

GTG, High-Resolution, Nor-banding에 의한 개의 염색체 분석

김종봉¹ · 윤인숙²

¹대구가톨릭대학교 자연대학 생물학과
²대구보건대학 임상병리학과

Chromosome Analysis by GTG, High-Resolution, and NOR-banding Techniques in the Dog (*Canis familiaris*)

Jong Bong Kim^{1*} and In Sook Yoon²

¹Department of Biology, Catholic University of Daegu, Kyeongsbuk 712-702, Korea
²Department of Medical Technology, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Abstract

None of the numerous published canine idiograms and karyotypes has yet been generally accepted as a standard one because the dog has 76 acrocentric autosomes of similar size and shape. To establish canine banded karyotype from the 22nd chromosome to the 37th chromosome, we analyzed canine chromosomes by GTG, high resolution, and NOR-banding techniques. The GTG and high resolution banding patterns of canine chromosomes corresponded to other reports described previously except for a few chromosomes. While other researchers observed 12 bands, we observed 7 bands in the banding patterns of chromosome 24, 34 and 37. On the other hand, the banding patterns by NOR-banding technique showed that three pairs of autosomes have nucleolus organizer regions at the terminal ends of their long arm, and the Y chromosome has it in its short arm terminal. However, the X chromosome has no nucleolus organizer like other mammals.

Key words – canine karyotype, GTG banding, NOR-banding

서 론

유전자 작성을 하는데 반드시 선행되어야 하는 것이 해당 생물종의 핵형을 확립하는 것이다. 이러한 관점에서 사람[8], 실험용 생쥐[4], 쥐[3]의 분열법에 의한 표준핵형이 이루어졌다. 그러나 개의 핵형의 경우 많은 연구들[6,10,11, 16,18]에 의해 이루어 졌지만 GTG등에 의한 완전한 표준

핵형은 확립되어 있지 않다.

단지 1995년에 개최된 "The 11th European Colloquium on The Cytogenetic of Domestic Animal"의 101의 표준핵형 분과위원회에서 개의 38쌍의 상염색체중 1번부터 21번 째까지의 염색체들의 G-banding에 의한 표준핵형이 확립 되었음을 발표하였다[19]. 개의 G-banding표준핵형이 확립 되 어려운 것은 metacentric chromosome인 X, Y염색체를 제외한 모든 상염색체들이 acrocentric chromosome이고 염색체들의 크기의 차이가 아주 미세하며 특히 22번 이하의 염색체는 아주 작기 때문이다. 그리하여 근래는 α -

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-850-3775, Fax : 053-852-8030
E-mail : jbkim@cuth.cataegu.ac.kr

satellite의 염기서열을 probe로 이용한 FISH[19]나, DAPI[4, 6-damidino-2-phenylindole) banding technique[2] 등의 방법을 이용하여 염색체들을 동정하고자 하는 연구들이 이루어지고 있으며 또한 nucleolus organizer region (NOR)을 silver stain 할 수 있는 Ag-NOR technigue이 개의 염색체 marke를 찾기위하여 이용되기도 하였다[5]. 그러나 이러한 연구들이 이루어졌음에도 불구하고 G-banding에 의한 표준핵형이 확립되지 않았고 특히 삽사리를 이용한 NOR-banding에 의한 염색체 marker 등이 연구된 바 없어 GTG-banding, high resolution banding 및 NOR-banding의 방법을 이용하여 상염색체로 동정할 수 있는 marker를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

GTG와 high-resolution banding 삽사리의 앞다리 정맥에서 미리 heparin 처리를 한 주사기를 이용하여 4ml의 혈액을 채취하였다. 깨끗한 표본을 얻기 위하여 림프구를 분리하여, 미리 phytohemagglutination을 처리한 배양액에서 배양을 하였다. 배양액은 L-glutamine, 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI용액이었고 5% CO₂조건에서 72시간 배양하였다. 세포를 수거하기 1시간전 cocemid를 10μg/ml의 농도가 되게 처리하였다. 0.075M KCl 용액으로 15분간 저장액처리를 하였으며 glacial acetic acid와 methanol을 1 : 3의 비율로 섞은 고정액으로 세포를 고정하였다. Slide에 3-4방울의 고정된 세포액 떨어뜨리고 공기건조하였으며 GTG banding을 위해서 0.025% trypsin의 PBS용액에 slide 표본을 10-30초 처리하였고[17] giemsa 용액을 염색하였다.

NOR-banding

NOR-banding에 의한 삽사리의 핵형분석은 Howell과 Black의 방법[7]을 이용하였다. 본 실험에서 사용된 colloid 용액은 gelatin powder를 formic acid 혼합액 100ml에 첨가하여 10분간 섞은후 갈색병에 넣어 실온에 보관 하였고, 50%(w/v)질산용액은 4g의 질산을 넣어 8ml의 용액을 만들어 세공의 직경이 4μm 이하되는 여과로 여과시켜 제조하였다. 완전히 건조된 표본에 colloid용액을 2-3방울 떨어뜨린 후 여기에 다시 50%(w/v) 질산용액 4방울을 떨어뜨렸다. Cover glass를 덮고 80℃에서 2-3분간 두었다가 염색

체표본이 황금색을 나타낼 때 cover glass를 제거 한 후 증류수로 세척하여 건조시켰다.

결과 및 고찰

삽사리의 핵형을 분석한 결과 2n=78의 염색체 중 sub-metacentric의 X염색체와 metacentric의 Y염색체를 제외한 76개의 모든 상염색체는 acrocentric이었다. 개의 X염색체는 크기 뿐만 아니라 band의 pattern에서 사람의 X염색체와 비슷하다. Y염색체는 사람은 submetacentric인데 반하여 개는 metacentric이었다(Fig. 1, 2).

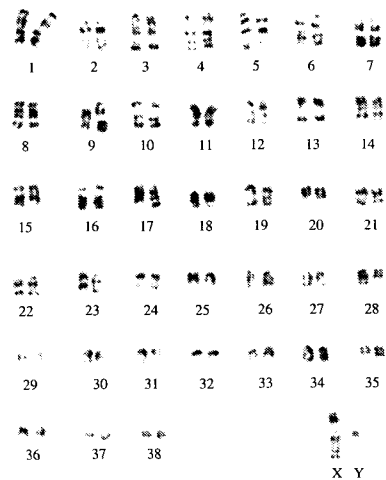


Fig 1. Canine karyotype by GTG banding technique

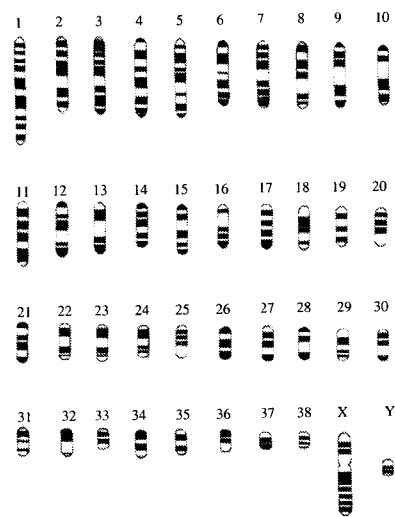


Fig 2. Idiogram of canine G-banded karyotype

개의 38쌍의 상염색체 중 1번에서 21번 염색체까지는 G-banding에 의하여 국제적으로 표준화가 이루어졌기 때문에 본 연구에서는 핵형분석을 주로 22번염색체 이상의 소형 염색체들에 대하여 분석하였다.

그 결과 22번 염색체에는 2개의 band가 동원체의 위에 23번 염색체는 2개의 굵은 band가 중간부위와 말단부위에 있다. 한 개의 굵은 band가 24번 염색체의 동원체 부위에, 2개의 작은 band가 약간 밑부분에 있다. 25번 염색체는 동원체 부위에 3개의 band가 그리고 약간 밑부위에 하나의 band가 있고 26번 염색체에는 3개의 band가 고르게 퍼져 있다.

27번 염색체의 중간부위나 말단부위에 3개의 band가 있고 29번 염색체는 3개의 band가 고르게 퍼져 있지만 말단부위에는 가느다란 한 개의 band가 있다. 한 개의 굵은 band가 30번, 31번, 32번 염색체 각각의 동원체 부위에 있으며 32번 염색체에는 2개의 band가 중간 부위에 있다. 34번과 35번 염색체에도 2개의 굵은 band가 있다. 36번 염색체의 동원체 부위에 한 개의 굵은 band가 있지만 37번 염색체에는 한 개의 굵은 band가 말단 부위에 있으며 38번 염색체의 중간부위에 2개의 band가 있다.

삼사리에 대한 본 연구 결과를 Selden[16] 및 Reimann 등 [12]의 결과와 비교해보면 22번 이상의 염색체에서는 24번, 34번, 37번의 염색체에서 band의 차이가 있는 것을 알 수 있었다. 삼사리의 경우 24번 염색체는 한 개의 굵은 band와 2개의 band가 밑부분에 있는 반면 Reimann의 연구 결과에 의하면 가느다란 2개의 band가 중간부위에 더 있다.

34번과 37번 염색체의 경우는 삼사리에서는 2개의 굵은 band가 34번 염색체에 있는 반면 Reiman등의 경우 4개의 band가 있고, 37번의 경우 삼사리에서는 2개의 굵은 band가 있는 반면 Reiman등에는 3개의 band가 있다(Fig 3).

Chromosome Number	12	24	34	37
Kim				
Reimann				

Fig 3. The canine idiogrammatic patterns showing differences of some chromosome.

한편 NOR-banding분석한 것을 보면 NOR-band는 3쌍의 상염색체와 Y염색체에서 나타났고, X염색체에는 NOR-band가 관찰되지 않았다. NOR-band가 나타난 3쌍의 상염색체의 NOR-band의 위치는 모두 염색체의 말단 부위에 있었고 Y염색체에서는 Y염색체의 단완에 NOR-band가 있었다(Fig. 4).

개는 단일종으로서 수백 이상의 품종이 있으며 품종에 따라서는 같은 종이라고 할 수 없을 정도로 커다란 형질을 보이는 특이한 종이다. 또한 인간과 유사한 생리학적 특징을 많이 가지고 있다는 것 등과 관련하여 국제적으로 Dog-Genome Project (DogMap)가 수행되고 있으며 이에 따라

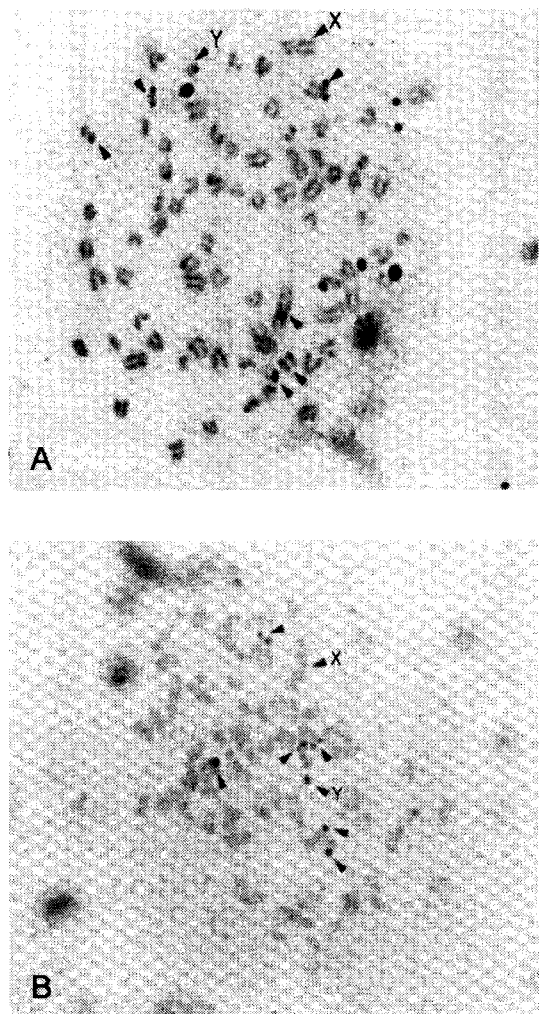


Fig 4. The silver NORs of dog. Arrows indicate real nucleolus organizer regions.
X : X Chromosome, Y : Y Chromosome

"physical gene mapping"에 필수적 기반이 되는 개의 표준 핵형을 확립하고자 많은 노력들이 기울어져 왔다[6, 10, 11, 16, 18]. 사람을 비롯하여 포유동물들의 표준핵형을 확립하는데 가장 흔히 이용되는 G-banding technique에 의한 개의 핵형분석에 대하여서는 국제적으로 X, Y의 성염색체나 38쌍의 상염색체중 1번에서부터 21번 염색체까지만 표준핵형이 확립되었다. 이에 따라 22번부터 38번 염색체들에 대한 표준핵형을 확립하고자 high-resolution banding, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) banding, α -satellite DNA를 probe으로한 FISH등 여러 가지 방법을 이용하여 핵형 분석이 이루어졌다[1, 13, 15]. 이러한 방법들을 통하여 개의 전 염색체에서 460개의 band가 확인되었다[2]. 분석방법이 까다롭고 여전히 일부의 소형염색체들에 대해서는 G-banding에 의한 핵형도가 분명하게 확립되지는 않았다.

본 G-banding과 high-resolution banding에 의한 개의 핵형 분석의 결과도 21번 염색체까지는 표준핵형과 일치 하였으나 24, 34, 37번의 염색체의 band의 pattern이 Reimann 등의 보고[14]와 일치하지 않았다. 3종류의 염색체에서 본 연구는 7개의 band가 관찰된 반면 Reimann등의 보고에는 12개의 band가 있었다. 이러한 Band 수 차이는 특별한 위치에 있는 band 때문이 아니고 같은 위치의 band를 1개로 보는가 2개로 보는가 하는데 차이가 있었고 이는 염색시간이나 세척 회수 등에 따라서 나타난 것으로 사료된다. 따라서 GTG-banding과 high-resolution banding에 의한 개의 핵형은 일부 염색체에서 보고자에 따른 차이가 있다 하더라도 위와 같은 점 때문에 일치 하지 않는다면 차이가 있는 부분에 대한 기준을 설정해야 할 것으로 본다.

한편 NOR-banding 방법에 의한 핵형분석 결과 3쌍의 상염색체 장완 말단부위에 nucleolus organizer가 있음이 관찰되었다. 또한 Y염색체의 단완 말단부위에도 band가 관찰되었으나 X염색체에는 없었다. Y염색체상의 nucleolus organizer는 사람에서와 같았고 이는 Y염색체가 보존적임을 말해준다. 3쌍의 nucleolus organizer를 가지고 있는 개의 상염색체 중 2개는 중간정도의 크기이고 한 개는 소형 염색체였다. 이들의 염색체의 종류를 확인한다면 이를 염색체 확인의 marker로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

개의 염색체수는 $2n=78$ 이며 염색체의 형태를 보면 sub-

metacentric chromosome metacentric chromosome인 X와 Y를 제외하고 모든 상염색체가 acrocentric chromosome이며 그 크기가 작고 크기의 차이가 나지 않는 염색체들이 많아 G-banding등에 의한 핵형의 표준화가 완전하게 이루어지고 있지 않다. 본 연구에서는 G-banding, high-resolution-banding, NOR-banding등의 방법을 이용하여 개의 미소 염색체들에 대한 핵형 및 염색체 동정을 하고자 하였다. G-banding과 high-resolution banding에 의한 그 결과 아직 표준화가 되어 있지 않은 염색체 중 34번, 37번 등의 염색체에서 본 연구 결과가 차이가 있었으나 이는 해석상의 차이로 보이며 NOR-banding에 의한 분석결과 Y염색체와 3쌍의 상염색체에서 존재함을 확인 할 수 있었고 이는 개의 염색체 동정의 지표로 활용할 수 있으리라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Breen, M., C.F. Langford, N.P. Carter, N.G. Holmes, H.F. Dickens, R. Thomas, N.Suter, E.J. Ryder, M. Pope and M.M. Binns. 1990. FISH Mapping and Identification of Canine Chromosomes. *J. Heredity* **90(1)**, 27-30.
2. Breen, M., J. Bullerdiel and C.F. Langford. 1999. The DAPI banded karyotype of the domestic dog(*Canis Familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. *Chromosome Res.* **7**, 401-406.
3. Committee for a Standardized Karyotype of *Rattus norvegicus* 1973 : Standard karyotype of the Norway rat(*Rattus norvegicus*). *Cytogenet. Cell Genet.* **12**, 199-205
4. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice 1973 : Standard karyotype of the mouse (*Mus musculus*). *J Heredity* **63**, 69-72
5. Fujinaga, T., M. Yamashita, M.C. Yoshida, S. Mizuno, M. Tajima and Y. Okamoto. 1989. The banding patterns of normal canine chromosomes. *Jpn. J Vet Sci.* **51**, 294-299.
6. Gustavsson, I. 1964. The chromosomes of the dog. *Hereditas* **51**, 187-189.
7. Howell, W. M. and D. A. Black. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer ; 1-step method. *Experimentia* **36**, 1014-1015.
8. ISCN. 1995. An international system for human cyto-

- genetic monomenclature(Mitelman, F. eds). *Basel*, S. Karger.
9. ISCNDA. 1995. International system for cytogenetic nomenclature of domestic animals(Di Bernardino, D., H. Hayes, R. Fries, S. Long, eds). *Cytogenet Cell Genet.* **53**, 65-79.
 10. Kim, J. B. and H. S. Ok. 1986. G-banded karyotype of Korean Sindo dog (*Canis familiaris*). *Korean J. Genetics* **8(4)**, 183-185
 11. Manolache, M., W.M. Ross and M. Schmid. 1976. Banding analysis of the somatic chromosomes of the domestic dog(*Canis familiaris*). *Can. J. Genet. Cytol.* **18**, 219-234.
 12. Pathak, S., P.V. Tuinen and D.E. Merry. 1982. Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog, *Canis familiaris* (Mammalia, Canidae). *Cytogenet. Cell Genet.* **34**, 112-118.
 13. Reimann, N., S. Bartnitzke, I. Nolte and J. Bullerdiek. 1990. Working with Canine Chromosome: Current Recommendations for karyotype description. *J. Heredity* **90(1)**, 31-34.
 14. Reimann, N., S. Barnitzke, J. Bullerdiek, U. Schmitz, P. Rogalla, I. Nolte and M. Ronne. 1996a. An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenet. Cell Genet.* **73**, 140-144.
 15. Reimann, N., U. Bonk, M. Werner, J. Bullerdiek and S. Bartnitzke. 1996b. Trisomy 18 in a canine thyroid adenoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **90**, 154-156.
 16. Selden, J.R., P.S. Moorhead, M.L. Oehlert and D.F. Patterson. 1975. The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenet. Cell Genet.* **15**, 380-387.
 17. Seabright, M. 1971. Rapid banding technique for human chromosome. *Lancet.* **2**, 971-972.
 18. Stone, D. M., P. B. Jacky and D. J. Prieur. 1991. The Giemsa banding pattern of canine chromosomes. using a cell synchronization technique. *Genome.* **34**, 407-412.
 19. Switonski, M., N. Reimann, A.A. Bosma, S. Long, S. Bartnitzke, A. Pienkowska, M.M. Moreno-Milan and P. Fischer. 1996. Report on the progress of the standardization of the G-banded canine(*Canis familiaris*) karyotype. *Chromosome Res.* **4**, 306-309.

(Received June 15, 2002; Accepted October 9, 2002)