

## 조직배양에 의한 무지개송어 장기조직세포의 염색체 기본구조에 관한 연구

정영래 · 정영길 · 손진기\* · 김무강

충남대학교 수의과대학

한국해양연구소\*

(1995년 2월 3일 접수)

### Studies of the chromosome structure of tissue cultured different organisms from the rainbow trout

Yung-rae Jung, Young-gil Jeong, Jin-ki Son\*, Moo-kang Kim

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

Korea Ocean Research & Development Institute\*

(Received Feb 3, 1995)

**Abstract :** This study was examined chromosome structure of kidney, fin, blood cell, sexual organ that were differently examined chromosome of a good cell activity from organ, medium, staining methods, instruments with rainbow trout 100.

And so we obtained following conclusion.

1. The difference from each organ and medium is that a good cell activity of fin, kidney, sexual organ were obtained in TC-199 medium and a good cell activity in TC-199 medium+PHA(5%).
2. In the difference by staining methods, G-banding and C-banding were analyzed by electron microscope or cytoscan. Among them, heterochromatin of centromere analyzed by C-banding.
3. The zygotene and the leptotene were analyzed in this study.
4. Karyotype, heterochromatin and each stage of cell division were clearly analyzed by cytoscan.

**Key words :** chromosome, C-banding, tissue-culture, cytoscan, rainbow trout

### 서 론

세포 유전연구는 염색체내의 DNA 구성이나 화학적 조성에 따라 나타나는 분열법을 많이 이용하는데 이는 초기태아의 사망원인, 비정상적인 유전물질의 발현에

대한 규명 등을 할 수 있고 나아가 형질전환 동물의 산업화 연구에도 이용할 수 있다. 동물의 유전자 규명을 위한 본격적인 연구는 Ferguson-Smith<sup>12</sup>가 1964년도에 사람과 Hamster의 염색체 검사에서 Aceto-orcein 염색액을 처음 사용한 이래 Allen<sup>1</sup>과 Miyake<sup>31</sup> 그리고 Cas-

tro-Sirra<sup>6</sup>, Jagiello<sup>19</sup>와 McLaren<sup>29</sup>는 Brdu와 Fuchsin 등의 염색액을 사용하여 관찰한 바 있고, 그 이후 Fuchsin 염색액이 발암물질로 판정되면서<sup>46</sup> 그대신 cosin 염색액이 다시 등장하면서 활발해졌다.<sup>3,36</sup>

실험동물에서는 Evans<sup>10</sup>, McDermott<sup>28</sup>와 Meredith<sup>30</sup>는 Lactic-Acetic Orcein을 사용하였고 Laurie<sup>22</sup>와 Oud<sup>33</sup>는 lacto-propioni orcein을 사용하였지만 Schnedl<sup>44</sup>이 Giemsa 염색액을 사용한 수많은 반복실험에서 좋은 결과를 얻음에 따라 현재에는 Giemsa 염색이 주로 사용되고 있다.<sup>11,14,20,24,27,37,49,52</sup>

어류 염색체의 연구는 1973년에 Denton<sup>9</sup>이 처음으로 응용하기 시작한 이래 동종의 어류에서도 염색체의 수와 그 형태학적 차이를 규명하는 것이 진화론적인 연구를 하는데 필요할 뿐 아니라 개체군에서의 유전변이와 유전병을 식별하는데도 중요한 연구대상이 되었다. 이러한 연구는 생물학, 수의학 및 의학분야의 의학 유전이나 수의학 분야의 유전에서 개발되고 있는 감수 분열 분야의 연구로 확대되면서 동종의 유전형태와 잡종(hybrid)에서 유발되는 수많은 유전교환형태연구에 이용되고 있으며<sup>49</sup> 이러한 염색체 조작은 부존자원이 부족한 우리나라로서는 지식집약적 유전공학으로 이용되어 새로운 수의학 유전의 연구영역으로 자리잡을 수 있게 되었다. 사람염색체의 배양방법이 1953년 Hsu와 Pomerat<sup>17</sup>에 의해 시도된 이후 어류에서도 세포 배양에 의한 염색체 분석이 활발하게 되었으며 1960년부터는 Wolf et al<sup>51</sup>이 세포분열이 왕성한 동물의 배조직(embryonic tissue)은 물론이고 그의 아가미, 신장, 근육, 소장 및 비늘상피(scale epithelia) 등이 좋은 재료로 이용될 수 있다고 하였다<sup>44,51</sup>.

이에 본 연구에서는 무지개송어를 대상으로, 유전과 육종에 영향을 미칠수 있는 염색체의 실체를 광학 현미경 및 최신 전자영상분석기를 이용하여 추적, 분석하여 유전자 실태에 관한 기본적인 바탕을 규명함으로써 세포유전 연구에 기초자료를 제공하고자 본 실험을 계획하였다.

## 재료 및 방법

공시동물 및 조직준비 : 1~2년생 무지개송어 (*Oncorhynchus mykiss*) 100尾를 한국해양연구소 생물공학 연구그룹 수조실에서 사료를 먹여 키우면서 실시하였다. 세포배양을 위해서는 수조에 마취액을 희석해서 사용하는 Siwicki 방법<sup>48</sup>으로 마취를 하였으며 마취를 끝낸 어체에서 지느러미, 신장, 혈액, 생식기관을 구

분하여 채취하여 실험에 사용하였다.

배양 방법 : 수상균 방지를 위해 중부멸균작업을 실시하였고 특히 세균전달이 제일 빠른 안면과 손 등을 Lind과 Bauer방법<sup>26</sup>에 따라 소독하였으며 주배양액(main media)에 첨가배양액을 혼합할 때에는 정밀여과작업(Falcon 7105, Bottle top filter, 0.22 micron, Becton Dickinson Labware)을 하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 실시하였다.

배양액 및 배양조직 : 신장, 지느러미, 및 성선에 대한 배양액으로는 본 실험에 실시한 실험에서 BEM(basal eagle medium), MIEM(minimum essential medium)와 MOEM(modified Eagle medium) 배양액보다 세포활성도가 높게 나타난 TC-199 배양액을 주로 사용하였다(Table 1).

Table 1. Composition of supplemented media for kidney tissue culture

Ingredients	Volume	Remark
TC-199	80%	Cat No 12350-013(Gibco)
FCS(fetal calf serum)	20%	Cat No 240-6000AG(Gibco)
Penicillin	100IU/ml	Cat No 600-5140AG(Gibco)
Streptomycin	100ug/ml	Cat No 600-5140AG(Gibco)

한편 혈액 배양액은 혈구응집이 일어나지 않아야 하는 것이 우선 조건이다. 이러한 것을 기본으로 무지개송어 미정맥 혈액을 채취하여 헤파린이 들어있는 시험관에 옮겨 원심분리하여 상층의 혈청과 하층의 혈구 퇴적층 사이에 있는 buffy coat층의 세포를 흡입하여 TC-199에 혈구성장촉진제인 phytohemagglutinin을 첨가한 혼합배양액에 배양하였다.

배양 시간 : 신장, 지느러미 및 성선에서는 장기 배양시 세포의 오염도가 문제되기 때문에 단기배양방법(72시간)을 사용하였으며, 혈액세포배양시에는 장기배양방법(120시간)을 사용하였다.

콜히친 처리 : 단기배양에 있어 지느러미 조직은 Kligerman과 Bloom<sup>21</sup>의 방법으로 생리식염수에 콜히친을 25ug/ml되게 희석하여 배양완료 20분전에 사용하였으며 배양액의 10ml당 약 0.1ml를 혼합하였다. 지느러미를 제외한 조직(신장 및 성선조직)의 단기배양시 배양완료 2시간전에 콜히친처리를 하며, 용량은 배양액이 10ml일 경우는 0.3ml를 주입, 5ml일 경우는 0.2ml를 혼합하여 배양하였다. 혈액은 배양완료 4시간

전에 0.3ml 콜히친 처리를 하였다.

저등장액 처리 : 콜히친으로 처리한 세포배양액을 원심분리(1,500rpm/10min)하여 상층액을 제거한 후 아래쪽에 잔류하는 세포 덩어리에 저장액(KCl용액 0.075M = 0.5592g KCl+100ml 증류수) 10ml를 주입한 후, 다시 원심분리하여 상층액을 제거했다.

고정액 처리 : 저등장액 처리후 고정액(fixative = acetic acid(glacial) 100ml+methyl alcohol 300ml)을 처리하여 원심분리한 다음 염색체분리가 용이할 수 있는 세포를 함유하는 용액만을 분리했다.

**분열 방법**

라이트염색 분석 : 혈구의 일반적인 분열상태를 관찰하기 위해서 라이트염색액을 이용하였는데 염색은 먼저 혈액도말한 슬라이드에 염색약을 충분히 덮히도록 떨어뜨린 후 염색약과 동량의 완충용액을 슬라이드위에 떨어뜨려 염색액과 4~5분간 혼합하였고, 그후 수돗물로 3~5분간 세척하여 일반적인 과정을 거쳐 영구표본을 작성하여 광학현미경으로 관찰하였다.

G-banding 분석 : 혈액을 비롯한 각 장기조직의 염색체형태 및 그들의 핵형을 관찰하기 위한 G-banding 분석은 0.005% trypsin 효소 용액에 2분간 침적한 후 증류수로 세척하여 건조하였으며 그후 5% Giemsa용액에 침적시킨다음 세척한 후 일반적인 과정을 거쳐 영구표본을 작성하였다.

C-banding 분석 : 이형염색질을 규명하기위한 C-banding 분석은 7일간 상온에서 건조시킨 슬라이드를 0.2N HCl 용액에 침적하였다가 증류수로 세척하여 건조시킨 후 DNA를 숙성시키기 위해 37℃의 0.07N. Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O 용액이 들어있는 온수조에 7분간 침적한 후 세척하여 상온에서 건조하였다. 세포의 염색체가 붙어있는 건조된 슬라이드를 60℃의 2×SSC용액에 120분간 침적하였다가 증류수로 세척하여 건조시킨 후, 6% Giemsa 용액에 침적시켜 염색하였다, C-banding 분석(constitutive heterochromatin)은 산과 알칼리를 병용하여 60℃의 온도에서 일련의 과정을 거쳤을 때 관찰이 가능하며 Lima-De-Faria<sup>25</sup>는 이형염색체(heterochromatin)자체는 유전적으로 불활성이므로 유전자 발현이 없고, DNA의 양은 동형염색체(euchromatin)보다 3~4배 많으며 전체 염색체의 20%로 추정된다고 했기 때문에 이전에 유의해서 관찰하였으며 염색과정 중 슬라이드 글라스의 단백질을 제거하기 위해서는 Hsu et al<sup>18</sup>의 방법에 의해 염산을 또 DNA를 크게 만들기 위해 barium hydroxide(Ba(OH)<sub>2</sub>·8H<sub>2</sub>O) 용액을 사용하여 DNA의 관찰을 용이하게 하였다.

사진촬영 및 분석 : 핵형분석은 염색체의 중심체

(centromere)가 자리잡은 위치에 따라 그 형태가 달라지게 되므로, 완(arm) 길이의 비( $r$ =장완(long arm)/단완(short arm))에 따라 형태를 네 종류로 분류하여 분석하였다<sup>23</sup>.

(1) 중심염색체(metacentric chromosome)

$$r = 1.0-1.5 \text{로 중심립은 염색체의 가운데 위치}$$

(2) 아중심염색체(submetacentric chromosome)

$$r = 1.6-3.0 \text{으로 중심립은 염색체의 가운데보다 약간 위에 위치}$$

(3) 정점염색체(acrocentric chromosome)

$$r = 7.0 \text{으로 중심립은 염색체의 한쪽 끝에 위치}$$

(4) 말단염색체(telocentric chromosome)

$$r = \infty \text{로 단완이 거의 찾아보기 어려울 정도이거나, 없는 경우이다.}$$

염색체 핵형분류는 영상인식장치(Image recognition system)인 cytoscan (영국 IRS, 등록번호 1984637)<sup>23,25</sup>을 이용하였다.

**결 과**

장기 세포 배양 : 각 배양액에 따르는 장기세포들의 활성화도 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Cell activity from cell culture

(Unit : %)

	TC-199	Modified	Minimum	Basal
Kidney	61	25	8	6
Fin	53	2	40	5
Testis	49	15	21	15
Ovary	53	4	17	26

Table 2에서 나타난 바와 같이 세포활성도는 신장에서 TC-199와 Modified, 지느러미는 TC-199와 Minimum, 고환은 TC-199와 Minimum, 난소는 TC-199와 Basal의 순이었으나 전체적인 성적은 TC-199 medium에서 가장 뛰어났다.

혈구 세포 배양 : 주배양액인 TC-199에 혈구성장촉진제인 PHA(phytohemagglutinin)를 3%, 5%, 10%씩 첨가한 배지에 20℃에서 5일간 배양한 세포의 활성화도에 관한 본 연구에서는 PHA 5% 첨가시 가장 세포활성도가 뛰어났다(Table 3).

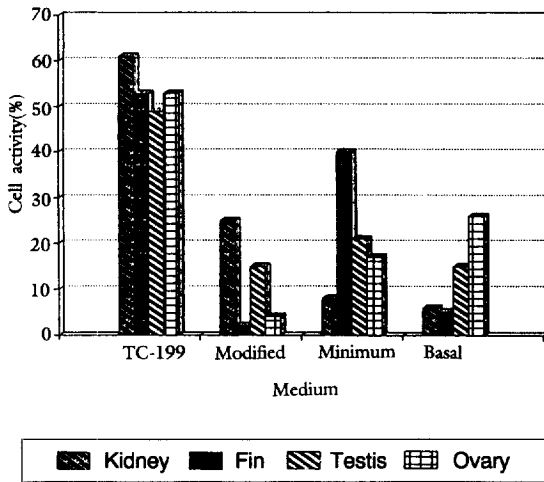
**Table 3. Cell activity from blood cell culture.**

	PHA 3%	PHA 5%	PHA 10%
Cell activity (%)	29	53	18

배지에 따르는 세포 활성도의 비교 : 배양액에 따르는 각 장기조직세포의 활성도를 그래프로 나타내었다 (Fig 1). 성적에서 알수 있듯이 각 배양액에 있어서 장기들의 배양시 TC-199 배지에서 자란 세포들의 활성도가 제일 뛰어났으며 혈액세포 배양은 PHA 5% 첨가된 배양액에서 세포활성도가 가장 좋은 결과를 얻었다.

**일반적 관찰**

라이트 염색 : 혈액에 있는 혈구염색에 주로 사용하고 있는 라이트염색액으로 염색한 무지개송어의 적혈구 형태는 경골어류의 특징인 핵을 함유하고 있었으며 적혈구는 오렌지색으로 나타나고 백혈구의 핵은 푸른색으로 보였으나 분열상태에 있는 핵은 관찰할 수 없었다(Fig 2).



**Fig 1. Cell activity of various media.**

**염색체 관찰**

G-banding 분석 : 본 실험에서 실시한 G-banding 분석에서 양호한 성적을 얻었으며 자동영상 분석기로 분석한 결과를 보면 60개 및 61개의 염색체 다형현상을 확인하였는데 2n=60인 개체는 44개의 중심 (metacentric) 또는 아중심(submetacentric), 16개의 아말단(subtelocentric) 또는 차단의(acrocentric) 염색체로

구성되었고, 2n=61인 개체는 43개의 중심 또는 아중심, 18개의 아말단 또는 차단의 염색체로 구성되었다 (Fig 3).

Fig 3에서 나타난 염색체의 형태를 자동영상분석기로 염색체 크기를 비교하여 나열한 핵형이며 이는 수컷 무지개송어에서 나타난 것이다.

C-banding 분석 : 본 실험에서는 cytoscan을 이용하여 무지개 송어의 염색체를 C-banding 분석하였다 (Fig 5, 6). 이는 종래 현미경적 방법 보다 훨씬 빠르고 깨끗하게 나타나는 결과를 얻었다.

분열전기의 단계에 따르는 관찰 : 본 실험은 감수분열중에서 분석이 가능한 각 단계를 제시하였는데 배 발생초기에 체세포로부터 분리, 독립된 원시생식세포는 일련의 유사분열을 통해 정원세포가 되며 성 성숙 후 정모세포가 된다. 이 정원세포에서 볼 수 있는 분열상은 체세포와 완전히 동일하므로 정소를 이용한 염색체의 분석은 감수분열의 각 단계뿐 아니라 유사분열까지도 관찰이 가능하였다.

세사기(leptotene stage) : 감수분열 전기 과정의 세사기(leptotene stage)단계는 유사분열의 초기 세포의 전기단계(prophase stage)의 염색체 확산보다 길고 가늘게 나타났다(Fig 7). 길고 가늘게 나타나는 꼬인 염색사(chromonemata)는 분극화 현상이며 이러한 화속기(bouquet stage)는 Fig 7에 나타났듯이 synzytic knot을 관찰할 수 있었다.

접합기(zygotene) : 상동염색체의 짝짓기(pairing), 혹은 접합(synapsis)현상이 나타나는 시기(Fig 8)로서 감수분열 고유의 특징인 접합은 염색체의 여러곳에서 무작위로 형성되며 부계와 모계 유래의 상동염색체가 전장에 걸쳐 접합된 이가염색체(bivalents)의 모습을 볼 수 있었다. 광학현미경으로는 개개의 염색분체를 식별하는것이 어렵고 염색체의 수는 반감되어 보였다. Fig 8에서의 이가염색체는 진하게 염색되는 많은 과립 즉,염색소립(화살표)을 가지고 있는 가늘고 긴 염색분체사가 망처럼 보였으며 성염색체는 양성의 미분화된 이상응축구조로서, 이시기에서부터 진하게 염색되어 성기구(sex vesicle)가 형성되며 염색소립에 비해 다소 크기 때문에 쉽게 구별이 가능하였다.

감수분열 중 접합기단계(zygotic stage)의 염색체는 유전자 꼬임(helix coiling)현상에 의해 점차 지름이 넓어지고 길이가 짧아지는 현상이 나타나고 있다(Fig 8). 이와같은 현상은 모계유전자와 부계유전자 염색체의 접합과 교차(crossing over)형성을 하려는 예비단계이다.

## 고 찰

대체로 변은 동물인 어류의 세포배양에는 배양온도가 큰 영향을 줄 수 있는데 해산어 중 볼락류의 경우에는 20℃가 적당하지만 담수어인 붕어 등의 세포 배양온도는 25℃~30℃로 어종에 따라 차이가 있는 것으로 알려졌다<sup>16</sup>. 이 온도는 냉수성 어종인 송어를 대상으로 한 본 실험의 세포 배양에 있어 적정 사육 수중온도가 20℃였음을 비교해 볼 때 조금 높은 온도였다. 배양액에 따르는 차이를 보면 각 장기의 세포활성도는 신장, 정소, 난소 및 지느러미 모두가 TC-199에서 가장 좋게 나타났는데 이는 Son<sup>46</sup>이 소에서 실험한 성적과 비교해 볼 때 TC-199에서 세포활성도가 가장 좋게 나타난 것과 일치하며 여기에 덧붙여 신장 과 지느러미도 역시 TC-199에서 가장 좋은 성적을 얻었다. 본 배양액 실험은 향후 다른 실험동물에서 사용하는 배양액(예: Medium NCTC 135, McCoy's 5A medium, Medium RPMI 1640)과 비교하여 성분분석을 한 후 광범위한 비교실험이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

혈액 세포 배양에 있어서는 Hartley와 Horne<sup>15</sup>에 의해 PHA가 유사분열 촉진인자로 1960년에 개발된 이후 혈액세포를 배양하는데 중요한 역할을 하고 있으며 본 연구에서도 PHA 5% 첨가시 세포활성도의 성적이 가장 뛰어났는데 이는 Hartley와 Horne<sup>15</sup>의 실험결과와 일치하였다. 또 그 이후 Hartley와 Horne<sup>15</sup>는 *Escherichia coli*(serotype 055:B5, sigma)로 부터 추출한 LPS(=lipopolysaccharide)를 PHA의 대체물질로 보고한 바 있는데 이 대체물질을 이용한 무지개송어의 조직배양도 앞으로 시도해 볼 수 있을 것이라 사료된다.

염색 방법에 따르는 차이를 보면 본 실험의 G-banding 분석에서 무지개송어의 염색체 수가  $2n=60$ 으로 나타났으나 개중에  $2n=61$ 인 개체가 나타났다. 이것은 무지개송어의 정상 염색체가  $2n=60$ 이라고 많은 학자<sup>8,32,45,53</sup>들의 보고에 의해 증명되었으나 무지개송어가 속해있는 연어과 어류의 경우 salmon salar가 54개<sup>5</sup>로 제일 적고 *Oncorhynchus mykiss*의 경우 90개<sup>5</sup>까지 범위로 보고되었는데 이와같은 수적 변화는 Muramoto<sup>32</sup>가 주장한 염색체의 전위(translocation)와 관계되는 것으로 염색체수의 증가 과정에서 미세 염색체가 관여하는 것으로 추측되며 어류의 생활양식과도 관계가 있는 것으로 사료된다.

또한 G-banding 분석에서 X염색체와 Y염색체는 모두 아말단염색체(subtelocentric chromosome)로 나타났는데 이는 무지개송어의 성염색체가 발생분화의 초기단계에서부터 Thorgaard<sup>50</sup>가 지적한 바와 같이 형태

학적으로 동일한 상동염색체로부터 분화되었기 때문인 것으로 사료된다. 그리고 염색체 핵형 배열을 크기와 중심체(centromere)의 위치에 따라 비교하여 배열해 볼 때 성염색체는 이형 성염색체(heteromorphic sex chromosome)이고, Y염색체의 단완은 X염색체의 단완보다 더욱 짧은 크기를 가지고 있었는데 이는 Thorgaard<sup>50</sup>가 무지개송어의 수컷에서 발표한 바와 일치하였으며 다른 특이한 소견은 관찰할 수 없었다. 분석된 개체중 분화가 뚜렷이 나타나지 않아 Fig 4에서 제시한 Y염색체를 구별할 수 없는 경우도 있었는데 이러한 현상의 가능성은 Thorgaard<sup>50</sup> 성적에서도 보고된 바 있으며 이형 현상에 관한 가능성의 첫번째는 분화에 있어서의 주단계(main step)가 염색체상의 단완의 유전물질을 손실시키기 때문이라고 했다. 즉 종간 비교에 의하여 보여지는 초기의 성염색체(dimorphism)는 때때로 중심주변(pericentric) 부위와 관련되어 있다고 보고하고 있으며, 두번째는 사람에게서 볼 수 있는 Y염색체의 다형현상(polymorphism)과 유사한 Y염색체의 이형염색질에 있는 다형현상이 어떤 X염색체와 Y염색체간의 우연한 유사성의 결과로 나타난다는 것이며 세번째는 수컷이 환경적 영향에 의하여 또는 상염색체 유전자의 음성적인 영향때문에 수컷으로 분화된 유전학적 암컷이었을 것으로 보고하고 있는데 본 연구에서도 내특이성 Y염색체가 이형현상으로 나타나는 원인이 되는 것으로 사료된다.

C-banding 분석에서 나타나는 이형염색질(heterochromatin)에 관한 분석은 Pardue와 Gall<sup>7,34</sup>이 세포를 융합하는 연구 도중에 DNA 핵산을 발견한 이후 인류유전과 실험동물 연구분야에서 성염색체(sex-chromosome)분석에 이형염색질을 규명하여 응용하고 있으며 본 연구에서도 C-banding을 이용하여 나타난 염색체를 Fig 6에서 제시하였다. 특이한 유전물질인 이형염색질을 분석하는 기술은 산, 알칼리 용액과 염산을 첨가하여 Giemsa염색을 하는 변형방법이 Sumner<sup>47</sup>에 의해 개발되었다. 염색과정중에서 염산은 슬라이드 표면의 단백질을 분리하는 작용이 있으며, NaOH용액보다 역가가 적은  $Ba(OH)_2$ 용액은 DNA를 변성시키는 화학작용이 있어 이형염색질이 잘 나타나므로 지금까지 많이 활용되고 있다<sup>26</sup>.

Arrighi와 Hansen et al<sup>2,13</sup>이 모든 상동염색체(autosome)에서 C-Banding을 확실히 구별했는데 반해 Schnedl과 Czaker<sup>40</sup>는 X-염색체의 동원체 부위(centromere region)가 염색이 안되기 때문에 만족할 만한 결과를 얻지 못했다. 그러나 Seth와 Kunze<sup>42</sup>는 상동염색체와 성염색체의 동원체 부위에 염색이 이루어진

것을 보고한 바 있으며<sup>13,40,42</sup> Hansen과 Popescu<sup>13,38</sup>는 성염색체인 Y-염색체의 이형염색질은 일반적으로 이형염색질과 진정염색질 사이의 동원체 부위와 단완(short arm)에 자리잡고 있다고 하였다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 단완(short arm)의 끝은 말단 이형염색질로, Y-염색체의 장완(long arm)은 진정염색질로 구성되어 있는 것으로 사료된다.

대부분의 유전검사와 각종 생물공학기법을 활용하여 생산되는 실험동물들은 염색체의 수적인 이상 뿐만 아니라 다양한 구조적인 결함이 나타나는데 통상적인 G-banding 분염법으로는 충분한 수의 분열세포를 얻기가 힘들며, 관찰되는 염색체의 크기도 작기 때문에 염색체의 미세한 구조적 결함을 발견해내기가 매우 어렵다. 그러나 본 연구에서는 C-banding분석과 아울러 세포분열 전기-전중기의 가늘고 긴 염색체에 Giemsa염색을 시행하여 염색체의 미세한 구조이상을 검출할 수 있었다.

특히 R $\phi$ nc<sup>39</sup>가 사람의 입파구를 배양하여 이중 동기화(double synchronization) 연구를 하었는데 methotrexate synchronization을 이용한 배양은 성공율이 높고 각 염색체당 band 수도 많아 구조적인 결함을 찾아내는 데 훨씬 유리하다고 하였다. 또한 이것은 대체적으로 G-분염법과 동일하나 세포배양단계에서 DNA합성 억제제인 methotrexate(MTX)와 그 해제를 위해 thymidine이 첨가된다는 차이점이 있고 이 방법을 쓰면 colcemid 처리시간이 훨씬 단축되며 trypsin 처리 없이 간단한 라이트염색으로도 질적으로 우수한 염색체를 얻게 된다고 보고한 바 있다. 무지개송어에서도 이러한 분염법을 사용했을 경우 사람에서 나타난 결과와 비슷한 연구결과를 얻을 수 있을 것이라 짐작하여 앞으로 계속 더 추구해 볼 수 있는 방법이라 사료된다.

분열시기에 따른 차이를 보면 정자 형성과정 중 유전자의 변동분석에 관해 포유동물에서는 보고된 바 있으나 어류의 감수분열단계에 대한 연구보고는 아직까지 희소하다. 감수분열의 연구대상인 정소와 난소는 생식세포의 발생장소이고 염색체 변이도 일어날 수도 있는 곳이기 때문에 이부위 생식세포의 감수분열 각 시기에 대한 연구는 유전현상과 진화현상의 해석에 중요성을 지니며 체세포 분열의 과정과도 비교분석할 수 있다는 장점을 갖고 있다.

감수분열은 제 1분열과 제 2분열을 하는데 제 1분열은 전기(prophase)에서 L(leptotene), Z(zygotene), P(pachytene), D(diplotene), D(diakinesis)의 5단계로 편이상 세분할 수 있고 곧이어 중기(metaphase), 후기(anaphase), 말기(telophase)로 이어진 후 짧은 간기

(interphase)를 거쳐 제 2분열의 전기, 중기, 후기, 말기 과정으로 진행되어 정자가 형성되는데 본 실험에서는 우선 이들 단계의 전기 중 세사기(leptotene)와 접합기(zygotene)를 분석하였으며 추후에 나머지 단계에 대해서는 더 연구되어야 할 과제로 남아있다.

본 연구에서는 세사기에 synizetic knot을 관찰할 수 있었는데 이러한 결과는 세사기 단계의 구슬 같은 물질인 핵인(nucleolus)의 증가와 RNA와 단백질의 결합 등으로 이루어진 것으로써 Son<sup>46</sup>의 सू소 연구에서 주장한 바와 같은 유전자로 생각된다. 접합기 단계에서의 짝짓기현상은 봉합(synapsis)현상으로 나타나는데 이러한 봉합현상을 왕새우에서 발견한 이래 동물, 식물 등 생물체의 접합기 단계에서 상동유전자(homozygotic gene)가 짝짓는 단계(pairing stage)는 몇개의 유전자 좌위(gene locus)의 접촉점(conjugation point)이 평행을 유지할 때까지 계속 진행되는 지퍼형태라고 했는데 이와 똑같은 현상이 일어나는 것을 본 연구에서도 관찰할 수 있었다.

또한 성염색체가 지퍼형태의 접촉점을 접합기 초기단계에서 부터 시도하지 못하는 이유는 포유동물에서 이형 배우자 성세포 표면에 H-Y 항원(histocompatibility Y-antigen)이 있다는 것이 Shalcv<sup>43</sup>에 의해 알려진 이래 이것이 최초의 성 결정인자로 제안되어 왔는데 어류의 경우에는 H-Y항원이 수컷이 아니라 암컷의 무지개송어 적혈구표면에 존재하기 때문인 것으로 보고된 바 있다. 관찰 방법에 따른 차이를 보면 광학현미경의 경우는 그 결과가 뚜렷하지 않았으며 관찰과정 중에 나타난 염색체를 촬영하여 현상 및 인화하는 데에도 번거롭고 비경제적인 반면 자동영상장치(cytoscan)를 이용한 관찰에서는 보다 더욱 신속하고 명확한 결과를 얻을 수 있었다.

본 연구에서 제시한 무지개송어의 염색체 형태 및 핵형은 cytoscan을 이용하여 나타난 것이며 조작시 여러 가지 어려움은 있었으나 반복 사용함으로써 해결할 수 있었다. 앞으로도 염색체 연구에 있어 cytoscan을 이용하는 것이 좀더 용이할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 실험동물인 무지개송어(Oncorhynchus mykiss) 100尾를 재료로 하여 신장, 지느러미, 혈액과 성선조직의 염색체 구조를 규명하기 위하여 장기별, 배지별, 염색방법 및 검사기구를 달리하면서 세포활성도가 좋은 염색체를 선정하여 연구한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 각 장기와 배양액에 따르는 차이를 보면 신장, 지느러미, 성선조직에서는 TC-199(80%)에 FCS(20%) 혼합한 배양액에서, 혈액은 TC-199(75%)에 FCS(20%) 그리고 PHA(5%)의 혼합배양액에서 좋은 세포활성도가 나타났다.

2. 염색방법에 따르는 차이로는 G-banding 및 C-banding 염색법 모두 광학현미경 및 자동영상분석장치로 가능하였으며 이 중 동원체부위의 이형염색질은 C-

banding만이 가능하였다.

3. 감수분열의 각 단계별 구별 중 본 연구에서 실시한 세포분열의 기본단계인 세사기와 접합기의 구분이 무지개송어에서도 구분되었다.

4. 핵형분석, 이형염색질의 규명 및 세포분열 각 단계별 구분은 광학현미경보다 자동영상분석장치에 의한 분석이 매우 빠르고 뚜렷하게 구별됨을 본 연구에서 알 수 있었다.

## Legends for figures

Fig 2. Erythrocyte of rainbow trout(1:red cell, 2:lymphocyte).

Fig 3. Shape of G-banding chromosomes(rainbow trout,  $2n=60$ ).

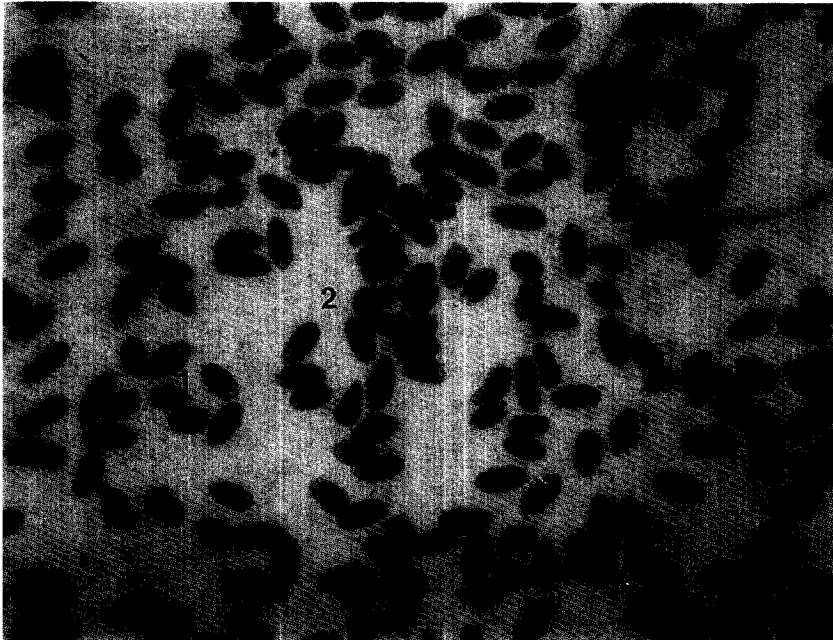
Fig 4. G-banding Karyotype of rainbow trout chromosomes( $2n=60$ ).

Fig 5. Shape of C-banding Chromosomes(rainbow trout,  $2n=60$ ).

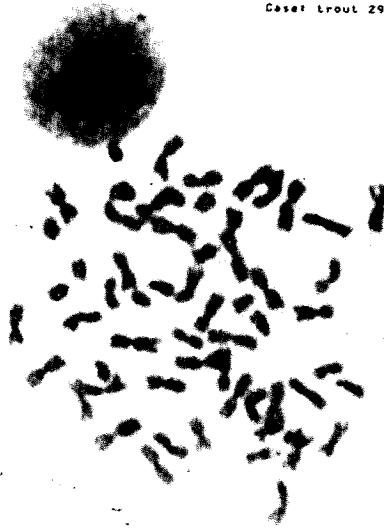
Fig 6. C-banding karyotype of rainbow trout chromosomes( $2n=60$ ).

Fig 7. Leptotene stage of rainbow trout chromosomes.

Fig 8. Zygotene stage of rainbow trout.



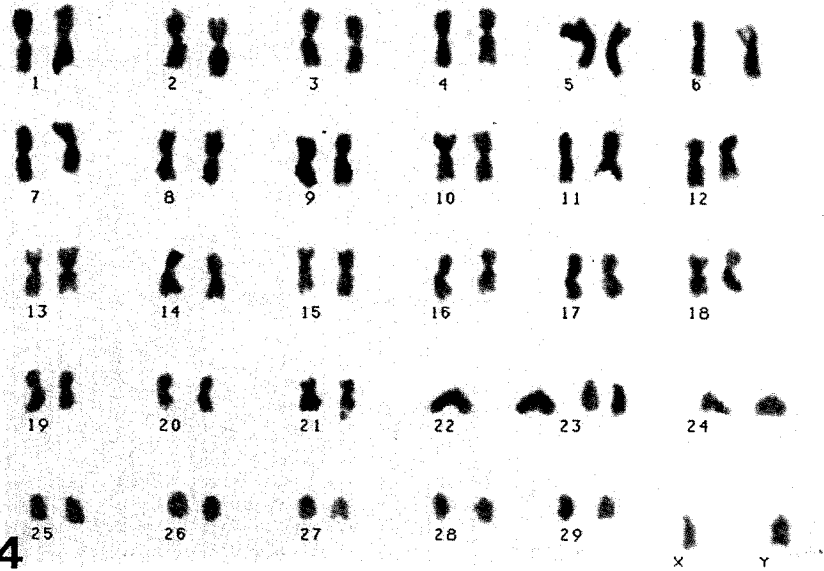
Case: Trout 2902 60



3

KIST - KORDI 1994. 03. 20 No. - 12346

Case: trout 2902 60

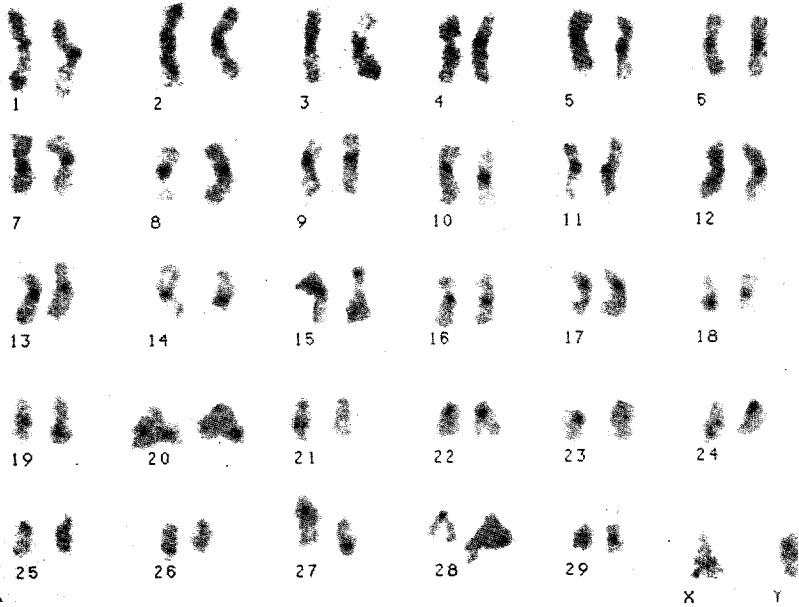






5

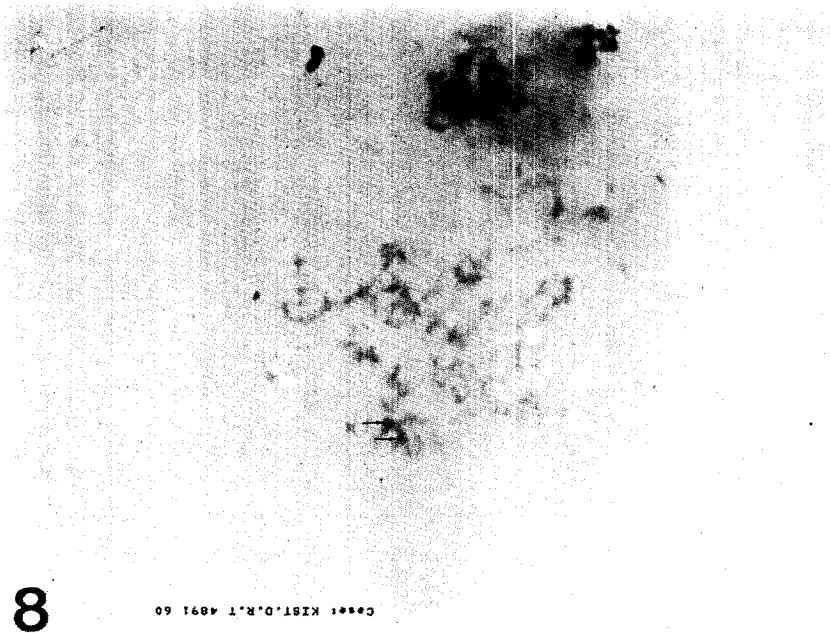
KIST - KORDI 1994. 03. 26 No. - 12349



6

Case: trout 5231-90

7



## 참 고 문 헌

1. Allen JW. BrdU-Dye characterization of late replication and meiotic recombination in Armenian hamster germ cells. *Chromosoma* 1979; 74(2): 189-207.
2. Arrighi, Frances E, Hsu TC. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 1971; 10: 81-86.
3. Bilaspuri GS, Guraya SS. Quantitative studies on spermatogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reprod Nutr Develop* 1980; 20(4): 975-982.
4. Blaxhall PC. Fish chromosome techniques-a review of selected literature. *Journal of Fish Biology* 1975; 7: 315-320.
5. Bungenberg De Jong CM. Cytological studies on Salmoidrids. *Genetica* 1955; 27: 472-483.
6. Castro-Sierra E, Wolf U. Studies on the male meiosis of *Ellobius lutescens* TH. *Cytogenetics* 1968; 7: 241-248.
7. Chen TR, Ruddle FH. Karyotype analysis utilizing differentially stained constitutive heterochromatin of human and murine chromosomes. *Chromosoma* 1971; 34(1): 51-72.
8. Cuellar O, Uyeno T. Triploidy in rainbow trout. *Cytogenetics* 1972; 11: 508-515.
9. Denton TE. Fish chromosome technology. Thomas, Springfield, Illinois, 1973.
10. Evans EP, Breckon G, Ford CE. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testis. *Cytogenetics* 1964; 3: 289-294.
11. Fang JS, Jagiello, Georgiana. A pachytene map of the mouse spermatocyte. *Chromosoma* 1981; 82: 437-445.
12. Ferguson-Smith MA. The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. *Cytogenetics* 1964; 3: 124-134.
13. Hansen KM. Heterochromatin(C bands) in bovine chromosomes. *Hereditase* 1973; 73(1): 65-70.
14. Hare WCD, Singh EL, Eaglesome MD. Studies on obtaining meiotic chromosomes for analysis in the bull. II. Direct and culture methods. *Theriogenology* 1979; 12(5): 271-282.
15. Hartley SE, Horne MT. A method for obtaining mitotic figures from blood leukocyte cultures of rainbow trout. *J of Fish Biology* 1983; 22: 77-82.
16. Hoar WS, Randall DJ, Brett LJR. Fishphysiology, Academic press. Inc, 1979.
17. Hsu TC, Pomerat CM. Mammalian chromosomes in vitro . II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J Hered* 1953; 44: 23-29.
18. Hsu TC, Arrighi FE. Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosome. *Chrmosoma* 1971; 34(3): 243-253.
19. Jagiello, Georgiana, Fang JS. Cytological observations of deletions in pachytene stages of oogenesis and spermatogenesis in the mouse. *Chromosoma* 1976; 58(4): 377-386.
20. Klasterka I, Natarajan AT, Ramel C. New observations on mammalian male meiosis. I. Laboratory mouse(*Mus musculus*) and Rhesus monkey(*Macaca mulatta*). *Hereditas* 1976; 83: 203-214.
21. Kligerman AD, Bloom SE. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 1977; 34: 266-269.
22. Laurie DA, Hulten M, Jones GH. Chiasma frequency and distribution in a sample of human males: chromosomes 1, 2 and 9. *Cytogenet. Cell Genet* 1981; 31: 153-166.
23. Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 1964; 52: 201-220.
24. Libbus BL, Schuetz AW. Analysis of the progression of meiosis in dispersed rat testicular cells by flow cytofluorometry. *Cell Tissue Kinet* 1978; 11(4): 377-391,
25. Lima-De-Faria A. Differential uptake of tritiated thymidine into hetero and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. *J Biophys Biochem Cytol* 1959; 6: 457-466.
26. Lindl, Bauer. Germ contents in various parts of the body of laboratory workers. 1987.
27. Mayr B, Hager G, Weber A. Zum vorkommen von spermiogenezellen in stierejakulaten. *Zuchthyg* 1979; 14(2): 55-58.
28. Mcdermott A. Human male meiosis: Chro-

- mosome behaviour at premeiotic and meiotic stages of spermatogenesis. *Can J Genet Cytol* 1971; 13(3): 536-549.
29. McLaren, Anne, Chandley. A study of meiotic germ cells in the gonads of foetal mouse chimaeras. *J Embryol exp Morph* 1972; 27(3): 515-524.
  30. Meredith R. A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testis. *Chromosomae* 1969; 26: 254-258.
  31. Miyake YI. Studies on replicating patterns of bovine sex chromosomes using 5-bromodeoxyuridine (BrdU). *Zuchthyg* 1982; 17: 56-64.
  32. Muramoto J, Azumi J, Fukuoka H. Karyotypes of nine species of Salmonidae. *Chrom Inf Serv* 1974; 17: 20-23.
  33. Oud JL, Reutlinger AHH. The behaviour of silver-positive structures during meiotic prophase of male mice. *Chromosoma* 1981; 81: 569-578.
  34. Pardue ML, Gall JG. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 1970; 168: 1356-1358.
  35. Paufler S. Chromosomenmessung mit dem koordinatenmesstisch "Pencil-Fellow" 1. Europäisches kolloquium über zytogenetik, institut fuer zytogenetik, Gissen. Germany, 1970.
  36. Pogosianz, Helen E. Meiosis in the Djungarian hamster. I. General pattern of male meiosis. *Chromosoma* 1970; 31: 392-403.
  37. Pollock D. A chromosome abnormality in Friesian cattle in Great Britain. *Vet Rec* 1972; 90: 309-310.
  38. Popescu CP. L'heterochromatine constitutive dans le caryotype bovine normal et abnormal. *Ann Genet* 1973; 16(3): 183-188
  39. Rø nne M. Double synchronization of human lymphocyte culture: Selection for high-resolution banded metaphases in the first and second division. *Cytogenet Cell Genet* 1985; 39: 292-295.
  40. Schnedl W, Czaker R. Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat, and sheep chromosomes (Bovidae). *Cytogenet Cell Genet* 1974; 13: 246-255.
  41. Schnedl W. End-to-end association of X and Y chromosomes in mouse meiosis. *Nature New Biol* 1972; 236: 29-30.
  42. Seth PK, Kunze WP. Differential chromosomal staining in *Bostaurus* (cattle). *Cytologia* 1974; 39(2): 373-378.
  43. Shalev A, Berzi I, Ilamcrton JI. Detection and crossreaction of H-Y antigen by haemagglutination. *Immunogenet* 1973; 5: 303-312.
  44. Shreck CB. Methods for fish biology American Fisheries Society. Bethesda, Maryland, USA, 1990.
  45. Simon RC, Dollar AM. Cytological aspects of speciation in two North American teleosts, *Salmo gairdneri* and *Salmo clarki lewisii*. *Can J Genet* 1963.
  46. Son JK. Zytogenetische untersuchungen an zellen der spermiogenese beim Bullen und Schafbock (Zugleich ein Beitrag zur methodik). West-Germany. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Giessen. BRD, 1984.
  47. Sumner AT, Evans HJ, Buckland RA. Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. *Expt Cell Res* 1973; 81: 214-222.
  48. Swicki A. New anaesthetic for Aquaculture. 1984; 38:171-176.
  49. Templado C, Marina S, Coll MD. Meiotic studies in human semen. *Hum Genet* 1980; 53(3): 335-339.
  50. Thorgaard GH. Heteromorphic sex chromosomes in male Rainbow Trout. *Science* 1977; 196: 900-902.
  51. Wolf K, Quimby MC, Pyle EA. Preparation of monolayer cell cultures from tissues of some lower vertebrates. *Science* 1960; 132: 1890-1891.
  52. Yamamoto KI, Kikuchi Y. A new method for the preparation of mammalian spermatogonial chromosomes. *Mutation Res* 1978; 52: 207-209.
  53. 小島吉雄. 魚類細胞 遺傳學, 水交社, 東京, 日本, 1983.