 연구를 통해 국내 각 지역에 분포하고 수달의 주요 서식지를 대상으로 시료를 확보해 mtDNA 전체 서열 분석을 실시하면 수달의 서식지별 유전적 유연관계에 대한 객관적인 자료가 확보될 것이며, 또한 이를 기반으로 국내에 서식하는 수달의 개체 수 및 모계 추정 등이 가능하여 천연기념물인 수달의 보전 및 보호에 도움이 될 것으로 사료되어 진다.

다. 수달 성(性) 감별을 위한 DNA 마커 개발

NCBI data base에서 수달의 ZFX와 ZFY 유전자 서열을 확보하여(AB491606, AB491597), 돼지 및 사람의 ZFX와 ZFY 유전자와 상동성이 높은 지역에서 각각 1쌍의 primer를 제작 하였다(표 3-24). 이를 이용하여 수달의 조직 시료와 분변시료에서 추출한 Genomic DNA로 PCR 조건을 확립하여 성 감별 마커를 구축하였다. PCR 조성은 Genomic DNA 1 µl (조직시료의 경우 50 ng/µl, 분변시료의 경우 100 ng/µl), primer 각각 1 µl (10 pmol/µl), Taq DNA polymerase (GeNet Bio, Korea) 0.1 µl, 10×buffer 2.5 µl, 0.25 mM dNTP 2 µl에 중류수를 첨가하여 최종 25 µl 용량으로 반응하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 denaturation을 실시한 후, 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 하여 35회 반복한 후, 72°C에서 5분간 extension하고 8°C에서 보관하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동 확인하였다(그림 3-33).

표 3-24. 수달 성 감별용 primer 정보

No.	name	GenBank Accession No.	bp	5'-primer Sequence-3'	
1	lutra_ZFX	AB491606	353	F	CCA CAG AGG TGT TGT GAT GG
				R	ATC ACC ATC CGC GAA TAG AC
2	lutra_ZFY	AB491597	299	F	CCC AAT GCA GGA CTC TTC TC
				R	GAG TGA TCG AGC CAA GTT CC

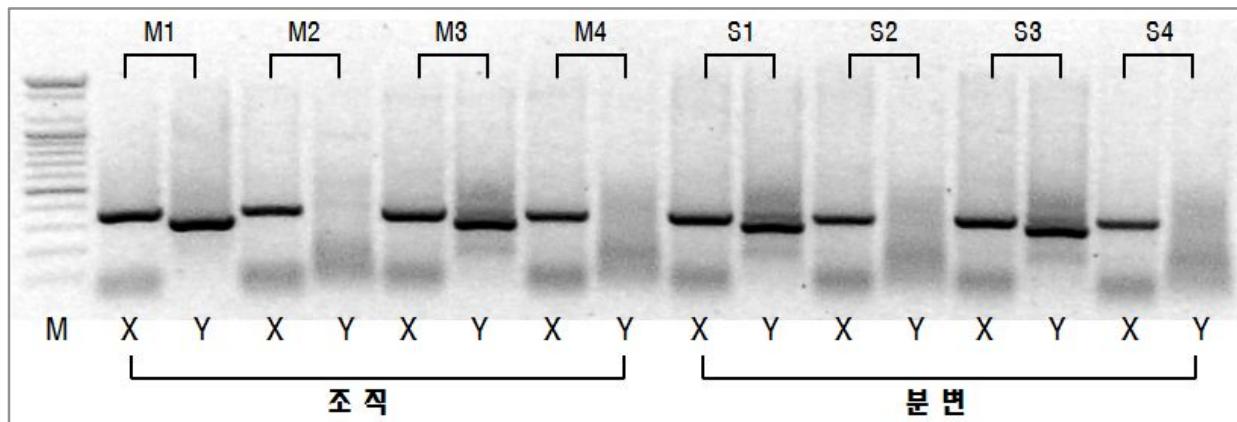


그림 3-33. 수달 성 감별 마커 결과

라. mtDNA를 이용한 수달의 계통유전학적 유연관계 분석

본 연구에 사용된 수달 시료는 멸종위기야생동물 I 급과 천연기념물(330호)로 법적 보호를 받는 동물로, (사) 수달생태연구센터의 도움을 받아 경남 진주 진양호 일대 Road-kill된 11개체의 조직을 분양 받아 proteinase K / phenol / chloroform / isoamylalcohol 방법으로 Genomic DNA를 추출 하였다.

Primer 디자인은 넓은 지역을 먼저 PCR을 하고 그안의 내부 서열을 sequencing primer로 제작하였다 (표 3-25).

표 3-25. PCR primer 와 sequencing primer 정보 리스트

PCR primer	SEQ primer	Size(bp)	Total size(bp)	PCR primer	SEQ primer	Size(bp)	Total size(bp)
mt-PCR-1	Seq-1	617	1714	mt-PCR-6	Seq-16	587	1804
	Seq-2	672			Seq-17	627	
	Seq-3	593			Seq-18	533	
mt-PCR-2	Seq-4	596	1695	mt-PCR-7	Seq-19	630	1704
	Seq-5	644			Seq-20	631	
	Seq-6	609			Seq-21	494	
mt-PCR-3	Seq-7	628	1806	mt-PCR-8	Seq-22	593	1787
	Seq-8	599			Seq-23	631	
	Seq-9	654		mt-PCR-9	Seq-24	667	1705
mt-PCR-4	Seq-10	597	1820		Seq-25	648	
	Seq-11	551	mt-PCR-10-cyt	Seq-26	698	1396	
	Seq-12	684		Seq-27	499		
mt-PCR-5	Seq-13	600		1737		Seq-28	581
	Seq-14	608	mt-PCR-11-D-loop	Seq-29	623		
	Seq-15	641		Seq-30	635		
					Seq-31	654	

수달의 전체 mtDNA 염기서열 다중정렬은 CLUSTAL W program 을 이용하였고, Fasta format과 Nexus format 간 Data 전환은 DAMBE 와 DnaSP 4.50.3로 수행하였다. 최적의 분석 모델 설정은 MrModeltest 2.3을 수행한 후 PAUP* 4.0에서 분석하였으며, 계통수 작성은 MRBAYES 3.1과 FigTree v1.3.1을 사용하여 도식화 하였다. 국내 수달 사이의 haplotype 연관관계 분석은 parsimony consensus NJ tree method를 이용하여 계통수 작성과 분석에 이용하였다.

수달의 유전자원 보호 및 체계적인 관리를 위한 기초자료로 활용하기 위해 경남 진주 진양호 지역에 서식하는 수달의 계통유전학적 유연관계를 전체 mtDNA, Cyt b, D-loop 지역의 염

기서열분석 통하여 실시하였다. 그 결과 수달의 전체 mtDNA 서열의 길이는 16,639 bp로 나타나었으며, mtDNA 전체 39개의 영역 중에서 20개의 지역에서 단일염기다형성이 나타났으며, 3개 이상의 단일염기다형성이 나타나는 지역은 12개의 영역으로 발견 할 수 있었다. 그 중 Control region 영역 즉, D-loop 지역에서 가장 많은 8개의 단일염기다형성을 발견 할 수 있었고 이것은 한반도 경남 진주 진양호 일대에서 서식하는 수달의 경우 mtDNA 전체 염기서열 중에서 다른 지역보다 D-loop 지역에 가장 빠른 염기의 변이가 나타나는 것을 확인 하였다. 또한 전체 mtDNA 서열의 16,639 bp에서 70개의 단일염기다형을 발견 할 수 있었다(표 3-26).

표 3-26. 11마리의 수달 mitochondrial DNA 위치와 영역별 SNP

Featurea	Position		Size (bp)	SNP	Featurea	Position		Size (bp)	SNP
	From	To				From	To		
tRNA-Phe	1	69	69	0	tRNA-Lys	7813	7878	66	0
12S rRNA	70	1033	964	4	ATP 8	7880	8102	223	2
tRNA-Val	1034	1101	68	0	ATP 6	8063	8744	682	4
16S r RNA RNA	1102	2707	1606	6	CO3	8744	9528	785	1
tRNA-Leu (UUR)	2708	2783	76	0	tRNA-Gly	9529	9597	69	0
ND1	2786	3750	965	5	ND3	9598	9956	359	1
tRNA-Ile	3751	3819	69	0	tRNA-Arg (CGN)	9957	10024	68	0
tRNA-Gln	3817	3890	74	0	ND4L	10025	10321	297	0
tRNA-Met	3892	3960	69	0	ND4	10315	11692	1378	3
ND2	3961	5026	1066	6	tRNA-His	11693	11761	69	0
tRNA-Trp	5027	5095	69	1	tRNA-Ser (AGY)	11762	11823	62	0
tRNA-Ala	5105	5172	68	0	tRNA-Leu (CUN)	11824	11893	70	3
tRNA-Asn	5174	5246	73	0	ND5	11885	13716	1832	5
OriginL	5247	5282	36	0	ND6	13700	14233	534	5
tRNA-Cys	5280	5346	67	1	tRNA-Glu	14234	14302	69	0
tRNA-Tyr	5347	5414	68	2	Cyt b	14307	15456	1150	5
CO1	5416	6986	1571	6	tRNA-Thr	15457	15524	68	0
tRNA-Ser (UCN)	6984	7052	69	0	tRNA-Pro	15524	15600	77	0
tRNA-Asp	7059	7125	67	1	Control region		15601	16691	1091
CO2	7126	7809	684	2					8

수달 11 개체의 미토콘드리아 유전체 전체 염기서열 16,639 bp 이용하여 MrBays의 Markov chain Monte Carlo 분석법을 이용하여 추정한 phylogeny 분석결과 각각의 개체가 고유의 개체로 구분 되어 지는 것을 확인 할 수 있었으며 또한, 단 하나의 그룹으로 분류되어 지는 것을 확인 할 수 있었다. Posterior probability 값이 1에 가까울수록 뚜렷한 하나의 그룹으로 분류되어 지기 때문에 넓게 분류하여 본다면 Otter_6, Otter_7 개체는 posterior probability 값이 0.62로 나머지 다른 개체들과 하나의 그룹으로 분류되어 지는 것으로 판단된다. 또한 작게 분류하여 본다면 2 개체가 하나의 그룹으로 분류되어 지며 9 개체가 하나의 분류되어지는 2개의 그룹으로 분류되어 지는 것으로 확인 할 수 있다 수달 11개체의 미토콘드리아 유전체 전체 염기서열을 이용하여 Clustal W program 사용하여 수달 11개체의 haplotypes 을 찾아 haplotypes 을 이용하여 parsimonious median-joining network 분석 결과 또한 각각의 개체가 구분 되어 지는 것을 확인 할 수 있으며, Otter_6 개체의 경우 Otter_6 개체에서 다른 개체들이 분절점에서 분절되어 있는 것으로 보아 다른 개체 보다 상위에 있는 개체임을 보이며, Otter_6 개체는 Otter_9 개체와 가장 먼 유연관계를 보이고 있다 (그림 3-34).

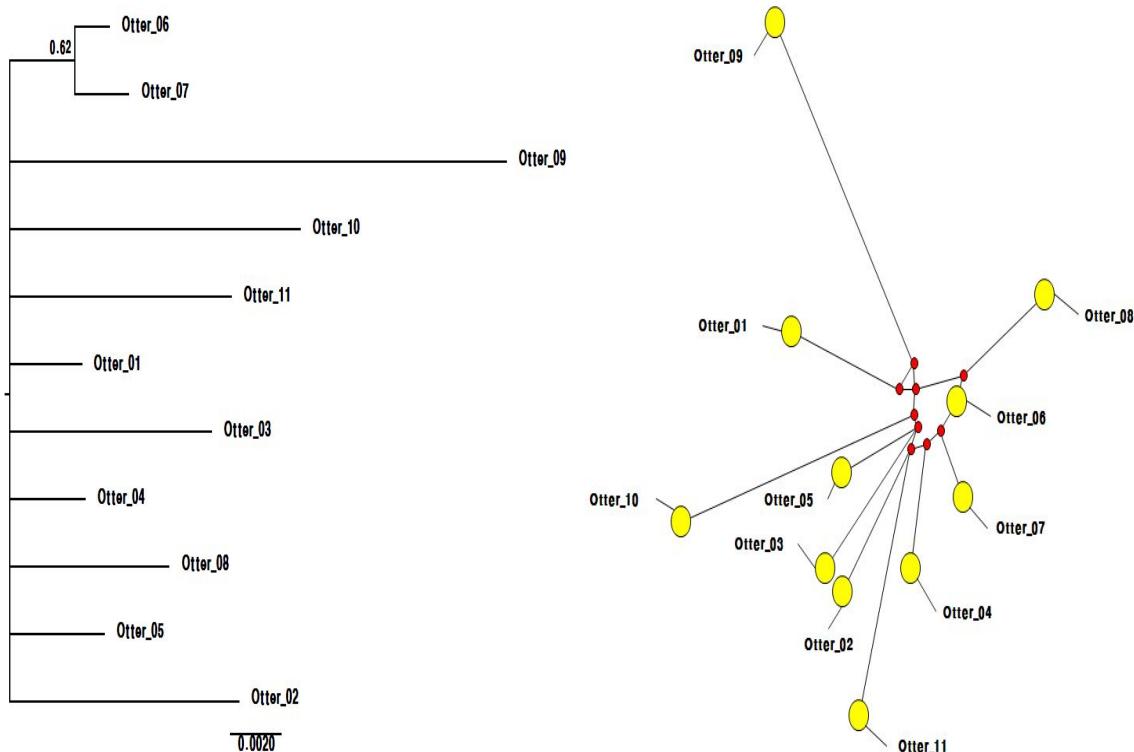


그림 3-34. 수달 전체 mtDNA 지역 변이를 이용한 개체별 및 haplotype별 유연관계 분석 결과.

수달 11 개체의 미토콘드리아 유전체의 Cyt b 영역의 염기서열 1,150 bp를 Markov chain Monte Carlo 분석법을 이용하여 추정한 phylogeny 분석결과 각각의 개체가 고유의 개체로 분류되는 것을 확인 할 수 있으며, 또한, 두 개의 그룹으로 분류되어 지는 것을 확인 할 수 있었다.

Posterior probability 값이 1에 가까울수록 뚜렷한 하나의 그룹으로 분류되어 지기 때문에 3개체 하나의 그룹으로 분류되어 지고, posterior probability 값이 0.99로 8 개체가 하나로 분류되어지는 2개의 그룹으로 분류되어 지는 것으로 확인 할 수 있다. 수달 11 개체의 미토콘드리아 유전체의 Cyt b 영역의 염기서열 이용하여 Clustal W program 사용하여 수달 11개체의 haplotypes을 찾아 haplotypes을 이용하여 parsimonious median-joining network 분석 결과 5개체 같은 haplotypes을 나타내어 하나의 집단으로 분류되어 지며, 또한 다른 개체보다 상위에 있는 개체임을 확인 할 수 있었으며, 이 5 개체의 집단은 Otter_3 개체와 다소 먼 유연관계를 나타내고 있지만 하나의 그룹으로 분류되어 지는 것을 확인 할 수 있으며, 5 개체의 집단과 3개체가 하나의 그룹으로 분류 되어 지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 5 개체 집단에서 분류되어 구분되어진 2 개체는 같은 haplotypes 을 나타내며 다시 개체 Otter_5로 구분되어 지는 하나의 그룹으로 총 2 개의 그룹으로 분류되는 것을 확인 할 수 있었다. 이 5 개체의 집단은 Otter_5 개체와 가장 먼 유연관계인 것으로 사료 되어 진다(그림 3-35).

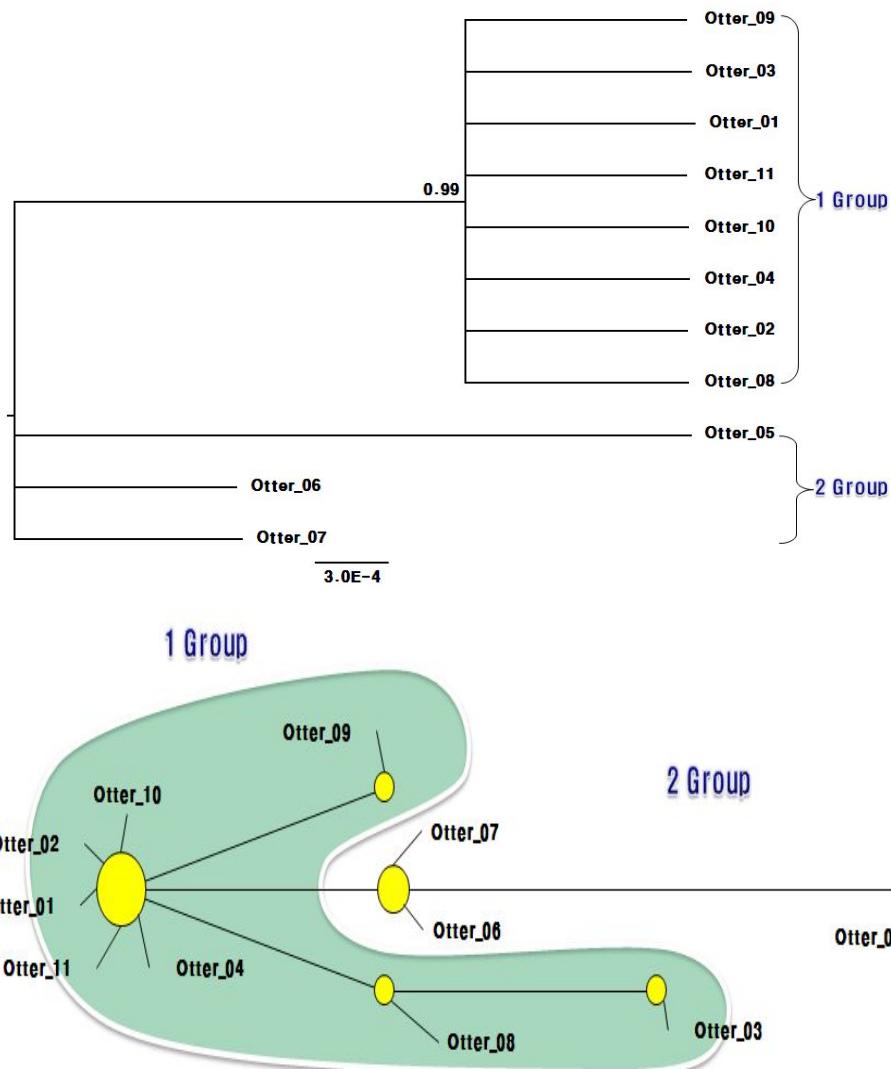
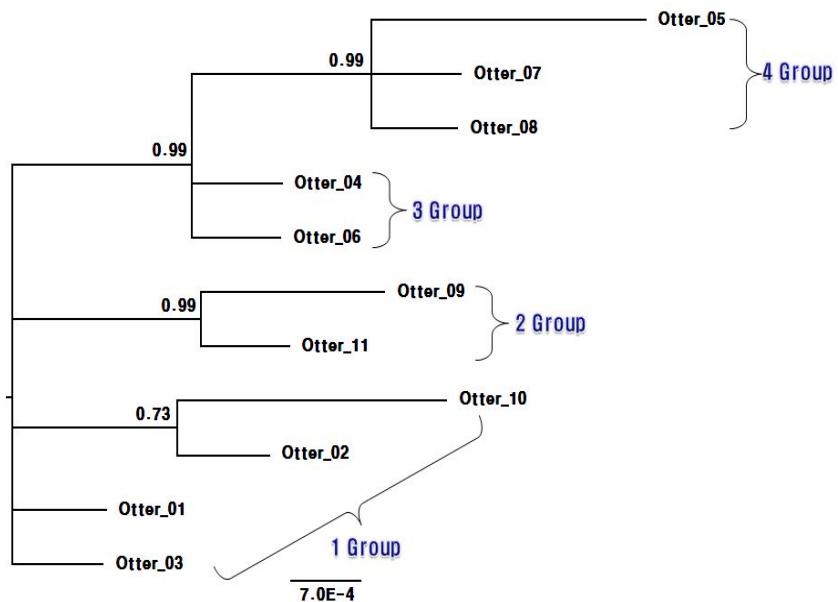


그림 3-35. 수달 전체 mtDNA cyt b 지역 변이를 이용한 개체별 및 haplotype별 유연관계 분석 결과.

수달 11 개체의 미토콘드리아 유전체의 D-loop 영역의 염기서열 1,091 bp를 MrBays의 Markov chain Monte Carlo 분석법을 이용하여 추정한 phylogeny 분석결과 각각의 개체가 고유의 개체로 분류되는 것을 확인 할 수 있으며 또한, posterior probability 값이 1에 가까울수록 뚜렷한 하나의 그룹으로 분류되어 지기 때문에 넓게 4 개체가 하나의 그룹으로 분류되어 지며, posterior probability 값이 0.99로 2 개체가 하나의 그룹으로 또한 posterior probability 값이 0.99로 나뉘는 2 개체가 또 하나의 그룹으로 분류되어 지며, posterior probability 값이 0.99로 3 개체가 하나의 그룹으로 분류되어 총 4개의 그룹으로 분류되어 지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 작게 분류하게 된다면, posterior probability 값이 0.73 으로 Otter_01, Otter_03 개체가 분류되어 지는 한 그룹과, Otter_02, Otter_10 개체가 분류되어지는 한 그룹, 총 5개의 그룹으로 분류 되어 진다. 수달 11 개체의 미토콘드리아 유전체의 D-loop 영역의 염기서열 이용하여 Clustal W program 사용하여 수달 11 개체의 haplotypes을 찾아 haplotypes을 이용하여 parsimonious median-joining network 분석 결과 Otter_03 개체의 경우 다른 개체보다 상위에 있는 것으로 판단되며 Otter_03 개체는 또한 Otter_10 개체와 다소 먼 유연관계를 나타내고 있지만 Otter_01, Otter_02, Otter_03, Otter_10 개체가 하나의 그룹으로 분류되어지고, Otter_03 개체에서 나뉘어져 Otter_09, Otter_11 개체가 하나의 그룹으로 나뉘며, Otter_06, Otter_04 개체로 나뉘지는 하나의 그룹으로 분류 할 수 있으며, Otter_06 개체에서 나뉘어져 분절되어 Otter_05, Otter_07, Otter_08 개체의 그룹으로 분류되어지는 총 4개의 그룹으로 분류되어 진다. 또한 Otter_07, Otter_08 개체는 같은 haplotypes을 가진다(그림 3-36).



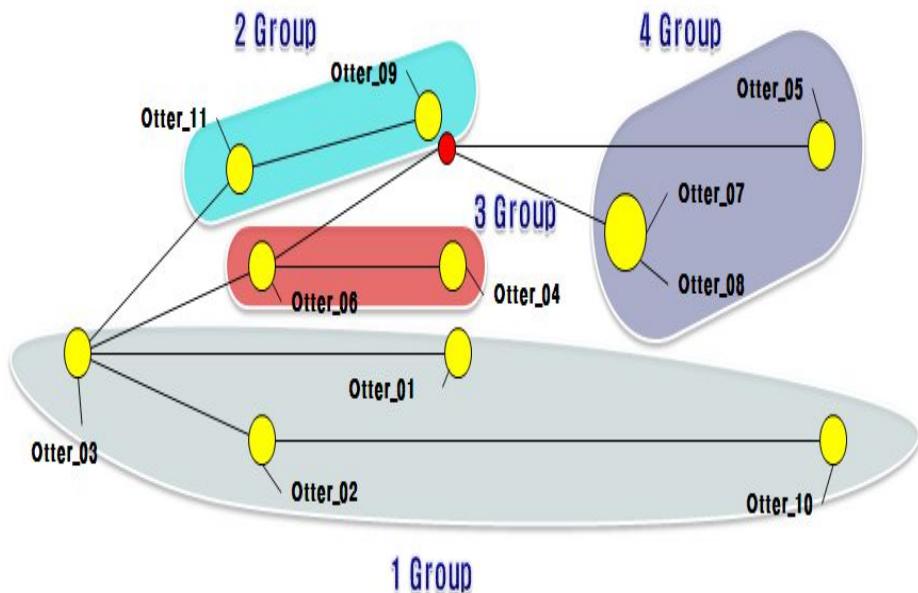


그림 3-36. 수달 전체 mtDNA D-loop 지역 변이를 이용한 개체별 및 haplotype별 유연관계 분석 결과

이상으로 보아 한반도의 경남 진주 진양호 일대에 서식하는 수달의 경우 전체로 보았을 때 한 그룹으로 분류되어 지는 것을 확인 할 수 있으며 진양호가 만들어지면서 30-40년 이상의 고립으로 인해 최소 4개의 그룹으로 분류 되어 지는 것을 확인 하였으며, mtDNA D-loop 지역에서 가장 많은 단일염기다형성을 발견 하였다. 또한 이는 2004년 Cho *et al.* 이 연구한 한반도 야생멧돼지 결과와 비교해보면 한반도 야생멧돼지의 경우 9마리의 mtDNA D-loop 영역 중 일부인 477 bp를 분석한 결과 10개의 단일염기다형성을 관찰되어 본 연구에서 사용한 공시동물의 개체 수 보다 적은 공시동물과 짧은 D-loop 영역의 염기서열을 분석한 결과 임에도 불구하고 수달보다 다양한 단일염기다형성이 관찰 되었다는 것은 한반도 경남 진주 진양호 일대에 서식하는 수달이 다른 야생 동물에 비해 유전적 다양성은 낮고, 서식하는 개체의 수가 적다는 것으로 사료되어 진다. 좀 더 정확한 검증을 위해서는 수달의 full mtDNA 분석의 개체 수를 늘리고 전국 단위의 수달 시료를 확보하여 유전적 유연관계 분석을 실시한다면 한국 내 수달의 보전 및 보호에 도움이 될 것으로 사료되어 진다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표의 달성도

구분	연구개발 달성내용
1차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none">○ 가축/반려/멸종위기동물 유전자원 확보 여부○ 돼지 MS 식별을 위한 마커의 활용성 검증○ 돼지 MS Allelic ladder 개발○ 말 MS 마커 선발 및 다형성분석○ 닭 MS 마커 선발 및 다형성분석○ 수달에 적용 가능한 MS 마커 선발 및 다형성분석
2차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none">○ 돼지 친자감별용 DNA 마커 효율성 비교 및 현장 적용 검증○ 돼지 개체식별용 MS 키트 제품화○ 수달 개체식별을 위한 mtDNA D-loop 지역 분석 및○ 수달 성(性) 감별 마커 개발○ 말 개체식별용 MS 키트 개발○ 오리 개체식별용 MS 마커 선발 및 다형성 분석
3차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none">○ 국내 수달 whole mtDNA 분석○ 말 개체식별키트 표준화를 위한 도구 개발○ 오리 개체식별용 MS 키트 개발○ 오리 개체식별키트 표준화를 위한 도구 개발○ 종 식별 마커 선발 및 키트 개발○ 혼입육 정성/정량확인 체계 및 키트 개발
최종	<ul style="list-style-type: none">○ 주요 가축(돼지, 닭, 오리)용 DNA 감식용 마커 선발의 적정성과 진단키트의 실용화 및 표준화○ 반려동물인 말의 DNA 감식용 마커 선발의 적정성과 진단키트의 실용화 및 표준화○ 희귀동물인 수달의 DNA 감식용 마커 선발의 적정성과 진단키트의 실용화 및 표준화○ 주요 축종에 대한 종식별 마커의 개발 및 실용화○ 혼입육 상태에서의 종식별 및 정량적 확인 기술 개발 및 실용화

2. 정량적 연구개발 성과

가. 논문성과

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	돼지 브랜드 식별 및 원산지 추적에 활용 가능한 Microsatellite Marker Set의 확립	임현태	전진태	서보영 정은지 유채경 종타오 조인철 윤두학 이정규	한국동물자원과학회	51(3) 201-206	국내	비SCI
2011	3원교감 비육돈 집단에 대한 이력추적용 13 microsatellite marker의 판별효율 및 혈연관계 추정효율 실증 연구	임현태	전진태	김병우 조인철 유채경 박문성 박희복 이재봉 이정규	한국동물자원과학회	53(1) 1-10	국내	비SCI
2011	경남지역 수달(<i>Lutra lutra</i>)의 mitochondrial DNA D-loop지역과 microsatellite marker를 이용한 계통유전학적 유연관계 분석	박문성	전진태	임현태 오기철 문영록 김종갑	한국생명과학회	Publish	국내	비SCI

나. 특허성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2010	국내 서식 수달(<i>Lutra lutra</i>)의 개체식별을 위한 마이크로세틀라이트 마커 및 이를 이용한 개체식별 방법	경상대 산학협력단	대한민국	10-2010-0011405
2011	멀티플렉스 PCR을 이용한 말의 개체식별 방법	(주)젠틱스	대한민국	10-2011-0015737
2012	멀티플렉스 PCR을 이용한 오리의 개체식별 방법	(주)젠틱스	대한민국	10-2012-0035226
2012	CytB 유전자 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 혼합육 식별용 조성물	(주)젠틱스	대한민국	10-2012-0035233

다. 연구성과 활용

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	5			1	

3. 연구개발 결과의 관련분야에의 기여도

본 연구과제는 주요 가축, 반려 및 멸종위기동물에 대한 개체식별 및 종식별 마커의 개발과 이들을 상용화하고자 실시하였다. DNA 검사를 활용한 개체식별 기술이 농축산물의 이력관리에 성공적으로 적용된 예로는 쇠고기이력관리 시스템을 들 수 있으며, 이 제도가 성공적으로 정착함에 있어서 DNA의 대립유전자 분석을 통한 개체식별 기술이 핵심적이고 필수적인 역할을 수행하고 있다. 이러한 선례가 있기 때문에 본 과제에서 개발된 다양한 기술들은 향후 현재 시범사업이 진행 중인 돼지고기이력관리 시스템 등에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단하며, 비약적으로 관련 산업이 발전하고 있는 말과 오리 개체식별기술 또한 산업의 발전을 보조하는 필수적인 수단이 될 수 있을 것으로 기대한다.

또한 멸종희귀동물인 수달의 식별 기술 및 mtDNA 분석 결과는 전방위적 산업에 대한 파급력은 약하겠지만 생태환경 연구 및 기초연구 분야 그리고 멸종위기동물의 기초연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되면 가축을 대상으로 개발한 종 식별을 위한 기술들은 축산물을 활용한 2차, 3차 가공식품의 안정성 확인 등을 통해 소비자의 신뢰도를 향상 시킬 수 있는 장치로 활용이 가능해 관련 산업분야에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단한다.

상기와 같은 이유로 본 연구과제의 결과물들은 여러 DNA 마커들을 활용하는 새로운 산업으로의 확대를 촉진시키는 계기가 될 것이라 기대한다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 개발기술의 실용화 및 산업화 계획

- 본 과제를 통하여 개발된 DNA 분석 키트 및 마커들은 가축(돼지, 닭, 오리, 종 판별, 혼합육 판별), 반려동물(말), 멸종위기동물(수달)을 대상으로 다양성을 갖추고 있어 다양한 연구분야의 연구자의 환경에 맞도록 공급할 수 있는 여러 형태의 제품으로 확장해 나가고자 함.
- 주요가축 개체식별 키트들은 국가 연구기관 및 육류생산 브랜드에 직접적으로 판매가 될 수 있을 것으로 예상되며, 소규모 유통업체, 지자체등을 대상으로 자체적으로 키트를 이용하여 분석 서비스도 가능함.
- 또한 반려동물인 말의 개체식별키트는 향후 마사회 및 지역의 경마장과 연계하여 혈통 확인 및 말에 관한 연구분야에 활용될 수 있도록 준비할 계획임.
- 원산지 정보를 이용한 개체추적 시스템을 통해 가축 질병의 확산과 방역 위생 산업에 활용 가능
- 국내산 축산물 중 혼합육으로 제조된 축산물의 진위 여부 판별이 가능하여 단속기관 및 업체에 기술이전 및 키트 판매 가능
- 다양한 축종의 사양 관리등을 위한 국가기관, 지자체기관등에 키트 판매 및 서비스 확대
- 수달 관련 연구자와 연구기관 등에 기술이전 및 기술교육 실시 가능

2. 특허 및 논문 등 지적재산권 확보 계획

- 본 연구과제 성과인 닭, 오리, 수달 등을 대상으로 개발된 DNA 마커는 개체식별 및 유전학적 분석을 위해 국내 최초 또는 분석 효율성이 높은 방법으로 키트화 및 개발되어 있어 특허를 통한 지적재산권 확보에는 어려움이 없을 것으로 판단되고 현재 특허 출원이 3건 완료 되었고 앞으로 추가적으로 특허 출원을 진행할 계획임.
- 종 특이 마커를 이용하여 법의학적으로 종을 구분하는 분야는 비교적 많은 논문이 나와 있지만 대부분 노동력이 많이 들고 국내의 경우는 표준화가 되어있지 않은 방법을 사용하고 있어 본 연구에서 개발된 형광물질을 이용하는 방법과 자동전기영동장치를 사용할 수 있는 분석 방법으로 개발되어 특허출원 및 지적재산권 확보 가능할 것으로 판단됨.
- DNA 마커를 이용한 논문의 경우 현재 해외 보고된 논문 분석결과 다양하고 표준화된 DNA마커들을 제시하고 있고, 이미 상당한 현장 테스트를 통한 결과를 기초로 만들어지고 있어 본 연구를 통해 개발된 DNA 마커들을 현장 테스트를 실시하여 충분한 자료를 확보한다면 우수한 논문을 보고할 수 있을 것으로 판단되면 앞으로 지속적으로 본 연구과제를 통해 만들어진 성과들을 보고할 계획임.

3. DNA 분석 키트를 이용한 관련 산업 활용 계획

- 국내 및 국외시장의 경우 DNA 마커를 이용하여 동물 개체식별을 활용하는 시스템이나 서비스는 비교적 많이 활성화되고 있지만, 그와 관련된 제품은 매우 적은 상황으로 본 연구에서 개발된 키트들의 시장성은 매우 좋을 것으로 판단되고 가축의 이력추적 시스템이나 개량 및 혈통 분석 등에 적극 활용될 수 있도록 관련 연구기관 및 산업체와 연계하여 적극 활용할 계획임.
- 멸종위기동물(수달)에 관한 연구 결과는 종의 보존 및 보호를 위한 혈통 분석 및 계통유전학적 분석의 기초자료 활용될 수 있으며, 이러한 자료들이 현장에서 활용 될 수 있도록 관련 연구기관들과 정보 공유 및 기술이전을 통해 기초연구에 활용할 계획임.
- 종 판별 및 혼합육 판별 키트는 축산물 중 혼합육으로 제조된 축산물의 진위 여부를 효율적으로 판별할 수 있는 기술로 개발되어 제조과정 단속을 통한 소비자 신뢰도 향상에 직접적인 효과를 얻을 수 있어 관련 단속기관에 기술이전을 통한 활용 방법을 계획하고 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

MS marker는 포유류의 염색체 평균 100,000개 이상 존재하고, 생물체의 전 염색체에 고르게 분포하고 있으며, 사람의 경우 di-nucleotide repeat은 140,000개, tetra-nucleotide repeat은 105,000개로 보고되어 있다(IHGSC, 2001). DNA marker를 이용한 개체식별 및 친자감별에 관해 국외의 경우 2007년 Rohrer 등은 Landrace 42두, Duroc 40두, Yorkshire 35두, Hampshire 28두 총 145두를 대상으로 60종의 SNP marker를 이용하여 4.55×10^{-23} 의 동일개체 출현확률값과 0.999982의 친자감별력을 10종의 MS marker를 이용하여 5.41×10^{-13} 의 동일개체 출현확률값과 0.999964의 친자감별력을 추정하였으며, 2010년 Hara 등은 일본 흑우 집단을 대상으로 44종의 SNP marker를 선발해 2.73×10^{-12} 의 동일개체 출현확률값을 추정하였고 친자감별 검증을 하였다. 2010년 김 등이 51종의 SNP marker를 이용해 비육돈 생산에 이용된 F₀, F₁ 그리고 F₂ 총 437두를 대상으로 무작위교배집단으로 가정하여 5.63×10^{-33} 의 동일개체 출현확률 추정치를 발표하였다.

외국의 가축 개체식별 관련 유전자분석 체계는

- 일본의 경우 지역단위의 브랜드 주체를 중심으로 개체의 동일성 분석 기법을 채택하여 안전성 확보를 위한 수단으로 추진하고 국가차원에서 원산지 추적 검증을 위해 화우를 대상으로 유전자감식 방법을 채택하여 활용중이며 기존의 가축 혈통 검증 체계에서 기능을 확장하여 국가 분석 센터로 활용해 원산지 추적과 관련된 제도 및 시스템 운영 전반을 국가가 직접 관리하고 있음.
- 미국의 경우 젖소와 육우 종축을 대상으로 혈통 정확도 검증 실시하고 있으며 분석 기관으로 미국 내 4개 대학이 지정되어 분석결과를 축종별 품종 등록 협회에 전송하고 종축의 혈통 기록 등을 D/B로 관리해 개체별로 발행되는 혈통부에 기재되어 종축의 진위 확인 및 기초 정보로 활용하고 있다 또한 광우병 파동의 영향으로 감염 가축의 생산단계 역추적을 위한 시스템 보완을 위해 RF-ID 기법 및 유전자감식 기법을 구축 중에 있음.
- 유럽의 경우 국가주도로 이미 생산단계의 생축 및 소고기 물류 단계까지의 meat moving chain에 대한 추적 시스템이 구축되어 방역, 개량, 위생적 통합 시스템을 운영 중이며, 원산지 추적에 대한 최종 검증체계의 보완을 위해 DNA 감식 기법을 체계화하고 개체식별, 친자 확인 및 도체 및 생체간의 동일성검정 등과 관련된 분석기법의 표준화 및 체계화를 위한 연구를 진행하고 있음.
- 호주의 경우 이력추적제도는 모든 소에 대하여 개체식별번호가 표시된 귀표를 장착하여 생산에서 도축, 그리고 가공까지 이동사항을 신고 관리하며 소의 이동시 농가는 소의 개체정보

가 수록된 출하자증명서(NVD)를 발급(매도자) 및 보관(매수장)하고, 이동정보는 인터넷(NLIS)을 통해 신고하는 제도가 정착되어 있음.

수달(*Lutra lutra*)은 환경부 지정 멸종위기야생동물 I 급, 천연기념물 제330호, 세계자연보전연맹(International Union for the Conservation of Nature, IUCN) 적색목록 취약종, 멸종위기에 처한 야생동식물종의 국제거래에 관한 협약(Convention on International Trade in Endangered Species of wild fauna and flora, CITES) 부속서 I에 등재된 국제적 멸종위기 종으로서 식육목 족제비과 수달아과로 분류되는 동물로 세계적으로 총 13종으로 분류되며, 그 중 국내에 서식하는 수달은 유라시아 수달(*Lutra lutra*) 1종으로, 내륙지역 수 생태계 먹이사슬의 최상위층에 해당하고, 하천생태계의 건강도를 나타내는 지표종으로 중요한 위치에 있다. 국외의 경우 수달에 대한 다양한 복원계획이 이루어지고 있는데, 영국에서는 20년 이상의 과학적인 복원노력의 결과 현재 각 지역 개체군의 크기가 안정적이거나 증가하는 추세에 있으며(Jessop. R. M. 1993.), 지중해 연안의 스페인, 포르투갈, 그리스 등지에서도 지속적인 복원 노력을 통해 안정적인 개체군을 유지하고 있다고 보고되어 있다(Mason, C. F. and S. M. McDonald. 1986.)

제 7 장 참고문헌

- Cho, I. C. 2004. Phylogenetic analysis based on porcine mitochondrial DNA and melanocortin receptor 1 gene: Focusing on Korean Native Pig in Jeju province and Korean Wild Boar. Ph. D Thesis. Gyeongsang National University, Gyeongnam Jinju. Korea
- Gil-Jae Cho, Yong-Jin Yang, Han-Seok Kang and Byung-Wook Cho. 2002, Genetic Diversity and Validation of Microsatellite Markers for Jeju Native Horse Parentage Testing. Korean J. Genetics24(4) : 359–365.
- Hara, K., Watanabe, S., Mukai, H. and Mannen, H. 2010. Development of SNP markers for individual identification and parentage test in a Japanese Black cattle population. J. Anim. Sci. 81:152–157.
- IHGSC(International Human Genome Sequencing Consortium). 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409:860–921.
- Jessop. R. M. 1993. The re-introduction of the European otter, *Lutra Lutra* into lowland England carried out by the otter trust ,pp. 1983–92 : a progress report. inproceeding of the national otter conference(ed.Morris, P. A), the Mammal Society.
- Ji-Hye Jung, Mi-Rang Lee, Tae-Yong Ha, Seon-Ku Kim, Teak-Soon Shin, Han-Seok Kang, Hong-Gu Lee, Gil-Jae Cho, Kyung-Do Park and Byung-Wook Cho, 2009. Assessment of Genetic Diversity of Horse Breeds Using Microsatellite Makers. Journal of Life Science. Vol. 19. No. 2. 169–173
- José ARANGUREN-MÉNDEZ, Jordi JORDANA, Mariano GOMEZ, 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. Genet. Sel. Evol. 33 : 433–442
- Kim, S. W., Li, X., Lee, Y. M., Kim, J. J., Kim T. H., Choi, B. W. and Kim, K. S. 2010. Development of SNP markers for domestic pork traceability. J. Anim. Sci. & Technol. (Kor.) 52(2):91–96.

Mason, C. F. and S. M. McDonald. 1986. Otter: Ecology and Conservation. Cambridge University Press.

Rohrer, G. A., Freking, B. A. and Nonneman, D. 2007. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. Anim. Genet. 38:253–258.

농림수산 식품부. 2008. 농림수산 식품 통계연보

(별첨)

축종별 mitochondria DNA cytochrome B (cytB) region 염기서열

(1) Canis lupus

ATGACCAACATTGAAAAACCCACCCACTAGCCAAATTGTTAATAACTCATTGACCTCCCAGCGCCGTCTAACATCTGCTTGT
GGAACCTCGGATCCTTACTAGGAGTATGCTTGATTCTACAGATTCTAACAGGTTATTCTTAGCTATGCACACTACATCGGACACAGGCCAC
AGCTTTTCATCAGTCACCCACATCTGCCAGACGTTAATCAGCTGAATTATCCGCTATATGCACGAAATGGCGCTTCCATATTCTT
ATCTGCCATTCTCATGTAGGACGAGGCCATATTACGGATCCTATGTATTCTAGAAACATGAAACATTGGAATTGTAATATTCTG
GCAACCATAGGCCACAGCATTGAGGACAAATATCATTGAGGAGCAACTGTAATCAACTTCTCTG
CCATCCCTATATCGGAACCTGACTTAGAATGGATCTGAGGCCCTCTCAGTGGACAAAGCAACCTAACACGATTCTTGATTCCA
TTTCATCCTCCCTTCATCGCAGCTCTAGCAATAGTACACCTCTATTCTACACGAAACGGATCCAACAACCTTCAGGAATCACAT
CAGACTCAGACAAAATTCCATTTCACCCCTACTACACAATCAAGGATATCCTAGGAGCCTACTCCTACTCCTAACCTAACATCACTAGT
TTTATTTCACCTGACCTATTAGGAGACCCAGATAACTACACCCCTGCAAACCCCCCTAAACACCCCTCACATATTAAACCTGAGTGTAT
TTCTATTGCGCTATGCTATCCTACGATCATTCTAAATAATTAGGAGGTGTACTCGCCCTAGTATTCTCCATCCTAACATCTTGCATTCA
TTCCACTCCTCCACACATCTAACGCAACGCGACATAATATTCCGGCCCTTAGCCAATGCCTATTCTGACTTTAGTCGCCGATCTCTCACT
TTAACATGAATTGGAGGACAACCAAGCTGAGCACCCCTTCATCATTATCGGACAAGTCGCTCAATCTTATATTCAACATCTTATTGATCC
TAATACCAACAGTTAGCGTTATGAAAACACCTTCTAAAATGAAGA

(2) Bos taurus

ATGACTAACATTGAAAAGTCCCACCCACTAATAAAATTGTAACAAATGCATTGACCTTCCAGCCCCATCAAACATTCTCATGAT
GAAATTTCGGTCCCTGGAAATCTGCTTAATCCTACAAATCCTCACAGGCCATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACA
GCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCAGACGTGAACCTACGGCTGAATCATCGATACATACCGAAACGGAGCTCAATGTTTTA
TCTGCTTATATATGCACGTAGGACGAGGCCCTATATTACGGCTTACACTTTCTAGAAACATGAAATATTGGAGTAATCTCTGCTCA
CAGTAATAGCCACAGCATTATAGGATACGCTTACCATGAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTCATCACCAACCTTATCAGC
AAATCCCATACATCGGACAAATTAGTCGAATGAATCTGAGGCGATTCTCAGTAGACAAGCAACCCCTACCGATTCTCGTTCCAT
TTTATCTCCATTATCATAGCAATTGCCATAGTCCACCTACTATTCCCTACGAAACAGGCTCCAACAACCCAACAGGAATTCC
CAGACGTAGACAAAATCCATTCCACCCCTACTATACCATTAAGGACATCTTAGGGGCCCTTACTAATTCTAGCTTAATACTACTAGT
ACTATTGCAACCCGACCTCTCGAGACCCAGATAACTACACCCAGCCAATCCACTCAACACACCCCTCACATCAAACCCGAGTGATACT
TCTTATTTGCAACGCAATCTACGATCAATCCCAACAAACTAGGAGGAGTACTAGCCCTAGCCTCTATCCTAACATTCTGCTCAAT
CCCCCTACTACACACCTCAAACAGAAGCATAATATTCCGACCACTCAGCCAATGCCTATTCTGAGCCTAGTAGCAGACCTATTGACAC
TCACATGAATTGGAGGACAACCAAGCTGAAACACCCATATACCCATGGACAACTAGCATCTGCTTACATTCTCCATCCTAGTGCT
AATACCAACGGCCGGACAATCGAAAACAAATTACTAAAATGAAGA

(3) Sus scrofa

ATGACCAACATCGAAAATCACACCCACTAATAAAATTATCAACAAACGCATTGACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATGAT
GAAACTCGGTTCCCTTCTAGGCATCTGCTTAATCTGCAAATCCTAACAGGCCGTTCTAGCAATACATTACACATCAGACACA
AGCTTTCTCATCAGTTACACACATTGCGAGACGTTAACATTACGGATGAGTTATTCTGCTATCTACATGCAAACGGAGCATCCATATTCTT
ATTCGCTATTCTACCGTAGGCCGAGGTCTATACTACGGATCCTATATATTCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCTACTATT
CCGTTATAGCAACAGCCTCATAGGCTACGCTCTGCCGTAGGACAAATATCATTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGC
TATCCCTTATATCGGAACAGACCTCGTAGAATGAATCTGAGGGGCTTCTCGTAGCAAACAGCAACCCCTCACGATTCTGCCCTCACT
TTATCCTGCCATTCTACATTACGCCCTCGCAGCGTACATCTCTATTCTGACGAAACGGATCCAACAACCCCTACCGGAATCTCATCA
GACATAGACAAAATTCCATTCCACCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGAGCCTATTATAACTAATCTACTAACCTTGT
CTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACACTACACCCAGCAAACCCACTAAACACCCACCCATATTAAACCGAGATGATATT
CTTATTCGCTACCGCTATTCTACGTTCAATTCTAACAAACTAGGTGGAGTGTGGCCCTAGTAGCCTCCATCCTAACCTAACATT
CCCCCTACTACACACATCCAAACAGAAGCATAATATTGACCAACTAAGTCATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTATTACAC
TAACATGAATTGGAGGACAACCGTAGAACACCCGTTACATCATCGGCAACTAGCCTCCATCTTACTATTCTAACATTCTAGTATT
GATACCAATCACTAGCATCATGAAAACAACCTATTAAAATGAAGA

(4) *Gallus gallus*

ATGGCACCAACATTCGAAAATCCCACCCCTACTAAAAATAATTAAACAACCTCCAATCGACCTCCAGCCCCATCCAACATCTCTGCTTG
ATGAAATTTCGGCTCCCTATTAGCAGTCTGCCATGACCAAATCCTCACCGGCCTACTACTAGCCATGCACACAGCAGACACATCCC
TAGCCTCTCCTCCGTAGCCCACACTTGCGGAACGTACAATACGGCTGACTCATCCGAATCTCCACGAAACGGGCCTCATTCTCTTC
ATCTGTATCTTCCTCACATCGGACGAGGCCTATACTACGGCTCTACCTCTACAAGGAAACCTGAAACACAGGAGTAATCCTCCCTCAC
ACTCATAGCCACCGCCTTGTGGCTATGTTCTCCATGGGCCAATATCATTCTGAGGGCCACCGTTATCACAAACCTATTCTCAGCAA
TTCCCTACATTGGACACACCCTAGTAGAGTGAGGCTGAGGGGGATTTCACTGACAACCCACCCCTACCGATTCTCGCTTACACTTC
CTCCTCCCTTGAATCGCAGGTATTACTATCATCCACCTCACCTCTACACGAATCAGGCTCAAACAACCCCTAGGCATCTCATCCGA
CTCTGACAAAATTCATTCACCCATACTACTCCTCAAAGACATTCTGGCTTAACCTCTACACCCATTCTAACACTAGCCCTAT
TCTCCCCAACCTCTAGGAGACCCAGAAAACCTCACCCAGCAACCCACTAGTAACCCCCACATATCAAACCAGAATGATATTCTA
TCGCCTATGCCATCCTACGCTCCATCCCCAACAAACTTGGAGGTGACTAGCCCTAGCAGCCTCAGTCATCTCTCTAATCCCTTC
CTCCACAAATCTAAACAACGAACAATAACCTCCGACCACTCTCCAAACCTATTCTGACTCTAGTAGCCAACCTCTTATCTAACCTG
AATCGGAAGCCAACCACTAGAACACCCCTCATCATCATTGCCAATAGCATCCCTCTTACTTCACCATCCTACTTATCCTCTCCCA
CAATCGGAACACTAGAAAACAAACTCAACTACTAA

(5) *Equus caballus*

ATGACAAACATCCGAAATCTACCCACTAATTAAAATCATCAATCACTCTTTATTGACCTACCAGCCCCCTCAAACATTTCATCATGAT
GAAACTTCGGCTCCCTCTAGGAATCTGCTTAATCCTCAAATCTAACAGGCTATTCTAGCCATACACTACACATCAGACACGACA
GCCTTCTCATCCGTCACTCACATCTGCCAGACGTTAACTACGGATGAATTATTCGCTACCTCATGCCAACGGAGCATCAATATTTTA
TCTGCCTCTTCATTACGTAGGACGCGGCCTACTACGGCTCTTACACATTCTAGAGACATGAAACATTGGAATCATCCTACTTTCA
AGTTATAGCTACAGCATTCTACGGCTATGCTCTACCATGAGGCCAATATCCTTTGAGGAGCAACAGTCATCAGAACCTCTATCAGCA
ATTCCCTACATCGTACTACCCCTGCGAGTGAATCTGAGGTGGATTCTCAGTAGACAAAGCCACCCCTACCGATTGGCTTCCACTT
CATCCTACCCCTCATCATCACAGCCCTGGTAGTCGTACATTACTATTCTCACGAAACAGGATCTAAACCCCTCAGGAATCCCATCCG
ATATGGACAAAATCCACCCATATTACAAATTAAAGACATCCTAGGACTCCTCCCTGATCTTGCCTACTAACTCTAGTATT
ATTCTCCCCGACCTCTAGGAGACCCAGACAACACTACCCCCAGCTAACCCCTCTCAGCACTCCCCCTCATTTAACCCAGAATGGTACTTCC
TGTTTGCCTACGCCATCCTACGCTCCATTCCAACAAACTAGGCGCGTATTAGCCCTAACCTCTCCATCCTGATCCTAGCACTCATCCCC
ACCCCTCACATATCAAACACGAAGCATAATATTCCGGCTCTCAGCAATGCGTATTCTGACTCTAGTGGCAGACTTACTGACACTAA
CATGAATCGCGGAGGCCAGTGGAACACCCATACGTAATTATGCCCAACTGCCCAATCCTACTTCTCCATTCTCATTTTAT
ACCACTCGCAAGCACCCTGAAAACAAATCTCTAAATGAAGA

(6) *Anas platyrhynchos*

ATGGCCCCAACATCCGCAAATCCCACCCCTACTAAAAATAATCAACAACCTCCAATCGACCTCCCGACCCCTCTAATATCTCTGCTG
ATGAAACTTCGGATCTGCTGCCATCTGCCATGGCCACACAAATCTCACAGGCCCTCTACTGGCTATGACTACACCGCAGACACATCCC
TTGCTTCTCTCAGTAGCCAACACATGCCAACGTTCAATATGGCTGACTCATCGCAACCTCACGCAATGGGCCCTATTCTCTTC
ATCTGCATCTACCTGCACATCGGACGAGGCTCTACTACGGCTCTACCTGTATAAGGAAACCTGAAATACAGGAGTAATCCTACTGCTCA
CTCTTATAGCAACTGCCCTCGTAGGTTATGCTGCCATGAGGACAATATCGTTCTGAGGAGCTACCGTAATTACCAACTTATTTCA
CCTCCCATACATCGGACAGACCCCTGGTAGAATGAGCCTGAGGAGGATTCTCAGTGGATAACCCAAACCTAACCGATTCTCGCCATTCA
TCCTACTACCCCTTTAATCGAGGAATCACCCCTAGTCCACTTAACCTCTACACGAATCAGGCTCAAACAACCCCTAGGTCTGTATCA
GACTGTGACAAAATCCCATTCCACCCCTACTCTCTTTAAGGACATCCTAGGATTATCCTCATGCTTACCCCTCATAGCACTAGCCCT
ATTCTCACCTAACCTCTAGGGGACCCAGAAAACCTCACCCCGCAAACCCCTAGTAACCCACACATTAACCCAGAATGATACTTCC
TATTGCCCTACGCCATCCTCGGGTCAATCCAACAAACTAGGAGGCCTCTAGCACTAGCCGCTCCGCTTAATCTTATTCTGGTCCCT
TCCTCCACAAATCAAACAGAACATAAACATTCCGGCGCTCTCCAACTCTTATTCTGAACACTAGTGGCCAACCTCTCGCTCTAAC
TGAGTGGGAAGCCAACCTGTGCGAACACCCATTCACTCATCGGGCAACTCGCATCAATTACTTACCCATCCTCTTATTCTGGTCCCT
TGCGTAAGGCCCTAGAAAACAAATGCTTAACTGCTAA

주 의

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