

혈액세포를 이용한 염색체 분리 분석에 관한 방법적 고찰

진주산업대학교 낙농자원학과, 한국생명과학연구소*

손시환·정구민*

A Study on the Methodology of Chromosome Preparation from Blood Culture

S.H. Sohn and K.M. Chung*

Department of Dairy Science & Technology, Chinju National University, *Hankook
Institute of Life Science

= Abstract =

This study was carried out to develop the methodology of chromosome preparation from blood cultures in mammals which included human, mouse, cattle and pig. For karyotyping, 0.5-5.0ml of peripheral blood were collected and cultured. The satisfactory results were obtained from macroculture and microculture in all species. In culture, the patterns of cell growth were no difference among media except serum concentration and mitogen supplement. The presence of mitogen and fetal bovine serum in medium significantly affected the mitotic index. The optimal culture condition was 37°C for 3 days. And the concentration of colcemid and reincubation time also affected the chromosome morphology. In harvest, chromosome patterns were mainly affected on hypotonic treatment which included treated time and temperature, dropwise of fixative solution, and drying after slide preparation.

Key words : chromosome, lymphocyte, human, mouse, cattle, pig.

서론

지난 30여년간 염색체의 연구는 많은 생물학자 및 생리학자들에게 주된 관심사가 되었고, 특히 사람에 대한 이의 연구는 더욱 중요성을 더하며 급진적 발전을 이룩하였다.

세포유전학적 기술을 이용한 의학적 성과로는 무엇보다 유전적 질환의 진단 수단으로 유효하게 이용됨을 들 수 있겠는데 이의 중요성에 비추어 최근에는 이러한 연구 분야를 독자적으로 임상세포유전학(clinical cytogenetics)으로 분류하기도 한다(Therman 등, 1986). 동물등에 있어서도 세포유전학적 연구를 이용한 많은 연구들이 시도되고 있는 바 염색체의 이상 양상에 관한 연구, 염색체의 배가 육종, 유

전적 표지인자의 구명을 위한 banding 연구, 유전자 지도 작성을 위한 연구 및 수정란 조작기술에 활용할 다양한 염색체 연구들이 수행되고 있다. 이는 가축의 개량적 측면에서도 매우 다양하게 적용될 수 있을 것이며 실현 가능성이 많은 결과가 예상된다.

혈액세포를 이용한 핵형분석은 이러한 연구를 위한 가장 기본적인 과정이다. 말초혈액(peripheral blood)은 생존하는 개체로부터 가장 손쉽게 용이하게 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 적절한 세포분열촉진제(mitogen)의 존재 하에서 비교적 간단한 배양방법으로 짧은 시간내 만족할만한 증기상을 얻을 수 있기 때문이다.

혈액을 이용한 염색체 분리 방법은 사람에게 있어 Hungerford 등(1959)이 혈액 중 leukocyte만을 분리하여 배양에 성공한 것을 계기로 Nowell(1960)이 lymphocyte의 분열촉진제로서 PHA의 성공적인 적용과 더불어 Moor-

Corresponding author : S. H. Sohn, Department of Dairy Science and Technology, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea.

head등(1960)이 자연건조방법(air-drying method)을 개발함으로써 이후 급진적 발전의 기틀을 마련하였다. 한편, 백혈구만을 분리하여 배양하는 것과는 달리 전혈액(whole blood)을 그대로 배양하여 염색체 분리에 성공함으로써 미량의 혈액으로서도 염색체의 분석이 가능하여지고, 또한 백혈구만의 분리를 위한 번거로운 과정을 생략할 수 있게 되었다(Hungerford등, 1965).

이와같이 다양한 연구가 진행된 결과 혈액으로 부터의 염색체 분석은 현재 거의 보편화 되고 쉽게 이용되어질 수 있는 기술이라 할 수 있다. 그러나 혈액의 세포적 특성에 대한 이해의 미흡과 또한 실험적 조건의 까다로움으로 인해 만족할 만한 증기상의 수와 바람직한 염색체의 형태를 얻는데 어려움이 많다.

따라서 본 연구에서는 사람을 포함한 여러 포유동물들의 혈액세포 배양으로 부터 염색체 분리 분석을 위한 최적의 방법을 제시하고, 또한 각 실험단계별 유발될 수 있는 여러 문제점들에 대하여 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

본 시험에 이용한 시료로서는 사람의 경우 손가락 끝 말초 혈액 2-3방울을 채혈하여 그대로 이용하거나, 혹은 팔의 정중정맥(median basilic or cephalic vein)으로 부터 헤파린(heparin) 처리된 주사기를 이용하여 5-10ml정도 채혈하여 이용하였다. 소 및 돼지의 경우 경정맥(Jugular vein)으로 부터 역시 헤파린 처리된 주사기를 이용하여 5-10ml정도 채혈하고, 생쥐(mouse)는 헤파린 처리된 모세관(heparinized capillary tube)을 이용하여 안구 정맥으로 부터 약 0.5ml정도 채혈하여 염색체 분석에 이용하였다. 혈액배양을 이용한 염색체의 분리방법은 Verma 와 Babu(1989) 및 Rooney 와 Czepulkowski(1992)의 방법을 다소 변형하여 다음과 같이 수행하였다.

1. Macroculture

1) 백혈구의 분리

채혈 후 혈액이 응고가 되지 않도록 가볍게 흔들어 주고 실온 상태에서 30-60분간 세워둠으로써 뿌연 혈장층과 혈액세포가 분리된다. 이 혈장층 중 하부에 상대적으로 백혈구가 많이 응집되어 있는데 이 부분만을 채취하

여 천천히 균질시켰다.

2) 배양

배양액으로서는 각 sample당 RPMI 1640 8ml, Fetal Bovine Serum 2ml, Penicillin & Streptomycin 0.1ml(10,000IU/ml and 10mg/ml), L-glutamine(200mM) 0.1ml(배양액에 이미 첨가된 commercial medium의 경우는 첨가할 필요가 없음) 및 Phytohemagglutinin(M-form) 0.1ml을 혼합하고, 이후 0.2 filter로써 여과하였다. 이들을 배양용기에 넣은 후 약 0.3-0.5 ml lymphocyte-rich plasma(1×10^6 nucleated cells/ml)를 주입하고 가볍게 흔들어 준 다음, 마개를 완전히 밀봉한 상태로 37°C에서 3일간 배양하였다.

3) 염색체의 분리

배양종료 50분전에 각 배양용기당 0.1ml colcemid($10 \mu\text{g/ml}$; final conc. $0.1 \mu\text{g/ml}$ medium) 또는 0.1ml colchicine(0.1%)을 주입하고, 배양종료 후 원심분리(1000rpm/10min)하였다. 이후 부유액을 제거한 후 저장처리(hypotonic treatment)를 하였다. 저장액으로는 0.075M KCl을 이용하여 약 5ml정도 주입하고 고루 섞어 준 다음 37°C의 항온기에서 15분간 처리하였다. 그리고 원심분리하여 고정(fixation treatment)을 실시하였다. 고정액으로서는 3 methanol과 1 acetic acid를 이용하고 세포 침전물에 천천히 1방울씩 첨가하여 섞어 준 후 최종 고정액이 5ml이 되도록 하였다. 최소 이러한 고정과정을 3회정도 반복하고, 마지막 고정과정에서 부유액을 버리고 pasteur pipet으로 20방울 정도 고정액을 첨가하여 슬라이드 제작을 위한 세포 현탁액을 만들었다. 염색체 분석에 이용할 슬라이드는 알콜로 닦은 후 하루 정도 냉장보관 시키고, 젖은 상태인 채로 표면에 세포 현탁액을 3-4방울 정도 떨어뜨려 최소 5장 정도의 표본을 제작하였다. 이후 약 41°C정도의 슬라이드 가온판(slide warmer)위에서 건조시켰다.

4) 염색 및 관찰

일반 검경을 위하여 1장의 슬라이드는 곧바로 염색하고, 나머지 표본들은 banding처리를 위하여 60°C 건조기(dry oven)에 하루정도 더 건조 시켰다. 염색은 4%의 Giemsa용액에 5분간 염색하고 증류수에 2-3회 수세하였다. 그 다음 자연건조시키고 완전히 건조된 슬라이드상에 permount액을 2-3방울 떨어뜨려 cover slip으로 덮고 저배율($\times 100$)로 부터 고

배울($\times 1000$)로 관찰하였다. 관찰한 증기 상이 정상일 경우는 슬라이드당 30개 정도 분석하고, 핵형분석을 위하여 각 슬라이드당 3장 정도 사진 촬영을 하였다. 반면 비정상일 경우, 특히 mosaicism으로 의심될 경우는 슬라이드당 최소 50개 이상의 상을 관찰 후 핵형을 분석하였다.

2. Microculture

모든 과정은 macroculture와 동일하나 백혈구의 분리 없이 전혈액(whole blood)을 그대로 10-15 방울(0.2-0.3ml)정도 배양에 이용하였다. 한편 분열세포의 수를 많게하기 위하여 이러한 과정의 변형 형태로써 혈액 배양량을 각 배양용기당 1ml씩 주입 후 배양하고, 배양종료 후 저장처리 직전에 원심분리 후 백혈구층(buffy coat)만을 채취하여 처리하기도 하였다.

3. 핵형분석

잘 퍼진 증기상을 저감도 필름(ASA 25)으로 촬영하고, 촬영된 필름은 D-19용액으로 5분간 현상하였다. 인화작업은 확대기를 이용하여 8" \times 10"의 반광택 인화지(Kodabrome F2)로 인화한 후 Dektol현상액으로 현상하고, SB-1용액으로 정지시킨 후 Rapid fix액에 정착하였다. 이와같이 인화 확대된 사진 상의 상동염색체를 식별하여 오려 순서대로 나열하여 붙인 후 핵형분석을 하였다.

결과 및 고찰

요구하는 증기상의 명확한 염색체 표본을 위해서는 조직배양의 기술이 선행되어야 한다. 조직배양에 관한 기본적개념은 수년간 변화된 바가 없으나, 배양조건 및 배양액에 대한 기술적 차이는 매우 다양한 결과를 낳게 한다. 염색체의 분리를 위한 보다 바람직한 배양기술은 우선 세포분열의 빈도를 높여야 하고, 염색체의 형태가 양호하게 되도록 하며, 세포의 확산 및 분열을 촉진시킬 수 있어야 한다.

1. 배양준비작업

조직배양의 종류에 따라서 완벽한 멸균시설과 도구들이 요구되어지고 있기는 하나 대체적인 세포유전학적 연구에는 상대적으로 이들에 비해 단순 취급되어져도 무방하다. 그러나

다음의 4가지 요소 즉, 배양액(culture media)과 배양첨가액(media ingredients), 배양용기(culture-ware), 배양을 위한 작업환경 및 분석에 이용할 시료에 대해서만은 완전한 멸균상태를 유지하여야 한다. 특히 분석에 이용할 혈액은 채혈시 오염의 가능성을 최대한 배제시키고, 채취된 시료가 오염의 가능성이 우려될 때는 rinsing solution(basal salt solution, 400IU penicillin, 400 g/ml streptomycin)으로 약 5분간 원심분리 후 balanced salt solution에 철저히 수세한 다음 이용하는 것이 바람직하나 이러한 처리 후는 배양상태가 현격히 저하될 수도 있다(Verma and Babu, 1989).

혈액의 운반은 해파린 처리된 주사기에 채혈된 채로 혹은 해파린 처리된 튜브로 실은 상태로 가능하지만, 다소의 운반시간이 요할 경우는 4°C 정도의 냉장 상태로써 운반이 바람직하다. 또한 운반된 혈액을 곧 바로 배양에 이용치 못할 경우는 냉장 상태로 이를 정도의 보관은 배양에 별 다른 문제점이 없는 것으로 나타났다.

2. 배양

1) 배양액간의 비교

백혈구의 배양을 위해 지금까지 소개된 상업용 배양액을 비교 검토한 바 Minimal Essential Medium(MEM), Medium 199, Nutrient Mixture F10 및 RPMI 1640간에 세포성장(cell growth)에는 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 전체적 배양양상에 있어서 RPMI 1640의 배양액이 다른 배양액에 비해 다소의 좋은 결과를 나타내었다.

2) 배양첨가물(Supplements)

혈액 배양을 위한 배양액의 첨가물로는 Fetal bovine serum(FBS), L-Glutamin, Heparin, Pen. & Streptomycin 및 PHA 또는 Pokeweed mitogen으로서 이들중 cell growth를 위해 약 10-20%의 FBS의 첨가는 필수적인 것으로 나타났다.

한편 세포분열촉진제(mitogen)의 첨가여부에 따라 증기상의 분열 촉진에 매우 큰 영향을 미치고, 이의 첨가 함량은 배양액의 1-2% 정도가 바람직한 것으로 나타났다. 정상적인 백혈구세포는 관행적인 배양조건 하에서는 분열을 하지 않는다. 그러나 phytohemagglutinin(PHA)이라던가 pokeweed mitogen(PWM) 및 concanavalin A와 같은 lectin에 의해 분열을

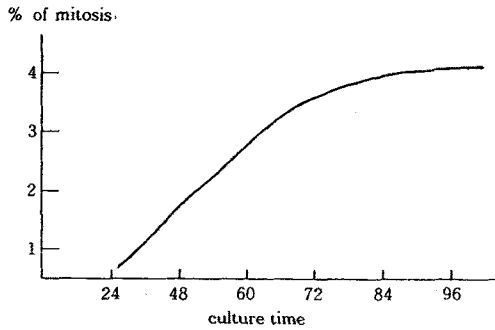


Fig. 1. Mitotic index of lymphocytes at different culture time intervals.

촉진할 수 있음이 밝혀진 이래 혈액배양에는 이들의 첨가가 필수적으로 이용된다(Nowell 등, 1960). 이들 중 PHA는 lymphocyte중 T-cell의 분열을 촉진하므로 사람의 경우 혈액배양으로의 염색체 분리에 가장 보편적으로 이용된다. 그러나 생쥐나 조류 혈액의 경우는 PHA보다는 pokeweed가 이들 세포들의 분열 촉진에 훨씬 더 효과적이다. Mitogen의 lymphocyte 분열촉진 기작은 이들이 glycoprotein으로 구성되어 세포막에 부착하므로 막의 투과성을 변화시키고 이에 따라 분자의 흡수도를 증가시켜 lymphocyte의 macromolecule의 합성을 촉진하게 되는 것이다.

3) 배양조건

분열지수(mitotic index)에 따른 적정 배양 시간은 약 72시간정도로써 이의 배양양상은 그림 1과 같다. 통상 PHA의 첨가 하에서 첫 세포분열은 40시간째 나타나기 시작하여 약 배양 44시간째 분열지수가 2-3%에 도달한다. 세포분열은 배양 후 6일간(144시간)정도 지속하나 120시간 이후부터 중기 염색체 상의 질이 급격히 저하되는 양상을 보인다. 따라서 염색체 분석을 위한 최적의 배양 시간은 45-96시간이 가장 바람직한 것으로 생각되고, 특히 배양 70-76시간째의 염색체 분석은 2차 세포분열의 말미무렵으로서 세포수의 증가와 더불어 보다 나은 중기상의 형태를 얻게된다.

한편 배양온도에 있어서는 37.0-37.5°C가 가장 최적의 배양조건으로서 이의 범위내에서는 배양의 차이가 거의 없었으나 이보다 낮은 온도에서는 세포수의 현격한 저하를 보인다. 통상적인 세포 또는 조직의 장기배양에 CO₂의 공급은 필수적이나, 염색체 분석을 위한 혈액배양에서는 최소한의 O₂공급이 될 수 있는 용량의 배양용기(25cm²의 culture flask)를

선택하고, 마개를 완전히 밀봉한 상태로 일반 항온기에서 배양하여도 배양에 별 무리가 없다.

4) 중기상의 유도

염색체의 중기상 유도를 위하여 방추사 억제물질인 alkaloid계의 colcemid 또는 colchicine의 투여농도 및 재배양 시간이 중기상의 수 및 염색체의 형태에 매우 큰 영향을 미친다. colcemid 농도에 있어서 무리한 고농도처리는 세포분열의 중단을 야기 시키고, 반면 적정 수준이하의 저농도는 중기상을 적절히 억제하지 못하는 현상을 유발한다. 따라서 최적의 중기상을 유도하기 위하여서는 배양액 ml당 0.1 μ g의 colcemid 농도가 가장 바람직한 것으로 생각된다.

한편 colcemid 투여 후 재배양 시간에 따라 중기상의 수 및 형태적양상에 매우 큰 영향을 미치는 바 짧은 시간의 재배양은 중기상의 수가 감소되는 반면 염색체의 형태는 보다 길어지고 (early metaphase or late prophase), 적정시간 보다 다소 긴 재배양은 중기상의 수는 다소 많아질 수 있으나 염색체의 형태는 보다 짧아지고 응축된 양상(late metaphase)을 보이게 된다. 따라서 최적의 중기상을 얻기 위해서는 colcemid 투여후 약 50분-1시간 정도의 재배양이 가장 바람직한 것으로 나타났다.

3. 저장처리(Hypotonic Treatment)

Harvest시 중기상의 형태에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로서의 저장처리 방법인 것으로 생각된다. 과도한 저장처리의 경우 세포막 파열에 의한 염색체들의 흩어짐이 심하게 되어 분석이 불가능하여지고, 반면 부족한 저장 처리시에는 염색체들의 겹쳐짐과 개개 염색체의 형태가 매우 좋지 않을 뿐만 아니라 염색체 주위에 세포질의 흔적이 많이 남게된다.

따라서 저장처리시 저장액의 성분 및 처리 온도, 습도, 처리시간이 염색체의 형태에 가장 민감한 반응을 보이는 바 실온과 상대습도가 항상성을 유지하지 못하는 실험실에서는 세심한 주의가 요한다. 저장액의 처리로서는 1:3 calf serum과 distilled water 또는 0.075M KCl이 가장 적합한 저장액으로 간주되며, 실온 20-25°C, 상대습도 60%에서 가장 바람직한 결과를 얻을수 있었다. 처리시간은 상기한 조건에서 10-20분이 적절한 저장상태가 됨에 따라 조건이 일정하지 못한 실험실에서는 37°C의 항온기 하에서 미리 예온된 저장액으로 약 15

Table 1. The classification of human chromosomes by the standardizing committee on nomenclature(ISCN, 1985)

Group	Characteristic
Group (A) Chromosomes 1-3	Large metacentric chromosomes readily distinguished from each other by size and centromere position.
Group (B) Chromosomes 4-5	Large submetacentric chromosomes which are difficult to distinguish from each other.
Group (C) Chromosomes 6-12	Medium-sized metacentric chromosomes. The X chromosome resembles the longer chromosomes in this group. This large group is the one which presents major difficulties in identification of individual chromosomes without the use of banding techniques.
Group (D) Chromosomes 13-15	Medium-sized acrocentric chromosomes with satellites.
Group (E) Chromosomes 16-18	Relatively short metacentric chromosome (no. 16) or submetacentric chromosomes (no. 17 and 18).
Group (F) Chromosomes 19-20	Short metacentric chromosomes.
Group (G) Chromosomes 21-22-Y	Short acrocentric chromosomes with satellites; the Y chromosome is similar to these chromosomes but bears no satellites.

분간 동일한 환경 하에서 처리함이 가장 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

4. 고정처리(Fixation)

저장처리된 표본의 고정을 위하여 이후 고정처리가 수행되어야 한다. 세포의 고정처리를 위하여서는 일반적으로 Carnoy's액(1:3 acetic acid와 methanol)이 가장 많이 이용되고 있으나 고정 처리방법에 따라 염색체의 형태에 매우 큰 영향을 미치게 된다. 고정처리시 급격한 고정액의 주입은 염색체들의 응축현상(shrinkage)을 유발하는 바 한 방울씩 첨가하고 손가락 끝으로 원심분리관을 쳐서 고무 섞어준 다음 또 한 방울씩 첨가하는 drop-wise가 필수적이라 하겠다. 또한 슬라이드상의 이물질의 최소화를 위하여서는 최소 3회 이상의 새로운 고정액의 반복 처리가 요구된다.

5. 슬라이드 제작(Slide Preparation)

적절한 저장과 고정처리가 된 중기상의 관찰을 위하여 슬라이드 제작시 이들 상들의 최적의 퍼짐을 유도하여야 한다. 슬라이드상에 적절한 퍼짐을 위하여서는 온도 차에 의한 퍼

짐이 가장 좋은 방법으로써 시료의 도말을 위한 슬라이드를 사전에 냉장시킴이 가장 바람직한 것으로 나타났다. 세포막의 파열은 떨어뜨림의 높이에 의해 유도되는 바 이는 최소 25cm 이상의 높이만 유지하면 큰 차이가 없는 것으로 보여진다.

도말된 슬라이드의 건조 상태도 염색체의 형태에 많은 영향을 미침에 따라 건조시 너무 습할 경우 세포질(cytoplasm)의 흔적이 많아지고 형태 또한 좋지 않게 된다. 따라서 습도가 높은 날은 가열판(hot plate)위에서 38-42℃정도의 온도를 유지하여 건조 시킴이 바람직하다. 반면 처리시 너무 건조할 경우는 염색체의 퍼짐이 과도하게 될 가능성이 있으므로 이때는 도말 후 가습기를 켜 상태로 건조 시킴이 좋다.

6. 핵형분석(Karyotyping)

1) 사람(Human)

사람 염색체의 핵형은 그림 2에 나타난 바와 같고, 이의 구분은 ISCN(1985)의 규정에 따라 7개의 그룹(A-G Group)으로 나누고 표 1과 같이 분류한다.

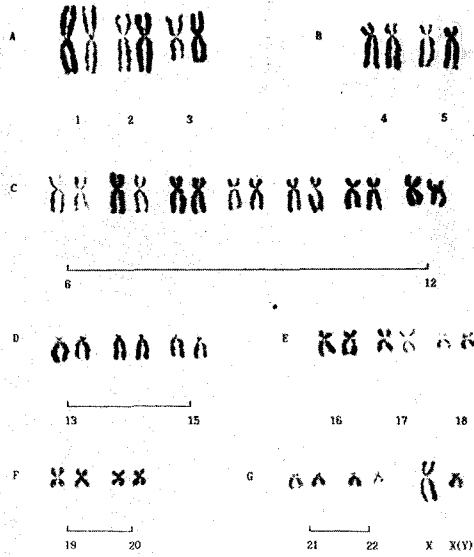


Fig. 2. The karyotype of human male from lymphocyte culture.

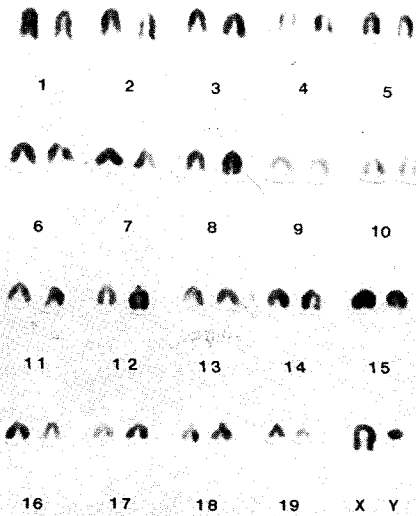


Fig. 3. The karyotype of mouse male from lymphocyte culture.

2) 생쥐 (Human)

생쥐의 염색체는 총 40개으로써 이들 모두가 말단염색체(telocentric)이다. 따라서 생쥐의 경우 특별한 banding의 처리 없이 염색체의 형태적 특징에 의한 핵형분석에는 많은 어려움이 있다. 그러므로 생쥐에 대한 핵형분석은 Q-banding에 의한 표지인자로서(Committee on stand-

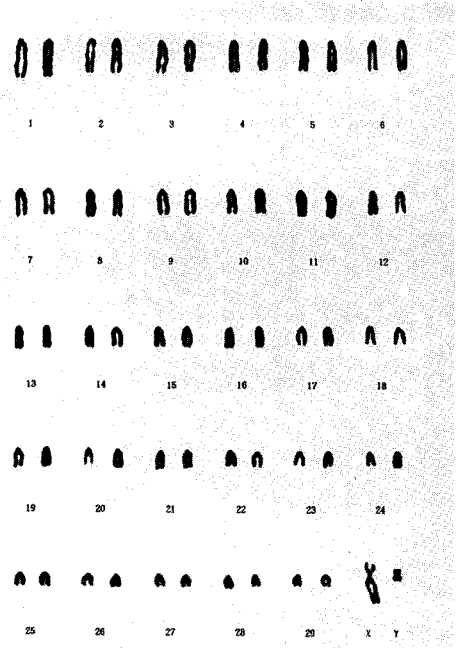


Fig. 4. The karyotype of cattle male from lymphocyte culture.

ardized genetic nomenclature for mice, 1972), 또는 ASG banding에 의하거나(Buckland등, 1971), C-banding의 방법(Schnedl등, 1971)으로써 식별하여 제시하고 있다. 그림 3에서와 같이 banding 처리 없이 핵형을 분석하고자 할 때는 단순한 상대적 길이의 비로써만 길이 순에 의한 나열밖에 할 수 없다.

상대적 길이비에 의한 성 염색체 X는 2번 내지 3번의 길이 정도의 크기이고, Y 염색체는 19번 염색체의 길이와 비슷하다. 그밖의 상 염색체의 형태적 특징으로써는 12번 염색체, 15번 염색체, 18번 염색체 및 19번 염색체에서 다소의 짧은 p-arm 양상을 지니고 있다.

3) 소(Cattle)

소의 핵형은 그림 4에 제시된 바와 같이 총 60개으로써 염색체의 형태적 특징은 58개의 상 염색체는 동원체가 말단부에 위치한 아단염색체(acrocentric)이고, X 성 염색체는 아중양염색체(submetacentric), Y 성 염색체는 중양염색체(metacentric) 형태로서 크기는 X 염색체가 거의 1번 크기이고, Y 염색체는 28번 내지 29번 크기이다(오 등, 1991; 김 등, 1994). 따라서 소에 있어 성 염색체 X, Y는 형태적 특징으로 별다른 처리 없이도 상 염색체와 뚜렷이

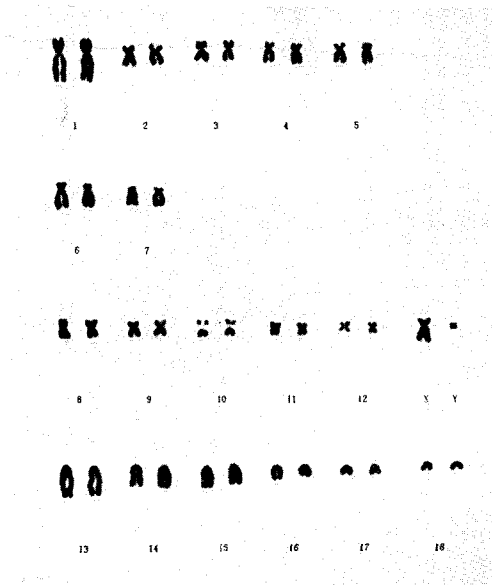


Fig. 5. The karyotype of pig male from lymphocyte culture.

구별되는 반면, 상 염색체간에는 가장 긴 1번 염색체를 제외하고는 상동염색체의 구분에 어려움이 많다.

4) 돼지(Pig)

돼지 염색체의 형태적 양상은 중앙염색체(metacentric chromosome), 아중앙염색체(sub-metacentric chromosome), 아단염색체(acrocentric chromosome)의 모든 형태의 염색체가 혼재하고, 이들의 크기 또한 형태적 양상과는 독립적으로 나타나고 있다. 또한 각 품종별 염색체의 수는 공히 $2n=38$ 개로 나타나며, XY 또는 XX의 성 염색체와 36개의 상 염색체로 구성되어 있다.

이들의 핵형은 그림 5에 제시된 바와 같다. 돼지염색체의 핵형분석은 형태적 특징에 따라 가장 긴 중앙 또는 아중앙염색체 형태의 5개의 염색체들을 한 그룹으로 하고(Group I), 짧은 단완을 가진 아단염색체 형태의 2개의 염색체를 또 한 그룹(Group II)으로 하는 한편 중앙염색체 형태의 5개의 상 염색체와 X, Y성 염색체를 그 다음 그룹(Group III)으로, 나머지 동원체가 말단부에 있는 아단염색체 형태의 6개의 염색체들을 마지막 그룹(Group IV)으로 한다(Ford 등, 1980; 김 등, 1994).

결론

여러 포유동물들의 혈액세포 배양으로부터 염색체 분리 분석을 위한 최적의 방법을 제시하고자 본 연구를 수행하였다. 본 시험에 이용한 시료로서는 사람, 새앙쥐, 소 및 돼지로서 이들로 부터 0.5-5.0ml 정도의 말초혈액을 채취하여 백혈구의 배양으로 핵형분석을 하였다. 모든 종의 시료로부터 macroculture 및 microculture에서 공히 만족할 만한 수준의 염색체 분리가 가능하였다. 배양 조건상 여러 배양액 간에는 세포분열 양상에 큰 차이를 보이지 않았으나, serum의 첨가량과 mitogen의 첨가 여부는 중기상의 수확에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 최적의 배양조건은 37°C 에서 3일간의 배양이 바람직한 것으로 나타났다. 또한 중기상 유도를 위한 방추사 억제물질인 colcemid의 첨가 농도와 재배양 시간은 염색체의 양상에 매우 큰 영향을 미치며, harvest처리에서는 저장액의 처리시간 및 처리온도, 고정액의 첨가방법 및 슬라이드 도말 후 건조 방법이 염색체의 형태적 양상에 매우 민감하게 반응하는 것으로 나타났다.

인용문헌

- Buckland RA, Evans HJ, Sumner AT: Identifying mouse chromosomes with the ASG technique. *Exp Cell Res* 1971, 69, 231-236.
- Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: Standard karyotype of the mouse, *Mus musculus*. *J of Heredity* 1972, 63, 69-72.
- Ford CE, Pollock DL, Gustavsson I: Proceeding of the first international conference for the standardization of banded karyotypes of domestic animals. *Hereditas* 1980, 92, 145-162.
- Hungerford DA: Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Tech* 1965, 40, 333-338.
- Hungerford DA, Donnelly AJ, Nowell PC,

- Beck S: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Amer J Hum Genet* 1959, 11, 215-236.
- ISCN: An International System for Human Cytogenetics Nomenclature; Birth defects. 1985, Vol.21. March of Dimes Birth Defects Foundation, New York.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960, 20, 613-616.
- Nowell PC: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 1960, 20, 462-466.
- Rooney DE, Czepulkowski BH: Human Cytogenetics; A practical approach. 1992, Vol. I. 2nd Edi. Oxford, IRL Press.
- Schnedl W: The karyotype of the mouse. *Chromosoma(Berl.)* 1971, 35, 111-116.
- Therman E: Human Chromosomes: Structure, Behavior, Effects. 1986, New York, Springer-Verlag.
- Verma RS, Babu A: Human Chromosomes; Manual of basic techniques. 1989, New York, Pergamon Press.
- 김기원, 손시환, 문점동: Holstein종의 염색체 분석. *진주산업대 농업기술연구소보* 1994, 7, 1-11.
- 김철욱, 손시환, 김형균, 오하식: 동원체지수 및 상대적길이에 의한 돼지의 품종별 핵형분석. *한국축산학회지* 1994, 36.
- 오봉국, 여정수, 손시환, 홍영호: 한우 염색체의 Constitutive Heterochromatin Banding 양상. *한국축산학회지* 1991, 33, 359-369.