

제 3 차 년 도
최종 연구보고서

GOVP 19916410

636.700951
L 2932
V.3

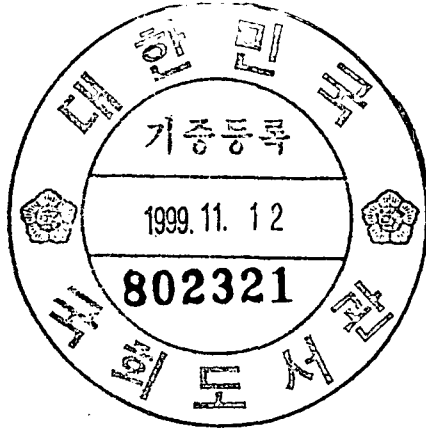
진돗개의 염색체 및 DNA지문법에 관한 연구

Studies on Chromosome
and DNA Fingerprints of Jindo-dog

연 구 기 관

전남대학교 농과대학
전남대학교 수의과대학

농 립 부



최 종 보 고 서

1995년도 농림특정연구사업에 의하여 완료한 진돗개의
염색체 및 DNA 지문법에 관한 연구에 관한 연구의 최종
보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨 부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1998. 12. .

주관연구기관 : 전 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 정 기 철 (인)

주관연구기관장 : 전남대학교 총장 직인

농림부장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “진돗개의 염색체 및 DNA 지문법에 관한 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 정 기 철

연 구 원 : 박 남 용

요 약 문

I. 제 목

진돗개의 염색체 및 DNA 지문법에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

진돗개는 주인에 대한 충직성과 귀소성, 용맹성, 수렴성 등을 인정받아 천연기념물 53호로 지정되어 보호를 받고 있다. 또한 한국 진돗개 보호 육성법을 제정하여 혈통을 고정시키고 순수 번식하여 세계적인 우수품종으로 육성하려 하고 있다. 진돗개의 고유성과 순수성 증명을 위해서 진돗개 체형과 습성에 관한 최초의 보고에 이어 일반체형과 대뇌의 비교 해부학상의 특징 및 혈액상에 관한 연구, 진돗개의 핵형과 단백질 분석 및 효소 활성에 관한 연구, 기생충감염 실태조사, 혈액치, 혈액성 및 혈액 화학치에 관한 연구, 진돗개와 삼살개의 혈액 단백질의 비교 연구, 혈청단백질의 비교 연구, 혈청 LDH와 혈청 ALP의 동위 효소와 활성도, 진돗개 모색 등의 여러 방면의 연구들이 수행되어 왔다. 그러나 진돗개의 혈통보존을 위한 염색체에 관한 체계적인 연구가 드

물었고, 또한 이러한 연구들은 진돗개의 특유성을 밝히고 순수한 혈통 보존을 가능케 하는 과학적인 보호 육성 목표에 이르기까지는 미비점이 많았다.

최근에는 DNA 지문법과 더불어 PCR을 이용한 RAPD 분석방법이 행동 생태학, 집단 유전학, 멸종 동식물 보존 등에서 유전자 분석의 도구로서 그 활용 가치를 크게 인정받고 있다. 동물 세포의 유전 정보를 총괄하는 genome상에는 minisatellite로 이루어진 tandem repetitive region이 각각의 개체마다 다르게 존재한다. 이것은 아마도 DNA 복제시에 slippage 혹은 unequal crossover 에 의해서 형성된 것으로 추정되는데 생물의 종간은 물론 동일 종 내의 개체에서도 큰 다양성을 보인다. 따라서 DNA 지문법 및 RAPD-PCR 기술은 이러한 종이나 품종 및 개체사이의 차이점을 측정해내고 이들의 유전자수준의 변이나 특성의 차이점을 특성화시키는데 아주 유용한 기술로 인정되고 있다.

(Yu and Pauls. 1994)

진돗개의 혈통을 보존하고 합리적 육종을 위해서는 진돗개 집단내의 혈통관계에 대한 정보가 필수적으로 요청된다. 따라서 첨단 분자생물학적인 기법을 이용한 체계적인 연구의 기초로 진돗개 품종 특성과 유전자 표지 형질의 검출, 진돗개 염색체의 핵형 확립을 주요 연구 내용으로 하였다.

따라서 본 연구과제의 최종 목표는 진돗개 염색체의 유전적 특성을 확립하기 위한 핵형 분석과 각종 염색기법의 도입을 통해 비교연구 및 이들 염색체 DNA의 RAPD분석, 염기서열 분석 및 유전자 수준의 핵산 연구를 통해서 유전적 변이를 추정하여 진돗개 유전자의 표준형을 확립하고, 이에 따라 다른 품종과 유전적 관계를 규명하는 데에 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 진도견 중 관상견, 수렵견, 번견 등으로부터 혈액을 채취하여 DNA를 분리 정제한 후 *Hinf* I등의 제한효소로 절단하여 전기영동한 후 사람의 minisatellite DNA중 시판되고 있는 probe33.6 [(AGGGCTGGAGG)₃]₁₈ 과 probe 33.15 (AGAGGTGGGCAGGTGG)₂₉를 각각 ³²P-dATP로 labelling하여 Southern hybridization을 수행하고 DNA fingerprinting 결과로부터 형제자매간 또는 그 자손의 DNA 유전자 형태를 분석하였으며, Zimmerman 등(1988)의 방법에 의거해 혈액에서 채취한 미토콘드리아 DNA RFLP 분석을 하였다.

또한 DNA 지문법의 개체식별, 부자판정 및 유전적 변이의 추정, 미토콘드리아 DNA polymorphism에 대한 유전적 변이의 추정, 진돗개 표준 핵형 확립과 핵형 분석을 위해 다수의 혈액시료를 확보 후 PCR법을 이용한 DNA 지문법과 미토콘드리아 DNA 타이핑을 통해 진돗개의 품종 특성과 유전자 패턴을 확립하였고, 진돗개의 말초혈액 림프구 배양에 의한 염색체 분리 및 이에 대한 G-banding 연구로 핵형 분석을 하여 표준 핵형을 확립하였다.

진돗개의 특유 표지인자(DNA marker)를 RAPD-PCR방법으로 선별하여 cloning을 하였고, 선발 및 cloning된 진돗개 특유의 표지인자의 염기서열 분석, 표지인자의 유전형질과의 연관관계 분석에 의한 고유의 특성 규명을 수행하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

진돗개 일반 염색에 의한 핵형은 모두 동일한 양상을 보여 주었다. $2n=78$, $NF=80$ 으로서 상염색체는 38쌍이며, 모두 말단 동원체 염색체(telo-acrocentric chromosome)이었으며 X염색체는 차중부 동원체 염색체(submetacentric chromosome), Y 염색체는 중부 동원체 염색체(metacentric chromosome)이었다. 염색체간의 상대길이는 1번 염색체가 4.0이고 염색체중 제일 작은 38번 염색체가 1.0로서 완만하게 짧아지는 경향을 나타냈으며 X염색체는 4.6으로서 1번 염색체와 길이가 비슷하였고 Y염색체는 1.6이었다.

G-banding 염색방법에 의해 핵형을 동정한 결과 각 염색체마다 특이적인 띠를 확인할 수 있었다. 염색체의 띠는 1개에서 6개까지 염색체별로 관찰되었고 X염색체는 단완(short arm)은 1개 장완(long arm)은 3개 Y염색체는 장완과 단완에서 각각 1개씩의 띠를 나타내었다. 또한 진돗개의 염색체는 1개 혹은 몇 개의 띠를 나타내어 동원체 정단부위, 중간부위 등에서 띠를 관찰할 수 있었으나 같은 개체에서도 실험에 따라 다양한 띠의 양상이 관찰되어 G-banding 염색에 의한 염색체별로의 특이성을 단정짓기는 어려웠다.

DNA-fingerprinting으로부터 형제자매간에는 동일 형태의 band중

major band에서 형제간에는 44%, 자매간에는 23%의 동일 형태의 다형성을 보였다. 자손들의 RFLP DNA band pattern의 결과 순수 모계로부터 유전되는 band pattern의 유사비율은 16%이며 양친으로부터 공통으로 유전되는 band pattern의 유사비율은 66%로 높았다. 또한 부계로부터 유전되고 있는 band 수는 모계로부터 유전되는 band 수와 유사하였다. 이와 같은 결과로부터 형제자매간 또는 그 자손에 있어서 DNA의 유전형태를 유전자 지문 방법을 통해서 분석하는 것은 매우 신속하고 정확한 방법임을 확인하였고 현재 수렵견, 번견 등의 유전자 지문분석이 수행되고 있다.

Zimmerman 등(1988)의 방법에 의거하여 혈액으로부터 채취한 미토콘드리아 DNA로 RFLP를 수행하였는데 미토콘드리아 DNA의 제한효소 절편 다형성 분석결과 *BamH I*의 경우 9.0, 3.0, 1.1Kb에 해당하는 제한효소 절단부위가 인정되었다. 또한 지역개체군 간 유전적 변이는 RFLP에 의해 나타난 band수와 크기에 의거 진도견과 일반견의 유전적 차이, 진도견 내에서 관상견, 수렵견 간에 있어서 그 차이를 분석한 결과에 의하면 사용한 5종의 제한효소 *BamH I*, *EcoR I*, *Hind III*, *Pst I* 및 *Xba I*으로 절단한 부위는 1-3개로서 polymorphism이 나타나지 않았다. 이는 한등(1993)이 보고한 진도견과 잡종견의 DNA polymorphism연구결과와 유사한 경향을 나타냈다.

혈액시료를 채취한 132개체의 진돗개 중에서 최우수 그룹으로 분리된 5개체와 다른 개 집단과 PCR을 이용한 비교 실험한 결과 약 1.2kb의 진돗개 specific marker를 선별해내었다. 혈액시료를 채취한 132개체의 진돗개 중에서 최우수 group으로 분리된 5개체의 진돗개와 외견상으로 진돗개와 구분이 힘든 잡종견, 아키다, 기주견 및 시바견 등을

대상으로 여러 개의 primer를 다양한 조건으로 RAPD-PCR을 수행하였다. Primer DPR3에 의한 RAPD의 결과 생성된 band range는 1~20개였고 평균적으로 200bp 내지 1500bp 범위에서 10~15개의 band가 형성됨을 관찰할 수 있었다. DP1 과 DPR3 primer에서 다른 품종 group과 구분이 되는 몇 개의 DNA 표지인자(specific marker)를 검출하였는데 primer DPR3에서는 480bp, DP1에서는 350bp, 1.2kbp에 해당하는 band가 진돗개 특유의 유전적 표지인자로 관찰되었다. 그 중 가장 분별력이 좋고 구분이 명확한 DP1 primer의 1.2kb band를 일차적으로 표지인자로 선발하여 전체 진돗개 group의 band pattern 분석을 시행하였다. 진돗개 특이적인 specific marker가 형성되는 21개체에 대하여 성별, 모색, 성상별로 비교, 분석한 결과 7개체인 33%가 수렵견으로 나타나, specific marker가 진돗개의 수렵성과 연관이 있을 것으로 판단된다.

최우수 그룹으로 분리된 5개체에서 생성된 specific marker를 분리 정제하여 염기서열을 분석한 결과 모두 동일함을 확인하였고 이를 진돗개 특이적인 marker DNA라고 결정하고 J라 명명하였다. J의 염기서열 분석을 위해 frame별로 translation 한 결과 ORF를 발견 할 수는 없었다. J 염기서열에 대하여 현재까지 보고된 총 778개의 microsatellite repeat sequence로 search분석한 결과 동일한 서열을 찾을 수 없었으며, 따라서 J 염기서열은 어떤 유전자의 intron등을 포함한 부분서열로 판단되었다.

Genbank BLAST Search결과 총 43개 유전자와 homology를 보였으나 기능이나 성상에 대해 알려지지 않은 hypothetical protein이나 unknown protein이 주를 이루었다. 이는 개에 대한 genome이나 유전자에 대한 연구자료가 세계적으로 미흡한 결과로 판단한다.

결론적으로 J sequence는 진돗개에서 유래된 진돗개 특이적인 specific marker로 인정되며 이 특이도를 높이기 위해서는 J sequence의 제한효소 지도를 작성한 다음 그를 근간으로 여러 개의 절편으로 분리한 다음 각각의 절편을 probe로 이용한 Southern blotting이나 fingerprinting을 수행하여 특이성이 높은 절편을 선정하는 작업을 통해 달성될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 활용방안 및 건의사항

본 실험에서 분리한 진돗개 특이적인 specific marker J는 이상의 결과를 통해 알 수 있듯이 진돗개에서 특이적으로 증폭되며 다른 여타 개 그룹과도 구분이 되는 기준으로 평가된다.

현재까지의 진돗개의 선별방식이나 진돗개 품평회 및 매년 선정하는 champion 심사기준마저도 육안조건이나 외형적 특성에 의존하고 있는 실정이어서 진돗개에 대한 체계적인 특성조사나 유전적 계통분석이 미흡하다. 이는 국견인 진돗개가 아직 전세계적으로 독자적인 종으로 분류되지 못하고 일본의 Akida의 아종(subspecies)으로 분류되고 있는 현실과 전혀 무관하지 않다. 더욱이 2002년 월드컵의 마스코트로 선정하려는 노력이 현재 진행되고 있는 점과 연관시켜볼 때 진돗개의 유전자 수준에서의 특성조사나 유전적 특성을 이용한 체계적인 분류와 구별

점에 대한 연구는 매우 시기 적절한 뿐더러 반드시 이뤄줘야 할 과제라고 사료된다.

따라서 본 연구그룹에서는 분리한 이 marker J를 이용하여 현재까지 알려져 있는 모든 진돗개 그룹의 염색체 DNA에 대해 fingerprinting이나 Southern blotting등을 실시하여 그 결과의 통계적인 처리가 이루어진다면 상기에서 밝힌 진돗개의 유전적인 분류나 특성조사가 가능하며 나아가 우리의 진돗개가 전세계적으로 당당히 독립된 종으로 인정받는데 결정적인 역할을 할 수 있을 것이다.

그러나 본 연구과제에서 수행한 결과만으로는 진돗개의 여러 가지 성상 즉, 모색, 영민성, 귀속성, 충직성, 수렵성 등에 대한 유전적인 연관성을 규명하기에는 미흡한 점이 많다.

물론, 본 연구과제에서 도출한 결과를 보면 specific marker J가 생성되는 진돗개의 33%가 수렵견으로 나타나 이 marker가 진돗개의 수렵성과 어느 정도 연관되어 있다고는 볼 수 있지만, 다른 특성에 대해서는 조사할 수 없는 실정이다.

이는 전 세계적으로 개에 대한 유전자 수준의 연구가 아직 활발히 진행되고 있지 않기 때문에 본 그룹에서 분리한 marker J와 비교 분석할 수 있는 개의 적당한 대상 유전자가 아직 보고되어 있지 않은 까닭이다.

따라서 진돗개에 대한 본격적인 염색체, 유전자와 여러 가지 성상에 대한 비교 분석연구를 본 연구과제에서 얻은 specific marker J와 연계하여 수행한다면 매우 만족할 만한 결과를 얻을 수 있을 것이며 개의 유전자 분석에 대한 연구측면에서도 세계적으로 앞서 나갈 수 있다는 장점을 가질 수 있을 것으로 판단된다.

즉, 본 연구과제의 결과는 이러한 추가적인 보충연구가 체계적으로 새롭게 이루어질 때만이 더욱더 큰 가치를 가지게 된다고 사료되며, 추가적인 보충연구의 내용은 본 specific marker J를 이용한 fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 등의 기법으로 본 marker가 위치하는 염색체의 위치를 밝히고 그 염색체의 전체 염기서열 결정 및 유전자 지도 작성, 유전자 분석을 통한 진돗개의 다른 특이점 분석을 수행하고 진돗개의 여러 가지 성상에 따른 특성분석은 전체 진돗개의 fingerprinting 및 Southern blotting 결과의 통계자료를 바탕으로 유전적 분석을 접근해 나가는 방법으로 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

Summary

I. Title

Studies on chromosome and DNA fingerprints of Jindo-dog.

II. Objectives and significances

Jindo-dog was designated the natural monument No. 53 because of their uprightness for master, homing instinct, bravery and superior hunting ability. So, the government made the law to protect the family line of Jindo-dog.

The first study for Jindo-dog, which the body-shape and habit of Jindo-dog was reported. And the many studies were reported such as, comparison of their brain shape, nuclear type, protein analysis and enzyme activity.

But, there are no reports for the systematic study for the chromosome and nucleotide level of Jindo-dog.

Recently, DNA fingerprinting and RAPD analysis using PCR were used as good tool for the group genetics, gene analysis, distinction the species and so on.

So, the purpose of this study was the establishment for the

genetic standard of Jindo-dog and for the genetic relationship with other dog species, using the nuclear type analysis, DNA-fingerprinting, RAPD-PCR and nucleotide sequence analysis.

III. Contents

The blood samples for this study were collected from the Jindo-dogs in Jindo island and several provinces.

First, the DNA-fingerprinting study was performed. The purified genomic DNA from blood samples were digested with restriction enzyme such as *Hinf* I and separated on the agarose gel and transferred on the Nylon membrane. The transferred DNA were hybridized with pre-labelled commercial probe, probe 33.6[(AGGGCTGGAGG)₃]₁₈ and probe 33.15(AGAGGTGGGCAGGTGG)₂₉. And then the hybridization pattern were analyzed according to their family relationship.

Another approach was carried out with their RFLP pattern of mitochondrial DNA from blood samples.

The other approach was performed using PCR. The selected and cloned specific DNA marker of Jindo-dog using RAPD-PCR, were sequenced and analyzed the relationship with their inherited character.

The isolation of chromosomes using the peripheral blood

lymphocyte incubation and G-banding study were also performed.

IV. Results and applications

1. Results

The nuclear type of Jindo-dog was $2n=78$, $NF=80$. The autosome, 38-pairs, were all telo-acrocentric chromosome, in spite of the X chromosome (submetacentric chromosome) and Y chromosome (metacentric chromosome). The length of 1st chromosome, the longest chromosome, was 4.0 when the smallest chromosome, 38th chromosome, was 1.0. And the X chromosome was 4.6 and Y chromosome was 1.6, respectively.

The specific bands of each chromosome were detected using G-banding study. But, according to their diversity of band pattern in spite of same one, it is difficult to confirm the specificity of each one using G-banding study.

The band similarity of the DNA-fingerprinting was revealed that the relationship with their brothers (44%) and their parents (66%) was higher than their sisters (23%) and their mothers (16%), respectively.

The RFLP patterns of mitochondrial DNA from blood samples were does not revealed the polymorphism. This result was same

with previous report of Han *et al.* (1993).

The RAPD-PCR was performed with the selected standard Jindo-dog group from 132 samples and another dog-group, like Akida, Kiju, Siba. And the 1.2kb length of specific DNA marker of Jindo-dog was selected and named "J".

The specific marker 'J' was sequenced and characterized. There are no ORF in 'J' sequence and not matched with any 778 microsatellite repeat sequence which reported to now. So, the specific marker 'J' is supposed to the gene segment with intron.

2. Applications

The specific marker 'J' of Jindo-dog was amplified only Jindo-dog standard group using PCR. If the statistical disposition for the result of DNA-fingerprinting and Southern blotting for all Jindo-dog using this specific marker 'J' was performed, it is possible to establish the genetic classify and specific character investigation of Jindo-dog.

But, it is difficult to compare with specific marker 'J' and other dog's gene, because of there are few reports for the gene of dog.

For the more study, it is essential to perform the nucleotide-level research of the Jindo-dog's genome and if added our results to this research, we have a good merit for the dog genome study in the world.

Contents

SUMMARY (in Korean) -----	2
SUMMARY -----	11
CONTENTS -----	15
CONTENTS (in Korean) -----	16
Chapter 1: Introduction -----	17
Chapter 2. Methods for Chromosomal studies of Jindo-dog-----	22
Chapter 2-1. Sample selection for chromosomal study ---	22
Chapter 2-2. Methods for chromosomal study -----	22
Chapter 3. Methods for DNA-fingerprinting studies of Jindo-dog	24
Chapter 3-1. Sample selection for DNA-fingerprinting ---	24
Chapter 3-2. Analysis the result of DNA-fingerprinting -	37
Chapter 3-3. Studies for the polymorphism of mitochondrial DNA -----	38
Chapter 3-4. Studies for RAPD-PCR -----	40
Chapter 4. The results and discussion -----	44
Chapter 4-1. Chromosomal studies -----	44
Chapter 4-2. DNA-fingerprinting studies-----	47
Chapter 4-3. Mitochondrial DNA polymorphism studies-----	50
Chapter 4-4. RAPD-PCR studies-----	53
REFERENCES -----	75

목 차

요약문	2
SUMMARY	11
CONTENT	15
목차	16
제1장 서론	17
제2장 진돗개의 염색체 연구방법	22
제1절 염색체 연구를 위한 진돗개 선정	22
제2절 염색체 연구 방법	22
제3장 진돗개의 DNA 지문법 연구방법	24
제1절 DNA 지문법 연구를 위한 진돗개 선정	24
제2절 DNA 지문법에 의한 진돗개의 개체 및 부자 판정	37
제3절 미토콘드리아 DNA 다형성 연구	38
제4절 RAPD-PCR에 의한 DNA 지문법 연구	40
제4장 연구 결과 및 고찰	44
제1절 진돗개의 염색체 연구	44
제2절 DNA 지문법에 의한 진돗개의 개체 및 부자 판정	47
제3절 미토콘드리아 DNA 다형성 연구	50
제4절 RAPD-PCR에 의한 DNA 지문법 연구	53
참고문헌	75

제 1 장 서 론

인간은 농경 생활을 시작한 전후부터 양이나 소, 돼지, 염소 등의 많은 가축을 길러왔으나, 개는 이들보다 더 이전인 홍적세에서부터 가축화되어 오기 시작한 것으로 밝혀졌고, 이는 다른 가축들은 주로 식용, 노동력 등의 경제적 이용가치 때문에 가축화가 이루어져 왔는 데에 반하여 개는 이러한 경제적인 면보다 정서적으로 사람과 결합되어 가축화가 이루어졌기 때문인 것으로 보고 있다. 인류가 야생동물을 가축화한 최초의 동물이 개(犬)임을 알 수 있음은 구석기 시대 유적에서 개의 유물을 발견할 수 있는 것으로 보아 능히 입증할 수 있다.

개(*Canis familiaris*)는 현재 세계적으로 800 여 품종이 있는 것으로 추정되고 있으며 국제적으로 공인된 품종만도 200 여 종에 이른다. 우리나라의 자랑인 진돗개는 1938년 우리나라 천연기념물 53호로 지정된 이래 1979년 아시아 공인견으로 지정됐고, 1982년에는 세계축견협회로부터 순수 혈통을 인정받았으며, 최근 세계축견연맹(FCI)은 '94 서울 국제축견전람회에서 진돗개를 공인견으로 지정하기에 이르렀다.

진돗개를 가축으로서 사양하게된 뚜렷한 기록은 없으나 구전된 바에 의하면 송남 시대의 무역선이 진도 근해에서 조난 당했을 때에 송남국의 개가 진돗개의 시조를 이루었다는 설과, 고려 고종 때 일어났던 삼별초난시 삼별초군이 강화도에서 관군과 몽고군에게 항거하다가 진도로 옮긴 일이 있었다. 그 때 몽고군이 평정하기 위해 들어왔을 때 남기고 간 개의 후손이라는 설, 이조 초기에 진도군 지산면에 설치됐다는

군영 목장의 번견용으로 몽고에서 수입했다는 설, 한국의 고유견이 있어 번식 유지해 왔었는데 진도에 분포했던 개만이 섬이라는 지리적 조건 때문에 타견과의 혼혈됨이 없이 순수 혈통을 보전해 왔다는 설이 있다. 속설로 구전되어 오는 몽고견설이나 송나라 유래견설은 근거가 애매하다.

개는 근연종(近緣種)에 속하는 이리, 코요테, 자칼과는 약간 다른 단일종으로 분화되어 지역적 특성과 사육 목적에 따라 인위적 도태 등의 여러 가지 수단에 의해 품종을 다양화하여 오늘에 이르고 있다. 그러나 형태, 습성, 유골 등의 비교 연구만으로는 개가 어떠한 품종으로부터 어떠한 과정을 거쳐 가축화가 되어왔고, 세계 각 지역에서 사육되고 있는 다양한 품종들이 어떻게 형성되었는지 분명하게 밝혀낼 수 없었다. 이에 따라 이러한 문제들을 해결하기 위해 분자 생물학적 기법을 이용한 유전학적, 면역학적, 생화학적 연구들이 수행되어 오고 있다. 일반 염색에 의한 핵형 분석 결과 개의 근연종(近緣種)인 이리, 자칼, 코요테는 모두 $2n=78$, $NF=80$ 으로 동일하였으며 단백질 전기영동을 통한 유전적 비교 분석 결과에서도 다양성에 차이가 있었으나 각 종의 지표 인자는 발견되지 않았다.

진돗개는 석기 시대의 사람들이 기르던 개의 후예가 진도라는 특수한 환경에서 혈통과 야성을 비교적 순수하게 유지하면서 토착화된 우리의 고유견이다. 한마디로 진돗개는 귀가 서고 꼬리를 만 한국 고유의 개로서 성능이 우수하고 다른 장점도 많으며, 학술상으로도 실용상 귀중한 개이므로 우수한 순종견으로 보호 육성하는 것이 가장 급선무이다. 일본에서는 각지에 일본견 보존회가 설치되어 있어 순수 우랑견의 사양 장려가 행해지고 있다. 따라서 훨씬 우랑의 일본견이 나오고

있으며 일본에서는 일본견에 대한 열의가 높아가고 있다.

그 동안의 진돗개에 대한 연구는 일본인 森 爲三에 의한 체형과 습성에 관한 최초의 보고에 이어, 일반 체형과 대뇌의 비교 해부학상의 특징 및 혈액상에 관한 연구, 진돗개의 핵형과 단백질의 분석 및 효소 활성에 관한 연구, 기생충 감염 실태 조사, 혈액치, 혈액성 및 혈액 화학치에 관한 연구, 진돗개와 삼살개 혈액 단백질의 비교 연구, 혈청 단백질의 비교 연구, 혈청 LDH와 혈청 ALP의 동위 효소와 활성도, 진돗개의 모색등의 여러 방면으로 수행되어 왔다. 그러나 이러한 연구들은 진돗개의 골격, 외적 형태, 특성 등에 관한 조사 연구로서, 진돗개의 특유성을 밝히고 순수한 혈통 보존을 가능케하는 과학적인 보호 육성에는 미비점이 많았으며, 진돗개 혈통 보존을 위한 염색체에 관한 체계적인 연구와 DNA 지문법에 대한 종합적인 연구는 찾기 힘들었다. 이에 우리는 유전 공학적 기법인 DNA 지문법(DNA finger-printing method)과 염색체에 관한 연구로 순수 혈통 보존에 이바지하고, 아울러 진돗개에 발생하는 질병들을 분자 생물학적 기법으로 접근하여 진돗개 보호 육성에 일조를 하고자 한다. 최근에 DNA 지문법은 범죄 감식, 친자 감별, 가계 분석, twin zygoty의 결정, 집단 유전학, 행동 생태학의 분야에서 널리 활용될 뿐만 아니라 멸종 위기에 처한 동식물의 육종과 보존을 위해서도 없어서는 안될 중요한 연구 방법이 되고 있다.

한국 고유의 토종견으로서 여러 가지 뛰어난 우수성 때문에 천연기념물로 지정되어 보호 받고있는, 진돗개의 혈통을 보존하고 합리적 육종을 위해서는 진돗개 집단내의 혈통 관계에 대한 정보가 필수적이다. 따라서 DNA 지문법을 이용 진돗개의 혈통을 연구함으로써 과학적 육종의 기초를 다지는 일은 지극히 중요한 일이 아닐 수 없으며 기타 최

근의 분자 생물학적 기법을 응용한 진돗개의 염색체 banding에 관한 연구, *in situ* hybridization을 이용한 연구 그리고 더 나아가 진돗개에 발생한 전파성 성기육종(TVT) 종양세포의 염색체 분석에 관한 연구 등도 그 의의가 매우 크다고 할 수 있다. 그런데 이러한 DNA 지문법을 이용한 유전자 연구는 국내에서도 이미 경북지방에서 주로 사육되어온 역시 한국 고유의 토종견인 삼사리를 대상으로 하여 연구된 바 있고 또한 *in situ* hybridization이나 기타 염색체 분석에 관한 연구들도 국내에서 이미 여러 가지 질병진단의 기법으로 응용하기 위한 실험등이 활발히 수행되고 있다. 본 대학에서도 최근 뇌 심근염 바이러스 감염폐지의 심장, 신장 등 조직절편을 *in situ* hybridization을 이용 특이성이 높고 신속한 분자 생물학적 기법을 확립한 바 있다.

DNA 지문법은 최근에 행동 생태학, 집단 유전학, 멸종 동식물 보존 등에서 그 활용 가치를 크게 인정받고 있다. 동물 세포의 유전 정보를 총괄하는 genome상에는 minisatellite로 이루어진 tandem repetitive region이 각각의 개체마다 다르게 존재하고 있다고 밝혀져 있다. 이것은 아마도 DNA 복제시에 slippage 혹은 unequal crossover 에 의해서 형성된 것으로 추정되는데 생물의 종간은 물론 동일 종내의 개체에서도 큰 다양성을 보인다. DNA 지문법은 개체들을 DNA 수준에서 구별할 수 있는 방법으로 현존하는 진돗개의 혈통 관계를 분명히 하고 합리적이고 과학적인 육종을 가능하게 할 것이다. 따라서 국내에서 우리 기술로 우리 고유의 토종견인 진돗개의 혈통보존을 위한 연구들을 수행하는 것은 지극히 당연한 일이며 또한 충분한 가능성이 있는 일인 것이다.

진돗개 염색체의 유전적 특성을 확립하기 위한 핵형 분석과 진돗개

에서 가장 흔히 발생하는 TVT 세포와의 비교 연구 및 이들 염색체의 *in situ* hybridization과 유전자 수준의 핵산 연구를 통해서 유전적 변이를 추정함으로써 다른 품종과의 유전적 관계를 규명하고, 분자적 수준에서 타 견종과의 구별을 할 수 있는 진돗개 특유의 표지인자를 개발하고 이 표지인자와 유전형질과의 연관관계 분석에 의한 특성을 규명하고자 이 연구를 수행하게 되었다.

제2장 진돗개의 염색체 연구방법

제1절 염색체 연구를 위한 진돗개 선정

순수 혈통의 진돗개를 찾는 것이 중요하고 채혈 후 바로 RPMI1640 배지에 분주하여 5% CO₂ 조건하에서 배양을 실시해야 하고 혈액내 림프구를 배양하기 위해서는 아주 신선한 혈액이 필요하기 때문에 핵형 분석을 위한 공시동물은 광주관내 개업 수의사 및 진돗개 집단 사육농장에서 암, 수 각각 10마리의 혈액을 사용하여 반복실험을 하였다.

제2절 염색체 연구 방법

일회용 주사기에 헤파린을 넣고 개의 앞다리 정맥에서 약 3ml의 혈액을 채취하여 lymphocyte를 분리하였다. 소독된 conical tube에 RPMI1640 80ml과 bovine calf serum 20ml 혼합액 7ml씩을 분주하고 PHA 0.5ml씩을 넣어 배양배지를 만들었고 여기에 0.5ml의 lymphocyte를 배양하였다. 이를 37°C에서 72시간 배양시킨 다음 0.2ml의 colcemid를 처리하여 2시간 배양 후 중기세포를 수집하였다. 배양된

세포액은 1,200rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 침전된 세포에 저장액(0.075M KCl)을 넣고 37℃에서 15분간 방치한 후 저장액을 제거하고 고정액(methanol:acetic acid=3:1)을 가하여 저온에서 15분간 방치한 다음 이를 1,200rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 침전된 세포에 새로운 고정액을 가하고 최종 원심 분리된 세포에 다시 새로운 고정액을 가하여 공기건조법에 의하여 염색체 표본을 제작하였다.

일반염색은 제작된 염색체표본에 4% Giemsa용액으로 10분간 염색하였으며 이를 건조시킨후 permount로 봉입하여 관찰하였다.

G-banding 분석은 제작된 슬라이드를 3-5일간 건조시킨 다음 0.25% trypsin용액에 1-3초간 처리하였고 이를 다시 PBS용액으로 세척후 공기건조 시켰다. 이를 Giemsa용액으로 10분간 염색한후 permount로 영구표본을 만들었다. 광학현미경(X 1,000배)에서 중기염색체를 촬영하여 핵형 분석을 하였다.

제3장 진돗개의 DNA 지문법 연구방법

제1절 DNA 지문법 연구를 위한 진돗개 선정

진돗개 특유의 표현형질의 분석을 위하여 진돗개 사육 농장 및 가정 견, 훈련소, 동물 병원 등에서 사육되고 있는 진돗개 132두 및 잡종개 34두로부터 혈액을 채취 하였다. 전체의 진돗개 및 잡종견 채혈시료 확보내용을 Table 1 에 나타내었다. 이들 진돗개 중 진도군 고군면 모사리 1265번지 명갑춘 씨가 사육하고 있는 「향동이」, 「안치」, 전남 나주시 금천면 오강리 7-13번지 정해승 씨가 사육하고 있는 「星君」, 광주광역시 북구 운정동 400번지 김복길 씨가 사육하고 있는 「칠성」, 「정호」 등 5두를 연구대상 우수 진돗개로 선정하였다(Fig. 1).

「향동이」, 「안치」는 제6회 한국 진돗개 품평회(93. 10. 17.) 챔피언쉽 획득견이며 「星君」은 96년 11월 3일 일본 도쿄에서 개최된 세계축견연맹(FCI) 「'96 FCI Tokyo International Dog Show」에서 스피츠 부문 특별상을 수상한 세계속으로 자리잡고 있는 한국의 토종개로서 30여개국 1백여종 3천3백마리와 당당히 겨뤄 세계의 명견임을 입증시킨 국견이다. 「칠성」은 '97춘계 제27회 전국 우수견 선발대회에서 최우수 초청견으로서 90년부터 현재까지 39회에 걸쳐 수상력을 가진 진돗개 백구의 최고봉으로 인정받고있는 우수견이며, 「정호」는 93년부

터 지금까지 17회에 걸쳐 수상력을 가진 '97 FCI서울 국제 축견 전람회
본부전 최우수 초청견이다.

진돗개 염색체의 표준 핵형 확립 연구에 이용한 진돗개는 heparin을
넣은 일회용주사기로 채혈한 혈액을 바로 RPMI640배지에 분주하여
5% CO₂ Incubator에서 배양을 실시해야 하므로 광주광역시 관내 개업
수의사 및 집단 사육농장에서 암수 각각 10마리씩을 선정하여 반복실
험을 하였다.

염색체 핵형 분석을 위한 채혈은 혈액내 림프구를 배양하기 위해선
아주 신선한 혈액이 요구되기 때문에 실험실까지 1시간 이내에 도착할
수 있는 지점의 진돗개를 선정하여 실험을 수행하였다.

Table 1. 전체의 진돗개 및 잡종견 채혈시료 확보내용

사 육 농 가	두 수
진도군 군내면 녹진리 양승희	10
진도군 군내면 월가리 이운규	12
진도군 군내면 월가리 최만원	11
진도군 진도읍 쌍정리 진돗개 축협 종축장	7
진도군 고군면 유교리 최희정	3
진도군 고군면 유교리 이근옥	2
진도군 고군면 유교리 최규생	2
진도군 고군면 오류리 이화춘	3
진도군 고군면 모사리 명갑춘	8
진도군 고군면 회동리 박채연	1
진도군 고군면 회동리 박정식	1
보성군 문덕면 용암리 서도원	22
나주시 금천면 오강리 정혜승	26
광주시 북구 운정동 김복길	15
담양군 금성면 석현리 이종구	5
광주시 북구 용봉동 손창호	14
광주시 북구 용봉동 박인철	7
영암군 영암읍 회문리 박덕철	6
장흥군 용산면 모산리 손춘식	5
나주시 남평읍 대교리 서희열	4
나주시 남평읍 대교리 김양숙	2
진돗개 132 + 잡종견 34	166

1996년 진도 채혈 목록

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
1	수	백구	백색		
2	암	막내	백색		
3	암	물레	백색		
4	암	쌍순이	백색		
5	수	달산	황색		
6	수		백색		
7	암	검순이			
8	암	없음	황색		
9	암	없음	백색		
10	수	없음	황색		
11 - 22			이운규씨의 개		
11	수	떡수	황색		
12	암	옥수	황색		
13	수	백수	백색		
14	암	백희	백색		
15	암	진순	황색		
16	수	진부	황색	외측귀 말람	
17	수	웅덕	황색		
18	암	황금	황색	순하고 예민	
19	암	백은	백색		
20	수	진수	황색		
21		진영	황색	엄살이 심함	

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
22	수	백파	백색	엄살이 심함	
23 - 29			최만원씨댁 수렵견		
23	암	백구	백색		
24	암	백자			백구의 자
25	수	돌개바람	백색	체구가 큼	
26	암	백자2호	백색		
27	암	백자2호	백색		
28	수	황구	황색	다양한 색의 새끼	
29	암	없음	황색		잡종
30	암	진순	황색		
31	수	엽뿔	황색	사나움	
32	수	가뿔	황색		
33	수	소뿔	백흑	순함	
51 - 57			축협 진도개 종축장의 개		
51	수	벽파	백색	훈련이 잘됨	
52	수	없음	백색	'95년 챔피언의 부	
53	암	유교	백색		
54	암	모름	백색		
55	수	모름	백색		벽파의 자
56	수	모름	백색		
57	암	모사	황색		
58	암	오일	백색		

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
59	암	대사	백색	사냥성	
60	암	덕병	백색		
61	암	백구	백색	'95진도견 장려상	
62	수	없음	백색		
63	수	돌이	백색		
64	암	출랑이	백색		
65	암	똥보	백색		
66	암	없음	백색		
67	암	늑자	백색		
68	수	향동이	황색		
69	암	안치	백색	사냥을 잘함	
70	수	노랑이	황색		
71	암	노랑이	황색	야생기질이 있음	
72	수	정코	황색	노랑이의 자	
73	암	송상이	황색		
74	수	꺼명이	흑황		
75	수	없음	흑색		
76	암	호미	황색		
77	암	없음	황색		

1997년 진도 채혈 목록

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
101	암	없음	백색		진도 90%
102	암	호경이		온순	아끼다근연
103	암	없음	황색	온순	도사,아끼다
104	수	누렁이	황색	겉이 많음	도사,아끼다
105	암	쌍꺼풀	백색	성질이 급함	진도 90%
106	암	쫑	황색	사냥성	
107	암	백구	백색	주위환경에 민감	
108	수	설호	백색	투견	피플 50%
109	수	망치	백색	거칠다	진도근연
110	수	두산	백색	거칠다	진도근연
111	수	건	백색	사냥성	진도 99%
112	암	잠내	흑색	순함	그레이하운드
113	암	재롱이	황색	사냥성	그레이하운드
114	수	망기	백색	순하고 차분	진도,기주
115	암	뽀미	황얼룩	순함, 꼬리 절단	포인타
116	수	미키	흑얼룩	성질 차분	포인타
117	암	용순	황색	귀 한쪽이 안섬	진도산
118	암	곰순	황색	거칠다	도사,아끼다
119	암	코리	흑황	온순	라프코리
120	암	갑순	백색	목욕	
121		주현	황색	소형	시바
122	암	백곰	백색	투견	아끼다
이상 22두				전남 보성군 망일봉 농장	

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
131	수	인석	황색	아주 대범	미견
132	수	백호	백색	대범	미견
133	수	흑표	흑적색	겁이 많음	
134	수	성군	황색	대범	일본특별상
135	수	무명	황색	활동적	시바견 소형
136	수	요스타	흑황색	전람회챔피언 다수	세퍼드
137	스	훈호		평범	세퍼드
138	수	루퍼		훈련 챔피언	세퍼드
139	수	폭탄		잡종견	
140	수	팔만	황색	사냥성	
141				사냥견	
142	수	번개	흑색	사냥견	그레이하운드
143	암	메화딸	황색	멧돼지 사냥견	피플,하운드
144	수	막둥이	황색	사냥성	피플,하운드
145	수	다크	흑색	용맹	
146	수	툽	흑색		
147	수	워커	흑색		
148	수	승진	백색	투견, 꼬리 직립형	기주견
149	암		황색	교배 대기용	진도
150	암		황색	교배 대기용	진도
151	암		황색	교배 대기용	진도
이상 21두				전남 나주시 금천 가정견 훈련소	

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
152	수	용	백색	사냥	진도, 기주
153	수	순혈	백색	광주전람회 출품	
154	수	칠성	백색	매우영리, 1억호가	챔피언 다수
155	수	정호	황색	'97한국챔피언	윤호의 자
156	암	정란	백색		칠선의 자
157	암	강심	황색		
158					
159	수	진도			
160	암	윤라	황색		
211		칠윤			칠성의 자
이상 10두			광주 북구 운정동 김복길씨택		
171	암	삼순	황색	용맹	진도
172	암	귀주	백색	호전적	기주,진도
173	암	충순	황색	호전적	삼순의 자
174	암	백투	백색		백구의 자
175	암	사순	황색	순함	진도산
176	암	백구	백색	투견	진도
177	암	시종	황색	입이 기형	사순의 자
178	암	오순이	황색	순함, 다혈질	진도
179	암	땡땡이	백색	주인만 따름	백구의 자
180	암	승진	백색	"	"
181	암	똥개	황색	"	사순의 자
182	수	백수	백색	"	삐쩍이의 자
183	암	백쓰리	황색	"	백구의 자

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
184	수	광팔	황색		백구의 자
이상 14두			전남대학교 수의과 대학		
201	수	강 타	백색	투견, 온순	진도직산
202	수	진 돌	백색	대범한 편	장돌, 흑순
203	수	갑 돌	황색	대범	
204	암	갑 순	황색		
205	암	동 순	황색	전시중인 진도견	
206	수	칼 빈	황색	마약 탐지견	
207	암	코 리	황색	마약 탐지견	
이상 7두			동물병원 박인철		
230	암	최진실	황색	진도직산	
231	수	백 호	백색	훈련대기	
232	암	바 투	황색	몸안쪽백색	
233	암	진 희	황색	진도직산	
234	수	진 수	황색	진도직산	
235	암	뽕 미	백색	신경예민	갑들의 자
236	암	돼 지	백색	성질무난	
237	암	검둥이	흑색		
238	수	장 군	흑황		성군의 자
239	암	또 또	백색		
240	암	맹 순	황색	싸움잘함	갑들의 자
241	암	거멍이	흑색	온순	
242	암	지 선	흑색	온순	
243	암	백 구	백색	진도견의 특성교루	

No.	성별	이름	모색	성질	근연관계
244	암	부용	황색	쥐를 잘 잡음	강포의 자
246	암	복실	황색	전형적 진도견	
이상 15두			나주 금천 가정견 훈련소		
247	암	노랭이	황색	암전	
248	수	근본	백색	크다	한솔의 자
249	수	백구	백색	수렵견, 지능높음	방풍의 자
250	암	황진	황색	중간크기	
251	암	백미	백색	사냥성	
252	수	백구	백색	사냥견 스타일	
이상 6두			나주 남평 전남애견 훈련학교		

1. 향동, 안치



2. 성군



3. 칠성



4. 정호

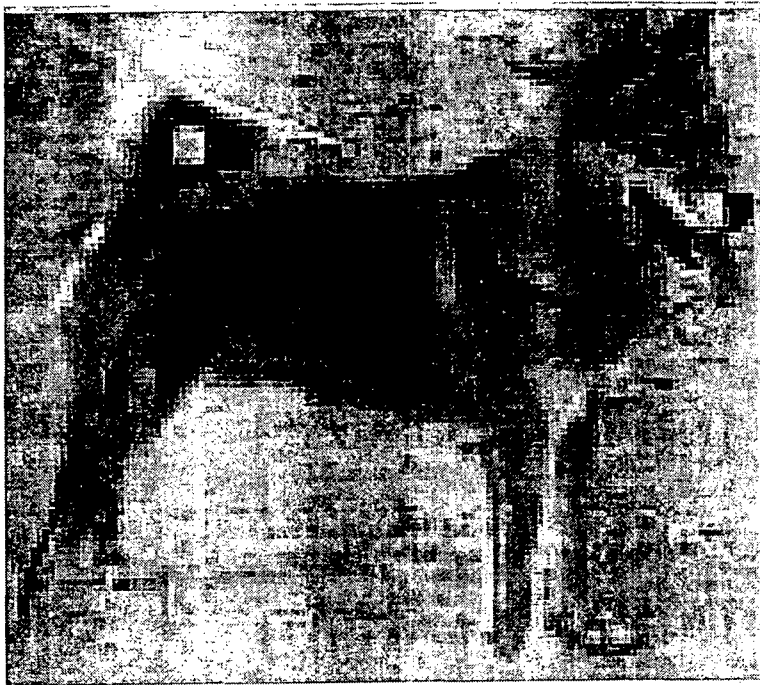


Figure 1. 진돗개 대표군으로 선정된 5마리 진돗개

제2절 DNA 지문법에 의한 진돗개의 개체 및 부자 판정

유전자 지문법에 의한 진돗개의 개체 및 부자 판정을 위하여 60두의 진돗개와 6두의 일반견, 3두의 도입견들로부터 각각 5ml의 혈액을 채취한 후 500mM EDTA 20을 첨가하여 혈액응고를 방지하고 -80℃에서 보관하였다.

DNA의 분리정제는 5 Prime-3 Prime. Inc. (Boulder, CO 80303 USA)사의 Phase Lock Gel Syringe Protocol에 의하여 수행하였다.

분리정제된 DNA를 *EcoR* I, *Hind*III, *Hinf*I, *Alu* I 등 다양한 제한효소로 절단한 뒤 1% agarose gel을 사용하여 전기영동 하였다.

Probe DNA조제는 Cellmark Diagnostics사가 개발한 DNA fingerprint용 Multi-locus probe(MLP) 33.15(AGAGGTGGGCAGGTGG)₂₉ kit 및 33.6 [(AGGGCTGGAGG)₃]₁₈ kit를 이용하여 nucleotide transferase를 이용 ³²P-dATP로 end-labelling하여 Southern hybridization에 이용하였다.

제3절 미토콘드리아 DNA 다형성 연구

제1항 진돗개 및 잡종개 조직에서 mtDNA 분리

MtDNA의 분리는 Ha 등(1995)이 삽사리 혈연 연구시에 사용한 Zimmerman 등(1988)의 방법을 따랐다. 도살직후의 개에서 취한 간 조직 3-4g에 0.24M sucrose, 0.1M EDTA 용액 15ml를 가하여 homogenize 한 후 2-3겹의 gauze로 여과하였다. 분쇄된 시료를 20ml의 0.34M sucrose, 0.1M EDTA 용액 위에 흔들림이 없이 올려 gradient를 형성했다. 이와 같이 형성된 시료를 3,000rpm으로 10분간 원심분리하여 침전된 핵과 완전히 분쇄가 되지 않은 세포를 제거했다. 상등액을 8,000rpm으로 20분간 원심분리시켜 미토콘드리아 분획을 침전시킨 후 10ml의 0.24M sucrose, 0.1M EDTA 용액에 재혼탁한 후 다시 원심분리 했다. 이렇게 얻은 미토콘드리아 분획을 0.3M sucrose, 0.005M MgCl₂, 0.02M Tris-HCl(pH7.5) 용액으로 재혼탁 시켰다. 혼탁된 용액에 RNase A 15 μ l, DNase 15 μ l를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리하여 RNA와 미토콘드리아 밖에 존재하는 nuclear DNA를 제거했다. 처리된 용액을 0.3M sucrose, 0.005M MgCl₂, 0.02M Tris-HCl(pH7.5) 용액 4ml로 재현탁한 후 8,000rpm에서 2-3회 다시 원심분리하여 미토콘드리아 외부에 존재하는 DNase를 제거했다. DNase가 제거된 처리액에 50 μ l의 10% SDS를 가하여 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 처리한 후, 50 μ l의 Proteinase K를 처리한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 동량의 Tris

buffer-saturated phenol/chloroform으로 추출하고 역시 같은 양의 ether로 2회 추출했다. 여기에 2배의 ethanol을 가하여 -70℃에서 45분간 방치한 후 12,000rpm에서 20분간 원심분리시켜 mtDNA를 침전시켰다. 이것을 다시 0.25ml의 70% ethanol로 mtDNA를 침전시켜 불순물을 제거한 후 TE buffer 50-100 μ l에 녹여서 이용하였다.

제2항 진돗개 mtDNA절편 pattern의 검출

진돗개 말초 혈액에서 추출한 DNA를 적당한 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose gel 전기영동법으로 분리하여 Southern blotting법에 의해 agarose gel에서 nylon membrane으로 전사하였다. 그 후 nylon membrane을 32 P로 표지한 mtDNA를 probe로 하여 hybridization하고 autoradiography로 절단한 mtDNA pattern을 검출하였다.

제 4절 RAPD-PCR에 의한 DNA 지문법 연구

제 1항 혈액 DNA 추출

RAPD분석을 위한 genomic DNA는 Sambrock등 (1989)의 방법을 이용하여 진돗개 혈액으로부터 분리하였다. 먼저 얼린 혈액 sample을 실온에서 녹인 다음 vortexing하여 잘 섞어준 후 동량의 PBS buffer (pH 7.4)를 첨가한 후 3,500g, 15min, 실온에서 원심분리 한 후 상등액을 버린다. 침전물에 extraction buffer (10mM Tris-Cl, 0.1M EDTA, 20 μ g/ml Rnase, 0.5% SDS, pH 8.0)를 가하여 pellet을 재현탁 시킨다. 그리고 water bath 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨다. Proteinase K를 최종농도 100 μ g/ml가 되도록 첨가한 후 tip 또는 유리막대로 잘 섞어서 water bath 50 $^{\circ}$ C에서 3 시간 동안 반응시킨다. 실온에서 식힌 후 동량의 buffered phenol (pH 8.0)을 첨가해서 두 층이 섞이도록 10분간 부드럽게 천천히 섞어준다. 이 때 genomic DNA가 깨질 염려가 있으므로 vortex는 안되며 두 층이 완전히 섞여야 한다. 그 후 5,000g, 20min, 실온 조건에서 원심분리 후 상등액을 새로운 tube로 옮긴 다음 buffered phenol (pH 8.0) 첨가의 반응을 2회 더 반복한다. 1/5 volume의 10M ammonium acetate를 첨가하고 100% ethanol을 첨가한 후 10,000g, 20min, 실온 조건으로 원심분리하여 pellet을 취한다. 70% ethanol로 washing한 후 적당량의 증류수로 DNA pellet을 녹여서 준비한다.

제 2항 PCR primers

본 실험의 RAPD 분석을 위해 이용된 random primer는 아래와 같다.

DP1 : 5'- GAT GCG ACT CAG -3'

DP3 : 5'- GTA TGC CCT AAG -3'

DP4 : 5'- ACT AAC CGC CT -3'

DP6 : 5'- CAG CCG TGA A -3'

DP7 : 5'- ACT GTC CAC C

DPR1 : 5'- GAT AGA TAG ATA GAT A -3'

DPR2 : 5'- GTG GTG GTG GTG GTG 3'

DPR3 : 5'- TTG GGG TTG GGG 3'

DPR4 : 5'- CCC TAA CCC TAA 3'

DP1-DP7까지의 primers는 A. D. Ezer등(1996)에 의한 결과를 이용하였고, DPR1-4의 primers는 random하게 합성하여 이용하였다.

제 3항 RAPD-PCR 증폭

PCR 반응조건은 Sambrook et al. (1989)의 방법을 변형하여 실시하였으며 PreMix-TOP(BIONEER) 을 이용하였다. 전체 volume을 20 μ l 로 하여 DNA Thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Co., USA)를 이용하여 50cycle을 수행하였다.

PCR Mixture (total 20 μ l)

- : 10mM Tris-Cl (pH 8.3)
- : 1.5mM MgCl₂
- : 40mM KCl
- : 50ng genomic DNA (template DNA)
- : 40pM primer
- : 2U Taq polymerase

Reaction condition (50 cycles)

pre-denaturation	94°C 3min
denaturation	94°C 1min
annealing	42°C 1min
synthesis	72°C 2min
extension	72°C 7min
store	4°C

제 4항 전기영동

10 μ l의 PCR product를 2 μ l의 loading dye를 혼합하여 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였다. 전기영동은 50V, 1X TAE running buffer, 70min 조건으로 하였고 전기영동 band들이 잘 분리되게 하기 위해서 agarose를 끓인 후 상온에서 shaking하면서 냉각한 다음 water bath에

서 36-39℃가 될 때까지 서서히 냉각한 후 gel cast에 3-5mm가 되도록 gel을 붓는다. 만일 50℃ 이상에서 부으면 전기영동 band들이 전체적으로 물결모양으로 끌리는 양상으로 나타나면서 분리가 잘 이뤄지지 않으므로 주의한다. size marker로는 Kb DNA ladder (Stratagen, USA)를 사용하였으며, 전기영동이 끝난 agarose gel은 etidium bromide로 염색하여 UV상에서 band pattern을 관찰하였다.

제 5항 특이 DNA marker의 cloning 및 sequencing

전기영동상에서 진돗개 대표에서만 나타나는 band(specific marker)를 QIAEX II Agarose Gel Extraction kit (QIAGEN)를 이용하여서 agarose gel에서 분리 정제한 후 이를 곧바로 TOPO TA Cloning kit를 이용하여 cloning을 수행하였다. 이렇게 cloning된 vector들의 sequencing 반응은 Dye Terminator Cycle Sequencing method로 ABI 310 Genetic Analyzer System (PerkinElmer)을 이용하여 수행하였다.

제 6항 Specific marker sequence 분석

Sequencing에 의해 밝혀진 specific marker의 염기서열을 NCBI BLAST Search를 이용하여 homology 및 alingment를 분석하였으며 microsatellite repeat sequence로 search등 여러 방면에 걸쳐 분석을 수행하였다.

제4장 연구 결과 및 고찰

제1절 진돗개의 염색체 연구

진돗개 염색체의 일반 염색에 의한 핵형은 모두 동일한 양상을 보여주었다. 즉 $2n=78$, $NF=80$ 으로서 상염색체는 38쌍이며, 모두 말단동원체 염색체(telo-acrocentric chromosome)이었으며 X염색체는 차중부동원체 염색체(submetacentric chromosome), Y 염색체는 중부동원체 염색체(metacentric chromosome)이었다.

염색체간의 상대길이는 1번 염색체가 4.0이고 염색체중 제일 작은 38번 염색체가 1.0 으로서 완만하게 짧아지는 경향을 나타냈으며 X염색체는 4.6으로서 1번 염색체와 길이가 비슷하였고 Y염색체는 1.6이었다.

G-banding염색방법에 의해 핵형을 동정한 결과 각 염색체마다 특이적인 띠를 확인할 수 있었다. 염색체의 띠는 1개에서 6개까지 염색체별로 관찰되었고 X염색체는 단완(short arm)은 1개 장완(long arm)은 3개 Y염색체는 장완과 단완에서 각각 1개씩의 띠를 나타내었다. 또한 진돗개의 염색체는 1개 혹은 몇 개의 띠를 나타내어 동원체 정단부위, 중간부위 등에서 띠를 관찰할 수 있었으나 같은 개체에서도 실험에 따라 다양한 띠의 양상이 관찰되어 G-banding염색에 의한 염색체별로의 특이성을 단정짓기는 어려웠다.

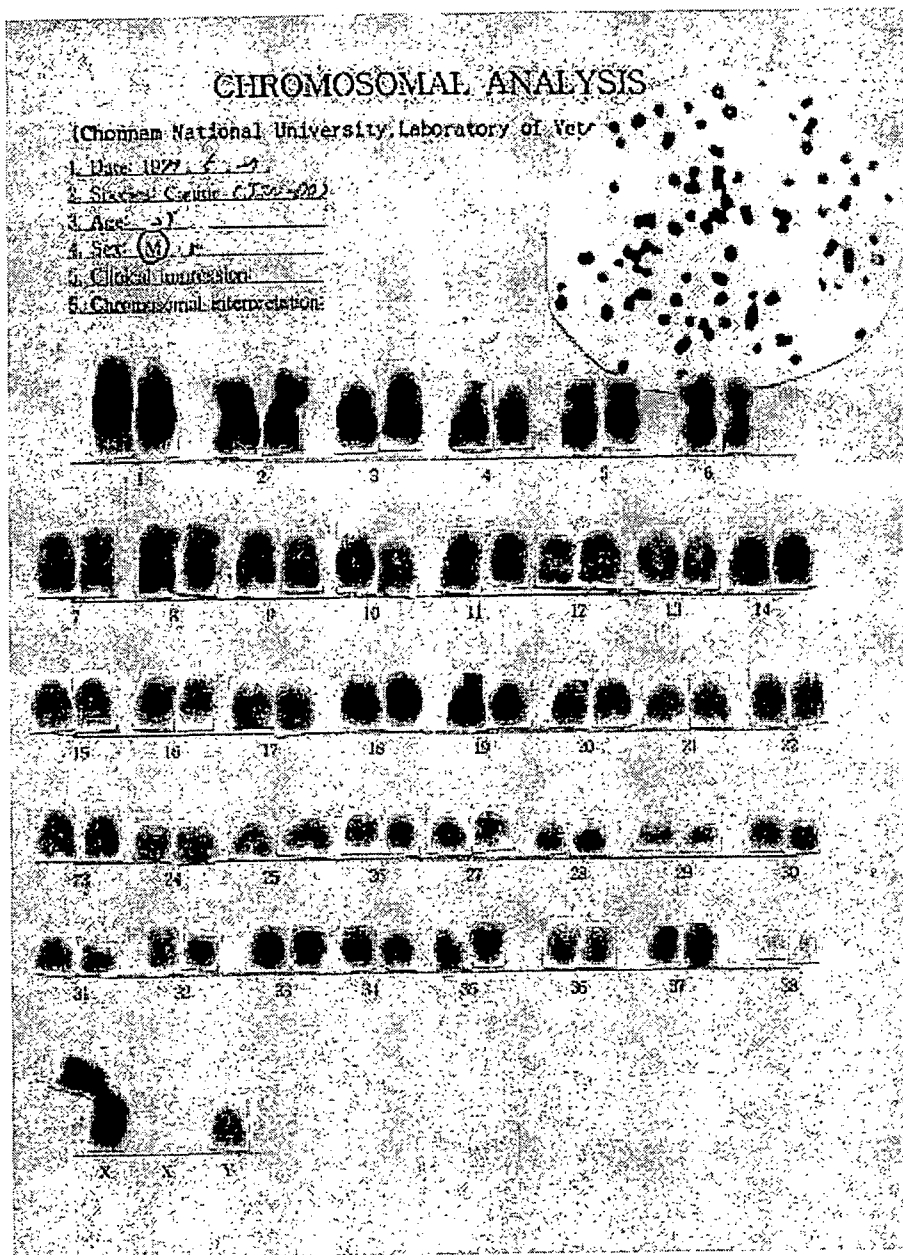


Figure 2. Karyotype of the male Jindo-dog

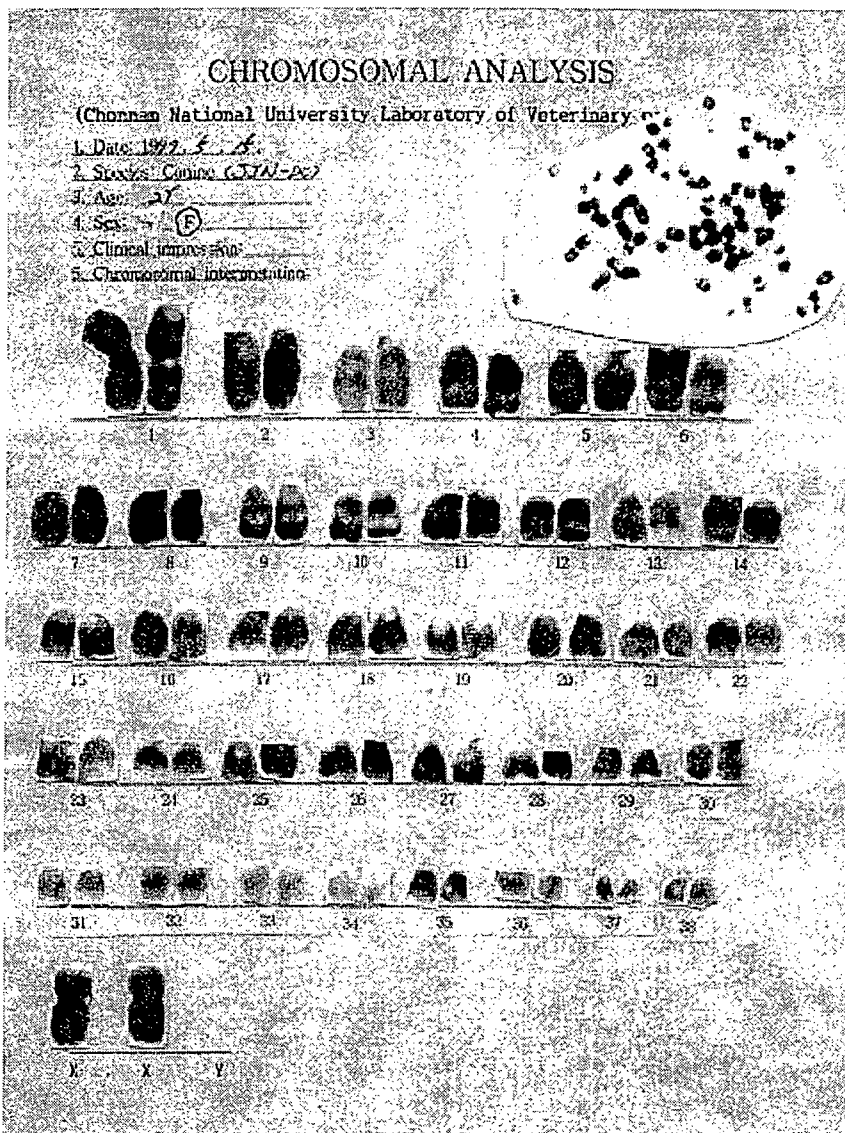


Figure 3. Karyotype of the female Jindo-dog

제2절 DNA 지문법에 의한 진돗개의 개체 및 부자 판정

관상견 9마리로부터 혈액을 채취하여 얻은 시료로부터 DNA fingerprinting을 행한 것을 figure 4에 나타내었다.

lane 1, 4, 5, 6, 9의 시료는 진도견 중 관상견이며 그 중 1, 6, 9번 시료는 자매로부터 그리고 4, 5번은 형제로부터 각기 채취된 시료를 제한 효소 *Alu I* 으로 절단한 후 Jeffrey가 고안한 probe 33.6을 labelling하여 Southern blotting한 것이다. 자매들과 형제간에 나타난 band수를 Table 2에 나타내었다.

Sample	Band pattern		
	No. of major	No. of minor	No. of total
1	12	9	21
6	20	5	25
9	15	6	21
4	16	5	21
5	16	6	22

Table 2. Number of band patterns within sisters and brothers

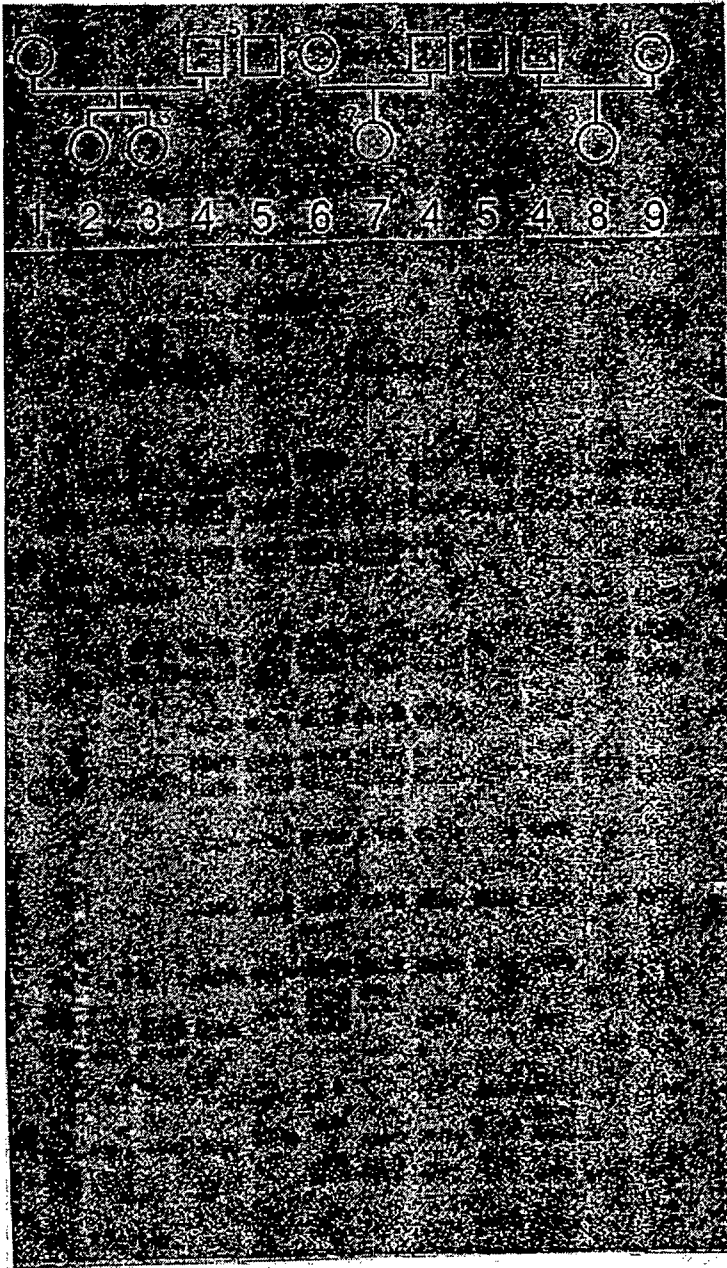


Figure 4. DNA fingerprints of a Jindo dog family. $6\mu\text{g}$ samples of blood DNA were digested with *Alu* I, electrophoresed through a 20cm long 1% agarose gel and Southern blot hybridized to ^{32}P -labelled human minisatellite probe 33.6.

형제 자매간에 동일형태의 band형태 중 4번과 5번의 형제간에 major band중 동일한 형태의 다형성을 보여 형제간에 44%의 유사성을 나타내 그들이 형제간임을 보여주고 있고 세 자매간에는 총 26의 major band중 공통된 band의 수는 6개로 23%의 유사성을 나타내 이들이 자매간임을 보여주고 있다. 그러나 1번과 6번, 1번과 9번, 6번과 9번 사이의 band 유사성은 약 43%로 세 자매가 공통으로 갖는 band보다는 높은 유사성을 보여주고 있다.

자손들의 RFLP DNA band pattern은 1번, 4번의 자손이 2, 3의 band 형태를 관찰한 결과 순수모계로부터 유전되고 band pattern 유사비율은 16%이며 양친으로부터 공통으로 유전되는 band pattern의 유사비율은 66%로 매우 높았다.

또한 부계로부터 유전되고 있는 band수는 3개로 모계로부터 유전되는 band수와 유사하였다. 한편 모계 6번과 9번으로부터 얻어진 자손들의 band pattern도 자손 2,3의 band pattern과 매우 유사함을 알 수 있었다. (Table 3 참고)

Offspring	Major	Minor	Total
6	20	5	25
9	15	6	21
4	16	5	21
5	16	6	22

Table 3. Offsprings Band Pattern

이와 같은 결과로부터 형제자매간 또는 그 자손에 있어서 DNA의 유전형태를 유전자 지문방법을 통해서 분석하는 것은 매우 신속하고 정확한 방법임을 확인하게 되었고 현재 수렵견, 번견 등의 유전자 지문분석이 수행되고 있다.

제3절 미토콘드리아 DNA 다형성 연구

미토콘드리아 DNA의 분리정제는 blood cell을 용균한 다음 초원심 분리방법에 의거 미토콘드리아를 분리하고, 분리된 미토콘드리아로부터 Zimmerman(1988)등의 방법에 의거 DNA를 분리 정제하여 *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind*III, *Pst* I 및 *Xba* I 등의 제한효소로 절단한 뒤 0.8% Agarose gel 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하여 Jeffrey등의 33.6과 33.15 probe와 인위적으로 합성한 probe를 이용하여 southern hybridization을 수행하였다.

지역개체군 간 유전적 변이는 RFLP이 의해 나타난 band 수와 크기에 의거 진도견과 일반견의 유전적 차이, 진도견 내에서 관상견, 수렵견 간에 있어서 그 차이를 분석 중에 있다. 현재까지 얻어진 결과를 table 4 및 Figure 5에 나타냈다. 사용한 5종의 제한효소 *Bam*H I,

EcoR I, *HindIII*, *Pst I* 및 *Xba I* 으로 절단한 부위는 1-3개로서 polymorphism이 나타나지 않았다. 이는 한등(1993)이 보고한 진도견과 잡종견의 DNA polymorphism 연구 결과와 유사한 경향을 나타냈다.

최근 김경석(1998)은 미토콘드리아 DNA가 개 품종간의 유연성을 밝히는 데는 적합하지 않으며 핵 DNA 자체에 대한 연구가 수행되어야 할 것이라고 지적하였다. 특히, domestic dog와 같은 다수 품종과 다수 개체가 있는 경우 집단적으로 분석을 하여 이들 사이의 변이 및 분화 특징을 조사해야 할 것으로 사료된다고 의견을 제시하였다.

Table 4. Restriction fragment of Jindo-dog mtDNA

Enzyme	No. of restriction site	DNA size of restriction fragment (kb)
<i>BamH I</i>	3	10.8 , 3.3 , 2.0
<i>EcoR I</i>	3	6.8 , 4.7 , 1.0
<i>Hind III</i>	2	10.5 , 2.0
<i>Pst I</i>	1	16.5
<i>Xba I</i>	2	12.0 , 3.0

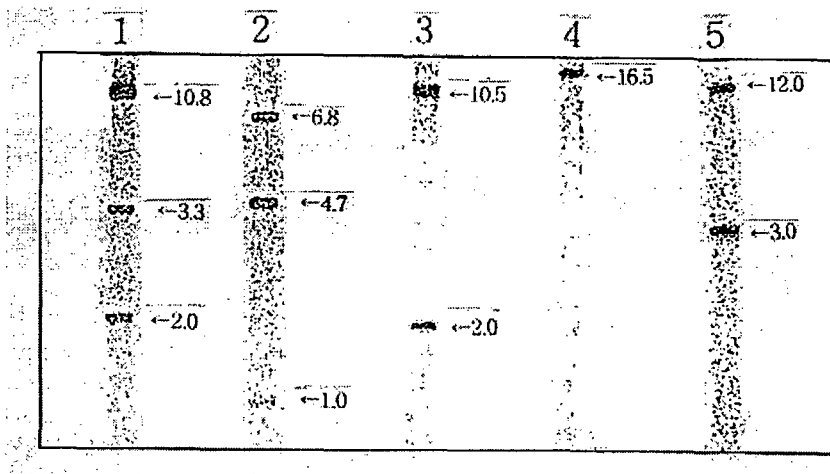
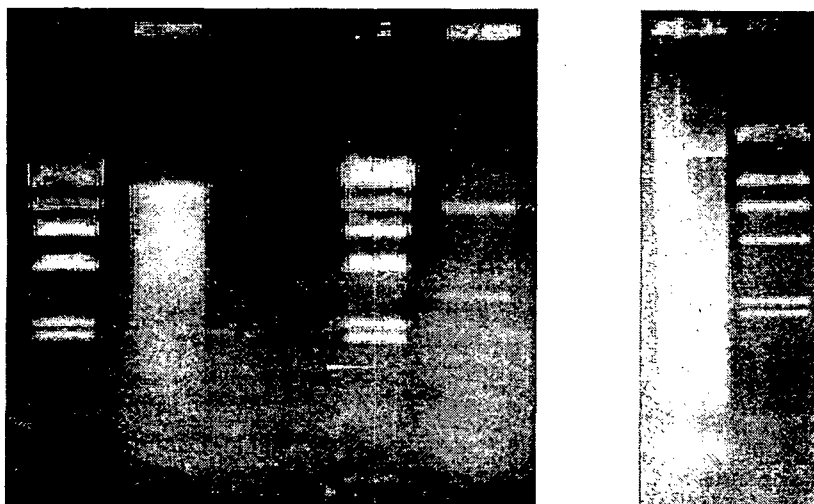


Figure 5. Restriction cleavage patterns of Jindo-dog mtDNA digested with 5 restriction enzymes.

Lane 1 : *Bam*H I, Lane 2 : *Eco*R I, Lane 3 : *Hind*III,
 Lane 4 : *Pst* I, Lane 5 : *Xba* I



A

B

Figure 6. A : The restriction pattern of Jindo-dog mtDNA with *Eco*R I and *Bam*H I

B : Jindo-dog mtDNA

제4절 RAPD-PCR에 의한 DNA 지문법 연구

제1항 진돗개의 DNA 표지인자(specific marker) 검출

각각의 primer에 대한 RAPD 수행 결과 생성된 band를 Figure 7~15에 걸쳐 나타냈다. 각각의 primer의 RAPD의 결과 생성된 band range는 1~20개였고 평균적으로 200bp 내지 1500bp 범위에서 10~15개의 band가 형성됨을 관찰할 수 있었다. 그 중 DP1과 DPR3 primer에서 다른 품종 group과 구분이 되는 몇 개의 DNA 표지인자 (specific marker)를 검출할 수 있었다. Primer DPR3에서는 480bp, DP1에서는 350bp, 1.2kbp에 해당하는 band가 진돗개 특유의 유전적 표지인자로 관찰되었다. 이것 중 가장 분별력이 좋고 구분이 명확한 DP1 primer의 1.2kb band를 일차적으로 표지인자로 선발하여 전체 진돗개 group의 band pattern 분석을 시행하였다(Figure 16 참조).

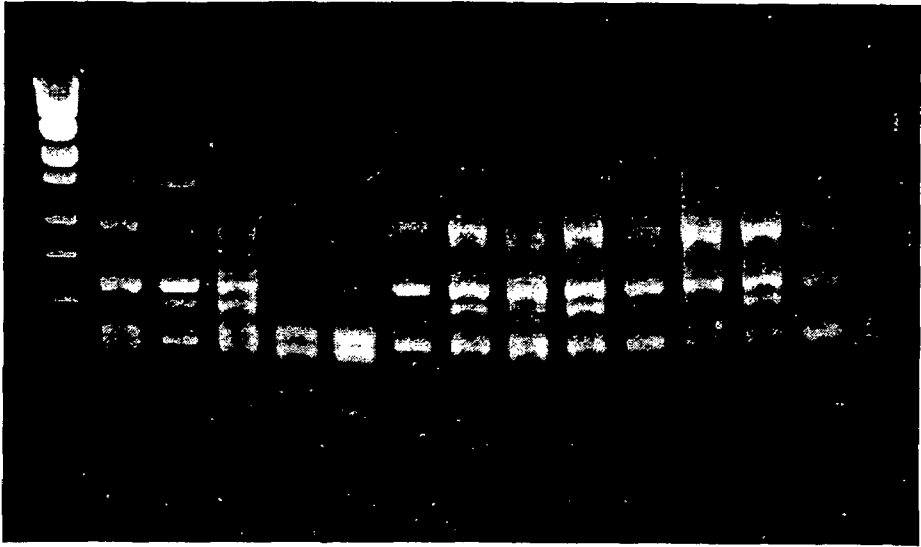


Figure 7. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DP1

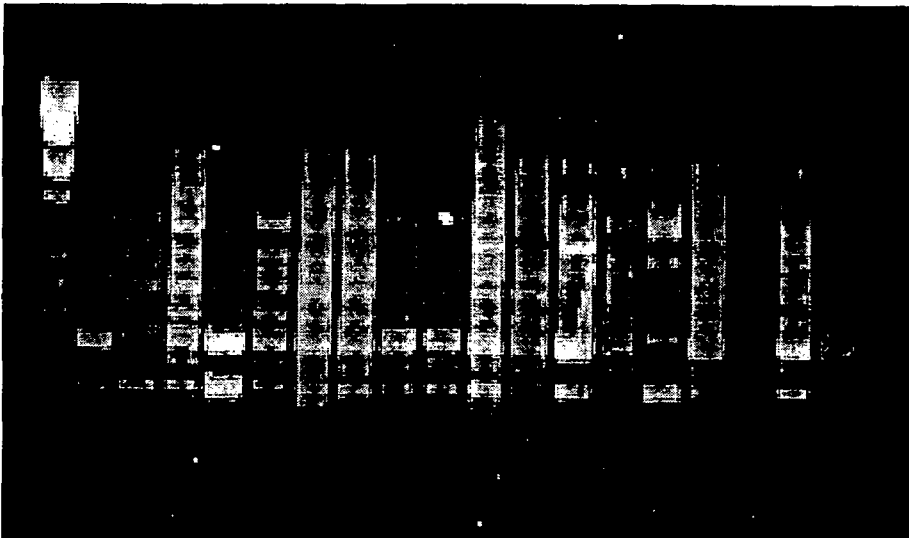


Figure 8. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DP3

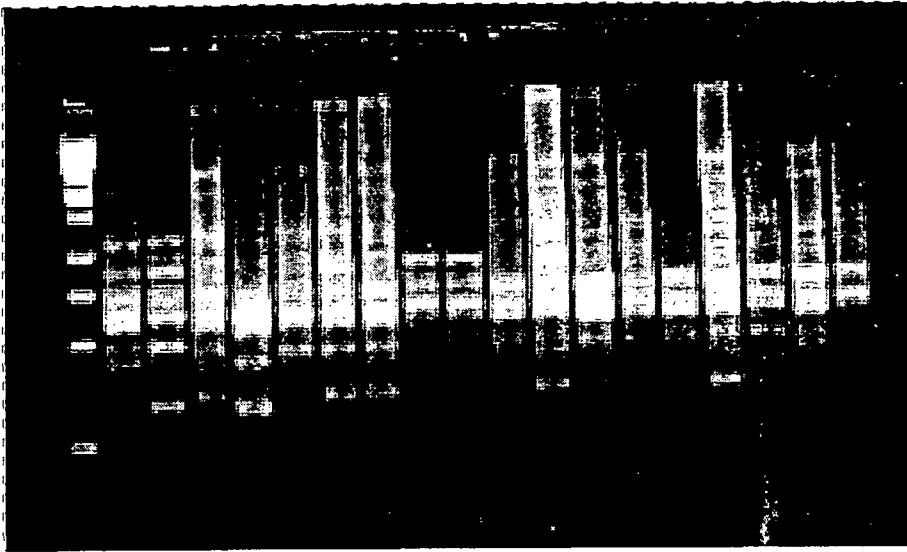


Figure 9. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DP4

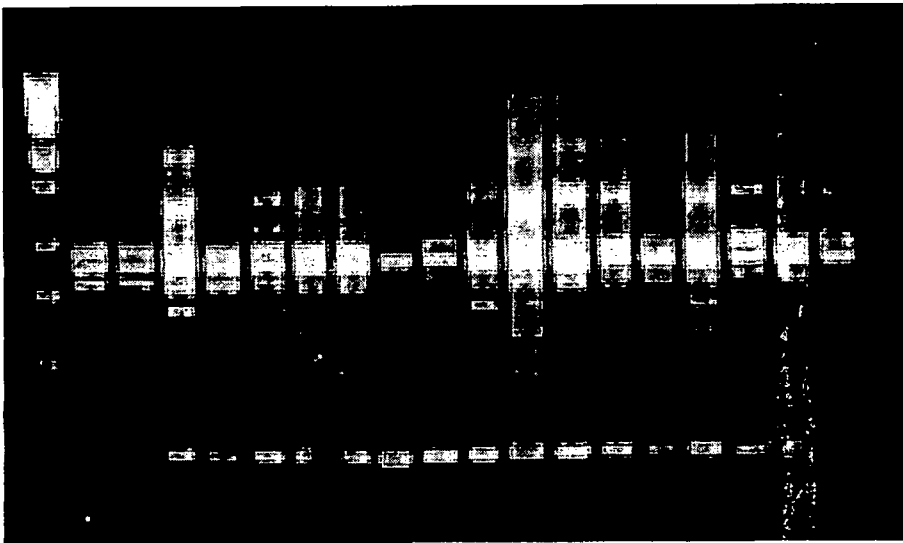


Figure 10. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DP6

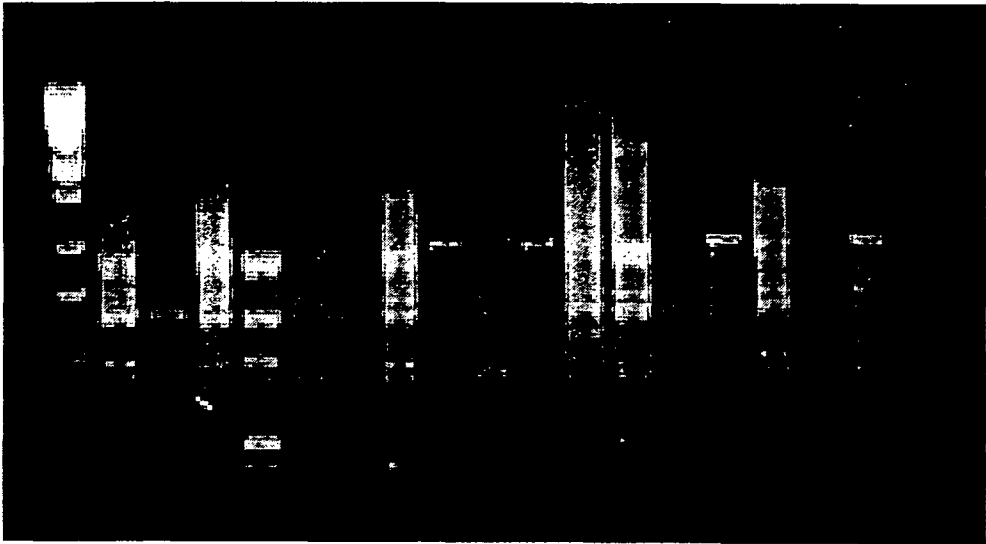


Figure 11. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DP7

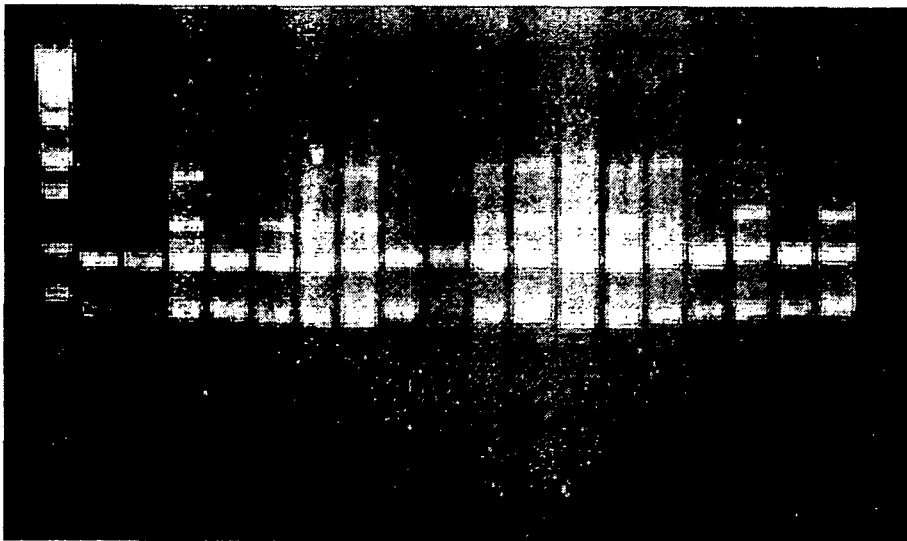


Figure 12. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DPR1

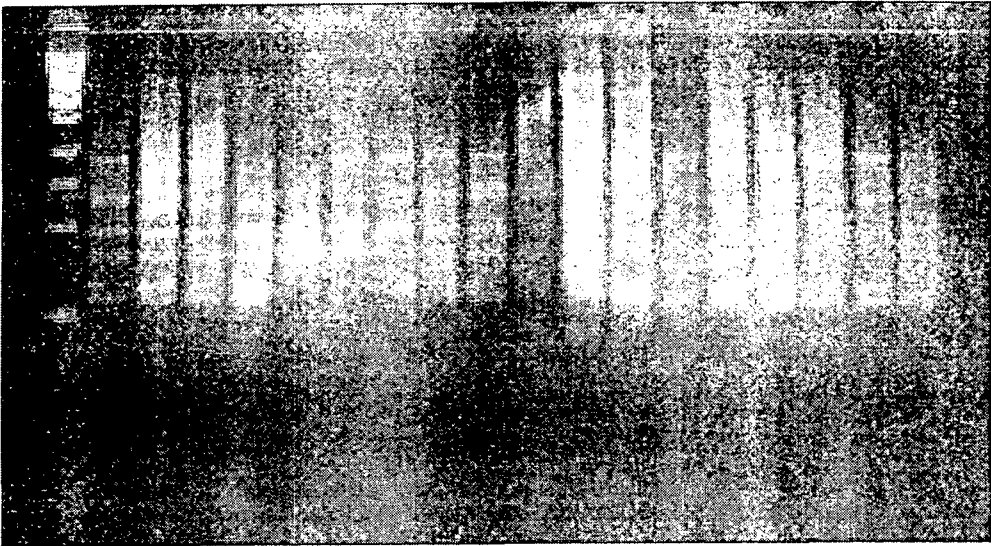


Figure 13. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DPR2

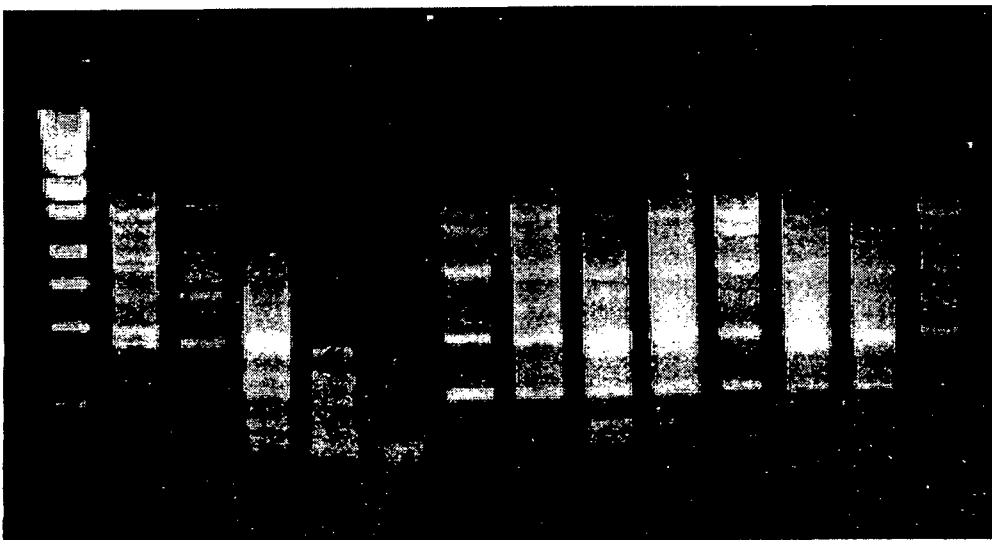


Figure 14. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DPR3

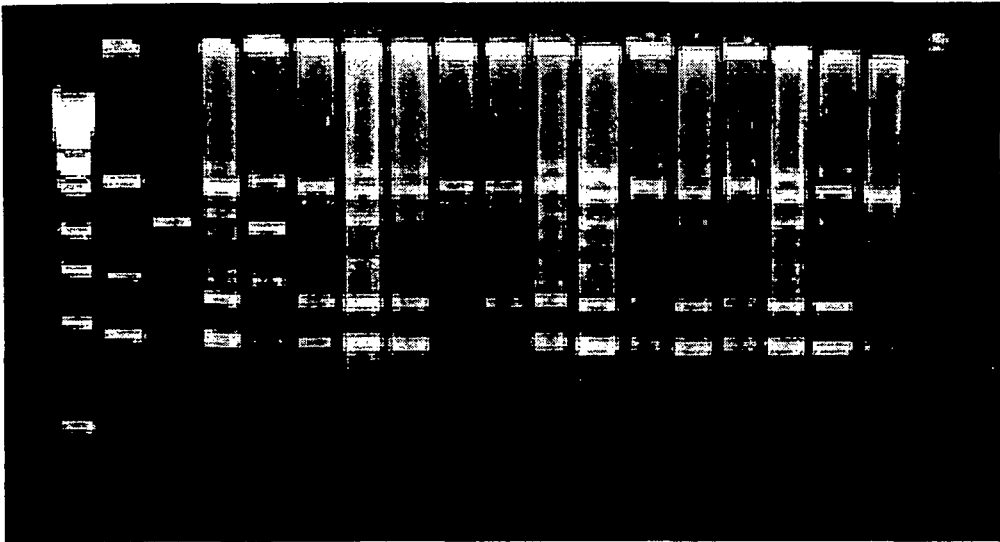


Figure 15. DNA amplification fingerprinting analysis of Jindo-dog.

Primer : DPR4

제2항 Annealing temperature에 따른 DNA 표지인자 pattern 분석

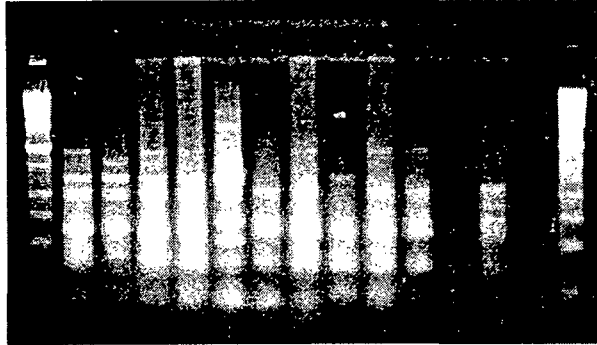
Figure 16에서 보는 바와 같이 DP1 primer를 사용한 RAPD-PCR 분석결과 1.2kb 위치에서 진돗개 우수집단에 특이적인 DNA 표지인자를 검출할 수 있었다.

한편, 이 marker는 잡종견 1-2개체에서도 동일한 부위의 band 형성 pattern을 보이고 있으나 band 형성이 일률적이지 않고 major band pattern이라고 하기보다는 약한 minor band pattern이므로 이는 잡종견에 진돗개의 유전형이 섞여 들어간 것으로 판단된다. 또한 잡종견의 이러한 band pattern은 annealing temperature를 42℃로 올려주면 그 양상이 약해지고 47℃에 가서는 보이지 않게 되는 것으로 보아 진돗개보다는 비특이적인 반응으로 이해된다.

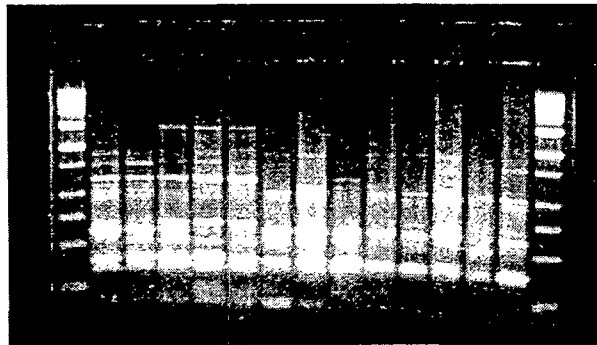
그러나 annealing temperature를 47℃까지 올리게 되면 진돗개의 특이 band도 점점 약해지는 양상을 보이기 때문에(lane1-향동이, lane2-안치) 전체 진돗개를 대상으로 하는 band pattern 분석에는 annealing temperature를 42℃로 유지하여 RAPD-PCR 반응을 수행하였다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

A



B



C

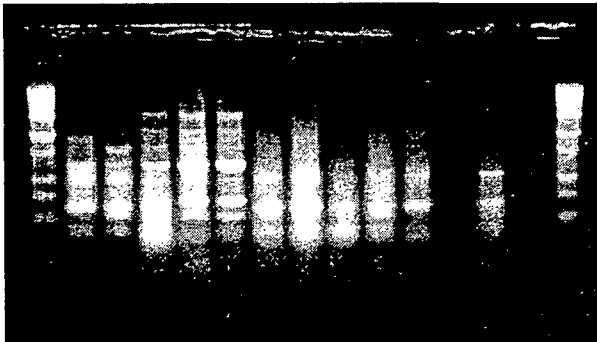


Figure 16. DNA specific marker pattern analysis by annealing temperature.

A : 37°C , B : 42°C , C : 47°C

1-5: 진돗개 , 6-10: 잡종견 , 11: Akida , 12: Kiju , 13: Siba

제3항 Specific marker 생성조건에 따른 다른 진돗개와 타품종 group 간의 band pattern 분석

Marker 생성조건에 따른 진돗개, Akida, Kiju, Siba 및 잡종견의 band pattern을 분석해 본 결과 각각의 band 위치라든가 발현빈도에서 큰 차이점을 보이지는 않았다. 하지만 본 실험에서 제시한 자료에 의하면 진돗개의 band pattern은 다른 group(Figure 18,19)에 비해 훨씬 다양한 band pattern을 보여주고(Figure 17) 있을 뿐만 아니라 1,500bp 이상에서의 band는 오직 진돗개 group 에서만 형성됨을 알 수 있다.

특히 2,000bp band는 다른 group에서는 발견할 수 없었지만 진돗개 group 에서는 23.0%의 표현율을 보여주고 있는 점이 주목된다. (Figure 17)

DP1 primer에 의한 RAPD-PCR분석에 의해 총 61개체의 진돗개 중 21개체만이 specific marker를 형성하였다. 이는 백분율로 환산하면 34.4%에 해당하는 수치이지만 단순히 specific marker형성 유무로서 진돗개 여부를 단정짓기는 어려웠지만 specific marker가 형성된 개체들을 따로 group화하여 이들의 유전적 특성을 분석하여 다른 group들과의 비교의 의미로 이해할 수 있었다.

본 실험에서 이용된 진돗개, Akida, Kiju ald Siba 견들의 개체수는 그리 많지 않기 때문에 제시한 수치상의 자료가 바로 진돗개의 표준형으로 이해하기는 힘든 점이 있다. 하지만 이러한 제반적인 문제점은 다량의 시료 확보에 의한 통계 분석으로 해결될 수 있으리라 전망된다.

Marker 생성조건에 따른 진돗개의 RAPD pattern 분석

Size	M	Band Patterns	빈도수	표현율(%)
3000	————	————	4	6.6
2000	————	————	14	23.0
1500	————	————	31	50.8
		————	21	34.4
1000	————	————	55	90.2
		————	19	31.1
		————	19	31.1
750	————	————	4	6.6
		————	33	54.1
500	————	————	46	75.4
		————	30	49.2
		————	36	59.0
		————	40	65.6
250	————	————	3	5.0
		————	25	41.0
		————	24	39.3

Figure 17. Marker 생성조건에 따른 진돗개의 RAPD-PCR pattern 분석.

-비교 대상 진돗개 개체수 : 61개체

Marker 생성조건에 따른 Akida와 잡종건의 RAPD pattern 분석

Size	M	Akida	발현빈도	Mixed	발현빈도
3000	————				
2000	————				
1500	————			————	4/5
1000	————	————	1/4	———— ————	4/5 4/5
750	————	———— ———— ————	1/4 2/4 3/4	———— ———— ————	3/5 5/5 5/5
500	————	———— ————	4/4 4/4	———— ————	5/5 3/5
250	————	———— ————	2/4 4/4	———— ————	4/5 4/5

Figure 18. Marker 생성조건에 따른 Akida와 잡종건의 RAPD-PCR pattern 분석.

-비교 대상 개체수 : Akida 4개체, 잡종건 5개체

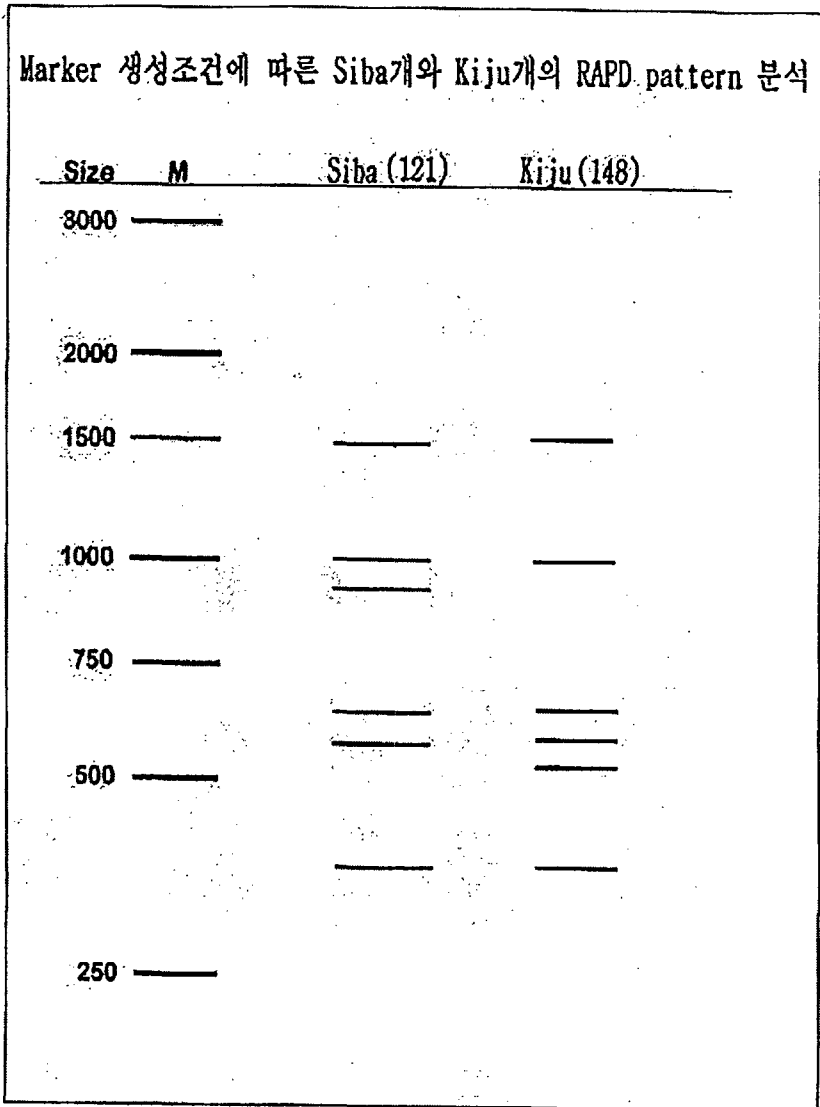


Figure 19. Marker 생성조건에 따른 Siba 개와 Kiju 개의 RAPD-PCR pattern 분석.

제4항 Specific marker band 가 생성된 개체들의 band pattern 분석

Specific marker band가 생성된 진돗개 개체들은 아래와 같다.

No.	성별	이름	모색	성질	농가 (사육주)
27	암	백자 2호	백색	수렵견	최만원
28	수	황구	황색	수렵견	"
31	수	염뿔	황색	사나움, 수렵견	"
33	수	소뿔	백황	순함, 수렵견	"
68	수	항동이	황색		명갑춘
69	암	안치	백색	사냥기질 있음	"
105	암	쌍거풀	백색	성질이 급함	서도원
107	암	백구	백색	주위상황에 민감	"
134	수	성군	황색	대범하고 사람과 친화	정해승
154	수	칠성	백색	아주 영리함	김복길
155	수	정호	황색		"
156	암	정란	백색		"
158					"
159					"
184	수	광팔이	황색		손창호
230	암	최진실	황색		정해승
236	암	돼지	백색	성질 무난, 식성 좋음	박덕철
243	암	백구	백색		손춘식
246	암	복실	황색		"
249	암	백구	백색	침착함, 수렵견	"
252	수	백구	백색	수렵견	"

이들의 band pattern 분석결과 전체 진돗개 집단에 비해 발현양상에 큰 차이 점은 없었으나 그 발현빈도에 있어서는 전체적으로 증가함을 보여주고 있었으며 이는 진돗개에서 band pattern이 다른 group이나 개체에 비하여 훨씬 다양함을 보여주고 있다(Figure 20). 또한, specific marker가 형성된 21개체 중에 수렵견이 차지하는 비중이 33%(7개체)인데 이는 이 marker에 의해 증폭되어지는 DNA band가 이와 같은 진돗개의 수렵성의 성상과 연관이 있을 것으로 추정되어진다.

Size	M	Band Patterns	빈도수	출현율(%)
3000	————	————	3	14.3
2000	————	————	8	38.1
1500	————	————	16	76.2
		————	21	100
1000	————	————	19	90.5
		————	12	57.1
750	————	————	11	52.4
		————	17	81.0
		————	9	42.9
500	————	————	17	81.0
		————	19	90.5
		————	17	81.0
		————	3	14.3
250	————	————	12	57.1
		————	17	81.0

Figure 20. Specific marker band가 생성된 개체들의 band pattern.

분석.

- 비교 대상 진돗개 개체수 : 21개체

제5항 진돗개 specific marker band의 서열분석

진돗개 대표그룹으로 선정된 향동이, 안치, 성균, 칠성, 정호의 specific marker band들을 gel elution하여 cloning 한 다음 sequencing 한 결과(Figure 21), 모두 동일한 서열의 절편으로 확인 할 수 있었다. 따라서 이 marker sequence를 J라 명명하고 이의 분석을 위해서 프로그램상에서 3개 frame 각각에 대하여 translation을 수행하였다. Translation에 사용된 염기서열에서는 primer부위는 제외로 하였고, 역상보 서열(J- i)에 대해서도 같은 방법으로 translation을 수행하였다. 각각의 frame 별로 translation을 수행한 결과 J- sequence 내에서는 ORF(Open Reading Frame)를 찾기 힘들었다.

따라서, 이 J sequence는 intron등을 포함한 유전자의 일부이거나, microsatellite repeat sequence등의 intergenic sequence로 생각하고 먼저 Etienneb등(1997)과 Vilma등(1997)이 각각 보고한 251개와 527개(총 778개) microsatellite repeat sequence로 search 해 보았으나 일치되는 repeat sequence를 찾을 수 없었다.

그러므로 translation 된 J와 J-i frame중 stop codon을 포함하지 않는 부위에 대하여 아미노산 homology search(BLAST Database Search)를 실시하였다. 이중 homolgy를 나타내는 frame은 J-frame1(6개)과 Ji-frame3(35개)이었으나 이들 중 J-frame1 homology search result중에서 *Chlamydia trachomatis*의 serine/threonine protein kinase만을 제외하고는 거의 대부분이 hypothetical protein이나 기능이나 이름이 밝혀지지 않은 단백질들이었다.

그러나 Figure 22과 Figure 23에서와 같이 이들의 homology 부분이

일정한 한 부위에서만 표현되고 있는 점으로 보아 어떤 단백질의 intron을 포함한 유전자의 일부일 것으로 생각하고 homology를 보이는 부위는 그 단백질의 conserved region으로 생각된다.

결론적으로 J sequence는 intron등을 포함한 어떤 유전자의 일부로 생각되지만 전체적으로 개의 염색체나 유전자에 대한 연구가 사람이나 유용가축의 수준정도까지는 진행되어 있지 않은 관계로 database search에서 만족스런 homology를 갖는 유전자를 찾지 못한 것으로 생각된다. 또한, 이러한 결과는 본 연구그룹에서 분리한 진돗개 marker인 J가 개를 망라하여 여태까지 보고된 어떤 유전자와도 유사성이 없는 새로운 진돗개만의 서열이라는 논리에 대한 반증이라고 생각된다.

따라서, 진돗개 marker인 J는 RAPD-PCR 결과에서도 알 수 있듯이 대표적인 진돗개 그룹에서 공통적으로 증폭되며 다른 여타 개 그룹과도 확연히 구별되는 specific marker임에 틀림없다. 또한 개에 대한 genome이나 기초적인 유전자지도 작성 등의 기본작업이 전세계적으로 이뤄지지 않은 환경에서 본 연구그룹에서 분리한 진돗개 marker인 J가 어떤 유전자의 일부인가를 밝히는 작업은 크게 의미를 가지지는 않는다고 생각되며 더욱이, 본 연구의 목적이 특정한 유전자의 분리가 아닌 진돗개 유전자의 specific marker분리인 만큼 다른 유사 유전자와 차이를 보이는 부위를 선정하는 작업이 더욱 중요하다고 사료된다.

그런 이유로 진돗개 marker인 J의 제한효소 인식 부위에 따른 제한효소 지도를 작성(Table 5)하고 이를 토대로 여러 가지 절편으로 자른 후 각각의 절편에 대한 fingerprinting이나 Southern blotting작업을 통하여 다른 개와 구별되는 진돗개만의 specific marker 선정함으로써 본 연구과제의 최종목표를 수행할 수 있다고 판단한다.

GATGCGACTC **AGGATG**CCCA TCAACATCCA CAAGCCAATT ACTGGCAAGG
 CGAATTTCCA TTGCATAATT CTGTTGAAGA CCATTTTGCA GATGTGGCAC
 CTGTGCGGCTG CTACCCCTGCC AATGCGTTCC AATTGTTCGA TATGATTGGT
 AATGTTTGGG AATGGACCTC TTCTGTATAT CAAGGTGCGC ATGATCAACA
 TATGGGAAAT TATACGGATC TGCCTCAGCA AAGCATCGCA GCAACCCAAT
 ATGTGATTAA AGGTGGTTCT TTCTTATGTG CTTCAAGTTA TTGCTCTCGT
 TATCGAAATA GTAGTCGTTA TCCGCAAGAG TTTGATTTGG CTGCAACCCA
 TGTGGGGTTT AGAACAGTAT TACGCACCCA TCAATAAGAC AAAGATAAGC
 TAAAATCTAA AGATATGGCG AATTTATACA CTTAAATATG AATTGCTTA
 CTTTAAAAA GAAAGTTGA AAAGAACAAA GCAACACTTA ACCACTTTTCG
 CTA AAAATCA GTGCTTATAC ACGTTTACGT TTTTCAATCA TCTTGCCAAA
 TACCAACCCC AATTCAAACA ACATCCACAT TGGAATTGCC AACATGATCA
 TCGAAATAGC ATCTGGTGGC GTGACAAAACA TTGCAATAAA AAAACAGCCC
 ACAATAATAA AGCGTCTTTT TTCCACCAGT GTTTGCCTGC TGACCAAACC
 GATTAAAATC AGTACCAGTG TAATAATTGG AATTTCAAAA GTGACCCCAA
 ACACCAAAAA GAGTTTTAAA CAGAACTTA AGTAACTGTT AATGTCCTGC
 ATTGGCGCAA CGGTATCAGG TGAAACACTG ATAAAAAAT GCAGAATCGA
 AGGCAAGGCA ATAAAATAGG CAAAGGCAAT TCCTGAATAA AACAAGCAA
 TACTGCTCAA TAACAATGGG AATGCCAGAT TCTTTTCTTT TTCATACAAC
 GCAGTTTTAA TAAATGCCCA AATCTGATAA ATAATGAAAG GCATCGCCAA
 CATCAGCGCA ATAAAGAAAT TCAGTTTAAA AGGTGCCATA AATGTTGCAG
 TTACATCTGT AGCAATCATG GTCGAACTGG CAGGTAATTG GGCACGTAAT
 GGTTCAGATA ACATTGAATA AGTTCTGTTT GCAAATGGCA GCAAACAGAA
 AAAAAGCACA ATCAATACCC CGATAATTTT AAACAAATS TGACGCAACA
 GCATCAAATG TCGGGTGATC GGCATTGCTT CAAG**CTGAGT CGCATC**

Figure 21. 진돗개 specific marker(1221bp)의 염기서열.

Primer부위는 **bold체**로 표시함

Table 6. 진돗개 specific marker(J)내의 제한효소 인식부위

제한효소	인식 부위	개수	위 치
Afl I	G!GWCC	1	152
Afl II	C!TTAAG	1	756
Afl III	A!CRYGT	1	507
Aha III	TTT!AAA	4	440, 753, 1013, 1166
Alu I	AG!CT	1	386
Aoc II	GDGCH!C	1	1078
Aos I	TGC!GCA	1	174
Asp7001	G!GTACC	1	1104
Asu I	G!GNCC	1	152
Ava II	G!GWCC	1	152
Ban I	G!GYRCC	2	84, 1020
Bcl I	T!GATCA	2	180, 583
Bin I	GATCNNNN!	1	204
Cfo I	GCG!C	3	175, 793, 994
Cfr 13 I	G!GNCC	1	152
Cvi J I	RG!CY	5	21, 94, 327, 386, 634
Dra I	TTT!AAA	4	440, 753, 1013, 1166
Eco47 I	G!GWCC	1	152
EcoR I	G!AATTC	1	428
Fnu4H I	GC!NGC	4	95, 226, 328, 1126
Fsp I	TGC!GCA	1	174
Hha I	GCG!C	3	175, 793, 994

Continued....

HinPI I	G!CGC	3	175, 793, 994
Hinf I	G!ANTC	2	832, 916
MaeII	A!CGT	3	509, 515, 1082
MaeIII	!GTNAC	5	609, 729, 770, 1038, 1177
Mbo I	!GATC	4	181, 205, 584, 1204
Mfe I	!CAATTG	1	118
Mfl I	R!GATCY	1	204
Mse I	T!TAA	11	245, 420, 441, 476, 691, 754, 766, 777, 945, 1014, 1167
Mst I	TGC!GCA	1	174
Nde I	CA!TATG	1	187
NdeII	!GATC	4	181, 205, 584, 1204
NlaIII	CATG!	4	178, 337, 581, 1055
NlaIV	GGN!NCC	2	84, 1020
NspII	GDGCH!C	1	1078
NunII	G!GNCC	1	152
Rsa I	GT!AC	1	700
Rsr I	GT!AC	1	428
Sau3A I	!GATC	4	181, 205, 584, 1204
Sau96 I	G!GNCC	1	152
Sdu I	GDGCH!C	1	1078
Sin I	G!GWCC	1	152

continued...

SstIII	!ACGT	3	509, 515, 1082
Taq I	T!CGA	5	125, 291, 589, 835, 1060
Tsp45 I	!GTSAC	3	609, 729, 1177
TspE I	!AATT	15	25, 41, 55, 119, 196, 409, 429, 549, 572, 713, 866, 1006, 1074, 1163
TthHB8 I	T!CGA	5	125, 291, 589, 835, 1060
Xho II	R!GATCY	1	204
Xmn I	GAANN!NNT TC	1	1104

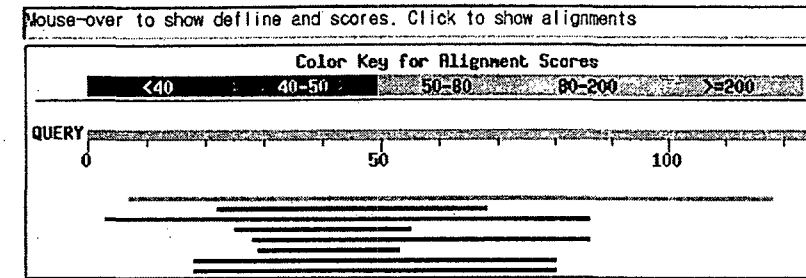


Figure 22. Homology search result by J-frame1.

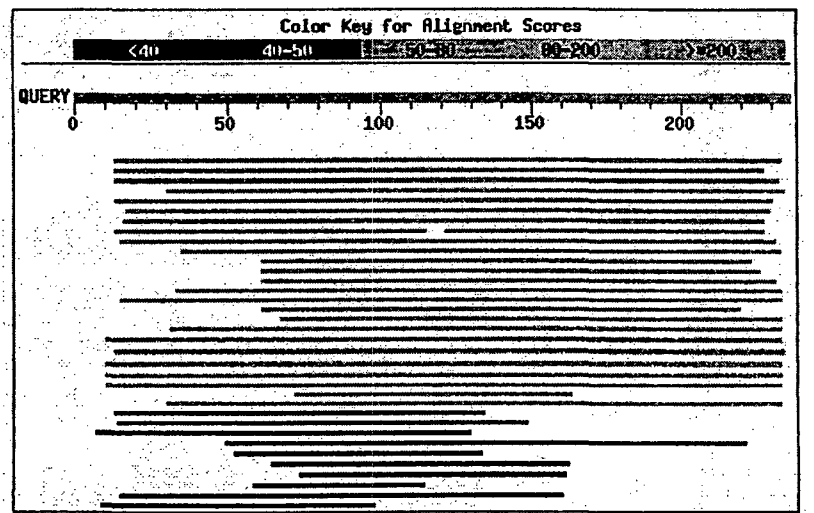


Figure 23. Homology search result by Ji-frame3.

참고문헌

- Ezer, A. D., R. W. Williams, and D. Goldwitz, 1996. Arbitrary primer PCR of Dog DNA with Estimates of Average Heterozygosity, *J. of Heredity* 87, 450-455.
- Hsu. T. C. and K. Benirschke, 1967. An atlas of mammalian chromosomes. Springer. 1: Folio 20 and 21.
- Hsu. T. C. and A. Markvong, 1975. chromosomes and DNA of MUS: terminal DNA synthetic sequences in three species. *Chromosoma*. 51:311-322.
- Jefferys, A. J. and D. B. Morton. 1987. DNA fingerprints of dogs and cats. *Animal Genetics* 18, 1-15.
- Jeffreys. A. J, J. Hillel, N. Hartley, G. Bulfield, D. Morton, V. Wilson, Z. Wong and S. Harris, 1987. The implication of hypervariable DNA-regions for animal identification. *Animal Genetics* 18, suppliment. 141-142.
- Kim, J. B. and H. S. Ok, 1986. G-banded karyotype of Korean Jindo dog(*canis familiaris*). *Korean J. Genetics*. 8(4):183-188

Manolache, M., W. H. Ross and M. Schmid, 1976. Banding analysis of the somatic chromosomes of the domestic dog (*Canis familiaris*). *Can. J. Genet. Cytol.* 18 : 513-518.

Mayer, B., D. Schwizerb and W. Schleger, 1983. Characterization of the canine karyotype by counterstain-enhanced chromosome banding. *Can. J. Genet. Cytol.* 25 : 616-621.

Moore, W. and P.D. Lambert, 1963. The chromosomes of the beagle dog. *J. Hered.* 54 : 273-276.

Morton, D. B. , R. E. Yaxley, I. Patel. , A. J. Jeffreys, S. J. Howes, P. G. Debenham, 1987. Use of DNA fingerprint analysis in identification of the sire. *Veterinary Record* 121, 529-593.

Old, R. W. and S. B. Primrose. 1994. Principles of Gene Manipulation (5th ed.) pp. 378-383. Blackwell Science. London.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual 2nd ed. CSH

Seabright, M., 1971. A rapid banding technique for human chromosome. *Lancet.* 2 : 971-972.

Sumner, A. T., 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exptl. Cell Res.* 75 : 304-306.

Yu K. and K. P. Pauls, 1994. The use of RAPD analysis to tag genes and determine relatedness in heterogeneous plant populations using tetraploid alfalfa as an example. In PCR technology : current Innovations. Griffin H. G. and Griffin. A. M. ed. CRC press, 201.

Zimmerman, E. G. , D. R. Akins, J. V. Planz and M. J. Schurr. Mitochondrial DNA. *Gene. Anal. Techn.* 5, 102-104.

김경석, 1998. 개(*Canis familiaris*) 미토콘드리아 유전체 분석 및 Microsatellite Loci 비교를 통한 품종간 유연관계조사 경북대학교 박사 학위 논문 pp. 77-84.

朴種萬, 1971. 韓國 珍島犬에 關한 研究(第1報). 韓國畜産學會誌. 13(2):92-106.

朴種萬, 1972. 韓國 珍島犬에 關한 研究(第2報). 韓國畜産學會誌. 14(3):189-203.

이상로, 1992. DNA 지문법을 이용한 삼사리의 가계 분석. 경북대학교 석사학위논문 pp.1-60.

이상욱, 홍성용, 하지홍, 1995. 미토콘드리아 DNA의 RFLP분석에 의한
삼사리 혈연연구. *한국유전학회지* 17(1), 19-24.

하지홍, 김경석, 1998. 한국토종개의 기원에 관한 고찰. *한국축산학회지*
40(6). 701-710.

하지홍, 이성은, 탁연빈, 김종봉, 1998. 한국토종개집단의 형태 특징과
혈액단백질. *한국축산학회지* 40(6). 711-720.

한방근, 김주현, 강주원, L.Ikemoto, 1993. DNA다형에 있어서 진도견과
잡종견과의 비교. *대한수의학회지* 33(1) 43-51.