

# 소의 염색체 검사를 위한 혈액 배양방법의 비교연구

박 무 서 장 인 호

경북대학교 동과대학 수의학과

## 서 론

사람의 여러가지 질병과 관계를 갖는 chromosome anomalies에 대한 연구는 백혈구배양법의 개발에 힘입어 활발히 진행되어 왔다. 그러나 가축에 있어서의 염색체 연구가 1960년대까지 비교적 회소하였던 것은 아마도 사람의 염색체 연구를 위해 사용된 기술이 가축의 염색체 연구에 그대로 이용될 수 없었던 것이 그 원인인 것 같다.<sup>1)</sup>

Hsu 및 Pomerat<sup>16)</sup>는 1953년의 한 연구를 통해 배양된 세포를 저장액으로 처리하여 염색체를 잘 분산시킬 수 있었다고 보고함으로 포유동물의 細胞遺傳學 발전에 크게 기여한 바 있다. 1956년 Tjio 및 Levan<sup>21)</sup>은 Colchicine 및 Sbuash technique을 이용하여 던 우수한 chromosome spread를 얻을 수 있었고 이로써 그 이전까지는 48개로 믿어지고 있었던 사람의 수가 46개라는 것이 입증되었다.

1959년 Hungerford 등<sup>17)</sup>이 말초혈액백혈구의 short term culture로 chromosome spread를 얻는데 성공하였다는 보고를 하기까지는 염색체 연구를 위해 사용된 세포는 주로 조직배양법으로부터 얻어 왔었다.

과거에는 단지 적혈구와 백혈구를 분리하기 위해 사용되었던 red kidney bean(*Phaseolus vulgaris*)의 추출물인 phytohemagglutinin(PHA)이 단백백혈구의 분열을 촉진시킨다는 사실이 1960년 Nowell 등<sup>20)</sup>에 의해 증명되고 부터는 백혈구를 배양할 때는 이를 첨가하고 있다.

말초혈액의 백혈구를 사용한 배양기술이 발전됨에 따라 사람의 細胞遺傳學은 급속도로 발달되었는데 이는 재료채취가 용이하고 복잡한 실험설기구 없이도 빨리 그 결과를 얻을 수 있었기 때문이라 본다.<sup>13)</sup>

Hare 등<sup>13)</sup>은 개와 고양이의 선천적 기형과 암의 예를 細胞遺傳學적으로 연구한 바 있고, Gerneke 및 Heinichen<sup>8)</sup>, Clough 등<sup>3)</sup>과 Hare 등<sup>14)</sup>은 개, Cornefert 등<sup>4)</sup>과 McFeely<sup>19)</sup>는 돼지, Grieves 등<sup>10)</sup>은 산양, Ge-

rneke 와 Coubrrough<sup>9)</sup>는 말, Dain<sup>5)</sup>과 Gerneke<sup>7)</sup>는 양에 대한 細胞遺傳學적인 연구결과를 보고한 바 있다. 그러나 소의 염색체에 대한 연구보고는 1960년대 말까지 극히 회소하였고 1969년에 와서 Sweden의 Gustavsson<sup>11, 10)</sup> Swedish cattle에 autosomal translocation<sup>6)</sup>이라는 현상이 나타나며 이는 다음 세대의 암소에서 early embryonic death로 인한 번식장애를 일으키는 원인이 된다고 보고하였다. 그러자 곧 이어 1971년 영국의 Harvey<sup>15)</sup>가 조사한 Charolais 종 모우 10두 중 1두에서 Gustavsson이 주장한 것과 같은 autosomal translocation이 나타났음을 보고해 현재 여러 외국의 가축번식학자들 사이에는 큰 관심사가 되고 있다.

지금까지 알려진 임상학적인 지식으로는 해결할 수 없는 소의 번식장애의 원인을 구명하기 위해 현재 우리가 응용할 수 있는 방법은 細胞遺傳學적인 방향 뿐이라고 생각된다.

細胞遺傳學적인 연구를 하기 위해서 1964년 Basrur 및 Gilman<sup>1)</sup>이 보고한 방법이나 그것을 좀더 개량한 Halnan<sup>12)</sup>의 방법을 응용할 수도 있겠으나 이들 방법으로는 흔히 시야가 흐린 표본을 얻기 쉽고 염색체가 너무 과도하게 분산되거나 밀집되어 결과분석에 곤란을 느낄 때가 많다. 그 밖에도 배지, 소 태아의 혈청 그리고 특히 값이 비싼 시약이 너무 많이 소모되어 불경제적인 점이 많으므로 좀더 개량하여 보다 경제적이고 우리나라 실정에 적합하고 합리적인 방법을 고안하는 것은 큰 의의가 있을 것으로 생각되었으며 새로 고안한 개량법과 과거 이미 보고된 바 있는 두 방법과를 비교 실험해 본 결과 좋은 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**공시동물 :** 정상범위의 혈구수를 가진 임상적으로 건강한 Holstein Friesian 암수 각 5두를 공시하였다.

**혈액 :** 공시동물로 부터 얻은 말초정백혈을 재료로 썼으며 경정액으로 부터 채혈했다. 채혈은 경정액 부

위를 70% ethyl alcohol로 소독하고 preservative free heparin 200IU를 묻힌 10ml 주사기와 18 gauge 주사침을 사용하여 10ml의 혈액을 무균적으로 채혈했다. 단시간의 수송이나 보존을 위해서는 주사기내에 그냥 두었지만 배양이 2시간 이상 지연될 경우에는 채혈후 바로 배지에 접종했다. 수송중 온도의 급변이나 진동을 피했다.

**배지**: medium 199(CSL) 한병을 37°C로 가온한 약 960ml의 3차증유수에 용해시키고 이 용액을 sintered glass 여과기나 asbestos 여과기로 여과하였다. 여기에 먼저 만들어 두었던 무균 2.8% 중탄산소디움용액을 적당량 가하여 pH 7.0이 되도록 하고 총량도 1 liter가 되도록 하였다.

**배양**: 채혈한 예별로 Basrur, Halnan 그리고 개량법 등 세가지 방법으로 배양, 수확하여 그 성적을 비교하였다. medium 199 4 ml, 소태아의 혈청 1 ml와 PAH 0.05 ml를 혼합 주입한 McCartney 병에 heparin으로 처리된 0.2 ml의 혈액을 접종하고 38°C에서 약 3일간(65~68시간) 배양하였다.

**Accumulation**: 만들어 놓았던 2 μg/ml Colcemid 액 0.3 ml를 배양병에 주입하고 다시 1시간 30분~3시간 배양하여 mitotic activity를 metaphase에서 억제시켰다.

**수확**: 먼저 시험판에 담은 0.075M KCl 용액이 38°C가 되도록 항온수조에 담가 두었다. 고정액은 methanol과 빙초산를 3:1의 비율로 혼합하여 사용했는데 methanol은 냉장고에 넣어 두었던 것을 사용 직전에 빙초산과 혼합하였다.

배양병의 내용물을 500 rpm으로 10분가 원심하고 상층액을 가느다란 pipette로 제거하고 원심관을 손가락으로 가볍게 두들겨 세포들이 혼탁되게 하였다. 거기에 38°C로 가온된 0.075M KCl 용액를 5 ml를 서서히 가하면서 시험판을 약하게 진탕시켜 주었다. 이것을 38°C에 5분간 두었다가 거기에 3 ml의 고정액을 가한 후 바로 750 rpm으로 5분간 원심하고 상층액을 제거한 후 5 ml의 고정액을 가하여 혼탁시킨 다음 실온에서 20분간 두었다가 750 rpm으로 5분간 원심하였다. 그 상층액을 버리고 다시 5 ml의 고정액을 가하고 실온에 5~10분간 두었다가 750 rpm으로 5분간 원심하고 그 상층액을 버렸다. 침전된 세포로 하여금 cloudy suspension으로 되게 하기 위해 충분한 고정액을 가하였다. 상기와 같이 만들어진 light cloudy suspension을 끌어 가느다랗게 만들어진 pipette로 약 25~30 cm의 높이에서 깨끗이 닦은 slide glass에 3~4방울 떨어뜨

려 風乾이나 火乾시켰다.

**염색**: 9:1로 희석한 Giemsa 액으로 5~10분간 염색하였다.

## 결 과

배지의 양을 우선 다른 방법의 반으로 줄여 놓고 그 밖의 시약도 비례적으로 반감된 양에서 더욱 줄여 보았다. colcemid는 0.6 μg, PHA는 0.05 ml까지 감소시켜도 그 성적에 아무런 영향도 미치지 않았지만 그 이상 감소시켰을 때는 mitotic activity와 metaphase에 있는 세포의 출현율이 감소한 사실을 관찰하였다. 그러나 소태아의 혈청은 배지 4 ml에 대해 1 ml 이하로 감소시키면 임파구의 분열에 강한 저해현상을 나타내었고 접종하는 혈액의 양도 사용한 배지 양의 10%를 넘어 15%에 가깝거나 그 이상이 되면 mitosis에 큰 저해를 가져 왔지만 10%이하 5%까지는 저해현상을 볼 수 없었다. 이 실험에서는 5%인 0.2 ml를 접종했

Table 1. Comparison of Basrur's, Halnan's and Modified Methods for the Preparation of Chromosome Spreads

Case No.	Spreads	Methods		
		Basrur's Method	Halnan's Method	Modified Method
1	Normal Spreads	15	13	20
	Abnormal Spreads	6	9	3
2	Normal Spreads	11	17	22
	Abnormal Spreads	9	4	2
3	Normal Spreads	12	14	21
	Abnormal Spreads	6	6	2
4	Normal Spreads	10	18	20
	Abnormal Spreads	9	6	4
5	Normal Spreads	14	15	21
	Abnormal Spreads	6	4	1
6	Normal Spreads	13	14	22
	Abnormal Spreads	7	8	2
7	Normal Spreads	12	14	22
	Abnormal Spreads	5	6	1
8	Normal Spreads	10	16	21
	Abnormal Spreads	8	5	3
9	Normal Spreads	11	14	20
	Abnormal Spreads	8	7	1
10	Normal Spreads	12	15	21
	Abnormal Spreads	6	5	1
Average	Normal Spreads	12	15	21
	Abnormal Spreads	7	6	2

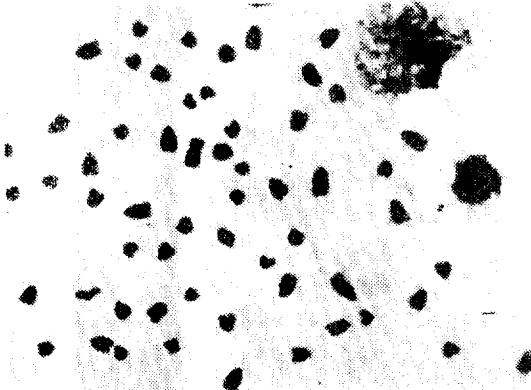


Fig. 1. Normal spreads obtained by modified method.

으나 그 보다 적은 양을 접종해도 mitosis에는 영향을 주지 않았다. 그러나 metaphase에 있는 세포의 수가 너무 적어 분석에 부적당하였다.



Fig. 2. Over-spread chromosomes obtained by Basrur's method.



Fig. 3. Unclean back ground obtained by Halnan's method.

Table 2. Compariron of Reagents Used in Basrur's, Halnan's and Modified Methods for Leukyte Culture.

Reagents Methods	Medium 199 (ml)	Fetal Calf Serum (ml)	Colchicine or Colcemid ( $\mu$ g)	Phytohemagglutinin (ml)
Basrur's method	9(ml)	2(ml)	100( $\mu$ g)	0.5(ml)
Halnan's method	8(ml)	2(ml)	25( $\mu$ g)	0.4(ml)
Modified method	4(ml)	1(ml)	0.6( $\mu$ g)	0.05(ml)

Basrur 법과 Halnan 법을 개량법과 비교함에 있어서 각 방법과 각 예마다 두장 이상의 slide 를 1,000배로 검정하였다. 개량법에 있어서는 spread 의 시야가 선명하고 염색체를 분석하기에 적당한 normal spread(Fig. 1)가 타방법에 비해 많이 볼 수 있었다. 한편 시야가 이를 때문에 선명하지 않거나 염색체가 너무 밀집되어 충복된 것이 많이 나타나거나 과도하게 분산되어 몇개 또는 여러 개의 염색체가 상실되어 분석에 부적당한 abnormal spardas는 개량법에서 훨씬 적었다 (Fig. 2, 3, 4참조). 세가지 방법에 사용된 시약의 양을 비교해 보면 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 현저히 소량의 시약을 사용한 개량법으로 Fig. 1과 같이 선명한 spread 를 많이 얻을 수 있었고 Fig. 2, 3, 4와 같이 부적당한 spread 의 출현율은 훨씬 낮았다.

## 고 칠

본 실험에서 혈액을 배지의 15% 또는 그 이상 접종했을 때 mitosis에 현저히 악영향을 미쳤음은 Halnan<sup>1,2)</sup>



Fig. 4. Overlapped chromosomes obtained by modified method.

의 성적과 일치되었다. 특히 공시동물에서 얻은 혈청을 가열치 않고 신선한 상태로 사용했을 때 더 뚜렷한 억제작용을 하는 것으로<sup>12)</sup> 보아 접종하는 혈액은 가능한 한 소량이 좋을 것으로 생각되며 본 실험에서는 0.2 ml의 혈액을 접종함으로써 가장 만족할 만한 성적을 얻었다(Table 1).

사람의 임파구에 비해 소의 세포는 훨씬 더 섬세한 것 같았다. Mellman<sup>16)</sup>은 사람의 임파구를 잠시동안 냉장하여도 아무런 저해를 받지 않았다고 하였지만 본 실험에서는 재료를 냉각시켰을 때 임파구의 분열에 현저한 저해를 갖어 왔음을 대조적인 성적이라 하겠다.

Biggers 및 McFeely<sup>2)</sup>는 재료를 냉각시켜도 아무런 저항이 없었다고 했으나 Gustavsson<sup>11)</sup>은 재료를 가능한 한 도내에서 냉각치 않고 수송함이 바람직한 일이라고 한 것으로 보아 연구자마다 조금씩의 차이가 있는 것으로 비로된다.

재료를 배양전에 원심했을 때 Mitotic cell의 출현율이 감소됨은 Halnan<sup>12)</sup>의 성적과 일치되었다. Basrur 및 Gilman<sup>13)</sup>은 9 ml의 배지와 0.5 ml의 PHA를, Halnan<sup>12)</sup>은 8 ml의 배지와 0.4 ml의 PHA를 사용했으나 본 실험에서는 배지 4 ml에 PHA를 0.05 ml 까지 줄여도 mitotic activity를 전혀 저해하지 않았다는 것은 본 실험으로 얻은 큰 성과라 하겠다(Table 2).

선인들의 방법<sup>1,12)</sup>으로 얻은 spread 중에는 그 다수에서 시야가 선명하지 못함을 볼 수 있었는데 이것은 많은 양의 배지를 사용했기 때문에 그 찌꺼기가 겸경하는데 방해물로 작용한 것이 아닌가 생각되며 상기 두 방법에서 hypotonic treatment를 하기 위해 다량의 중유수를 사용했기 때문에 상당수의 염색체를 상실하게 되는 원인이 될 것이며 섬세한 소의 임파구를 처리하기에는 조잡한 방법이라 생각된다.

본 실험에서는 Garson<sup>6)</sup>의 충고에 따라 hypotonic solution으로 0.075 M KCl 5 ml를 사용했으며 처리전 38°C로 가온했고 처리시간도 정확히 5분으로 했었다. 이때 처리온도나 처리시간의 차오는 그 실험성적에 치명적인 영향을 미치게 됨을 알 수 있었다. 수화를 하기 위해 고정액을 가하고 원심하여 상층액을 버리고 거기에 고정액을 가하고 다시 원심하는 과정을 적어도 3회 이상 반복했을 때 더욱 선명한 spread를 얻을 수 있었다. 이상의 성적으로 미루어 보아 본 개량법은 현재까지 알려진 방법 중에서는 가장 좋은 것이라 할 수 있겠다.

## 결 론

본 실험은 소의 細胞遺傳學적인 연구를 위해 필요불가결한 short term blood culture를 힘에 있어서 국내 생산이 되고 있지 않은 시약들을 절약할 수 있고 결과도 더욱 우수한 방법을 고안하여 현재 외국 문헌에 보고되어 있는 Basrur 방법 및 Halnan 방법과 비교 실험해 본 결과 다음과 같은 몇 가지 결론을 얻었다.

1. 소량의 시약을 사용한 개량법에서 더 선명한 spread를 얻을 수 있었다.
2. hypotonic treatment의 방법을 개선함으로써 더 우수한 spread를 많이 얻을 수 있었다.
3. 값이 비싼 PHA의 양을 타방법에 비해 약 1/10로 감소시킬 수 있었음은 경제적이었다.

## 참 고 문 헌

1. Basrur, P.K. and Gilman, J.P.W.: Blood culture method for the study of bovine chromosomes. Nature (1964) 204 : 1355.
2. Biggers, T.D. and McFeely, R.A.: A simple method for the display of chromosomes from culture of white blood cells with special reference to the ox. Nature (1963) 199 : 718.
3. Clough, E., Pyle, R.E., Hare, W.C.D., Kelly, D.F. and Patterson, D.F. An XXY sex-chromosome constitution in a dog which testicular hypoplasia and congenital heart disease. Cytogenetics (1970) 9 : 71.
4. Cornefert, J.F., Hare, W.C.D. and Adt, D.A., Identification of the sex chromosomes of the domestic pig. J. Heredity (1968) 54(4); 251.
5. Dain, A.: The incidence of freemartinism in sheep. J. Repro. Fert. (1971) 24 : 91.
6. Garson, M.: Personal communication.
7. Gerneke, W.H.: Chromosomal evidence of the freemartin condition in sheep-ovis aries. J.S. Afr. Vet. Med. Ass. (1965) 36(1); 99.
8. Germek, W.H. and Heinichen, I.G.: Two canine intersexes. Vet. Med. Ass. (1968) 39(1); 56.
9. Gerneke, W.H. and Coubrough, R.I.: Intersexuality in the horse. J. Vet. Res. (1970) 37(4); 211.

10. Grieves, S.A. and Hamerton, J.L., Dickson, J.M., Pollard, C.E. and Short, R.V.: Genetic intersexuality in goats. *J. Reprod. Fert. Suppl.* (1969) 7; 25.
11. Gustavsson, I.: Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of translocation in Swedish cattle. *Hereditas* (1969) 63; 68.
12. Halnan, C.R.E.: A study of cytogenetic techniques and the karyotype of domestic cattle. Thesis of Sydney Univ. 1971.
13. Hare, W.C.D., Weber, W.T., McFeely, R.A. and Yang, T.J.: Cytogenetics in the dog and cat. *J. Small Anim. Pract.* (1966) 7 : 575.
14. Hare, W.C.D., Wilkinson, J.S., McFeely, R.A. and Riser, W.H.: Bone chondroplasia and a chromosome abnormality in the same dog. *Am. J. Vet. Res.* (1967) 28 : 583.
15. Harvey, M.J.A.: An autosomal translocation in the Charolais breed of cattle. *Vet. Rec.* (1971) 89 : 110.
16. Hsu, T.C., Pomerat, C.M.: *J. Hered.* (1966) 44 : 23. (cited by Hare).
17. Hungerford, D.A., Donnelly, A.T., Nowell, P.C. and Beck, S.: The chromosome constitution of the human phenotypic intersex. *Am. J. Human Genet.* (1965) 11 : 215.
18. Mellman, W.J.: Human chromosome methodology. Academic press. New York (1965).
19. McFeely, R.A.: A direct method for the display of chromosomes from early pig embryos. *J. Reprod. Fert.* (1966) 11 : 161.
20. Nowell, P.C., Moorhead, P.S., Mellman, W.J. and Ford, D.A.: Chromosome preparation of leukocyte cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* (1960) 20 : 613.
21. Tjio, J.H. and Levan, A.: The chromosome number of man. *Hereditas* (1956) 42 : 1.

### Comparative Studies on Short Term Blood Culture Method for Bovine Chromosome Investigation

Moo Seo Park, D.V.M., M.S. and In Ho Jang D.V.M.

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture  
Gyeongbug National University*

#### Abstract

The studies were carried on to set up a short term blood culture method which is essential for doing bovine cytogenetic investigation and to reduce the amount of the various reagents with better results obtained with modified methods were compared with the results of Basrur's and Halnan's methods, and the following results were obtained.

1. The modified method, with lesser amount of reagents than other methods, produced better results and showed cleaner spreads.
2. Better spreads were obtained, in the modified method, by modifying the hypotonic treatment.
3. Reduction of the PHA to 1/10 comparison with the other methods showed no harmful effects.