

# AgNOR 염색법에 의한 한우 염색체의 Nucleolus Organizer Regions 양상 분석

정 원 · 손시환

진주산업대학교 동물생명과학과 · 동물생명산업지역협력연구센터

## Identification of Nucleolus Organizer Regions of Korean Cattle Chromosomes by AgNOR Staining

W. Jung and S. H. Sohn

Department of Animal Science and Biotechnology & RAIRC, Jinju National University

### ABSTRACT

Nucleolus Organizer Regions (NORs) are the specific chromosome sites where ribosomal genes are located and highly expressed. We have applied the AgNOR staining to identify the distribution of NORs in the chromosomes of Korean Cattle. We have also studied the NORs pattern on the cells originated from different breeds, tissues and sex. Peripheral blood from forty-four Korean Cattle and Holstein was cultured for chromosome preparation. The fibroblast culture from biopsied ear skins was also conducted for chromosome analysis. The distribution of NORs was analyzed by sequential Ag staining and G-banding on metaphases of the cells. In Korean Cattle, the NORs are localized on the telomeres of the five chromosome pairs number 2, 3, 4, 11 and 28. The number of NORs per metaphase ranged from 2 to 10 giving a mean value of 5.6. The number of NORs per cell varied among individuals and cells within same individual. The size of NORs also differed in NO-chromosomes. The number of NORs was significantly different between Korean Cattle and Holstein, fibroblasts and lymphocytes, and male and female. However, the distribution and frequency of NORs were similar among the cells regardless of breeds, tissues, and sex.

(Key words : Korean Cattle, AgNOR, NORs, G-banding, Chromosomes)

### I 서 론

Nucleolus Organizer Regions(NORs)는 핵인을 형성하는 염색체의 특정 부위로서 rRNA 합성에 관여하는 리보솜 유전자를 함유하고 있으며 또한 이의 활성화가 일어나는 곳이다 (Gall and Pardue, 1969). NORs의 확인 방법으로는 *in situ* hybridization방법 (Henderson 등, 1972; Evans 등, 1974)이나 silver staining (Goodpasture and

Bloom, 1975; Howell and Black, 1980; Hubbel, 1985)으로서 가능한데 이들 중 silver(AgNO<sub>3</sub>) 염색에 의한 NORs는 rRNA 합성에 관여하는 DNA 부위를 나타내기보다는 오히려 NOR 특이 단백질 부위와 이들의 활성도를 나타낸다 (Howell, 1977).

사람에 있어서 염색체상 AgNORs는 13, 14, 15, 21 및 22번 염색체의 부수체에 존재하고, 개체 및 세포 간에 다양한 변이 양상이 있다

Corresponding author : S. H. Sohn, Dept. of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea. Phone:(+82)55-751-3264, e-mail:shsohn@jinju.ac.kr

(Zakharov 등, 1982). 최근에는 AgNOR 단백질과 종양 세포 간에 밀접한 관련이 있음이 제시되어 임상 병리적 차원에서 이에 대한 연구가 매우 활발히 진행 중이다. 즉 종양세포의 AgNOR 단백질 함량이 정상세포에 비해 현저한 증가 양상을 나타냄으로 AgNORs 발현의 양적분포양상을 이용한 종양의 진단 예후적 표지 개발을 시도하고 있다 (Derenzini and Ploton, 1991; Pich 등, 2000; Trere, 2000). 가축에 있어서도 NORs에 관한 많은 연구들이 진행되고 있으며 특히 이들의 존재부위에 대하여서는 여러 축종에 대해 보고된 바 있다 (Toga-Piquet 등, 1984; Schwarzacher 등, 1984; Stefanova, 1984; Bloom 등, 1987; Di Meo 등, 1991, 1993; Mellink 등, 1992, 1994). 축우의 경우 한 개의 세포내 NORs의 수는 10개 내외로 알려져 있으며, NORs를 포함하고 있는 염색체는 연구자에 따라 다소의 이견이 있으나 약 5쌍의 상동염색체에 존재하고, NORs의 염색체상 부위는 말단부분에 위치하는 것으로 알려져 있다 (Henderson and Bruere, 1979; Di Berardino 등, 1979, 1981; Mayr 등, 1987; Iannuzzi 등, 1996). 지금까지 여러 축우 종에 대한 NORs의 연구에서 소의 경우에도 품종 간, 개체 간 및 세포들 간에 NORs의 수적 다형 양상이 존재함을 보고하고 있으나 이의 양상에 대하여서는 연구자간에 많은 차이가 있다 (Di Berardino 등, 1981; Mayr and Czaker, 1981; Mayr 등, 1987, 1989). 그러므로 소의 NORs 수, 발현도 및 분포 양상에 대해서는 아직까지 명확히 구명되어야 할 과제로 남아있으며, 더불어 한국 재래 축종인 한우에 대한 NORs의 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한우의 NORs의 양상을 제시하기 위하여 AgNOR 염색법을 이용하여 한우의 NORs 수와 NORs 염색체 및 이의 분포 위치 등을 구명하고, 한편으로 소의 품종별, 성별 및 근원이 다른 세포간의 NORs 양상을 비교 분석하였다.

## II 재료 및 방법

### 1. 공시 재료

NORs의 분석에 이용된 공시축은 진주산업대학교 동물사육농장 및 인근 농가에서 사육중인 한우 19두 및 대조축으로 홀스타인 암수 25두를 대상으로 하였고, 이들로부터 혈액을 채취하여 백혈구로부터 염색체를 분리하였다. 한편 조직간 세포의 NORs의 비교를 위하여 개체의 귀 조직으로부터 skin biopsy를 하여 세포주(cell line)를 조성하고 이들 세포 배양으로부터 분리된 염색체와 백혈구 배양으로부터 분리된 염색체를 분석하였다.

### 2. 염색체 분리

소의 혈액 배양으로부터 염색체 분리는 손과 이(1998)가 제시한 방법과 동일하게 시행하였다. 이의 방법을 간략히 기술하면 각 개체의 경 정맥으로부터 10mL 정도의 혈액을 채취하고 전 혈액을 이용하여 배양하였다. 배양액은 RPMI 1640을 기본 배양액으로 하여 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 1% pokeweed mitogen (이상 Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, NY, USA)을 첨가하였고 37.5°C 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양하였다. 증기상의 유도를 위하여 배양종료 50분전에 colcemid 0.1µg/mL (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 처리하였다. 세포 수확 후 저장처리는 0.06M KCl (Sigma Chem, St Louis, MO, USA)로서 15분간 처리하였고, 고정처리는 methanol과 acetic acid를 3:1로 혼합한 Carnoy's액으로 3회 반복 실시한 후 표본을 제작하였다.

귀 조직으로부터 세포 배양은 성우의 귀에서 일부 조직을 떼어내어 이들을 미세하게 세절한 후 PBS 용액으로 수차례 세척한 다음 Medium 199 배양액에 15% fetal bovine serum 및 1% penicillin-streptomycin (이상 Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, NY, USA)을 첨가한 혼합배양액에 37.5°C 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에 배양하였다. 세포들이 배양플라스크의 바닥면 전체에 monolayer를 형성하게 되면 0.25% trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, NY, USA)를 이용하여 세포들을 분리하고 일정량을 분주하여 재 배양하였다. 3회 계대 후 전

면 부착된 세포로부터 염색체 분리를 위하여 배양플라스크내 colcemid(0.1µg/ml)를 처리하고 50분간 배양한 다음 scraper로 세포만을 수확하였다. 저장처리는 0.4% KCl 용액과 0.4% sodium citrate 용액을 1:1로 혼합한 혼합용액을 이용하여 10분간 처리하였고 이 후 고정처리 및 표본의 제작은 백혈구 배양법에서의 처리과정과 동일하게 시행하였다.

### 3. AgNOR 염색 및 G-banding

AgNOR 염색은 Bloom과 Goodpasture(1976)가 제시한 방법을 다소 변형하여 실시하였다. 이를 간략히 소개하면 60°C slide warmer에서 48시간 건조시킨 염색체 표본을 이용하여 표본위에 50% AgNO<sub>3</sub> (Sigma Chem, St Louis, MO, USA) 용액을 세 방울정도 떨어뜨린 후 cover slip으로 덮고 빛이 투과되지 않는 moist chamber안에 넣은 다음 37°C 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 초자수로서 2회 이상 세척하고 이를 검경하였는데 만약 염색이 부족할 경우 재 염색시킨 후 다시 배양하였다. AgNOR 염색 후 G-banding을 위하여 검경 처리된 슬라이드를 95% ethanol로 행구어 낸 후 60°C 2×SSC용액 (0.3M sodium chloride + 0.03M sodium citrate)에 90분간 처리하고 초자수로 세척 후 건조하였다. G-banding은 0.05% trypsin (Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, NY, USA)에 건조된 표본을 70초 정도 담근 후 Ca 이온과 Mg 이온이 없는 D-PBS로 행구어 내고 2% Giemsa (BDH Lab. Poole, UK) 염색액에 10분간 염색하고 검경하였다.

### III 결 과

소 염색체 상 NORs의 분포 양상을 분석하기 위하여 ISCNDB(2001) 및 손과 이(1998)가 제시한 핵형을 기본으로 하였다. 한우의 핵형 양상은 60개의 염색체로 구성되어 있으며 58개의 상 염색체는 p-arm이 거의 없는 acrocentric 염색체이고, 성 염색체 X는 2번째 크기인 submetacentric, Y는 28-29번째 크기인 metacentric 양상으로 나타났다.

AgNOR 염색법에 의한 한우 염색체의 NORs의 출현 양상은 Fig. 1과 같다. 이들 NORs 염색체의 확인을 위하여 AgNOR 염색 후 G-banding을 한 결과 한우의 NORs는 2번, 3번, 4번, 11번 및 28번 염색체에 존재하는 것으로 확인되었고, 이들의 분포 위치는 각 염색체의 말단부에 있는 것으로 분석되었다. 또한 NORs의 수는 세포에 따라 최소 2개에서부터 최대 10개까지 나타났다. 이러한 다형적 양상은 개체 간뿐만 아니라 동일 개체 내 세포 간에서도 달리 나타나고 있으며 염색 부위의 크기 또한 차이가 있었다. NORs가 존재하는 염색체의 경우에도 상동염색체에 공히 NORs가 존재하는 양상과 한쪽에만 존재하는 이형 양상을 보이고 있다.

한우 NORs의 구체적 분포 양상을 제시하기 위하여 한우 19두 및 Holstein종 25두를 대상으로 혈액배양으로부터 얻은 증기상 1,460개에 대하여 분석한 바 이의 결과는 Table 1과 같다. 한우의 증기상 570개에 대한 분석 결과 세포당 평균 NORs의 수는 5.63개이었으며, 이들은 2번, 3번, 4번, 11번 및 28번 염색체에 분포하

Table 1. Mean number of AgNORs per cell and per chromosome pair in Korean Cattle and Holstein

Breed	No. of animals	Analyzed meta-phases	Mean no. of AgNORs	Mean no. of AgNORs per chromosome pair				
				2	3	4	11	28
Korean Cattle	19	570	5.63±0.05**	1.42 ± 0.03	1.58 ± 0.02	0.75 ± 0.03	0.55 ± 0.03	1.25 ± 0.02
Holstein	25	890	5.37±0.04	1.20 ± 0.02	1.39 ± 0.02	0.88 ± 0.03	0.52 ± 0.02	1.39 ± 0.03

Values are mean±standard error

\*\* Means in the same column significantly differ at  $P < 0.01$ .

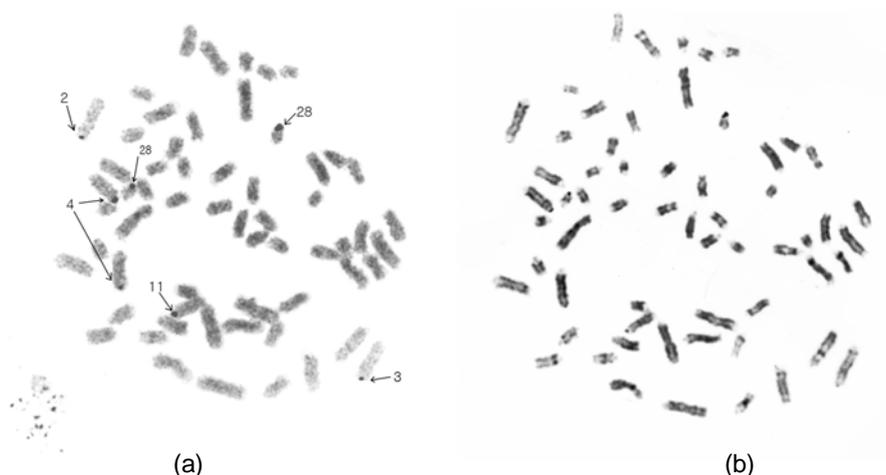


Fig. 1. Metaphase cell showing Korean Cattle chromosomes. (a) Metaphase stained with silver nitrate; arrows indicate NORs chromosomes with silver staining. (b) Same metaphase by G-banding for chromosome identification.

였다. Holstein의 경우 평균 NORs는 5.37개로서 한우와는 유의적 차이를 보였으나 ( $p < 0.01$ ), NORs 출현 염색체는 한우와 동일하였다. 염색체상 NORs의 출현빈도는 두 품종 간 비슷한 경향을 나타내었으며 공히 4번 및 11번 염색체에서의 발현수가 2, 3, 28번 염색체에 비해 낮게 나타났다.

Table 2에서는 근원이 다른 조직 간의 NORs

의 양상을 비교 분석한 것으로 백혈구배양으로부터 얻은 증기상과 귀 조직의 세포배양으로부터 획득한 증기상에 있어 NORs의 분포양상이다. 분석 결과 세포의 종류에 따른 NORs의 숫적 양상에서 섬유아세포의 경우 5.90개로 림프구의 5.50개 보다 유의적으로 많았으나 ( $t < 0.01$ ) NORs가 분포한 염색체는 동일하였고, 염색체 상 NORs의 빈도 또한 약간의 차이를 보

Table 2. Mean number of AgNORs per cell and per chromosome pair on fibroblasts and lymphocytes in cattle

Cells	Analyzed metaphases	Mean no. of AgNORs	Mean no. of AgNORs per chromosome pair				
			2	3	4	11	28
Fibroblast	180	5.90±0.09**	1.38 ± 0.04	1.53 ± 0.04	1.02 ± 0.05	0.72 ± 0.04	1.16 ± 0.04
Lymphocyte	1460	5.50±0.05	1.31 ± 0.03	1.49 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.54 ± 0.03	1.32 ± 0.03

Values are mean±standard error

\*\* Means in the same column significantly differ at  $t < 0.01$ .

Table 3. Mean number of AgNORs per cell and per chromosome pair in male and female cattle

Sex	Analyzed metaphases	Mean no. of AgNORs	Mean no. of AgNORs per chromosome pair				
			2	3	4	11	28
Male	540	5.68±0.04**	1.10 ± 0.02	1.45 ± 0.02	1.00 ± 0.03	0.65 ± 0.03	1.33 ± 0.03
Female	920	5.35±0.04	1.38 ± 0.02	1.47 ± 0.02	0.78 ± 0.02	0.41 ± 0.01	1.27 ± 0.02

Values are mean±standard error

\*\* Means in the same column significantly differ at  $t < 0.01$ .

이기는 하나 거의 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 3은 소의 성별 간 NORs의 양상을 비교 분석한 것으로 수컷 18두와 암컷 26두에 대한 분석 결과이다. 소에 있어 수컷의 경우 평균 5.68개의 NORs가 나타났고, 암컷은 평균 5.35개의 NORs가 나타나 암수 간에 NORs의 수적 차이가 있는 것으로 분석되었다 ( $t < 0.01$ ). 반면 NORs가 분포한 염색체는 동일하게 나타났고, 염색체 상 NORs의 출현 빈도 역시 암수 간에 유사하게 나타났다.

#### IV 고 찰

NORs는 핵인 형성부위로서 18S + 28S rRNA 합성에 주된 역할을 하는 유전자를 함유하고 있는 곳으로 특정 염색체 부위에 존재한다. 염색체 상에 AgNOR 염색은 이전 간기 상태에서 단백질의 전사가 활성화된 NORs의 위치를 나타낼 뿐만 아니라 중기상태에서 AgNOR 염색 부위의 크기는 NORs의 활성도를 간접적으로 나타내기도 한다 (Zurita 등, 1998). NORs에 대한 많은 연구 보고에서 종 간, 개체 간 및 세포 간에 심한 양적 변이 양상을 제시하고 있는데 이러한 변이의 원인은 개체 간 NORs에 있어 rDNA 함량의 차이가 있기 때문이거나 (Miller 등, 1977; Tantravahi 등, 1981), ribosomal 유전자의 수와 관계없이 전사의 활성도에 기인한 결과로서 예를 들어 세포의 유전적 조성에 따라서 혹은 세포 분화 과정 중 활성도가 변함에 따라 달리 나타날 수 있는 현상이며 (Schwarzacher 등, 1978; Hartung 등, 1979), 또는 AgNOR 염색과정 자체에 기인된 변이로서 동일 세포에서도 염색체의 분열 상태가 다름에 따라 일어날 수 있는 결과로 볼 수 있다 (Bloom and Goodpasture, 1976; Zakharov 등, 1982).

본 연구에서 제시한 한우의 NORs 분포 양상 역시 품종 간, 개체 간 및 세포 간에 다형적 변이 양상을 보이고 있으나 동일 표본 내 세포들 간의 변이 정도는 그리 심하지 않은 상태이다. 한우의 중기 세포 당 평균 NORs 수는 약 5.6개로서 세포에 따라 2개에서부터 10개까지

나타났으며, 분석된 최빈수(modal number)는 4-7개였다. 이들의 분포 양상은 2번, 3번 4번, 11번 및 28번 염색체에 존재하였는데 2번, 3번, 28번 염색체의 경우 거의 모든 세포에서 1개 이상이 나타났으며, 4번, 11번 염색체에서는 50% 정도의 세포에서만 분포하는 것으로 나타났다. 이러한 양상은 Diamond 등(1975)이 제시한 소의 NORs가 4-6개, Henderson과 Bruere (1979)가 보고한 Holstein과 Charolais의 NORs가 6-7개 및 Mayr 등(1987)이 분석한 세 품종 축우(Fleckvieh, Braunvieh, Grauvieh)의 NORs 수가 평균 6.06개와 거의 일치하는 결과이나 Di Berardino 등(1979)이 보고한 Holstein 종에 있어 평균 7.7개의 NORs와는 다소 차이를 보였다. NORs의 분포 양상에 있어서는 대부분의 연구들에서 품종과 관계없이 2번, 3번, 4번, 11번 및 28번 염색체에 존재함을 보고하였고 (Di Berardino 등, 1981; Mayr 등, 1987, 1989) 본 결과에서도 이와 동일한 양상을 보였으나, Henderson과 Bruere(1979)는 2, 3, 4, 5, 28번 염색체, Di Berardino 등(1979)은 2, 3, 4, 11, 29번 염색체 및 Gallagher 등(1999)은 *in situ hybridization* 방법에 의해 2, 3, 4, 11, 25번 염색체에 분포함을 보고하여 NORs가 존재하는 1쌍의 소형염색체에 대해서는 다소의 이견이 있다. 염색체별 평균 NORs 수는 한우의 경우 4번, 11번 염색체에서 상대적으로 낮은 빈도를 보였는데 반해 Mayr 등(1987)은 Simmental 종에서 2번, 3번 염색체에서 상대적으로 낮은 빈도로 분석되어 본 결과와는 차이가 있었다. 이는 본 분석에서 Holstein과 한우 간에도 염색체별 평균 NORs의 빈도 차이가 있었는 바 품종 간 차이에 기인된 결과로 생각된다. 한편 근원이 다른 세포 간의 비교에서 세포배양을 통한 섬유아세포로부터의 중기상과 림프구로부터의 중기상에서 섬유아세포가 림프구에 비해 훨씬 높은 NORs의 빈도를 나타내었는데 이는 *in vitro* culture에 있어 귀 조직으로부터 섬유아세포의 NORs 활성도가 lymphocytes의 활성도보다 높다는 것을 의미한다 하겠다. 이러한 양상은 Di Berardino 등(1979)이 소의 lymphocytes와 fibroblasts 세포에서 NORs의 빈도 분석에서 fibro-

blasts에서의 NORs가 평균 8.1개, lymphocytes에서 평균 7.5개로 나타난 결과와 동일한 경향을 보였다. 성별 간 NORs의 분석에서는 본 연구의 경우 수컷의 NORs(5.7개)가 암컷(5.4개)에 비해 높은 결과를 보여 암수 간에 차이가 있으므로 나타났으나 Di Berardino(1979)의 경우 이의 차이가 없음을 보고하였다. 암수 성에 따른 NORs의 비교 연구는 다른 종에서도 거의 찾아보기 힘들었으며 본 결과에 대해서도 단호한 결론을 내리기에는 어려움이 많아 이에 대해서는 보다 체계적이고 다양한 연구로서 앞으로 구명되어야 할 과제인 것으로 생각된다.

### V. 요 약

Nucleolus Organizer Regions(NORs)는 핵인을 형성하는 염색체의 특정 부위로서 rRNA 합성에 관여하는 리보솜 유전자를 함유하고 있으며 이의 활성화가 일어나는 곳이다. 본 연구에서는 한우의 NORs의 양상을 제시하기 위하여 AgNOR 염색법을 이용하여 한우의 NORs 수와 NORs 염색체 및 이의 분포 위치 등을 구명하고 한편으로 소의 품종별, 성별 및 근원이 다른 세포간의 NORs 양상을 비교 분석하였다. 본 분석에 이용된 공시축은 한우 및 홀스타인 암수 44두로서 이들의 혈액배양으로부터 염색체를 분리하였다. 조직간 세포의 NORs 비교를 위하여 귀 조직으로부터 배양된 섬유아세포의 염색체와 백혈구 배양으로부터 분리된 염색체를 분석하였다. 분리된 중기상에 AgNOR 염색 후 G-banding을 한 결과 한우의 NORs는 2번, 3번, 4번, 11번 및 28번 염색체에 존재하고, 이들의 분포 위치는 각 염색체의 말단부에 위치한다. 한우 NORs 수는 세포에 따라 최소 2개에서부터 최대 10개까지 나타나며 평균 5.6개였다. 이러한 다형적 양상은 개체 간뿐만 아니라 동일 개체 내 세포 간에서도 달리 나타나며 발현의 크기 또한 차이가 있다. 품종 간 NORs의 비교 분석에서 한우의 NORs 수가 Holstein(5.4개)에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 근원이 다른 세포간 비교에서는 fibroblasts(5.9개)에서의 NORs 수가 lymphocytes(5.5개)에 비해

높은 빈도를 보였고, 성 간에는 수컷(5.7개)이 암컷(5.4개)에 비하여 많은 NORs 수를 나타내었다. 그러나 이들의 염색체상 분포 양상에서는 공히 동일한 염색체에 출현되었으며 염색체상 출현 빈도에서도 세포들 간에 거의 차이가 없었다.

### VI 사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업지역협력연구센터의 연구비 지원에 의한 것입니다.

### VII 인 용 문 헌

1. Bloom, S. E. and Goodpasture, C. 1976. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Humangenetik* 34:199-206.
2. Bloom, S. E., Briles, W. E., Briles, R. W., Delany, M. E. and Dietert, R. R. 1987. Chromosomal localization of the major histocompatibility (B) complex (MHC) and its expression in chickens aneuploid for the major deoxyribonucleic acid microchromosome. *Poultry Sci.* 66:782-789.
3. Derenzini, M. and Ploton, D. 1991. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int. Rev. Exp. Pathol* 32:150-192.
4. Di Berardino, D., Arrighi, F. E. and Kieffer, N. M. 1979. Nucleolus organizer regions in two species of Bovidae. *J. Heredity* 70:47-50.
5. Di Berardino, D., Iannuzzi, L., Bettini, T. M. and Matassino, D. 1981. Ag-NORs variation banding homologies in two species of bovidae: *Bubalus bubalis* and *Bos taurus*. *Can. J. Genet. Cytol.* 23: 89-99.
6. Di Meo, G. P., Iannuzzi, L., Ferrara, L. and Rubino, R. 1991. Identification of nucleolus organizer chromosomes in goat. *Caryologia* 44:309-316.
7. Di Meo, G. P., Iannuzzi, L., Perucatti, A. and Ferrara, L. 1993. Identification of nucleolus organizer chromosomes in sheep. *Cytobios* 75:183-190.
8. Diamond, J. R., Dunn, H. O. and Howell, W. M. 1975. Centromeric and telomeric staining regions in the chromosomes of cattle(*Bos taurus*). *Cytogent. Cell Genet.* 15:332-337.

9. Evans, H. J., Buckland, R. A. and Pardue, M. L. 1974. Location of the genes coding 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma* 48:405-426.
10. Gall, J. G. and Pardue, M. L. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64:600-604.
11. Gallagher Jr., D. S., Davis, S. K., De Donato, M., Burzlaff, J. D., Womack, J. E., Taylor, J. F. and Kumamoto, A. T. 1999. A molecular cytogenetic analysis of the tribe Bovini with an emphasis on sex chromosome morphology and NOR distribution. *Chromosome Res.* 7:481-492.
12. Goodpasture, C. and Bloom, S. E. 1975. Visualisation of nucleolus organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 55:37-50.
13. Hartung, M., Mirre, C. and Stahl, A. 1979. Nucleolar organizers in human oocytes at meiotic prophase I, studied by the silver-NOR method and electron microscopy. *Hum. Genet.* 52:295-308.
14. Henderson, A. S., Warburton, D. and Atwood, K. C. 1972. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *PNAS* 69:3394-3398.
15. Hendeson, L. M. and Bruere, A. N. 1979. Conservation of nucleolus organizer regions during evolution in sheep, goat, cattle and aoudad. *Can. J. Genet. Cytol.* 21:1-8.
16. Howell, W. M. 1977. Visualisation of ribosomal gene activity: silver stains proteins associated with rRNA transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* 62:361-367.
17. Howell, W. M. and Black, D. A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia* 36:1014-1015.
18. Hubbel, H. R. 1985. Silver staining as an indicator active ribosomal genes. *Stain Technol.* 60:285-294.
19. Iannuzzi, L., Di Meo, G. P. and Perucatti, A. 1996. Identification of nucleolus organizer chromosomes and frequency of active NORs in river buffalo (*Bubalus bubalis* L.). *Caryologia* 49:27-24.
20. ISCNDB 2000. 2001. International system for chromosome nomenclature of domestic Bovids. *Cytogenet. Cell Genet.* 92:283-299.
21. Mayr, B. and Czaker, R. 1981. Variable position of nucleolus organizer regions in Bovidae. *Experientia* 37, 564-565.
22. Mayr, B., Gruber, K., Brem, G. and Mayrhofer, G. 1989. Genetic studies on nucleolus organizer regions (NORs) in cattle. *Genet. Res.* 53:111-118.
23. Mayr, B., Schleger, W. and Auer, H. 1987. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the chromosomes of cattle. *J. Heredity* 78:206-207.
24. Mellink, C. H. M., Bosma, A. A. and De Haan, N. A. 1994. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridization signals in six breeds of domestic pig. *Hereditas* 120:141-149.
25. Mellink, C. H. M., Bosma, A. A., De Haan, N. A. and Macdonald, A. A. 1992. Numerical variation of nucleolar organizer regions after silver staining in domestic and wild *Suidae* (Mammalia). *Animal Genetics* 23:231-239.
26. Miller, D. A., Tantravahi, R., Dev, V. G. and Miller, O. J. 1977. Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *Am. J. Hum. Genet* 29:490-502.
27. Pich, A., Chiusa L. and Margaria, E. 2000. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron* 31:133-141.
28. Schwarzacher, H. G., Mikelsaar, A. V. and Schnedl, W. 1978. The nature of Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis, and meiosis. *Cytogenet. Cell Genet.* 20:24-39.
29. Schwarzacher, T., Mayr, B. and Schweizer, D. 1984. Heterochromatin and nucleolus organizer region behaviour at male pachytene of *Sus scrofa domestica*. *chromosoma* 91:12-19.
30. Stefanova, V. N. 1984. Quantitative characteristics of the nucleolus organizer region of the chromosomes in the domestic pig. *Tsitologija* 26:40-45.
31. Tantravahi, U., Breg, W. R., Wertelecki, V., Erlanger, B. F. and Miller, O. 1981. Evidence for methylation of inactive human rRNA genes in amplified regions. *Hum. Genet.* 56:315-320.
32. Toga-Piquet, C., Henderson, A. S., Grillo, J. M. and Stahl, A. 1984. Localisation des genes ribosomique et activite nucleolaire dans les lymphocytes du porc (*Sus scrofa domestica*) stimules par la phytohemagglutinine. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences(III)* 289:383-6.
33. Trere, D. 2000. AgNOR staining and quantification. *Micron* 31:127-131.

34. Zakharov, A. F., Davudov, A. Z., Benjush, V. A. and Egolina, N. A. 1982. Polymorphism of Ag-stained nucleolus organizer region in man. *Human Genetics* 60:334-339.
35. Zurita, F., Jimenez, R., Burgos, M. and Diaz, del la G. R. 1998. Sequential silver staining and *in situ* hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions, a hypothesis for NOR structure and function. *J. Cell Sci.* 111:1433-1439.
36. 손시환, 이재익. 1998. 고분염 분석법(high-resolution banding)에 의한 한우 염색체의 표준 표지 설정. *한국축산학회지* 40(5):467-484.  
(접수일자 : 2003. 5. 19. / 채택일자 : 2003. 7. 18.)