

닭 染色體의 分離 分析 方法에 관한 研究

孫始煥 · 吳鳳國
서울大學校 畜産學科
(1987. 9. 29 接受)

Methodology of Chromosome Preparation and Banding Analysis in *Gallus domesticus*

S. H. Sohn and B. K. Ohh

Department of Animal Science, Seoul National University

(Received September. 29, 1987)

SUMMARY

The purpose of this paper to present morphological normal chick chromosomes and develop avian cytogenetic techniques including chromosome preparation and banding technique.

The early chick embryos provide a consistent source of material with high mitotic cells. Although chick embryo tissue gives excellent preparations, the 4-5 days embryo is somewhat inconvenient materials.

Most important for avian chromosome analysis are the technical protocols to achieve adequate preservation, spreading, and staining of the full chromosome complement. To precise chromosome analysis, pro-metaphase states are required.

Best results of banding will be obtained from air dried slides prepared from early chick embryos that have been aged at least 1 week. Good G-banding differentiation is achieved by adequate trypsin digestion followed by staining in Giemsa dye. The results of C-banding is influenced by many factors including the conditions of Ba(OH)₂, HCl treatment, and state of rinsing.

In addition to precisely interpret banding patterns, the densitometric analysis is recommended.

I. 緒 論

지금까지의 家畜 및 家禽의 改良은 기존 統計育種學의 方法에 힘입은 바 크지만 最近 이들의 改良은 遺傳物質의 本體인 染色體와 遺傳子를 利用하여 遺傳物質의 實體를 직접 다루고자 시도되고 있다.

특히 染色體가 遺傳物質의 總合體이자 運搬體라는 것이 發見된 이래 이에 대한 지대한 關心과 研究가 집중되어 왔다. 染色體의 研究는 사람을 포함한 여러 生物種들에서 1970年代 이후 急速한 發展을 보여 왔으나 鳥類에 대한 研究들은 다른 種에 비해 매우 遲滯된 상황이다. 이 같은 原因은 染色體의 分離와 特性을 精明하기 위한 적합한 分析技術의 研究不足과 아울러 이들 染色體들 대부분이 小型 染色體

(microchromosome) 들로 構成되어 있어서 分析에 곤란함이 많기 때문이다 (Bloom, 1981). 최근 染色體內 DNA 構成이나 이들의 化學的 組成에 따라 나타나는 여러 banding 方法이 開發되면서 보다 다양한 研究와 部分的으로 이들의 特性이 究明되고 있기는 하지만 (Pardue와 Gall, 1970; Arrighi와 Hsu, 1971; Stefos와 Arrighi, 1971; Wang과 Federoff, 1972; Wang과 Shoffner, 1974) 아직까지 染色體 分析을 위한 완벽한 技術體系의 定立이 未洽한 상태이고, 染色體內 化學的 組成에 따른 遺傳物質의 變化와 遺傳因子에 관련시킨 染色體의 構造的 解析이 不足하다. 더우기 實質的인 育種의 手段으로서 染色體 分析에 의한 적용은 매우 未洽하고 初步的 段階이다.

따라서 本 研究에서는 家禽에 있어 細胞遺傳學的

방법을 이용하여 닭 染色體의 보다 명확한 分離方法을 提示하고, DNA의 構成이나 化學的 組成에 의해 나타나는 G, C-banding에 의한 分染分析方法을 再考하여 닭 染色體의 形態的 構造 樣相을 提示하고자 한다.

II. 材料 및 方法

本 研究에서는 單冠白色레그혼種 및 白色코니쉬種 純系를 供試하고 이들 受精卵의 初期胚兒를 利用하여 染色體 分析을 하였다.

1. 染色體의 分離分析 方法

初期胚兒를 이용한 染色體의 分離分析은 Shoffner (1982)가 提示한 方法을 다소 變形시켜 다음과 같이 實施하였다.

1) 受精卵의 培養: 受精卵을 37.5°C의 恒溫器에 18~24時間 培養한 다음 氣孔을 통하여 0.05% colchicine 0.1~0.3 cc 주입 시킨 후 다시 1~3時間 더 培養시키므로써 有統分裂의 中期 像을 誘導하였다. 이와같이 培養된 受精卵은 卵殼을 깨뜨려 卵黃중에 浮遊된 胚 (embryo) 만을 떼어 낸다.

2) 前處理: 細胞의 膨脹과 퍼짐을 誘導하기 위하여 떼어낸 胚를 0.45% sodium citrate 溶液에 15~20分間 低張 處理시켰다.

3) 固定 및 標本製作: 低張處理를 시킨 胚兒를 methanol 과 acetic acid를 3:1로 혼합한 固定液에 옮긴 후 최소 30분이상 冷藏定置시킨 다음 遠心分離 (1,000 rpm) 하여 浮遊液을 버리고 다시 신선한 固定液을 交換시켜 aspiration pipette 을 이용하여 고루 섞어주었다. 固定液에 처리된 試料는 냉장보관된 깨끗한 slide에 3~4 방울 떨어뜨려 塗抹시킨 후 自然乾燥시켰으며 완전히 乾燥된 slide를 2% Giemsa 溶液에 7~8분간 染色하고 이것을 光學顯微鏡하에서 低倍率 ($\times 100$) 로 부터 高倍率 ($\times 1,600$) 로 관찰하였다.

2. G-banding 方法

最小 1주일간 自然乾燥시켜 準備된 染色體 試料 標本을 이용하여 다음과 같이 實施하였다.

1) Ca⁺⁺와 Mg⁺⁺을 제거시킨 HBSS 溶液 (Hank's balanced salt solution)에 0.075% trypsin (Diffco, 1:250)을 溶解시켜 여기에 塗

抹 乾燥시킨 slide를 담구어 室溫에서 30초~2분간 放置하였다. 이때 HBSS 溶液은 pH 7.0 으로 調定한다.

2) trypsin 處理한 slide는 0.9% saline 溶液에 2~3회 水洗시킨다.

3) 水洗된 slide는 곧 바로 2% Giemsa 溶液에 6~7분간 染色하고, 현미경하에서 檢鏡하여 만약 染色이 불충분할 경우 saline으로 다시 행구고 필요한 시간 만큼 재차 染色한다.

3. C-banding 方法

C-banding을 위해서도 최소 1주일간 自然乾燥시켜 처리된 slide를 이용하여 다음과 같이 실시하였다.

1) 塗抹 乾燥시킨 slide를 室溫에서 0.2N HCl에 1시간 동안 浸漬시킨 후 증류수로 水洗한다.

2) 水洗된 slide를 41°C의 5% Ba(OH)₂에 2~3분간 浸漬한 후 흐르는 물로 水洗한 다음 0.05N HCl에 15~30초간 흔들어 완전히 Ba(OH)₂ 제거시키고 다시 2회정도 水洗한다.

3) Ba(OH)₂가 완전히 제거된 slide를 2×SSCC 0.3M NaCl+0.03M sodium citrate) 溶液에 60°C로 1시간 정도 定置시킨 후 증류수로 水洗한다.

4) 4% Giemsa 溶液에 20~30분간 染色하여 水洗한 다음 현미경 하에서 관찰한다.

4. 核型分析

처리된 slide는 광학현미경 하에서 관찰하고 잘 퍼진 中期 像을 포착하여 低感度필름 (ASA 25, Microfilm, Fuji) 으로서 寫眞 撮影한 다음 이들 사진 으로서 개개 染色體의 核型을 分析한다.

1) 現像: 撮影된 film을 D₁₉ 現像組成液에 약 6분간 現像시킨 다음 靜止液을 처리한 후 定着시킨다.

2) 印畫: 寫眞 擴大機를 이용하여 8"×10" 정도의 無光澤紙 (RC 700, 現代)에 擴大 印畫시키고 D₇₂ 印畫用 現像液에 像의 表現이 뚜렷해질 때까지 처리한 다음 定着시킨다.

3) 核型羅列: 擴大한 사진을 통하여 개개 相同 染色體를 크기 및 動原體의 位置에 따라 識別하고 이들을 오려 順序대로 나열한다.

4) 再撮影: 순서대로 核型分析된 기록들을 複寫 필름 (copy film)을 이용하여 再 撮影한다.

5. Densitometer 에 의한 分析

G - 및 C - banding의 보다 정확한 解析을 위하여 Photographic-Densitometer를 이용하여 band의 具體的 樣相을 分析하였다.

1) densitometric 分析을 위해서는 가능한 한 길고 끈게 나타난 染色體의 中期 像을 택한다.

2) 分析에 이용하려는 寫眞은 얇은 無光澤紙(RC 3,000, Appolo)를 사용하여 擴大 印畫하고, 개개 染色體들을 核型羅列한다.

3) 照射필터는 contrast가 강한 것으로 하고 scanning의 길이와 폭을 決定한다.

4) scanning함에 따라 나타나는 graph의 屈曲部를 寫眞像에 나타난 band樣相과 比較 分析하여 band의 濃淡 및 크기에 대해 考察한다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 染色體의 分離技術

染色體의 標本은 보통 成長中이거나 有絲分裂이 完結한 組織으로부터 직접 試料採取하여 얻거나, 生體組織 또는 血液을 培養시켜 얻는다.

직접 試料採取되는 組織들로는 胚兒組織 (Ohno, 1961; Owen, 1965; Bloom과 Buss, 1966; Shoffner 등, 1967; Bloom, 1972; 1974; Sasaki, 1981), 깃털털프 (Sandnes, 1954; Krishan 등, 1966; Bloom 등, 1969)가 널리 이용되며 그 밖에도 骨髓組織, 粘液囊 및 胸腺組織 (Bloom, 1970)을 들 수 있다. 培養細胞로부터 染色體의 分離도 많이 이루어지고 있는데 血液 중의 白血球 (Newcomer, 1963; Donnelly와 Newcomer, 1963; Shoffner 등, 1967; Zartman, 1973)와 여러 組織들의 纖維芽細胞 (Rothfels 등, 1963; Krishan 등, 1965; Shoffner 등, 1967)를 培養 이용한다.

本 試驗에서는 初期 胚兒를 이용하여 染色體를 分離한 바 보다 명확한 有絲分裂 中期 像을 얻을 수 있었으며 특히 受精卵를 18~24時間 및 4~5日間 培養시켜 이들의 胚兒를 分離하였을 때 初期 胚兒 (18~24時間)는 胚兒 全體를 그대로 이용하므로 處理가 보다 간편하고 時間을 短縮시킬 수 있었다. 반면 4~5일째의 胚兒에서는 이미 많은 器官들이 형성되었으므로 이들 중 尿管 (allantoic

sac)만을 떼어 處理해야 하는 번거로움과 處理에 보다 많은 時間이 소요되는 불편함이 있었으며 또한 初期 胚兒時의 染色體 異常에 대한 관찰이 不可能하게 된다.

家禽에 있어 染色體 分離技術中 가장 중요한 것으로는 적합한 試料의 採取, 적당히 퍼진 染色體 像의 誘導, 染色의 處理過程 등이 지적되고 있다 (Bloom, 1981). 따라서 本 研究에서도 染色體 分離에 영향을 여러 要因들을 考察한 바 培養溫度는 37.5°C로 持續的 維持가 바람직 하였으며 39°C 이상이 되었을 때는 細胞들의 급격한 異常과 分裂의 中止가 나타나므로 培養時 最高溫度에 특히 留意하여야 한다.

紡錘絲의 形成을 抑制시키기 위하여 colchicine을 사용하므로써 有絲分裂의 中期狀態를 維持하게 한다. colchicine의 注入量과 注入後 再培養 時間의 길이가 染色體의 形態에 크게 관여하는 것으로 나타났으므로 過度한 注入量과 培養時間은 染色體의 凝縮과 形態的 缺陷을 나타내게 된다.

Hypotonic 處理는 細胞의 膨脹과 퍼짐을 誘導하기 때문에 이의 使用試藥, 濃度 및 處理時間이 매우 크게 영향을 주는 것으로 나타났다. 本 試驗의 結果 이의 處理液으로는 0.45% sodium citrate가 적절한 像을 誘導하고, 處理時間은 處理溫度에 따라 매우 多樣한 樣相을 나타내었다. 室內 溫度가 높은 여름철에는 處理時間을 15分 以下로 短縮시키는 바람직한 結果를 보이고, 겨울철과 같은 낮은 室溫狀態에는 20~25分 정도 다소 길게함이 좋은 것으로 나타났다.

試料를 固定시켜 slide에 塗抹하는 方法으로 squashing preparation과 air-dried preparation이 알려진 바 本 試驗에서는 이들 두가지 方法을 比較 考察하여 初期 胚兒와 같은 材料를 이용하여 染色體의 分離時 air-dried preparation이 훨씬 더 잘 퍼지고 良好한 中期 像을 나타내는 結果를 보였다.

塗抹 處理된 slide는 室溫에서 完全 乾燥시킨 후 2% Giemsa 溶液으로 染色하는데 이때 stock solution은 冷蔵 保管함이 바람직 하며, 한번 使用한 Giemsa 溶液은 再使用하지 않는 것이 좋다.

處理가 끝난 slide는 光學顯微鏡에서 일단 低倍率로서 관찰하고 잘 퍼지고 명확한 中期 像에 대해 高倍率로 撮影한다. 보통 1 slide당 20개 이상의 中期 像이 나타나나 각 細胞들의 分裂狀態가 모두 일정하지 않기 때문에 이들중 初期中期(early

metaphase) 狀態의 像을 捕捉하여 分析에 이용함이 바람직하다. Fig.1에서는 同一한 slide 내 나타난 有絲分裂 中期 像으로서 初期中期 狀態(a)와 다소 늦은 中期 狀態(b)를 比較 提示한 것이다.

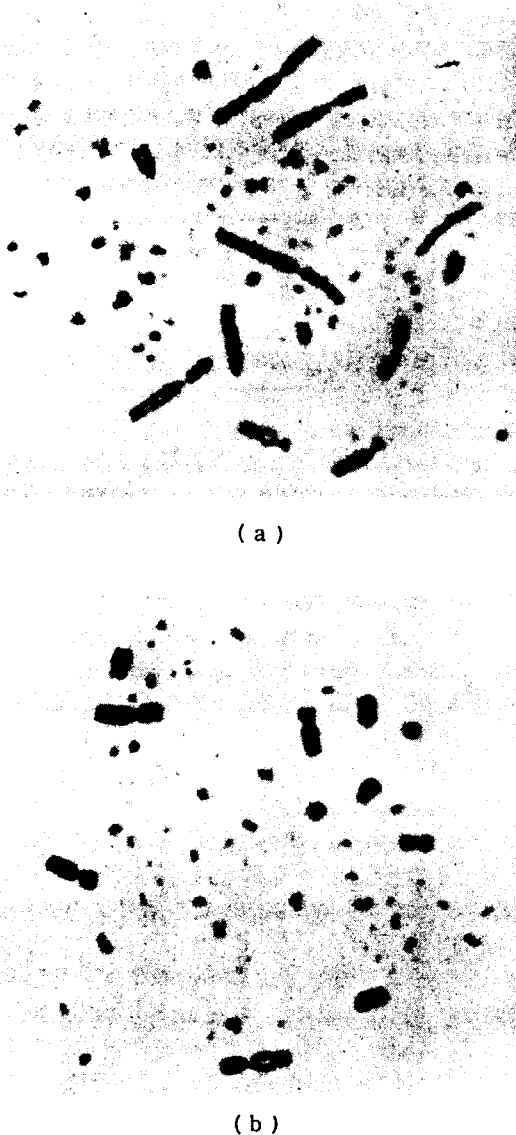


Fig.1. Early-metaphase(a) and late-metaphase (b) chromosome spread in the female chick cells

有絲分裂의 中期狀態가 진행됨에 따라 染色體가 凝縮되고 이같은 樣相에 따라 相同染色體 및 小型

染色體들에 대한 識別이 어렵게 되어 특히 banding 分析 等を 위해서는 初期中期나 後期前期 (late prophase) 狀態의 染色體들을 捕捉함이 필요하다.

2. 染色體의 分染分析 技術

G, C-banding 處理를 위해서는 充分하고도 완전히 乾燥된 air-dried slide 가 바람직하다. 本試驗 結果 乾燥時間이 최소 5~6日 경과된 slide 에서 이의 樣相이 良好하였고, slide box에서 20~30日 까지 保存하여도 거의 같은 樣相을 나타내었으나 2~3日 乾燥된 slide 에서는 거의 band가 없는 樣相을 보였다. 따라서 乾燥 保管時間에 따라 banding 發現樣相이 달라져 乾燥狀態가 banding 處理에 따른 化學的 活性度에 영향을 미치는 것 같다. 또한 banding 處理에 이용하기 위한 slide는 가능한 한 새것으로 흠이 없는 것을 사용하여 air-dried preparation 을 하여 desiccator 내에서 乾燥시킴이 바람직하다.

1) G-banding의 處理技術

G-banding 處理時 trypsin의 力價가 製品에 따라 매우 다름을 나타내었는데 本試驗에서는 Diffco (1:250) 製品으로서의 處理가 좋은 結果를 보였다. 또한 G-banding은 trypsin의 濃度라던가, trypsin 溶液의 處理時間, 處理溫度 및 試料標本에 따라 많은 影響을 받는 것으로 나타났다. 따라서 trypsin 處理時 한 slide를 먼저 처리해보고 나머지 slide를 필요한 시간만큼 測定하여 처리함이 바람직하다.

trypsin 處理 後 곧바로 saline에 행균으로서 이의 作用을 停止시키고 Giemsa 溶液에 染色시키는 때 이때 染色溶液을 위한 buffer의 pH도 중요하게 作用하는 것으로 생각된다. 染色 後 반드시 tap water 로서 어떠한 salt crystal 도 남김없이 철저히 水洗하여야만 관찰시 crystal의 汚染이 없어진다.

2) C-banding의 處理技術

C-banding 處理는 우선적으로 air-dried slide 를 HCl에 얼마간 定着시킨 후 處理하였는데 이는 Stefos와 Arrighi (1971)가 제시한 鳥類의 染色體에 있어 C-banding 處理에 HCl 과정을 생략한 方法과 다소 다른 것으로 本實驗結果 HCl의 處理는 동일한 slide에 있어 細胞들의 一定性과 均一性을 다소 改善시키는 傾向을 보였다.

C-banding 樣相에 있어서는 Ba(OH)₂의 處理時間, 濃度, 處理溫度가 가장 큰 影響을 미치는 것으로 나타났는 바 다소 짧은 時間의 처리가 良好한 C-

band 樣相을 보이고 긴 時間의 처리는 많은 染色體의 形態의 變形을 나타내었다. 또한 $Ba(OH)_2$ 의 처리 후 tap water 로서의 완전한 水洗가 반드시 요구되어지는데 이는 처리를 마친 slide 상에 $Ba(OH)_2$ 의 汚物이 자주 묻어나오기 때문이다. 따라서 $Ba(OH)_2$ 處理後 tap water로 水洗한 다음 다시 HCl에 짧은 시간동안 흔들며 줌으로써 $Ba(OH)_2$ 를 완전히 除去할 수 있었다.

2×SSC 溶液에서의 處理時間은 1시간 정도 처리함이 바람직하나 이 이상이 되어도 banding 樣相에 별다른 차이가 없는 것으로 나타났다.

3. 染色體의 分析

染色體의 보다 明確한 分析을 위해서는 既已 處理된 染色體들의 精巧한 寫眞 像이 요구된다. 顯微鏡 寫眞과 같이 뛰어난 解像力 (resolving power)이 요구되는 撮影에는 低感度の 필름을 사용하는 것이 보다 좋은 結果를 얻을 수 있었다.

核型分析을 위한 寫眞 處理過程은 現像, 印畫, 擴大, 再編輯, 再撮影으로 나눌 수 있다. 現像組成液의 處方은 보다 硬調로 하기 위하여 D-19와 같은 硬調現像液을 사용하는 것이 바람직하고, 印畫時 印畫用 現像液으로서 D-72의 使用으로 좋은 像을 얻을 수 있었다. 이때 사용되는 印畫紙로서는 가능한 無光澤紙를 이용함이 核型分析하여 再撮影하는데 도움이 된다.

核型分析을 위해 撮影된 染色體 像은 8"×10" 정도 크기로 擴大 印畫하고 여기에서 染色體들의 動原體의 위치와 크기로서 各 相同染色體들을 구별하여 도려내어 순서대로 나열 核型分析한다. Fig. 2는 Fig. 1(a)의 像을 核型分析한 것으로 닭에 있어서는 약 10쌍의 大型染色體와 28쌍의 小型染色體로 構成됨을 알 수 있다. 그리고 5번째 크기로서 metacentric인 染色體가 Z性染色體이며 7-8번째 크기로 역시 metacentric인 染色體가 W性染色體로서 쉽게 다른 常染色體와 구별된다. 本 核型分析에서 大型染色體는 動原體의 위치나 크기에 따라 明確히 구분 지을 수 있지만 몇 개를 제외한 대부분의 小型染色體는 相對的 크기로 밖에 나열할 수 없었다.

G-banding은 分離된 染色體에 trypsin이나 urea 또는 protease를 처리한 후 Giemsa 染色을 하므로써 生成되는 banding 樣相으로 染色體를 構成하는 DNA와 histone 및 non-histone protein이

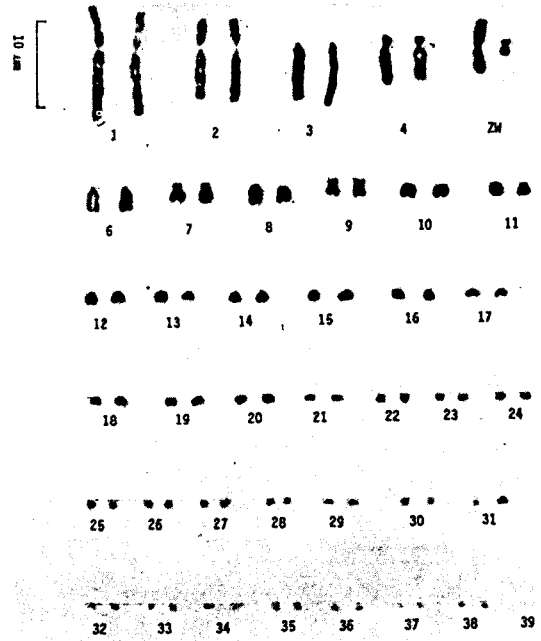


Fig. 2. Karyotype of the female chick cell (Fig. 1(a))

G-banding 過程에 따라 이들간의 細胞化學的 相互作用에 의해 나타나는 結果라고 提示되고 있으나 아직 이에 대한 化學的 作用 機構를 明確히 밝히지 못하고 있는 實情이다(Coming 등, 1973; Hsu, 1973; Burkholder와 Weaver, 1977; Comings, 1978).

Fig. 3에서는 닭 染色體의 G-banding 像과 이들의 核型分析으로서 大型染色體에서는 보다 뚜렷하고 明確한 banding 樣相을 나타내고 있다.

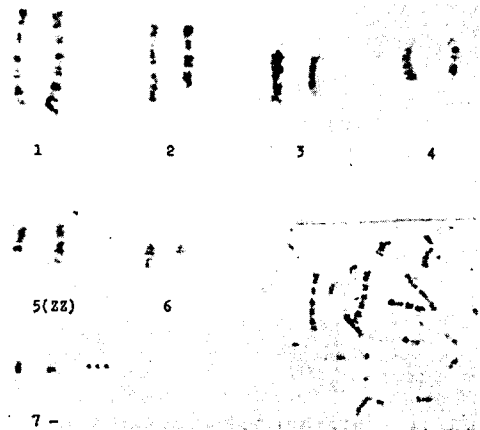


Fig. 3. G-banded chromosomes spread and karyotype of *Gallus domesticus*

이와같은 banding의 처리는 各 相同染色體 間에 뚜렷하고 일정한 band樣相을 나타내게 되므로 各 染色體의 식별을 보다 용이하게 하고, 아울러 p-arm과 q-arm의 구분도 명확하게 할 수 있다.

또한 G-band의 樣相을 보다 정확하게 分析하기 위하여 photographic densitometer를 이용하므로서 band樣相을 具體化 시킬 수 있다. 즉 graph의 屈曲의 頻度에 따라 band數를 決定하고, 彎曲의 높이에 따라 band의 濃淡을 알 수 있다. Fig. 4에서는 G-banding樣相을 densitometric 分析을 통하여 圖式化한 것이다.

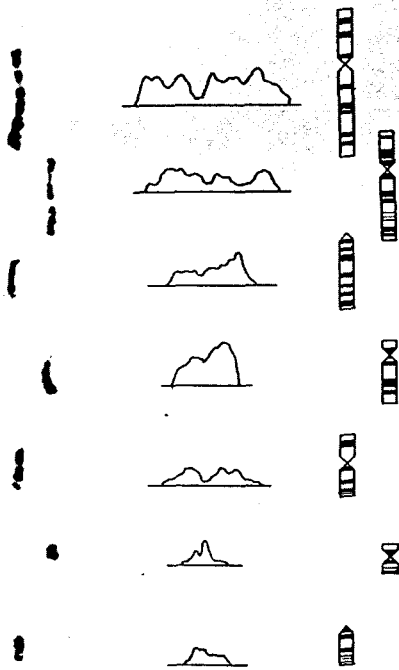


Fig. 4. G-banded chromosomes and idiogram according to densitometric analysis in *Gallus domesticus*

C-banding은 in situ hybridisation 技術(Pardue와 Gall, 1970)을 다소 變形시켜 constitutive heterochromatin을 選擇的으로 染色하는 方法으로서 Arrighi와 Hsu(1971)가 사람의 染色體에 있어 처음으로 이의 樣相을 提示하였다. 닭에 있어 heterochromatin의 C-band 樣相은 Stefos와 Arrighi(1971)가 提示한 바 W染色體와 많은 小型染色體의 動原體 部位에 나타남을 示唆한 바 있다. C-banding의 化學的 作用 機構는 初期

에는 染色體내 DNA의 全體的인 denaturation에 이어 C-bands내 함유된 highly repetitive DNA의 選擇적인 annealing에 의해 banding이 生成된다는 理論을 提示하였으나 (Arrighi와 Hsu, 1971; Gagnè 等, 1971; Schnedl, 1971; Yunis 等, 1971), 最近 C-bands는 non-C bands 部位가 DNA를 損失하므로서 나타나는 樣相이라고 解析하는 바 이는 C-banding을 위한 여러 化學的 處理(acid, alkali, hot salt)가 DNA를 여러 부위에서 조각내고 抽出시킨다는 것이다 (Comings 等, 1973; McKay, 1973; Pathak과 Arrighi, 1973; Burkholder, 1975; Holmquist, 1979; Burkholder와 Duczek, 1982; Jack 等, 1985).

Fig. 5에서는 닭 染色體의 C-banding 樣相을 提示한 것으로 大型染色體의 特定部位와 n型染色體의 動原體 部位에 주로 이의 樣相을 보이고 있다. 특히 各 品種의 Z性染色體의 末端部에서 짙은 C-band를 나타내고, W染色體 全體에도 짙은 C-bands를 나타낸다. 또한 대부분의 大型染色體들에서도 末端部와 動原體 部位에 C-band 樣相을 보이기는 하나 一定 樣相이 아닌 多型的 樣相을 나타내고 있다. Fig. 6에서는 C-band 樣相의 多型的 出現 樣相을 고려하여 닭 染色體의 heterochromatin 部位를 圖式化한 것이다.

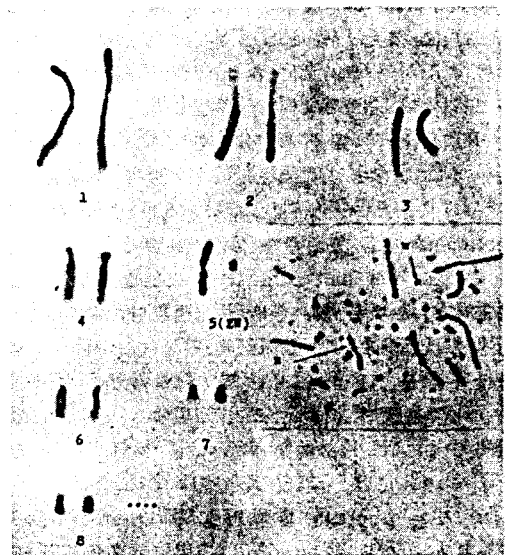


Fig. 5. C-banded chromosomes spread and Karyotype of *Gallus domesticus*

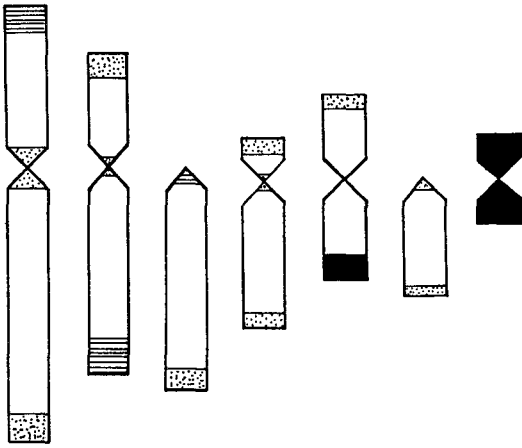


Fig.6. An idiogram of C-banded chromosomes in *Gallus domesticus*. ▤ is C-bands bearing frequency at below 50 %, ▨ is at above 50 % and ▩ is at 100 %.

IV. 摘 要

本 研究에서는 家禽에 있어 細胞遺傳學의 方法을 이용하여 닭 染色體의 分離方法과 G, C-banding에 의한 分染分析 方法을 再考하여 보다 명확한 染色體의 形態의 樣相을 提示하였다.

染色體의 分離는 成長중인 初期胚兒를 이용하므로

서 有絲分裂 中期像을 쉽게 포착할 수 있었으며, 成長 4 - 5일째의 胚兒組織으로 부터 染色體의 分離는 다소 불편함이 많았다.

家禽에 있어 染色體 分離技術중 가장 중요한 것으로는 적합한 sample의 채취와 적절한 中期像의 誘導, hypotonic 處理에 따른 뚜렷한 形態의 誘導, 塗抹方法 및 染色의 處理過程이다. 또한 보다 명확한 染色體의 分析을 위하여서는 中期 分裂像중 初期 中期 상태의 像을 포착함이 바람직하다.

G, C-banding 處理를 위해서는 공히 충분하고도 완전히 건조된 air-dried preparation된 sample을 이용하여야 바람직한 結果를 얻을 수 있으며, slide의 保存時間에 따라 band樣相에 많은 차이를 나타낸다.

G-banding 樣相에 크게 영향하는 要因으로서는 trypsin의 濃度, 處理時間, 處理溫度가 주된 作用을 하고, Giemsa solution에 사용하는 buffer의 pH도 크게 작용하는 것으로 나타났다.

C-banding에 있어서는 $Ba(OH)_2$ 의 濃度, 處理時間, 處理溫度가 큰 영향을 미친 바 다소 짧은 時間의 處理가 바람직한 樣相을 보이고, 處理前 HCl 處理로서 細胞들의 均一性을 加하고, 處理後 철저한 水洗가 좋은 結果를 나타내었다.

Band 樣相의 보다 精確한 解析을 위해서는 densitometer를 이용하므로써 具體的 樣相을 分析할 수 있었다.

V. 引用文獻

1. Arrighi, F. E. and T. C. Hsu. 1971. Localization of the heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10 : 81-86.
2. Bloom, S. E. 1970. Haploid development in chicken embryos. *Poul. Sci.* 49 : 1369.
3. Bloom, S. E. 1972. Chromosome abnormalities in chicken (*Gallus Domesticus*) embryos ; types, frequencies, and phenotypic effects. *Chromosoma* 37 : 309-326.
4. Bloom, S. E. 1974. The origins and phenotypic effects of chromosome abnormalities in avian embryos. *Proc. XV World's Poultry Congr.* 316-320.
5. Bloom, S. E. 1981. Detection of normal and aberrant chromosomes in chicken embryos and in tumor cells. *Poul. Sci.* 60 : 1355-1361.
6. Bloom, S. E. and E. G. Buss. 1967. A cytological study of mitotic chromosomes in chicken embryos. *Poul. Sci.* 46 : 518-522.
7. Bloom, S. E., R. N. Shoffner and E. G. Buss. 1969. A rapid cytological method for identifying polyploid birds. *Poul. Sci.* 48 : 1116-1117.
8. Burkholder, G. D. 1975. The ultrastructure of G- and C-banded chromosomes. *Exptl. Cell Res.* 90 : 269-278.
9. Burkholder, G. D. and L. L. Duczek. 1982. The effect of chromosome banding techniques on the proteins

- of isolated chromosomes. *Chromosoma* 87 : 425-435.
10. Burkholder, G. D. and M. G. Weaver. 1977. DNA-protein interactions and chromosome banding. *Exptl. Cell Res.* 100 : 251-262.
 11. Coming, D. E. 1978. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12 : 25-46.
 12. Comings, D. E., E. Avelino, T. A. Okada and H. E. Wyandt. 1973. The mechanism of C- and G-banding of chromosomes. *Exptl. Cell Res.* 77 : 469-493.
 13. Donnelly, G. M. and E. H. Newcomer. 1963. Autoradiographic patterns in cultured leucocytes of the domestic fowl. *Exptl. Cell Res.* 30 : 363-368.
 14. Gagne, R., R. Tanguay and C. Laberge. 1971. Differential staining patterns of heterochromatin in man. *Nature New Biol.* 232 : 29-30.
 15. Holmquist, G. 1979. The mechanism of C-banding. Depurination and β -elimination. *Chromosoma* 72 : 203-224.
 16. Hsu, T. C. 1973. Longitudinal differentiation of chromosomes. *Ann. Rev. Genet.* Vol. 7 : 153-176.
 17. Jack, E. M., C. J. Harrison, T. D. Allen and R. Harris. 1985. The structural basis for C-banding. A scanning electron microscopy study. *Chromosoma* 91 : 363-368.
 18. Krishan, A. and R. N. Shoffner. 1966. Sex chromosomes in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), turkey (*Meleagris gallopavo*) and the chinese pheasant (*Dhasianus Colchicus*). *Cytogenetics* 5 : 53-63.
 19. McKay, R. D. G. 1973. The mechanism of G and C banding in mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma* 44 : 1-4.
 20. Newcomer, E. H. 1963. Leukocyte culture for chromosome studies in the domestic fowl. *Stain Tech.* 38 : 54-56.
 21. Ohno, S. 1961. Sex chromosomes and microchromosomes of *Gallus domesticus*. *Chromosoma* 11 : 484-498.
 22. Owen, J. T. 1965. Karyotype studies on *Gallus domesticus*. *Chromosoma* 16 : 601-608.
 23. Pardue, M. L. and J. G. Gall. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Sci.* 168 : 1356-1358.
 24. Pathak, S. and F. E. Arrighi. 1973. Loss of DNA following C-banding procedures. *Cytogenet. Cell Genet.* 12 : 414-422.
 25. Rothfels, K., M. Aspden and M. Mollison. 1963. The W chromosome of the budgerigar, *Melopsittacus undulatus*. *Chromosoma* 14 : 459-467.
 26. Sandnes, G. C. 1954. A new technique for the study of avian chromosome. *Sci.* 119 : 508-509.
 27. Sasaki, M. 1981. High resolution G-band karyotypes of the domestic fowl and the Japanese quail. *CIS* 31 : 26-28.
 28. Schnedl, W. 1971. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma* 34 : 204-210.
 29. Shoffner, R. N. 1982. Personal Communication.
 30. Shoffner, R. N., A. Krishan and G. J. Haiden. 1967. Avian chromosome methodology. *Poul. Sci.* 46 : 333-344.
 31. Stefos, K. and F. E. Arrighi. 1971. Heterochromatic nature of W chromosome in birds. *Exptl. Cell Res.* 68 : 228-231.
 32. Wang, H. C. and S. Fedoroff. 1972. Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* 235 : 52-53.
 33. Wang, N. and R. N. Shoffner. 1974. Trypsin G- and C-banding for interchange analysis and sex identification in the chicken. *Chromosoma* 47 : 61-69.
 34. Yunis, J. J., L. Roldan, W. G. Yasmineh and J. C. Lee. 1971. Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. *Nature* 231 : 532-533.
 35. Zartman, D. L. 1973. A microculture technique for chick leucocytes. *Cytogenet. and Cell Genet.* 12 : 136-142.
 36. 孫始煥, 1987. 닭에 있어서 G,C-banding 형태에 의한染色體標識因子에 관한研究. 서울대학교博士學位論文.