

## 개에서 동결 수정란 이식 후 생산된 산자의 친자감별

김용준<sup>1</sup>, 김하나, 한용만\*, 김선정\*, 김병진\*\*, 박영재\*\*\*, 오홍근.  
전북대학교 수의과대학<sup>1</sup>, 생명공학연구소\*, 동부동물병원\*\*, 박영재동물병원\*\*\*

### Parentage Testing for the Offspring Produced by Embryo Transfer with Frozen Embryos in the Dog.

Yong-Jun Kim<sup>1</sup>, Ha-Na Kim, Yong-Man Han\*, Sun-Jeong Kim\*, Byoung-Jin Kim\*\*,  
Young-Jae Park\*\*\* and Hong-Geun Oh

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, 561-756, Korea,

\*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,

\*\*Dong-Bu Animal Clinic, \*\*\*Park Young Jae Animal Clinic

**ABSTRACT** : The donor, 2 years old, 20kg and mixed breed, was bred naturally on day 1 and day 3 of estrus and eight gastrulae were collected by flushing the uterus of the donor after laparotomy on day 13 after the second mating. The embryos were frozen by programmable freezer and preserved for about 3 months in liquid nitrogen. Another bitch in natural estrus, 2 years old, 30kg, mixed breed, was selected as the recipient and the frozen embryos(8 gastrulae) were thawed and each 4 embryos were transferred into upper part of left and right uterine horn, respectively, on day 13 after the proper mating day determined by vaginal smear. The recipient delivered 6 offspring 48 days after embryo transfer. Of 6 puppies, one was still birth and two puppies died one month after birth. Parentage test was performed by DNA analysis using microsatellite sequences for 3 puppies, the recipient, the donor, the male dog bred with the donor, and the male dog raised near to the recipient. The markers selected for the test were CXX 873(133-157 base pair) and CXX 894(141-165 base pair). Using primers manufactured according to the markers, the blood samples were processed for polymerase chain reaction and the PCR products were treated for electrophoresis. The three puppies showed identical band to that of recipient, consequently, it was concluded that the puppies were offspring of the recipient mated naturally by the male dog, not the offspring by embryo transfer.

**Key words** : frozen embryo, gastrula, parentage test, donor, recipient, microsatellite sequence, marker, polymerase chain reaction

## 서 론

우리 나라의 경제발전 및 소득수준의 향상으로순종견에 대한 수요가 증가함에 따라 외국에서 도입되는 여러 품종의 순수견종도 많아지고 있다 국내에서도 진도견, 삼살견 등과 같은 순수혈통을 가진 순종견의 혈통증명을 위해서 혹은 축주가 개를 분실했다가 발견한 경우에 혈연관계의 증명 등에 친자감별이 필수

적이다. 그리고 수정란 이식을 통한 자견의 분만시 공란견의 자견인지, 공란견과 관계없는 수란견의 자견인지의 증명을 위해서도 친자확인이 필요하다.

친자감별은 지금까지 주로 혈액형분석 또는 혈액단백질분석방법등에 의존해 왔으나, 최근에는 개체의 DNA분석법<sup>2,6,7</sup>을 통해 매우 정확한 친자확인방법이 이용되고 있다.

현재 DNA확인법으로서는 DNA 지문법 (DNA finger printing), 제한효소 절편다형 분석법(RFLP), 초미세위성체 분석법(microsatellite sequences), 등의 방법들이 이용되고 있다.

같은 종에서도 개체간에는 염기서열의 차이를 보이

이 논문은 1997년 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

<sup>1</sup>Corresponding author.

는 DNA polymorphism(DNA 다형현상)이 있는데 이러한 DNA 특정부분을 분석하기 위한 maker로서 미세 위성체(mini satellite)와 microsatellite(초미세위성체)가 있다. 특히 microsatellite의 경우는 비교하고자 하는 DNA부분의 길이가 불과 수백 뉴클레오티드로 짧기 때문에 polymerase chain reaction(PCR)기법을 통해 확인이 가능하다.

본 친자감별에는 공란견으로부터 회수한 gastrula 8개를 동결한 후 수란견에 이식하여 6마리의 산자가 생산되었는데, 이의 친자감별을 위하여 공란견, 수란견, 종모견, 및 자견에 대해 microsatellite를 이용하여 PCR기법을 통해 친자감별을 한바 그 결과를 소개하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 공란견

2년령의 20 kg의 집종견으로서 1년간 전북대학교 수의과대학에서 사육되었으며 기간중 1회의 분만을 하였고 6개월 후 정상적인 발정을 나타내어 별도 격리 상태에서 2일 간격으로 질도말검사를 실시하여 발정기를 판정하였다. 교배는 발정개시일로부터 1일과 3일에, 2회 각각 자연교배를 실시하였다. 2번째 교배일로부터 13일에 수정란을 회수하였다.

### 수정란의 회수 및 동결

수정란 회수용배지는 Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS, Gibco)이었고, 이 배지에 fetal calf serum(FCS, Gibco)을 20%가 되도록 첨가하고 bovine serum albumin(BSA, Sigma)은 3.5%가 되도록 첨가하였다. 또한 penicillin과 streptomycin을 배지 100 ml당 각각 10,000 IU, 10 mg이 되도록 혼합하였다. 수정란 회수 2시간 전에 상기 배지를 37.5°C, 5% CO<sub>2</sub> Incubator 내 보관하였다. 동결배지는 상기 PBS 배지에 glycerol이 1 mol이 되도록 조성하였다.

수정란 회수를 위해 공란견을 마취시킨후 복벽절개를 통하여 자궁을 노출시키고나서 자궁각의 선단부위에서 자궁체쪽으로 배지를 관류시켜 수정란을 회수하였다.

Gastrula 단계의 8개의 수정란(Fig 1)이 회수되었으며 이를 0.25 ml straw에 충전하여 20분 정도 실온에 정지한 후 Program freezer (EYELA MPF-1000)으로 -30°C까지 동결한 후 LN<sub>2</sub> 탱크내에 보관하였다.

### 수정란의 융해



Fig 1. A canine gastrula. Primitive streak(arrow)

이식을 위해 동결된 수정란이 들어있는 스트로를 액체질소통에서 꺼낸 후 37°C 수조에 15초간 넣어 융해시켰다

### 클리세를 제거 및 이식 스트로 준비

융해후 수정란은 1, 0.67, 0.33 mol의 glycerol이 첨가된 PBS 배지내를 순차적으로 5분씩 통과시킨 후 glycerol이 전혀 첨가되지 않은 PBS 배지(FCS 20% 첨가)에 옮기고나서 이식을 위한 straw내 충전하였다.

### 수란견

수란견은 30 kg, 1년 5개월령의 건강한 잡종 빈견으로서 발정징후를 보일 때부터 2일 간격으로 질도말검사를 하여 교배적기를 판정하였고, 발정전기부터 격리 사육하여 발정개시일로 판정된 날부터 13일에 복벽절개를 한후 융해한지 1시간이 경과된 수정란을 자궁각의 선단부위(1/3 부위)에 좌우 각각 4개씩 이식하였다. 이식후 48일에 6두의 자견이 태어났으며 이것은 수정란 일령 13일을 감안하면 임신 61일만에 분만하였다. 그 중 1두는 사산이었고 1개월 경과후 2두가 사망하였으며, 남은 3두에 대해 친자감별을 하였다.

### 친자감별을 위한 혈액샘플 채취

공란견과 수란견, 출생자견(수컷 2마리, 암컷 1마리), 공란견과 교배된 숫개와 수란견의 주변 케이지에 있던 숫개로부터 각각 2-3 ml의 혈액을 요측피정맥(cephalic vein)으로부터 채혈하고 즉시 EDTA가 들어 있는 병에 담아 4°C에서 보관하였다.

### Blood sample로부터 DNA 추출

Genomic DNA preparation kit(Invitrogen)를 사용하

**Table 1.** Selection of marker for parentage test of dogs

Marker name	Allele range (bp)	No of alleles	Parental HET
CXX. 873	133-157	11	0.81
CXX. 894	141-165	10	0.72

HET : heterozygosity

여 DNA를 추출하였다.

#### 친자확인을 위한 Marker 선택

이 연구에서 친자확인을 위한 marker는 Mark 등<sup>5</sup>에서 소개된 marker를 인용하여 Table 1과 같은 polymorphism과 양친이형접합성(parental heterozygosity)이 높은 di-repeat type의 CXX. 873과 CXX. 894 두 가지의 maker를 선택하였다.

#### Primer 제작 · 신청

Marker에 따른 primer의 염기서열은 Table 2와 같으며, 이 두쌍의 primer를 (주)제노텍에 신청하여 제작하였다.

#### PCR(Polymerase chain reaction)

각 primer에 대한 PCR 조건은 Table 3과 같으며 PCR을 위한 기기는 thermal cycler(Perkin Elmer DNA Thermal cycler 480)를 사용하였다.

10×reaction buffer, 4 dNTP, Taq polymerase 가 들어있는 "bioneer"의 pre-mix PCR tube에 Template(각 개체들로부터 추출한 DNA), primer(5'-3'primer, 3'-5'primer), D,W를 혼합하여 혼합액이 45 µl가 되도록

**Table 3.** Polymerase chain reaction conditions for the markers

Marker	PCR condition
CXX. 873	94°C, 30 sec., denaturation
	58°C, 30 sec., annealing
	72°C, 1.5 min., extension
	35°C, cycles
CXX. 894	94°C, 30 sec., denaturation
	55°C, 30 sec., annealing
	72°C, 1.5 min., extension
	35 cycles

**Table 2.** Primers according to the markers

Maker	Forward primer	Reverse primer
CXX. 873	CTGGCAGATTACAGGTAGC	CTTCTCCAAAGCACTCAT
CXX. 894	TCAGCATCTAGAAAATTAGGT	ACTCATTTTCTCTTATCTGCAC

한 후 Table 3과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다.

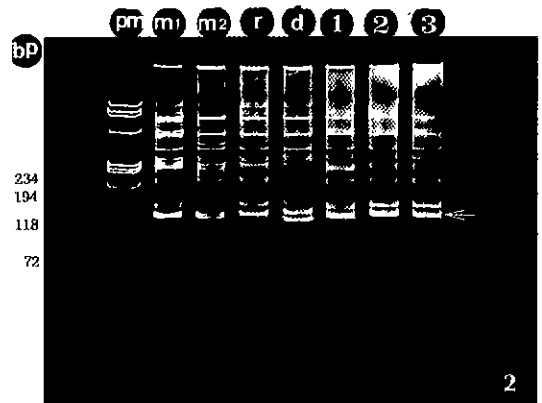
#### 전기영동(Electrophoresis)

Marker의 b.p가 작기 때문에 2% agarose gel을 만들어 PCR 산물을 넣은 후 100 mA로 30분간 gel running을 실시하였다 gel running이 끝난후 ethidium bromide로 5분 동안 staining하고 물로 destaining하여 UV상에서 band를 관찰하였다. 아울러 보다 확실한 band를 확인하기 위하여 agarose대신 polyacrylamide gel을 만들어 전기영동을 실시하였다. 확인하고자 하는 band의 size가 130-170이므로 band 크기에 따른 효과적인 전기영동이 되도록 8.0%의 acrylamide gel을 만들어 1 V/cm voltage gradients로 running시켰다. ethidium bromide로 염색한 후 UV light에서 band를 관찰하였다.

#### 판정결과

친자확인 결과는 Fig 2와 같다.

Fig 2 에서와 같이 자견 1,2,3은 band size가 130-170 범위에서 서로 같은 band를 나타내었고, 이 band

**Fig 2.** Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products from canine blood to detect paternity for the offsprings produced by ET.

PM : PCR markers(CXX. 873, CXX. 894), M 1 : Male 1 (male raised near to the recipient), M 2 : Male 2 (male bred with the donor), R : Recipient, D : Donor, Lane 1 : Offspring(female), Lane 2 : Offspring(male 1), Lane 3 : Offspring(male 2)

는 수란견(r)의 band와 동일하였다. 따라서 수란견으로부터 태어난 자견은 공란견의 수정란을 이식하여 생산된 자견이 아니라 수란견이 수란견주위에 있던 슛케와의 자연교배에 의해 생산된 자견으로 판명되었다.

## 고 찰

개에서 친자감별은 우수품종견에서 혈통의 확인 또는 실종견을 발견했을 때 주인을 찾기 위한 방법, 등으로 이용될 수 있다. 본 증례에서는 수정란 이식 후 생산된 산자에 대해 이식된 수정란에 의한 산자 여부를 확인하기 위하여 수행되었다.

친자확인을 위해 최근 사용되고 있는 정확한 친자감별 방법인 DNA 분석법<sup>2,6,7</sup>을 도입하였다. DNA 분석법을 위해 가장 많이 사용되는 marker로서는 minisatellite sequences와 microsatellite sequences를 이용할 수 있는데, minisatellite를 이용하는 경우 그 DNA 길이를 비교하기 위해 서던블롯(Southern blot)과 같은 복잡한 방법이 필요하나, microsatellite의 경우에는 개체간 비교하고자 하는 DNA부분의 길이가 불과 수백 nucleotides 정도의 짧은 길이이므로 PCR을 이용하여 microsatellite DNA의 길이를 비교할 수 있다. 그러나, microsatellite의 길이가 매우 짧은 경우도 있어 이때는 정교한 전기영동방법이 필요한데, 이 연구에서 보다 확실한 band 확인을 위해 polyacrylamide gel을 이용한 것도 이 목적을 위해서였다.

본 친자감별에 이용된 marker 및 primer는 Mark 등<sup>5</sup>의 자료에서 인용된 primer를 제작하여 실험에 이용하였는데 본 연구에서 이용된 primer를 사용해서 친자감별이 가능하다는 것을 알게 되었다.

친자감별 결과 자견 3두는 130-170 band size에서 서로 동일한 band를 보였고, 이자견 3두는 수란견 및 수란견과 역시 같은 크기의 band로서 인정된 일치되는 대립형질(allele)을 보임으로써 수정란 이식 후 생산된 산자는 공란견(donor)의 수정란에 의한 산자가 아니라 수란견의 주변에 있던 모견과의 자연교배에 의한 산자임이 판명되었다. 따라서 수정란이식 실험시 실험동물간의 완벽한 격리가 요구되는 점을 시사한다고 보겠다.

## 결 론

2년령의 20 kg의 잡종견을 발정 1일과 3일에 자연교

배 시켜 13일 후 복벽절개술을 실시하여 자궁을 관류하여 8개의 gastrula를 회수하였다. 수정란을 프로그램 동결기로 동결하여 액체질소에 3개월간 보관하였다. 이후 발정징후를 보인 2년령의 30 kg의 잡종견을 수란견으로 정하여 교배적기로 판명된 날로부터 13일에 동결수정란(gastrula) 8개를 용해하여 좌,우 자궁각 선단부에 각각 4개씩 이식하였다. 수란견은 이식 후 48일에 6두의 자견을 분탄하였으며 1두는 사산되었고 한달 후 2두가 폐사하였다. 남아있는 자견 3두와 수란견, 공란견, 공란견과 교배된 牡犬, 수란견의 주위에 있던 牡犬에 대해 microsatellite를 이용한 DNA 분석에 의해 친자감별을 하였다.

DNA 분석을 위한 marker는 CXX 873(133-157 bp)과 CXX 894(141-165 bp) 두쌍을 선택하였고 PCR 기법으로 증폭하여 이를 전기영동하였다.

그 결과 자견 3두는 수란견과 일치되는 band를 보임으로써 수정란이식 후 출생자견은 공란견의 자견이 아닌 수란견의 자견임이 확인되었다.

## 참 고 문 헌

1. Albert L. Lehninger. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc. 1982 ; 827-830 837, 877, 880
2. Binns MM, Holmes NG, Marti E, Bowen N. Dog parentage testing using canine microsatellite. Journal of Small Animal Practice. 1995; 36 : 493-497.
3. Cathryn SM, Amelia AL, Gregory MA, et al. A linkage map of the canine genome. Genomics. 1997; 46: 326-336.
4. Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS et al. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. Mamm. Genome 1996, 7: 359-362.
5. Mark WN, Karl W, Brown, et al. A second-generation genetic linkage map of domestic dog, canis familiaris. Genetics. 1999; 151: 803-820.
6. Zajc I, Mellersh C. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequence. Vet Rec. 1994; 135: 545-547.
7. Zajc I, Sampson J. DNA microsatellites in domesticated dogs-application in paternity dispute. Eur. J. Physiol. 1996; 43(Suppl): 201-202