

細胞內 染色體의 分散에 關한 研究

—赤血塩溶液의 光照射 處理에 依한 染色體의 分散—

金 宗 鎬

(慶北大學校 文理科大學 生物學科)

The Study on Scattering of Chromosomes in Cells

—Scattering of Chromosomes by Treatment with Potassium Ferricyanide Solution under Light—

Kim, Jong Ho

(Dept. of Biology, Kyungpook National University)

Abstract

In counting chromosome number and karyotype study, it is necessary to let chromosomes on metaphase by pretreatment before fixation. For this purpose, colchicine, or 8-oxyquinoline are generally used. The author found out that chromosomes could be scattered by illuminating cyanoferrate complex solution in which root-tips were sunk.

As materials, 8 sorts of plant such as *Allium fistulosum*, *Allium tuberosum* Rottler, *Triticum vulgare* were used. Their root-tips were sunk on the bottom of beaker in potassium ferricyanide solution $3 \times 10^{-4}M$ and illuminated through the solution by sterilizing lamp for 1~2 hours in dark room, keeping 10 cm distance from light source to the surface of solution and 2 cm depth of solution. Then again, they were illuminated to the light which was somewhat weaker intensity than the former (distance, 16 cm; depth, 3 cm) for 1.5~2 hours after immersed in 1/100N-HCl and washed in water for each 5 minutes. By such methods chromosomes could be scattered. About the mechanism of scattering, it is supposed that CN and $Fe(CN)_x$ ions ($x \leq 5$) which were gradually produced in the process of photodissociation acted together on the scattering of chromosomes.

緒 論

細胞內 染色體數의 算定, 核型調查를 하기 爲히서는 먼저 染色體를 細胞內에 分散시켜야만 한다. 이 目的 으로서 從來 colchicine과 8-oxyquinoline이 一般의으

로 使用되고 있으며 그 外에 paradichlorobenzene, α -bromonaphthalene, coumarin, cohloralhydrate 등 여러 化學藥品이 提示되어 있고 (西山, 1961; Darlington, 1962) 또 冷却法도 그 한 方法으로 되어있다 (西山, 1961; 橫田, 1963). Chaudhuri et al. (1962)

는 isopsoralene도 有效하여 根端을 1—2時間 이 飽和 溶液에 處理함으로써 이 目的을 達成할 수가 있으며 coumarin이나 paradichlorobenzene 으로서 좋은 結果를 얻지 못할 때에 이 溶液을 使用하면 좋다고 한다.

筆者(1969)는 根端을 赤血鹽溶液에 浸漬하여 室內 散光下에 두면 溶液의 光分解가 進行함에 따라서 細胞內 染色體가 分散되는 事實을 發見한 바 있었다.

그러나 自然光線은 隨時로 그 強度가 變하기 쉬워서 比較的 長時間 이것을 一定하게 存續시킨다는 것은 甚히 困難할 뿐만 아니라 雨天 또는 夜間에는 利用할 수가 없으므로 人工光線을 使用할 수 밖에 없다. Cyanoferrate complex인 赤血鹽($K_3Fe(CN)_6$), sodium nitroferricyanide ($Na_2Fe(CN)_5 \cdot NO \cdot 2H_2O$), 黃血鹽 ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)의 $1.5 \times 10^{-4}M$ 溶液에 根端을 沈漬하고 水銀燈(4W, 118V, 0.08A, 80 cycle) 또는 UV-lamp (mineral light lamp; 9W, 120V, 60 cycle) 로서 5cm 距離에서 照射한 바 水銀燈의 경우 前二者의 溶液을 3.1cm, 黃血鹽은 0.9cm로 하고 4時間 照射함으로써 染色體가 分散이 되었고 UV-lamp의 경우 前二者의 溶液의 液深은 4.5cm, 黃血鹽은 1.4cm로 하고 lamp에 裝置된 filter를 끼우지 않고 照射하였을 때는 4時間, filter를 끼웠을 때 즉 2537Å 波長 으로서 照射하였을 때는 6—7時間 으로서 分散하기에 이르렀다. 그러나 植物의 種類에 따라서 完全分散에 이르지 못하고 途中에서 挫折되거나 또는 收縮하고 全然 分散하지 못하는 것도 있다. 그러기에 더욱 確實한 方法을 알고서 光源으로서 殺菌燈을 利用하여 몇가지 材料에 對하여 實驗한 바 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材料로서 파(*Allium fistulosum*, $2n=16$), 부추(*Allium tuberosum*, $2n=32$), 양파(*Allium cepa*, $2n=16$), 마늘(*Allium scorodoprasum*, $2n=16$), 보리(*Hordeum vulgare*, $2n=14$), 호밀(*Cecale cereale*, $2n=14$), 밀(*Triticum vulgare*, $2n=42$), 완두(*Pisum sativum*, $2n=14$)의 8種類를 供試하였다. 發根시켜서 2cm程度로 伸長하였을 때에 赤血鹽 $3 \times 10^{-4}M$ 溶液에 根端을 沈漬하고 一定한 距離에서 一定時間 照射한 後 squash method에 依하여 aceto-carmin으로 染色 檢鏡하였다.

이 實驗에서 光源으로서는 殺菌燈 (100V, 60c/s, 0.3A, 20.5W)을 使用하였으며 光照射는 暗室속에 衛置한 40×75×35cm의 箱子 속에서 行하였다. 照射에 있어서는 材料를 beaker 底面에 중첩이 되지 않도록

一面으로 羅列 沈漬하고 다음과 같이 區分하여 照射하였다.

一次照射

光源과 液表面과의 距離: 10cm

液深: 2cm

照射時間: 材料에 따라서 1~2時間

鹼酸處理

一次照射後 1/100N-HCl에 材料를 5分間 浸漬하고 5分間 水洗(그냥 물에 浸漬)한 後 다음 照射을 續

二次照射

光源과 液表面과의 距離: 16cm

液深: 3cm

照射時間: 1時間 30分~2時間

一, 二次照射에 있어서 모두 1時間마다 溶液을 更新한.

結果 및 考察

이들 材料를 赤血鹽溶液에 浸漬하여 暗處에 數時間 두어도 無處理狀態와 같으며 染色體는 分散되지 않는다. 그러나 위와 같은 方法으로 處理하여 分散된 中期像을 多數 集積시킬 수가 있었다. 染色體의 모양도 colchicine 또는 8-oxyquinoline에 處理한 것과 同一하며 染色體가 一般의으로 골은 것이 特徵이다. Constriction은 chloralhydrate 處理法에 依한 것 보다는 顯著하지 않지만 勿論 識別이 된다.

處理上에 있어서 얻은 知見은 다음과 같다.

1. 處理溫度는 22—25°C가 好適하며 그 以下の 溫度에서는 分散에 이르기까지의 時間이 遲延되는 傾向이며 그 以上の 溫度에서는 分散像의 數가 減少되는 傾向이다.

2. 一次照射 條件下에서

① 液을 1時間마다 更新하여 照射할 경우에는 밀 보리 호밀 파는 5時間, 마늘은 6~7時間, 완두는 8時間에 이르러서 分散되며 所要時間이 너무 길다.

② 液을 更新하지 않고 繼續 照射한 경우에는 파는 約 3時間만에 分散이 되나 그 狀態가 不良하다. 他種類에 있어서는 기의 效果를 얻지 못하였다.

3. 一次照射後 鹼酸處理한 것을 다시 一次照射의 條件下에서 照射하면 1時間쯤 되어 分散을 完成하지 못하고 收縮 sticky로 되어버리는 까닭에 二次照射는 光의 強度를 低下시킬 必要가 있다.

- 4. 一次照射 所要時間은 材料에 따라서 差異가 있었으며 완두, 호밀, 보리, 밀은 1時間, 파, 부추, 양파, 마늘은 2時間이 適當하며 二次照射의 所要時間은 모든 種類에 걸쳐서 1時間 30分 乃至 2時間이다.
- 5. 一次와 二次照射사이 에 鹽酸處理를 하지 않을 때

- 면 파 以外의 種類는 完全分散에 이르지 못하였다.
- 6. 材料는 器底에 堆積이 되지 않도록 羅列해서 直接 光線을 받도록 하여야 된다.
- 7. 光線強度의 調節은 空間距離보다는 液深을 調節하는 것이 效果的이다.

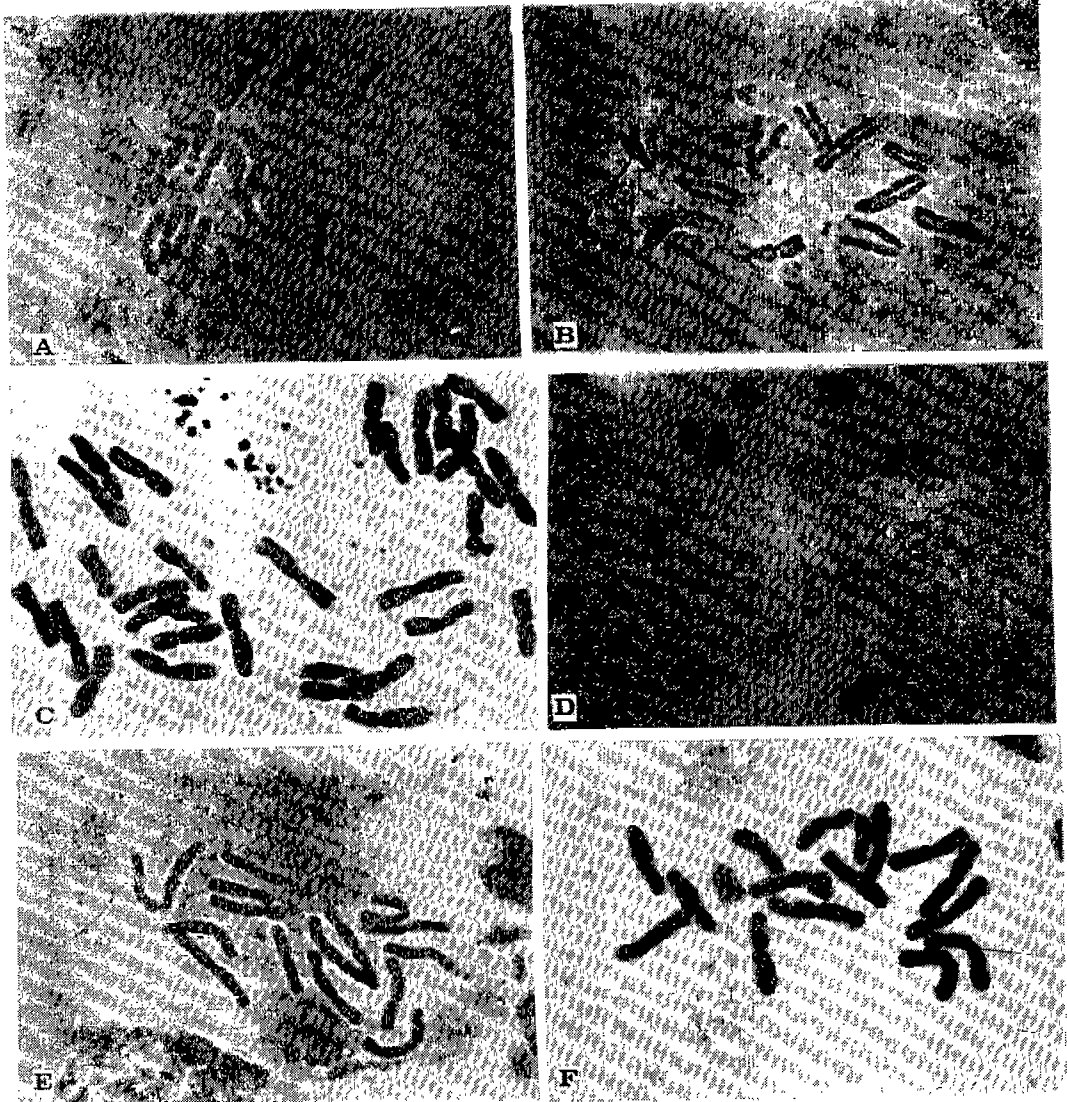


Plate 1-1. Microphotographs of chromosomes($\times 1000$).
 A and B; *Allium fistulosum*, C and D; *Allium tuberosum*,
 E; *Allium cepa*, F; *Allium scorodoprasum*.

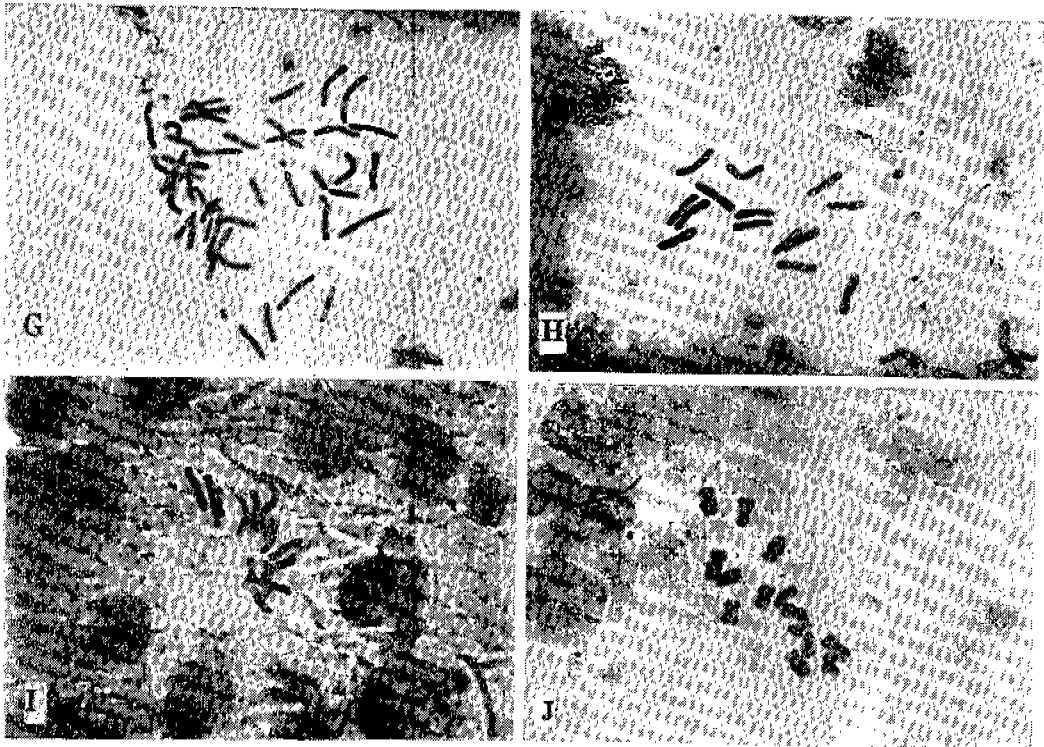


Plate 1-2. Microphotographs of chromosomes ($\times 1000$).

G; *Triticum vulgare*,

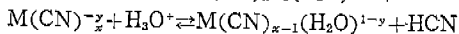
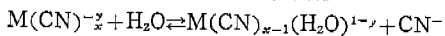
H; *Cecale cereale*,

I; *Hordeum vulgare*,

J; *Pisum sativum*.

自然光線으로서는 $1.5 \times 10^{-4}M$ 溶液에 浸漬하여 9000 lux 程度의 室内 散光下에 두니 禾本科 植物과 파는 3時間, *Allium* 屬植物은 4時間에 이르러 分散되었으나 완두는 染色體가 凝縮이 되고 效果가 없었다. 그러나 위의 散光에 2時間 後 鹽酸處理를 하고 液을 更新하여 다시 2時間 燻으로써 分散시킬 수가 있었다.

染色體 分散의 機構를 考察하건대 이것은 cyanoferrate complex 溶液의 光解離에 依하여 生成된 産物의 作用에 依하여 惹起된 現象이다. Alan et al. (1953)에 依하면 hexacyanoferrate(III)의 光解離는



으로 되고 生成된 free CN ion은 同時에 加水分解되어 因하여 pH가 上昇한다고 한다(M은 3價金屬). $25^\circ C$, 一次照射 狀態에서 pH의 變化를 測定한 바 當初 pH 6.8에서 照射 1時間後에는 7.2로 되고 그後 3時間 繼續 照射하여도 pH는 上昇하지 않았다. 이로 보아서 殺菌燈은 光分解能이 弱하다고 보겠다.

暗處에서 파의 根端을 赤血鹽 $3 \times 10^{-4}M$ 溶液에 30分 間 浸漬한 後 여기에 위의 液 100ml에 對하여 KCN 0.01M 溶液 1ml와 sodium nitroferrocyanide $3 \times 10^{-4}M$ 溶液 1ml를 加하고 다시 30分 經過後 sodium nitroferrocyanide 溶液 1ml를 添加하여 1時間後 觀察한 바 短小한 染色體를 가진 分散像이 散見되었다. 이것으로 보아 細胞內 染色體의 分散은 cyanoferrate complex 溶液의 光分解에 依하여 생긴 CN ion과 同時에 생겨나는 $Fe(CN)_x$ ion ($x \leq 5$)의 作用에 依한 것으로서 CN ion은 細胞의 粘度를 低下시키고 $Fe(CN)_x$ ion의 浸入을 誘導하는 것 같으며 또 CN ion은 染色體를 縮小시키고자 하고 $Fe(CN)_x$ ion은 이것을 伸長시키고 저하는 相互作用에 依한 것으로 생각되는데 光線下에서 이러한 作用이 溶液의 緩慢한 分解에 따라서 徐徐히 進行되는 까닭이라고 생각된다. 또 分解過程에서 $Fe(CN)_x$ ion의 x가 5, 4, 3... 등으로 繼續적으로 變遷하여야만 完全한 成果를 얻으리라고 생각되는 바이다.

Kihlman(1956)은 蠶豆(*Vicia fava*)를 材料로 하여 染色體의 fragment, chromosome bridge, isolocus break, exchange 등의 染色體異常의 生成에 對한 KCN의 效果에 關해서 研究하고 CN이 染色體에 存在하는 鐵 또는 다른 重金屬과 結合하여 錯鹽을 形成하는 場合에 異常이 生길 것이라고 하였다. 이러한 染色體異常의 問題와 아울러 생각할 때 $Fe(CN)_x$ 가 分散에 對한 生役割을 하는 것으로 생각된다. 照射中間에 HCl處理를 하면 細胞가 爛아지며 또 染色體가 sticky로 되지 않는다.

摘 要

1. 파, 부추, 민들 8種類를 材料로 하여 根端을 赤血鹽 $3 \times 10^{-4}M$ 溶液에 浸漬이 되지 않도록 器底에 沈漬하고 光源에서 溶液表面까지의 距離를 10cm, 液深 2cm로 하여 1~2時間 照射한 後 0.01N-HCl에 5分間 浸漬, 同時間 水洗(물에 浸漬)한 다음 距離 16cm, 液深 3cm로 하여 1時間 30分~2時間 照射하여 染色體 分散像을 많이 集積할 수가 있었다. 光照射는 外光을 막기 爲하여 暗室에서 行하였으며 處理하는 동안 溶液은 1時間마다 更新하였다.

이 方法에 의하여 染色體를 分散시킬 수가 있으며 colchicine, 8-oxyquinoline處理에 代用할 수가 있다.

2. 染色體의 모양은 colchicine, 8-oxyquinoline 處理를 한 것과 같으며 染色體가 直線狀으로 되는 特徵이 있다.

3. 細胞內 染色體가 分散되는 機構는 cyanoferrate complex溶液의 光分解에 依하여 纖維的으로 서서히 生成되는 CN ion과 $Fe(CN)_x$ ion ($x \leq 5$)의 共同作用에 依한 것으로 解釋된다.

參 考 文 獻

- Mac Diarmid, A.G., and N. F. Hall 1954. Illumination-pH effects in solution complex cyanides. *Jour. Am. Chem. Soc.* 75:5204-5207.
- Kihlman, B.A. 1957. Experimental induced chromosome aberrations by cyanide and other heavy metal complexing agents. *Biochy. Biochem. Cytol.* 3: 363-380.
- Darlington, C.D., and L.F. La Cour 1962. The handling of chromosome, 4th ed., pp. 88-89.
- Chaudhuri, M., D.P. Chakraborty, and A. K. Sharma 1962. Isopsoralene and its use in karyotype analysis. *Biological Abstracts*, 39: No.2, 339.
- Kim, Jong Ho 1969. The studies on scattering of chromosomes in cell (I). Treatment with cyanoferrate complex solution under light. 楊驥錫博士頌詞紀念論文集 pp. 49-56.
- 西山市三 1961. 細胞遺傳學實驗法 pp. 28-30.
- 横田 清 1963. 低溫處理による 蠶豆의 染色體. 遺傳, 17: 62-63.
- (1974. 8. 12 접수)