

Microsatellite DNA형에 의한 더러브렛 말의 친자감정에

조길재*, 양영진, 김봉환¹

한국마사회 혈액형검사실, 경북대학교 수의과대학¹
(게재승인: 2003년 2월 19일)

A case of parentage testing in the Thoroughbred horse by microsatellite DNA typing

Gil-Jae Cho*, Young-Jin Yang, Bong-Hwan Kim¹

Equine Blood Typing Laboratory, Korea Racing Association
¹College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
(Accepted: February 19, 2003)

Abstract: This study was carried out to investigate a usefulness of the microsatellite DNA markers for parentage verification of Thoroughbred (TB) horses. 9 TB horses samples were genotyped for nine international minimum standard markers (AHT4, 5, ASB2, HMS3, 6, 7, HTG4, 10, and VHL20), and the additional panel of four markers, ASB17, CA425, LEX33, and TKY321. 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. Foal I was excluded according to principles of Mendelian genetics in AHT4 (H/K), ASB2 (Q/Q), HMS3 (I/P), HTG4 (M/O), HTG10 (K/R), VHL20 (M/P), ASB17 (F/N), LEX33 (M/O), and TKY321 (G/I) markers. Foal II was excluded with markers AHT5 (K/M), ASB2 (M/N), HMS7 (N/N), HTG10 (K/K), VHL20 (I/I), ASB17 (F/F) and TKY321 (G/I). Foal III was excluded with markers AHT4 (O/O), AHT5 (K/K), ASB2 (M/R), HMS6 (M/P), HMS7 (O/O), HTG10 (R/S), VHL20 (L/M), and ASB17 (N/O). These results suggest that the present DNA typing is so useful for parentage verification of TB horses.

Key words: microsatellite, parentage verification, thoroughbred horse

서 론

국내에서 생산되는 더러브렛 말은 사람의 족보와도 같은 혈통서(Stud book)에 등재되기 위해서는 축산법 및 더러브렛 등록규정에 근거하여 혈액형 감정 및 모색유전의 법칙에 의해서 친자관계가 확인되어야만 한다. 말의 번식등록과 혈통등록을 목적으로 개체식별 및 친자판정에는 주로 혈액형 감정을 이용하고 있다^{1,2}. 말의 혈액형 검사는 대상마의 혈액으로 항혈청을 이용한 응집반응과 용혈반응에 의한 혈청학적 방법으로 분류하는 적혈구항원형과 적혈구와 혈청내의 단백질 및 효소를

전기영동법을 이용하여 분류하는 혈액단백질형에 의해서 실시되고 있다¹⁻³.

더러브렛 말의 혈통등록을 위한 혈액형 검사는 국제 혈통서위원회(International Stud Book Committee: ISBC)의 엄격한 조건을 준수하여야 한다¹. 그래서 혈통서 등록기관으로부터 혈액형 감정기관으로 지정받은 각국의 친자감정기관은 국제동물유전학회(International Society of Animal Genetics: ISAG)에 가입하여 ISBC와 ISAG가 공동으로 결정한 더러브렛 혈액형(유전자형 포함) 최소 표준검사항목을 검사해야 하고 ISBC와 ISAG가 공동 주최하는 말(더러브렛 포함) 유전자형 국제비교동정시험

* Corresponding author: Gil-Jae Cho

Equine Blood Typing Laboratory, Korea Racing Association, 685 Juam-dong, Gwacheon, 427-070, Korea.
Tel: 02-509-1933, Fax: 02-509-1909, E-mail: chogj@mail.kra.co.kr

에 참가해야 하는 의무를 준수하여야만 한다¹. 한국의 더러브렛 감정기관인 한국마사회 혈액형검사실도 이러한 국제기준에 준하여 국내산 더러브렛 망아지의 친자 감정을 실시하고 있다³.

현재 이용되고 있는 혈액형 감정으로 대부분의 친자 관계를 확인하고 있으나 어떤 경우에는 이러한 다형현상만으로는 명확한 결론을 내릴 수 없는 경우가 있다. 그래서 더욱더 정확하고 간편한 방법으로 검사할 수 있는 유전적 marker system을 찾기 위하여 1990년 ISAG 더러브렛 분과위원회의 요청에 의해 DNA 다형좌위를 말의 친자판정에 적용, 유용성 여부를 알아보고자 각국의 친자감정기관이 더러브렛 DNA 마크의 검색을 연구한 결과 1996년 말에 약 130여개가 보고되었다⁴. 그 후 1997년과 1999년 말 비교동정시험을 통해 2000년 국제동물유전학회 더러브렛 분과위원회에서 9개(AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20)의 microsatellite DNA 다형좌위를 국제최소표준검사항목으로 지정하여 친자판정에 활용토록 권장하고 있다^{5,6}.

미국을 비롯한 선진외국에서는 2001년부터 말의 친자 감정에 종전의 혈액형 감정 대신 유전자형 감정을 도입하여 시행하고 있으며⁶, 한국마사회 혈액형검사실도 국제기준에 준한 친자감정을 위해서 2003년부터 국내에서 사육중인 모든 번식마와 혈통등록 대상마(국내 생산 망아지)를 대상으로 DNA형 감정을 실시할 계획이다. 이런 배경하에 본 연구는 국내산 말의 혈통등록을 위한 친자판정시 혈액형 감정에서 친자관계가 의심되는 말로부터 DNA를 추출하여 DNA형 감정을 실시한 결과 친자관계를 판정하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료

2002년 국내에서 생산되어 한국마사회 혈액형검사실로 의뢰된 840두의 망아지 시료중에서 혈액형 감정으로 친자관계가 의심되는 망아지 3두와 그의 부모 6두를 포함하여 총 9두를 대상으로 하였다. 재료는 말의 경정맥으로부터 Heparin 튜브(Becton Dickinson, USA)에 채혈한 혈액에서 Tozaki *et al*⁷의 방법에 준하여 DNA를 분리하였다.

DNA Marker 선정 및 PCR

DNA형 분석을 위한 좌위는 국제최소표준마크 9개와 보완용 마크 4개를 선정하여 Bozzini *et al*⁸의 방법을 약간 수정하여 DNA를 증폭하였으며 사용된 마크는 모두 dinucleotide repeats로서 primer의 sequence는 Table 1에

나타내었다. Multiplex-PCR은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 행하였으며, PCR 조건은 국제최소검사항목인 9개 marker는 먼저 95°C에서 10분간 가열하여 변성을 유도하고 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 1분간의 annealing 그리고 72°C에서 1분간의 extension의 3단계로 30회 반복하였으며 72°C에서 60분간 extension을 실시하였고 ASB17과 TKY321 marker는 95°C에서 3분, 60°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간 가열하여 변성을 유도하고 95°C에서 45초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing 그리고 72°C에서 1분간의 extension의 3단계로 30회 반복하였으며 95°C에서 45초, 60°C에서 1분 그리고 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. CA425와 LEX33 marker는 95°C에서 3분, 56°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간 가열하여 변성을 유도하고 95°C에서 45초간 denaturation, 56°C에서 1분간 annealing 그리고 72°C에서 1분간의 extension의 3단계로 35회 반복하였으며 95°C에서 45초, 56°C에서 1분 그리고 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. PCR 후 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)를 이용하여 각 마크별 대립유전자의 base 크기를 결정된 후 친자관계 여부를 판정하였다.

결 과

Microsatellite DNA형에 의한 친자감정

연구대상마 9두의 microsatellite marker 13개에 대한 DNA형에 의한 친자감정 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 혈액형 감정에서 친자관계가 의심된 Foal I은 AHT4 (H/K), ASB2 (Q/Q), HMS3 (I/P), HTG4 (M/O), HTG10 (K/R), VHL20 (M/P), ASB17 (F/N), LEX33 (M/O), TKY321 (G/I) 등 9개 marker에서 멘델의 유전법칙이 성립되지 않았으며, Foal II는 AHT5 (K/M), ASB2 (M/N), HMS7 (N/N), HTG10 (K/K), VHL20 (I/I), ASB17 (F/F), TKY321 (G/I) 등의 7개 marker, 그리고 Foal III은 AHT4 (O/O), AHT5 (K/K), ASB2 (M/R), HMS6 (M/P), HMS7 (O/O), HTG10 (R/S), VHL20 (L/M), ASB17 (N/O) 등의 8개 marker에서 각각 친자관계가 성립되지 않았다.

Table 1. The international marker of microsatellite DNA in Thoroughbred horse

Marker	Primer sequences(5' → 3')	Allele size range(bp)
(Minimum standard marker)		
VHL20	(FAM)-CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG AACTCAGGGAGAATCTTCTCAG	89-107
HTG4	(FAM)-CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC CTCCCTCCCTCCCTCTGTCTC	127-141
AHT4	(FAM)-AACCGCCTGAGCAAGGAAGT GCTCCCAGAGAGTTTACCCT	138-170
HMS7	(FAM)-CAGGAAACTCATGTTGATACCATC TGTTGTGAAACATACCTTGACTGT	167-189
AHT5	(JOE)-ACGGACACATCCCTGCCTGC GCAGGCTAAGGGGGCTCAGC	128-152
HMS6	(JOE)-GAAGCTGCCAGTATTCACCATTG CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA	153-171
ASB2	(JOE)-CCACTAAGTGTCTTTCAGAAGG CACAAGTGAAGTCTCTGATAGG	222-256
HTG10	(TAMRA)-CAATTCCCGCCCCACCCCGGCA TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT	89-117
HMS3	(TAMRA)-CCAAGTCTTTGTACATAACAAGA CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	150-174
(Additional marker)		
ASB17	(NED)-GAGGGCGGTACCTTTGTACC ACCAGTCAGGATCTCCACCG	89-131
CA425	(NED)-AGCTGCCTCGTTAATTCA CTCATGTCCGCTTGCTC	230-250
LEX33	(HEX)-TTTAATCAAAGGATTGTTG GGGACACTTTCTTTACTTTT	201-221
TKY321	(HEX)-TGTGACTTCAAGAACAGACG ACAGTGCAAGTCTGTGAAAC	212-230

Table 2. The results of parentage testing by 13 microsatellite loci in Thoroughbred horses

Sample	Loci												
	AHT4	AHT5	ASB2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG10	VHL20	ASB17	LEX33	CA425	TKY321
Sire	K/O*	K/M	M/O	I/I	K/M	M/N	K/K	K/S	I/N	F/O	M/Q	N/O	G/K
Dam	J/K	K/N	N/Q	I/I	M/P	M/O	K/M	K/S	I/M	F/O	M/M	N/O	G/G
Foal I	H/K	M/N	Q/Q	I/P	K/P	M/M	M/O	K/R	M/P	F/N	M/O	N/O	G/I
Sire	J/O	K/K	M/Q	I/M	M/P	N/O	K/M	R/S	L/M	N/O	M/Q	N/O	G/K
Dam	O/O	K/N	K/R	I/M	K/M	L/O	M/M	R/S	L/M	N/O	L/M	N/N	G/L
Foal II	J/O	K/M	M/N	I/I	K/P	N/N	M/M	K/K	I/I	F/F	M/Q	N/N	G/I
Sire	H/O	M/M	M/M	I/I	P/P	N/N	M/P	K/S	I/M	F/O	M/Q	N/N	G/K
Dam	J/J	K/N	N/O	I/P	K/P	L/N	K/M	K/S	I/N	F/O	L/M	N/N	G/I
Foal III	O/O	K/K	M/R	I/I	M/P	O/O	K/M	R/S	L/M	N/O	L/M	N/N	G/K

*Allele codes are identical to the alphabetical and numerical symbols used on 2000 ISBC/ISAG Horse Comparison Test.

고 찰

근래에 들어 국내 말 생산산업의 괄목한 만한 성장으로 생산 및 사육농가의 증가, 경주마의 생산두수 증가, 인기있는 씨수말과의 교배 집중화, 혈통과 유전형질이 뛰어난 외국산 씨수말 및 씨암말의 구입 등 경마의 국제화에 따른 말의 국제간 이동 증가, 목장내 생산마의 친자감정을 둘러싼 분쟁 등 종래에 비해서 말의 개체식별이나 친자감정의 중요성이 대두됨에 따라 신속하고 정확하며 경제적인 감정방법을 요구하고 있다². 1985년 영국의 Jeffreys 등에 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^{9,13}.

단백질의 다형은 유전자 상에 코딩되어 있지만 유전자내에서 단백질의 정보를 담당하고 있지 않는 인터론 부위나 유전자이외의 비코드 영역에는 반복배열의 반복수가 다른 다형이 존재하는 것이 알려진 이래 현재 이용되고 있는 대표적인 DNA typing은 microsatellite DNA typing 혹은 short tandem repeats(STRs)이다. 말에 있어서는 1986년 개최된 더러브렛 국제혈통서위원회에서 DNA형 감정에 관해서 처음으로 거론된 이래 국제간의 긴밀한 협조하에 진행된 결과 현재는 각국의 공통 DNA marker 사용 및 검사법의 표준화가 이루어져 친자확인에 채택하고 있는 실정이다⁷. 말의 개체식별이나 친자판정을 목적으로 한 DNA marker는 allele의 수가 많고 heterozygosity가 높으며 다형성을 보이는 염기수가 적은 것, 즉 PCR 증폭이 가능하며 정확한 염기수나 반복배열수가 용이하게 산출되는 범위의 것으로서 돌연변이율이 낮은 것이어야 하고 또한, 더러브렛 경주마의 혈통등록은 초봄에 집중되어 단시일내에 많은 검사를 수행해야 하므로 경제적이며 방법이 단순하고 시간이 절약되어야 한다¹⁴. 그래서 각국에서는 말의 DNA다형 marker를 지금까지 핵 DNA의 유전자 비코드부위에서의 반복배열수의 차이를 지표로 한 microsatellite DNA로서 2~4염기의 반복되는 배열로서 heterozygosity가 높고 allele의 수가 많은 marker중에서 국제간 comparison test를 통해 검사방법을 표준화 시킨 후 2000년 국제동물유전학회 말분과위원회에서 9개의 microsatellite DNA marker를 국제최소검사항목으로 지정하여 일부 국가에서는 실제로 혈액형 감정을 시행하지 않고 유전자형 감정으로 개체식별이나 친자판정을 실시하고 있다⁷.

2002년에 국내에서 생산되어 혈통등록을 위해 의뢰된 망아지 840두중 혈액형 감정에서 친자관계가 의심된 3

두를 대상으로 유전자형 감정을 실시한 결과 Foal I 은 9개 marker, Foal II 와 III 은 각각 7개, marker에서 유전법칙이 성립되지 않았다. 이는 혈액형 감정으로 친자감정이 곤란한 경우에 microsatellite DNA형을 이용하여 친자판정을 하면 더욱 정확하고 유용한 결과를 얻을 수 있다고 보고한 Kakoi *et al*⁶, Bowling^{2,15}, Binns *et al*¹⁶의 견해와 일치하였다.

Microsatellite DNA형에 의한 말의 친자확인에 관한 국제 가이드라인은 아직 정립되지 않은 상태이나 혈액형 감정처럼 국제최소표준검사항목 9개 marker중 2개 marker 이상에서 멘델의 유전법칙이 성립되지 않을 경우 모순으로 판정하도록 권고하고 있다. 현재 말의 친자판정 방법이 기존의 혈액형 감정에서 DNA형 감정으로 전환되고 있는 실정이나 앞으로 더 많은 연구를 통해 null allele 및 mutation 등의 문제점^{17,18}을 해결하여야 할 것으로 사료되며 신속·정확하고 재현성이 뛰어난 장비의 자동화로 국제수준의 감정기술을 확보할 수 있도록 더욱더 심혈을 기울임과 동시에 말의 유전적 질병이나 경주능력과 관련된 특이 유전인자의 탐색 등의 연구에도 관심을 가져야 할 것으로 사료된다.

결 론

Microsatellite DNA형에 의한 말의 친자감정을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Foal I 은 AHT4 (H/K), ASB2 (Q/Q), HMS3 (I/P), HTG4 (M/O), HTG10 (K/R), VHL20 (M/P), ASB17 (F/N), LEX33 (M/O), TKY321 (G/I) marker에서 멘델의 유전법칙이 성립되지 않았으며, Foal II 는 AHT5 (K/M), ASB2 (M/N), HMS7 (N/N), HTG10 (K/K), VHL20 (I/I), ASB17 (F/F), TKY321 (G/I) marker, 그리고 Foal III 은 AHT4 (O/O), AHT5 (K/K), ASB2 (M/R), HMS6 (M/P), HMS7 (O/O), HTG10 (R/S), VHL20 (L/M), ASB17 (N/O) marker에서 유전법칙에 어긋나 친자관계가 성립되지 않았다.

이상의 결과로 보아 microsatellite DNA형 감정이 말 친자감정의 효율 향상에 유용할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Miura N. Blood typing service in light-breed horses. *Jpn J Equine Sci*, 4:187-190, 1994.
2. Bowling AT. *Horse genetics*. CAB International, p. 82-96, 1996.
3. 조길재, 김봉환. 더러브렛 말의 혈액형에 관한 연구. *대한수의학회지* 40:683-689, 2000.

4. Natsuno Y. The present status of horse blood typing in Japan. *J Anim Genet*, 26:19-25, 1998.
5. Hasegawa T, Miura N. Advances in the equine molecular genetics in Japan. Proc. 4th IEGMW. p. 13, 2001.
6. Kakoi H, Nagata S, Kurosawa M. Microsatellite DNA testing for parentage verification of thoroughbreds. *Pros 27th ISAG Conf Anim Genet*, p. 90, 2000.
7. Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, et al. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J Vet Med Sci*, 63:1191-1197, 2001.
8. Bozzini M, Fantin D, Ziegler JS, et al. Automated equine paternity testing. PE Applied Biosystems. p. 1, 1997.
9. Glowatzki-Mullis ML, Gaillard C, Wigger G, et al. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim Genet*, 26:7-12, 1995.
10. Fredholm M, Wintero AK. Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellites. *Anim Genet*, 27:19-23, 1996.
11. 채영진, 이병천, 이황. 유전자감식에 의한 개에서의 친자감별. *한국임상수의학회*, 15:274-278, 1998.
12. Ellegren H, Johansson M, Sandberg K, et al. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Anim Genet*, 23:133-142, 1992.
13. Alford RB, Hammond HA, Coto I, et al. Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *American J Human Genet*, 55, 190-195, 1994.
14. Mukoyama H. DNA analysis for individual identification of horses. *Jpn J Equine Sci*, 4:191-197, 1994.
15. Bowling AT. *UC DAVIS book of horses*. Mordecai Siegal, 1st ed. Haper Collins, p. 126, 1996.
16. Binns MM, Uolmes NG, Holliman AM. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit Vet J*, 151:9-15, 1995.
17. Eggleston-Scott ML, Delvalle A, Dileanis S, et al. Characterization of a null allele at an equine microsatellite locus. *Anim Genet*, 27: 89-90, 1996.
18. Eggleston-Scott ML, Delvalle A, Dileanis S, et al. A single base transversion in the flanking region of an equine microsatellite locus affects amplification of one allele. *Anim Genet*, 28:438-440, 1997.