

경주지방의 무미 또는 단미 형태의 개(경주개 동경이)의 혈청 단백질의 분획에 대한 실태조사

박창은* · 이은우¹ · 성기창² · 최석규²

남서울대학교 임상병리학과, ¹경북대학교 수의학과, ²서라벌대학 애완동물보건관리과

(접수 2010. 9. 13, 게재승인 2010. 9. 16)

Investigation of serum protein electrophoresis fractions analysis in Gyeongju DongGyeong dogs

Chang-Eun Park*, Eun-Woo Lee¹, Ki-Chang Sung², Seog-Gyu Choi²

Department of Biomedical Laboratory Science, Namseoul University, Cheonan 331-707, Korea

¹Department of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Department of companion animal public health, Sorabol College, Gyeongju 780-711, Korea

(Received 13 September 2010, accepted in revised from 16 September 2010)

Abstract

Serum proteins of Korean native dogs (Gyeongju DongGyeong dogs) was analyzed by capillary electrophoresis system. Electrophoretic patterns showed six fractions. Total serum protein and ratio of albumin to globulin were 5.99 ± 0.83 (g/dl) and 1.41 ± 0.29 (g/dl) in DongGyeong dogs. Relative percentages of total serum albumin and α -1, α -2, β -1, β -2, γ -globulin fraction were 57.94 ± 5.43 , 3.15 ± 2.30 , 7.49 ± 4.09 , 9.43 ± 3.50 , 7.63 ± 5.70 , and 14.36 ± 7.63 , respectively. It was observed that β -globulin was higher than other fractions. The most striking alternation with age was founded in the γ -fractions. Also, it was observed that ratios of albumin to globulin in DongGyeong dogs were higher than on other dogs.

Key words : Serum protein, Capillary electrophoresis, Dogs

서 론

현재까지 보고된 우리나라 토종개 중 문헌 기록으로 남아 있는 가장 오래된 개가 동경이이다(Choi 등, 2008). 동경이는 고려시대의 경주지명이 동경이였고 이 지역에 많이 사육되었던 꼬리 짧은 특이한 개를 지명과 연관 지어 불렀던 이름이다. 우리나라 최고의 역사성과 민족적 특징을 지니고 있어 보존적 가치가 있음에도 불구하고 사육관리의 부실로 멸종위기에 처해 있고, 또한 혈통이 고정되지 않아 잡종이 양산되고 있

는 실정이다.

우리나라에 가장 오래된 기록을 가지고 있는 동경이에 대해 혈통을 고정하고 개체 수를 확보한다면 천연기념물로 지정이 가능하다는 보고가 있었다(Natural heritage preservation association, 2006). 따라서 동경이의 혈통 고정, 개체 수 확보, 사육환경 등을 조사하여 천연기념물 지정에 필요한 자료를 확보하고자 한다. 한편 최근 들어 노인인구 증가, 이혼 가정 증가 등으로 애견이 생활 깊숙이 들어와 있으며, 애견 인구는 계속적으로 증가하고 있다. 이에 우리나라 토종개의 저변 확대와 관심이 요구된다.

또한 21세기에 들어 생물 종 다양성에 대한 국제적

*Corresponding author: Chang-Eun Park, Tel. +82-41-580-2722,
Fax. +82-41-580-2932, E-mail. pce@nsu.ac.kr

인 관심이 집중되고, 자국의 고유 생물자원의 보존에 대한 연구가 집중되고 있는 추세에 있다. 특히 세계 각국에서 자국의 민족적 특징을 가지고 있는 토종개의 종 보존을 위한 연구가 경쟁적으로 이루어지고 있다.

현재 경주지방을 중심으로 사육되고 있는 무미 또는 단미 형태의 경주개 동경이는 약 200여두로서 경주시의 경제적 지원에 의해 일부 농가에서 사육되고 있으나 경주개의 체계적인 조사나 연구가 거의 없는 실정이다. 이와 같은 배경 하에서 경주개 동경이의 유전자원을 보존하기 위한 기초자료를 확보하고자 경주개 동경이의 혈청 단백질의 분포를 조사하였다.

혈청 단백질은 영양상태, 장기의 손상, 질병감염 등 체내의 여러 가지 조건에 따른 생리적인 상태를 잘 반영하는 것으로 잘 알려져 있다. 이에 따라 특히, 사람에게 있어서는 정상, 혹은 여러 가지 병리적인 상태의 혈청 단백질에 관한 많은 연구가 이루어져 이 자료를 질병의 감염이나 치료의 예후 판정을 위한 진단기준으로 널리 활용되고 있다.

또한 사람의 경우에서와 같은 목적으로 주요 사양관리의 대상이 되는 여러 가지 가축들의 혈액단백질에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있다(Swenson, 1984). 진도개의 경우는 오래전에 박(1980)과 임 등(1980)에 의하여 혈액 화학치에 관한 분석이 이루어졌을 뿐만 아니라 삼사리에 관해서는 김 등(1992)에 의해 보고되었다.

이러한 점들과 관련하여 우리나라 고유 품종인 경주개 동경이의 혈청단백질의 특성을 밝히고 이를 이들의 사양관리를 위한 자료로 활용하기 위하여 이들의 혈청단백질을 전기영동에 의하여 분획을 비교 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

대상동물

경북 경주지역을 중심으로 무미 또는 단미 형태의 개(일명, 경주개 동경이)를 대상으로 유전학적으로 혈통이 보존된 4대까지 개체를 대상으로 조사하였다. 연구에 수행된 개체들은 사전에 기생충 및 바이러스 질환에 대한 사전 검사를 통하여 질병에 노출되지 않은 동물을 공시하여 분석에 사용하였다.

본 연구에서는 경주개 동경이 40마리(수컷 22마리, 암컷 18마리)로부터 혈액을 채취하여 실험재료로 하였다.

개의 앞다리 정맥에서 5ml의 혈액을 채취하여 5,000rpm으로 5분간 원심 후 혈구와 혈청을 분리하였다.

단백질 분획 분석

단백질 분획을 위해 혈청 단백질의 capillary zone electrophoresis는 CAPILLAYS 2 (5.07 software version; Sebia Inc, GA, USA)를 이용하였다. 전반적인 과정은 이전의 Gay-Bellile 등(2003)의 방법에 따랐다. 이 capillays는 혈청단백 분석을 위한 multicapillary 장비이다. 이는 검체의 bar-code 인식부터 사전분리 단계(pre-separation steps-검체분류(sampling), 희석(dilution), 주입(injection))를 거친 후 직접 사후분리 정량단계(direct postseparation quantification)까지 모든 과정이 분석된다.

전기영동은 Sebia사에서 제공된 alkaline buffer(pH 9.4)를 이용해 수행하였다. 1차적인 분리는 내침투(endosmosis)와 용액의 pH에 의해 이루어진다. 혈청을 접종 후 high voltage에서 전기영동 한 다음 amido black 용액에 의해 5분간 염색하였고 이후 정량을 하였다. 총 단백질 농도는 clinical refractometer를 사용하여 측정하였으며 각 분획별 농도계측은 570nm 조건에서 densitometer로 scanning하여 측정값과 농도에 대한 백분율 값을 산출하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 모든 실험결과는 평균치와 표준편차로 나타냈으며, 유의성 검증을 위해 측정치는 Shapiro-Wilcoxon 검정법을 통해 정규성 검정을 실시하였다. 본 실험의 전체 측정치 상호간 비교는 *t*-test를, 전체 측정치와 참고구간과의 비교는 *Z*-test를 이용하였으며, 성별간, 연령간 비교는 정규분포 유무에 따라 *Z*-test와 sign-test (부호검정)를 병용하여 검정하였다. 통계처리는 SAS 9.1 Windows Program (SAS Inc, USA)을 이용하였다.

결 과

혈청 단백질의 분획 양(g/dl)

경주개 동경이의 혈청을 capillary zone electrophoresis를 이용하여 전기영동 한 결과는 Fig. 1에서와 같이 6개의 분획을 얻을 수 있었는데 이동도가 제일 빠른 albumin으로부터 α 1-fraction, α 2-fraction, β 1-

fraction, β 2-fraction과 이동도가 제일 느린 것은 γ -fraction으로 나누었다. 각 분획별 단백질의 구성 상태를 보면 경주개 동경이에서 β -fraction과 γ -fraction에서 개체에 따라 단백질의 종류 및 양의 차이가 많았다.

한편 경주개 동경이의 총 혈청 단백질 양은 5.99 ± 0.83 (g/dl)이고 albumin/globulin (A/G)는 1.41 ± 0.29 로 나타났다. 성별, 연령 및 꼬리의 형태 등의 요인에 따른 혈청단백질의 양에서 유의성 있는 차이는 없었으나 1년 미만의 개들에게서 단백질의 양이 낮게 분포하였고 3년생 개들에게서 가장 높은 단백질의 분포를 보였다 ($P < 0.05$)(Table 1). 특히 globulin 중, γ -globulin의 경우는 암컷에 비해 수컷이, 3년생의 개들에게서 높은 경향을 보였다($P < 0.05$).

혈청 단백질의 분획 분포(%)

총 혈청단백질에 대한 상대적인 분획별 분포에서는

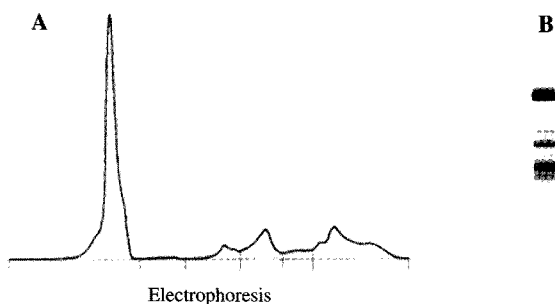


Fig. 1. The representative of capillary zone electrophoretic phenotypes of serum protein in Gyeongju DongGyeong-dogs. (A) Densitometric pattern of serum protein in Gyeongju DongGyeong-dogs. The diagram showed notable variation of protein in β - and γ -fractions. (B) The protein band pattern was stained amidoblack.

albumin의 백분위(%)는 57.94 ± 5.43 이고, α 1-fraction은 3.15 ± 2.30 , α 2-fraction은 7.49 ± 4.09 , β 1-fraction은 9.43 ± 3.50 , β 2-fraction은 7.63 ± 5.70 , γ -globulin은 14.36 ± 7.63 을 보였다(Table 2). 이들의 분획 중 γ , β 1, β 2-globulin 순으로 분획의 분포가 높게 나타났다. 그리고 3년생 개에 있어서는 β 2와 γ -globulin의 분포가 현저히 높은 것을 보였다($P < 0.05$). 또한 γ -globulin의 분포에 있어서 통계적인 유의성은 없지만 꼬리가 짧은, 단미 형태의 개(short tail)에서 꼬리가 없는, 무미 형태의 개(tailless)보다 높게 나타났다.

고 찰

단백질의 전기영동 방법은 cellulose acetate plate, agarose gel, capillary zone 등 다양하나 최근에는 이중 capillary zone electrophoresis법이 분획 분리의 효율성이 높고 해상도와 재현성에 있어서 모든 종의 단백질에 대해 높으며 불규칙하거나 좁은 peak의 출현이 낮은 것으로 보고하고 있다(Crivellente 등, 2008). 따라서 질병의 진단에도 활용도가 높은 것으로 사료된다.

전기영동에 의하여 포유동물들의 혈청단백질은 이동거리에 따라 5~7개의 분획으로 나눌 수 있으며 구성단백질에는 albumin과 여러 종류의 globulin 및 운반 단백질의 많은 양을 차지하는 것으로 밝혀졌다(Swenson, 1984). 개의 경우 α 2-fraction에는 lipoprotein, haptoglobin 등이, β -fraction에는 일부의 globulin, lipoprotein, glycoprotein들 및 transferrin 등이 그리고 γ -fraction에는 면역글로불린들이 대부분을 차지하는 것으로 보고되었다(Okoshi 등, 1967). 최근에는 고해상도 기법

Table 1. The concentrations (g/dl) of serum protein in Gyeongju DongGyeong-dogs

Group	No. of dogs	Protein (g/dl)						Total protein	A/G
		Albumin	α 1-fraction	α 2-fraction	β 1-fraction	β 2-fraction	γ -fraction		
Sex									
Male	22	3.41 ± 0.47	0.14 ± 0.07	0.46 ± 0.25	0.56 ± 0.22	0.39 ± 0.33	$1.07 \pm 0.52^*$	6.10 ± 0.89	1.37 ± 0.27
Female	18	3.42 ± 0.48	0.13 ± 0.09	0.41 ± 0.24	0.54 ± 0.21	0.43 ± 0.46	0.88 ± 0.44	5.86 ± 0.76	1.47 ± 0.32
Age (years)									
< 1	8	3.31 ± 0.49	0.12 ± 0.05	0.41 ± 0.21	0.52 ± 0.28	0.35 ± 0.32	1.11 ± 0.79	5.79 ± 0.76	1.43 ± 0.44
1-2	18	3.37 ± 0.58	0.13 ± 0.07	0.42 ± 0.25	0.60 ± 0.21	0.31 ± 0.17	0.92 ± 0.39	5.84 ± 0.94	1.46 ± 0.25
2-3	7	3.52 ± 0.19	0.16 ± 0.11	0.42 ± 0.25	0.61 ± 0.16	0.69 ± 0.77	$1.12 \pm 0.48^*$	6.57 ± 0.51	1.22 ± 0.25
≥ 4	7	3.52 ± 0.36	0.17 ± 0.08	0.54 ± 0.29	0.43 ± 0.17	0.45 ± 0.23	0.87 ± 0.32	6.01 ± 0.74	1.46 ± 0.17
Appearance of tail									
Short-tail	19	3.46 ± 0.58	0.11 ± 0.04	0.36 ± 0.18	0.60 ± 0.21	0.29 ± 0.22	1.07 ± 0.52	5.89 ± 0.85	1.49 ± 0.34
Tailless	21	3.37 ± 0.35	0.17 ± 0.09	0.51 ± 0.27	0.52 ± 0.21	0.51 ± 0.48	0.90 ± 0.46	6.08 ± 0.83	1.34 ± 0.22
Total	40	3.41 ± 0.47	0.14 ± 0.08	0.44 ± 0.24	0.55 ± 0.21	0.41 ± 0.39	0.98 ± 0.49	5.99 ± 0.83	1.41 ± 0.29

Each value is mean \pm standard deviation A/G indicates albumin: globulin. * $P < 0.05$

Table 2. The individual fraction concentration (%) of serum protein in Gyeongju DongGyeong-dogs

Group	No. of dogs	Distributed of protein fraction (%)					
		Albumin	α 1-fraction	α 2-fraction	β 1-fraction	β 2-fraction	γ -fraction
Sex							
Male	22	57.19 \pm 5.79	3.53 \pm 2.41	7.72 \pm 4.14	9.69 \pm 3.24	7.11 \pm 4.63	14.77 \pm 8.35
Female	18	58.86 \pm 4.96	2.68 \pm 2.15	7.21 \pm 4.14	9.12 \pm 3.86	8.27 \pm 6.88	13.87 \pm 6.84
Age (years)							
<1	8	57.59 \pm 8.40	3.45 \pm 2.71	6.64 \pm 4.03	9.60 \pm 3.77	6.00 \pm 4.95	16.73 \pm 11.85
1-2	18	58.99 \pm 4.09	3.04 \pm 2.29	7.80 \pm 4.14	10.17 \pm 3.74	6.61 \pm 3.64	13.39 \pm 5.92
2-3	7	54.40 \pm 5.67	2.79 \pm 2.54	5.80 \pm 2.85	9.23 \pm 2.89	11.09 \pm 10.52*	16.70 \pm 8.39*
\geq 4	7	59.16 \pm 3.10	3.46 \pm 2.05	9.34 \pm 4.96	7.54 \pm 2.99	8.69 \pm 3.55	11.81 \pm 4.51
Appearance of tail							
Short-tail	19	59.04 \pm 6.23	2.75 \pm 2.30	6.13 \pm 3.17	10.52 \pm 2.97	5.34 \pm 3.55	16.22 \pm 8.37
Tailless	21	56.94 \pm 4.51	3.51 \pm 2.30	8.71 \pm 4.51	8.45 \pm 3.71	9.70 \pm 6.52	12.69 \pm 6.65
Total	40	57.94 \pm 5.43	3.15 \pm 2.30	7.49 \pm 4.09	9.43 \pm 3.50	7.63 \pm 5.70	14.36 \pm 7.63

Each value is mean \pm standard deviation. A/G indicates albumin : globulin * P < 0.05

을 통해 분획별로 albumin, α 1에는 lipoprotein, α 2에는 haptoglobin과 α 2-macroglobulin, β 1에는 β -lipoprotein 과 C3, β 2에는 transferrin과 IgM, IgG 는 대부분이 γ -region이나 부분적으로 β 2-region에 존재하는 것으로 보고하고 있다(Abate 등, 2000).

혈청단백질 중에 transferrin, haptoglobin 및 효소 단백질 등에서 다형현상이 보고되었다(Tanabe, 1990; Harrington 등, 1991). 특히 포유동물에서 haptoglobin (Hp)은 혈장에서 hemoglobin-binding protein으로 α 와 β subunits으로 구성되어 있으며 4개의 chain (β - α - α - β)이 이황화결합(disulfide bridge)으로 배열하고 있다. 그러나 개의 Hp는 이황화결합보다 비공유 결합(non-covalent interaction)에 의해 연결되어 있으며 α 사슬은 올리고당류와 결합한 서열(Asn-X-Ser/Thr)로 당화 결합을 하고 있다. Mominoki 등(1995)은 곰, 고양이, 개는 α 사슬끼리의 이황화 결합의 부재로 인해 Hp가 유사한 것으로 보아서 α 사슬 중간의 아미노산 서열을 알아본 결과, Cys15를 대신해 곰은 Val이 고양이와 개는 Leu이 결합하고 있다고 보고하였다. Juneja 등(1987)은 규명되지 않는 5종류 단백질 (pretransferrin-1, -2 (Prt1, Prt2)와 postalbumin-1, -2, -3(Pa1, Pa2 및 Pa3)의 유전적인 다형성을 보고하였다 이중 Prt1, Pa1, Pa2 단백질은 혈통 조절을 위한 마커로 사용된다고 보고하였다.

이번 연구에서 경주개 동경이 혈청의 전기 영동상을 보면 개체 간에 구성 단백질의 변이가 가장 두드러지게 나타난 것은 α 2-fraction와 β 1-fraction, β 2-fraction에서였다. 그러나 이것의 원인이 특정 단백질의 다형현상 때문인지 혹은 단백질 종류의 차이에 의한 것인지는 분명하지 않다. 한편 이러한 혈액 단백질들의 대

부분은 간, 세망내피계, 골수 등에서 만들어지며 물질의 운반, 세균이나 이물질에 대한 방어, 단백질의 균형, 혈액의 삼투압조절 등의 기능을 수행하기 때문에 장기가 손상되거나 질병의 감염 등 여러 가지 체내의 병태, 생리적인 조건에 따라 이들의 구성이 달라진다.

또한 일반적으로 개의 혈청단백질의 양은 6.0~7.0 (g/dl)이고 A/G는 1.0~1.5정도이다. 이에 비하여 김 등(1992)의 보고에서는 진도개는 혈청 총 단백질이 8.40 \pm 1.63(g/dl), A/G는 0.81 \pm 0.25이며 삼사리의 경우는 혈청 단백질은 8.23 \pm 2.20 (g/dl)이며 A/G는 0.73 \pm 0.22로 보고하였다. 이에 반해 경주개 동경이는 총 단백질이 현저히 낮게 나타났으며 이에 반해 A/G는 현저히 높았다. 그리고 특히 globin 중에서 β 1-, β 2-globulin과 γ -globulin의 양이 높게 나타났다.

한편 진돗개나 삼사리의 경우보다 γ -globulin의 증가는 단정 지어 말할 수는 없지만 예방접종과 질병의 노출 등에 관련하여 사양관리가 중요함을 시사하고 있다. 그리고 단백질분획에 대한 백분위 표시에 있어서 β -globulin의 분획이 높은 것은 단백질의 다형 현상과 일치하여 높은 결과를 보이는 것으로 사료된다.

혈청 단백질의 현저한 차이는 경주개 동경이가 모두 외형상 건강한 개들이고 예방접종 및 기생충, 바이러스성 질환에 대해 노출되지 않았음에도 불구하고 낮게 나타난 것은 중간에 단순 비교하기는 어려우나 채혈 시의 스트레스, 절식 기간, 보정 방법, 기후 및 급여 사료의 형태나 성분 등, 사육환경이나 사양관리 방법 등에 따른 차이, 방목해서 기른 것과 우리에서 기른 것 등의 사육조건에 따라 차이가 있는 것으로 보이고 또한 먹이의 종류, 사육 방식, 거주지의 외부환경조건, 사

육자의 마인드 등의 영향인 것으로 추정된다.

권 등(2010)의 보고에 따르면 가장 객관적인 자료로 제시할 수 있는 혈액검사 데이터는 각 혈액검사 장비마다 측정하는 능력이 달라지므로 각 사육 장소에서는 보유동물에 대한 정상시의 기준 참고치를 데이터화하여 이를 진단에 활용 또는 사양관리에 활용하고 사육하는 기관에서는 각 동물의 정상 상태에서의 혈액검사 결과를 데이터화하여 고유의 표준치를 지속적으로 관리하는 것이 기본적인 혈액검사에 대해 보다 정확한 해석에 도움을 준다고 한다.

따라서 이번 연구에서 고유의 생물 종을 보존하기 위해 혈액상에 대한 기초자료를 잘 축적하여 지속적으로 관리하는 체계를 구축해야 할 것으로 사료된다.

결 론

Capillary zone electrophoresis system을 통해 경주개 동경이의 혈청단백질을 분석하였다. 이들의 혈청 단백질의 전기영동상은 6개의 분획으로 나눌 수 있었다. 경주개 동경이의 총 혈청 단백질은 5.99 ± 0.83 (g/dl)이었으며 albumin과 globulin의 비(A/G)는 1.41 ± 0.29 (g/dl)로 나타났다. 한편 각 분획별 상대적인 백분위 분포를 보면 albumin은 57.94 ± 5.43 (%), α_1 은 3.15 ± 2.30 (%), α_2 는 7.49 ± 4.09 (%), β_1 은 9.43 ± 3.50 (%), β_2 는 7.63 ± 5.70 (%), γ 는 14.36 ± 7.63 (%)를 보였다. 경주개 동경이는 다른 토종견들에 비해 β 와 γ -globulin의 양이 높았다.

참 고 문 헌

권수완, 오석현, 신남식, 송희중, 광동미, 권오덕. 2010. 국내동물원에서 사육 중인 일본원숭이의 혈액상. *한국가축위생학회지* 33(1): 89-96.

김종봉, 옥현숙, 윤인숙, 탁연빈, 하지홍, 박희천. 1992. 한국 진도개와 삼사리 혈액 단백질의 비교연구 I. 혈청 단백질의 구성. *한국동물학회지* 35(1): 96-101.

박남용. 1980. 한국진도견의 혈액상 및 혈액화학치에 관한 연구.

제1보 진도견의 혈액상. *대한수의사회지* 16(2): 92-106.

임봉호, 박남용, 이방환. 1980. 진도견의 혈액상 및 혈액화학치에 관한 연구. 2. 진도견의 혈액화학치. *대한수의사회지* 16(2): 143-149.

Abate O, Zanatta R, Malisano T, Dotta U. 2000. Canine serum protein patterns using high-resolution electrophoresis (HRE). *Vet J* 159(2): 154-160.

Choi SG, Sung GC, Lee EW, Park CE, Park ST, Cho GJ, Song HB. 2008. Historical origin on Korean native Dong-Gyeong-i dogs. *Korean J. of Companion Anim Sci* 5(1): 67-77.

Crivellente F, Bonato M, Cristofori P. 2008. Analysis of mouse, rat, dog, marmoset, and human serum proteins by capillary electrophoresis: comparison with agarose gel electrophoresis. *Vet Clin Pathol* 37(1): 73-78.

Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, Le Carrer D, Benlakehal M, Bousquet B, Gourmel B, Le Bricon T. 2003. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. *Clin Chem* 49(11): 1909-1915.

Harrington J, Heaney H, McSweeney C, Quarino L, Schwartz T, Versoza J. 1991. Haptoglobin typing in canine bloods. *J Forensic Sci* 36(5): 1561-1564.

Juneja RK, Arnold IC, Gahne B, Bouw J. 1987. Parentage testing of dogs using variants of blood proteins: description of five new plasma protein polymorphisms. *Anim Genet* 18(4): 297-310.

Mominoki K, Nakagawa-Tosa N, Morimatsu M, Syuto B, Saito M. 1995. Haptoglobin in Carnivora: a unique molecular structure in bear, cat and dog haptoglobins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 110(4): 785-789.

Natural heritage preservation association. 2006. Management systems and identify ways to improve research conditions domestic animals. *Cultural heritage administration, Seoul*: 161-166.

Okoshi S, Tomoda I, Makimura S. 1967. Analysis of normal dog serum by immunoelectrophoresis. *Nippon Juigaku Zasshi* 29(5): 233-244.

Swenson MJ. 1984. Physiological properties and cellular constituents of blood. In: *Duke's physiology of domestic animals*. Cornell University Press Ltd. London: 15-39.

Tanabe Y. 1990. Genetic relationships among dog breeds with special reference to asian dog breeds studied by biochemical polymorphisms of blood proteins. In: *Isozyme: structure, function, and use in biology and medicine*. Wiley-Less, Inc: 619-637.