

## Microsatellite 대립유전자 분석을 통한 개에서의 친자감별

채영진 · 김동근 · 김하나 · 이문한 · 황우석 · 이병천 · 윤화영 · 이 항

서울대학교 수의과대학  
(1998년 11월 30일 접수)

### Paternity test in dogs by microsatellite allele analysis

Young-jin Chae, Dong-keon Kim, Hana Kim, Moon-han Lee, Woo-suk Hwang,  
Byoung-chun Lee, Hwa-young Youn, Hang Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Nov 30, 1998)

**Abstract** : Microsatellite allele analysis has been used for individual identification and paternity test. In the present study, the biological father of three puppies was determined by using microsatellite allele amplification analysis. The mother bitch of the litter was a Poongsan dog. The three stud dogs that could have inseminated the bitch, by being in the same residence, were a white Poosan dog, a mixed breed, and a white Jindo dog. DNA was obtained from all the relevant dogs by buccal swabbing. Four loci of tetranucleotide repeat microsatellite were PCR-amplified, and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. The results of genotyping unambiguously assigned the Poongsan dog as the biological father. There was no evidence of superfecundation. Therefore, the present study demonstrated the usefulness of microsatellite allele analysis as a simple, efficient method of paternity test in dogs.

**Key words** : paternity test, dogs, microsatellite, PCR, silver staining.

## 서 론

전통적으로 사람이나 동물에서 친자감별은 혈액형 분석, 혈액단백질 분석방법 등에 의존하였으나 분자유전학과 DNA 분석기술의 발달로 인하여 유전자 분석에 의

한 친자감별법으로 거의 대체되어 가고 있다. 그 이유는 유전자 분석에 의한 친자감별법이 다른 방법들에 비하여 정확도가 높으며 분석방법도 간편하기 때문이다. 유전자 분석에 의한 친자감별법에는 미세위성체(minisatellite)를 이용한 유전자 지문법(DNA fingerprinting), 제한효소절편 다형(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

본 연구는 서울대학교 수의과대학 부설 수의과학연구소 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Hang Lee, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

분석법, 초미세위성체(microsatellite) 분석법 등의 여러가지 방법들이 있다.

미세위성체는 variable number of tandem repeats(VNTR)이라고도 하며 약 20 염기쌍 이하의 반복되는 DNA 염기서열로 이루어져 있다. 미세위성체는 특정한 유전자 좌위에서 반복되는 단위의 수가 다름에 따라 개체간의 차이가 나타나며 포유류의 계통 중에서 가장 높은 정도의 다형성을 지닌 것으로 알려져 있다. 유전자 지문법은 이 미세위성체의 반복단위의 염기서열을 probe으로 사용하여 여러 미세위성체 유전자 좌위를 동시에 검출하는 기법으로 DNA를 분리, 전기영동 및 blotting 한 후 probe과 hybridization 시키면 한 개체 내에서 크기가 다른 여러 좌위에 probe이 결합하여 사다리 모양의 band가 나타난다. 이러한 band pattern은 개체간에 차이를 보이며 개체 식별의 도구로 이용될 수 있다. 유전자 지문법은 Jeffreys *et al*<sup>1-4</sup>에 의해 처음으로 범죄수사, 친자감별 등의 법의학에 성공적으로 적용되었다. 이후 사람 이외의 다른 동물에도 미세위성체가 존재함이 밝혀졌고 Morton *et al*<sup>5</sup>에 의해 처음 개에서의 친자감별에 이용되었다.

최근에는 사람을 포함한 동물의 개체식별 및 친자감별을 위한 빠르고 간편한 방법으로 microsatellite 분석법이 이용되고 있다. Microsatellite는 short tandem repeat (STR)이라고도 불리우며 2개 내지 4개 단위의 염기가 연속적으로 반복되는 구조를 가진 DNA 부분으로 미세위성체와 마찬가지로 개체에 따라 반복되는 단위의 수가 달라 상당히 높은 다형현상을 보이며 이러한 반복수는 멘델의 유전법칙에 따라 유전된다. PCR을 이용하여 microsatellite를 증폭하여 전기영동하면 개체가 가지고 있는 두 대립유전자는 겹상에서 공우성(co-dominant)으로 나타나는데 이중 한 대립유전자는 모계에서 유래한 것이고 다른 하나는 부계에서 유래한 것이다. 그러므로 자식의 두 대립유전자중 모계에서 유래한 것을 제외한 나머지 하나는 반드시 부계의 것과 일치하여야 하며 그렇지 않을 때에는 친부가 아닌 것으로 판정할 수 있다. 이러한 microsatellite의 성질은 개체식별 및 친자감별에 강력한 도구로 이용될 수 있다.

본 연구에서는 microsatellite를 이용한 간결한 친자감별법을 확립하고 그 응용성을 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 즉, 서울대학교 수의과대학 부속동물병원에 의뢰된 부자관계가 불확실한 세 마리의 자견과 세 마리의 부견후보에 대하여 친자감별을 위한 microsatellite 대

립유전자 분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물** : 친자가 확인된 모견 1두 및 자견 3두와 부견으로 의심되는 수컷 3두를 실험에 공시하였다.

**시약** : 사용한 모든 시약은 별도의 표시가 없는 한 Sigma(ST, Louis, MO, USA)에서 주문하여 사용하였다.

**DNA 준비** : DNA 추출을 위한 세포를 얻기 위해 모견, 자견 3마리 및 부견후보 3마리의 구강내벽을 칫솔로 5-6회 문질러 phosphate buffered saline(PBS, 0.01M sodium phosphate, pH 7.0) 3ml에 담그어 진탕시킨 후 10,000×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포는 lysis buffer(100mM EDTA, 10mM Tris-Cl, 1%(w/v) SDS, 100µg/ml proteinase K, pH 8.0) 200µl에 60℃에서 2시간 동안 녹인 후 다시 10,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 이물질질을 제거하였다. 이물질이 제거된 lysate에 isopropanol 500µl를 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 Francisco *et al*<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 4쌍을 선택, 사용하였다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

2004 forward : ctaagtggggagcctctct  
reverse : actgtgacctactgaggttgca

2097 forward : caatgtcgaattccatggtc  
reverse : atggagcaagatgtgtttgtg

2161 forward : tcagcaagaaacctccagt  
reverse : cattcccaacggaggactct

2175 forward : ttcatgtattctccattggc  
reverse : aggactctaaaaactgctctc

PCR 반응액 조성은 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v)gelatin, 0.2mM dNTPs, 0.5 µM primer, 0.75 unit Taq polymerase(Takara, Otsu, Japan)이 있으며 template으로 10~20ng의 genomic DNA를 사용하였다. 반응조건은 2004, 2161 marker에 대해서는 'touch-down' 기법<sup>7</sup>으로 annealing 온도를 62℃에서 52℃까지 3 cycles에 1℃씩 낮추면서 반응을 진행시켰다. 2097과

**Table 1.** Estimated allele sizes (bp) of four different microsatellite markers in mother, three puppies, and three proposed stud dogs (PS1-PS3).

Marker	Mother	Puppy 1	Puppy 2	Puppy 3	PS1	PS2	PS3
2004	242/238	238	242/238	238	238	316	254/242
2097	305/297	305/297	305/293	305/297	305/293	289/281	301/281
2161	267/247	267/247	267/247	267	267/247	251/243	251
2175	271/263	263	263	271/263	263	267/263	259

2175 marker에 대해서는 처음 10 cycles의 annealing 온도는 각각 57℃, 51℃에서, 다음 25 cycles는 각각 55℃, 49℃에서 반응을 진행하였다. 모든 경우에 첫번째 denaturation은 94℃에서 5분, 나머지 34 cycles의 denaturation은 35초였고, annealing 40초, extension 72℃ 40초, 마지막 extension 반응은 5분 동안 진행시켰다.

전기영동 및 Silver staining : 전기영동은 160×240×0.75mm polyacrylamide native gel을 사용하였으며 separating gel(T: 8%, C: 3%, 1×TBE) 15cm와 stacking gel(T: 4%, C: 3%, 1×TBE) 1cm를 결합시켜 사용하였다. Cross-linker로는 piperazine di-acrylamide(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하였으며 loading 된 PCR 산물의 양은 10ng 정도 되도록 조절하였다. 전기영동 buffer로는 1×TBE (89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA)를 사용하여 250V에서 4~6시간 전개시킨 후 Bassam *et al*<sup>8</sup>의 방법에 따라 silver staining 하여 band를 확인하였다. 전기영동한 polyacryl-amide gel은 GS-670 Imaging Densitometer(Bio-Rad)를 이용하여 scan 하였으며 Multi-Analyst(Bio-Rad) image analysis computer program(Version 1.1)을 이용하여 DNA의 크기를 계산하였다. DNA size marker로는 20bp DNA Ladder(Takara)를 사용하였다.

## 결 과

네 가지의 microsatellite marker를 PCR로 증폭하여 전기영동한 결과는 Fig 1, 2, 3 및 4와 같다. 또한 그 allele size를 분석한 결과는 Table 1에 제시하였다. Microsatellite marker 2004의 분석(Fig 1) 결과 모견은 238bp와 242bp의 두 대립유전자를 가지고 있었다. 자견 1과 3은 238bp의 allele이 동형접합으로 나타났고 자견 2는 238과 242 두 allele로서 모견과 동일하였다. 부견후보 1은 238의

allele을 동형접합으로, 부견후보 2는 316의 allele을 동형접합으로, 부견후보 3은 242와 254의 두 allele을 이형접합으로 보유하고 있었다. 그러므로 marker 2004의 분석으로 볼 때 자견 1과 3은 모두 모견과 부견으로부터 동일한 238 allele을 물려 받았으며 세 후보 부견중 후보 1만이 친부로서의 allele을 가지고 있어 후보 2와 3은 제외된다. 자견 2는 238과 242 allele를 다 가지고 있으며 모견의 유전자형도 동일하므로 모견으로부터 어느 allele을 받았는지 알 수 없고 따라서 부견으로부터 238 혹은 242 allele 어느 쪽이든 유전받았을 가능성이 있다. 그러므로 238 allele을 가지고 있는 부견후보 1과 242 allele를 가지고 있는 부견후보 3의 두 마리가 모두 친부일 가능성이 있다. 그러나 부견후보 2는 316 allele만을 동형접합으로 가지고 있어 어느 자견의 친부도 될 수 없다. 이러한 방식으로 네 가지의 microsatellite marker를 분석한 결과의 해석이 Table 2에 요약되어 있다. 그러므로 marker

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

Marker	Puppy 1	Puppy 2	Puppy 3
2004	PS1	PS1, 3	PS1
2097	PS1	PS1	PS1
2161	PS1	PS1	PS1
2175	PS1, 2	PS1, 2	PS1, 2

PS : proposed stud dogs.

2175의 분석에 의하면 모든 자견들이 부견후보 1과 2의 친자일 수 있으나 marker 2097, 2161 분석에 의하여 부견 후보 2와 3은 제외되고 따라서 부견후보 1만이 친부견으로서 유전자형이 일치하는 후보로 남게 된다.

## 고 찰

본 연구는 부견후보일 가능성이 있는 모든 개들이 검사의 대상이 되었으므로 부견이 될 수 없는 개들을 제외시켜 나가면 자동적으로 부견이 결정되는 경우이다. 따라서 부견후보 3마리 중에서 풍산견으로 생각되는 부견 후보 1이 모든 자견의 친부견으로 결정되었으며 위의 여러가지 microsatellite marker의 분석에 의해 과임신(superfecundation)일 가능성 역시 완전히 배제되었다. 그러나 부견일 가능성이 있는 모든 동물의 시료를 구하지 못하였을 경우 후보부견의 allele이 자견의 allele과 모두 일치한다고 하여도 부견으로 단정지을 수는 없다. 이러한 경우에는 각각의 microsatellite 좌위에 대해서 전체집단에서 대립유전자들이 나타나는 빈도를 조사하여 친부일 가능성의 확률을 계산하여야 한다. 이를 위해 현재 이용하고 있는 marker들의 대립유전자 빈도가 개의 각 품종별로 어떻게 분포하는지에 대한 광범위한 조사가 필요하며 현재 이러한 작업이 진행중에 있다.

DNA에 기초한 친자감별 및 개체식별은 현재 사람과 동물에서 혈액단백질 typing 방법을 거의 대체하고 있다. Microsatellite를 이용한 방법은 microsatellite 다형현상을 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.

개에서 microsatellite를 이용한 친자감별에 관한 보고는 여러차례 있었다<sup>9-12</sup>. 그러나 이들은 모두 혈액에서 DNA를 채취하였고 방사성 동위원소와 sequencing gel을 사용하는 등 그 sample 채취과정과 분석과정이 복잡한 면이 있으며 또한 dinucleotide repeat microsatellite를 사용함으로써 'stutter' band가 나타나는 문제점을 가지고 있었다. Automatic sequencer를 이용한 microsatellite 분석도 가능하나<sup>13</sup> 국내 애견산업의 영세성을 고려할 때 microsatellite를 이용한 개체확인, 친자감별법이 개에서 실용화되기 위하여는 그 분석에 소요되는 비용이 저렴하면서 간편히 수행될 수 있어야 할 것이다. 본 실험에서 혈액시료가 아닌 구강 내의 상피세포를 DNA 원으로 이용

함으로써 시료채취 과정을 간소화하였다. 그리고 tetranucleotide repeat sequence를 가지는 microsatellite 좌위를 이용함으로써 sequencing gel이 아닌 통상의 polyacrylamide gel로 allele 분석을 할 수 있었으며 또한 silver staining을 사용함으로써 번거로운 동위원소의 사용을 피하면서 ethidium bromide staining 보다 높은 감도를 유지할 수 있었다. 더욱이 tetranucleotide repeat sequence를 사용함으로써 dinucleotide repeat sequence를 PCR 증폭하여 전기영동할 때 흔히 나타나는 'stutter' band 현상을 피할 수 있었다. 'Stutter' band는 주된 band 이외에 여러개의 minor band가 겹 상에 나타나는 현상으로 DNA polymerase의 'slippage' 현상 때문인 것으로 추측된다<sup>14</sup>. 이러한 현상은 전기영동 결과의 해석에 혼란을 가져올 수 있다.

국내에서도 애견에 대한 관심이 증가하면서 순종견의 정확한 혈통관리에 대한 필요성이 커가고 있으며 이를 위해서는 정확한 친자관계를 먼저 확립할 필요가 있다. 미국 American Kennel Club(AKC)에서는 1998년부터 번식업자가 등록하는 순종견에 대하여 의무적으로 DNA 검사를 실시하고 있다. 이러한 검사에 의하면 번식가에 의하여 등록되는 순종견의 약 12%가 등록내용과 일치하지 않았다고 보고되었다(<http://www.akc.org/dnawhite.htm>). 우리나라에서의 순종견의 관리는 여러 애견협회나 기관이 담당하고 있으나 등록업무의 일관성과 신뢰성에 의문이 제기되는 경우가 있으므로 이에 대한 대책으로 DNA 분석법이 중요한 역할을 할 수 있을 것이다. 본 실험은 microsatellite allele 분석으로 개의 친자감별을 간편하게 수행할 수 있음을 보여 주었으며 앞으로 여러 microsatellite 좌위를 동시에 분석할 수 있는 multiplex PCR 등의 방법을 개발함으로써 더욱 간편하고 저렴한 비용으로 유전자 검사를 실시할 수 있도록 노력이 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

근래에 애완견에 대한 관심이 커가고 있어 국내에서도 개에서의 친자감별이나 개체확인에 대한 요구가 점차 증가할 것으로 예상된다. 본 실험에서는 세 마리의 자견에 대하여 친자관계가 불확실한 세 마리의 부견후보가 존재하는 상태에서 친부를 확인하기 위한 유전자 검사를 실시하였다. 모견, 자견 세 마리, 부견후보 세 마리의 구강상피세포에서 DNA를 추출하였고 네 가지의

서로 다른 **microsatellite** 좌위의 유전자형을 PCR로 증폭, 전기영동 및 **silver staining** 하여 분석한 결과 세 마리의 부견후보중 한 마리만이 세 자견 모두의 친부임이 판명되었다. 그러므로 **microsatellite** 분석에 의한 개체식별, 친

자감별은 빠르고 간단하며 높은 정확성을 지니고 있는 것으로 확인되었고 앞으로 국내 순종견의 혈통관리에 이 방법의 활용이 기대된다.

### **Legends for figures**

- Fig 1. Genotyping of microsatellite locus 2004 in mother (Mo), three puppies (P1-P3) and three putative fathers (S1-S3). M, molecular size markers (bp).**
- Fig 2. Genotyping of microsatellite locus 2097 in mother (Mo), three puppies (P1-P3) and three putative fathers (S1-S3). M, molecular size markers (bp).**
- Fig 3. Genotyping of microsatellite locus 2161 in mother (Mo), three puppies (P1-P3) and three putative fathers (S1-S3). M, molecular size markers (bp).**
- Fig 4. Genotyping of microsatellite locus 2175 in mother (Mo), three puppies (P1-P3) and three putative fathers (S1-S3). M, molecular size markers (bp).**

## 참 고 문 헌

1. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006): 67-73, 1985.
2. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023):76-79, 1985.
3. Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317(6040):818-819, 1985.
4. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318(6046):577-579, 1985.
5. Morton DB, Yaxley RE, Patel I, *et al*, Use of DNA fingerprint analysis in identification of the sire. *Vet Rec*, 121(25-26):592-594, 1987.

6. Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, *et al.* A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mamm Genome*, 7(5):359-362, 1996.
7. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, *et al.* 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 19:4008, 1991.
8. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 196(1):80-83, 1991.
9. Zajc I, Mellersh C, Kelly EP, Sampson J. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Vet Rec*, 135:545-547, 1994.
10. Binns MM, Holmes NG, Marti E, Bowen N. Dog parentage testing using canine microsatellites. *J Small Anim Pract*, 36:493-497, 1995.
11. Fredholm M, Wintero AK. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim Genet*, 27:19-23, 1996.
12. Zajc I, Sampson J. DNA microsatellites in domesticated dogs: application in paternity disputes. *Pfugers Arch-Eur J Physiol*, 431(Suppl):R201-R202, 1996.
13. Sutton MD, Holmes NG, Brennan FB, Binns MM, Kelly EP, Duke EJ. A comparative genetic analysis of the Irish greyhound population using multilocus DNA fingerprinting, canine single locus minisatellites and canine microsatellites. *Anim Genet*, 29:168-172, 1998.
14. Richards RI, Sutherland GR. Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat Genet*, 6(2):114-116, 1994.