

## 유전자감식에 의한 개에서의 친자감별

채영진 · 이병천 · 이 항<sup>1</sup>  
서울대학교 수의과대학

### Paternity test in dogs by DNA analysis

Young-Jin Chae, Byeong-Chun Lee and Hang Lee<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Seoul National University. 441-744, Suwon, Korea

**ABSTRACT :** The biological father of two Golden Retriever puppies was determined between two proposed stud dogs by using microsatellite DNA analysis. DNA was obtained from all the relevant dogs by buccal swabbing and three loci of tetranucleotide repeat microsatellite were PCR-amplified, and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. One of the two proposed stud dogs was assigned as the biological father of the puppies by the genotyping. The result demonstrated that the microsatellite DNA analysis is a simple, efficient method of paternity test in dogs.

**Key words :** paternity test, dog, microsatellite, PCR, silver staining

## 서 론

개는 사람과 가장 친근한 동물이며 아마도 가장 먼저 가축화된 동물로 생각되고 있다. 개는 사람에게 애완동물(pet animal) 혹은 반려동물(companion animal)로서 뿐만 아니라 재난구조견, 사냥견, 목축견, 경비견, 경찰견, 군용견 등 다양한 실용적 목적을 위해 사육되고 있다. 특히 사회가 도시화, 핵가족화, 노령화 될 수록 삶의 반려자로서 개의 역할은 점점 더 중요해지고 있다. 많은 연구자료들은 어린이들이나 노인, 육체적, 정서적으로 불안정한 환자들 뿐 아니라 보통 사람들에게도 반려동물로서 애완견은 정서적으로 커다란 안정감을 가져다 주는 것으로 보고되어 있다.<sup>5,10</sup>

근래에 우리나라에서도 애완동물(반려동물)에 대한 관심이 증대되면서 애완견으로서 개를 키우는 사람이 늘어났다. 어떠한 개라도 애완견이 될 수 있겠지만 혈통이 고정된 순종견은 다 자랐을 때의 체격과 모양, 성질 등을 예측할 수 있기 때문에 키우는 사람의 거주 조건, 환경, 기호, 목적 등에 따라 다양한 품종 중에서 선택을 할 수 있다. 이러한 순종견의 혈통은 순종견끼리의 교배에 의하여 이어지게 되는데, 같은 순종견이라도 그 개체의 품종으로서 완성도는 그 가계의 혈통

과 환경에 따라 많은 차이가 있다. 그러므로 애견인들은 순종견의 가계보를 중요시하게 되는데 이러한 가계의 혈통기록을 유지하기 위하여 각 나라에는 순종견의 혈통을 등록하고 혈통서를 발급하는 애견협회가 있다. 미국에는 미국애견협회(AKC, American Kennel Club)가 있고 영국에는 UK Kennel Club이 있어 이러한 협회에 등록된 혈통서는 순종과 가계혈통의 보증으로 신뢰되고 있다. 우리나라에도 크고 작은 여러 애견협회와 진도견협회들이 있으나 이러한 협회들에서 발행하는 혈통서는 선진외국에서와 같은 권위와 신뢰를 확보하고 있지 못한 실정이다. 그 이유 중의 하나는 현재 혈통등록은 번식가가 신고하는 대로 인정할 수밖에 없는 실정인데 적지 않은 번식가들이 고의 혹은 실수로 잘못된 혈통관계를 등록하고 있다는 의심을 받고 있기 때문이다. 이러한 불신은 진돗개 등 국내 토종견에서도 마찬가지로 퍼져 있으며 이것은 국내 토종견의 건전한 보급과 혈통유지 및 고정사업에 커다란 장애요인으로 작용하고 있다. 그러므로 이러한 의심을 해소시킬 수 있다면 진돗개, 풍산개, 삼사리 등 국내 토종견의 유전자원을 보호육성하고, 더 나아가서는 건전한 애견문화를 정착시키는데 커다란 기여를 할 수 있을 것이다.

모든 가축에서 육종에 의한 유전적 형질개량은 생산성향상에 있어 중요한 역할을 하여 왔다. 육종개량

<sup>1</sup>Corresponding author.

은 애완동물인 개에 있어서도 마찬가지로 중요하며 사실상 지난 수백년 동안 선택번식과 근교배에 의하여 오늘날과 같은 많은 종류의 순종견이 나타나게 되었다. 순종견 혈통의 유지와 개량은 정확한 친자관계에 바탕을 두게 되나, 번식가의 실수 혹은 고의에 의하여 많은 자견들이 잘못된 혈통등록을 하게된다. 예를들어 미국애견협회(AKC)에서는 1998년부터 등록하는 순종견에 대하여 유전자감식에 의한 친자감별로 실사를 하고 있는데, 1998년 1월부터 6월까지 6개월간 실시한 8000마리의 유전자 샘플 조사에서 전문번식업자에 의하여 등록되는 자견들의 12%가 잘못된 혈통등록을 하였던 것으로 보고되었으며 이들은 모두 등록이 취소되었다(<http://www.akc.org/dnawhite.htm>). 우리나라에서는 잘못된 혈통등록에 대한 조사가 이루어진 적은 없지만 그 비율이 미국의 경우보다 훨씬 높을 것으로 예상된다.

전통적으로 사람이나 동물에서 친자감별 및 개체식별은 혈액형 분석, 혈액단백질 다형분석 방법 등에 의존하였으나 분자유전학과 DNA 분석기술의 발달로 인하여 유전자분석에 의한 친자감별법으로 거의 대체되어 가고 있다. 그 이유는 유전자분석에 의한 친자감별법이 다른 방법들에 비하여 정확도가 높으며 분석방법도 간편하기 때문이다. 유전자분석에 의한 친자감별법에는 미세위성체(minisatellite)를 이용한 유전자 지문법(DNA fingerprinting), 제한효소절편다형(restriction fragment length polymorphism, RFLP)분석법, 초미세위성체(microsatellite)분석법 등의 여러 가지 방법들이 있다. 초기에는 유전자지문법이 사람과 동물에서 주류를 이루었으나 현재에는 microsatellite 분석법이 여러 가지 이점을 가지고 있어 각광을 받고 있다.<sup>1,3,7,8,11,3,15</sup>

Microsatellite는 short tandem repeat(STR)이라고도 불리우며 2개 내지 6개 단위의 염기가 연속적으로 반복되는 구조를 가진 DNA 부분으로, 포유류의 게놈 전체에 걸쳐 고루 분포하고 있다. Microsatellite는 개체에 따라 반복되는 단위의 수가 달라 상당히 높은 다형현상을 보이며, 이러한 반복수는 멘델의 유전법칙에 따라 유전되므로 개체식별 및 친자감별에 강력한 도구로 이용될 수 있다. 더욱이 microsatellite는 그 길이가 수백 bp 이내로 짧기 때문에 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 의하여 쉽게 증폭되어 그 대립유전자의 길이를 전기영동으로 정확하게 결정할 수 있다. 그러므로 그 분석과정이 Southern blot 기술이 필요한 유전자지문법보다 훨씬 간편하고 대립유전자의 크기결정과 통계적인 분석도 명확한 이점이 있다.<sup>9,11</sup>

본 연구실은 microsatellite를 이용한 개에서의 친자

감별법을 확립하고 그 응용성을 확인하기 위하여 서울대학교 수의과대학 부속동물병원에 의뢰된 친자감별건에 대하여 microsatellite DNA 분석실험을 실시하였다. 의뢰인은 경기도 지역에 거주하는 견주로서 Golden Retriever 암컷 한 마리와 수컷 두 마리를 사육하면서 두 마리의 수컷을 하루 걸러 암컷과 교배를 시켰으므로 친부를 알 수 없는 경우였다. 본 연구실에서 확보하고 있는 microsatellite marker들을 이용하여 두 자견의 친부를 명확히 가려 낼 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 동물

친부를 알 수 없는 Golden Retriever 자견 2두와 부견으로 의심되는 수컷 2두를 실험에 사용하였다. 모견은 실험 이전에 처분되어 샘플을 구할 수 없었다.

### 시약

사용한 모든 시약은 별도의 표시가 없는 한 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 주문하여 사용하였다.

### DNA 준비

DNA 추출을 위한 세포를 얻기 위해 자견 2마리 및 부견후보 2마리의 구강내벽을 칫솔로 5~6회 문질러 phosphate buffered saline (PBS, 0.01M sodium phosphate, pH 7.0) 3 ml에 담그어 진탕시킨 후 10,000×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포는 lysis buffer (100 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, 1%(w/v) SDS, 100 µg/ml proteinase K, pH 8.0) 200 µl에 60°C에서 2시간 동안 녹인 후 다시 10,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 이물질 제거하였다. 이물질이 제거된 lysate에 isopropanol 500 µl를 첨가하여 DNA를 침전시키고 Wizard DNA Clean Up system(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 정제한 후 PCR 반응에 이용하였다.

### PCR

Microsatellite 유전자형 분석에 사용한 좌위들은 Fransisco 등<sup>6</sup>에 의해 보고된 tetranucleotide repeat sequence(GAAA)<sub>n</sub>에 대한 primer pair들 중에서 비교적 polymorphic information content(PIC) 값이 높은 primer 9쌍을 선택, 사용하였다. PCR 반응액 조성은 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v)gelatin, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM primer, 0.75 unit Taq polymerase(Takara, Otsu, Japan)이었으며 template으로 10~20 ng의 genomic DNA를 사용하였

다. 반응 조건은 2158 marker에 대해서는 'touchdown' 기법<sup>4</sup>으로 annealing 온도를 62°C에서 52°C까지 3 cycles에 1°C씩 낮추면서 반응을 진행시켰다. 2146과 2175 marker에 대해서는 처음 10 cycles의 annealing 온도는 각각 57, 51°C에서, 다음 25 cycles는 각각 55, 49°C에서 반응을 진행하였다. 모든 경우에 첫 번째 denaturation은 94°C에서 5분, 나머지 34 cycles의 denaturation은 35초였고, annealing 40초, extension 72°C 40초, 마지막 extension 반응은 5분 동안 진행시켰다.

### 전기영동 및 Silver staining

전기영동은 160×240 acrylamide native gel을 사용하였으며 separating gel(T: 8%, C: 3%, 1×TBE) 15 cm와 stacking gel(T: 4%, C: 3%, 1×TBE) 1 cm를 결합시켜 사용하였다. Crosslinker로는 piperazine di-acrylamide(Bio-Rad, CA, USA)를 사용하였으며 loading된 PCR 산물의 양은 10ng 정도 되도록 조절하였다. 전기영동 buffer로는 1×TBE(89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)를 사용하여 250 V에서 4-6시간 전개시킨 후 Bassam 등<sup>2</sup>의 방법에 따라 silver staining하여 band를 확인하였다. 전기영동한 polyacrylamide gel은 GS-670 Imaging Densitometer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 scan하였으며 Multi-Analyst(Bio-Rad) image analysis computer program (Version 1.1)을 이용하여 DNA의 크기를 계산하였다. DNA size marker로는 20 bp DNA Ladder(Takara)를 사용하였다.

## 결 과

분석된 9가지의 marker 중 세 가지 만이 친자감별에 유용한 분별력을 가지고 있었다. 세 가지의 microsatellite marker를 PCR로 증폭하여 전기영동한 결과는 Fig 1, 2, 3과 같다. 또한 그 대립유전자 크기를 분석한 결과는 Table 1에 제시하였다. Microsatellite marker 2146의 분석(Fig 1) 결과 자견1은 375와 323, 자견2는 375와 343 두 대립유전자를 이형접합으로 가지고 있었다. 한편 부견후보1은 375와 323의 대립유전자를 가지고 있어 자견1과 유전자형이 같았고, 부견후보2의 대립유전자형은 343와 315이었다. 그러므로 2146 marker에서 부견후보1은 두 자견 모두와 최소한 개 이상의 대립유전자가 일치하였다. 부견후보2는 자견2와는 343 대립유전자가 일치하였으나 자견1과는 일치하는 대립유전자가 없었다. Marker 2158(Fig

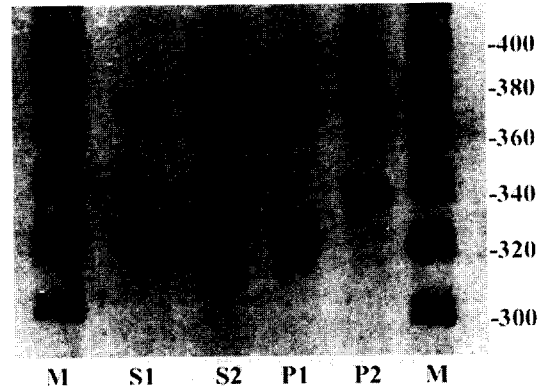


Fig 1. Genotyping of microsatellite locus 2146 in two proposed stud dogs (S1 and S2) and two puppies (P1 and P2). M, molecular size markers (bp).

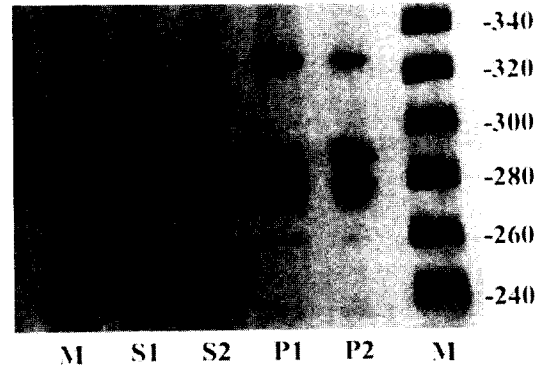


Fig 2. Genotyping of microsatellite locus 2158 in two proposed stud dogs (S1 and S2) and two puppies (P1 and P2). M, molecular size markers (bp).

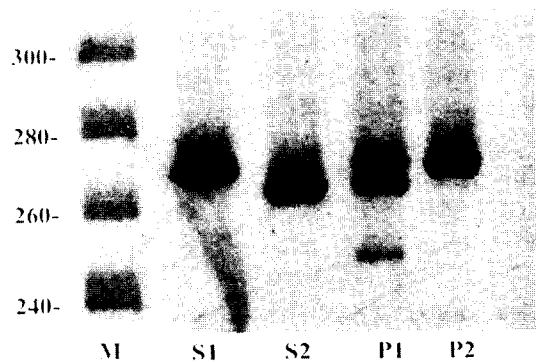


Fig 3. Genotyping of microsatellite locus 2175 in two proposed stud dogs (S1 and S2) and two puppies (P1 and P2). M, molecular size markers (bp).

**Table 1.** Estimated allele sizes (bp) at three different microsatellite markers in two puppies and two proposed stud dogs (S1 and S2)

Marker	Puppy1	Puppy2	S1	S2
2146	375/323	375/343	375/323	343/315
2158	283/279	287/279	279/279	311/295
2175	271/267	271/271	271/271	267/267

**Table 2.** Inclusion of proposed stud dogs for each puppy by genotyping of individual marker

Marker	Puppy1	Puppy2
2146	S1	S1/S2
2158	S1	S1
2175	S1/S2	S1

2)에서는 부견후보1이 279 대립유전자를 동형접합으로 가지고 있었고 이 대립유전자는 자견1과 자견2에서 각각 하나씩 관찰되었다. 그러나 부견후보2의 대립유전자 311과 295는 어느 자견에도 존재하지 않았다. Gel의 약 328 bp와 260 bp 위치에서, 그리고 그 밖에서 나타나는 약한 band들은 비특이적 PCR 산물로 추정되어 무시하였다. Marker 2175(Fig 3)에서는 부견후보1이 271, 부견후보2가 267의 대립유전자를 각각 동형접합으로 보유하고 있었으며, 자견1은 267, 271 두 대립유전자를 이형접합으로 보유하여 두 후보부견 모두의 자견일 가능성이 있으나 자견2는 271만 동형접합으로 보유하여 부견후보1의 유전자형과 일치하였다.

세 가지의 microsatellite marker를 분석한 결과에 대한 해석이 Table 2에 요약되어 있다. 그러므로 부견후보2는 자견1에 대하여는 2146, 2158 두 marker에서 일치하는 band가 없었고, 자견2에 대하여는 2158, 2175 두 marker에 대하여 일치하는 band가 없었다. 그러나 부견후보1은 세 marker 모두에서 두 자견과 일치하는 대립유전자를 가지고 있었다. 그러므로 부견후보2는 친부에서 제외되고 자동적으로 부견후보1이 친부로 판정이 되었다.

## 고 찰

본 실험을 위하여 모두 9가지의 microsatellite를 분석하였으나 그 중 6가지는 두 후보부견 모두의 대립유전자형이 자견과 일치하여 친자감별에 사용할 수 없었다. 이것은 모견 샘플을 구할 수 없었기 때문에 자견의 어느 대립유전자가 부견으로부터 온 것인지 결정할 수 없었고 따라서 marker들의 감별력이 줄어들

었기 때문이다. 그러나 나머지 3가지의 marker 분석만으로도 감별이 가능한 충분한 정보를 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 부견후보일 가능성이 있는 개들이 두 마리 뿐이었으므로 부견으로서 유전자형이 일치하지 않는 개 한 마리를 제외시키면 자동적으로 부견이 결정되는 경우이다. 따라서 두 마리의 부견후보 중에서 부견후보1이 두 자견의 친부견으로 결정되었으며, 위의 세 가지 microsatellite marker의 분석에 의해 과임신(superfecundation)일 가능성 역시 완전히 배제되었다. 그러나 부견일 가능성이 있는 모든 동물의 시료를 구하지 못하였을 경우 분석한 모든 marker 좌위에서 후보부견의 대립유전자가 자견의 대립유전자와 일치한다고 하여도 부견으로 단정지를 수는 없다. 친부견이 아님에도 불구하고 우연히 자견과 일치하는 유전자형을 가진 개체가 있을 가능성이 있기 때문이다. 이러한 경우에는 각각의 microsatellite 좌위에 대해서 후보부견이 속한 견종 전체집단에서의 대립유전자들이 나타나는 빈도를 조사하여 친부와 일치하는 유전자형이 나타날 가능성의 확률을 계산하여야 한다. 이를 위해 이용하고 있는 marker들의 대립유전자 빈도가 국내 개의 각 품종별로 어떻게 분포하는 지에 대한 광범위한 조사가 필요하며 현재 이러한 작업이 본 실험실에서 진행 중에 있다.

DNA에 기초한 친자감별 및 개체식별법은 현재 사람과 동물에서 혈액단백질 typing 방법을 거의 대체하고 있다. Microsatellite를 이용한 방법은 polymorphic한 microsatellite를 가지고 있는 어떤 종에도 적용될 수 있다. 이러한 방법의 이점은 아주 소량의 DNA sample만 있어도 분석이 가능하기 때문에 혈액은 물론 머리카락의 모근, 구강내의 swab 등 DNA를 얻을 수 있는 시료면 어느 것이든 이용이 가능하다는 것이다. 또한 분석에 이용되는 microsatellite의 좌위의 수에 따라 거의 100%에 가까운 확률로 친자감별 및 개체식별이 가능하다.

Microsatellite를 이용한 개체확인/친자감별법이 개에서 실용화되기 위하여는 그 분석에 소요되는 비용이 저렴하면서 간편히 수행할 수 있어야 할 것이다. 본 실험에서는 tetranucleotide repeat sequence를 가지는 microsatellite 좌위를 이용함으로써 sequencing gel이 아닌 통상의 polyacrylamide gel로 대립유전자 분석을 할 수 있었으며, 또한 silver staining을 사용함으로써 번거로운 동위원소의 사용을 피할 수 있었다. 더욱이 tetranucleotide repeat sequence를 사용함으로써 dinucleotide repeat sequence를 PCR 증폭하여 전기영동할 때 흔히 나타나는 'stutter' band 현상을 상당히 피할 수 있

었다. 'Stutter' band는 주된 band 이외에 여러 개의 minor band가 gel상에 나타나는 현상으로 DNA polymerase의 'slippage' 현상 때문인 것으로 추측된다<sup>12</sup>. 이러한 현상은 전기영동 결과의 해석에 혼란을 가져올 수 있다.

국내에서도 애견에 대한 관심도가 증가하면서 순종견의 정확한 혈통관리에 대한 필요성이 커 가고 있으며, 이를 위해서는 정확한 친자관계를 확립할 수 있는 간편한 방법이 필요하다. 우리나라에서의 순종견의 관리는 여러 애견협회나 기관이 담당하고 있으나 등록업무의 일관성과 신뢰성에 의문이 제기되는 경우가 있으므로 이에 대한 대책으로 유전자감식법이 중요한 역할을 할 수 있을 것이다. 본 실험은 microsatellite DNA 분석으로 개의 친자감별을 간편하게 수행할 수 있음을 보여 주었다. 앞으로 국내 토종견과 순종견에서의 microsatellite marker의 대립유전자 출현빈도를 조사하여 적합한 표준 marker를 선정하고, multiplex PCR 기법 등의 방법으로 좀 더 간편한 분석법을 개발한다면 외국의 경우와 같이 순종견의 혈통등록 및 관리에 충분히 이 기법을 이용할 수 있다고 생각된다.

## 결 론

두 마리의 Golden Retriever 자견에 대한 친자관계가 불확실한 두 마리의 부견후보 중 친부를 감별하기 위한 유전자검사를 실시하였다. 자견 두 마리와 부견 후보 두 마리의 구강상피세포에서 DNA를 추출하였고 9가지의 서로 다른 microsatellite marker를 PCR로 증폭, 전기영동 및 silver staining하여 분석한 결과, 3가지 marker에서 친부감별이 가능한 유전자형 정보를 얻어 부견후보 중 하나를 친부로 판정하였다. 그러므로 microsatellite 분석에 의한 개체식별, 친자감별은 빠르고 간단하며 높은 정확성을 지니고 있는 것으로 확인되었고, 앞으로 국내 순종견의 혈통관리에 이 방법의 활용이 기대된다.

## 감사의 글

이 연구는 서울대학교 수의과대학 부속 수의과학연구소 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 감사의 뜻을 표합니다.

## 참 고 문 헌

1. Alford RL, Hammond HA, Coto I, Caskey CT. Rapid

- and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 190-195.
2. Bassam BJ, Cactano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196: 80-83.
3. Bowling AT, Eggleston-Stott ML, Byrns G, Clark RS, Dileanis S, Wictum E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim Genet* 1997; 28: 247-252.
4. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4008
5. Dossey L. The healing power of pets: a look at animal-assisted therapy. *Altern Ther Health Med* 1997; 3: 8-16.
6. Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm Genome* 1996; 7: 359-362.
7. Fredholm M, Wintero AK. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim Genet* 1996; 27: 19-23.
8. Glowatzki-Mullis ML, Gaillard C, Wigger G, Fries R. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genet* 1995; 26: 7-12.
9. Heyen DW, Beever JE, Da Y, Evert RE, Green C, Bates SR, Ziegler JS, Lewin HA. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim Genet* 1997; 28: 21-27.
10. Jorgenson J. Therapeutic use of companion animals in health care. *Image J Nurs Sch* 1997; 29: 249-254.
11. Pena SD, Chakraborty R. Paternity testing in the DNA era. *Trends Genet* 1994; 10: 204-209.
12. Richards RL, Sutherland GR. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet* 1994; 6: 114-116.
13. van Haeringen H. DNA analysis in paternity testing of dogs and cats. *Vet Q* 1998; 20 Suppl 1: S89-90.
14. Zajc I, Mellersh C, Kelly EP, Sampson J. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Vet Rec* 1994; 135: 545-547.
15. 정의룡, 전길양, 김우태, 전기준, 한상기. Microsatellite DNA Marker를 이용한 한우의 친자감별 및 가계분석에 관한 연구. *한국동물유전육종학회지* 1997; 1: 133-146.