한국가축위생학회지 제34권 제3호 (2011)
Korean J Vet Serv 34(3) : 291~296 (2011)

국내 토종개의 염색체 조사에 관한 연구

박 창 은*
남서울대학교 임상병리학과

(접수 2011. 5. 27; 수정 2011. 6. 20; 게재승인 2011. 9. 10)

Study on chromosomes survey of Korea native dogs

Chang-Eun Park*
Department of Biomedical Laboratory Science, Namseoul University, Cheonan 331-707, Korea

(Received 27 May 2011; revised 20 June 2011; accepted 10 September 2011)

Abstract

The karyotype of the domestic dog is widely accepted as one of the difficult mammalian karyotypes to work. In contrast to many other animals, knowledge about the canine karyotype is quite sparse. The dog has a total of 78 chromosomes; all 76 autosomes are acrocentric in morphology and show only a gradual decrease in length. But appear to be quite small and difficult to identify unambiguously. To purchased standardization of chromosome in Korea native dog, there were analyzed by conventional trypsin/Giemsa staining (GTG-banding techniques), and were compared with 4, 6, 8, 11, 13, 17 chromosome. There were no variations in karyotypes which were analyzed by conventional GTG-banding techniques, but differences were observed in G-banding patterns with Sapsaree, Jindo, Gyeongju DongGyeong dogs, Welshi-Corgi. It is not clear that these disagreements in G-banding patterns between strains of dog were caused by chromosome polymorphism or a difference in interpretation. Comparative analysis of the distribution patterns of conserved segments defined by dog paints in the genomes of the Korea native dogs demonstrates that their differences in the karyotypes of these three species could have resulted from acrocentric banding patterns.

Key words : Karyotype, GTG-banding, Korea native dogs, Polymorphisms, Mosaicism

서 론

인간의 가장 좋은 반려동물로 국내 개(*Canis familiaris*)는 공존을 같이해 왔다. 다른 포유동물보다도 더 가까운 관계에 있는 것이라 할 수 있다. 이에 인간과 개의 고품질의 게놈 자원에 대한 비교 연구가 생물학적으로 유사점을 찾을 수 있으며 새로운 유전자 규명과 염색체 수준을 이해하는 것이 게놈 구조를 알기 위한 정보일 것이다. 따라서 분자세포 유전학적 분석을 위한 개발은 유전자 지도의 작성과 게놈의 조합을 위해 중추적인 역할을 하게 된다.

일반적으로 사람(Mitelman, 1995), 쥐(Dev 등, 1973)의 분염법에 의한 표준핵형은 이루어졌다. 그러나 품종화된 개는 78개의 상동염색체로 포유동물 중에 가장 많은 염색체를 가지고 있으며 염색체 수는 2 n=78개로 밝혀졌다(Reimann 등, 1999). 따라서 많은 연구들(Gustavsson, 1964; Manolache 등, 1976)에 의해 규명되어왔지만 GTG 등에 의한 표준화된 핵형은 아직도 확립되지 않고 있다.

개의 염색체들은 성염색체를 제외하고 대부분의 상염체는 동원체가 한쪽 끝에 있는 단부염색체이고 그 크기가 비슷하기 때문에 동정이 불가능하여 이를 위해 G-banding (Stone 등, 1991), Q-banding (Stone 등, 1991), R-banding (Poulsen 등, 1990; Rønne 등, 1990),

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

G-/R-banding을 비교분석(Reimann 등, 1996) 등의 분염법들을 이용하여 개의 핵형분석이 이루어져 왔다.

그러나 분염법에 의한 핵형은 품종에 따라 다르게 보고되기도 하고 같은 품종이라 하더라도 연구자들에 따라 일부 염색체들의 banding pattern이 달리 보고되기도 하여 현재까지 개에 대해서는 분염법에 의한 표준핵형이 확립되지 않았다.

개의 G-banding 표준 핵형이 확립되기 어려운 것은 염색체가 작고 차중부염색체(metacentric chromosome)인 X, Y염색체를 제외하고 대부분 상염색체들이 차단부(acrocentric chromosome)이기 때문이다.

이에 국내 토종개들의 핵형을 확립하고 이에 염색체들의 비교분석을 통해 차이가 나는 염색체를 규명하고자 하였다. 이에 진돗개(Kim과 Ok, 1996) 및 삽사리(탁 등, 1993), 경주개 동경이(최 등, 2010), 그리고 외래종으로 꼬리가 단미인, 웰시코기에 대해서 G-banding에 의하여 핵형분석을 실시하고 이를 보고하였다. 따라서 이 연구에서는 세포유전학적 핵형분석을 통하여 품종 간 염색체 다변형 현상 및 염색체의 수적 결함이 있는지를 관찰하고 한편, GTG banding 법을 통해 유전자 수준의 결함, 염색체의 미세한 결손 및 추가, 분포율이 매우 낮은 비정상 핵형의 섞임증(mosaicism)을 분석하고자 하였다. 또한, 특정염색체에 존재하는 유전자를 발굴하여 probe 개발 및 종 특이적 마커로 활용하고자 분석하였다.

재료 및 방법

대상동물

국내 토종개로 알려진 삽사리, 진돗개, 경주개 동경이 그리고 꼬리가 무미인 형태의 외래종인 웰시코기를 대상으로 유전학적으로 혈통이 보존된 4대 이상의 개체를 대상으로 조사하였다. 총 종류별 3개체 이상을 조사하였다.

핵형분석

핵형분석은 Seabright (1971)와 Rønne (1989)의 방법에 의해 수행되었고 우선 말초혈액을 채취하기 위해 멸균한 주사기에 헤파린을 넣고 개의 앞다리 정맥에서 10 ml의 혈액을 채취한 다음 RPMI 1640과 fetal calf serum (FCS)과 phytohemagglutinin, penicillin을 혼합하여 만든 배지에서 배양하였다. 37°C, 5% CO_2 배양기에서 72시간 배양시킨 뒤 colcemid (Gibco-BRL)를 50 μl 첨가시킨 후 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 조심스럽게 상층 배양액을 버리고 저장액(hypotonic solution : 0.075 M KCl) 5 ml를 첨가한 37°C에서 40분간 배양하였다.

그리고 고정제 Carnoy's 용액(methanol: acetic acid = 3:1) 500 μl를 첨가하여 천천히 혼합하고 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 조심스럽게 상층 배양액을 버리고 고정제 Canoy's 용액 3 ml를 첨가하여 완전히 혼합하고 20분 후에 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 그 후 Carnoy's 고정제로 1회 추가 처리하였다.

남은 침사 내의 세포액(pellet) 2～3방울을 슬라이드에 떨어뜨려 60°C에서 30분간 건조시켰다. 그 후 세포들 위에 50% H_2O_2를 3분간 처리하고, 다시 60°C에서 30분간 건조시켰다. 건조된 염색체 표본을 GTG banding을 위해서 0.025% trypsin의 phosphate buffered saline (PBS)용액에 slide 표본을 10～30초 처리하였고 5% Giemsa 용액으로 염색하였다. 그 후 증류수로 세척한 뒤 공기 건조시킨 슬라이드를 1,000배 시야에서 현미경으로 검사하였다. GTG banding은 ChIPS-Karyo (Chromosome Image Processing System, GenDix, Inc. Seoul, Korea)를 이용하여 20개 이상의 중기세포에서 저장, 분석하였다.

결　　과

각 종별 중기상 세포 유도 및 염색체의 분포

삽사리, 진돗개, 경주개 동경이의 혈액에서 염색체 관찰을 위해 세포들의 배양 과정 및 중기(metaphase) 세포 유도가 헤파린이 처리된 혈액에서 잘 유도 되었는지를 알아보기 위해 중기 때 염색체 분포를 관찰하였다(Fig. 1B, 2B, 3B, 4B)

또한 삽사리(Fig. 1A), 진돗개(Fig. 2A), 경주개 동경이(Fig. 3A), 웰시코기(Fig. 4A)의 혈액에서 G-banding에 의한 핵형분석의 결과를 관찰하였다. 결과와 같이 banding 염색과 염색체의 수가 잘 보존되어 관찰되었고 세포분열과정 중 중기(metaphase) 유도와 염색체 분포 양상이 잘 분포되고 있음을 관찰할 수 있었다.

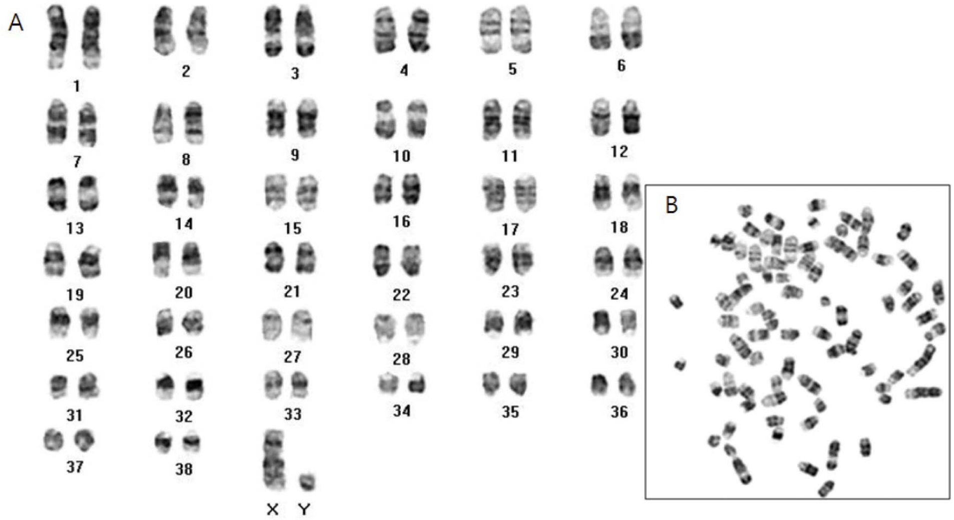

Fig. 1. G-banded karyotype of Sapsaree (A) and metaphase (B) spread of Sapsaree (2 n=78, XY)

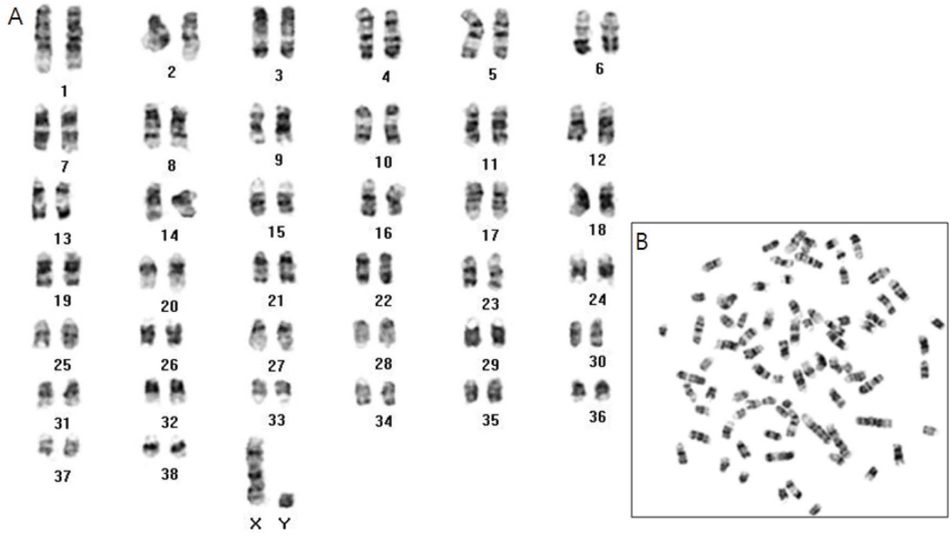

Fig. 2. G-banded karyotype of Jindo-dog (A) and metaphase (B) spread of Jindo-dog (2 n=78, XY).

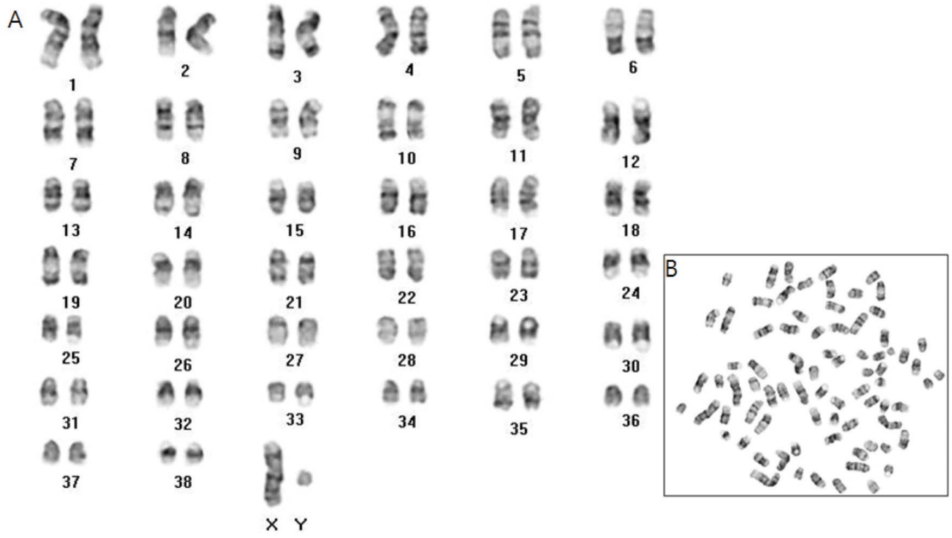

Fig. 3. G-banded karyotype of Gyeongju DongGyeong dog (A) and metaphase (B) spread of Gyeongju DongGyeong dog (2 n=78, XY).

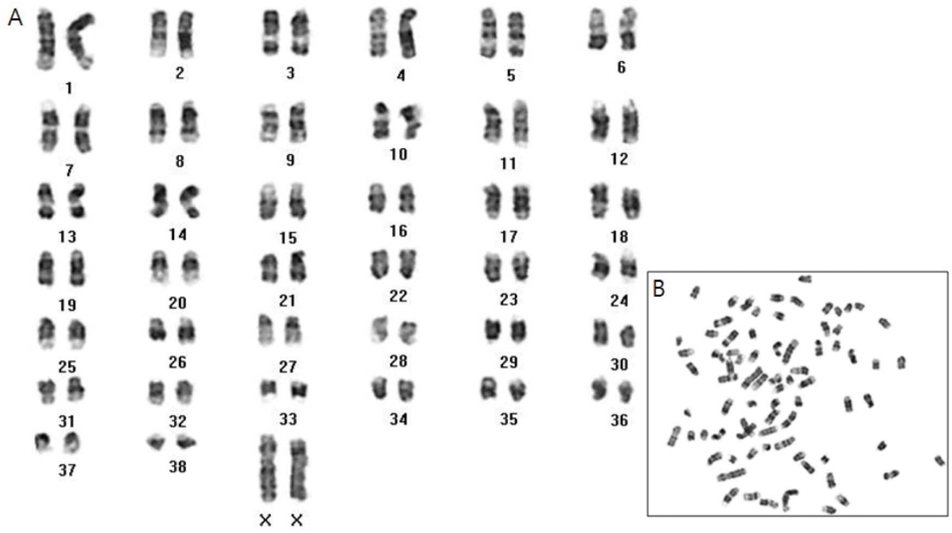

Fig. 4. G-banded karyotype of Welshi-corgi dog (A) and metaphase (B) spread of Welshi-corgi dog (2 n=78, XX).

핵형분석을 통한 특정 염색체의 비교

Fig. 1∼4의 결과는 국내 토종 개(삽사리, 진돗개, 경주개 동경이) 와 외래종으로써 꼬리가 없는 웰시코기의 통 4종류의 핵형분석을 조사하여 염색체의 수적 이상 또는 종간에 염색체의 특별한 변이유무를 알아보기 위한 결과로 차이가 나는 염색체의 banding pattern을 관찰할 수 없었다. 특히 4, 6. 8, 11, 13, 17번의 염색체를 비교·분석한 결과 4, 6, 8, 17번의 염색체는 동일한 banding 양상을 보였다. 그러나 11, 13번의 염색체는 국내 토종개와 웰시코기가 차이가 있는 것으로 관찰하였다.

고 찰

현재 개의 전체 게놈 6억 개의 염기서열 분석을 통해 이중 진정염색체의 게놈은 대략 2.4 Gb로 추정되며, 이는 인간의 게놈은 3.25 Gb보다 작고 마우스는 3.3 Gb와도 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 개(*Canis familiaris*, CFA)는 Switoński 등(1996)에 의해 중기 세포상태에서 1∼20번까지 염색체를 규명하여 인식되어 왔다. 그 후 바로 방사선 교잡을 통해 해상도를 높인 염색체를 보고하였고(Vignaux 등, 1999) 또한 FISH (fluorescence *in situ* hybridization)법을 이용해 염색체 지도를 보고하였다(Kirkness 등, 2003; Breen 등, 2004). 이후에 염색체에 대해서는 저자들마다 논쟁이 많아 이를 보완하기 위해 Langford 등(1996)은 해상도와 특이성을 높여 1번에서 21번까지와 성염색체에 대해 국제적인 표준화로 확립하였다.

포유동물을 비롯해 인간에서 단백질을 해독하는 유전자들은 대략 25,000에서 100,000개로 추정하고 있다. 그러나 최근에 Ensembl (http://asia.ensembl.org/index.html)에서는 인간의 유전자로 알려진 것은 21,667개, 마우스는 21,946개, 개는 14,120개로, 토끼는 495개로 소개하고 있다. 이를 통해 연구의 대상과 연구자의 수에 따라 규명되는 유전자들의 수가 다양함을 알 수 있다. 따라서 연구에서는 아직까지 확립되지 않은 개의 핵형, 특히 국내토종개의 핵형을 규명하고자 조사를 하였으며 또한 이전의 보고(최 등, 2010)에서 삽사리, 진돗개, 경주개 동경이의 염색체 수는 2 n = 78개로 다른 품종의 개들과 차이가 없음과 38쌍의 상염색체가 대부분 단부(acrocentric) 혹은 차단부(submetacentric) 염색체로 분포하고 있음을 알 수 있었다.

따라서 연구자는 G-분염법과 trypsin을 이용하여 개체들의 G-분염의 핵형을 얻어 이들의 핵형도를 작성하였고 이를 통해 특정 염색체의 분염 양상을 비교분석 하였다(Fig. 5, 6). 이를 통해 차별성을 보이는 염색체를 추정하여 그 염색체에 분포하는 알려진 유전자를 비교 분석하기 위해 조사하였다 또한 차이거나 혹은 특이적으로 발현하는 추정 유전자들을 이용해 국내 토종개의 특이발현 마커 발굴과 혈통 보존을 위한 유전자 probe 개발을 위해 활용하고자 하는 연구를 수행하였다.

이 중 1번에서 20번 사이의 염색체 중 분염 양상이 잘 관찰되며 차이가 나는 염색체 4, 6, 8, 11, 13, 17번의 염색체를 비교 분석하였다. 이 중 4, 6, 8, 17번의 염색체는 동일한 banding 양상을 보였으나 11, 13번

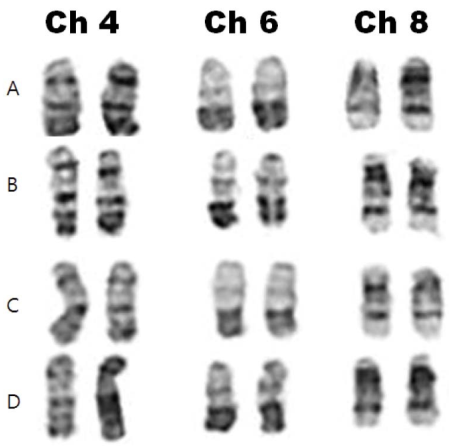

Fig. 5. Comparison of G-banded chromosome No 4, 6, 8 in Sapsaree (A), Jindo-dog (B), Gyeongju DongGyeong-dog (C), other tailless dogs (Welshi- Corgi) (D).

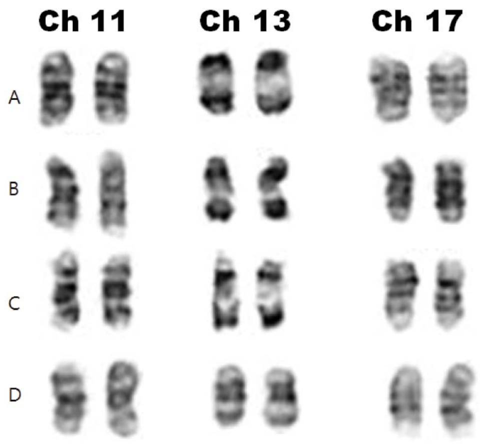

Fig. 6. Comparison of G-banded chromosome No 11, 13, 17 in Sapsaree (A), Jindo-dog (B), Gyeongju DongGyeong-dog (C), other tailless dogs (Welshi-Corgi) (D).

의 염색체는 국내 토종개와 웰시코기가 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 이들 중 염색체 4번에서는 알려진 단백질 해독 유전자가 402개가 있는데 이중 대표적으로 *Histone-lysine N-methyltransferase*가 분포하였고, 염색체 6번에서는 알려진 단백질 해독 유전자가 649개가 있는데 이중 *Transmembrane protein 112*가 분포하고 있음을 알 수 있었다. 또한, 염색체 8번에서는 유전자가 440개 중 *Myosin-6* (*Myosin heavy chain 6*)이 분포하고 있음을 알 수 있었고 염색체 11번에서는 유전자가 370개가 있는데 이중 *Ubiquitin-associated protein 2*가 분포하고 있음을 알 수 있었다. 그리고 염색체 13번에서는 유자가 253개가 있는데 이중 *Zinc finger CCCH domain-containing protein 3*가 분포하였고 염색체 17번에서는 유전자가 453개가 있는데 이중 *sodium bicarbonate transporter 4 isoform c*, *Uncharacterized protein* (*KIAA0460*), *Vacuolar protein sorting- associated protein 45* (*h-VPS45*)가 분포하고 있음을 알 수 있었다. 이를 통해 특정 banding 부위 염색체에 존재하는 유전자를 추정하여 그 종의 특이 발현 후보유전자로서 활용가치를 고려할 수 있을 것으로 생각한다.

특히 핵형분석 시 개체 간의 띠의 굵기나 위치의 차이는 발생하고 다소 차이는 보인다. 한편, 개의 품종 간의 G-분염법에 의한 양상의 이러한 변이는 염색체의 다변형현상(polymorphism)에 의한 것인지 아니면 기술적인 측면에서 염색성의 차이, 세척시간, 핵형 분석과정에서 이미지 해상도의 차이인지에 대해 고려해야 할 것으로 생각한다.

따라서 생물의 유전 육종자원들의 대표로 국내 토종개들에 대한 기초 데이터 정립 및 비교 분석을 통해 품종을 육성하고 이에 대한 정보를 구축해야 할 것으로 생각한다. 또한 개에 대한 핵형분석의 연구에서는 아직까지 인간과 유사한 생리학적 특징을 많이 가지고 있다는 것 등과 관련하여 국내. 외적으로 개의 표준 핵형을 확립하고자 많은 노력이 기울여지고 있다(Graphodatsky 등, 1995; Fischer 등, 1996; Pieńkowska-Schelling 등, 2008).

그러나 현재 핵형분석의 고해상도를 접목한 염색법의 개발이 미흡한 실정이어서 향후 국내 토종개의 특정 염색체를 probe로 하는 마커들을 개발하여 FISH 기법들을 활용하여 토종개의 유전학적 확립이 이루어져야 할 것으로 생각한다.

또한, 위에서 언급한 특정개체의 염색체에 존재하는 특이 유전자를 개발하여 품종을 대표하는 혈통분석의 대표 기법으로 활용하여 염색체의 다변형 및 근친 교배, 잡종 교배 등의 감별을 통해 우수한 혈통을 가진 국낸 토종개의 육성이 시급할 것으로 보인다. 이를 위해서는 더 많은 수의 분석을 통한 재현성을 검사하고 개의 유전체에 대한 관심과 비교분석을 통한 토종개의 유전자를 축적해야 할 것으로 생각한다.

결 론

국내 토종개의 염색체 수는 2 n=78이며 염색체의 형태를 보면 단부 또는 차단부 염색체이며 그 크기가 작고 염색체의 수가 많아 G-banding 등에 의한 핵형

의 표준화가 완전하게 이루어지지 않아 국내 토종개들의 핵형을 확립 및 비교·분석을 통해 규명하고자 하였다. 국내 토종개의 대표인 삽사리, 진돗개, 경주개 동경이는 품종 간에 특이한 변이는 없었으며, G-분염법에서 4, 6. 8, 11, 13, 17번의 염색체를 비교분석한 결과 4, 6, 8, 17번의 염색체는 동일한 banding 양상을 보였다. 그러나 11, 13번의 염색체는 국내 토종개와 웰시코기가 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 그리고 유전자 수준의 결함, 염색체의 미세한 결손 및 추가, 분포율이 매우 낮은 비정상 핵형인, 유전적으로 다른 세포집단이 한 개체에서 둘 이상 공존하는 상태의 섞임증은 관찰할 수 없었으며 각 염색체에 존재하는 특이유전자들을 통해 각 개체의 혈통보존을 위한 마커로 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2011학년도 남서울대학교 학술연구비(자유공모) 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

최석규, 성기창, 이은우, 박창은. 2010. GTG banding에 의한 경주지방의 무미 또는 단미 형태의 개(경주개 동경이)의 핵형분석. 한국가축위생학회지 33: 207-211.

탁연빈, 하지홍, 김종봉, 박희천. 1993. 고유견 삽사리의 보호육성에 관한 연구. 한국과학재단 목적기초연구 제 2 차년도 중간보고서(KOSEF90-05-00-11).

Breen M, Hitte C, Lorentzen TD, Thomas R, Cadieu E, Sabacan L, Scott A, Evanno G, Parker HG, Kirkness EF, Hudson R, Guyon R, Mahairas GG, Gelfenbeyn B, Fraser CM, André C, Galibert F, Ostrander EA. 2004. An integrated 4249 marker FISH/RH map of the canine genome. BMC Genomics 5: 65.

Dev VG, Miller DA, Miller OJ. 1973. Chromosome markers in Mus musculus: strain differences in C-banding. Genetics 75: 663-670.

Fischer PE, Holmes NG, Dickens HF, Thomas R, Binns MM, Nacheva EP. 1996. The application of FISH techniques for physical mapping in the dog (*Canis familiaris*). Mamm Genome 7: 37-41.

Graphodatsky AS, Beklemisheva VR, Dolf G. 1995. High-resolution GTG-banding patterns of dog and silver fox chromosomes: description and comparative analysis. Cytogenet Cell Genet 69: 226-231.

Gustavsson I. 1964. The chromosomes of the dog. Hereditas 51: 187-189.

Kim JB, Ok HS. 1996. G-banded karyotype of Korean Jindo dog (*Canis familiaris*). Korean J Genetics 8: 183-188.

Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC. 2003. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. Science 301 (5641): 1898-1903.

Langford CF, Fischer PE, Binns MM, Holmes NG, Carter NP. 1996. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. Chromosome Res 4: 115-123.

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

Mitelman F. 1995. ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature (1995): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tennessee, USA, October 9-13, 1994. S. Karger Publishers, Inc. Switzerland.

Pieńkowska-Schelling A, Schelling C, Zawada M, Yang F, Bugno M, Ferguson-Smith M. 2008. Cytogenetic studies and karyotype nomenclature of three wild canid species: maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), bat-eared fox (*Otocyon megalotis*) and fennec fox (*Fennecus zerda*). Cytogenet Genome Res 121: 25-34.

Poulsen BS, Shibasaki Y, Ikeuchi T, Rønne M. 1990. Banding studies in *Canis familiaris*. I. Replication patterns in karyotypes from lymphocyte cultures. Cytobios 62: 161-165.

Reimann N, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Schmitz U, Rogalla P, Nolte I, Rønne M. 1996. An extended nomenclature of the canine karyotype. Cytogenet Cell Genet. 73: 140-144.

Reimann N, Bartnitzke S, Nolte I, Bullerdiek J. 1999. Working with canine chromosomes: current recommendations for karyotype description. J Hered 90: 31-34.

Rønne M 1989. Chromosome preparation and high resolution banding techniques. A review. J Dairy Sci 72: 1363-1377.

Rønne M, Kirpekar F, Shibasaki Y, Poulsen BS, Kristiansen K. 1990. R-banding and in situ hybridization localization of single copy genes on high resolution banded chromosomes. Anticancer Res. 10(2A): 375-377.

Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2 (7731): 971-972.

Stone DM, Jacky PB, Prieur DJ. 1991. The Giemsa banding pattern of canine chromosomes, using a cell synchronization technique. Genome 34: 407-412.

Switoński M, Reimann N, Bosma AA, Long S, Bartnitzke S, Pieńkowska A, Moreno-Milan MM, Fischer P. 1996. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the standardized Karyotype of the dog (*Canis familiaris*). Chromosome Res 4: 306-309.

Vignaux F, Hitte C, Priat C, Chuat JC, Andre C, Galibert F. 1999. Construction and optimization of a dog whole-genome radiation hybrid panel. Mamm Genome 10: 888-894.