

倍數體操作을 위한 細胞遺傳學의 研究

孫 珍 基
韓國科學技術院

Cytogenetic Studies of Polyploidy Manipulation

Son, J. K

Korea advanced Institute of Science and Technology

Summary

The Results of colchicine and pretreatment time have shown that the cells of Coho Salmom (*Oncorhynchus Kisutch*) were effectively injected 6 hours prior to the harvest at a final concentration of $10\mu\text{g/g}$ body weight. The cell-density from 8,000 cells/ mm^3 ($=8 \times 10^6$ ml) was found as ideal. The best effect of hypotonic solution in proportion to the cell is 20:1 and 50 minutes.

The model number of diploid chromosome in this species was $2n=60$. The karyotype analysis proved that the diploid complement consisted of 19 pairs of metacentric-, 4 pairs of submetacentric — and 7 pairs of acrocentric-chromosomes.

The diagrammatic representation proved that the diploid complement consisted of 7 pairs of metacentric-, 2 pairs of submetacentric — and 1 pair of acrocentric-chromosomes.

I. 緒 論

1970年 이후 遺傳子研究을 위한 細胞培養法이 발전하면서 細胞操作이 可能하게 되었고, 倍數性 個體 生産과 性轉換을 유도하여 商品性을 높이는 技術은 産業的인 應用段階에 도달하였으나, 生産能力의 향상과 育種의 効率化를 위한 最尖端工學의 研究는 細胞機作이 까다롭고 취급이 어려운 關係로 産業利用率이 다소 저조하게 나타나고 있다.

本 研究는 倍數體操作을 目的으로 發生段階가 比較的 容易하게 觀察되어 지는 實驗動物을 利用하여 第一段階로 染色體의 遺傳子排列을 糾明하고자 한다

II. 材料 및 方法

1. 染色體 特性

은연어(*Oncorhynchus Kisutch*)는 미국 오레곤주로부터 수입한 受精卵을 孵化하여 韓國科學技術院 實驗室에서 사육중인 成體를 사용하였다. 예비 실험시

직접 관찰은 筋肉, 腎臟, 아가미 등에서 채취한 組織을 콜히친과 低等張液(KCI溶液)의 濃도와 時間에 따른 變化를 測定하면서 處理한 뒤 Schmidt(1976) 方法에 의한 G-banding 染色을 하여 特性을 觀察하였다. 細胞培養實驗은 MEM(Minimum Essential Medium)을 사용하였는데 그 化學的 組成은 Table 1 과 같다.

Table 1. Composition of cell culture medium for *Oncorhynchus Kisutch*.

Composition	Volume
Minimum Essential Medium x 10	10ml
Aqua bidest steril	90ml
Admixture in 100ml medium :	
Fetal Calf Serum	12ml
Phytohemagglutinin	0.1ml

예비 실험에서 밝혀진 濃도와 處理時間에 따라 본 실험에서 사용한 方法은 다음과 같다. 콜히친 $10\mu\text{g/g}$

体重을 腹腔肉注射하고 6 시간 후에 署殺한 다음 細胞組織과 KC1溶液(0.075Mol.)의 比를 1:20으로 維持하면서 상온에서 50분간 방치한다. 處理한 試料를 遠心分離(10min./1500r.p.m.)하여 殘餘細胞를 固定液(glacial acetic acid: absolute alcohol=1:3)에 15분간 沈澱시킨후 다시 遠心分離시킨다. 이와 같은 과정을 3~4회 반복할 후 슬라이드 글라스에 滴下시켜 상온에서 2~3일간 건조시킨다. 건조한 슬라이드 글라스를 Trypsin 溶液(0.005%)에서 2분간 沈澱시키고 洗滌한 다음 2~5% Giemsa溶液에 10분간 染色하고 상온에서 乾燥하여 현미경(Leiz, 1,000倍)으로 관찰하였다. 이에 使用한 溶液의 量은 아래와 같다.

1) Trypsin-solution

0.005% Sol.

Trypsin solution(0.5% Vorrat-sol., 1:250)	1ml
Soerensen-buffer (pH. 6,8)	99ml
Prim. Kaliumphosphate (KH ₂ PO ₄ , 1/15Mol.)	50.8ml
Sec. Natriumphosphate (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O, 1/15Mol.)	49.2ml

2) Gim Giemsa-solution

Giemsa	2ml
Soerensen-buffer (pH. 6.8)	98ml

2. 染色体數

은연어細胞에서 細胞分裂을 가장 잘 觀察할 수 있는 腎臟細胞의 슬라이드 글라스를 基準으로 分析하였다. 實驗에 使用한 은연어中 選別된 中期 染色體를 正確히 觀察할 수 있었던 成體의 外形의인 特徵은 다음과 같다(Table 2).

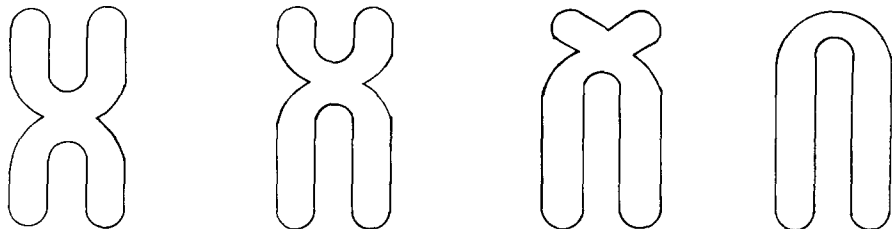


Fig. 1 Morphology of chromosome

Table 2. External characteristics of *Oneorhynchus Kisutch* for the Chromosome analysis

Fish No.	Body length (cm)	Total length (cm)	Body weight (g)
1	37	41	860.85
2	36	40	673.24
3	33	37.5	594.18
4	31.5	35	469.90

3. 染色体 形態

染色体 中心粒(centromere)이 자리잡은 位置에 따라 그 形態가 달라지며 腕(arm)길이의 比는 $r = \frac{\text{長腕(long arm)}}{\text{短腕(short arm)}}$ 의 公式를 利用하여 네 종류로 分類한다(Levan et al., 1964).

① 中部染色体(metacentric chromosome)

$r = 1.0 \sim 1.5$ 로 中心粒은 染色體의 가운데 位置한다 (Fig. 1.1)

② 垂中心染色体(submetacentric chromosome)

$r = 1.6 \sim 3.0$ 으로 中心粒은 染色體의 가운데 보다 약간 위에 位置한다 (Fig 1.2).

③ 頂點染色体(acrocentric chromosome)

$r = 7.0$ 으로 中心粒은 染色體의 한쪽끝에 位置한다 (Fig. 1.3).

④ 末端染色体(telocentric chromosome)

$r = \infty$ 로 한쪽 腕이 거의 찾아보기 어려울 정도이거나 아예 없는 경우이다 (Fig. 1.4).

여기서 짧은 腕의 部分은 p로 긴 部分은 q로 表示하였고, 核型(Karyotype) 排列과 圖表(Diagram)의 排列은 Ford et al. (1980), Dutrillaux)와 Prieur (1978)에 의한 分類를 利用하였다.

1. metacentric chromosome
2. submetacentric chromosome
3. acrocentric chromosome
4. telocentric chromosome

III. 結果 및 考察

1. 染色体 特性

콜히친의 適定 處理時間을 구하기 위하여 處理濃度區間을 $5\mu\text{g/g}$ 으로 하고 1~18시간 관찰한 結果 $10\mu\text{g/g}$ 을 80分間 處理한 區間에서부터 中期染色体

를 觀察할 수 있었다. 가장 良好한 處理區는 $10\mu\text{g/g}$ 을 6時間 處理한 區에서 나타났으며 이때 中期染色体의 出理率은 1.8%이었다 (Table 3).

低等張液處理區에서는 體細胞와 아가미 細胞에서 中期染色体를 觀察하지 못하였으며 腎臟細胞에서만 50分 處理區에서 1.3%의 中期染色体를 觀察할 수 있었다 (Table 4).

Table 3. Results of colchicine treatment on Kidney cells of (*Oncorhynchus Kisutch*) Unit: %

Treatment time	Concentration ($\mu\text{g/g}$ body weight)				
	5	10	15	20	25
60 min	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0
70 min	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0
80 min	I. 100	I. 99.8	I. 100	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0.2	M. 0	M. 0	M. 0
3 hrs	I. 100	I. 99.8	I. 99.9	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0.2	M. 0.1	M. 0	M. 0
6 hrs	I. 98.9	I. 98.2	I. 98.9	I. 100	I. 100
	M. 1.1	M. 1.8	M. 1.1	M. 0	M. 0
18 hrs	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0

I: Interphase

M: Metaphase

Table 4. Results of KCl-sol. treatment on tissue of *Oncorhynchus Kisutch* Unit: %

Tissue	Treatment time (min)					
	10	20	40	50	80	90
Body	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0
Kidney	I. 100	I. 100	I. 99.8	I. 98.7	I. 100	I. 100
	M. 0.0	M. 0	M. 0.2	M. 1.3	M. 0	M. 0
Gill	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100	I. 100
	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0	M. 0

I: Interphase

M: Metaphase

2. 染色体數

연어속 (Genus: *Oncorhynchus*)에 속하는 魚數는 대체적으로 染色体數의 差異가 큰것으로 알려져 있다 (Arai, 1984). *O. nerka*는 56~58, *O. keta*는 74, *O. Masau*는 66, 또한 *O. Tshawytscha*는 68로 알려져 있는데 本 實驗結果 은연어 染色体는 58~62의 範圍를 나타내었다. 頻度別로 보면 60個의 경우 68.9%의 頻度を 나타냈으며 그 다음은 58個의 15% 順이었다. 따라서 은연어 染色体數는 60個로 推定 되어

Table 5. Frequency distribution of chromosome numbers from Kidney cells of *Oncorhynchus Kisutch*

Fix. No.	Number of Chromosomes (2n)			
	58	60	61	62
1	20	41	14	13
2	13	89	2	4
3	1	23	2	1
4	3	16	2	1
Total cell counts	37	169	20	19
Frequency (%)	15.0	68.9	8.1	8.0

지는데 個體變異에 의한 正確한 範圍는 앞으로의 研究課題라 할 수 있다 (Table 5).

3. 染色体形態

形態學的인 構造 (Levan et al., 1964)를 보면 각 實驗區間에 따른 差異는 있었으나 中部染色体 38個, 亞中部染色体 8個, 頂點染色体 14個로 나타난 區間이 82%였다 (Table 6).

Table 6. Karyological data of Chromosomes from Kidney cells of *Oncorhynchus Kisutch*

Fix. No.	Morphology				Total No. of cell observed
	M	SM	ST	A	
1	30	8	0	14	130
2	37	9	1	14	26
3	40	7	-	13	2
4	38	8	3	11	1

M = metacentric SM = submetacentric
ST = subtelocentric A = acrocentric

한편 Fig. 2 에서는 *O. Kisutch*의 中期染色体의 形態를 보여주고 있다.

核型 (Karyotype)은 相對的인 長이를 測定하기 위해 排列하였다. 相對測定方法 以外에도 다른 脊椎



Fig. 2 Metaphase Chromosome of *Oncorhynchus Kisutch* (x 1,000)

動物에서는 完全自動測定과 半自動測定이 사용되고 있는데, 이 경우 誤差가 5~10%이어서 이 實驗에서의 誤差는 더욱 클것으로 생각된다 (Fig. 3).

圖表 (Diagram)는 中部染色体 7 (2n), 亞中心染色体 2 (2n)과 頂點染色体 1 (2n)을 確認할 수 있다. 배열한 染色体는 異型染色質 (Heterochromatin)과 眞正染色質 (Euchromatin)을 표시하였는데 異型染色質은 遺傳的으로 不活性이며 DNA (deoxyribo nucleic acid)가 眞正染色質보다 늦게 合成되며 DNA含量이 眞正染色質보다 3~4部가 더 많은 것으로 알려져 있다 (Schmidt, 1976) (Fig. 4).

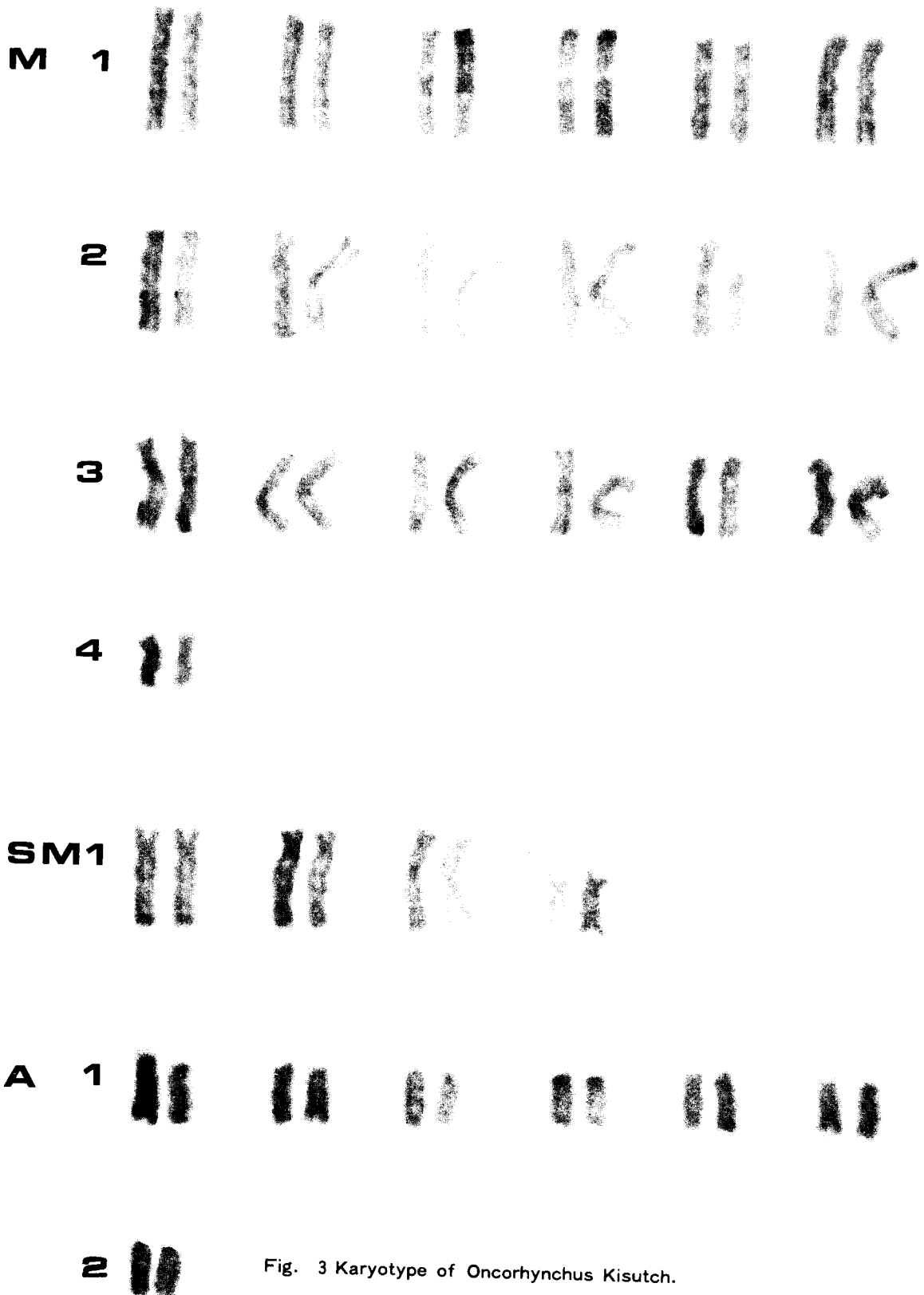


Fig. 3 Karyotype of *Oncorhynchus Kisutch*.

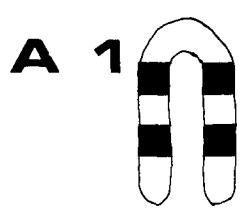
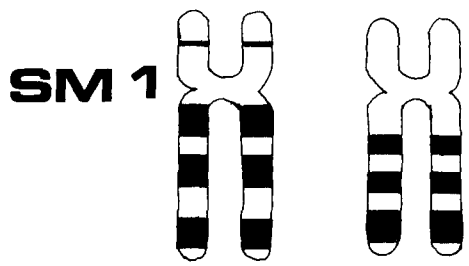
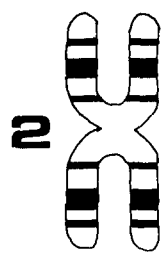
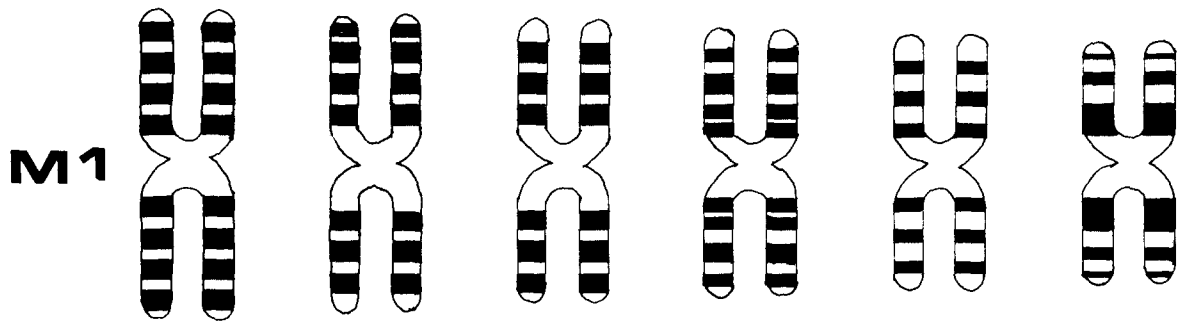


Fig. 4 Diagram of *Oncorhynchus Kisutch*

Ⅲ. 摘 要

은연어 (*Oncorhynchus Kisutch*) 細胞의 梁色体分析에 適合한 콜히친은 $10\mu\text{g}/\text{体動}$ 이고, 處理時間은 6 時間 生体内 投與한 方法이 良好한 結果를 나타내었다. 低等張液 KCl 溶液은 $8,000\text{細胞}/\text{mm}^3$ ($8 \times 10^6/\text{ml}$)로 低等張液과 細胞의 比는 20:1을 基準으로 處理時間 50分の 것이 良好하였다. 梁色体の 數는 60 個이며, 38個의 中部梁色体, 8 個의 亞中心 梁色体和 14個의 頂點梁色体로 構成되어 있다. 또한 中部 梁色体 7 (2n), 亞中心梁色体 2 (2n)과 頂點 梁色体 1 (2n) 等を 圖表로 確認하였다.

1. Arai, K. 1984. Developmental genetic studies on salmonides: Morphogenesis, Isozyme phenotypes and Chromosomes in hybrid Embryos. Hokkaid Univ. Vol. 31, 1-94.

2. Dutrillaux, B. and M. Prieur, 1978. The Normal Human Karyotype. Cytogenetics and Genetics, 21(6), 45.
3. Ford, C.E., D.L. Pollock and I. Gustavsson, 1980. Proceedings the First International Conference for the Standerdization of Banded Karyotypes of Domestic Animals. Hereditas, 92:145-162.
4. Levan A., K. Fredga and A.A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52(3), 201-220.
5. Schmidt I. 1976. Identifizierung der Chromosomen des Rindes mit hilfe verschiedener G-banden techniken Dissertation, Jastus-Liebig-Uni. Giessen.