



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월12일
 (11) 등록번호 10-1557407
 (24) 등록일자 2015년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-0097566
 (22) 출원일자 2008년10월06일
 심사청구일자 2013년10월07일
 (65) 공개번호 10-2010-0038550
 (43) 공개일자 2010년04월15일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020070066352 A*
 Int. J. Legal. Med., Vol. 111, No. 5, pp.
 267-272 (1998)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한경대학교 산학협력단
 경기도 안성시 석정동 67
 (72) 발명자
공홍식
 경기 수원시 영통구 태장로71번길 19, 201동 105호 (망포동, 동수원엘지빌리지2차)
이학교
 경기도 수원시 장안구 만석로 29, 우방아파트 713동 602호 (천천동)
 (74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이준혁

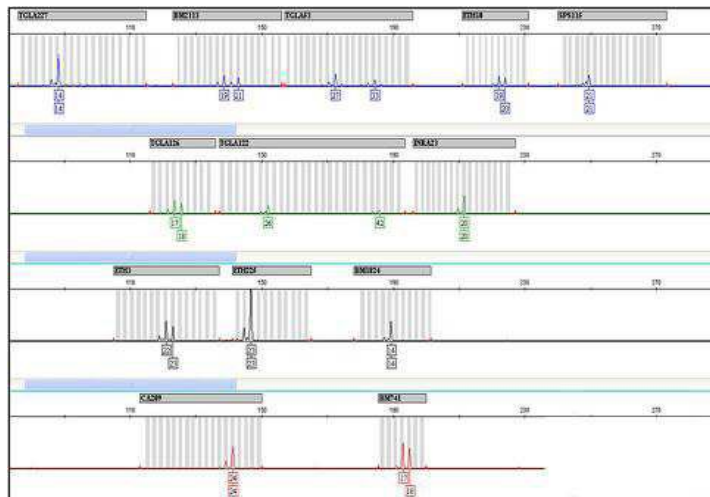
(54) 발명의 명칭 **한우의 개체식별방법 및 키트**

(57) 요약

본 발명은 한우 개체 식별 방법 및 키트에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 한우의 초위성체 유전자를 증폭하여, 증폭된 산물을 전기영동을 통해 대립유전자를 검출하고, 대립형질 사다리를 적용하여 표준화된 유전자형을 결정하는 한우 개체를 식별하는 방법 및 이를 구현하기 위한 한우개체 식별용 키트에 관한 것이다.

본 발명에 따른 한우 개체 분석 방법 및 키트는 초위성체의 다수의 대립유전자를 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 멀티플렉스 피씨알 기법과 대립형질 사다리를 제공함으로써 대립유전자에 관한 표준화된 통합 데이터베이스 구축을 가능케 하며, 한우 개체를 식별하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20053035

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관

연구사업명 핵심전략기술개발

연구과제명 BT, IT 융합기술 및 DNA database를 이용한 한우 원산지 검증기술 개발

주관기관 한경대학교

연구기간 2005년 10월 09일 ~ 2008년 10월 08일

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 얻는 단계;
- (b) TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209 및 BM741 로 이루어진 13개의 초위성체 유전자좌에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 피씨알로 증폭하는 단계;
- (c) 상기 (b)단계의 증폭된 산물을 전기영동을 통해 대립유전자를 검출하는 단계; 및
- (d) 상기 (b) 단계의 초위성체 유전자좌의 대립유전자들로 이루어진 대립형질 사다리를 적용하여 (c) 단계의 대립유전자의 표준화된 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 한우 개체 식별 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 초위성체 유전자좌는 대립유전자 수가 7 이상이고, 증폭산물의 크기가 80bp이상 300bp이하 인 것을 특징으로 하는 한우 개체 식별 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 핵산 시료는 분석하고자 하는 소의 혈액 또는 모근임을 특징으로 하는 한우 개체 식별 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 프라이머는 서열번호 1 내지 26으로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 한우 개체 식별 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 대립형질 사다리는 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209 및 BM741에 대한 대립유전자형을 마커별로 선발하는 단계; 선발된 대립유전자형을 증합효소연쇄반응(PCR)에 의하여 증폭하는 단계; 상기 증폭된 PCR 산물을 클로닝하고, 반복되는 염기서열을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 대립유전자형의 플라스미드 DNA를, 형광물질 표지된 프라이머를 이용하여 증합효소연쇄반응에 의하여 증폭하는 단계;를 통해 마커별로 PCR 산물을 수득하고, 상기 수득한 PCR 산물을 혼합하여 얻어진 것을 특징으로 하는 한우 개체 식별 방법.

청구항 7

TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209 및 BM741 로 이루어진 13개의 초위성체 유전자좌에 특이적인 프라이머 및; 초위성체 유전자좌의 대립형질 사다리를 포함하는 한우 개체 식별용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프라이머가 서열번호 1 내지 26으로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 한우개체 식별용 키트.

청구항 9

삭제

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 대립형질 사다리는 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209 및 BM741에 대한 대립유전자 형을 마커별로 선발하는 단계; 선발된 대립 유전자형을 증합효소연쇄반응(PCR)에 의하여 증폭하는 단계; 상기 증폭된 PCR 산물을 클로닝하고, 반복되는 염기서열을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 대립유전자형의 플라스미드 DNA를, 형광물질 표지된 프라이머를 이용하여 증합효소연쇄반응에 의하여 증폭하는 단계;를 통해 마커별로 PCR 산물을 수득하고, 상기 수득한 PCR 산물을 혼합하여 얻어진 것을 특징으로 하는 한우 개체 식별용 키트.

발명의 설명

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 한우 개체 식별 방법 및 키트에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 한우의 Microsatellites(조위성체) 유전자를 증폭하여, 증폭된 산물을 전기영동을 통해 대립유전자를 검출하고, 대립형질 사다리를 적용하여 표준화된 유전자형을 결정하는 한우 개체를 식별하는 방법 및 이를 구현하기 위한 한우개체 식별용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

세계 각국에서는 유전자원으로서 재래가축에 대한 보존 및 활용의 가치를 인식하면서(Notter (1999) *J. Anim. Sci.* 77:61-69) 가축들의 품종 형성, 유전적 특성, 유전적 다양성, 타 품종간의 유연관계 등의 분석연구를 수행하여 왔다. 소의 품종집단에 대해서는 혈액단백질, 유단백질, 마이크로세틀라이트(microsatellites), 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA), 등 다양한 유전적 표지인자들을 활용한 연구들이 수행되어 왔다(MacHugh et al (1998) *Anim. Genet.* 29:333-340; Mannen et al (1998) *Genetics* 150:1169-1175; Edwards et al (2000) *Anim. Genet.* 31:127-130; Troy et al (2001) *Nature* 410:1088-1091; Hanotte et al (2000) *Molecular Ecology* 9:387-396, (2002) *Science* 296:336-339). 기존의 혈액형 및 생화학적인 지표의 다형성 분석방법들은 분석을 위해 사용되는 조직들에 한계가 있으며, 한우에 있어서 혈액형검사는 정확한 부계혈통을 결정하지 못하는 단점이 있다(Glowatzki-Mullis et al., 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genet.* 26:7-12). 이로 인해 최근 들어 DNA 다형성에 기초한 다양한 유전적 분석방법들이 개발되었으며, 이를 이용하여 품종간 및 개체간의 동정이 이루어지고 있다 (Peelman et al., 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet.* 29:161-167).

[0003]

조위성체(Microsatellite, MS)는 2 내지 6개 정도의 염기서열이 반복되는 DNA군(repetitive DNA group)으로, 게놈 내에 골고루 분포하고 매우 높은 다형성을 나타내는 비암호화 DNA 서열(non-coding DNA sequence)이다 (Zajc I and Sampson J (1999) *J Hered* 90: 104-107). 특정 좌위에서 반복단위의 반복수에 따라 개체간의 다양성이 인정되는데(Koreth J, O'Leary JJand McGee JO (1996) *J Pathol* 178: 239-248.), 반복수에 품종 간 다형성이 있는 경우에 인접영역에 설계한 프라이머를 이용하여 증합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 행하면, PCR 산물 길이에 다형이 관찰되고 DNA 다형을 검출하는 것이 가능해진다. 또한, 조위성체는 다른 유전자들과 마찬가지로 멘델의 유전법칙에 따라 자식에게 전달되며 PCR을 이용하여 증폭할 수 있고, 전기영동을 할 경우 공우성(co-dominant)의 양상을 보인다. 특히, 조위성체는 크기가 작기 때문에 2개에서 최대 8개까지의 프라이머를 동시에 증폭할 수 있으므로(Chamberlain JS et al., (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 11141-11156) 유전자의 다형성을 분석하는데 시간과 비용을 줄일 수 있으며 쉽게 이들의 대립유전자형을 분석할 수 있다. 현재 소에서 약 천개의 조위성체 좌위가 밝혀져 있으며, 이들의 특성 및 염색체상의 위치파악이 이루어져 왔다. 따라서, 이들 중 품종간, 개체간 다형성이 높은 조위성체 마커들을 선별하여 혈통검정을 위한 수단으로서 사용되고 있다(Barendse et al., 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.* 6:227-235). 이 과정에서 여러 개의 프라이머를 혼합하여 증폭하는 multiplex PCR 기법이 사용되고 있으며, 이를 통하여 효율적인 혈통검정 및 연관지도 작성 등이 행해지고 있다. 이러한 분석을 통하여 조위성체는 인간을 포함한 포유류, 어류, 식물 등을 대상으로 이루어지는 집단유전분야에서 유전적 다양성에 기초한 집단간, 집단내 유전성분과 연관성 분석을 위한 중요한 DNA 마커로서 인지되고 있다(Achmann et al., 2004. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Anim. Genet.* 35:285-292. Ayub ET AL., 2003. Reconstruction of human evolutionary tree using polymorphic autosomal microsatellites. *Am. J.*

Anthropol. 122:259-268.

- [0004] 전 세계적으로 이러한 초위성체 분석은 매우 광범위하게 이루어지고 있으며, 국내에서 또한 학술적 연구와 더불어 최고기 이력 추적시스템, 한우와 수입육 판별법 개발 등에 많이 사용되고 있으나, 최종 결과값은 모두 소수 점을 갖는 숫자로 표기되어지므로 타 연구결과와의 데이터 공유는 매우 힘든 실정이다. 즉, 동일한 PCR산물을 동일한 분석기기에서 계속적으로 반복하여 분석한다 해도 크기(bp)는 매번 달라지게 된다. 그렇기 때문에 그러한 데이터는 통합하여 관리하거나, 동일성을 알아보려고 할 때는 매우 비효율적인 시스템이다.
- [0005] 대립형질 사다리(allelic ladder)란, 각 초위성체의 각 유전자형들이 나타날 수 있는 최소 또는 최대의 범위를 하나의 allele number로 지정해주고, 그 범위 안에 위치하는 peak들은 무조건 하나의 숫자로 표시되는 절대값으로 변환하여 주는 것을 의미한다.
- [0006] 본 발명자는 초위성체 유전자좌들의 대립유전자를 정확히 분석하고, 이를 표준화시켜 효율적인 한우 개체 식별 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 한우 집단에 변별력을 가지는 초위성체 유전자좌를 선정, 증폭하여 대립유전자를 검출하고 대립형질 사다리(allelic ladder)를 적용하여 표준화된 유전자형을 결정할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 한우 집단에 변별력을 가지는 초위성체 유전자좌를 선정, 증폭하여 대립유전자를 검출하고 대립형질 사다리를 적용하여 표준화된 유전자형을 결정하는 한우 개체 식별 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기의 증폭용 프라이머 및 이를 대립형질 사다리를 포함하는 방법을 이용하여 한우 개체 식별용 키트를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 각 초위성체 유전자좌에서 출현 가능한 모든 대립유전자(allele)들을 혼합한 대립형질 사다리(allelic ladder)를 통한 통합 데이터베이스 구축 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 한우 집단에 변별력을 가지는 초위성체 유전자좌를 선정, 증폭하여 대립유전자를 검출하고 대립형질 사다리를 적용하여 표준화된 유전자형을 결정하는 한우 개체 식별 방법을 제공한다.
- [0011] 바람직하게는, (a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 얻는 단계; (b) 초위성체유전자좌를 선정하고 초위성체 유전자좌 각각에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 피씨알로 증폭하는 단계; (c) 상기 (b)단계의 증폭된 산물을 전기영동을 통해 대립유전자를 검출하는 단계; 및 (d) 상기 (b) 단계의 초위성체 유전자좌의 대립유전자들로 이루어진 대립형질 사다리를 적용하여 (c) 단계의 대립유전자의 표준화된 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 한우 개체 식별 방법을 제공한다.
- [0012] 초위성체 유전자좌 선정은 종합적인 증폭조건(프라이머의 어닐링(annealing)온도, 산물의 크기, 표지형광 물질)을 고려하여 선정하며, 농도에 맞게 프라이머를 혼합하여 증폭반응을 위한 반응액을 만든 다음, 초위성체 유전자좌들을 멀티플렉스피씨알(Multiplex PCR)방법으로 증폭한다. 증폭된 산물을 자동 DNA 시퀀서를 이용하여 분리하고, 각 좌위별 대립유전자(allele)의 분포 및 크기 등을 분석하고, 이러한 분석자료를 근거로하여 한우의 개체식별을 위한 유전자 마커를 선정하고, 감식방법을 제공한다.
- [0013] 초위성체 유전자좌의 선정은 대립유전자의 수가 최소 7개 이상, 증폭산물의 크기는 80bp이상 300bp이하의 유전자 표지를 사용하는 것이 바람직하다. 특히 프라이머의 제조는 어닐링(Annealing) 온도, 증폭산물의 크기 등 멀티플렉스 피씨알(Multiplex PCR)조건을 고려하여 제조해야 한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에서는 상기의 조건에 부합하는 초위성체 유전자좌위 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209, BM741을 선정하였으며, 상기의 초위성체 유전자좌위에서의 모든 출현 가능한 대립유전자들을 혼합한 대립형질 사다리(allelic ladder)를 제조하였다.
- [0015] 대립형질 사다리는 TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824, CA209 및 BM741에 대한 대립유전자 형을 마커별로 선발하는 단계; 선발된 대립유전자형을 증합효소연쇄

반응(PCR)에 의하여 증폭하는 단계; 상기 증폭된 PCR 산물을 클로닝하고, 반복되는 염기서열을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 대립유전자형의 플라스미드 DNA를, 형광물질 표지된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응에 의하여 증폭하는 단계;를 통해 마커별로 PCR 산물을 수득하고, 상기 수득한 PCR 산물을 혼합하여 제조할 수 있다.

- [0016] 본 발명에서 한우의 개체 식별을 위한 분석DNA샘플은 혈액, 모근 등에서 수득될 수 있으며, 상기 DNA 샘플에서 각 좌위별 프라이머들을 이용하여 멀티플렉스 피씨알(Multiplex PCR)로 증폭하고, 증폭된 산물을 자동 전기영동 장치를 통해 대립유전자(allele)를 검출하며, 대립형질 사다리(allelic ladder)를 적용하여 표준화된 유전자형을 결정하는 단계를 통하여 한우 개체 식별이 가능하다.
- [0017] 본 발명의 프라이머로는 서열번호 1 내지 서열번호 26로 표시되는 염기서열을 가진 것일 수 있다.
- [0018] 상기 프라이머의 염기서열의 일부를 다른 염기로 치환, 삭제하거나 일부 염기서열의 위치와 방향이 바뀐 염기서열도 본 발명에 따른 프라이머의 범위에 속한다.
- [0019] 본 발명에 따른 한우 개체 분석 방법은 초위성체의 다수의 대립유전자를 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 멀티플렉스 피씨알 기법과 대립형질 사다리(allelic ladder)를 제공함으로써 대립유전자에 관한 표준화된 통합 데이터베이스 구축을 가능케 하며, 한우 개체를 식별하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0020] 따라서, 본 발명에 따른 한우 개체 분석 방법을 이용한 초위성체 유전자좌에 특이적인 프라이머, 초위성체 유전자좌의 대립형질 사다리(allelic ladder)를 포함하는 한우개체 식별용 키트도 본 발명의 범위 내에 포함되며, 이를 바탕으로 한 대립유전자에 관한 표준화된 통합 데이터베이스 역시 본 발명의 기술적 사상에 포함될 수 있다.

효 과

- [0021] 본 발명에 따른 한우 개체 분석 방법 및 키트는 초위성체의 다수의 대립유전자를 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 멀티플렉스 피씨알 기법과 대립형질 사다리(allelic ladder)를 제공함으로써 대립유전자에 관한 표준화된 통합 데이터베이스 구축을 가능케 하며, 한우 개체를 식별하는데 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0023] <실시예> 한우 개체 식별

[0024] 1.1. 공시 동물과 DNA

- [0025] 한우의 혈액은 경기도 지역의 5개 브랜드사업체의 번식우 165두의 혈액을 채취하여 공시재료로 사용하였다. 한우의 혈액에서 genomic DNA의 분리는 Genomic DNA 추출 키트(Qiagen, USA)를 이용하였다.

[0026] 1.2. 초위성체 유전자좌의 선발

- [0027] 본 실험에 사용된 초위성체 유전자좌는 Applied Biosystems사의 Stockmarker™, International Society for Animal Genetics(http://www.isag.org.uk/ISAG/all/02_PVpanels_LPCGH.doc)과 Roslin 연구소(<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>) 그리고, 미국국립생물공학정보센터(NCBI, National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=250931>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts.cgi?uid=48737>)에서 제안한 소의 다형성 분석용 초위성체 유전자좌들을 기초로 하여 선정하였다(표1).

표 1

소의 다형성 분석용 초위성체 유전자좌

유전자좌	염색체위치	(bp)	프라이머 서열		서열번호
TGLA227	18	76~104	F	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT	1
			R	ACAGACAGAAACTCAATGAAAGCA	2
BM2113	2	123~143	F	GCTGCCTTCTACCAAATACCC	3
			R	CTTCTGAGAGAAGCAACACC	4
TGLA53	16	154~188	F	GCTTTCAGAAATAGTTGCATTCA	5
			R	ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	6
ETH10	5	212~224	F	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	7
			R	CCTCCAGCCCACTTCTCTTCTC	8
SPS115	15	246~260	F	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	9
			R	AACGAGTGTCTAGTTGGCTGTG	10
TGLA126	21	95~121	F	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT	11
			R	TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	12
TGLA122	21	137~181	F	CCCTCCTCCAGGTAATCAGC	13
			R	AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	14
INRA23	3	196~222	F	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	15
			R	TAACTACAGGGTGTAGATGAATC	16
ETH3	19	90~118	F	GAACCTGCCTCTCTGCATTGG	17
			R	ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	18
ETH225	9	141~159	F	GATCACCTTGCCACTATTTCCT	19
			R	ACATGACAGCCAGCTGCTACT	20
BM1824	1	178~192	F	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC	21
			R	CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG	22
CA209		113~150	F	GTAGAAGTTAGTGACTGTTCATCC	23
			R	CCTCAGAGCCCCATACATTCC	24
BM741		186~196	F	GCCCCGAAGGAATGGTG	25
			R	CCAAAAGGTCCTATCTCCAAA	26

1.3. 프라이머의 제작 및 형광물질 표지

본 발명에 사용된 프라이머는 AppliedBiosystems사(USA)에서 주문 제작하였으며, 각 유전자좌의 명칭, 표지 형광물질 및 프라이머 염기서열은 상기 표1과 같다.

형광물질은 한쌍의 증폭 프라이머 중 한 가지의 서열에만 표지시켰으며, 표지에 사용된 형광물질은 6-FAM(6-carboxylfluorescein), VIC, NED, PET등이었다.

1.4. Multiplex PCR 및 MS 분석

Multiplex PCR은 최종 부피가 15 μ l가 되도록 하였으며, 주형 DNA는 50ng, 프라이머 혼합물 2 μ l, dNTP의 농도는 0.25mM로 하였다. 또한 Taq DNA polymerase 0.5 unit((주)젠텍스), 10 \times buffer 1.5 μ l를 첨가하였고, 멸균 3차 증류수로 최종 부피를 맞추었다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 denaturation을 실시한 후 95 $^{\circ}$ C에서 50초, 56 $^{\circ}$ C에서 70초, 72 $^{\circ}$ C에서 70초를 1 cycle로 하여 32회 반복하였다. 그 후 65 $^{\circ}$ C에서 30분 후 8 $^{\circ}$ C에서 종료하였다.

초위성체 유전자좌 분석을 위하여, 각각의 PCR 최종산물의 증폭 여부 및 농도를 확인하기 위하여 3% 아가로스젤에서 1차 전기영동을 실시한 후, 자동염기서열 분석장치인 AppliedBiosystems 3130xl Genetic Analyzer(AppliedBiosystems, USA)에서 2차 전기영동을 하기위하여 약 80배 증류수로 희석을 하였다. 크기별로 분획을 시키기 위하여, GeneScanTM-500 LIZ Size Standard 및 Hi-Di Formamide (AppliedBiosystems, USA)혼합물을 1:9로 희석하여 전기영동을 실시하였다.

또한 모든 초위성체에 대한 대립형질 사다리(allelic ladder)를 PCR 최종산물의 전기영동과 마찬가지로

GeneScan™-500 LIZ Size Standard 및 Hi-Di Formamide (AppliedBiosystems, USA) 혼합물과 1:9로 희석하여 전기영동을 실시하였다.

[0036] 전기영동이 끝난 후, GeneMapper 4.0(AppliedBiosystems, USA)을 이용하여 각 초위성체 유전자좌의 증폭 크기와 표식자의 종류를 확인하고, 표 2처럼 대립형질 사다리(allelic ladder)를 통해 표준화된 결과값을 도출하였다.

표 2

[0037]

샘플	초위성체	Size 1	Size 2	A1	A2
Control	TGLA227	88.07		14	
	BM2113	140.54	142.65	20	21
	TGLA53	164.41	174.48	23	28
	ETH10	221.96	227.74	19	22
	SPS115	249.59	251.51	21	22
	TGLA126	123.49	131.93	17	21
	TGLA122	147.15	151.81	24	26
	INRA23	211.62	219.32	20	24
	ETH3	122.81		23	
	ETH225	146.38	148.57	23	24
	BM1824	189.45		14	
	CA209	142.52		24	
	BM741	192.23	194.32	17	18

[0038] SAS V8.2(USA) 통계프로그램을 이용하여 도출된 값들에 대한 통계처리를 실시하였으며, 표 3과 같은 이형접합률(He, Heterozygosity), 다형정보지수(PIC, Polymorphic Information Content) 등을 확보하였다.

[0039] 각 유전자좌위별 다형성지수인 및 기타 정보들을 하기에 표시한 표 3과 같이 알 수 있었다.

표 3

[0040] 초위성체의 다형성 지수

Locus	Lable	N	No. of alleles	Size(bp)	He	PIC
TGLA227	B(FAM)	351	13	76~115	0.830	0.808
BM2113	B(FAM)	339	11	123~156	0.744	0.708
TGLA53	B(FAM)	315	17	158~196	0.872	0.858
ETH10	B(FAM)	345	8	212~230	0.761	0.720
SPS115	B(FAM)	351	7	240~270	0.766	0.733
TGLA126	G(VIC)	318	7	116~136	0.661	0.616
TGLA122	G(VIC)	334	19	137~195	0.863	0.847
INRA23	G(VIC)	347	11	196~222	0.756	0.721
ETH3	Y(NED)	298	8	105~137	0.759	0.720

ETH225	Y(NED)	345	8	141-170	0.651	0.609
BM1824	Y(NED)	357	7	176-200	0.656	0.600
CA209	R(PET)	343	11	113-150	0.467	0.447
BM741	R(PET)	251	3	186-196	0.326	0.275

[0041] 가장 많은 대립유전자(allele)의 개수는 TGLA122에서 나타난 19개였으며, TGLA53은 가장 높은 He(0.872)와 PIC(0.858)값을 갖는 초위성체였다. 이러한 결과는 대립유전자(allele)의 개수가 많더라도 출현빈도가 편귀될 수 있음을 나타내는 것이며, He와 PIC 값의 최상위 초위성체가 다른 것은 대립유전자(allele)의 개수와 빈도에 의한 추정 계산식 차이에 의한 것이다.

[0042] 아래 표 4에서처럼 13개의 초위성체 마커를 사용하여 통계처리 하였을 경우 무작위 교배집단에서 동일개체가 출현할 확률은 2.27×10^{-28} 로 나타났으며, 이는 국내 한육우의 전체 사육두수 2,448,305 두(2008년 2사분기, 농림부 통계자료)를 고려하더라도 동일개체가 출현할 확률이 없는 것으로 판단된다.

표 4

[0043] 통계분석 결과

H_e	PIC	PE	PE_{pu}	PI	$PI_{half-sibs}$
0.7010	0.6664	0.999942	0.996623	2.27×10^{-28}	5.19×10^{-20}

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 13개의 초위성체 유전자좌에 대한 멀티플렉스 피씨알(multiplex PCR)로 획득된 산물을 자동염기서열 분석장치에서 분석한 전기영동상을 나타낸다.

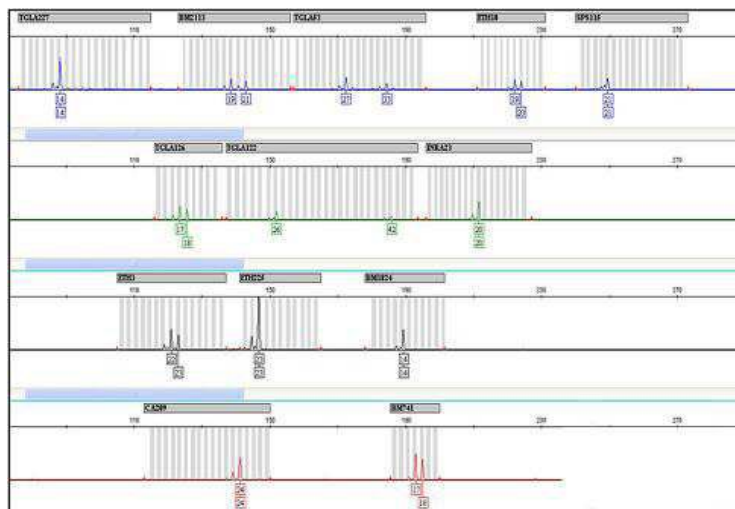
[0045] 도 2는 13개 초위성체 유전자좌에 대한 대립형질 사다리(allelic ladder)를 자동염기서열 분석장치에서 분석한 전기영동상을 나타낸다.

[0046] 도 3a는 13개의 초위성체 유전자좌에 대한 멀티플렉스 피씨알(multiplex PCR)로 획득된 산물을 자동염기서열 분석장치에서 전기영동 한 후, 대립형질 사다리(allelic ladder)를 적용하지 않고 분석한 결과이다.

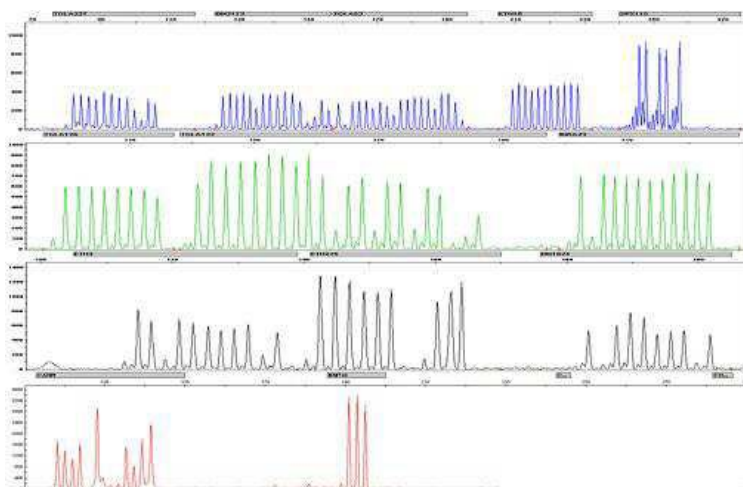
[0047] 도 3b는 13개의 초위성체 유전자좌에 대한 멀티플렉스 피씨알(multiplex PCR)로 획득된 산물을 자동염기서열 분석장치에서 전기영동 한 후 대립형질 사다리(allelic ladder)를 적용하여 표준화된 결과값으로 변환된 결과이다.

도면

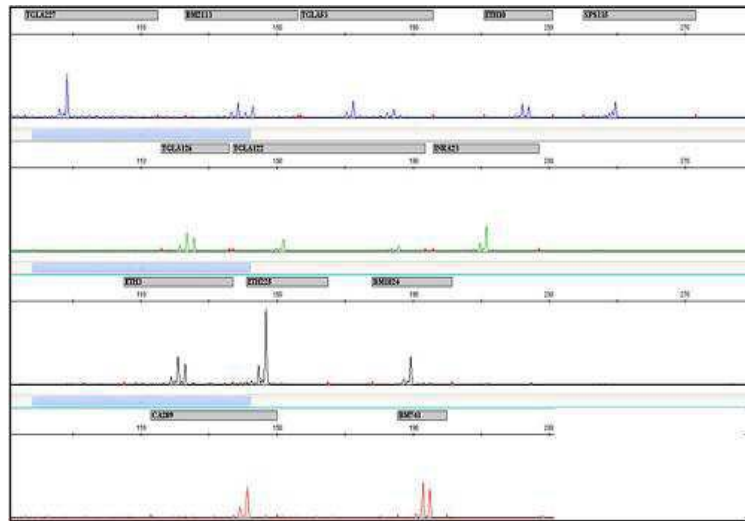
도면1



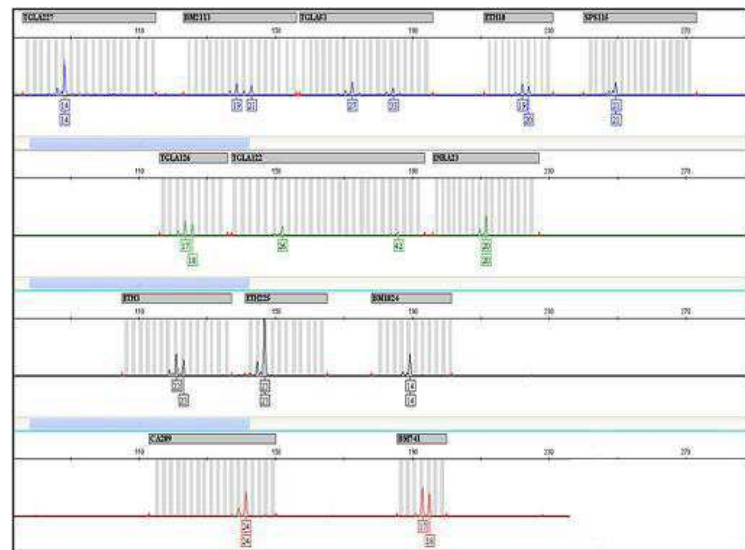
도면2



도면3a



도면3b



서열목록

- <110> HANKYONG INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION CENTER
- <120> Method and Kit for identification of Korean cattle
- <160> 26
- <170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA227 forward primer

<400> 1
cgaattccaa atctgttaat ttgct 25

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA227 reverse primer

<400> 2
acagacagaa actcaatgaa agca 24

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM2113 forward primer

<400> 3
gctgccttct accaaatacc c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BM2113 reverse primer

<400> 4

cttcctgaga gaagcaacac c

21

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGLA53 forward primer

<400> 5

gctttcagaa atagtttgca ttca

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGLA53 reverse primer

<400> 6

atcttcacat gatattacag caga

24

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ETH10 forward primer

<400> 7

gttcaggact ggcctgcta aca

23

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ETH 10 reverse primer

<400> 8
 cctccagccc actttctctt ctc 23

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SPS115 forward primer

<400> 9
 aaagtgacac aacagttct ccag 24

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SPS115 reverse primer

<400> 10
 aacgagtgtc ctagtttggc tgtg 24

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TGLA126 forward primer

<400> 11
 ctaatttaga atgagagagg cttct 25

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TGLA126 reverse primer

<400> 12
 ttggtctcta ttctctgaat attcc 25

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TGLA122 forward primer

<400> 13
 ccctcctcca ggtaaatcag c 21

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TGLA122 reverse primer

<400> 14
 aatcacatgg caaataagta catac 25

<210> 15

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> INRA23 forward primer

<400> 15
 gagtagagct acaagataaa cttc 24

<210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> INRA23 reverse primer

<400> 16
 taactacagg gtgtagatg aactc 25

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ETH3 forward primer

<400> 17
 gaacctgect ctctgcatt gg 22

<210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ETH3 reverse primer

<400> 18
actctgcctg tggccaagta gg 22

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH225 forward primer

<400> 19
gatcaccttg ccactatttc ct 22

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH225 reverse primer

<400> 20
acatgacagc cagctgctac t 21

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM1824 forward primer

<400> 21
gagcaagggtg tttttccaat c 21

<210> 22
<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BM1824 reverse primer

<400> 22
 cattctccaa ctgcttcctt g 21

<210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA209 forward primer

<400> 23
 gtagaagtta gtgactgtca tcc 23

<210> 24
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA209 reverse primer

<400> 24
 cctcagagcc ccatacattt cc 22

<210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BM741 forward primer

<400> 25
gccctgaag gaatggtg

18

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM741 reverse primer

<400> 26
ccaaaaggtc ctatctcaa a

21