Polymorphisms and Allele Distribution of Novel Indel Markers in Jeju Black Cattle, Hanwoo and Imported Cattle Breeds

Sang-Hyun Han^{1,2}, Jae-Hwan Kim³, In-Cheol Cho¹, Sang-Rae Cho¹, Won-Mo Cho¹, Sang-Geum Kim¹, Yoo-Kyung Kim¹, Yong-Jun Kang^{1,5}, Yong-Sang Park¹, Young-Hoon Kim⁴, Se-Phil Park^{2,5}, Eun-Young Kim², Sung-Soo Lee^{6*} and Moon-Suck Ko^{1*}

¹Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

²Mirae Biotech. Co./Jeju National University Stem Cell Research Center, Seoul 143-854, Korea

³Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

⁴Institute for Livestock Promotion, Jeju-do, Jeju 690-802, Korea

⁵Department of Animal Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

⁶Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

Received October 17, 2012 / Revised December 20, 2012 / Accepted December 20, 2012

The aim of this study was to screen the polymorphisms and distribution of each genotype of insertion/deletion (indel) markers which were found in a preliminary comparative study of bovine genomic sequence databases. Comparative bioinformatic analyses were first performed between the nucleotide sequences of Bovine Genome Project and those of expressed sequence tag (EST) database, and a total of fifty-one species of indel markers were screened. Of these, forty-two indel markers were evaluated, and nine informative indel markers were ultimately selected for population analysis. Nucleotide sequences of each marker were re-sequenced and their polymorphic patterns were typed in six cattle breeds: Holstein, Angus, Charolais, Hereford, and two Korean native cattle breeds (Hanwoo and Jeju Black cattle). Cattle breeds tested in this study showed polymorphic patterns in eight indel markers but not in the Indel-15 marker in Charolais and Holstein. The results of analysis for Jeju Black cattle (JBC) population indicated an observed heterozygosity (Ho) that was highest in HW_G1 (0.600) and the lowest in Indel_29 (0.274). The PIC value was the highest in HW_G4 (0.373) and lowest in Indel_6 (0.305). These polymorphic indel markers will be useful in supplying genetic information for parentage tests and traceability and to develop a molecular breeding system for improvement of animal production in cattle breeds as well as in the JBC population.

Key words : Indel marker, polymorphism, genotype, cattle, Jeju black cattle

서 론

과거부터 혈액형이나 혈액단백질의 동위효소에 대한 정보 뿐만 아니라 최근에는 법의학적 검증에서 DNA 분석기법, 특히 초위성체(microsatellite marker, MS) DNA 표지인자의 반복양상에 따른 유전자형 자료를 기반으로 가축 품종들의 유연관계, 혈통 증명, 집단 식별 및 개체추적과 친자확인 등에 광범

위하게 이용되고 있다[1,6,13,16,23,24]. 또한 한우의 황모색, 제주흑우의 흑모색 등 품종 특이적 특성을 반영하는 유전자의 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP)와 부계(Y 염색체)나 모계(mtDNA) 유전을 통해 자손으로 전달되는 유전자의 다형성들은 검증 대상에서 특이적으로 중요한 정보의 보유여부를 판독할 수 있는 자료로써 활용 가능성이 제기되었다[18-20,34-35].

현재 우리나라에서 적용되고 있는 한우의 생산이력추적제나 품종식별 역시 이들 유전자 표지인자의 다형성을 근거로 적용되고 있다. Lim 등[22]은 한우 생산이력추적제용 MS체계에서 marker의 구성에 따라 집단의 정보력에 차이가 있어 적정 집단의 다양성 정보를 보다 효율적으로 분석할 수 있는 체계의 구축을 제안한 바 있다. Han 등[11]의 수정란이식과 인공수정 후손을 추적한 연구보고에서도 MS 이외의 marker들과의 적절한 조합이 필요함을 제안하였다. 현재 개체의 동일성검사나 친자감별 등에 활용되고 있는 MS marker의 경우

*Corresponding author: Sung-Soo Lee

Tel: +82-31-290-1634, Fax: +82-31-290-1622

E-mail: lee6470@rda.go.kr

*Corresponding author: Moon-Suck Ko

Tel: +82-64-754-5710, Fax: +82-64-754-5713,

E-mail: koms21c@rda.go.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 상대적으로 높은 돌연변이율을 보이며, 암(cancer)이나 유전질환과 관련된 유전자의 구조적 돌연변이와 불안정성(MS instability), 이형접합성의 획득/상실(gain/loss of heterogeneity) 등을 나타내기도 한다[4-5,7,10,12,17,25,32]. 특히 두 개의 염기가 반복되는 di-nucleotide (nt) repeat MS의 경우는 실험과정에서 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭 시 주형 DNA 서열의 단순반복에 의한 효소의 slip-page 현상에 의해 stutter band들이 형성되고 이는 유전자형의 결정에서 false positive를 나타낼 수 있는 원인이 된다. 또한 여러 개의 유전자들을 동시에 증폭하는 다중 증폭(multiplex PCR) 시험은 효소의 차등 증폭양상을 나타내어 data의 일부가 상대적으로 낮은 수준으로 검출되거나 관찰되지 않는 결과를 초래하기도 한다[3,9,21,29,33]. 이와 같은 문제점들의 보완을 위해 di-nt repeat MS marker set 분석에서의 문제점들을 해결하기 위해 상대적으로 다형정보량은 적으나, 돌연변이율이 낮은 tri-, tetra-nt repeat나 minisatellite, variable number of tandem repeat (VNTR), SNP, indel marker 등에 의한 보완의 필요성이 제안되고 있다[2,8,15,26-28].

소에서는 전체 유전체 서열이 보고된 이후 next generation sequencing 등을 통해 다량의 유전체 정보들이 지속적으로 보고되고 있으며, 유전 정보들과 표현형의 상관관계의 분석이 진행되고 있다. 본 연구에서는 Bovine Genome Project에서 보고한 소의 유전체 서열과 발현서열표식(expressed sequence tag, EST) database의 서열들을 비교하여 얻어낸 삽입/결실 다형을 나타내는 표지인자들을 한우와 제주흑우를 포함한 소 품종들에서 평가하여 다형성의 유형과 대립인자의 분포를 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물과 DNA 추출

본 연구에 이용한 제주흑우(n=160)와 한우(n=152)는 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장(Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA; SAES)과 제주도 축산진흥원(Livestock Promotion Institute, Jeju-do)에서 보관중인 genomic DNA를 제공받거나 말초동맥에서 혈액을 채취하여 DNA를 분리하였다. Holstein (n=54), Angus (n=32), Charolais (n=21), Hereford (n=13) 등은 SAES에서 제공받은 것을 이용하였으며, 한우는 경기도와 제주도에서 수집한 혈액에서 DNA를 분리하였다. 전혈에서 DNA 분리는 Sambrook 등[31]의 방법을 변형하여 수행하였으며, 분리한 DNA는 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, USA)로 흡광도를 측정 후 A_{260}/A_{280} 와 A_{230}/A_{280} 이 모두 1.8 이상인 DNA들을 50-60 ng/ μ l로 희석하여 PCR 반응의 주형으로 이용하였다.

Indel marker의 선정 유전자형의 결정

Indel marker의 고안은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) database 상에 보고된 Bovine Genome Project의 서열을 대상으로 소의 EST 염기서열을 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 이용하여 탐색한 후, 단백질 암호화 영역에서 삽입/결실 돌연변이를 보이는 영역을 탐색하였다. Indel marker는 삽입/결실된 서열의 길이가 5-nt 이상, 50-nt 이하인 것만을 선별하였으며, 사전 연구를 통해 한우집단에서 다형성의 빈도가 높은 9 종의 indel marker들을 최종 선발하였다(Table 1). 선정된 indel marker의 유전자형 분석을 위해 Primer3 v.0.4.0 [30]을 이용하여 유전자 증폭을 위한 primer를 고안하였다(Table 1).

유전자형의 결정

유전자형 결정을 위한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 반응은 50 ng의 genomic DNA 용액에 1× PCR buffer, 125 mM dNTP, 0.3 unit *Taq* DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Korea)에 각각의 primer와 멸균 증류수를 첨가하여 최종 20 μ l가 되게 하여 준비하였다. 준비된 반응액에 대한 PCR 증폭은 PTC-200 thermal cycler (Bio-Rad, USA) 상에서 95℃에서 3분간 초기변성, 94℃ 45초-primer annealing 온도에서 45초-72℃ 45초로 구성된 cycle을 40회 반복 수행하고 72℃에서 5분간 최종 신장하였다. PCR 증폭 산물은 ethidium bromide (EtBr)가 함유된 2.0% agarose 겔 상에서 전기영동하거나 10% polyacrylamide gel 상에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 결정하였다.

염기서열 분석

연구에 이용한 9 종의 indel marker의 대립인자별 염기서열은 PCR 산물에 대한 sequencing 분석을 통해 결정하였다. 유전자 PCR 산물에 전기영동 판독 후 결정된 insertion 동형접합자형, deletion 동형접합자형, 삽입-결실 이형접합자형에 해당하는 PCR 산물을 각각 3 개체씩 선발하고, PCR 산물을 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 주형으로 PCR primer를 이용하여 dye-termination 반응을 수행한 후, MegaBase1000 (Amersham Pharmacia, USA)을 이용하여 염기서열을 결정하였고, 다시 BLAST 검색을 통해 GenBank database에 보고된 서열과 비교하였다.

대립인자형의 품종별 출현빈도 분석

시험에 이용한 indel marker들의 대립인자형 분석에서 산출된 모든 좌위에 대한 적은 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF)와 관찰이형접합도(observed heterozygosity), 기대이형접합도(expected heterozygosity, H_e), 다형정보량(polymorphic information contents, PIC), χ^2 value, P -value,

Table 1. Chromosomal locations and primer sequences of indel markers

Marker names	Chr. no.	Indel sequences	Forward primers	Reverse primers	PCR product size (bp)
HW_G01	BTA1	-/gaacggggctagtgt	agactctgggcctactcc	caagccacatgaggacagtg	155
HW_G04	BTA20	-/ttgtggtgtttt	ttgcaagatctgaaggaattga	tgaacctgtgctattgtcca	269
HW_G14	BTA4	-/actgcttac	ttgcatgaccaatctcaaa	tgaaactggaaggtgagaacag	317
Indel_06	BTA3	-/ggctgctgtc	gggtcacaaagtggcatttc	cctgaggctgttgaaactca	182
Indel_13	BTA27	-/gcatgaa	ctgaccggcggtatagttgt	tcactgttcaatcttgcctttc	260
Indel_15	BTA5	-/tcaggatgtgtaa	cccccaacctactcctta	cacaaatagcccaaggcaag	194
Indel_16	BTA22	-/ctttctaacgc	tggcctctcttttgtgt	taaccatgggaggaggagaa	242
Indel_29	BTAXY	-/natgtcaata	cttgagcaggggaagtgaag	ggaggctgaaaagcaccata	203
Indel_32	BTA28	-/agcattaag	tcacagtgggctttgtctg	tttctctcttggtcctt	345

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 등은 CERVUS 3.0.3 [14]을 이용하여 분석하였다. χ^2 value는 Yates' correction을 이용하였고, HWE의 유의성은 Bonferroni correction을 이용하였다.

결과 및 고찰

Indel marker의 선정

연구에 이용한 indel marker의 고안을 위해 한우의 cDNA library sequencing을 통해 얻은 EST 염기서열을 NCBI database 상에 보고된 Bovine Genome 서열을 대상으로 BLAST 분석을 통해 삽입/결실 다형성을 확인하였다. 다형성을 나타내는 총 958 개의 영역을 검출하였다. 검출된 영역 중 단백질을 암호화하는 영역에 해당되는 것은 총 51 종으로 확인되었

고, 이 중 삽입/결실된 단위서열의 길이가 5-nt 이상, 50-nt 이하인 42 종을 다시 선별했다. 선별한 42 종의 marker들은 한우 96 두를 대상으로 PCR 효율과 다형성의 빈도를 사전 평가하였다(자료 미기재). 사전평가를 통해 유전자 marker의 PIC 수준이 0.25 이상인 9 종의 indel marker들을 최종 선별하였다(Table 1).

Indel marker의 다형성

제주흑우와 한우를 포함한 소 6 품종에서 indel marker 9 종의 다형성을 PCR 산물에 대한 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 각각의 indel marker에 대한 PCR 증폭산물은 oligo nucleotide의 삽입/결실을 보여주는 두 가지의 동형접합자형들(LL, SS)과 하나의 이형접합자형(LS)으로 구분되었다(Fig. 1). 전체 9 종의 marker 중에서 Indel-15를 제외한 8 종의

Fig. 1. Polymorphisms of each indel marker detected on agarose gels. L and S indicate the inserted and deleted alleles for each indel marker amplified by PCR, respectively. M is the molecular size marker (50-bp DNA Ladder).

marker들은 모두 다형성을 나타내었고, Indel-15는 Holstein과 Charolais 품종에서는 조사에 이용한 모든 시료에서 결실형인 유전자형이 전혀 발견되지 않았다.

Indel-15의 경우 BTA5에 위치하는 염기서열로 확인되었으며, 시험에 사용된 품종 중 대표적인 외국산 소 품종인 Holstien과 Charolais에서 결실형 유전자형이 없다는 점은 비록 본 연구에서 사용한 품종별 개체 수가 충분히 많다고 단정할 수는 없으나, Indel-15 marker의 유전자형 분포가 해당 품종을 검출할 수 있는 분자 표지인자로 활용할 수 있다는 점을 보여준다고 하겠다.

Indel marker의 다형정보량(PIC)

Table 2는 각각의 indel marker에 대한 PIC를 나타낸 것이다. 전체적으로는 제주흑우의 PIC가 평균 0.362로 가장 높고, Charolais는 0.246으로 가장 낮은 수준을 나타내었다. 제주흑우에서는 HW_G04 marker의 PIC가 0.373으로 가장 높고, Indel_06 marker가 0.305로 가장 낮은 수준을 보였다. 한우에서는 HW_G04에서 0.374로 가장 높고 Indel_29 marker에서 0.269로 가장 낮은 수준을 보였다. 외국 소 품종 중에서 Angus

와 Hereford는 Indel_32에서 각각 0.088과 0.083, Charolais와 Holstein은 Indel_15에서 0.000으로 가장 낮은 수준을 나타내었다. 모든 품종에서 PIC가 0.300 이상인 marker는 HW_G01과 HW_G04로 확인되었다.

제주흑우에서 Indel marker의 다형성

Table 3은 제주흑우 집단에서 9 종의 marker에 대한 대립인자 빈도와 이형접합율, HWE 등을 조사한 결과이다. MAF가 가장 높은 marker는 HW_G04 (0.435), 가장 낮은 marker는 Indel_06 (0.189)로 확인되었다. Ho는 HW_G01 (0.604)에서 가장 높고, Indel_29 (0.274)에서 가장 낮았다. Indel_29 marker는 χ^2 value가 13.6257, P -value 0.0002로 HWE가 매우 유의한 수준으로 나타났으며, HW_G01은 χ^2 value가 7.7336, P -value 0.0054로 HWE가 유의한 수준임을 나타내었다. 성염색체 상에 위치한 Indel_29 marker에서 가장 높은 수준의 HWE 유의성을 보인 점은 현재 제주흑우 원종 집단들이 국립축산과학원 난지축산시험장과 제주도 축산진흥원에서만 유지되고 있으며, 이들 두 집단 내에서 발생할 수 있는 근친을 피하기 위한 전략으로 각각의 집단에서 보유한 종모우의 인공수정용 정액

Table 2. PIC values for each indel marker found in six cattle breeds

Markers	Cattle breed					
	JBC (n=160)	Hanwoo (n=152)	Angus (n=32)	Charolais (n=21)	Holstein (n=54)	Hereford (n=13)
HW_G01	0.372	0.351	0.375	0.312	0.338	0.373
HW_G04	0.373	0.374	0.365	0.312	0.375	0.356
HW_G14	0.341	0.289	0.375	0.360	0.286	0.340
Indel_06	0.305	0.373	0.373	0.261	0.330	0.367
Indel_13	0.335	0.372	0.200	0.346	0.166	0.152
Indel_15	0.309	0.282	0.263	0.000	0.000	0.373
Indel_16	0.362	0.371	0.348	0.124	0.350	0.356
Indel_29	0.365	0.269	0.137	0.239	0.375	0.152
Indel_32	0.363	0.333	0.088	0.261	0.114	0.083
mean	0.362	0.334	0.280	0.246	0.260	0.283

Table 3. Minor allele frequencies, Heterozygosities, and Hardy-Weinberg equilibrium of the indel markers in JBC population

Markers	n ¹	MAF	Heterozygosity		HWE		Significance
			Ho	He	χ^2 value	P -value	
HW_G01	159	0.428	0.604	0.491	7.7335	0.0054	*
HW_G04	154	0.435	0.571	0.493	3.4321	0.0640	NS
HW_G14	157	0.319	0.420	0.435	0.0873	0.7676	NS
Indel_06	156	0.189	0.391	0.373	0.1893	0.6635	NS
Indel_13	147	0.215	0.456	0.434	0.2150	0.6429	NS
Indel_15	158	0.288	0.411	0.411	0.0262	0.8714	NS
Indel_16	149	0.359	0.503	0.462	0.9329	0.3341	NS
Indel_29	154	0.375	0.274	0.472	13.6257	0.0002	**
Indel_32	159	0.406	0.472	0.484	0.0376	0.8462	NS
mean	155		0.456	0.451			

¹is number of individuals counted.

MAF, minor allele frequency; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium (*<0.05; **<0.01; NS, not significant)

을 교차하여 사용함으로써 인해 나타난 결과로 추정된다. 특히, 제주흑우의 종모우들이 1990년대 농가에서 수집하여 복원할 당시에 고능력을 보였던 2 마리의 핵심 종모우에서 유래되었다는 점 또한 무시할 수 없다. 즉, 두 집단에서 유래된 소수의 종모우가 보유한 유전자형들만이 집단 간 교차를 통한 인공수정을 통해 전달되기 때문에 임의적 자연교배 유전집단을 추정할 수 있는 HWE 상에서는 유의성이 높아지는 결과를 나타낸다고 하겠다.

Indel marker의 활용

핵 DNA의 유전정보는 Mendelian inheritance를 따르는 유전양상을 나타냄으로, 대립인자의 유무에 따라 선친과 후대의 직접적인 혈연관계를 추정할 수 있는 매우 중요한 분자적 증거가 된다[2,8,15,26-29]. 축산분야에서 핵 DNA의 유전정보는 다형성이 높은 marker의 조합을 통해 유전자 분석체계는 대규모 축군 내에서 개체식별뿐만 아니라 대부분 부분육으로 유통되는 축산물의 동일성검사를 통한 원산지 추적이 가능한 단계에 접어들었다. 특히 한우의 경우 우리나라에서 전면적인 DNA 기반 생산이력추적제와 도체에 대한 동일성검사의 정착으로 국내산 한우에 대한 유통 질서가 정착하는 데 크게 기여하였으며, 부가적으로 해외에서 수입된 수육과의 구분도 가능해졌다. 본 연구에서 발견된 Indel_15의 조사결과와 같이 특정 품종에서 어느 한 대립인자가 완전히 상실된 형태의 marker들을 조합한다면, 유전자 분석을 통한 품종의 식별이 훨씬 더 수월해 질 것으로 예상된다.

1990년대 멸종위기 이후 복원된 제주흑우는 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장과 제주도 축산진흥원에서만 보존되고 있으며, 최근 산업화에 농가의 강력한 요구에 따라 제주흑우 정책과 수정란을 농가에 보급하고 있다. Han 등[11]은 제주흑우 유래의 ET, AI 후대우의 검출에서 한우의 생산이력추적제에 이용되고 있는 국제동물유전학회(International Society of Animal Genetics, ISAG) 권장 11종의 MS marker에 대한 정보만으로는 상대적으로 폐쇄축군인 제주흑우 집단에서는 다형성 빈도가 상대적으로 낮아 친자감별이나 개체식별의 효율성이 낮아 추가적인 marker 도입의 필요성을 언급하였고, 이에 따라 한우 생산이력추적제 marker 11 종외에 MS 11 종과 제주흑우 특이적 모색을 결정하는 *MC1R*와 *ASIP*의 SNP를 추가한 24 종의 유전자 marker 체계를 제안한 바 있다. Lim 등[23]은 MS 분석체계에서 marker의 구성이 한우 집단에서 정보력에 차이를 보여, 한우 생산이력추적제를 위한 분석체계의 도입에 적절한 구성이 필요함을 제안하였다.

본 연구에서 고안한 indel marker의 경우 제주흑우 집단에서 이형접합율, PIC 등이 상대적으로 높다는 점에서 향후 기존의 MS marker 위주의 유전자 검사 체계를 보완하거나 유전자형 판독에 있어 기술적인 어려움을 나타내는 MS marker를 대체할 수 있는 체계도 가능 하리라 판단된다. MS marker에

비해 indel marker가 비록 대립인자의 수가 한정되어 있어 기본적으로 PIC가 상대적으로 낮은 점은 없지 않지만, 친자감별 등에서 요구되는 명확한 유전자형의 판독 등에는 훨씬 더 유리하며, PCR 산물에 대한 agarose gel 전기영동만으로도 marker의 유전자형을 명확하게 판독할 수 있어, 표지된 형광분자를 확인하게 위해 이용되는 고가의 검사장비를 갖추지 않아도 된다는 장점이 있다고 하겠다. 향후 본 연구에서 고안된 indel marker들을 단독으로 또는 MS marker들과 조합하여 다량의 시료들을 신속하고 명확하게 분석할 수 있는 multiplex PCR 기법 등이 개발된다면, 친자검정, 개체식별 등 혈통정립 사업뿐만 아니라, 제주흑우 생산이력추적제나 품종인증 검사체계 등의 기틀을 마련하는 데 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 “제주흑우의 대량증식 기술개발 및 산업화” 연구과제(308008-5)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- 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.
- Borsting, C. and Morling, N. 2011. Mutations and/or close relatives? Six case work examples where 49 autosomal SNPs were used as supplementary markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2**, 198-204.
- Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Hühne, J. and Rolf, B. 1998. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1408-1415.
- Chen, C., Zhou, Z., Li, M., Qu, M., Ma, Q., Zhong, M., Zhang, Y. and Yu, Z. 2012a. Presenilin-2 polymorphisms and risk of sporadic AD: Evidence from a meta-analysis. *Gene* **503**, 194-199.
- Chen, Z., Li, X., Tang, B., Wang, J., Shi, Y., Sun, Z., Zhang, L., Pan, Q., Xia, K. and Jiang, H. 2012b. Spinocerebellar ataxia type 27 (SCA27) is an uncommon cause of dominant ataxia among Chinese Han population. *Neurosci. Lett.* **520**, 16-19.
- Cho, G. J., Yang, Y. J. and Kim, B. H. 2003. A case of parentage testing in the thoroughbred horse by microsatellite typing. *Kor. J. Vet. Res.* **43**, 25-30.
- Collins, F. S., Drumm, M. L., Cole, J. L., Lockwood, W. K., Vande Woude, G. F. and Iannuzzi, M. C. 1987. Construction of a general human chromosome jumping library, with application to cystic fibrosis. *Science* **235**, 1046-1049.
- Daniels, J., Holmans, P., Williams, N., Turic, D., McGuffin, P., Plomin, R. and Owen, M. J. 1998. A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association

- studies. *Am J. Hum. Genet.* **62**, 1189-1197.
9. Demers, D. B., Curry, E. T., Egholm, M. and Sozer, A. C. 1995. Enhanced PCR amplification of VNTR locus D1S80 using peptide nucleic acid (PNA). *Nucleic Acids Res.* **23**, 3050-3055.
 10. Garay, J., Bravo, J. C., Correa, P. and Schneider, B. G. 2004. Infrequency of microsatellite instability in complete and incomplete gastric intestinal metaplasia. *Hum. Pathol.* **35**, 102-106.
 11. Han, S. H., Ko, J. C., Kim, Y. H., Kim, N. Y., Kim, J. H., Ko, M. S., Jeong, H. Y., Cho, I. C., Yang, Y. H. and Lee, S. S. 2012. Verification of ET and AI derived offspring using on the genetic polymorphisms of microsatellite and coat color related genes in Jeju Black cattle. *J. Life Sci.* **20**, 381-387.
 12. Huang, L., Xiao, X., Li, S., Jia, X., Wang, P., Guo, X. and Zhang, Q. 2012. *CRY* variants in cone-rod dystrophy and mutation overview. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **426**, 498-503.
 13. Ji, H., Kim, E., Lee, K., Kang, T., Lee, J., Shin, H., Kim, L. and Yun, Y. 2007. Beagle dogs parentage testing by using 22 ISAG microsatellite markers. *Kor. J. Vet. Res.* **47**, 457-460.
 14. Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* **16**, 1099-1106.
 15. Kersbergen, P., van Eede, P. H., Kraaijenbrink, T., Lardy, N. M., Sijen, T., Bakker, E. and de Knijff, P. 2008. "False positive" or true paternity: Investigating one or two STR mismatches by detailed SNP analyses. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* **1**, 518-519.
 16. Kim, M. J., Li, G. H., Oh, J. D., Cho, K. H., Jeon, G. J. Choi, B. H., Lee, J. H., Hong, Y. S., Kong, H. S. and Lee, H. K. 2007. Characterization of a Korean traditional porcine breed using microsatellite markers and establishment of an individual identification system. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 150-156.
 17. Kim, R. N., Kim, A., Kim, D., Choi, S. H., Kim, D., Nam, S., Kang, A., Kim, M., Park, K., Yoon, B., Lee, K. S. and Park, H. 2012. Analysis of indel variations in the humn disease-associated genes *CDKN2AIP*, *WDR66*, *USP20* and *OR7C2* in a Korean population. *J. Genet.* **91**, e1-e11.
 18. Kim, T. H., Yoon, D. H., Lee, H. S., Cheong, I. C. and Jo, J. K. 1997. Analysis of D-loop region sequences in mitochondrial genome of Korean native pig. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **39**, 215-224.
 19. Lee, S. S., Yang, B. S., Yang, Y. H., Kang, S. Y., Ko, S. B., Jung, J. K., Oh, W. Y., Oh, S. J. and Kim, K. I. 2002. Analysis of melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genotype in Korean Bridle cattle and Korean cattle with dark muzzle. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **44**, 23-30.
 20. Lee, S. S., Yang, Y. H., Kang, S. Y., Oh, W. Y., Yang, B. S., Ko, S. B., Oh, S. J. and Kim, K. I. 2000. Comparison of the genotype and frequencies of MSH receptor (*MC1R*) gene in Korean cattle, Cheju native black cattle, Japanese black and Japanese brown cattle. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **42**, 253-260.
 21. Levinson, G. and Gutman, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203-221.
 22. Lim, H. T., Min, H. S., Moon, W. G., Lee, J. B., Kim, J. M., Cho, I. C., Lee, H. K., Lee, Y. W., Lee, J. G. and Jeon, J. T. 2005. Analysis and selection of microsatellite markers for individual traceability system in Hanwoo. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **47**, 491-500.
 23. Mannen, H., Tsuji, S., Mukai, F., Goto, N. and Ohtagaki, S. 1993. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *J. Hered.* **84**, 166-169.
 24. Oh, J. D., Kong, H. S., Lee, J. H., Moon, S. J., Jeon, G. J. and Lee, H. K. 2007. The genetic relationship between regional population of Hanwoo brands (Korean Cattle) using microsatellite markers. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 357-362.
 25. Ostertag, E. M. and Kazazian, Jr. H. H. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 501-538.
 26. Pereira, R., Phillips, C., Alves, C., Amorim, A., Carracedo, Á. and Gusmão, L. 2009. Insertion/deletion polymorphisms: A multiplex assay and forensic applications. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* **2**, 513-515.
 27. Phillips, C., Fondevila, M., García-Magariños, M., Rodriguez, A., Salas, A., Carracedo, A. and Lareu, M. V. 2008. Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2**, 198-204.
 28. Pinto, N., Magalhaes, M., Conde-Sousa, E., Gomes, C., Pereira, R., Alves, C., Gusmao, L. and Amorim, A. 2012. Assessing paternities with inconclusive STR results: The suitability of bi-allelic markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* in press.
 29. Poetsch, M., Ludcke, C., Repenning, A., Fischer, L., Malyusz, V., Simeoni, E., Lignitz, E., Oehmichen, M. and von Wurmb-Schwark, N. 2006. The problem of single parent/child paternity analysis-Practical results involving 336 children and 348 unrelated men. *Forensic Sci. Int.* **159**, 98-103.
 30. Rozen, S. and Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. and Misener, S. (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
 31. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Manniatis, T. 1989. *Molecular cloning*: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
 32. Warren, S. T., Zhang, F., Licameli, G. R. and Peters, J. F. 1987. The fragile X site in somatic cell hybrids: an approach for molecular cloning of fragile sites. *Science* **237**, 420-423.
 33. Wolff, R. K., Plaetke, R., Jeffreys, A. J. and White, R. 1989. Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics* **5**, 382-384.
 34. Yoon, D., Park, E. W., Cho, Y. M., Cheong, I. C. and Lim, S. K. 2007. Allele frequency of the bovine Y-chromosome

- microsatellite locus in the cattle breeds. *Kor. J. Anim. Sci. Technol.* **49**, 429-436.
35. Yoon, D., Lee, H. K., Oh, S. J., Hong, K. C., Jeon, G. J., Kong,

H. S. and Lee, J. H. 2005. Genetic relationships of cattle breeds assessed by PCR-RFLP of the bovine mitochondrial DNA D-loop region. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **18**, 1368-1374.

초록 : 제주흑우, 한우 및 수입 소 품종에서 새로운 indel 마커의 다형성과 대립인자 분포

한상현^{1,2} · 김재환³ · 조인철¹ · 조상래¹ · 조원모¹ · 김상금¹ · 김유경¹ · 강용준^{1,5} · 박용상¹ · 김영훈⁴ · 박세필^{2,5} · 김은영² · 이성수^{6,*} · 고문석^{1,*}

(¹국립축산과학원 난지축산시험장, ²미래생명공학연구소/제주대학교 줄기세포연구센터, ³국립축산과학원 가축유전자원시험장, ⁴제주도 축산진흥원, ⁵제주대학교 동물자원과학과, ⁶국립축산과학원 바이오공학과)

본 연구는 소 유전자 database들에 대한 사전 비교연구에서 발견된 삽입/결실(indel) marker들의 다형성과 각각의 유전자형의 분포를 확인하고자 수행하였다. 먼저, 소의 유전체 서열과 발현서열표식(EST) database 간의 생물정보학적 비교를 통해 전체 51 종의 indel marker들을 검출하였다. 이 중에서 42 종을 평가하여 최종적으로 9 종의 정보력이 있는 marker들을 집단분석을 위해 선발하였다. 각각의 marker들에 대한 염기서열을 재분석하였으며, marker의 다형성을 한국 재래소 품종인 한우와 제주흑우(JBC), Holstein, Angus, Charolais, Hereford 등 6 품종에서 조사하였다. 본 연구에서 이용한 소 6 품종은 8 종의 marker들에 대해 다형성을 나타내었으나, Indel_15의 경우 Holstein과 Charolais에서 다형성이 발견되지 않았다. JBC 집단에 대한 분석에서는 관찰된 이형 접합자 빈도는 HW_G1 (0.600)에서 가장 높고, Indel_29 (0.274)에서 가장 낮았다. Marker에 대한 다형정보량의 수준은 HW_G4 (0.373)에서 가장 높고, Indel_6 (0.305)에서 가장 낮은 수준을 보였다. 본 연구에서 조사한 새로운 indel marker들은 특히 제주흑우 집단의 생산성 향상을 위한 분자유종 체계의 개발뿐만 아니라 친자확인이나 생산이력추적을 위한 유전정보를 제공하는데 유용할 것으로 기대된다.