

사람의 정확한 염색체 분석을 위한 고해상 G-분염 염색체와 R-분염 염색체

제일병원 유전학연구소, 건국대학교 생물학과*

박소연 · 최수경 · 이형환*

High Resolution G- and R-banding for Accurate analysis in Human Chromosomes

So-Yun Park, Soo-Kyung Choi and Hyung-Hoan Lee*

Genetic Research Laboratory, Cheil General Hospital, Department of biology, Kon-Kuk University*

= Abstract =

A technique is described for producing high resolution G- and R-banded chromosomes in human peripheral lymphocyte cultures. Cultured lymphocyte cells were exposed to ethidium bromide (10 μ g/ml) and colcemid (0.02 μ g/ml) each for 2.5h and 0.5h prior to harvest for high resolution G-banded chromosomes. High resolution R-band patterns were obtained by BrdU substitution which was revealed by the fluorochrome-photolysis-Giemsa staining technique.

These methods are easy to perform and highly reliable. The data on relative length of chromosomes at the four mitotic stages are presented in units of percentage of haploid autosome length. The characteristic patterns of GTG-bands (G-bands after trypsin and Giemsa) and RBG bands (R-bands after BrdU and Giemsa) were analyzed.

I. 서 론

사람의 고해상분염(high-resolution banding) 염색체에 관한 연구는 세포분열 중기상의 염색체에서는 인식하기 어려운 미세한 염색체 이상(Kroisel & Rosenkranz, 1990; Mangelschots *et al.*, 1992)을 동정하고 분석하여 정확한 진단을 하고자 하는 경우, 전좌염색체 사이의 정확한 절단부위를 결정하는 경우 그리고 염색체의 구조적, 분자적 조성에 관한 연구 등에 많은 정보를 제공한다.

특히 고해상 R-분염법(high-resolution R-banding)은 G-분염법에 의해 분석하기 힘든 염색체의 말단부위와 전좌염색체의 절단부위를 정확히 관찰할 수 있으며, 부가염색체(extra chromosome)의 기원을 밝히는 데 도움이 된다(Parslow *et al.*,

1980). 그러므로 사람의 염색체의 정확한 진단과 분류를 위해서는 일반적인 G-분염 염색체 분석과 더불어 고해상분염법에 의한 염색체 분석을 반드시 실시할 필요가 있다.

본 실험은 ethidium bromide와 BrdU를 사용하여 수확된 세포분열 초기단계의 고해상 G-분염, R-분염 염색체와 일반적인 배양법으로 수확된 세포분열 중기상의 G-분염 염색체의 특징을 비교하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

헤파린이 처리된 사람의 말초 혈액 0.5ml을 10% Fetal Bovine Serum(Gibco), 0.2% Penicillin-Streptomycin (Gibco), 그리고 2% Phytohemagglutinin-M (Gibco)이 첨가된 RPMI 1640

Table 1. The durations of exposure to BrdU, Ethidium Bromide, and Colcemid at given concentrations and hours before harvest of cultures

Cultures	BrdU (20µg/ml)	Ethidium Bromide (10µg/ml)	Colcemid (0.02µg/ml)
1	0	0	1
2	0	0	0
3	0	2.5	0
4	0	2.5	0.5
5	6.5	2.5	0.5
6	6.5	0	0.5

(Gibco) 과 Minimum Essential Medium (Gibco) 10ml에 각각 넣어 37°C로 유지된 항온기에서 72시간동안 배양하여 사용하였다.

2. 방법

1) 고해상 G-분열법

세포분열 초기의 고해상 G-분열 염색체를 얻기 위하여 혈액 배양종료 2.5시간 전에 ethidium bromide를 최종농도 10 µg/ml가 되도록 처리하였으며, 0.5시간 전에 colcemid (0.02 µg/ml)를 처리하였다 (Ikeuchi, 1984). 비교군으로서, 일반적인 배양조건에서 colcemid만 처리한 경우와, ethidium bromide만 처리한 경우, 두가지 모두 처리하지 않은 경우의 실험을 실시하였다 (Table 1). 배양된 세포는 원심분리 후 상층액을 버리고 37°C로 유지된 항온기에서 30분간 0.075M KCl로 처리한 다음 Carnoy's 고정액 (Methanol:Glacial acetic acid = 3:1, v/v)으로 3회 고정하였다. 깨끗하게 닦아 차게 보관해둔 슬라이드 위에 세포부유액을 50-60cm 높이에서 적하하여 실온에서 말리고 1주일정도 보관하였다. G-분열을 위하여 슬라이드를 0.125% trypsin으로 20-30초동안 처리한 후 5% Giemsa로 5분동안 염색하였다.

2) 고해상 R-분열법

R-분열 염색체를 얻기 위해서는 배양종료 6.5시간 전에 BrdU (20 µg/ml)를 처리하였으며, 0.5시간 전에 colcemid를 처리하였다 (Camargo & Cervenk, 1980). 그리고 고해상 염색체의 비율을 높이기 위해 배양종료 6.5시간 전에 BrdU를 처리한 후 2.5시간 전에 ethidium bromide, 0.5시간 전에 colcemid를 처리하여 (Table 1) 그 결과를 비교하였다 (Iannuzzi *et al.*, 1989). 배양세포들은 G-분열 염색체 수확방법과 동일하게 수확하였다. 수확 후에는 Fluorochrome - photolysis - Giemsa (FPG) 염색법 (Camargo & Cervenk, 1982)을 용

용하여 슬라이드를 50 µg/ml의 Hoechst 33258로 40분 동안 염색한 후 증류수로 씻어 말린다음 2X SSC로 덮어 black-ray lamp (UVP, Inc. model UVL-56)를 20cm 높이에서 2시간동안 조사하였다. 슬라이드를 60°C로 유지된 항온기에서 15분 동안 2X SSC로 처리한 다음 증류수로 씻고 5% Giemsa로 3분간 염색하였다.

3) 고해상 염색체의 관찰

세포분열계수(mitotic index)를 구하기위해 각 실험군마다 2000개 이상의 세포를 계수하였으며, 세포분열단계 (mitotic stage)의 분포를 보기위해 각 실험군별로 100-200 개의 세포를 관찰하였고, 각 세포의 염색체의 길이와 밴드의 수, 그리고 밴드와 밴드사이의 간격 등에 따라 세포분열 단계를 결정하였다. 본 실험은 3명의 여자와 2명의 남자의 말초혈액을 실험재료로 사용하여 5회 반복하였다. 세포분열 중기상의 염색체와 세포분열 초기단계의 염색체의 크기를 비교하기 위해 5회의 실험결과에서 염색체의 분열상태와 분포상태가 좋은 G-분열 세포를 현미경 사진촬영하여 각 세포분열단계별로 10개의 사진을 선택하였으며, 각 세포의 한쌍의 염색체 중에서 더 길고 겹치지 않은 것을 택하여 염색체 길이와 밴드수를 측정하였고, 세포분열단계간에 염색체의 길이를 비교하기 위해서 ANOVA 분석을 실시하였다. 각 염색체의 상대적 길이(relative length)는 다형성을 나타내는 D그룹과 G그룹의 염색체의 단완(short arm)을 제외한 전체 반수체 상염색체 길이에 대한 백분율 (percentage of total haploid autosome length)로 나타내었으며, 세포분열단계간에 염색체의 상대적 길이를 비교하기 위해서 ANOVA분석을 실시하였다. 세포분열 중기상의 염색체와 세포분열 초기단계의 고해상 G-분열, R-분열 염색체의 핵형분석은 Francke (1981), Drouin과 Richer (1989)등의 보고를 참고하였으며

Table 2. Mitotic index in different culture conditions (%)¹

Treatments	Subjects					Average ²
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	
Colcemid	0.83	1.15	1.19	3.60	2.07	1.77
Untreated	0.45	1.91	0.98	1.21	0.98	1.11
Ethidium Bromide	0.58	1.25	0.63	0.82	0.55	0.77
EB and Colcemid	2.30	1.25	0.97	1.00	1.23	1.35
BrdU, EB, Colcemid	0.93	1.04	1.02	1.09	1.04	1.02
BrdU and Colcemid	1.26	1.10	1.16	0.75	1.19	1.09

¹ Based on 2,000-3,000 cells. ² Data summarized from five different experiments (EB; Ethidium Bromide).

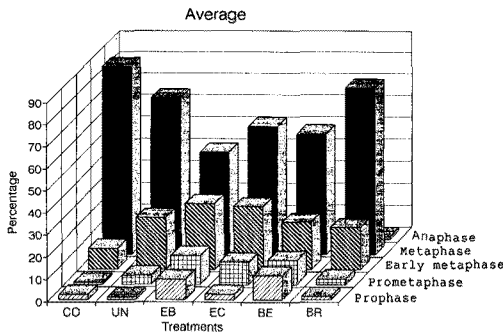


Fig. 1. Distribution of mitotic cells in different culture conditions. Data were summarized from five different experiments; Untreated cells(UN). Cells treated with colcemid(CO), ethidium bromide (EB), EB and colcemid (EC), BrdU, EB and colcemid (BE), BrdU and colcemid(BR).

ISCN (1981, 1985)의 명명 규약과 도표에 근거하여 실시하였다.

III. 결 과

1. 고해상 G-분염 염색체

5명의 말초혈액을 ethidium bromide와 colcemid를 처리하여 배양한 결과 세포분열계수 (mitotic index, %)는 평균 1.35%(0.97% - 2.30%)로 colcemid만 처리한 비교군(1.77%)보다는 다소 적고 ethidium bromide만 처리한 경우(0.77%)와 아무것도 처리하지않은 실험군(1.11%)보다는 높았다 (Table 2).

서로 다른 5명을 대상으로 한 실험결과를 종합해볼때, ethidium bromide와 colcemid를 처리한 실험군에서 세포분열 전기상 (prophase)의 세포는 유사분열중인 세포의 2.38%, 세포분열 전중기상 (prometaphase)의 세포는 10.15%, 세포분열 초중기상 (early metaphase)의 세포는 28.56%로 나타나 전체 유사분열중인 세포의 41.09%가 세포

분열 초기단계 (premetaphase)에 있었다. 이에 비해 colcemid만 처리한 비교군의 경우, 세포분열 전기상의 세포는 2.3%, 세포분열 전중기상의 세포는 0.69%, 세포분열 초중기상의 세포는 9.26%로 고해상 염색체의 출현빈도가 비교적 낮게 나타났다. Colcemid와 ethidium bromide 어느것도 처리하지않은 경우는 각 세포분열단계별로 1.21%, 3.90%, 23.45%로 나타나 colcemid만 처리한 경우보다 높은 출현빈도를 보였으며, ethidium bromide만 처리한 실험군은 9.16%, 12.98%, 29.76%로 가장 높은 빈도의 고해상 염색체를 관찰할 수 있었다 (Table 3).

서로 다른 배양조건을 가진 실험군 중에서 ethidium bromide를 처리한 경우에는 특히 세포분열 전기상과 전중기상의 세포의 출현빈도가 높게 나타났으며, ethidium bromide와 colcemid를 모두 처리한 실험군은 ethidium bromide만 처리한 실험군보다 세포분열 전기상의 세포의 출현빈도가 현저히 감소하였다. 염색체의 수축을 유도하는 colcemid를 첨가하지 않거나 염색체의 수축을 억제하는 ethidium bromide를 처리한 실험군은 세포분열 초중기상의 세포의 출현빈도가 크게 증가하였다 (Fig. 1). 세포분열 초기단계의 고해상 염색체의 출현빈도와 세포분열 중기상의 염색체의 출현빈도는 ethidium bromide만 처리한 경우가 가장 높은 빈도의 고해상 염색체를 얻을 수 있었지만 염색체들이 서로 분산되지 못하고 심하게 겹쳐있어 고해상분염 염색체의 정확한 분석이 불가능하였다 (Fig. 2). Ethidium bromide와 colcemid를 모두 처리한 경우에는 고해상 염색체의 비율이 높고, 염색체의 형태와 분포상태가 ethidium bromide만 처리한 경우보다 좋게 나타났다. 각 세포분열단계의 대표적인 G-분염세포들을 관찰한 결과 세포분열 전기상의 염색체의 길이가

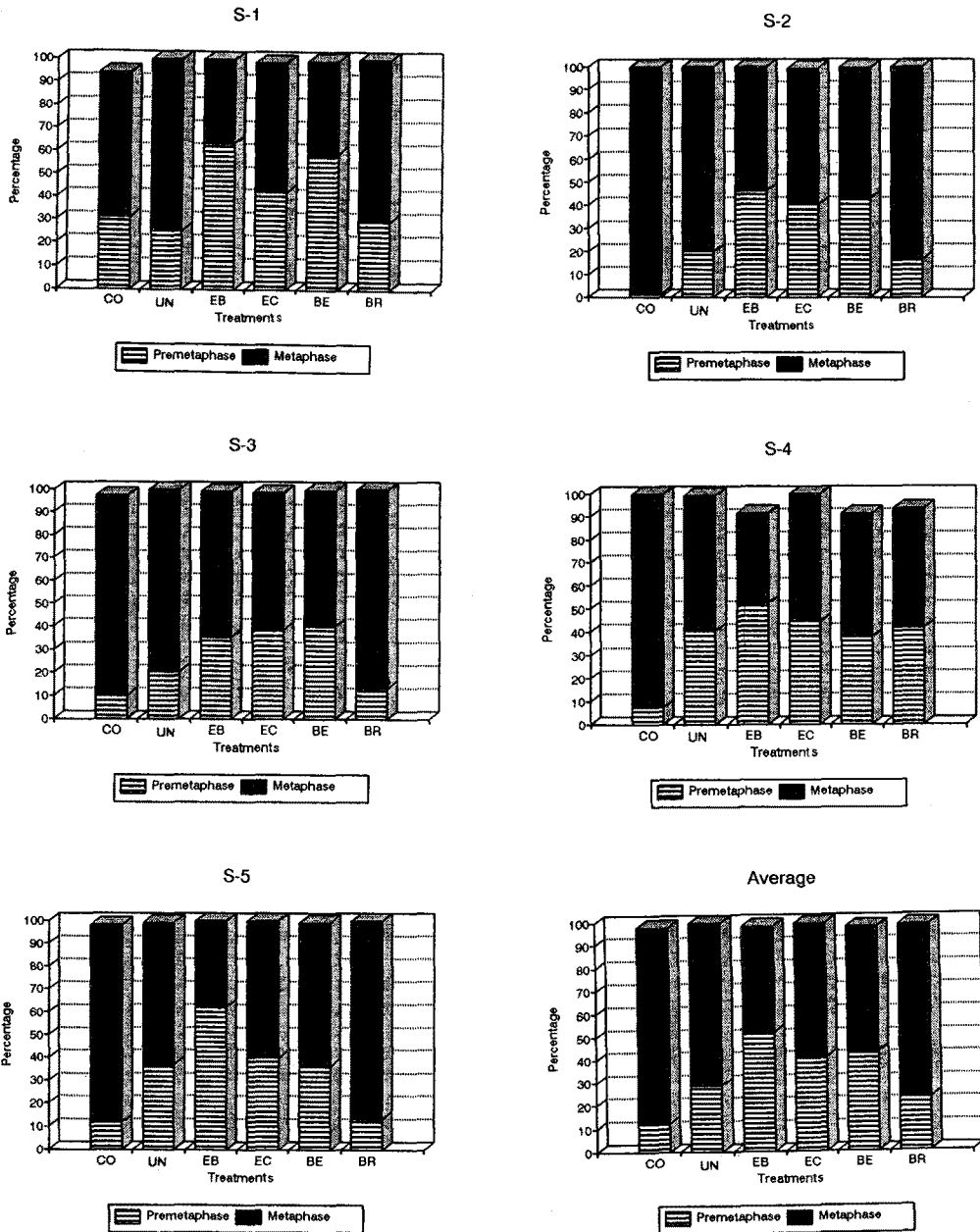


Fig. 2. Proportion of premetaphase cells and metaphase cells in different five experiments (premetaphase: ranging from prophase to early metaphase) (S: subject).

세포분열 중기상의 염색체에 비해 거의 2배정도 길게 나타났으며, 세포분열 전기상의 염색체들이 서로 많이 겹치는 경향을 볼 수 있었다 (Fig. 3).

2. 고해상 R-분염 염색체

R-분염법을 실시하기 위해 BrdU와 colcemid를

사용한 실험군에서 세포분열계수는 colcemid만 사용한 비교군에 비해 다소 적은 1.09%였으며 (Table 2), 세포분열 전기상, 전중기상의 세포의 출현빈도는 비교군과 별 차이를 보이지 않았으나 세포분열 초중기상의 세포는 18.88%로 2배정도 많이 수확되었다 (Table 3). 세포분열 초기단계의 세포를 많이 얻기 위해 ethidium bromide를

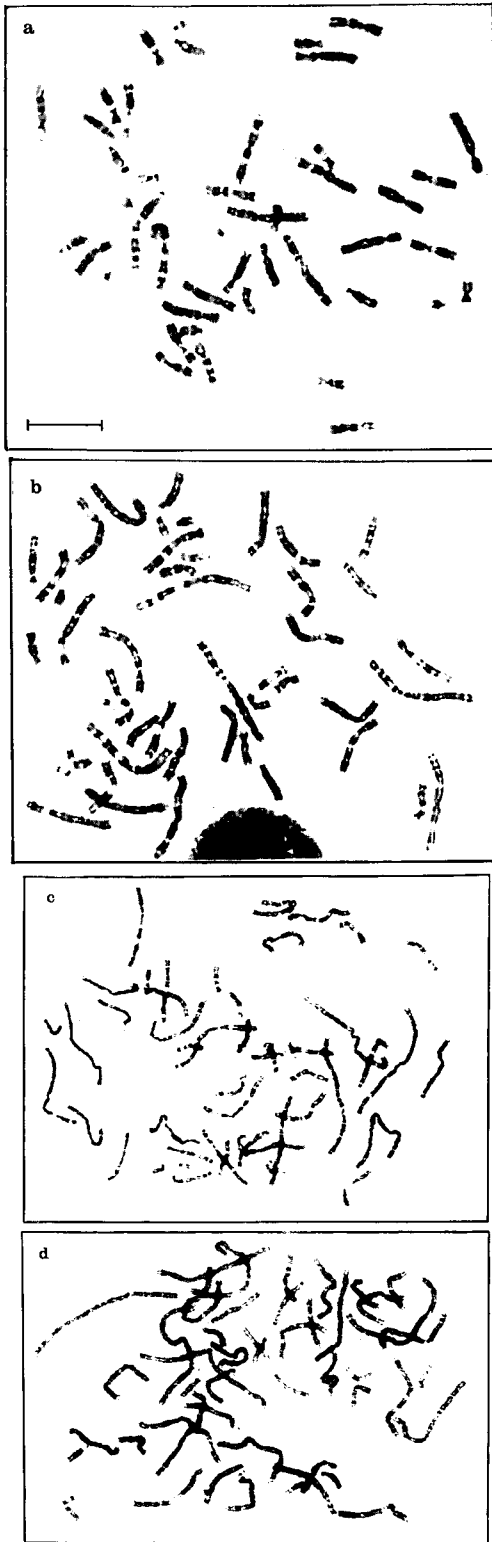


Fig. 3. Representative G-banded mitoses. a. Metaphase b. Early metaphase c. Prometaphase d. Prophase. Primary magnification 1500X. bar=10 μ m

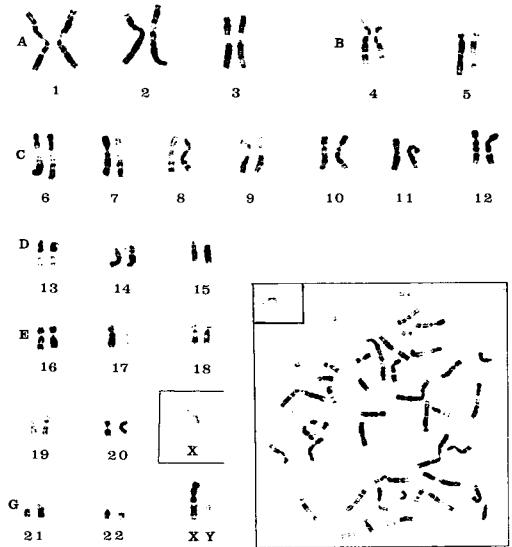


Fig. 4. Human Karyotype of R-banded chromosomes at metaphase. Y chromosome is lightly stained. Inserted late replicating X chromosome treated in the same manner.

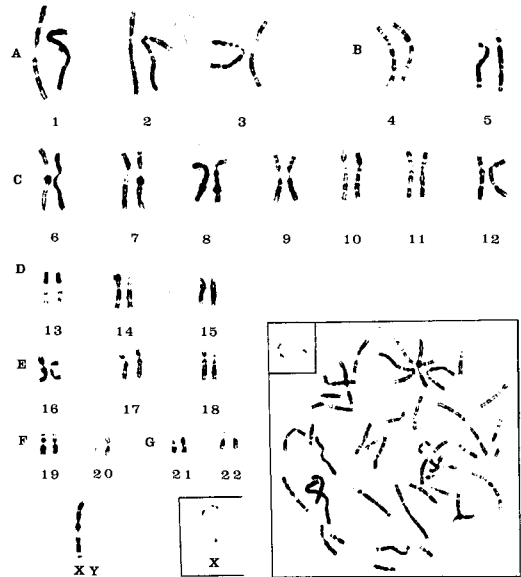


Fig. 5. Representations of high resolution R-banded human Karyotype. Inserted late replicating X chromosome treated in the same manner.

더 첨가한 경우, 세포분열계수는 1.02%로 나타나 BrdU와 colcemid만 사용한 경우와 차이를 보이지 않았으나 (Table 2) 세포분열 초기단계의 세포의 비율은 크게 증가하여 세포분열 전기상의 세포의 출현빈도가 10.77%, 세포분열 전중기상

Table 3. Distribution of cells in various mitotic stages from five different experiments after treatment with and without colcemid, ethidium bromide, BrdU

Treatments	Subjects	Mitotic stages(%) ¹				
		P	PM	EM	M	A
Colcemid	S-1	11.49	3.45	16.09	63.22	5.75
	S-2	0.00	0.00	1.28	98.72	0.00
	S-3	0.00	0.00	10.00	87.65	2.35
	S-4	0.00	0.00	7.27	92.73	0.00
	S-5	0.00	0.00	11.67	86.67	1.67
	Avg.	2.30	0.69	9.26	85.80	1.95
Untreated	S-1	3.33	3.33	18.33	75.00	0.00
	S-2	0.00	2.73	17.27	80.00	0.00
	S-3	0.00	3.00	17.50	79.50	0.00
	S-4	0.63	6.96	32.91	58.86	0.63
	S-5	2.08	3.47	31.25	62.50	0.69
	Avg.	1.21	3.90	23.45	71.17	0.27
Ethidium Bromide	S-1	26.67	13.33	23.33	36.67	0.00
	S-2	0.78	10.94	34.38	53.91	0.00
	S-3	6.90	9.48	18.97	63.79	0.86
	S-4	8.20	18.03	26.23	39.34	8.20
	S-5	3.28	13.11	45.90	37.70	0.00
	Avg.	9.16	12.98	29.76	46.28	1.81
Ethidium Bromide and Colcemid	S-1	4.15	15.35	22.82	56.43	1.24
	S-2	4.00	8.00	28.29	58.86	0.86
	S-3	3.26	6.52	28.62	60.14	1.45
	S-4	0.00	11.11	33.33	55.56	0.00
	S-5	0.51	9.74	29.74	60.00	0.00
	Avg.	2.39	10.15	28.56	58.20	0.71
BrdU, Ethidium Bromide and Colcemid	S-1	24.79	17.09	17.09	40.17	0.85
	S-2	4.31	7.66	31.10	56.46	0.48
	S-3	7.14	6.83	26.09	59.63	0.31
	S-4	8.70	15.94	13.04	53.62	8.70
	S-5	8.94	7.26	20.11	63.13	0.56
	Avg.	10.77	10.96	21.49	54.60	2.18
BrdU and Colcemid	S-1	0.00	1.50	27.82	70.68	0.00
	S-2	0.00	3.92	12.75	83.33	0.00
	S-3	1.11	3.33	8.89	86.67	0.00
	S-4	6.33	2.53	32.91	51.90	6.33
	S-5	0.00	1.20	12.05	86.75	0.00
	Avg.	1.49	2.50	18.88	75.86	1.27

¹. Based on 100-200 mitotic cells in each culture (P: Prophase; PM: Prometaphase; EM: Early metaphase; M: Metaphase; A: Anaphase).

의 세포의 출현빈도가 10.96%, 세포분열 초중기 상의 세포의 출현빈도가 21.49%로 나타났다 (Table 3). Fig. 2에서 알 수 있는 것처럼 R-분염을 위한 실험에서 ethidium bromide를 사용한 경우, 사용하지 않은 경우보다 2배정도 많은 세포분열 초기의 고해상 염색체를 얻을 수 있었다. Fig. 4와 Fig. 5는 세포분열 중기상의 R-분염염색체와

세포분열 초기단계의 R-분염 염색체의 핵형분석 결과이다. DNA복제 초기와 말기에 각각 복제하는 X염색체의 특이한 분염형태를 관찰할 수 있었는데 초기에 복제된 경우 진하게 염색된 밴드들이 많이 보였으며, 말기에 복제된 X염색체는 거의 보이지않을 정도로 흐리게 염색된 것을 볼 수 있었다.

Table 4. Measurements of chromosome length at different mitotic stages¹

Chromosome No.	Length (μm) ²			
	M	EM	PM	P
1	12.76 ^a	16.10 ^b	19.46 ^c	23.06 ^d
2	11.57 ^a	15.25 ^b	18.30 ^c	22.04 ^d
3	10.01 ^a	12.99 ^b	15.60 ^c	18.53 ^d
4	9.19 ^a	12.62 ^b	14.96 ^c	16.79 ^d
5	8.76 ^a	11.75 ^b	13.83 ^c	16.50 ^d
6	8.58 ^a	11.31 ^b	13.37 ^c	15.63 ^d
7	7.66 ^a	10.21 ^b	11.92 ^c	14.59 ^d
8	6.87 ^a	9.48 ^b	10.96 ^c	12.88 ^d
9	6.70 ^a	8.93 ^b	10.44 ^c	12.62 ^d
10	6.64 ^a	8.47 ^b	10.41 ^c	11.95 ^d
11	6.70 ^a	8.70 ^b	10.38 ^c	11.43 ^d
12	6.58 ^a	8.87 ^b	10.06 ^c	11.02 ^d
13	4.52 ^a	6.09 ^b	7.19 ^c	8.79 ^d
14	4.47 ^a	5.77 ^b	6.79 ^c	8.15 ^d
15	4.29 ^a	5.77 ^b	6.64 ^c	7.83 ^d
16	4.38 ^a	5.25 ^b	6.21 ^c	7.80 ^d
17	4.47 ^a	5.83 ^b	6.70 ^c	7.98 ^d
18	4.06 ^a	5.10 ^b	6.15 ^c	7.05 ^d
19	3.45 ^a	4.61 ^b	5.48 ^c	6.00 ^d
20	3.31 ^a	4.21 ^b	4.87 ^c	5.48 ^d
21	2.06 ^a	2.64 ^b	3.02 ^c	3.42 ^d
22	2.15 ^a	2.67 ^b	2.96 ^c	3.42 ^d
X	7.40 ^a	9.89 ^b	11.08 ^c	12.96 ^d
Y	2.67 ^a	3.71 ^a	5.16 ^b	5.63 ^c

¹ There are no significant differences among the means with the same superscript in a row ($p \leq 0.05$).

² Based on average measurements of 10 excellent haploid sets each in metaphase(M), early metaphase(EM), prometaphase(P), and prophase(P).

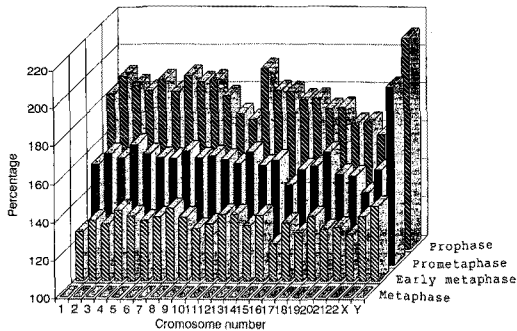


Fig. 6. Comparison of chromosomes length at different mitotic stages.

3. 염색체의 길이

세포분열 단계별로 염색체의 길이를 측정한 결과는 Table 4와 같으며, 각 단계별로 염색체의 분포상태와 분열상태가 좋은 세포를 10개씩 현

미경 사진촬영 (250×)하여 확대인화 (14.5×)한 후 측정된 값을 실제길이를 환산하였다. ANOVA분석 결과 ($p \leq 0.05$) 염색체의 길이는 세포분열 단계 (세포분열 중기, 세포분열 초중기, 세포분열 전중기, 세포분열 전기) 사이에 서로 유의한 차이를 나타내었다 (Table 4). 전 세포분열단계에서 각 염색체 길이의 증가비율을 보기위해서 세포분열 중기상의 염색체의 길이를 100으로 하여, 나머지 세가지 세포분열 단계의 염색체 길이를 세포분열 중기상의 염색체의 길이에 대한 백분율로 표시하였다 (Table 5). 그결과 염색체의 길이는 세포분열 중기상보다 최고 211%까지 증가되었다. 세포분열 초중기상에서는 16번 염색체가 119.87%의 가장 낮은 증가율을 보였고 세포분열 전중기상과 전기상에서는 22번 염색체가 가장 낮은 증가율을 보였다. 전 세포분열 단계에서 Y염색체 길이의 증가율이 가장 높았다. A(1-

Table 5. Comparison of chromosomes length at metaphase, early metaphase, prometaphase, and prophase¹

Chromosome No.	Length (%) ²			
	M	EM	PM	P
1	100.00	126.14	152.50	180.68
2	100.00	131.83	158.15	190.48
3	100.00	129.86	155.94	185.22
4	100.00	137.22	162.78	182.65
5	100.00	134.11	157.95	188.41
6	100.00	131.76	155.74	182.09
7	100.00	133.33	155.68	190.53
8	100.00	137.97	159.49	187.34
9	100.00	133.33	155.84	188.31
10	100.00	127.51	156.77	179.91
11	100.00	129.87	154.98	170.56
12	100.00	134.80	152.86	167.40
13	100.00	134.62	158.97	194.23
14	100.00	129.22	151.95	182.47
15	100.00	134.46	154.73	182.43
16	100.00	119.87	141.72	178.15
17	100.00	130.52	150.00	178.57
18	100.00	125.71	151.43	173.57
19	100.00	133.61	158.82	173.95
20	100.00	127.19	147.37	165.79
21	100.00	128.17	146.48	166.20
22	100.00	124.32	137.84	159.46
X	100.00	133.73	149.80	175.29
Y	100.00	138.95	193.26	210.86

¹. Based on average measurements of 10 excellent haploid sets each in metaphase(M), early metaphase(EM), prometaphase(PE), and prophase(P).

². Values obtained at metaphase are expressed as 100%. Measurements of chromosome length in EM, PM, and P are expressed as a percentage of those found for each chromosome at metaphase.

3)그룹의 염색체 중에서는 2번 염색체의 길이가 가장 많이 증가되었으며, B(4,5)그룹에서는 세포분열 전중기상까지는 4번 염색체의 증가율이 컸지만 세포분열 전기상에서는 5번 염색체의 증가율이 더 크게 나타났다. 또한 C(6-12)그룹 중에서는 7번 염색체의 증가율이 가장 컸으며, D(13-15)그룹중 13번 염색체는 세포분열 전기상에서 14, 15번 염색체에 비해 높은 증가율을 보였다. E,F(16-20)그룹에서는 20번 염색체가 가장 낮은 증가율을 보였고, G(21,22)그룹은 A-F그룹에 비해 낮은 증가율을 보였다 (Fig. 6).

4. 염색체의 상대적 길이

염색체의 상대적 길이는 Pearson (Appendix2 - ISCN, 1985)과 Daniel (1985)의 보고와 유사한 결과를 나타냈다 (Table 6). 세포분열 중기상에서

11번, 16번, 17번, 22번 염색체가, 세포분열 초중기상에서는 11번, 12번, 17번, 22번 염색체가, 그리고 세포분열 전중기상과 세포분열 전기상에서는 17번 염색체가 크기순서에 의한 본래의 상대적 위치와는 달리 더 길게 나타났다. 특히 17번 염색체는 전 세포분열 단계에 걸쳐 E그룹 중에서 가장 길게 나타났으며, D그룹의 13번이나 14번 다음으로 길게 측정되었다. X염색체는 전 세포분열 단계에 걸쳐 7번과 8번 염색체 사이의 크기를 나타냈다. 세포분열 단계 사이의 각염색체들의 상대적 길이에 차이가 있는지 ANOVA 분석을 실시한 결과 ($p \leq 0.05$) 1-3번, 5-10번, 14번, 15번, 17-19번, 21번, 그리고 X염색체의 상대적 길이는 세포분열 단계간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 11,12번 염색체는 세포분열 전기의 상대적 길이가 다른 세포분열 단계의 상대적

Table 6. Relative length of human chromosomes at various mitotic stage (GTG-banding)¹

Chromosome No.	Relative length ² (%) ³			
	M	EM	PM	P
1	9.19 ^a	8.82 ^a	9.03 ^a	9.14 ^a
2	8.32 ^a	8.36 ^a	8.47 ^a	8.72 ^a
3	7.18 ^a	7.11 ^a	7.22 ^a	7.31 ^a
4	6.60 ^{ab}	6.91 ^a	6.94 ^a	6.64 ^b
5	6.30 ^a	6.44 ^a	6.41 ^a	6.53 ^a
6	6.17 ^a	6.19 ^a	6.20 ^a	6.19 ^a
7	5.50 ^a	5.58 ^a	5.53 ^a	5.76 ^a
8	4.94 ^a	5.19 ^a	5.08 ^a	5.06 ^a
9	4.81 ^a	4.89 ^a	4.84 ^a	4.97 ^a
10	4.77 ^a	4.62 ^a	4.82 ^a	4.73 ^a
11	4.81 ^a	4.77 ^a	4.81 ^a	4.52 ^b
12	4.72 ^a	4.87 ^a	4.68 ^a	4.38 ^b
13	3.24 ^a	3.34 ^{ab}	3.33 ^{ab}	3.49 ^b
14	3.21 ^a	3.16 ^a	3.15 ^a	3.22 ^a
15	3.08 ^a	3.16 ^a	3.08 ^a	3.09 ^a
16	3.15 ^a	2.88 ^b	2.88 ^b	3.08 ^{ab}
17	3.21 ^a	3.19 ^a	3.11 ^a	3.16 ^a
18	2.92 ^a	2.79 ^a	2.85 ^a	2.77 ^a
19	2.48 ^a	2.53 ^a	2.55 ^a	2.37 ^a
20	2.38 ^a	2.30 ^{ab}	2.26 ^{bc}	2.16 ^c
21	1.48 ^a	1.44 ^a	1.40 ^a	1.36 ^a
22	1.55 ^a	1.46 ^{ab}	1.37 ^b	1.36 ^b
X	5.32 ^a	5.43 ^a	5.13 ^a	5.13 ^a
Y	1.91 ^c	2.04 ^{bc}	2.41 ^a	2.25 ^{ab}

¹. There are no significant differences among the means with the same superscript in a row ($p \leq 0.05$).

². Data were obtained from ten excellent G-banded metaphase(M), early metaphase(EM), prometaphase(PM), prophase(P) from five individuals.

³. Percentage of total haploid autosome length excluding the variable short arms of chromosomes 13-15 and 21-22.

길이와 유의한 차이가 있었으며, 13번 염색체의 상대적 길이는 세포분열 전기와 세포분열 중기 사이에 유의한 차이가 있었다 (Table 6). G-분염 염색체의 상대적 길이와 밴드 수, 분염형태에 근거하여 세포분열의 전기에서 중기에 이르는 각각의 염색체를 비교 관찰하였다 (Fig. 7). 세포분열 중기상의 염색체의 길이에 비하여 세포분열 전기상의 염색체의 길이는 대부분 1.7-1.9배 정도 더 길었으며 밴드 수도 3배 정도 많았다 (Table 7). 세포분열 전기상의 고해상분염 염색체는 서로 겹쳐져 있었으며, 세분된 많은 밴드로 인해 핵형분석이 어려웠기 때문에 염색체의 길이보다는 분염형태의 특징을 세포분열 전중기상의 염색체와 비교하여 핵형분석을 실시하였다.

IV. 고 찰

고해상 G-분염, R-분염 염색체의 특징은 무엇보다도 길게 신장되어 있어 많은 수의 밴드를 관찰할 수 있다는 점으로, 일반적인 세포배양법으로는 세포분열 초기단계의 고해상 염색체를 거의 얻을 수 없다. Yunis (1976)에 의해 고농도의 MTX와 저농도의 colcemid를 짧은 시간동안 처리하는 방법이 보고된 이후, 초기 유사분열 단계에 있는 세포들을 수확하여 고해상 염색체를 관찰하기 위해 개발된 대부분의 방법들은 세포분열 과정중 세포의 복제단계에서 DNA합성을 저지하는 여러가지 물질 중의 하나를 배양액에 첨가함으로써 배양세포들의 분열시기를 일치시키는 것이었다. Ikeuchi (1984)에 의해 세포분열의 G₂단

Table 7. Number of bands per chromosome arm at the four mitotic stages

Chromosome	Short arm					Long arm				
	No.	P	PM	EM	M	Decrease	P	PM	EM	M
1	54	28	22	16	70.37	43	28	20	14	67.44
2	31	20	17	12	61.29	61	31	27	21	65.57
3	32	18	12	12	62.50	42	26	21	14	66.67
4	20	13	11	5	75.00	53	32	24	19	64.15
5	21	12	8	6	71.43	50	33	26	16	68.00
6	25	14	11	7	72.00	41	26	21	15	63.41
7	22	15	11	7	68.18	42	26	19	11	73.81
8	24	12	8	6	75.00	41	28	20	12	70.73
9	17	10	7	4	76.47	34	23	16	10	70.59
10	23	11	9	4	82.61	38	23	21	11	71.05
11	19	11	9	6	68.42	32	22	18	9	71.88
12	15	12	6	5	66.67	30	24	18	13	56.67
13	10	6	4	3	70.00	34	23	15	10	70.59
14	9	5	4	4	55.56	34	19	15	12	64.71
15	7	4	3	4	42.86	36	20	14	8	77.78
16	15	10	7	5	66.67	18	13	8	6	66.67
17	8	6	5	6	25.00	24	17	12	10	58.33
18	7	4	4	3	57.14	21	14	10	7	66.67
19	10	7	5	4	60.00	16	10	8	6	62.50
20	10	5	3	3	70.00	17	7	6	5	70.59
21	5	4	3	3	40.00	12	7	5	4	66.67
22	5	4	3	3	40.00	12	8	7	4	66.67
X	23	13	12	9	60.87	31	20	16	11	64.52
Y	7	4	3	3	57.14	8	7	6	3	62.50

¹. Decrease are $((P-M)/P) \times 100$.

계동안 염색체의 수축을 억제하는 ethidium bromide를 배양종료 전에 적당한 시간 처리하므로써 고해상분열 염색체의 수확을 증가시킬 수 있음이 보고된 이후 그 실험의 간편성으로 인해 이 방법은 여러 실험실에서 응용되어 만족스러운 결과들이 보고되고 있다 (Røme, 1984, 1985). 일반적으로 세포분열전기나 전중기상의 길고 가는 염색체들의 출현빈도가 높아지면 슬라이드위에서의 염색체의 분포상이 나빠져, 정확한 염색체 분석이 용이하지 않은 경향이 있다. 그러나 ethidium bromide 또는 Hoechst 33258을 사용하는 경우에는 일반적인 고해상 분열 염색법보다 colcemid의 처리시간을 1시간까지 길게하여도 세포분열 전기 그리고 세포분열 전중기상의 세포수는 감소하지 않으면서 염색체의 분포상이 좋게 나타나며 세포분열계수와 세포분열 중기상의 염색체의 출현빈도는 증가한다는 사실이 보고되었다 (Røme, 1985). 본 실험에서도 ethidium bro-

mid만 사용한 실험군에서는 세포분열 초기단계의 고해상염색체의 출현빈도는 높지만 염색체들이 핵형분석을 할 수 없을 정도로 심하게 서로 겹쳐있는 분포상을 보였으며, ethidium bromide와 colcemid를 같이 사용한 실험군은 고해상염색체의 비율도 높고 염색체의 분포상도 핵형분석이 가능할 정도로 많이 좋아진 것이 관찰되어 이상의 보고와 일치하는 결과를 나타냈다. 비록 ethidium bromide와 colcemid를 이용한 본 실험에서의 세포분열계수가 평균 1.35%로 MTX를 사용하여 세포의 분열시기를 동일하게 만드는 실험에서 얻어진 12.3%에 비하면 훨씬 낮은 비율이었지만 (Yunis, 1978) 핵형분석을 위해 관찰하는데는 어려움이 없었으며, Yunis의 실험방법보다 편리하였다. Ikeuchi (1984)는 ethidium bromide와 colcemid를 2시간동안 동시에 처리하여 3.1%와 3.9%의 세포분열계수와 유사분열중인 세포의 56%, 44%가 세포분열 초기단계인 세포분열 전

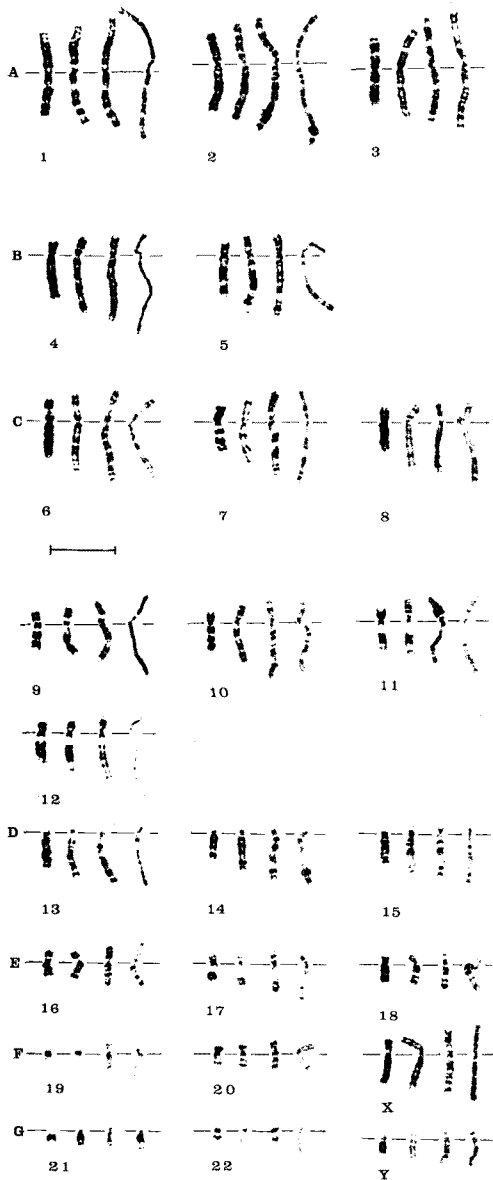


Fig. 7. Illustration of human chromosomes at different mitotic stages after G-banding. In order of increasing length, chromosomes are shown at metaphase, early metaphase, prometaphase, and prophase. Primary magnification 2000X. Bar equals 10 μ m.

기부터 세포분열 초중기상임을 보고하였다. 이 결과는 ethidium bromide를 2.5시간동안, colcemid를 0.5시간씩 처리한 본 실험의 결과에 비해 2배이상 세포분열율이 높은 것이다. 그러나 유사분열중인 세포들 중의 고해상염색체의 빈도

는 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 세포분열율을 높이면서 세포분열 초기의 고해상염색체를 많이 수확하고, 고해상염색체의 슬라이드 위의 분포상을 더 좋게하기 위해서는 colcemid의 처리 시간을 늘리는 것이 좋을것으로 생각된다.

일반적인 G-분염법으로는 구별하기 어려운 염색체의 소실 (deletion), 중복(duplication), 전좌(translocation)등의 정확한 절단부위 (breakpoint)를 관찰할 수 있는 BrdU를 이용한 R-분염법 (Pai & Thomas, 1980)이 보고된 이후 G-분염과 R-분염의 염색체를 비교하므로써 좀 더 미세한 염색체의 구조적 이상을 정확히 진단하는 일이 가능해졌다. MTX나 thymidine으로 세포분열 시기를 일치시킨후 배양종료 4.5 - 5.5시간 전에 BrdU를 처리하는 방법이 널리 사용되고 있다 (Camargo & Cervenka, 1980; Drouin & Richer, 1989). 또한 BrdU는 염색체의 수축을 방해하여(Pai & Thomas, 1980) 세포분열 전기 또는 전중기상의 세포의 출현빈도를 증가시키므로 간단히 배양종료 6-7시간 전에 BrdU (30 μ g/ml)만을 처리하므로써 고해상 R-분염 염색체를 수확할 수 있음이 보고되었다 (Cheung *et al.*, 1985). DNA복제 초기 또는 말기에 BrdU를 결합시키므로써 얻어지는 고해상 G-분염, R-분염형태는 특히 고해상염색체의 구조적, 물리적 조성과 변이염색체의 복제양상을 평가하는데 사용된다 (Drouin *et al.*, 1990). 대부분의 R-분염은 DNA 복제 초기에 유전자가 복제된 결과이고 G-분염은 DNA복제 말기 동안의 복제결과이다 (Iannuzzi *et al.*, 1985). 이러한 특징은 DNA복제 초기와 말기에 각각 복제하는 X염색체의 복제분염형태에서 뚜렷이 드러난다 (Camargo & Cervenka, 1982). R-분염을 얻기위한 염색방법은 Hoechst 33258 형광염색약과 UV-light 그리고 Giemsa염색을 사용하는 방법이 효과적인 것으로 보고되고있다 (Kim *et al.*, 1975; Speit, 1984). 이러한 방법들을 응용한 본 실험에서 얻어진 R-분염염색체에서도 다른 보고와 일치하는 특징을 가지고 있는 R-분염염색체를 얻을 수 있었다. 특히 각각 복제시기가 다른 X염색체의 분염형태가 뚜렷이 차이 나는 것을 관찰할 수 있었으며 일반적인 G-분염법에서 이질염색질 (heterochromatin) 부위로 관찰되던 염색체 1번, 9번, 16번의 중심절 (centromere) 부위와 Y염색체의 장완부위가 관찰하기 어려울 정도로 흐리게 염색된것을 볼 수 있는데 (Pai & Thomas, 1980;

Schempp & Müller, 1982; Drouin *et al.*, 1990) 이런 현상은 염색체의 이질염색질 부위의 다형성을 관찰하는데 장애가 된다. 따라서 정확한 염색체의 세포유전학적 분석을 위해 G-분염과 R-분염을 병행해야 할 필요가 있음을 알 수 있다. Iannuzzi (1989)는 ethidium bromide를 사용하여 세포분열 초기의 염색체를 많이 수확한 후 FPG-분염법으로 G + C 분염을 행하여 그 결과를 보고하였다. 그러나 본 실험은 BrdU와 ethidium bromide를 각기 다른 시간 처리한 후 일부는 trypsin으로 G-분염을, 일부는 FPG염색법을 응용하여 R-분염을 실시하였다. Trypsin을 처리한 경우 모든 세포는 BrdU가 첨가되지 않은 배양세포에서 나타나는 것과 동일한 G-분염 형태를 관찰할 수 있었다. 그러나 FPG염색법을 사용한 경우에 일부 세포에서는 R-분염 형태를, 일부 세포에서는 G-분염 형태를 관찰하였는데 각각의 G-분염, R-분염 형태는 Drouin 등(1990)이 보고한 BrdU를 이용한 GBG 분염 (G-bands by BrdU using Giemsa), RBG 분염 (R-bands by BrdU using Giemsa) 형태와 동일하였다. 그러므로 BrdU와 ethidium bromide, colcemid를 사용하여 고해상염색체를 수확하는 방법은 동일한 슬라이드에서 G-분염과 R-분염 염색체를 동시에 관찰할 수 있는 장점이 있었다.

사람의 고해상분염 염색체를 많이 수확하기 위하여 시행된 본 실험에서 ethidium bromide와 colcemid를 사용하여 높은 비율의 초기 유사분열 단계의 고해상 G-분염 염색체를 얻을 수 있었으며, BrdU와 Hoechst 33258, UV light 그리고 Giemsa염색에 의해 복제양상(replication pattern)을 확실히 살필수 있는 고해상 R-분염 염색체를 관찰하였다. 이러한 방법은 널리 사용되고 있는 DNA합성을 저지하는 물질을 첨가하여 세포의 분열시기를 일치시키는 방법에 비해 유사분열중인 세포(mitotic cells)의 출현빈도는 낮지만, 높은 빈도의 고해상분염 염색체를 얻을 수 있는 편리하고 간단한 실험방법이라 생각한다. 실험결과 수확한 초기 유사분열단계의 고해상분염 염색체의 분석과정에서 세포분열 전기상의 염색체는 세분된 많은 수의 밴드와 구부러진 모양, 그리고 서로 많이 겹치는 현상때문에 핵형분석을 위해 많은 시간이 소요되었으며, 정확한 분석이 어려웠다. 그러므로 고해상분염 염색체의 분석을 시행하는 과정에서 세포분열 전기상의 염색체보다는 세포분열전중기상 또는 세포분열 초중기상의

염색체를 분석하는 것이 더 바람직하다고 생각한다.

세포분열 중기상과 초기 유사분열 단계의 고해상 염색체의 상대적 길이를 비교하여 염색체의 복제시간과 수축과정에 대한 정보를 얻을 수 있으며 서로다른 세포분열 단계에서 각염색체의 상대적 길이는 유의한 차이가 없고 매우 안정되어 있다는 보고 (Van Dyke *et al.*, 1986; Drouin *et al.*, 1991)와는 다르게 본 실험에서는 7개의 염색체가 서로 다른 세포분열 단계에서 유의한 차이를 나타냈다. 이것은 세포분열 단계 중에서 2단계만 비교한 다른 보고와는 달리 본실험은 4단계의 세포분열과정을 서로 비교하였기 때문에 대조군이 많아 진것과 실험을 수행하는데 있어서 기술상의 차이 때문에 나타난 결과라고 생각한다.

이러한 고해상 G-분염, R-분염 염색체의 분석은 최근에는 *in situ* hybridization (Masuno *et al.*, 1992; Lemieux *et al.*, 1992)이나 다른 분자생물학적 방법 (Gandelman *et al.*, 1992; Tümer *et al.*, 1992)과 함께 특이 유전자나 변이유전자의 위치를 확인하는데 이용되고 있다. 그러므로 세포분열 초기단계의 고해상염색체의 분석을 위한 연구는 세포유전학의 발전과 유전자의 분자생물학적 연구 그리고 무엇보다도 일반적인 분염법에 의해 발견하기 어려운 미세한 염색체 변이의 정확한 진단을 위한 많은 정보를 제공한다.

V. 결 론

사람의 말초혈액을 배양하여 고해상 G-분염 염색체와 R-분염 염색체를 얻기 위한 실험을 실시하였으며, 세포분열 중기상의 염색체와 초기 세포분열단계의 고해상 염색체를 비교관찰하였다.

말초혈액 배양종료 2.5시간 전에 ethidium bromide (10 µg/ml)를, 0.5시간 전에 colcemid (0.02 µg/ml)를 처리하여 유사분열중인 세포의 41.09%에서 초기 유사분열단계의 고해상 G-분염 염색체를 GTG 분염법에 의해 관찰할 수 있었다. 고해상 R-분염 염색체를 수확하기 위해 배양종료 6.5시간 전에 BrdU를(20 µg/ml), 0.5시간 전에 colcemid (0.02 µg/ml)를 처리하였으며, 배양세포의 일부는 고해상 염색체의 출현빈도를 높이기 위해 2.5시간 전에 ethidium bromide (10 µg/ml)를 첨

가하였다. 그 결과 유사분열중인 세포의 22.87%, 43.22%에서 초기 유사분열단계의 고해상 R-분염 염색체를 관찰하였다.

세포분열 중기상의 염색체에 비해 세포분열 전기상의 염색체의 길이는 각 염색체에서 1.6 - 1.9배 정도 더 길었으며, 전체 반수체 (haploid set) 밴드수는 3배정도 더 많이 관찰되었다. 그러므로 서로 상보적인 분염형태를 보이는 고해상 G-분염 염색체와 고해상 R-분염 염색체의 비교 분석은 사람의 염색체의 정확한 진단과 분류에 매우 유용하다.

인 용 문 헌

- Camargo M, Cervenka J: Pattern of chromosomal replication in synchronized lymphocytes. 1. Evaluation and application of methotrexate block. *Hum genet* 1980, 54: 47-53
- Camargo M, Cervenka J: Patterns of DNA replication of human chromosomes. II. Replication map and replication model. *Amer Jur Hum Genet* 1982, 34: 757-780
- Cheung SW, Crane JP, Burgess AC: High resolution R banding in amniotic fluid cells using the BrdU-Hoechst 33258-Giemsa (RBG) technique. *Hum Genet* 1985, 69: 86-87
- Daniel A: The size of prometaphase chromosome segments: tables using percentages of haploid autosome length (750 band stage). *Clinical Genetics* 1985, 28: 216-224
- Drouin R, Lemieux N, Richer CL: Analysis of DNA replication during S-phase by means of dynamic chromosome banding at high resolution. *Chromosoma* 1990, 99: 273-280
- Drouin R, Lemieux N, and Richer CL: Chromosome condensation from prophase to late metaphase; relationship to chromosome bands and their replication time. *Cytogenet Cell Genet* 1991, 57: 91-99
- Drouin R, Richer C-L: High-resolution R-banding at the 1250-band level, II. Schematic representation and nomenclature of human RBG-banded chromosomes. *Genome* 1989, 32: 425-439
- Francke U: High-resolution idiograms of trypsin-Giemsa banded human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1981, 31: 24-32
- Gandelman KY, Gibson L, Meyn MS, Yang-Feng TL: Molecular definition of the smallest region of deletion overlap in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Amer Jur Hum Genet* 1992, 51: 571-578
- Iannuzzi L, Di Berardino D, Ferrara L, Gustavsson I, Di Meo GP, Lioi MB: Fluorescent G- and C-bands in mammalian chromosomes by using early BrdU incorporation simultaneous to methotrexate treatment. *Hereditas* 1985, 103: 153-160
- Iannuzzi L, Gustavsson I, Di Meo GP, Ferrara L: High-resolution studies on late-replicating segments (G+C bands) in mammalian chromosomes. *Hereditas* 1989, 110: 43-50
- Ikeuchi T: Inhibitory effect of ethidium bromide on mitotic chromosome condensation and its application to high-resolution chromosome banding. *Cytogenet Cell Genet* 1984, 38: 56-61
- ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature - High - Resolution Banding. *Cytogenet Cell Genet* 1981, 31: 1-23
- ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature . Harnden DG, Klingner HP(eds) 1985, S Karger, Basel/New York
- Kim MA, Johannsmann R, Grzeschik KH: Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocyte chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1975, 15: 363-371
- Kroisel PM, Rosenkranz W: High-resolution banding of an unusual reciprocal translocation in recurrent abortions. *Clinical genetics* 1990, 37: 230-234
- Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Péquignot E: A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* 1992, 59: 311-312
- Mangelschots K, Van Roy B, Speleman F, Van Roy N, Gheuens J, Beuten J, Buntinx I, Van Thienen MN, Willekens H, Dumon J, Ceulemans B, Willems P: Reciprocal translocation between the proximal regions of the long arms of chromosomes 13 and 15 resulting in

- unbalanced offspring: characterization by fluorescence in situ hybridization and DNA analysis. *Hum Genet* 1992, 89: 407-413
- Masuno M, Kano M, Fukao T, Yamaguchi S, Osumi T, Hashimoto T, Takahashi E, Hori T, Orii T: Chromosome mapping of the human mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase gene to 11q22.3-q23.1 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1992, 60: 121-122
- Pai GS, Thomas GH: A new R-banding technique in clinical cytogenetics. *Hum Genet* 1980, 54: 41-45
- Parslow M, Hoo JJ, Garry M, Rose F.: A deleted extra chromosome 22 identified by DNA replication banding. *Hum Genet* 1980, 53: 323-326
- Rønne M.: Fluorouracil synchronization of human lymphocyte cultures: induction of high resolution R-banding by simultaneous exposure to 5-bromodeoxyuridine / Hoechst 33258 in vitro. *Hereditas* 1984, 101: 205-208
- Rønne M.: Double synchronization of human lymphocyte cultures; selection for high-resolution banded metaphases in the first and second division. *Cytogenet Cell Genet* 1985, 39: 292-295
- Schempp W, Müller U: High resolution replication patterns of the human Y chromosome. Intra- and interindividual variation. *Chromosoma* 1982, 86: 229-237
- Speit G: Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. *Hum Genet* 1984, 67: 264-269
- Tümer Z, Tommerup N, Tønnesen T, Kreuder J, Craig IW, Horn N: Mapping of the Menkes locus to Xq13.3 distal to the X-inactivation center by an intrachromosomal insertion of the segment Xq13.3-q21.2. *Hum Genet* 1992, 88: 668-672
- Van Dyke DL, Worsham MJ, Fisher LJ, Weiss L: The Centromere index and relative length of human high-resolution G-banded chromosomes. *Hum Genet* 1986, 73: 130-132
- Yunis JJ: High resolution of human chromosomes. *Science* 1976, 11: 1268-1270
- Yunis JJ, Sawyer JR, Ball DW: The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man. *Chromosoma* 1978, 67: 293-307