

Microsatellite DNA형에 의한 개의 친자감정에

조길재* · 조병욱¹ · 이길왕¹ · 김선구¹ · 김용균²

한국마사회 유전자검사실
¹밀양대학교 동물자원학과
²밀양대학교 생물공학과

A Case of Parentage Testing in Dog by Microsatellite DNA Typing

Gil-Jae Cho*, Byung-Wook Cho¹, Kil-Wang Lee¹, Sun-Ku Kim¹ and Yong-Kyun Kim²

Laboratory of Equine Genetics, Korea Racing Association, Gwachon 427-070, Korea
¹Department of Animal Science, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea
²Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

Abstract

We performed this study to determine the parentage verification of putative dogs. A total of 7 samples (4 Labrador Retriever dog and 3 Poongsan dog) were genotyped by using 12 international markers (PEZ1, PEZ5, PEZ8, PEZ10, PEZ11, PEZ12, PEZ17, PEZ20, PEZ21, FHC2010, FHC2054, FHC2079). This methods consisted of multiplexing PCR procedures, and it showed reasonable amplification of all PCR products. Genotyping was performed with an ABI 310 genetic analyzer. Labrador Retriever Pup I and Pup II were included according to principles of Mendelian genetics in all loci, while Poongsan Pup III was excluded with markers PEZ1 (106/118), PEZ10 (276/300), and FHC2010 (228/232). These results suggest that the present DNA typing is so useful for parentage verification of these two breeds.

Key words – dog, microsatellite, parentage verification.

서 론

개를 포함한 대부분의 동물은 평생동안 변하지 않고 부모로부터 반반씩 물려받는 멘델의 유전양식에 따라 사람의 ABO식과 유사한 적혈구항원형과 혈액단백질형을 검사하는 혈액형 감정에 의해서 주로 동물의 품종이나 개체식별 및 친자확인에 이용하고 있다. 그러나 최근에는 분자유전학과 DNA 분석기술의 발달로 인해 유전자지문 기법이

나 microsatellite DNA형을 이용하여 친자감정은 물론 품종간의 유전적 특징 및 계통분류에도 활용하고 있는 실정이다. DNA 표지인자의 종류는 반복수의 차이에 의해 나타나는 VNTR (variable number of tandem repeat)형태로 minisatellite와 microsatellite 부위에 의한 표지인자들이 포함된다. 단백질의 다형은 유전자 상에 코딩되어 있지만 유전자내에서 단백질의 정보를 담당하고 있지 않는 인트론부위나 유전자이외의 비코드 영역에 반복배열의 반복수가 다른 다형이 존재하는 것이 알려진 이래 현재 이용되고 있는 대표적인 DNA typing은 microsatellite DNA typing 또는 short tandem repeats (STRs)이다[3]. Microsatellite

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-2-509-1933, Fax : 82-2-509-1909
E-mail : chogj@mail.kra.co.kr

DNA는 non-code 부위에 다형성이 풍부하고 검출이 간편하여 소[4,6], 말[1,2,10], 돼지[8] 등의 다양한 동물에서 분자유전학적 특징 연구에 응용하고 있다. 진핵세포의 DNA는 한 개 혹은 여러개의 nucleotide가 일정한 규칙에 의해서 반복적으로 배열된 형태의 satellite DNA가 존재하는데 이들 satellite DNA중 2~4개의 nucleotide가 반복적으로 배열된 형태를 초위성체(microsatellite)라고 하며 이들 초위성체가 각 개체간에 아주 높은 빈도의 유전적 다형성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[7,9]. 염색체 DNA중에 고르게 분포된 microsatellite locus가 개체간 다양한 변이를 보임으로서 개 품종간 유연관계 분석에 쓰일 뿐만 아니라 염색체 지도 작성의 주요한 marker로서 알려져 있다. American Kennel Club(AKC)은 전세계 개 품종의 절반인 151개 품종의 개를 등록하고 있다[5].

사람과 가장 친숙한 반려동물로서 알려진 개는 약 400여종 이상의 품종이 지구상에 분포되어 있고 국내에는 120여종 이상이 사육되고 있는 것으로 알려져 있다. 최근 애완동물산업의 괄목할만한 성장으로 국내에는 우리 고유의 재래종 개를 포함하여 각종의 애완개가 200만두 이상 사육되고 있는 것으로 알려져 있고 이로인해 우수 혈통을 가진 개의 구입이나 분실로 인한 분쟁 등 종래에 비해서 개의 개체식별이나 친자확인 중요성이 대두되고 있다. 미국을 비롯한 선진국에서는 다른 동물과 마찬가지로 개의 혈통 보존 및 개량을 목적으로 친자확인을 위한 microsatellite DNA형 감정을 실시하거나 연구중에 있으나 국내에서는 이제 시작단계로서 상당히 미진한 실정이다. 이와같은 배경하에서 본 연구는 국내에서 사육중인 개를 대상으로 microsatellite DNA형에 의한 친자감정의 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

국내에서 사육중인 Labrador Retriever 강아지 2두와 풍산개 강아지 1두, 그의 부모 각각 2두를 포함 모두 7두를 대상으로 하였다. 재료는 개의 경정맥으로부터 Heparin 튜브(Becton Dickinson, USA)에 채혈한 혈액에서 Tozaki 등[10]의 방법에 준하여 DNA를 분리하였다.

Marker 선정 및 PCR

DNA형 분석을 위한 microsatellite 좌위는 Table 1에서 보는 바와 같이 Stockmarks (Applied Biosystems, USA) 12개(PEZ1, PEZ5, PEZ8, PEZ10, PEZ11, PEZ12, PEZ17, PEZ20, PEZ21, FHC2010, FHC2054, FHC2079)의 좌위를 선정하여 manufacturer의 방법에 따라 DNA를 증폭하였다. Multiplex-PCR은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 수행하였으며 PCR 과정은 먼저 95℃에서 12분간 가열하여 변성을 유도하고 95℃에서 30초간 denaturation, 58℃에서 30초간의 annealing 그리고 72℃에서 1분간의 extension의 3단계로 총 20회 반복과 다시 95℃에서 30초간 denaturation, 56℃에서 30초간의 annealing 그리고 72℃에서 1분간의 extension의 3단계로 총 15회 반복하였다. 그리고 72℃에서 30분간 extension을 실시하였다. 증폭된 DNA는 2.5% agarose gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인하였다.

Microsatellite DNA형 분석

증폭된 DNA는 유전자형 자동분석기(Perkin-Elmer ABI Prism 310 Genetic Analyzer, USA)에 의해 전기영동하고 검출된 각 유전자좌의 대립유전자는 GeneScan Ver.2.1 (Perkin-Elmer)으로 분석한 후 Genotyper Ver.2.5(Perkin-Elmer)을 이용하여 각 marker별 대립유전자의 base 크기를 결정한 후 친자관계 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

Microsatellite DNA형에 의한 친자감정

연구대상개 3두와 그의 부모를 포함 총 7두를 대상으로 microsatellite marker 12개에 대한 친자감정 결과는 Fig. 1과 Table 2에서 보는 바와 같다. Labrador Retriever Pup I과 Pup II는 12개 marker 모두에서 멘델의 유전법칙에 따라 친자관계가 성립되었으나 풍산개인 Pup III은 PEZ1 (106bp/118bp), PEZ10 (276bp/300bp), FHC2010 (228bp/232bp) 등 3개 marker에서 유전법칙에 어긋나 친자관계가 성립되지 않았다. Fig. 1은 Labrador Retriever 부, 모, 자를 대상으로 FHC 2054 marker에 대한 결과로서 부의 대립유전자 크기는 145bp와 169bp, 모는 149bp를 나타낸 반면 Pup I은 145bp와 149bp, Pup II는 149bp와 169bp로 나타

Table 1. The international marker of microsatellite DNA in dog

Marker	Primer sequences (5' → 3')	Allele size range (bp)
PEZ1	(FAM)-GGCTGTCACCTTTCCCTTC CACCACAATCTCTCATAAATAC	92-136
PEZ5	(JOE)-GCTATCTTGTTCCACAGC TCACTGTATAACAATTGTC	97-121
PEZ8	(NED)-TATCGACTTATCACTGTGG ATGGAGCCTCATGTCTCATC	222-260
PEZ10	(NED)-CTTCATTGAAGTATCTATCC CCTGCCCTTTGTAATGTAAG	230-335
PEZ11	(JOE)-ATTCTCTGCCTCTCCCTTG TGTGGATAATCTCTTCTGTC	122-180
PEZ12	(JOE)-GTAGATTAGATCTCAGGCAG TAGGTCTGGTAGGGTGTGG	250-320
PEZ17	(NED)-CTAAGGGACTGAACTTCTCC GTGGAACCTGCTTAAGATTC	188-230
PEZ20	JOE Unknown	174-201
PEZ21	FAM Unknown	70-120
FHC2010	(FAM)-AAATGGAACAGTTGAGCATGC CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	210-260
FHC2054	(FAM)-GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	140-183
FHC2079	(NED)-CAGCCGAGCACATGGTTT ATTGATTCTGATATGCCACGC	263-299

Table 2. The results of parentage testing by 12 microsatellite loci in dog

Sample	Loci											
	PEZ1	PEZ5	PEZ8	PEZ10	PEZ11	PEZ12	PEZ17	PEZ20	PEZ21	FHC2010	FHC2054	FHC2079
Sire	114/114*	109/109	237/241	236/236	134/142	265/269	198/218	178/184	88/96	228/236	145/169	278/278
Dam	122/122	105/109	237/249	236/288	126/134	277/281	198/202	174/178	96/96	232/236	149/149	278/278
Pup I	114/122	105/109	237/249	236/236	126/134	269/277	198/202	178/178	96/96	232/236	149/169	278/278
Pup II	114/122	105/109	237/241	236/288	134/142	265/277	198/198	174/178	96/96	232/236	145/149	278/278
Sire	106/118	97/109	233/237	276/304	138/150	273/273	214/222	178/186	96/96	228/236	149/153	274/274
Dam	110/126	105/105	229/237	276/304	126/130	277/313	198/202	178/182	88/96	228/228	153/173	274/274
Pup III	106/118	97/105	237/237	276/300	130/150	273/313	202/214	178/178	88/96	228/232	153/173	274/274

*Allele size (bp).

나 친자관계가 성립되었다.

근래에 들어 국내 애완동물 산업의 괄목한 만한 성장으로 애완동물의 국제간 이동 증가, 혈통과 유전형질이 우수한 품종 선호 및 사육 두수 증가에 따른 사육시 분실과 순수 혈통의 진위여부를 둘러싼 분쟁 등 종래에 비해서 애완동물의 개체식별이나 친자감정의 중요성이 대두됨에 따라

신속하고 정확하며 경제적인 감정기법을 요구하고 있다.

1985년 영국의 Jeffreys 등[7]에 의해 human genome의 myoglobin gene에서 고변이 유전자 좌위를 제한효소처리와 Southern hybridization에 의해 다형성이 있는 것으로 알려지면서 사람을 포함한 대부분의 동물에서 DNA수준에서의 개체식별 및 친자확인이 가능하게 되었다. 현재 각

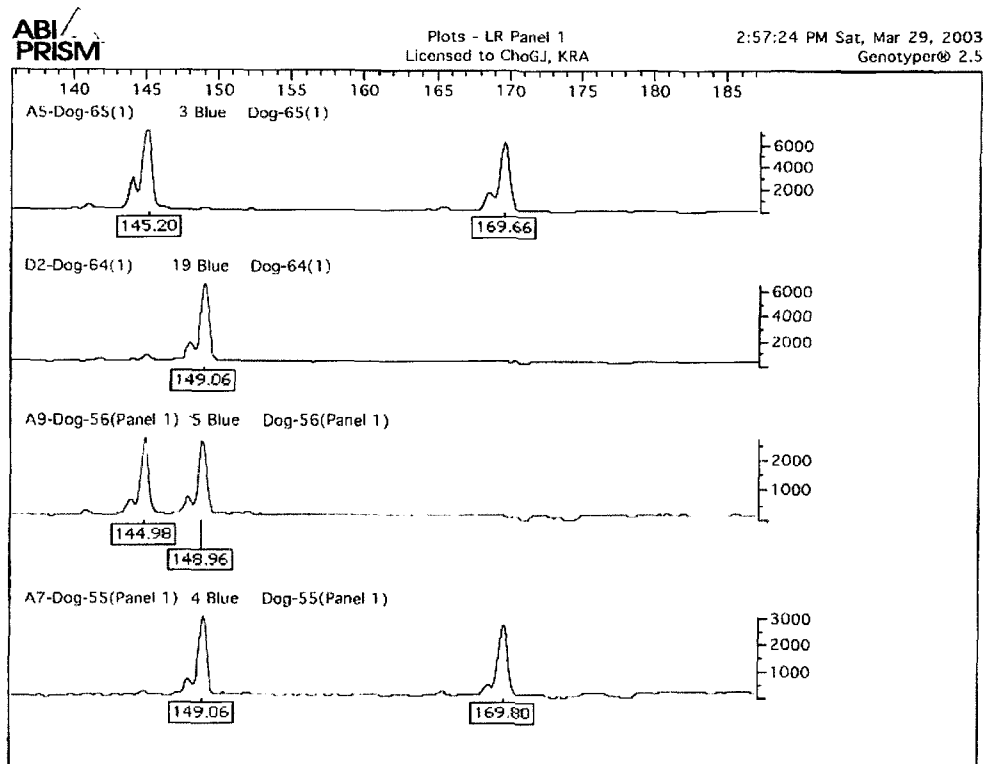


Fig. 1. Electropherogram of FHC2054 microsatellite marker in Labrador Retriever dog using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer.

국의 개 친자감정기관을 중심으로 모인 국제동물유전학회 (International Society of Animal Genetics; ISAG) 개 분과 위원회에서는 29개의 microsatellite marker를 국제 panel로 정하였고 본 연구에 사용된 marker중에는 PEZ8, PEZ10, PEZ11, PEZ12, FHC2054 등의 marker가 국제 panel에 포함되어 있으며 이들 marker외에도 각 품종별로 PIC가 0.7 이상인 marker를 중심으로 개의 친자감정에 선택하여 이용하면 더욱더 정확한 결과를 거둘 것으로 기대된다. 또한 microsatellite marker의 대립유전자의 base 크기가 각국의 검사실마다 조금씩 상이하기 때문에 국제적으로 통용할 수 있는 명명법의 정립을 목적으로 각국의 검사기관 상호간에 개 비교동정시험을 통한 표준화를 위해 노력하고 있다.

Microsatellite DNA형에 의한 개의 친자확인에 관한 국제 가이드라인은 아직 정립되지 않은 상태이나 말의 경우 9개의 국제최소검사항목 중 2개 이상의 marker에서 멘델의 유전양식에 일치하지 않을 경우 모순으로 판정하거나 추가적인 marker로 검사하도록 권장하고 부권부정율 99.95% 이상을 요구하고 있어 개의 경우도 이에 준하여 판정하

면 될 것으로 사료된다.

요 약

Microsatellite DNA형에 의한 개의 친자감정을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. Labrador Retriever Pup I과 Pup II는 12개 marker 모두에서 멘델의 유전법칙에 따라 친자관계가 성립되었으나 풍산개인 Pup III은 PEZ1 (106bp/118bp), PEZ10 (276bp/ 300bp), FHC2010 (228bp/ 232bp) 등 3개 marker에서 유전법칙에 어긋나 친자관계가 성립되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Cho, G. J. 2002. Microsatellite DNA polymorphism of thoroughbred horses in Korea. *Korean J. Genetics* **24**, 177-182.
2. Cho, G. J., Y. J. Yang, H. S. Kang and B. W. Cho. 2002. Genetic diversity and validation of microsatellite

- markers for Jeju native horse parentage testing. *Korean J. Genetics* **24**, 359-365.
3. Fredholm, M. and A. K. Wintero. 1995. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Animal Genetics* **27**, 19-23.
 4. Glowatzki-Mullis, M. L., C. Gaillard, G. Wigger and R. Feies. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics* **26**, 7-12.
 5. Halverson, J. L. and J. W. Edwards. 2000. Microsatellite polymorphism in dog breeds-the AKC Parent Club study. *Proc. 27th ISAG Conference on Animal Genetics*. pp. 19.
 6. Han, S. K., H. D. Byun and E. Y. Chung. 2000. Genetic diversity analysis and parentage control in Korean native cattle using Microsatellite. *Proc. 27th ISAG Conference on Animal Genetics*. pp. 88.
 7. Jeffreys A. J., V. Wilson and S. L. Thein. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* **314**, 67-73.
 8. Kim, K. S. and C. B. Choi. 2002. Genetic structure of Korean native pig using microsatellite markers. *Korean J. Genetics* **24**, 1-7.
 9. Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American J. Human Genetics* **44**, 397-401.
 10. Tozaki, T., H. Kakoi, S. Mashima, K. I. Hirota, T. Hasegawa, N. Ishida, N. Miura, N. H. Choi-Miura and M. Tomita. 2001. Population study and validation of paternity testing for thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Veterinary Medicine Science* **63**, 1191-1197.

(Received April 28, 2003; Accepted July 30, 2003)