

碩士學位論文

제주재래마와 제주산마의
초성위체 (microsatellite) 다형성
분석

濟州大學校 大學院

獸醫學科

任成仁

2002年 6月

제주재래마와 제주산마의
초성위체 (microsatellite) 다형성
분석

指導教授 李慶甲

任成仁

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2002 年 7 月

任成仁의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

2002年 7月

초 록

제주재래마와 제주산마의 초성위체 (microsatellite) 다형성 분석

(지도교수 : 이경갑)

임성인

제주대학교 대학원

수의학과

말에서 초성위체 (microsatellite)의 다형성 분석을 목적으로 축산진흥원에 보존되고 있는 천연기념물 제주재래마군 36 두와 제주경마장의 제주산마군 40 두의 11 개 좌위 (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, VHL20)에 대한 대립인자 빈도 (allele frequency), 이형접합도 (heterozygosity), 인자의 다형성 (polymorphic information content: PIC) 및 친자부정률 (exclusion probability: PE)을 경주마 육성목장의 더러브렛군 40 두를 대조로 하여 조사하였다.

대립인자 빈도수가 0.5 이상으로 관찰된 대립인자는 제주재래마에서 HTG4 (131 bp), HTG6 (96 bp), HMS6 (164 bp), ASB2 (245 bp), HTG7 (125 bp), 제주산마에서 HTG4 (131 bp), 그리고 더러브렛에서는 HTG6 (86 bp), AHT5 (132 bp), HMS6 (166 bp), HMS3 (149 bp), HMS2 (225 bp)이었다. 제주재래마의 각 좌위에 대한 대립인자 수는 5~10 개, 이형접합도 기대치와 인자의 다형성치가 각각 0.364~0.836 (평균 0.699), 0.341~0.801 (평균 0.656)이었고, 제주산마는 각 좌위에 대한 대립인자 수 5~11 개, 이형접합도 기대치와 인자의 다형성치가 각각 0.601~0.861 (평균 0.777), 0.550~0.833 (평균 0.735)로 관찰되었으며, 더러브렛은 각 좌위에 대한 대립인자 수 4~8 개, 이형접합도 기대치와 인자의 다형성치가 각각 0.450~

0.834 (평균 0.638), 0.405~0.801 (평균 0.580)으로 관찰되었다. 또한, 11개의 좌위를 가지고 친자부정률을 산출한 결과, 제주재래마, 제주산마, 더러브렛 각각 99.95 %, 99.99 %, 99.73 %로 높은 친자 판정 확률을 보여주었다.

이상으로 제주재래마와 제주산마는 11 개의 좌위에 대해서 대립인자의 출현과 빈도에 유사한 경향을 보이지만 일부의 좌위에서는 다소 차이가 있는 것으로 확인 되었고, 각 좌위의 인자들은 더러브렛군보다 다소 높은 다형성을 나타내고 있었다. 이러한 다형성을 이용하면 제주재래마 또는 제주산마에서도 효과적으로 친자 판정에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

중심어: 제주재래마, 초성위체, 대립인자 빈도, 인자의 다형성,
친자부정률

목 차

I. 서	론?
II. 재료 및 방법	3
III. 결	과8
IV. 고	찰17
V. 결	론20
VI. 참고 문헌	22
영문 초록	26

I. 서론

제주의 기후와 풍토에 적응하면서 자라온 말을 제주재래마라고 하며, 일명 '제주 조랑말'로 일컫고 있다. 제주재래마는 1986년에 천연기념물 제 347 호로 지정되어 보존되고 있다. 제주에는 제주재래마와 더불어 제주의 농가 및 승마장에서 사육되어 제주 경마장에서 경마에 이용되는 제주산마와 서울 경마장에서 경마에 이용하고자 번식, 사육되는 더러브렛이 있다. 더러브렛은 암말에 대한 종부 과정이 확실하여 정확한 혈통 파악이 잘 되어 있지만 (조 등, 2000), 제주산마는 그러한 과정이 확실하지 않고, 종부 횡수가 반복되면서 정확한 혈통이 파악되지 않고 있다. 이러한 제주의 실정에 따라 제주마의 보존을 위해 혈통 확인 및 개체 식별, 친자 확인 등의 연구가 진행되고 있다 (Cho 등, 2000; 신 등, 1999; 정 등, 1991; 한 등, 1992).

과거에는 친자 확인 및 개체 식별을 위한 연구로 색이나 크기, 모색 등의 외형 평가 (정 등, 1991)나 면역항혈청 분석 (한 등, 1992), 적혈구 항원형 분석 (조 등, 2000), 혈액 단백질 분석 (Bowling 과 Clark, 1985; 신 등, 1999; 조 등, 2000) 등이 연구되었는데, 과정이 복잡하고 판별의 정확도가 낮은 단점이 있다 (Bowling 과 Clark, 1985). 근래에 들어 기존 분석 방법의 단점을 극복할 수 있고 다른 방법들에 비해 정확도가 높으며 분석 방법도 간단한 분자 유전학과 DNA 분석 기술의 발달되어, 동물의 친자 확인 및 개체 식별에 적용하고 있다 (Binns 등, 1995; Breen 등, 1994; 이 등, 1996).

유전자 분석 방법으로는 genomic DNA를 이용한 minisatellite, microsatellite 좌위 분석, DNA fingerprinting, mitochondria DNA 분석, chromosome 분석 등이 있다. 그 중에서도 현재 가장 많이 사용되는 말의 개체 식별 및 친자 감별 방법은 microsatellite 좌위 분석이다 (Bowling, 1996).

말의 DNA 연구는 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction; PCR)의 개발로 초성위체 (microsatellite)의 다형성을 분석할 수 있는 괄목할 만한 발전을 보였고, 여러 가지 유전정보를 보유하고 있는 초성위체와 같은 표식 유전자의 연구는 개체 식별에 있어서 중요한 정보를 제공하며, 혈통을 규명하고 정립하는데 필수적인 검사 항목으로 자리잡고 있다. 초성위체

를 분석함으로써 혈통을 정립하고 정확한 개체 식별로 공정성을 확보할 수 있다는 면에서 초성위체 부위를 이용한 분자 유전학적 분석 작업은 유용하다고 할 수 있다 (Bowling 등, 1997; Canon 등, 2000; Marklund 등, 1994; 조 등, 1998; 조 등, 2000).

본 연구는 더러브렛을 대조로 해서 11 개 좌위에 대한 초성위체를 분석해 대립인자의 종류와 빈도를 조사함으로써 제주재래마와 제주산마의 초성위체 다형성을 조사하여 그 특성을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

천연기념물 347 호로 축산시험장에서 사육 중인 제주재래마 (CNH: Cheju-native horse) 36 두, 제주경마장에서 경마로 이용되는 제주산마 (CRH: Cheju-racing horse) 40 두, 육성목장에서 사육되고 있는 더러브렛 (TB: thoroughbred) 40 두를 공시하였다.

2. 시료준비

시료는 경정맥을 통해서 3 ml 씩 채혈한 후, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) 튜브에 옮겨 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리시키고 백색층 (buffy coats)을 분리하였다.

3. Genomic DNA 추출

Genomic DNA 추출은 Miller (Miller 등, 1988)의 방법에 준하였다. 즉, RBC lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.6, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)를 사용하여 적혈구를 파괴시키고, 원심분리를 통해 얻어진 백혈구만을 Proteinase K와 Sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 용액을 첨가하여 56 °C에서 반응시켜 백혈구 세포를 파괴하였다. 그리고 세포 안의 DNA가 상층액으로 흘러나오도록 하여 페놀 (phenol)이나 클로로포름 (chloroform) 등의 유기용매로 처리하고 단백질을 제거하였다. 또한, 에탄

을 (ethyl alcohol)을 첨가하여 DNA를 침전시키고 침전물을 상온에서 건조시킨 후, 증류수에 녹여 UV spectrophotometer (OD₂₆₀)로 농도를 측정해 10 ng/ μ l이 되도록 만들었다.

4. 중합효소연쇄반응에 의한 초성위체 증폭

초성위체의 증폭은 Bozzini 등(Bozzini 등, 1997)의 방법에 준하였으며, 프라이머 (primer)의 염기배열 (Binns 등, 1995; Breen 등, 1997; Ellegren 등, 1992; Marklund 등, 1994; Guerin 등, 1994; Van Haeringen 등, 1994)은 표 1과 같다. 중합효소연쇄반응은 MgCl₂ 2.0~3.0 mM로 1.5 μ l, primer 1~10 pmol로 3 μ l (F, R 각각 1.5 μ l), PCR buffer 3 μ l, Taq polymerase 0.2 μ l로 총 10 μ l가 되게 적정하여 주형 DNA 5 μ l (50 ng)와 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA)으로 실시하였다. 6 개의 초성위체 좌위는 표 2와 같이 복합중합효소연쇄반응 (multi-PCR)을 하였고, 5 개의 초성위체 좌위는 표 3과 같이 touchdown-PCR (Binns 등, 1995)을 하였다. 중합효소연쇄반응 과정은 먼저 95 °C에서 10 분간 가열하여 변성(denaturation)을 유도하고, 95 °C에서 30 초간 변성, 60 °C에서 1 분간의 가열 냉각 (annealing), 그리고 72 °C에서 1 분간의 증폭 (extension)의 3 단계로 총 30 회 반복하였으며, 최종 단계에서 72 °C에서 60 분간 증폭을 실시하였다. 그리고 touchdown-PCR은 가열 냉각 온도를 65 °C에서 55 °C까지 3 회에 1 °C씩 낮추면서 반응을 진행시켰다.

5. 초성위체 다형 분석

복합중합효소연쇄반응 산물 3 μ l와 GeneScan 400 HD size standard (Perkin-Elmer) 0.3 μ l, Hidi formamide (Perkin-Elmer) 6.7 μ l 를 혼합하고, touchdown-PCR 산물은 각각 3 μ l 씩 위와 같은 양으로 GS 400 HD와 Hidi formamide를 혼합해서 유전자형 자동분석기 (Perkin-Elmer ABI Prism

310 analyzer, USA)을 이용해 전기영동 (Janet 등, 1992)하고, 검출된 각 유전자좌의 대립유전자는 GeneScan Ver. 2.1 (Perkin-Elmer)으로 분석한 후, Genotyper Ver. 2.5 (Perkin-Elmer)로 각 좌위에 따른 대립인자의 크기를 결정하였다.

6. 통계 분석

초성위체 좌위의 대립인자 출현 빈도 (allele frequency)를 추정하고 대립인자 수와 출현 빈도에 기초하여 이형접합도 (heterozygosity; Het), 인자의 다형성 (polymorphic information content; PIC), 친자부정률 (exclusion probability; PE)을 Cervus Ver. 2.0 program (Marshall 등, 1998)을 이용하여 산출하였다.

Table 1. Microsatellite loci and primer sequences.

Locus	Size(bp)	Dye label	Primer sequence
VHL20	86-105	FAM	F: 5'-CAAGTCCTTACTTGAAGACTAG-3' R: 5'-AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG-3'
HTG4	120-140	FAM	F: 5'-CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC-3' R: 5'-CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC-3'
AHT4	146-170	FAM	F: 5'-AACCGCCTGAGCAAGGAAGT-3' R: 5'-GCTCCCAGAGAGTTTACCCT-3'
HTG6	80-107	HEX	F: 5'-CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT-3' R: 5'-GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT-3'
AHT5	129-149	HEX	F: 5'-ACGGACACATCCCTGCCTGC-3' R: 5'-GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC-3'
HMS6	157-171	HEX	F: 5'-GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG-3' R: 5'-CTCCTCTTGTGAAGTGA ACTCA-3'
ASB2	240-270	HEX	F: 5'-CCACTAAGTGTGTTTCAGAAGG-3' R: 5'-CACAACTGAGTTCTCTGATAGG-3'
HTG10	92-112	NED	F: 5'-CAATCCCCGCCCCACCCCGGCA-3' R: 5'-TTTTTATTCTGATCTGTACATTT-3'
HTG7	118-130	NED	F: 5'-CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG-3' R: 5'-ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT-3'
HMS3	149-172	NED	F: 5'-CCAACCTTTGTACATAACAAGA-3' R: 5'-CCATCCTCACTTTTTTCACTTTGTT-3'
HMS2	218-238	NED	F: 5'-CTTGACAGTCGAATGTGTATTAATG-3' R: 5'-ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG-3'

Table 2. Multi-PCR condition for six loci.

Locus	T _m °C	MgCl ₂ (mM)	primer concentration
VHL20	60	2.0	1.8 pmol
HTG4	60	2.0	1 pmol
AHT4	60	2.0	2 pmol
ASB2	60	2.0	2 pmol
HTG7	60	2.0	4.5 pmol
HMS3	60	2.0	3.4 pmol

Table 3. Touchdown-PCR condition for five loci.

Locus	T _m °C	MgCl ₂ (mM)	primer concentration
HTG6	55-65	3.0	10 pmol
AHT5	55-65	3.0	10 pmol
HMS6	55-65	2.5	10 pmol
HTG10	55-65	2.5	10 pmol
HMS2	55-65	2.5	10 pmol

III. 결 과

1. 초성위체의 다형 분석

제주재래마 36 두, 제주산마 40 두, 더러브렛 40 두를 대상으로 초성위체 좌위에 대해서 분석한 결과는 표 4에서 보는 바와 같다.

Table 4-1. Alleles sizes of 11 microsatellite loci for three groups of horses.

Locus	Alleles sizes observed in each groups		
	CNH n=36	CRH n=40	TB n=40
VHL20	85, 87, 93, 97, 99, 101, 103	85, 87, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103	85, 91, 93, 95, 97
HTG4	127, 129, 131, 135, 137	127, 129, 131, 133, 135, 137	127, 131, 133, 137
AHT4	145, 147, 151, 153, 155, 157, 159, 161	145, 147, 149, 151, 153, 157, 159, 161	145, 149, 151, 159
HTG6	80, 84, 86, 94, 96, 98, 102	74, 80, 84, 86, 92, 96, 98	80, 86, 92, 96
AHT5	130, 132, 134, 138, 140, 142	130, 132, 134, 136, 138, 140, 142	130, 132, 136, 138
HMS6	156, 158, 160, 162, 164, 166	156, 158, 160, 162, 164, 166, 168	156, 158, 160, 164, 166

to be continued

Table 4-2. Alleles sizes of 11 microsatellite loci for three groups of horses.

Locus	Alleles sizes observed in each groups		
	CNH n=36	CRH n=40	TB n=40
ASB2	219, 235, 239, 241, 243, 245, 247, 251	219, 235, 239, 243, 245, 247, 251, 253	219, 239, 243, 245, 247, 249, 253
HTG10	87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105	87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107	87, 91, 93, 95, 99, 105, 107
HTG7	119, 123, 125, 127, 129	119, 123, 125, 127, 129	119, 123, 125, 127
HMS3	149, 157, 161, 163, 165, 167, 169	149, 157, 159, 161, 163, 165, 167	149, 157, 159, 161, 163, 165, 167
HMS2	217, 219, 221, 223, 225	217, 219, 221, 223, 225, 227, 231, 233, 237	217, 221, 223, 225, 227

* CNH, Cheju-native horse; CRH, Cheju-racing horse; TB, Throughbred

2. 초성위체의 대립 인자 빈도

11 개 좌위에 대한 대립인자 빈도는 제주재래마에서 VHL20-99 bp (0.3333), HTG4-131 bp (0.5972), AHT4-153 bp (0.2500), HTG6-96 bp (0.7917), AHT5-140 bp (0.3056), HMS6-164 bp (0.5972), ASB2-245 bp (0.5000), HTG10-105 bp (0.3056), HTG7-125 bp(0.5139), HMS3-161 bp (0.2639), HMS2-217 bp (0.3750) 대립인자가 높은 빈도를 나타내었고, 제주산마에서 VHL20-93 bp (0.2875), HTG4-131 bp (0.5875), AHT4 -161 bp (0.2500), HTG6-86 bp (0.3625), AHT5-132 bp (0.2375), HMS6-166 bp (0.3625), ASB2-239 bp (0.3125), HTG10-99 bp (0.3625), HTG7-119 bp (0.3500), HMS3-163 bp (0.3625), HMS2-225 bp (0.3250) 대립인자가 높은 빈도로 나타났다. 그리고 더러브렛에서 VHL20-91, 93 bp (0.2750), HTG4-131 bp (0.4875), AHT4-159 bp (0.3625), HTG6-86 bp (0.6875), AHT5-132 bp (0.5875), HMS6-166 bp (0.5500), ASB2-251 bp (0.2875), HTG10-87 bp (0.3125), HTG7-127 bp (0.4500), HMS3-149 bp (0.6125), HMS2-225 bp (0.7375) 대립인자가 높은 빈도로 관찰되었다 (Table 5).

Table 5-1. Alleles Frequencies of 11 Microsatellite for three groups of horses.

Locus	Allele size(bp)	Allele frequency		
		CNH n=36	CRH n=40	TB n=40
VHL20	85	0.0694	0.2750	0.2500
	87	0.0556	0.0375	-
	91	-	0.1250	0.2750
	93	0.2500	0.2875	0.2750
	95	-	0.0750	0.1875
	97	0.0417	0.0125	0.0125
	99	0.3333	0.0625	-
	101	0.0139	0.0125	-
	103	0.2361	0.1125	-

to be continued

Table 5-2. Alleles Frequencies of 11 Microsatellite for three groups of horses.

Locus	Allele size(bp)	Allele frequency		
		CNH n=36	CRH n=40	TB n=40
HTG4	127	0.0139	0.2000	0.4625
	129	0.2500	0.1375	-
	131	0.5972	0.5875	0.4875
	133	-	0.0125	0.0250
	135	0.0417	0.0250	-
	137	0.0972	0.0375	0.0250
AHT4	145	0.0972	0.1125	0.1375
	147	0.0139	0.1000	-
	149	-	0.1375	0.3125
	151	0.0694	0.0875	0.1875
	153	0.2500	0.0625	-
	155	0.0278	-	-
	157	0.1389	0.0875	-
	159	0.1944	0.1625	0.3625
	161	0.2083	0.2500	-
HTG6	74	-	0.0125	-
	80	0.0556	0.2375	0.2250
	84	0.0417	0.0250	-
	86	-	0.3625	0.6875
	92	-	-	0.0375
	94	0.0139	-	-
	96	0.7917	0.3500	0.0500
	98	0.0972	0.0125	-
AHT5	130	0.0694	0.1250	0.1750
	132	0.0694	0.2375	0.5875
	134	0.2361	0.1125	-
	136	-	0.2250	0.1500
	138	0.2778	0.1375	0.0875
	140	0.3056	0.1500	-
	142	0.0417	0.0125	-

to be continued

Table 5-3. Alleles Frequencies of 11 Microsatellite for three groups of horses.

Locus	Allele size(bp)	Allele frequency		
		CNH n=36	CRH n=40	TB n=40
HMS6	156	0.0417	0.1375	0.1250
	158	0.0417	0.0500	0.0375
	160	0.0972	0.2625	0.2750
	162	0.0139	0.0625	-
	164	0.5972	0.1125	0.0125
	166	0.2083	0.3625	0.5500
	168	-	0.0125	-
	ASB2	219	0.0833	0.0250
	221	-	0.0125	-
	235	0.0278	0.0125	-
	239	0.1944	0.3125	0.1375
	241	0.0278	-	-
	243	0.0139	0.1750	0.1000
	245	0.5000	0.2500	0.1125
	247	0.0556	0.0250	0.1000
	249	-	-	0.0125
	251	0.0972	0.1500	0.2875
	253	-	0.0375	0.2000
HTG10	87	0.0417	0.1375	0.3125
	89	0.0139	0.0125	-
	91	0.0139	0.0250	0.1875
	93	0.0694	0.0750	0.0875
	95	0.2083	0.1625	0.1375
	97	0.0417	0.0125	-
	99	0.2639	0.3625	0.1375
	103	0.0278	0.0250	-
	105	0.3056	0.0750	0.1375
	107	-	0.0625	-

to be continued

Table 5-4. Alleles Frequencies of 11 Microsatellite for three groups of horses.

Locus	Allele size(bp)	Allele frequency		
		CNH n=36	CRH n=40	TB n=40
HTG7	119	0.1528	0.3500	0.1125
	123	0.1389	0.1500	0.0125
	125	0.5139	0.1625	0.4250
	127	0.1528	0.2750	0.4500
	129	0.0417	0.0625	-
HMS3	149	0.1250	0.2500	0.6125
	157	0.0694	0.0875	0.1375
	159	-	0.0625	0.0500
	161	0.2639	0.1500	0.0375
	163	0.1806	0.3625	0.1375
	165	0.1667	0.0625	0.0125
	167	0.1528	0.0250	0.0125
	169	0.0417	-	-
HMS2	217	0.3750	0.1625	0.0250
	219	0.1250	0.1000	-
	221	0.1111	0.0750	0.0250
	223	0.1667	0.1500	0.1250
	225	0.2083	0.3250	0.7375
	227	-	0.0125	0.0875
	231	-	0.0500	-
	233	-	0.0250	-
	237	0.0139	0.1000	-

* CNH, Cheju-native horse; CRH, Cheju-racing horse; TB, Throughbred;
 -, not detected.

3. 이형접합도, 인자의 다형성, 친자부정률 분석

대립인자 빈도에 기초하여 이형접합도와 인자의 다형성, 친자부정률을 분석한 결과는 표 6, 표 7과 같다. 제주재래마, 제주산마, 더러브렛에서 이형접합도 기대치는 각각 0.364~0.836 (평균 0.699), 0.601~0.861 (평균 0.777), 0.450~0.834 (평균 0.638)로 관찰되었고 (Table 6), 인자의 다형성은 각각 0.341~0.801 (평균 0.656), 0.550~0.833 (평균 0.735), 0.405~0.801 (평균 0.580)로 관찰되었다 (Table 7). 제주재래마에서 인자의 다형성은 HMS3에서 0.801로 가장 높게 나왔으며, VHL20, AHT4, AHT5, HTG10, HMS2에서 0.70 이상으로 나왔고, 제주산마에서 인자의 다형성이 AHT4에서 0.833으로 가장 높게 나왔으며, VHL20, AHT5, HMS6, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2에서 0.70 이상으로 나왔다. 그리고 더러브렛에서는 인자의 다형성이 ASB2에서 0.801로 가장 높게 나왔고, VHL20, HTG10에서 0.70 이상으로 나왔다. 또한, 친자부정률은 각 좌위당 제주재래마 0.202~0.650, 제주산마 0.362~0.701, 더러브렛 0.247~0.653으로 나왔고, 11 개 좌위 조합시 제주재래마는 0.9999, 제주산마 0.9995, 더러브렛 0.9973이 나왔다.

Tabel 6. Number of alleles and heterozygosity of microsatellite for three groups of horses.

Locus	Number of alleles			OHet			EHet		
	CNH	CRH	TB	CNH	CRH	TB	CNH	CRH	TB
VHL20	7	9	5	0.806	0.875	0.775	0.772	0.812	0.760
HTG4	5	6	4	0.472	0.600	0.525	0.577	0.601	0.554
AHT4	8	8	4	0.861	0.850	0.750	0.833	0.861	0.726
HTG6	5	6	4	0.389	0.775	0.425	0.364	0.697	0.479
AHT5	6	7	4	0.694	0.925	0.650	0.773	0.834	0.602
HMS6	6	7	5	0.639	0.825	0.525	0.595	0.771	0.612
ASB2	8	9	8	0.722	0.725	0.775	0.701	0.794	0.834
HTG10	10	11	6	0.639	0.725	0.675	0.795	0.814	0.813
HTG7	5	5	4	0.667	0.775	0.650	0.678	0.759	0.612
HMS3	7	7	7	0.778	0.700	0.625	0.836	0.777	0.590
HMS2	6	9	5	0.750	0.775	0.450	0.771	0.827	0.450

* CNH, Cheju-native horse; CRH, Cheju-racing horse;

TB, Thoroughbred;

OHet, Observed heterozygosity; EHet, Expected heterozygosity

Tabel 7. PIC and PE values of microsatellite in three groups of horses.

Locus	PIC			PE		
	CNH	CRH	TB	CNH	CRH	TB
VHL20	0.723	0.776	0.705	0.543	0.619	0.509
HTG4	0.515	0.550	0.444	0.326	0.362	0.249
AHT4	0.798	0.833	0.665	0.645	0.701	0.463
HTG6	0.341	0.627	0.421	0.202	0.419	0.248
AHT5	0.724	0.799	0.550	0.542	0.645	0.360
HMS6	0.545	0.727	0.546	0.361	0.552	0.350
ASB2	0.660	0.752	0.801	0.483	0.582	0.653
HTG10	0.753	0.784	0.776	0.586	0.637	0.614
HTG7	0.629	0.708	0.521	0.441	0.520	0.316
HMS3	0.801	0.735	0.550	0.650	0.564	0.371
HMS2	0.725	0.796	0.405	0.547	0.649	0.247

* CNH, Cheju-native horse; CRH, Cheju-racing horse;

TB, Thoroughbred;

PIC, Polymorphic information content;

PE, Exclusion probability

IV. 고 찰

지금까지 말에서 개체 식별 및 친자 확인은 주로 항원 항체 반응에 의한 적혈구 항원형과 전기영동에 의한 혈구 및 혈청 단백질형 (Bowling 과 Clark, 1985; 신 등, 1999; 조 등, 2000) 등이 사용되어 왔는데, 이러한 방법들은 표준 항혈청 생산 및 검사에 많은 시간이 요구되는 등 과정이 복잡하고 판별의 정확도도 낮은 단점이 있다. 그러나 1985년 영국의 Jeffreys가 인간 게놈 (human genome)의 미오글로빈 유전자 (myoglobin gene)에서 높은 변이의 유전자 좌위를 제한효소처리와 부합화법 (southern hybridization)을 이용해 다형성이 있음을 밝혀 사람을 포함한 대부분의 동물에서 DNA 수준에서의 개체 식별 및 친자 확인이 가능하게 되었다 (Alford 등, 1994; Binns 등, 1995; Ellegren 등, 1992; 채 등, 1999).

DNA에 기초한 친자 확인 및 개체 식별은 사람과 동물에서 혈액과 단백질형 분석법을 대체해 가고 있는 실정이다. 현재 이용되고 있는 대표적인 방법은 초성위체 (microsatellite or short tandem repeats; STRs)로서 단백질 다형은 유전자상에 코드로 되어 있는 반면에 초성위체는 유전자 내에서 단백질의 정보를 담당하지 않는 인트론 (intron) 부위나 유전자 이외의 비코드 (non-code) 부위에 있다. 이것은 혈액형과 마찬가지로 멘델의 유전 법칙을 토대로 하고 있다 (Bowling, 1996). 그리고 대립인자 수가 많아 매우 높은 다형성을 보이며 중합효소연쇄반응법 (Polymerase chain reaction; PCR)을 이용하여 증폭할 수 있기 때문에 특정 좌위만을 분석할 수 있어 명확한 해석이 가능하고, 다량의 시료를 한꺼번에 검사할 수 있어 간단하고 빠르며 경제적이다. 또한 혈액, 머리카락의 모근, 구강의 상피세포 등 소량의 DNA 시료만 있어도 분석이 가능하여, DNA를 얻을 수 있는 시료라면 어느 것이든 이용이 가능하다 (Alford 등, 1994; Binns 등, 1995; Bowling 등, 1997; Marklund 등, 1994; 이 등, 1996; Fredholm 등, 1996). 초성위체는 개체 식별, 친자 확인, 혈통 분석, 유전자 지도 작성, 계통 연구 (Bailey 등, 1995; Bowling 등, 1997; Marklund 등, 1994; Mary 등, 1999) 등에 사람에서 뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개에까지 적용되고 있는 실정이다 (Alford 등, 1994; Binns 등, 1995; David 등, 1994; Glowatzki

등, 1995; Holly 등 1994; Pihkanen 등, 1996).

현재 말에서 초성위체는 약 30 여종의 좌위가 보고되어 있고, 그 좌위들은 2~4 bp 차이의 크기로 각 개체에 따라 다양하게 분포되어 있다. 이러한 초성위체 좌위 중에서 말의 개체 식별이나 친자 판정을 목적으로 하는 좌위는 대립인자의 수가 많고 이형접합도가 높으며, 염기수가 적은 것이어야 한다. 그리고 정확한 염기수나 반복 배열수가 용이하게 산출되는 범위의 것으로서 돌연변이율이 낮은 것이어야 한다 (Bowling, 1996; 이 등, 1996).

Cho 등 (2000)은 제주재래마 50 두를 대상으로 12 개의 초성위체 다형을 분석한 결과 대립인자의 수는 4~13 개, HMS7-174 bp (0.813), HTG6-94 bp (0.732), HTG4-132 bp (0.526) 대립인자 빈도가 높고, 이형접합도와 친자 부정률은 HTG10 (0.8860, 0.4881), AHT4 (0.8134, 0.4335), HMS3 (0.8052, 0.4988) 좌위가 다른 좌위보다도 높은 빈도를 보이며, 친자 판정 확률은 99.72 %라고 보고한 바 있다. 이것은 본 연구의 제주재래마에 대한 대립인자 출현이나 그 빈도수와 대체로 비슷하지만 다소 차이를 보였다. 그리고 Kakoi 등 (2000)은 더러브렛 2124 두를 대상으로 17 개의 초성위체 좌위를 분석한 결과, 대립인자의 수는 5~8 개로서 AHT5-132 bp (0.619), HTG4-128 bp (0.565), HMS3-153 bp (0.517), HMS6-167 bp (0.476), VHL20-94 bp (0.345) 등의 대립인자에서 높은 빈도를 보이며, 이형접합도와 친자부정률은 각각 ASB2 (0.833, 0.666), HTG10 (0.806, 0.620), HMS7 (0.781, 0.566) 좌위에서 다른 좌위보다 높게 나타났음을 보고하였다. 이것은 본 연구에서 대조군인 더러브렛의 대립인자 출현과 빈도수와 유사하였다. 이렇듯 대립인자 출현과 빈도수에 다소 차이를 보이는 것은 검사 대상에 대한 차이로 보이고, 앞으로 제주재래마에 대한 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

이 실험에서 각 종간의 비교에서 제주재래마에서는 AHT4 (155 bp), ASB2 (241 bp), HMS2 (169 bp), HTG6 (94 bp), 제주산마에서는 ASB2 (221 bp), HMS2 (231 bp, 233 bp), HMS6 (168 bp), HTG6 (74 bp), HTG10 (107 bp), 그리고 더러브렛에서는 ASB2 (249 bp), HMS6 (92 bp)와 같이 다른 집단에는 없으면서 고유의 집단에만 있는 대립인자들이 관찰되었다. 더 많은 연구로 이러한 인자들을 각 품종의 식별에 이용할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고 제주산마는 제주재래마와 더러브렛에 있는 좌위를 함께 가지고 있어 교잡이 되었다는 추정이 되었다. 그리고 두 품종에는 없는 대립인자가 있어 다른 품종과의 교잡이 이루어졌음을 추측할 수 있었다.

이러한 결과를 미루어 볼 때, 제주재래마와 제주산마, 더리브랫은 다소 상이한 다른 집단임을 알 수 있었다. 그리고 신속하고 효율성이 높은 초성 위체 분석을 제주마의 개체 식별 및 친자 관계 규명에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

제주도에서 사육되고 있는 제주재래마 36 두, 제주산마 40 두, 더러브렛 40 두를 대상으로 초성위체 다형성을 조사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 제주재래마에서는 대립인자 수가 5~10 개로, VHL20-99 bp (0.3333), HTG4-131 bp (0.5972), AHT4-153 bp (0.2500), HTG6-96 bp (0.7917), AHT5-140 bp (0.3056), HMS6-164 bp (0.5972), ASB2-245 bp (0.5000), HTG10-105 bp (0.3056), HTG7-125 bp (0.5139), HMS3-161 bp (0.2639), HMS2-217 bp (0.3750)에서 높은 빈도로 관찰되었고, 이형접합도 기대치와 인자의 다형성치가 각각 0.364~0.836 (평균 0.699), 0.341~0.801 (평균 0.656)이었으며, 11 개의 좌위에 대한 친자 판정률은 99.95 %가 나왔다.

2. 제주산마에서는 대립인자 수가 5~11 개로, VHL20-93 bp (0.2875), HTG4-131bp (0.5875), AHT4-161 bp (0.2500), HTG6-86 bp (0.3625), AHT5-132 bp (0.2375), HMS6-166 bp (0.3625), ASB2-239 bp (0.3125), HTG10-99 bp (0.3625), HTG7-119 bp (0.3500), HMS3-163 bp (0.3625), HMS2-225 bp (0.3250)에서 높은 빈도로 관찰되었고, 이형접합도 기대치와 인자의 다형성치가 각각 0.601~0.861 (평균 0.777), 0.550~0.833 (평균 0.735)이었으며, 11 개의 좌위에 대한 친자 판정률은 99.99 %가 나왔다.

3. 더러브렛에서는 대립인자 수가 4~8 개로 VHL20-91, 93 bp (0.2750), HTG4-131 bp (0.4875), AHT4-159 bp (0.3625), HTG6-86 bp (0.6875), AHT5-132 bp (0.5875), HMS6-166 bp (0.5500), ASB2-251 bp (0.2875), HTG10-87 bp (0.3125), HTG7-127 bp (0.4500), HMS3-149 bp (0.6125), HMS2-225 bp (0.7375)에서 높은 빈도로 관찰되었고, 이형접합도 기대치와 인자의 다형성치가 각각 0.450~0.834 (평균 0.638), 0.405~0.801 (평균 0.580)으로 관찰되었으며, 11 개의 좌위에 대한 친자 판정률은 99.73 %가 나왔다.

4. 제주재래마에서는 AHT4 (155 bp), ASB2 (241 bp), HMS2 (169 bp), HTG6 (94 bp), 제주산마에서는 ASB2 (221 bp), HMS2 (231 bp, 233 bp), HMS6 (168 bp), HTG6 (74 bp), HTG10 (107 bp), 더러브렛에서는 ASB2 (249 bp), HMS6 (92 bp)와 같은 대립인자가 고유하게 관찰되었다.

5. 제주재래마와 제주산마, 더러브렛은 일부의 좌위에서 다소 차이가 있는 것으로 확인되어 다른 집단을 구성하고 있었다. 그리고 이러한 다형성을 이용하면 말에서 효과적으로 친자 판정에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

Alford, R.L., Hammond, H.A., Coto, I., Caskey, T. 1994. Rapid and Efficient Resolution of Parentage by Amplification of Short Tandem Repeats. *Am J Hum Genet.* 55:190~195

Bailey, E., Graves, K.T., Cothran, EG., Reid, R., Lear, T.L., Ennis, R.B. 1995. Synteny-mapping horse microsatellite markers using a heterohybridoma panel. *Anim Genet.* 26:177~180

Binns, M.M., Holmes, N.G., Holliman, A., Scott, A.M. 1995. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Br vet J.* 151:9~13

Bowling, A.T. 1996. Horse genetics. CAB International. pp. 82~96

Bowling, A.T., Clark, R.S. 1985. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim Blood Groups Biochem Genet.* 16:93~108

Bowling, A.T., Eggleston-Stott, M.L., Byrns, G., Clark, R.S., Dileanis, S., Wictum, E. 1997. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet.* 28:247~252

Bozzini, M., Fantin, D., Ziegle, J.S., Van Haeringen, H., Jacobs, W., Ketcham, M., Spencer, M., Bates, S. 1997. Automated Equine Paternity Testing. *PE Applied Biosystems.* 1

Breen, M., Downs, P., Irvin, Z., Bell, K. 1994. Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the przewalski's horse (*E.przewalskii*). *Anim Genet.* 25(6):401~405

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

Cho, G.J., Kim, B.H., Lee, D.S., Shin, J.A. 2000. Usefulness of Microsatellite Markers for Hoerses Patentage Testing. *Korean J Genet.* 22(4):281~287

David, E., Ronan, T., Loftus, T., Bradley, G., Paul, M. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc R Soc Lond B.* 256:25~31

Ellegren, H., Johansson, M., Sandberg, K., Andersson, L. 1992. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim Genet.* 23:133

Fredholm, M., Wintero, A.K. 1996. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim Genet.* 27:19~23

Glowatzki-Mullis, M.L., Gaillard, C., Wigger, G., Fries, R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genet.* 26:7~12

Guerin, G., Bertaud M., Amigues, Y. 1994. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS15 and HMS20. *Anim Genet.* 25:62

Holly, A.H., Li, Jin, Zhong, Y., Thomas Caskey, C., Ranajit Chakraborty. 1994. Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for Use in Personal Identification Applications. *Am J Hum Genet.* 55:175~189

Janet, S., Ying, Su, Kevin, P., Corcoran, Nie, Li, Eric Mayrand P., Louis, B.H., Lincoln, J.M., Mel, N.K., Scott, R.D. 1992. Application of Automated DNA Sizing Technology for Genotyping Microsatellite Loci. *Genomics.* 14:1026~1031

Kakoi, H., Nagata, S., Kurosawa, M. 2000. Microsatellite DNA testing for parentage verification of thoroughbreds. *Pros 29th ISAG Conf Anim Genet.* 90

Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E., Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol.* 7:639~655

Marklund, S., Ellegren, H., Eriksson, S., Sandberg, K., Andersson, L. 1994. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Anim Genet.* 25:19~23

Mary Joseph, Sher ali. 1999. Analysis of Conserved Microsatellite Sequences Suggests closer Relationship between Water Buffalo *Bubalus bubalis* and Sheep *Ovis aries*. *DNA AND Cell Biol.* 18(6):513~519

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215

Pihkanen, S., Vainola, R., Varvio, S. 1996. Characterizing dog breed differentiation with microsatellite markers. *Anim Genet.* 27:343~346

Van Haeringen, H., Bowling, A.T., Stott, M.L., Lenstra, J.A., Zwaagstra, K.A. 1994. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Anim Genet.* 25:207

신진아, 김상휘, 김영훈, 전창익, 이경갑. 1999. 제주마의 혈청단백질 유전적 다형현상. *J Res Ins Anim Sci.* 14: 149~157

이광전, 이연근, 박경도, 김정언, 안준천. 1996. 더러브렛 경주마에 있어서 HMS7과 EA2C4 microsatellites를 이용한 친자감별. *Korean J Anim Sci.* 38(1):1~8

정창조, 양영훈, 김중규, 강민수. 1991. 제주재래마 혈통 정립 및 혈통 등록을 위한 조사 연구- I. 제주의 지역별, 성별, 연령별 체형 측정치. *한국유전학회*. 33(6):418~422.

조길재, 김봉환. 2000. 더러브렛 말의 혈액형에 관한 연구. *대한수의학회지*. 40(4):683~689

조길재, 김봉환, 유창준, 김택수. 1998. PCR 기법을 이용한 말의 Microsatellite 분석. *Korean J Vet Publ Hlth*. 22(3):225~231

채영진, 김동근, 김하나, 이문한, 황우석, 이병천, 윤화영, 이항. 1999. Microsatellite 대립유전자 분석을 통한 개에서의 친자감별. *Korean J Vet Res*. 39(1):213~219

한방근, 장덕지, 김상근, Hiroshi Matsumoto. 1992. 면역항혈청에 의한 제주마 혈액형 분석. *Korean J Vet Res*. 32(3):451~456

Abstract

Studies on microsatellite polymorphism of Cheju-native horse and Cheju-racing horse

Seongin Im

(Supervised by Professor Kyoungkap Lee)

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Jeju, Korea

This study was carried out to investigate the polymorphism of the microsatellite markers in three horses group (36 Cheju-native horse, CNH; 40 Cheju-racing horses, CRH; 40 Thoroughbreds, TB for control) in Jeju. Eleven microsatellite loci (AHT4, AHT5, ASB2, HMS2, HMS3, HMS6, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, and VHL20) was typed, and their allele frequency, heterozygosity, polymorphic information content (PIC) and exclusion probability (PE) were estimated.

Alleles observed with high frequency (>0.5) were HTG4 (131 bp), HTG6 (96 bp), HMS6 (164 bp), ASB2 (245 bp), and HTG7 (125 bp) in the CNH group, HTG4 (131 bp) in the CRH group, HTG6 (86 bp), AHT5 (132 bp), HMS6 (166 bp), HMS3 (149 bp), and HMS2 (225 bp) in the TB group. The numbers of alleles for eleven loci were 5 to 10, and the expected heterozygosity and PIC value were $0.364\sim 0.836$ (mean 0.699), $0.341\sim 0.801$ (mean 0.656) in the CNH group. The numbers of alleles in the

CRH group were 5 to 11, and the expected heterozygosity and PIC value were 0.601~0.861 (mean 0.777), 0.550~0.833 (mean 0.735). And the numbers of alleles in the TB group were 4 to 8, and the expected heterozygosity and PIC value were 0.450~0.834 (mean 0.638), 0.405~0.801 (mean 0.580). The combined PE of 11 markers in the CNH, CRH and TB group were 99.95 %, 99.99 % and 99.73 %, respectively.

The results showed that the polymorphism of eleven loci in Jeju horses was than higher that in the TB group, suggested that these eleven loci could also be used in parentage test of Jeju horses.

Key words: Cheju-native horse, microsatellite,
allele frequency, heterozygosity,
polymorphic information content, exclusion probability