

人類染色體研究에 있어서의 螢光染色法과 分染法

姜 永 禧

(서울대·문리대)

Fluorescence and Heating Giemsa Staining studies of Human Chromosomes

Yung Sun Kang

(Dept. of Zoology, Seoul National University)

(1972. 11. 24 수리)

작년 9월 2~4일에 프랑스, 파리에서 사람의 染色體에 관한 國際會議(The Standardization Conference on Human Cytogenetics)가 열렸는데, 이것은 Denver, London 및 Chicago會議(1960, 1963, 1966)에 계속해서 개최된 4번째 會議가 된다. 계속해서 이틀 후인 9월 6일부터 1주일간 같은 장소인 파리에서 제4차 國際人類遺傳學會가 개최되었다. 이들 양 會議에서 사람의 染色體에서 밴드 구조를 얻을 수 있는 特殊染色法과 그에 따른 染色體의 새로운 同定과 命名法이 화제의 중심이 되었던 것이다. 이 사람은 다행히 이들 회의에 참석할 기회를 얻어 이 문제를 토의하는 회합에 참석했기에 여기 간단히 그 문제를 해설해볼까 한다.

1956년 Tjio 및 Leven이 사람의 染色體의 정확한 수를 확인했고, 그 뒤 Denver 및 London 國際會議를 거쳐서 사람 染色體의 同定과 命名에 관한 國際의인 規約이 정해지기는 했지만, 23쌍의 사람의 染色體 하나 하나를 정확히 구분하기란 어려운 일로 되었다. 종래의 방법으로 얻어진 사람의 染色體를 顯微鏡 밑에서 보이는 형태에 따라 A~G의 7그룹(22쌍)과 性染色體 1쌍(X-Y, X-X)으로 구분을 하지만 실제로 확신을 갖을 수 있는 것은 常染色體에서 6쌍과 Y染色體만이였다. 다음 1960년대에 染色體 연구에 널리 이용되어온 오토라디오그라피(Autoradiography)는 DNA 複製의 시간적인 차이를 통해 染色體 固定에 큰 도움을 주었지만 실제로 정확한 식별이 가능케 한 것은 常染色體쌍 5과 여성의 X染色體 1개만이라고 하겠다. 이렇게 생각한다면 나머지 11쌍의 常染色體와 1개의 X染色體는 1970년에 이르기까지 정확한 同定은 불가능했다고 말할 수 있다. 그러나 1970년을 전후해서 이 문제에 관한 정세는 일변했으며, 어더가지 特殊染色法이 개발되어 사람의 染色體 하나 하나를 정확히 식별할 수 있는 단계에 접어들게 되었다. 그중에서도 대표적 것이 키나크린 螢光染色法(quinacrine fluoresce-

nce staining method)와 김자분染法(heat-giemsa staining method)이며 이들 방법을 통하던 染色體의 縱軸에 따라 특유한 明暗의 밴드 패턴(banding patterns)이 나타나게 되어, 사람만이 아니라 고등한 동물의 모든 染色體가 쉽게 同定이 된다는 것이다.

1. 키나크린 螢光染色法

Caspersson 등(1968)은 Vicia, Trillium, Chinese hamster 등의 染色體를 키나크린(quinacrin) 또는 키나크린 마스타드(quinacrin mustard, QM)로 螢光染色을 시켜서 특정한 染色體의 특징인 부위가 선택적으로 강하게 螢光을 발함을 발견하였다. 그들은 이와 같은 특이한 현상은 螢光物質이 核酸의 鹽基인 GC/AT 비가 높은 DNA의 부위와 우선해서 결합하는 때문이 아닌가 추측하고, 다른 종류의 染色體에도 응용이 가능한 뿐 아니라 특정한 染色體 부위를 同定하는데도 효과적이라는 점을 암시한바 있다.

그후 그들은 다시 顯微鏡觀察만이 아니라 螢光顯微分光光度計를 작성해서 螢光밴드를 定量的으로 측정하는 일을 시도했다. Caspersson 등이 觀察한 Vicia는 體細胞에서 6쌍의 染色體를 지니고 있는데, 이를 分析해보면 中間狹窄과 附隨體가 달려있는 비교적 큰 1쌍의 染色體(M-chromosome)와 5쌍의 작은 染色體(S-chromosome)로 이루어져 있다. 그런데 이들의 分裂中期를 QM으로 처리하면 모든 染色體는 그 姊妹染色體의 相同인 부분에 동일한 螢光을 발하는 線條미지 밴드가 觀察되었다. 이들의 螢光패턴은 각 染色體에서 특징적이며, 再現性도 있음이 증명되었다. 形態적으로 거의 차이를 찾아보기 어려운 S染色體 중의 3쌍의 작은 染色體에 있어도 그들 사이에 명백하게 구별되는 螢光패턴을 찾아볼 수 있다는 것이다. 한편 M染色體에 있어도 수 많은 分裂中期像에서 螢光밴드가 일치하며, 定量的으로도 동일함을 밝혔다. 또 Caspersson 등(1969,

1970)은 Vicia, Trillium 등을 사용한 연구를 통하여 螢光染色에 있어 키나크린 보다 QM이 鮮明度, 安定性, 再現性이 우수하다는 점을 밝혔다. 그것은 QM쪽이 DNA와 강하게 결합되는 까닭이며, 결과적으로 靛색이 잘 안되고 사용하는 농도도 알계 해도 무방하며 染色도 쉽게 잘 된다는 것이다.

이 방법은 그 뒤 Zech(1969), (George 1970) 등에 의해 처음으로 사람에게 응용되었으며, 특히 血液培養에서 얻은 分裂中期像에서 Y染色體의 長腕의 遠位 부분이 특별히 螢光을 강하게 나타냄을 밝혔다. 실제로 그들이 사용한 방법은 血液培養을 한 뒤 空氣乾燥法(air drying method)으로 만든 顯微標本(preparat)을 pH가 4.1인 macilvaine 磷酸緩衝液에 5분간 담근 뒤, 신선한 QM(250~300µg/ml)으로 染色하고, 다시 緩衝液으로 씻은 뒤 카바글라스로 마운트해 가지고 螢光顯微鏡으로 觀察한 것이다. 그 결과 B와 C染色體는 다른 染色體에 비해 비교적 강하게 螢光을 발사하지만, F 및 G染色體는 螢光의 발색이 약하며, Y染色體 長腕의 遠位 부분이 특별히 강하게 발광함을 볼 수 있었다. Pearson등(1970)은 정상인 남자와 XYY의 남자를 재료로 血液培養만이 아니라 口腔粘膜炎의 塗抹標本도 함께 만들어 관찰했다. 口腔粘膜炎을 메타놀(methanol) 또는 50 : 50의 알코홀-에테르(ether)에 固定하여, 이를 0.5% 키나크린에 5분간 담근 뒤 흐르는 물에서 씻고 pH 5.5의 緩衝液으로 封入한다. 이와같이 해서 만든 顯微標本을 螢光顯微鏡으로 觀察하면 Y染色體의 長腕의 遠位부분이 강하게 螢光을 발하는 점은 血液培養에서와 동일하다. XYY 남자의 分裂中期像에서는 2개의 Y染色體가 명백히 식별되며, 또한 명백하게 螢光을 발함을 본다.

한편 Barlow 및 Vosa (1970)는 사람 精子의 塗抹標本을 만들고 건조시킨 뒤 에타놀로 5분간 固定시키고 키나크린 (0.5~1%) 또는 QM(0.005%)으로 20분간 染色해서 관찰했다. 이 때 거의 반수(40.2~45.1%)의 精子에서 螢光을 강하게 발하는 小體(F-小體, fluorescent body, F-body)가 발견된다. 그들은 이 實驗을 통하여 F-小體를 간직하는 精子가 Y染色體를 가진 精子이고, 이것이 없는 것은 X染色體를 가진 精子라고 추정해 였고. 그 뒤 血液塗抹標本, 羊水浮遊細胞, 毛根細胞 등에서도 F-小體가 관찰되었다. (Conen 1971, Thuline 1971, Rook 등 1971, Schwinger 1971). Conen 등(1971) 이 시도한 血液塗抹標本 작성에 있어서는 우선 100% 메타놀로 5분간 固定하고 空氣乾燥를

시킨 뒤, 0.5%의 키나크린으로 5분간 染色을 했다. 靛색이 잘난 材料는 흐르는 물에서 5분 정도 씻은 뒤, pH 5.5의 磷酸緩衝液으로 마운트 封入시켜 螢光顯微鏡으로 관찰했다. 이와 같이 해서 만들어진 프레파라트에서 남자의 경우는 觀察된 淋巴球의 80.1%에 F-小體가 보이지만 여자의 경우는 0.4%에서만 보였다고 한다. 또 氏는 한 거름 나가 2n=47의 染色體數를 가지며, XYY인 小兒의 淋巴球細胞를 조사해서 32%라는 비교적 높은 율로 2개의 F-小體가 나타남을 발견했다.

다음 그림과도 같이 口腔粘膜炎塗抹標本을 사용해서 性染色質(sex chromatin) 및 F-小體의 檢사를 함께 실시한 경우, X染色體와 Y染色體의 數의 異常을 쉽게 스크리닝할 수 있게 되었다. 원래 性染色質이란 鹽基性色素에 진하게 染色되는 分裂間期の 細胞核에서 보이는 小體이며, 不活性化된 X染色體에서 온 것이기에 보통 X染色體의 수보다 1개 적게 나타난다. 이와같은 원리를 이용해서 이전부터 性染色質스크리닝이 활발하게 추진되어왔다. 따라서 그림과도 같이 정상인 남자,

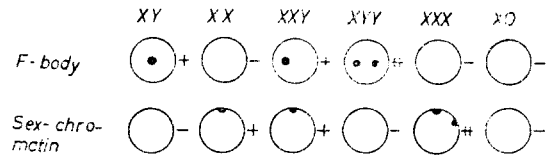


그림 1. 사람 染色體 正常 및 異常個體에서 나타나는 F-小體와 性染色質.

정상인 여자, Klinefelter症候(XXY), XYY 남자, Triplo-X 여자, Turner症候(XO)등이 쉽게 식별되며 性染色體異常의 유무를 판단할 수 있게 되었다. 그런데 이 중에서 XYY 남자를 찾아내는 방법으로는 증대는 血液培養을 한 뒤 分裂中期의 染色體를 분석하지 않으면 안되었던 것인데, 상기한 F-小體 檢사를 스크리닝에 응용하면 훨씬 간편하게 이를 분간할 수 있다는 것이다. 즉 XYY 남자에서 性染色質 檢사는 네가팁으로 나와서, 정상인 남자와 구별이 안되기에 血液培養을 통해 染色體 조사를 해왔던 것이다.

淺香등(1972)은 실제로 F-小體 檢사를 통해 XYY 남자의 스크리닝을 시도했다. 그들은 非行少年集團에서 각 계층으로부터 口腔粘膜炎을 수감받은 것으로 숨어내어 塗抹標本을 만들고 메타놀로 固定한 다음 우선 0.005% (5mg/100ml)의 QM에 5분간 담그고 그 뒤 흐르는 물

에 4~5번 정도 씻는다. 다음 pH=5.5의 磷酸緩衝液을 슬라이드 글라스 위에 언진 뒤 카버 글라스를 덮어 가지고 暗室에서 螢光顯微鏡을 써서 觀察한다. 이와같은 방법은 종전에 실시해온 血液培養을 통한 染色體 조사의 경우보다는 훨씬 간편한 방법임을 쉽게 알 수 있다. 이들이 실제로 非行少年集團 779명 중에서 身長이 큰 56명을 골라서 F-小體 스크리닝을 통해 2명의 異常者를 발견하고 다음 血液培養을 통한 染色體分析을 실시하여 XYY 남자임을 확인했다는 것이다. 그림에도 보는바와 같이 F-小體의 출현은 分裂中期에서 보이는 Y染色體의 長腕의 遠位 부분이 강하게 螢光을 발하는 때문에 나타나는 것이므로 Y染色體 1개를 가지는 정상인 남자와 Klinefelter症候인 사람에서는 F-



그림 2. 螢光을 나타내는 正常 男子의 1個의 Y染色體(淺香 1972)

小體는 1개(single F-body) 밖에 나타나지 않지만(그림 2, 4) 2개의 Y染色體를 지니는 XYY 남자에서는 2개의 F-小體(double F-body)가 나타남을 본다. (그림 3, 4) Y染色體의 기리는 個人的 變異가 심한 것이지만 Bobrow(1971), 淺香(1972) 등에 따르면 Y染色體가 길 경우에는 螢光을 발하는 부분도 길다는 점이 밝혀졌으며, 이제까지 연구된 범위에서는 이 부분에는 별로 遺傳情報가 포함되어 있지 않는 것으로 생각되고 있다

이와 같이 해서 螢光染色은 F-小體를 발견하여 Y染色體의 식별에 가장 유효한 무기가 되고 있지만, 한편 Y染色體 이외에도 제 3染色體의 動原體 근처, 제 13~15 그리고 제 21~22 染色體의 附隨體 혹은 短腕에서 강한 螢光을 발하는 부분이 존재한다는 점이 Casper-



그림 3. 螢光을 나타내는 XYY 男子의 2個 Y染色體(淺香 1972)

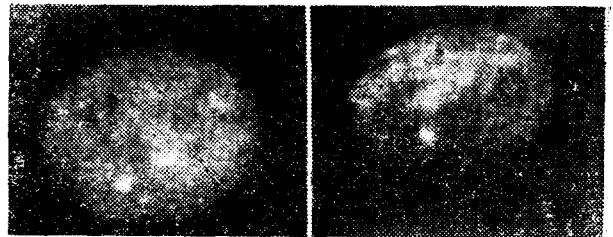


그림 4. 口腔粘膜炎 塗抹標本에서 보이는 F-小體(淺香 1972)

sson 등(1970), Schnedl(1971) 등에 의해 밝혀졌다. 또 Caspersson 등(1970)은 같은 B그룹에 속하는 제4와 5染色體는 螢光染色의 강도를 定量的으로 측정할 경우 染色體의 長軸 方向에 특유한 커어브가 그려지며, 서로 명백히 구별이 됨을 발견했다. 좀 더 자세히 말한다면 제4染色體의 경우에는 가장 강한 螢光 부분이 動原體에 접하고 있는가 하면, 제5染色體에서는 그 부분이 長腕의 중앙에 위치하고 있다는 것이다. 또 그들은 Cri du chat 疾候에서 短腕의 일부가 缺失되어 있는 것은 제5染色體라는 점도 螢光染色을 통해 확인했으며, 또 같은 방법으로 제21과 22染色體의 螢光과편의 차이로 慢性骨髓性인 白血症에서 보이는 Ph¹ 染色體가 제22의 長腕의 일부가 缺失된 것이라는 점도 밝혀져 있었다. 한편 Mikkelsen(1971)은 제21染色體의 trisomy 核型을 지니는 Down 症候의 경우 5개의 G 그룹의 染色體중 長腕이 보다 강하게 螢光을 발하는 것 3개

와 약한 螢光을 발하는 것 2개가 식별되지만 앞의 것이 제21染色體라고 주장한 바 있다. 따라서 螢光染色을 통해볼 때 제21染色體에서 특징적인 螢光부위를 지니는 染色體가 한개 결해져 있다는 것이다. 이렇게 해서 Caspersson 등(1971)이 주장하다시피 螢光染色을 통해 볼때 사람의 染色體, 제1~22, 그리고 X, Y 染色體에 나타나는 24종류의 螢光패턴은 각각 특징이 있어 전부를 정확하게 同定할 수 있게 되었다. 따라서 과거 일반적인 방법으로는 同定이, 어려웠던 제6~12 및 X 染色體가 속하는 C그룹, 제13~15의 D그룹, 제19~20의 F그룹의 각 染色體 사이의 식별도 가능하다는 것이다.

Pearson 등(1971)에 따르면 사람 이외의 哺乳動物의 染色體에 螢光染色을 시도한 경우 Y染色體가 강하게 螢光을 발하는 것은 고릴라(Gorilla) 만이며, 常染色體에 강하게 螢光을 발하는 부위가 인정되는 것은 침팬지(Chimpanzee)와 고릴라라 한다. 그러나 약한 螢光이지만 모든 동물에서 특유한 螢光패턴이 나타나기에 급년에 들어와서는 實驗動物로 많이 쓰이는 쥐, 생쥐, 햄스타 그 밖의 哺乳動物에도 이 방법이 널리 응용되고 있다.

2. 김자分染色法

이 방법은 Pardue 및 Gall(1970)에 의한 마우스 사트라이트 DNA(mouse satellite DNA)의 연구에서 시작된다. 이들은 마우스의 DNA로부터 比重이 작은 分畫(사트라이트 DNA)를 분리하여, 熱變性 후 직접 또는 이를 鑄型으로 해서 合成한 RNA를 알카리變性시킨 標本에 접촉시켜서 染色體에로의 結合을 발견한 것이다. 실제로 프페파라트 작성중에 65°C의 상태에서 2×SSC溶液(0.3M食鹽+0.03M 구연산 소다)속에서 16~18시간 처리하는 것이었다. 實驗에 사용한 사트라이트 DNA와 相補의인 RNA는 일찌기 放射性同位元素로 標識해 두었다가 오토레디오그라피에 의해 結合部位를 검출하는 것이다. 이와같은 實驗의 결과로 사트라이트 DNA는 Y染色體를 제외한 모든 染色體의 動原體 부근에 局在한다는 사실 및 그 부분이 김자(giemsa)色素에 染色이 진하게 잘 된다는 점이 명백해졌다. 다음 Arrighi 및 Hsu(1971)와 Yunis등(1971)은 프페파라트 작성 중에 65°C 상태에서 HCl, RNase, NaOH의 처리(denaturing DNA) 및 Saline citrate 溶液 속에서 DNA를 再生renaturing)함으로써 構造적인 異質染色質(constitutive heterochromatin)

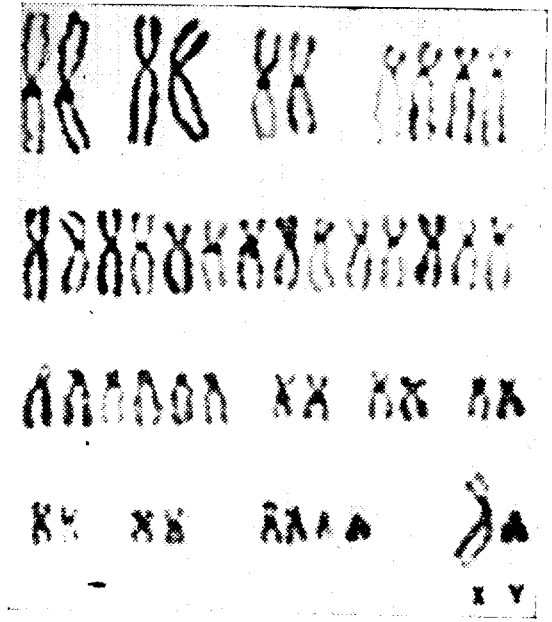


그림 5. 김자分染色에 의한 사람染色體의 L-밴드 (Arrighi 및 Hsu 1971)

의 부위가 김자染色 후에 잘 관찰됨을 발견했다. (그림 5) 이들의 방법은 널리 응용되었으며, 이를 통해 흥미 있는 知見도 많이 알아내게 되었다. 이렇게 해서 김자分染色法은 발전했으며 Dutrillaux 및 Lejeune(1971)에 이르러 본격화되었다. 이들은 細胞를 크롤로포름을 간직하는 醋酸알코홀溶液으로 同定하고, 이를 다시 89°C의 磷酸緩衝液으로 10분간 처리한 후 김자로 染色하는 간단한 방법을 통하여 染色體 위에 미묘한 밴드 구조가 나타남을 보았다(banding pattern). 이 밴드구조는 각 染色體에서 특징적이며, 모든 染色體가 확실하게 同定될 뿐 아니라 染色體 일부분까지도 식별이 가능하게 되었다.

한편 Sumner, Evans 및 Buckland(1971)는 밴드 구조를 染色해 내는데 보다 간단한 방법을 강구해냈다. 즉 標本을 직접 60°C의 2×SSC에 1시간 담겨둔 뒤 김자로 染色을 하는 방법인데 이를 세상에서 ASG法(acetic-saline-giemsa method)라 부른다. 극히 再現性이 풍부한 때문에 이 방법 역시 널리 애용되고 있다 또 Schnedl(1971)은 酢性소다를 처리한 뒤, 1/5M의 Sörensen 磷酸緩衝液을 사용했고, Drets 및 Shaw(1971)은 12×SSC液을 써서 선명하게 나타나는 밴드 구조를 染色體에서 얻는데 성공하고 있다. 또 한편 Patil 등 (1971) 등은 무처리인 標本을 pH 9의 김자液

으로 染色해서 진하고 엷은 밴드 모양이 나타남을 보았는데 이를 김자9法(giemsa 9 method)라고 불렀다. 최근 영국의 Seabright 여사(1971, 1972)는 트립신(trypsin) 처리후, Leischman 染色을 해서 잔으로 선명한 밴드구조를 얻고 있다(그림 6).

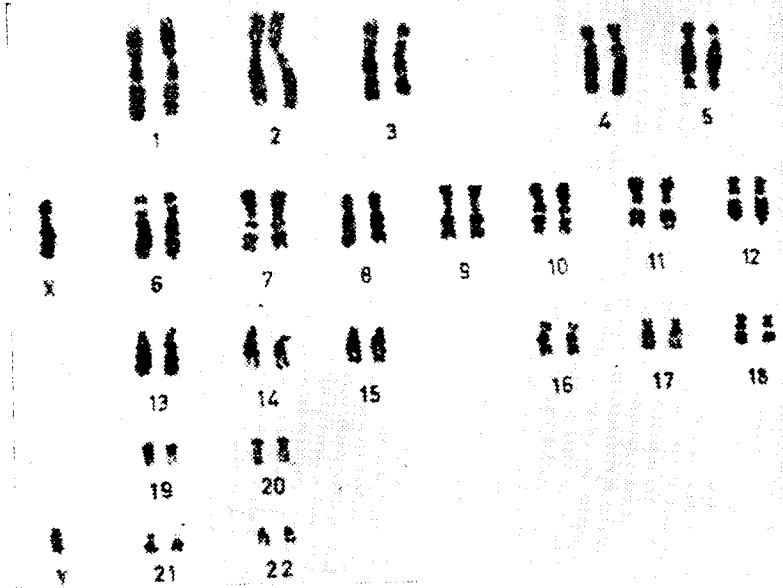


그림 6. 김자9법에 의한 사람 染色體의 G-밴드(濃染) 및 R-밴드(淡染) (Sehnedl 1971)

작년 9월 Paris에서 개최된 제4차 國際人類遺傳學會에서는 김자9法에 관해 Patil 등, Gagné 등, Lomholt 및 Mohr 그리고 Drets 및 Shaw가 각각 자신들이 개발한 여러가지 김자9法과 그를 통해 얻어지는 밴드구조의 顯微鏡寫眞을 전시해서 크게 센세이션을 일으키게 했다. 다음에 이들의 방법을 보다 상세하게 설명해 볼까 한다.

1) Patil, Merrick 및 Lubs(1971)의 김자9法

- ㄱ. 15%의 양아지血清을 가한 McCoy's 5A培養液에서 細胞를 63~70시간 培養한다.
- ㄴ. 低調液 KCl(0.075M/liter) 처리하면서 하베스한다(harvesting).
- ㄷ. 메타놀과 醋酸混液(3 : 1)으로 固定한다.
- ㄹ. 空氣乾燥시킨다.
- ㅁ. 김자9染色

2ml의 김자9原液(Harleco Giemsa Blood Stain Azure A stock solution)과 2ml의 0.14M Na₂HPO₄ (Na₂HPO₄·12H₂O 5g을 100ml의 증류수에 난것)를 96 ml의 증류수에 섞어서 김자9染色液을 만든다. 染色液

의 pH를 맞추는 것이 중요하며, citric acid 혹은 sodium hydroxide를 첨가해서 pH를 5.0~12.0이 되도록 조절한다.

이 방법에서는 pH를 조절하는 것과 染色시간을 얻어주는가가 가장 중요한 일이다. 실제로 pH 9.0 이하에서는 밴드구조가 나타나지 않으며 pH 10.0 이상에서는 染色體에 심한 피해를 준다. 그래서 pH는 9.0 정도로 하여 다음은 染色 시간을 조절한다. 染色 시간을 1~2분 정도 줄 경우에는 C-밴드(C-band)가 잘 나타나고, 시간을 4~10분으로 하면 QM螢光染色에서 보이는 바와 같은 밴드구조를 보여 준다. 만일 染色 시간을 더 늘려서 15~30분 정도로 하면 밴드구조는 전혀 나타나지 않고 染色體 전체에 일양하게 김자9染色이 된다.

2) Gagné, Tanguay 및 Laberge(1971)의 김자9法

- ㄱ. 血液 전체로 短期培養을 한다.
- ㄴ. 메타놀과 醋酸(3 : 1)이나

45% 醋酸으로 固定한다.

ㄷ. 0.014M의 NaOH液에 15~20초 동안 담근 뒤 70%와 95% 에타놀을 통해 빨리 脫水시켜 가지고 空氣乾燥시킨다.(denaturation).

ㄹ. 6×SSC 溶液에 담겨가지고 18 내지 20시간의 66°C 부란기에 넣어둔다. 다음 다시 6×SSC液으로 두 번 씻은 뒤 역시 70%와 95% 에타놀로 脫水, 空氣乾燥시킨다(renaturation),

ㅁ. 다음과 같이 조제한 김자9混液(giemsa-mixture)로 30분간 染色한다.

- 5ml 김자 (Harleco)
- 50ml 증류수
- 0.1M의 citric acid 1.5ml을 섞어 pH를 6.9로 맞춘다.
- 1.5ml 메타놀

ㄴ. 染色이 끝난 뒤 슬라이드는 증류수로 씻고 空氣乾燥시킨다. 그리고 바로 25% 에타놀, 아세톤, 아세톤-톨루엔(aceton-toluene, 1 : 1) 및 톨루엔에서 辨色을 한다. 그런데 이 방법에다가 QM螢光染色을 겹쳐서 2

중염색(double staining)하는 것이 더 한층 효과적이라 한다.

3) Lomholt 및 mohr(1971)의 김자분染法.

ㄱ. 靜脈血에서 淋巴球(Lymphocytes)를 分離해서 Moorhead 등의 방법을 약간 변경한 것으로 48시간 培養하며 뒤의 2시간 동안 콜세타이드(colcemid)를 처리한다.

ㄴ. 0.3% NaCl 液으로 低調液 처리와 메타놀 醋酸液(3:1)으로 固定한 뒤 35°C를 넘지않는 정도로 슬라이드에 친친히 熱을 가해 乾燥시킨다.

ㄷ. 슬라이드를 다음과 같이 조제한 표준인 緩衝液이 들어있는 染色瓶(histology glass jar)에 옮긴다. 緩衝液은 0.9M sodium chloride와 0.1M sodium citrate로 만들며, 여기에 0.1M의 sodium citric acid를 넣어서 pH 7.09가 되도록 조절하고 다시 3배 용량의 증류수로 희석하여 최종 pH가 7.43이 되게 한다.

ㄹ. 슬라이드가 담긴 染色瓶을 69~70°C의 부란기 안에 3시간 동안 걸어넣어둔다.

ㅁ. 다음 슬라이드가 들은 染色瓶을 30°C인 장소로 옮겨 시킨 뒤 김자液((Merck giemsa's solution, azur-eosin-methylene-blue solution; Darmstadt)으로 20분간 染色한다. 김자原液은 pH 6.95인 緩衝液을 섞어 1/10로 희석해서 染色에 사용한다.

ㅂ. 다음 슬라이드를 증류수에 2번 담겨서 씻은 뒤 空氣乾燥시킨다.

4. Drets 및 Shaw(1971)의 김자分染法

ㄱ. 淋巴球 및 纖維芽細胞(fibroblast)를 CIBCO media 1A로 培養한다.

ㄴ. 하베스트 하기 2~6시간 전에 0.04/ μ g/ml 농도의 콜키신(colchicine)을 가한다.

ㄷ. 1% sodium citrate로 低調液 처리한다.

ㄹ. 메타놀 醋酸(3:1)으로 固定한다.

ㅁ. 알코올 램프 불 위에서 슬라이드를 乾燥시켜서 프레파라트를 작성한다.

ㅂ. 다음 슬라이드를 0.07M NaOH液을 0.112M NaCl(pH12.00 \pm 0.01)에 섞은 溶液에 넣어 室溫(20~22°C)에서 30초동안 처리한다. 이 溶液은 2.8g NaOH와 6.2g NaCl을 1l의 증류수에 섞어 만들며 pH12.0이 되도록 한다.

ㅅ. 12 \times SSC (pH 7.0)溶液에 室溫에서 5분간 담근다. 12 \times SSC溶液은 105.2g NaCl과 52.2g Trisodium

citrate를 1l의 증류수에 섞어서 만들며 0.1 N NaOH로 pH를 7.00 \pm 0.01이 되도록 조절한다.

ㅇ. 12 \times SSC溶液 속에 들은 채로 슬라이드를 65°C \pm 0.5°C의 부란기 속에 60~72시간 넣어둔다. 슬라이드의 일부는 48시간에서 꺼내어 밴드형성이 진척되는 상태를 조사해볼 필요가 있다.

ㅈ. 그뒤 슬라이드를 부란기에서 꺼내어 室溫에서 12 \times SSC溶液에 수분간 다시 넣는다. 다음 70%와 95% 알코올에 각각 5분간씩 넣어 脫水한 뒤 空氣乾燥시킨다.

ㅊ. 다음과 같이 만든 緩衝液에 섞인 김자液으로 5분간 染色한다.

3ml 김자溶液(Curtain Scientific Co, U.S.A.)

3ml 無水메타놀

3ml 0.1M citric acid 溶液

상기 3용액을 100ml의 증류수에 섞어 만들며 0.2M Na₂HPO₄ 緩衝液으로 pH 6.60 \pm 0.01이 되도록 조절한다.

ㅋ. 이렇게 한 슬라이드를 증류수에 담겨 간단히 씻으며 空氣乾燥시킨 뒤 永久標本으로 마운트한다.

이상 4가지 방법은 사용한 시약이나 절차에 있어 차이가 있지만 근본 원리에는 대차가 없는 것이다. 國際人類遺傳學會에서는 이들 방법과 기술이 참으로 편리하고 우수한 것이지만 현단계로는 안정성이 적다해서 앞으로 수년간 좀 연구를 필요로 한다고 결론지었다.

이와같은 방법을 통해 얻어지는 染色상의 밴드 패턴(banding pattern)을 정리해 보면 다음과 같이 C-밴드, G-밴드 및 R-밴드의 3그룹으로 크게 나뉘어진다.

1) C-밴드(C-band)

Arrighi 및 Hsu, Yunis등과 Gagné 등의 방법의 의해 染色體의 動原體 부근에 명료하게 나타나는 밴드이며 이것은 構造性 異質染色質이 선택적으로 染色되는 때문에 생긴다. 이 밴드는 사람만이 아니고 마우스에서도 발견되고 있으며 Y染色體를 제외한 모든 染色體에서 나타난다. Y染色體에서 動原體 부근이 아니고 오히려 長腕의 近端 1/2~1/3의 부위에 밴드를 이루며, 또 제 1,9,16染色體의 제2차 狹窄(secondary constriction)에 상당한 부분이 특별히 染色이 잘되어 다른 부분과 쉽게 구별이 된다. 더우기 마우스의 경우 C-밴드와 사트라이트 DNA의 分布와 일치하며(Schnedl 1971) 또 사람에 있어도 사트라이트 DNA가 제 1,9,16 染色體에 나타나는 C-밴드의 위치에 局在한다

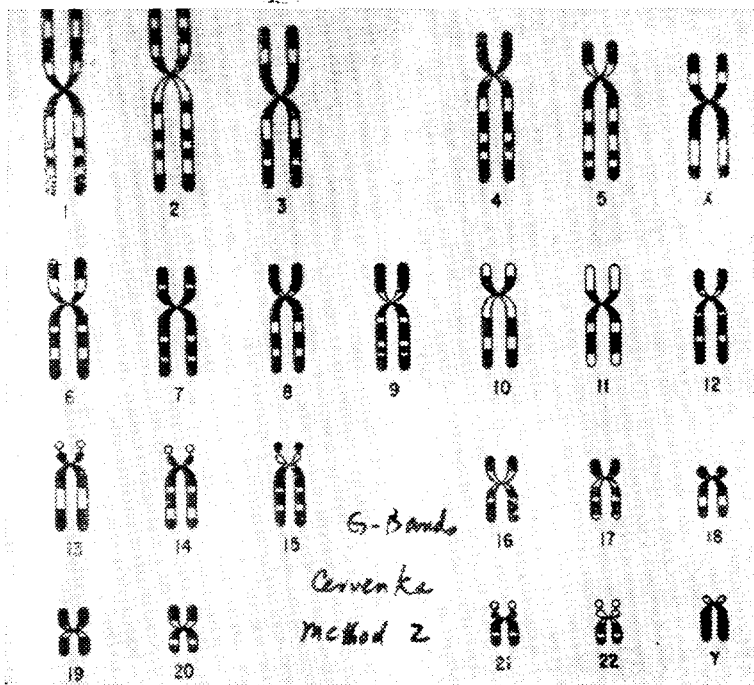


그림 7. 김자분염을 통한 사람 染色體의 G-밴드(Caballim 등 1972)

는 검은 띠가 나타나고 있다(Jones 및 Corneo 1971).

2) G-밴드(G-band)와 R-밴드(R-band)

G-밴드는 Sumner 등(1971)의 ASG법에 의해 처음으로 명백하게 染色이 된 것으로 각 染色體의 縱軸에 대해 直角으로 이루어지는 진하게 染色된 밴드를 가리키며, 그 수, 위치 및 크기 등은 각 染色體에 따라 특유하다. 따라서 아무리 形態적으로 꼭 같게 보이는 染色體 사이에도 G-밴드의 명백한 차이를 찾아볼 경우가 있다(그림 7). 한편 R-밴드는 Dutrillaux 및 Lejeune의 방법에 의해 확실히 보이게 된 것으로 상기한 G-밴드와 네가-포지(negative-positive)의 관계에 있는 밴드이기엔 G-밴드와는 대조적으로 染色이 없게 된 부분이라

고 하겠다.

최근에 Goday 등 (1972)은 재료를 0.5%의 Quinacrine dihydrochloride 용액에서 染色하여 상기한 G-밴드가 나타나는 染色體 부위에 그와는 전혀 다르게 밴드가 형성됨을 보고 Q-밴드(Q-band)라고 불렀다(그림 8).

영국의 Seabright(1972)는 染色體 길이에 따라 밴드가 DNA-蛋白質結合의 별다른 패턴을 초래할 가능성을 시험하기 위해 蛋白質分解酵素를 사용하는 새로운 방법을 개척하였다. 우선 血液을 전체로 短期培養한 뒤 染色體標本을 만들고 0.075M의 KCl로 37°C에서 3~5분간 低調液 처리한다. 이와같이 한 細胞를 매타늘-醋酸液(3:1)으로 固定하며 空氣乾燥法에 의해 프레카라트를 만든다. 다음 10m의 Sterile

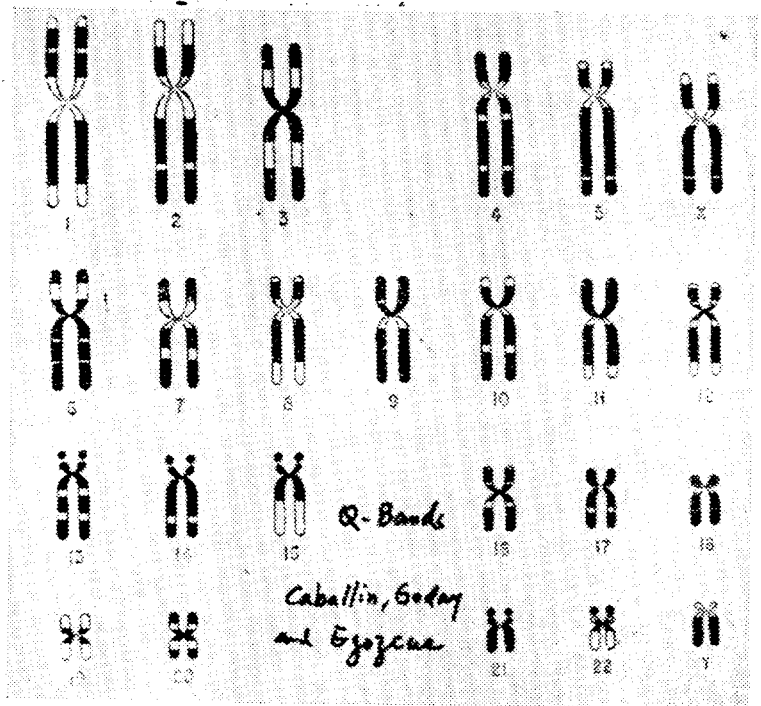


그림 8. 김자분염을 통한 사람 染色體의 Q-밴드(Caballim 등 1972)

isotonic saline bacto trypsin (Difco Catalogue No. 0153~59)을 만들고, 다시 이 溶液 1ml을 9ml의 sterile isotonic saline液과 섞어 희석해 가지고 슬라이드를 10~15초간 담근 뒤 sahine液으로 2번 씻는다(Trypsin 처리). 계속해서 細胞를 Leishman 染色液(BDH)을 緩衝液(pH 6.8, G.T. Gurr)으로 1/4로 희석한 染色液으로 3~5분간 染色하며, 바로 緩衝液으로 여분의 染色液으로 씻어내고, 吸紙로 물기를 닦아 가지고 乾燥시킨다. 완전히 乾燥된 材料를 자일롬(Xylo)로 씻은뒤 카바 글라스를 덮어 마운트한다. 이 밖에도 蛋白質分解酵素로는 Ficin, Bromeline 및 Papain 등이 사용되어 효과를 나타내고 있다.

앞년에 들어와서는 이 방면의 연구의 초점이 사람의 染色體의 G-밴드 패턴에 맞추어 지고있는 감을 주고 있으며 상기한 김자 分染法, 키나크린 螢光染色法 그리고 蛋白質을 分解시키는 방법등에 걸쳐 보다 효과적으로 G-밴드 패턴을 얻을 수 있는 새로운 방법 기술을 독자적으로 개척하고 있다(Dutrillaux 등 1972, Curtis 1972, Lampert 1972, Mandohl 및 Fredga 1972, Cervenka 1972, Goday, 1972, Caballin 1972 등). 이들 중에서도 Dutrillaux 등은 상기 3가지 방법을 통해 얻어지는 染色體 밴드 패턴을 비교 觀察 檢討하여 재미있는 知見을 얻고 있다.

이들에 따르면 血液培養을 한 뒤 低調液 처리, 固定 및 空氣乾燥 등은 보통 방법에 따르며, 다음 3가지 방법을 각각 사용하여 얻어지는 결과를 비교한 것이다.

(1) 김자分染法

슬라이드를 20mM 磷酸 緩衝液(pH 6.5)으로 87°C에서 10분간 처리한 뒤 수도물에서 간단히 씻고 김자 染色液(Dutrillaux 및 Lejeune 1971)으로 染色한다.

(2) 키나크린 螢光染色法

슬라이드를 QM(Polyscience, Inc.)으로 Caspersson 등(1970)의 방법에 따라 染色한다. 실제로 슬라이드를 100ml의 증류수에 5mg의 QM을 푼 溶液에 담그고, 그리 pH 7인 maclvoine 緩衝液에 담겨서 씻는다.

(3) 蛋白質分解法

슬라이드를 100ml의 증류수에 5mg pronase(Calbiochem.)을 섞은 溶液으로 37°C에서 3~6분간 처리한 뒤 씻어가지고 김자染色液(Dutrillaux 등 1971)으로 染色한다.

우선 김자分染法으로 얻어지는 染色體에서 전하게 染色되는 밴드는 QM 螢光染色을 통한 밴드(fluorescing band) 중 얇게 染色된 밴드와 일치되며, 또 이들

이 蛋白質分解法에 의해서는 染色이 잘 안되고 다만 굵어진 밴드모양과 동일하게 보인다. 다음 반대로 김자分染法에서 얇게 染色된 밴드는 QM 螢光染色으로 진하고 밴격어려 모이는 것에 해당하며, 또 蛋白質分解

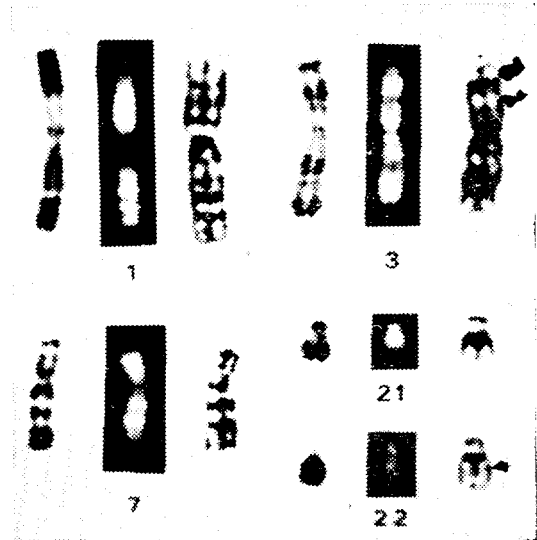


그림 9. 김자 分染法(왼쪽), QM染色法(중앙) 蛋白質分解法(바른쪽)에 의해 각각 얻어진 제 1, 3, 7, 21, 23 染色體의 밴드 패턴의 비교 (Dutrillaux 등 1972)

法을 통해 진하게 染色되는 밴드와 일치한다는 것이다 (그림 9).

그들이 얻은 연구결과를 좀 구체적으로 정리해 본다면 다음과 같이 된다.

- (1) 動原體부위는 다만 蛋白質分解시킨 뒤에 染色해야 染色이 잘 된다.
- (2) 제2차 狹窄 부위는 상기 3방법중 어느 방법을 통해서도 染色이 잘 안 된다.
- (3) acrocentric 染色體의 短腕이나 사트라이트 부위는 蛋白質分解法을 통해 명백하게 그리고 굵게 나타나지만 다른 2방법을 통해서서는 여러가지 모양으로 나타난다.
- (4) Y染色體의 밴드 패턴은 變異가 심해서 어떤 계통을 세울 수가 없다. 그의 短腕은 흔히 김자分染法으로 染色이 되며, 長腕은 QM 螢光染色으로 잘 밴격어린다.

Dutrillaux 등은 이와같은 사실은 상기한 3방법이 染色體의 生化學的 不等質(biochemical heterogeneity)를 초래케 하는 때문이라고 설명하고 있다. 즉 QM

螢光染色은 G-C가 풍부한 DNA(G-C rich DNA)에 특별히 작용하고, 반대로 蛋白質分解를 통한 染色은 대체로 蛋白質에 명백하게 작용하며, 또 김자분법은 DNA와 蛋白質 쌍방에 다 작용하는 것으로 보고 있다 따라서 이들 3가지 방법을 통해 나타나는 밴드는 染色體부분에 따라 DNA와 蛋白質이 들어 있는 상태를 그대로 나타내는 것이라고 하였다.

위의 3방법 중에서도 김자분법과 蛋白質分解法은 모두가 경험적인 것이며, 현재 그의 分子的인 機構(mechanism)는 전혀 아지 못하는 상태에 있다. 그러나 文獻에 따르면 이들 방법의 機構에 대한 설명이 전무한바는 아니나 그들의 대개가 推論에 지나지 않지만 그래도 현단계로서는 어느 정도 참고가 되지 않을까 하여 여기 간단히 소개한다. 우선 分染法으로 染色이 진하게 되는 染色體의 부분은 어떤 鹽基配列이 고도로 반복되면서 존재하는 부분이 아닐까 생각된다는 것이다. 실제로 마우스 DNA등 가트라이트 부분은 反復性이 가장 높은 부분의 하나이므로 變性(denaturation)→再生(renaturation) 처리과정에서 2개의 체인(double chain)으로 돌아가는 비율이 가장 높을 것이라고 생각된다. 더구나 C-밴드는 마우스의 경우 가트라이트 DNA의 分布와 잘 일치한다는 점으로 미루어보아 DNA의 2개의 체인이 김자에 진하게 染色이 되는 반면에 1개의 체인(single chain)은 染色이 안되어서 결국 밴드모양을 형성한다는 것이다. 뿐만 아니라 G-밴드의 경우에도 같은 이유를 붙여서 이해하려는 경향이 있다

이와는 별도로 DNA分子 중에는 그의 2차, 3차구조와도 관련해서 色素親和性이 다른 것이 존재한다고도 생각할 수 있다. 김자, 트릴린, 프로나제 및 尿素 등에 의한 G-밴드는 染色體로 부터의 蛋白質의 제거라던가, 또 蛋白質의 변화에 의해 감추어져 있던 DNA의 본래의 모양이 나타나는 것일지도 모른다는 의견도 있다(高木 1972). 그러나 色素와의 結合에 차가 생기는 要因에 대해서는 아직도 확실하지 못한 상태에 있다. 한편 DNA의 성질에 관해 G-밴드가 DNA後期複製 부위와 일치한다는 의견(Evans 등 1971, Ganner 및 Evans 1971)과 DNA合成期の 진행에 따라 複製되는 DNA의 G-C량이 감소되어간다는 知見(Bostock 및 Prescott 1971)을 결부시켜 생각한다면 대단히 흥미있는 사실을 알아낼듯한 감도 든다. 그러면 G-밴드의 分染에는 DNA만이 관계하는가 하는 점이 문제인데 이 점 역시 확실하지 못한 상태에 있다. 예전에 사람 染色體의 가트라이트 DNA分劃은 Goncs 및 Corneo

(1971)에 의해 제 1, 6, 16 染色體의 C-밴드의 위치에 局在하고 있음이 밝혀진 바 있다. 그러나 제 9染色體의 C-밴드는 제 1, 16 染色體와는 대조적으로 G-밴드로서는 나타나지 않기 때문에 DNA로서는 同種으로 생각되지만 G-밴드로서는 정반대로 행동하고 있음을 알겠다. 이와 같은 사실로 미루어 볼때 G-밴드 分染에 DNA이외의 물질이 관여하고 있음이 추측된다.

작금 人類의 細胞遺傳學 분야에 키나크린螢光染色, 김자분법 등 特別染色法이 개발 도입되어 여러가지로 연구성과를 올리고 있는 중에 있다. 예를 든다면 사람의 제 21 및 22染色體가 명백히 식별된 결과로 Down 症候에 관여하는 것이 제 21染色體라는 점이 확실해졌는가 하면 또 慢性骨髓性白血病的 원인이 되고 있는 Ph¹染色體는 제 22染色體에서 유래된 것이 밝혀졌다. 또 한편 Cri du chat 症候는 제 5染色體의 短腕의 단순한 缺失로 생각되어 왔던 것인데, 새로운 染色法에 따르면 제 5染色體의 양끝을 남기고 중앙부위가 缺失되어 있음을 명백히 했다. 이와같이 해서 先天異常이나 流產胎兒에 있어서의 비교적 큰 染色體異常의 연구는 물론이고, 한 거름 나가 작은 缺失, 轉座, 逆位 등도 발견되며, 染色體와 出現型의 異常, 癌化(Carcinogenesis)와의 관련 등 여러가지 면에 걸쳐 급속도로 발전이 기대되고 있다. 또 이제까지 주로 形態나 오토라디오그라피를 통해서 近緣種間的 核型의 비교에 크게 공헌해 왔던 것인데, 상기한 特別染色法으로 얻어지는 밴드패턴이 安定한 것이 되고, 쉽게 변화하지 않는다면 한개 한개의 染色體의 同定이 가능하게 되어 보다 정확한 核型分析이 이루어질 것이다. 이러한 점은 생물의 種形成 내지 系統進化에도 응용이 될 수 있다고 본다.

현시점에서 볼 때 키나크린 螢光染色法이나 여러가지 김자분법은 밴드 패턴을 얻기 하는데 있어 거의 비슷한 정도의 효과를 나타내고 있기에, 그 어느 방법을 취하는가는 오로지 연구 재료나 목적에 따라 달라지게 된다. 키나크린螢光染色法으로 얻어지는 螢光은 단시일내에 소실되는데 대해, 김자분법으로는 永久標本을 얻을 수 있지만 처리과정에서 染色體가 變形할 우려가 크다. 즉 김자분법의 처리조건이 細胞의 종류라던가 種이 다름에 따라 달라지기에 훌륭한 標本을 얻으려면 우선 본연구에 들어가기 전에 충분한 예비적인 실험이 필요하게 된다. 그러나 키나크린螢光染色에 있어서는 처리과정에서 우려할 점이 별로 없다. 키나크린螢光染色法은 1971년 이래 國際적으로 인정을 받

고 있지만, 김자분染法은 아직도 개발도중에 있으며 보다 安定度가 높아질때까지 國際學會는 인정을 보류했다. 그러나 이들의 기술 방법은 획기적인 것이라 하겠고, 앞으로 더 한층 놀라운만한 知見이 얻어질 것이 기대된다.

參 考 文 獻

- Arrighi, F.E. and T.C. Hsu, 1971. Localization of heterochromatin in human Chromosome, *Cytogenet.* **10** : 81—86.
- 淺香昭雄, 1972. 螢光染色. *遺傳* **26**(4) : 22—26.
- Barlow, P. and Vosa, 1970. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* **226** : 961—962.
- Bobrow, M., P.L. Pearson, M.C. Pike and O.S. El-Alfi, 1971. Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosomes of different sizes. *Cytogenet.* **10** : 190—198.
- Bostock, C.J. and D.M. Prescott, 1971. Buoyant density of DNA synthesized at different stages of the S phase of mouse L cells. *Exp. Cell Res.* **64** : 267.
- Caballin, MaRosa, C. Goday and J. Egozcue, 1972. G-bands in mammalian chromosomes. *M.C.N.* **13**(3) : 135.
- Caspersson, T., S. Farber, G.E. Foley, J. Kudvnowski, E.J. Modest, E. Simonsson, U. Wagh and L. Zech, 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* **49** : 219—222.
- Caspersson, T., L.Zech, E.J. Modest, G.E.Foley, U. Wagh and E. Simonsson, 1969 a. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in vicia faba metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* **58** : 128—140.
- Caspersson, T., L. Zech, E.J. Modest, G.E. Feley, U. Wagh and E. Simonsson, 1969b. DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus. *Exp. Cell Res.* **58** : 141—152.
- Caspersson, T., L. Zech and V.M. Emmel, 1970a. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* **60** : 315—319.
- Caspersson, T., L. Zech and C. Johansson, 1970b. Quinacrine mustard-fluorescence of human chromosomes 4, 5 and X. *Exp. Cell Res.* **61** : 474—475.
- Caspersson, T., J. Lindsten and L. Zech, 1970c. Identification of the abnormal B group chromosome in the “cri du chat” syndrome by QM-fluorescence. *Exp. Cell Res.* **63** : 474—476.
- Caspersson, T., G. Gahrton, J. Lindsten and L. Zech, 1970d. Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exp. Cell Res.* **63** : 238—240.
- Caspersson, T., L. Zech and E.J. Modest, 1970e. Fluorescent labeling of chromosomal DNA: superiority of quinacrine mustard to quinacrine. *Science* **170** : 762.
- Caspersson, T., G. Lomakka and L. Zech, 1971a. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes-distinguishing characters and variability. *Hereditas* **67** : 89—102.
- Caspersson, T., L. Zech, H. Harris, F. Wiener and G. Klein, 1971b. Identification of a human chromosome in a mouse-human hybrid by fluorescence techniques. *Exp. Cell Res.* **65** : 475—478.
- Cervenka, J., 1972. G-band techniques. *M. C. N.* **13**(3) : 133—134.
- Conen, P.E., P.K. Lewin and D.V. Vakil, 1971. Rapid Y chromosome identification in human blood smears. *Cand. Med. Assc, J.* **104** : 925—926.
- Curtis, D. J., 1972. Technique for the preparation of “G” bands in human chromosomes. *M. C. N.* **13**(3) : 131—132.
- Drets, M.E. and M.W. Shaw, 1971. Specific banding patterns of human chromosomes. *Pro. Nat. Aca. Sci.* **68** : 2037.
- Dutrillaux, B. and J. Lejeune, 1971. Sur une nouvelle technique dianalyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci.* **272** : 2638—2740.
- Dutrillaux, B., F. Catherine, J. De Grouchy and

- J. Lejeune, 1972. Comparison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence, and proteolytic digestion. *Cytogenet.* **11** : 113—116.
- Evans, H.J., K.E. Buckton and A.T. Sumner, 1971. Cytological mapping of human chromosomes; results obtained with quinacrine fluorescence and the acetic-saline-giemsa techniques. *Cromosohma* **35** : 310—325.
- Gagne, R., R. Tanguay and C. Laberge, 1971. Differential staining patterns of heterochromatin in man. *Nature New Biol.* **232** : 29.
- Ganner, E. and H.J. Evans, 1971. The relationship between patterns of DNA replication and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement. *Chromosoma* **35** : 326—341.
- George, K.P., 1970. Cytochemical differentiation along human chromosomes. *Nature* **226** : 80—81.
- Goday, C., MaRosa Caballin and J. Egozcue, 1972. Q-bands in mammalian chromosomes. *M.C.N.* **13**(3) : 134—135.
- Jones, R.W. and G. Corneo, 1971. Location of satellite and homogeneous DNA sequences on human chromosomes. *Nature New Biol.* **238** : 268—271.
- Lampert, F., 1972. G-band technique. *M.C.N.* **13** (3) : 132.
- Lomholt, B. and J. Mohr, 1971. Human karyotyping by heat-giemsa staining and comparison with fluorochrome techniques. *Nature New Biol.* **234** : 109—110.
- Mandahl, N. and K. Fredga, 1972. G-band pattern of human chromosomes. *M.C.N.* **13**(3) : 132—133.
- Mikkelsen, M., 1971. Identification of G group anomalies in Down's syndrome by quinacrine dihydrochloride fluorescence staining. *Humangenetik* **12** : 67—73.
- Pardue, M.L. and J.G. Gall, 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168** : 1356—1358.
- Patil, S.R., S. Merrick and H.A. Lubs, 1971. Identification of each human chromosome with a modified giemsa stain. *Science* **173** : 821—822.
- Pearson, P.L., M. Bobrow and C.G. Vosa, 1970. Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature* **226** : 78—80.
- Pearson, P.L., M. Bobrow, C.G. Vosa and P.W. Barlow, 1971. Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes. *Nature* **231** : 326—329.
- Rook, A., L.Y.Hsu, M. Gertner and K. Hirschhorn, 1971. Identification of Y and X chromosomes in amniotic fluid cells. *Nature* **230** : 53.
- Schnedl, W., 1971a. Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma* **34** : 448—454.
- Schnedl, W., 1971b. Unterschiedliche Fluoreszenz der beiden homologen Chromosomen Nr. 3 beim Menschen. *Humangenetik* **12** : 59—63.
- Schwinger, E., E. Rakebrand, H.J. Müller, E.M. Bühler and U. Tettenborn, 1971. Y body in hair roots. *Humangenetik* **12** : 79—80.
- Seabright, M., 1972. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma* **36** : 204—210.
- Sumner, A.T., H.J. Evans and R.A. Buckland, 1971a. New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.* **232** : 31.
- Sumner, A.T., J.A. Robinson and H.J. Evans, 1971b. Distinguishing between X, Y and YY-bearing human spermatozoa by fluorescence and DNA content. *Nature New Biol.* **229** : 231—233.
- 高木信夫, 1972. 人類染色體の縞模様, 遺傳 **26**(4) : 3—6.
- Thuline, H.C., 1971. Y-specific fluorescence in peripheral blood leucocytes. *J. Pediat.* **78** : 875—876.
- Tjio, J.H. and A. Levan, 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* **42** : 1—6.
- Yunis, J.J., L. Roldan, W.G. Yasmineh, and J.C. Lee, 1971. Staining of repetitive DNA in metaphase chromosome. *Nature* **231** : 532.
- Zech, L., 1969. Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochromes. *Exp. Cell Res.* **58** : 463.