

FISH(Fluorescence *in situ* hybridization)를 이용하여 분석한 방사선에 의해 유발된 림프구의 염색체 이상

정해원¹⁾ · 손은희 · 기혜성 · 하성환*

서울대학교 보건대학원, *서울대학교 의과대학

Radiation induced Chromosome aberration in human lymphocyte detected by Fluorescence *in situ* hybridization

Hai Won Chung¹⁾, Eun Hee Sohn, Hye Sung Kee and Sung Whan Ha*

School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

*College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received July 31, 1996)

ABSTRACT : Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the DNA probe for human chromosome 4 was used to analyse *in vitro* radiation induced chromosome rearrangement in peripheral lymphocyte. Translocations, dicentrics,acentrics and color junctions involving the painted chromosome were scored according to the Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology (PAINT) system. The frequency of chromosome rearrangements including reciprocal translocation, dicentric, acentric fragment and color junction increased with radiation dose. The frequency of dicentric chromosome reduced by the fixation time following irradiation, whereas that of translocation was relatively persistent. The applicability of FISH for scoring stable translocation for biological dosimetry was demonstrated.

Key Words : Fluorescence *in situ* hybridization, Radiation, Chromosome rearrangement

I. 서 론

염색체 이상은 방사선등의 물리적 요인이나 여러 화학적 요인에 의한 상해정도를 평가하는 유용한 방법으로 이용되어 왔다. 인간집단을 대상으로 생물학적 선량계로서 염색체 이상을 이용하고자 할 때는 주로 혈액 중에서 림프구를 대상으로 하고 있는데, 이들은 분열하지 않는 상태에서 피폭되어 그 상해정도가 축적되기 때문에 비교적 낮은 양으로 만성적으로 피폭된 경우에도 생물학적 선량계로서 가장 이상적인 방법으로 활용되어 왔다(IAEA, 1986).

일반적으로 염색체 이상 중 염색체형의 교환형은 비대칭형인 이동원염색체(dicentric)와 대칭형의 상호전좌(translocation)로 나타나는데, 이동원염색체를 지닌 세포는 유전물질의 분포가 균형있게 배분되지 못하기 때문에 세포분열을 계속하게되면 치사하게 되지만, 상호전좌는 유전물질이 그대로 유지되기

때문에 분열을 계속 하더라도 생존하게 되어 오래전에 피폭된 정도를 더 많이 반영하여 줄 수 있다 (Au, 1991).

피폭에 의해 유전물질의 재배열 즉, 염색체의 재배열이 나타나는 현상중 상호전좌는 염색분염법을 시행하면 구별이 되지만 이 방법은 많은 경험이 필요하고 시간이 소요되기 때문에 일반적인 측정방법으로 이용하기에는 한계가 있다.

Pinkel 등(1986)은 사람의 염색체로부터 추출한 DNA probe를 이용하는 fluorescence *in situ* hybridization(FISH)기법을 개발하여 특정 염색체만이 형광을 띠게하는 현상을 이용, 상호전좌 등 염색체 구조의 재배열을 정확하고 간편하게 확인할 수 있게 되었다.

FISH는 일명 'chromosome painting'이라고도 불리우는데 특정 염색체에 대한 특정 DNA부위를 염색체 전 길이에 걸쳐 결합할 수 있는 probe를 사용하여 목적에 따라 여러 종류의 probe를 동시에 이용 할 수도 있기 때문에 최근에 그 사용의

¹⁾To whom all correspondences should be addressed.

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비로 수행되었음.

타당성에 대한 연구가 증가하고 있다(Pinkel *et al.*, 1988; Natarajan *et al.*, 1992; Awa *et al.*, 1992; Schmid *et al.*, 1992; Bachinger *et al.*, 1993; Weier *et al.*, 1991; Cremer *et al.*, 1990; Lucas *et al.*, 1989; Lucas *et al.*, 1992; Nakano *et al.*, 1993).

과거에는 방사성동위원소를 probe DNA에 표지하여 자기방사법으로 hybridized sequence를 확인하였으나(Harper *et al.*, 1986; Jhanwag *et al.*, 1984), 자기방사법은 시간이 오래 걸리고 방사성동위원소의 사용으로 인한 제반문제점들 때문에 그 사용이 제한적이었으나 안정된 형광물질을 이용하게 되면서, 이의 활용이 강조되고 있다.

Chromosome painting에서 사용되는 probe는 특정염색체에 특이한 unique sequence probe를 이용하는데 이때 반복서열과의 hybridization을 방지하기 위해 과량의 total human DNA를 같이 가하게 된다. Propidium iodide(PI)나 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 적당한 counterstain을 하게 되면 paint가 안된 염색체를 각기 다른 색깔로 구분할 수 있다. 그래서, 교환형의 염색체 이상은 두가지 색깔로 나타나기 때문에 구분이 용이하다. 즉, 염색체 이상은 색깔의 변화로서 측정되기 때문에 기존의 염색분염법보다 염색체 분석이 빠르고 객관적이다. 그러나 FISH에서는 특정한 하나 또는 몇개의 염색체만을 대상으로 이루어지기 때문에 전체의 염색체 이상을 다 반영할 수 없다는 점이 단점으로 지적되고 있으나, 큰 염색체를 대상으로 할 때 DNA양을 감안하게 되면 전체염색체 이상으로 보정하여 추정할 수 있다.

Tucker 등(1993)은 사람의 말초립프구에 방사선을 조사한 후, FISH와 기존의 염색분염법 그리고 일반적인 이동원염색체로 염색체 이상을 비교 분석하였는데 200 cGy이하의 선량에서는 세 방법에서 차이가 없다고 보고하여 방사선에 대한 생물학적 선량계로서 FISH의 유용성을 보고하고 있다. 교환형 염색체 이상 중 상호전좌를 측정할 때는 FISH가 염색분염법보다 30배 빠르다고 보고하고 있다. 또한, 상호전좌(translocation)는 이동원염색체보다 방사선에 피폭후 시간이 경과하더라도 훨씬 안정하게 존재하기 때문에 만성적인 피폭을 평가하는데 유용하기 때문에 FISH의 유용성이 더욱 강조되고 있다.

그러나 FISH를 이용하여 염색체 이상을 측정할 때 나타나는 교환형 이상은 매우 복잡한 양상을 띠고 있으므로 연구자들 나름대로 염색체 이상 분류체계를 제안하여 사용하였기 때문에 염색체 이상을 분류할 때 일관성이 결여되어 왔다. 그래서 관련학자들에 의해 Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology (PAINT) system (Tucker *et al.*, 1995)을 제안하기에 이르렀으나, 이 분류체계에 의한 연구결과는 몇 안되는 실정이다. 이 분류체계에 의하면, 상호전좌의

다양한 양상을 체계적으로 분류할 수 있으며, 특히 과거의 명명체계에서는 찾아볼 수 없는 개념인 "color junction"도 관찰이 되는데 이는 염색체 이상의 복잡성을 나타내어 준다.

따라서 본연구의 목적은 방사선에 의해 유발된 각종 염색체 이상을 PAINT 분류체계에 의해 분석하여 생물학적 선량계로서의 활용성을 모색하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 방사선 조사

건강한 사람의 말초혈액을 0.5 Gy, 1 Gy, 1.5 Gy 및 2 Gy의 ^{137}Cs 감마선을 조사(dose rate: 2.54 Gy/min)하였다.

2. 세포배양 및 염색체 표본작성

방사선 조사된 말초혈액 1 ml을 PHA 및 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 배지 9 ml에 넣고 5% CO₂가 공급되는 배양기에서 48시간 배양하였는데, 배양시간에 따른 염색체 이상 빈도의 변화를 보기위해 2 Gy 조사된 혈액의 경우 72시간 및 96시간까지 배양하였다.

3. FISH

3.1 Slide 준비

염색체 slide를 2X SSC(pH 7)에서 15분씩 2회 담근후, 70%, 85%, 100% ethanol에 각 2분씩 처리하는 탈수과정을 거친 후, 70% formamide/2X SSC 용액에 70 °C에서 5분간 denaturation 시킨다음, 찬 70%, 85%, 100% ethanol에 각 2분씩 거친 후 slide를 상온에서 말렸다.

3.2 Probe 준비

University of California, Sanfrancisco의 W.F. Morgan 교수로부터 제공받은 4번 염색체의 PBS library의 plasmid DNA를 Bionick kit(BRL)를 이용하여 biotin으로 표지하였다. 즉, 1.5 μg의 DNA에 5 μl의 10X dNTP mix를 가한 후 중류수로 가해 전체 45 μl으로 만든다음 5 μl의 10X Enzyme mix를 처리하고 16 °C에서 1시간 배양한 후 5 μl의 stop액을 가하여 반응을 중지시켰다. 이후 5 μl의 1% Tween 20 및 10 μl의 STET 용액을 가한 후 NucTrap column(Stratagene)을 이용하여 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA 5 μl(50 ng)에 5 μl의 중류수 및 25 μl의 MM1(5 ml formamide, 1 g dextran sulfate, 1 ml 20X SSC를 중류수로 가해 7 ml을 만든다)을 가한다음 1.5 μl(1.5 μg)의 사람

의 Cot DNA를 넣은 Hybridization Mix를 준비하였다.

3.3 Hybridization

Hybridizatin mix를 72 °C에서 5분간 denaturation시키고 37 °C에서 20분간 preannealing시킨후 slide에 30 μl씩 점적한 후 cover를 덮고 가장자리는 rubber cement로 완전히 밀봉한 후 수분이 공급된 용기에 넣고 37 °C에서 3일간 배양하였다.

3.4 세척

슬라이드를 꺼내 rubber cement를 조심스럽게 제거하고 1X SSC(pH 7)에 72 °C에서 5분간 방치 후, 1X PBD(0.1 NaPO₄, 0.5% NP-40, pH 8, Oncor)에 2분씩 3번 세척한 다음 30 μl의 FITC(Fluorescein thiocyanate)-avidin(Oncor)을 가하고 plastic cover를 덮은 후, 37 °C에서 5분간 방치하였다. 이 후 1X PBD로 2분씩 3번 세척 후 antiavidin(Oncor) 30 μl를 가하고 37 °C에서 5분간 방치한 후 1X PBD로 3번 세척하였다. Signal을 증폭시키기 위해 다시 30 μl의 FITC-avidin을 처리하고 PBD로 세척한 다음, slide를 말리고 antifade가 포함된 PI로 counterstaining한 후, -20 °C에서 보관하였다.

3.5 관찰 및 사진촬영

형광현미경(NIKON, Biophot)을 이용하여 dual band filter인 B-2A Filter로는 FITC 및 PI를 동시에 관찰하였으며, G-2A Filter로는 PI를 관찰하였다. 사진촬영을 위해서는 KODAK Ektachrome 400 slide film을 사용하였다.

4. 염색체 이상 측정방법

염색체의 'painting'시에는 두가지 색깔 즉, probe와 counterstainig의 염색이 모두 나타나는 것만이 관찰대상이기 때문에 같은 색을 가진 염색체 사이의 교환형은 관찰에서 제외된다. 또한 관찰되는 염색체 교환형의 형성이 어떠한 과정에 기인했는가를 관찰할 수 없기 때문에 사용한 특정염색체만이 관찰대상이 된다.

본 연구에서는 Tucker 등(1995)에 의해 제안된 명명법인 PAINT (Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology) system에 근거하여 염색체 이상을 분류하고자 하였다. 이 분류체계는 염색체형 염색체 이상만을 대상으로 하는데 염색체 이상의 종류를 translocation(t), dicentric (dic), insertion(ins), acentric fragment(acc), 그리고 ring(r)으로 구분하는데, 일반적인 염색체 이상 분류방법과는 차이가 난다. 즉, dicentric이나 ring에 수반되는 acentric fragment도 별도로 분류하게 되며 acentric ring은 ring에 포함하여 분류하게 된

다. 특히, insertion 및 color junction은 PAINT system에서만 분류가 가능하다.

본 분류체계에서는 염색체 이상형을 먼저 기입한 후 그 다음 괄호안에 A, a, B, b등의 글자를 이용하여 이상의 형태를 구체적으로 나타낸다. 즉, A 및 a는 염색이 안된 염색체 부위를 나타내며, B 및 b는 염색된 염색체 부위를 나타내는데 대문자 A 및 B는 centromere를 포함했을 때를 나타낸다. 예를 들어, t(Ab)는 상호전좌된 염색체이며 centromere를 포함하는 염색안된 염색체 부위와 centromere가 포함안된 염색된 염색체 부위로 구성된 염색체 이상임을 의미한다.

염색체 이상빈도는 painting된 특정염색체에서만 나타나기 때문에, 이 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 계산하여 보정하게 되면 전체 genome에서의 염색체 이상빈도를 계산할 수 있다. G-banding에서 관찰될 수 있는 특정염색체의 translocation, insertion, dicentric, ring의 비율(F_t) 및 염색된 특정염색체의 전체 genome상에서의 비율(F_s)을 알게되면 FISH에 의해 측정될 수 있는 translocation의 fraction(F_b)는 다음의 공식을 통해 계산될 수 있다.

$$F_b = 2F_s(1-f_s)F_t$$

단, 몇 가지 중요한 가정이 전제되는데 ① 염색체의 이상은 전체 genome상 무작위적으로 분포해야한다. ② 일반적인 염색분열법은 모든 translocation과 inversion, dicentric 및 ring을 찾아낸다. 즉, $F_b=1$. ③ Break 중 염색체 부위가 하나는 paint되고 다른 하나는 paint되지 않으며, 이들이 교환된 경우에만 관찰이 가능한 것으로 간주된다. ④ 두개의 break를 초과하는 복잡한 염색체 재배열은 매우 드물게 나타난다. 예를 들어 염색체 4번은 전체 genome중 6.23%를 차지하며 따라서 위의 공식을 이용하면 전체 교환형중 11.7%가 관찰될 수 있음을 알 수 있다(Mendelsohn et al., 1973).

III. 결 과

그림 1-A는 간접방법에 의해 4번 염색체에 특이한 biotin이 표지된 probe로 hybridization시킨 염색체 슬라이드를 Fluorescein(FITC)이 표지된 avidin으로 반응시켜 관찰한 것인데, probe와 hybridization된 4번 염색체만 노란색을 나타내고 있다. 같은 슬라이드를 PI로 counterstaining하면 모두 오렌지색으로 나타나는 것을 알 수 있다(그림 1-B).

그림 2에서 상호전좌(t(AB), t(Ba))를, 그림 3에서 이동원염색체 및 무동원염색체를 볼 수 있다.

방사선 조사에 의한 염색체 이상 빈도는 표 1, 표 2 및 표 3과 그림 4와 같다. 본 실험에서는 4번 염색체의 probe를 이용

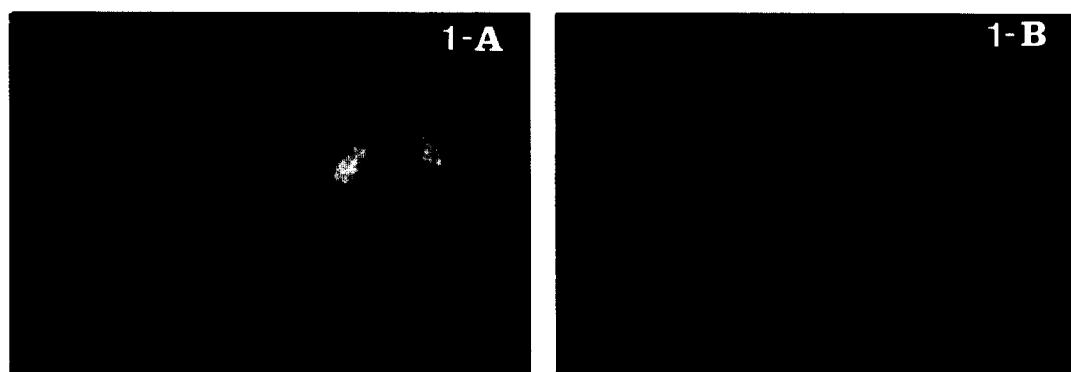


Fig. 1. Human metaphase spread hybridized with chromosome-specific composite DNA for chromosome 4. Detection of bound probe was biotin and avidin as described in 'Material and methods' (A). The same metaphase spread as (A) shown with PI excitation and emission (B).

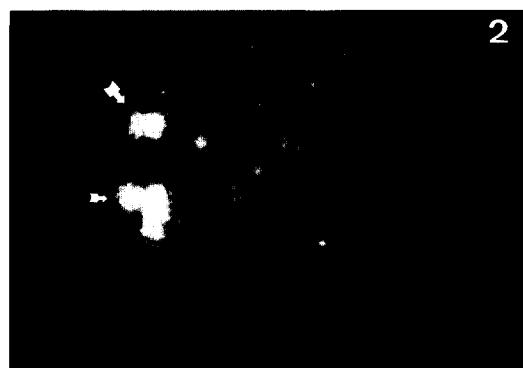


Fig. 2. Translocation [t(Ba): thick arrow, t(Ab): thin arrow] between chromosome 4 and another non-target chromosome.

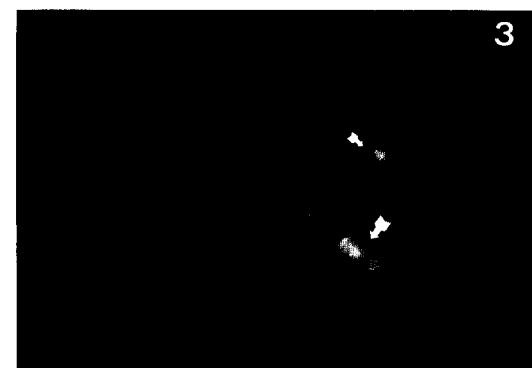


Fig. 3. Dicentric chromosome [dic(Ba): thick arrow] involving chromosome 4 and associated acentric fragment [ace(b): thin arrow].

Table 1. Radiation-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 4: Numbers and frequencies of color junctions, translocations and dicentric chromosomes

Dose (Gy)	No. of Cells Scored	No. of Cell Equivalents Scored	No. of Aberrant Cells	No. of Color Junctions	No. of Translocations	No. of Cells with Translocation	No. of Dicentrics	No. of Cells with Dicentric	No. of t/dic
0	1885	221	4	7 (0.0317)	6 (0.0271)	3	1 (0.0045)	1	6.02
0.5	1046	122	11	12 (0.0984)	8 (0.0656)	6	4 (0.0328)	4	2.00
1	1000	117	29	38 (0.3248)	30 (0.2564)	18	8 (0.0684)	8	3.75
2	1147	134	109	162 (1.2090)	86 (0.6418)	55	44 (0.3284)	43	1.95

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

하였기 때문에 4번 염색체가 전체 genome에서 차지하는 DNA 함량을 감안, 전체 세포수로 환산하였다. 상호전좌(t)와

이동원염색체(dic), 무동원염색체(ace)의 수가 선량 증가에 따라 같이 증가하는 것을 알 수 있으며, color junction의 수도 선

Table 2. Radiation-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 4: Numbers and frequencies of insertions, acentric fragments and ring chromosomes

Dose (Gy)	No. of Cells Scored	No. of Cell Equivalents Scored	No. of Acentric Fragments	No. of Cells with Acentric Fragments	No. of Insertions	No. of Cells with Insertion	No. of Rings	No. of Cells with Ring
0	1885	221	0 (0.0000)	0	0 (0.0000)	0	0 (0.0000)	0
0.5	1046	122	3 (0.0246)	3	0 (0.0000)	0	0 (0.0000)	0
1	1000	117	6 (0.0513)	5	0 (0.0000)	0	0 (0.0000)	0
2	1147	134	60 (0.4478)	47	2 (0.0149)	2	4 (0.0299)	4

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

Table 3. Numbers and frequencies of translocations induced by radiation using FISH with the DNA probe for chromosome 4

Dose (Gy)	No. of Translocations (no. per cell equivalent)		
	Total	t(Ab)	t(Ba)
0	6 (0.0271)	3 (0.0136)	3 (0.0136)
0.5	8 (0.0656)	5 (0.0410)	3 (0.0246)
1	30 (0.2564)	14 (0.1197)	15 (0.1282)
2	34 (0.6418)	44 (0.3284)	42 (0.3134)
			(0.0000)

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

량에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다.

본 실험결과 상호전좌를 지니는 세포 수보다 관찰되는 상호전좌의 빈도가 높게 나타났는데 이는 과거의 분류와는 달리 PAINT 명명법(1995)에서는 상호전좌가 나타난 염색체를 각각 분류하여 측정하기 때문이다. Color junction은 PAINT 명명법에서 중요한데 염색체 이상이 있는 한 염색체내에서 염색부위와 염색안정 부위의 경계를 나타내며 그 수는 염색체 이상의 복잡성을 나타내어 준다.

나타난 상호전좌를 유형별로 분류한 결과는 표 3과 같은데, 염색이 안된 부위에 centromere가 있는 t(Ab)의 빈도와 염색부위에 centromere가 있는 t(Ba)로 구분하였을 때 0.5 Gy에서 0.0410/cell equivalent와 0.0246/cell equivalent로 t(Ab)의 빈도가 더 큼 것으로 나타났으나 1 Gy에서는 0.1197/cell equivalent와 0.1282/cell equivalent, 2 Gy에서는 0.3284/cell equivalent와 0.3134/cell equivalent로 나타나 t(Ab)와 t(Ba)의 출

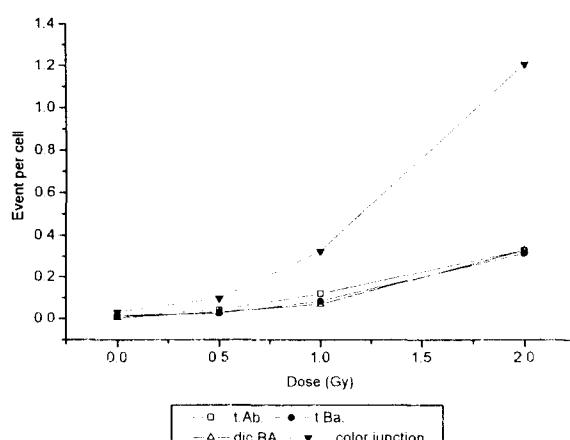


Fig. 4. A dose-response curve of different types of translocations, dicentric chromosomes and color junctions induced by radiation.

현빈도가 거의 비슷하였다.

이동원염색체 및 무동원염색체의 수를 전체 염색체로 환산한 결과와 실재로 Giemsa 염색한 경우를 비교하면 그림 5, 그림 6과 같은데, 이동원염색체의 경우 실제와 큰 차이가 없지만 무동원염색체의 경우 실제보다 훨씬 적게 나타났다.

방사선 조사후 배양시간에 따라 불안정한 염색체 이상인 이동원염색체 및 안정한 염색체 이상인 상호전좌의 빈도를 비교하였다(그림 7). 이동원염색체는 72시간 배양시 48시간 배양시보다 72.8% 감소하였으며 96시간 배양시에는 89.6%가 감소하였지만, 상호전좌는 72시간 배양시는 48시간 배양시보다 비교하여 거의 비슷하였으며 96시간 배양한 경우도 28.1%만이 감소하여 상호전좌는 시간경과에 따라 비교적 안정되게 유지되는 것을 알 수 있었다.

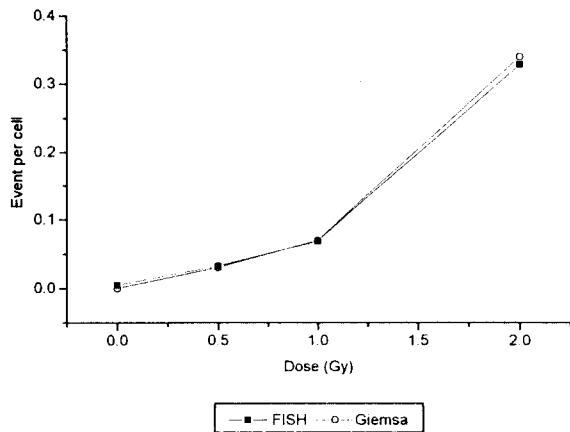


Fig. 5. Comparison of the frequency of dicentric chromosome induced by radiation between FISH and conventional Giemsa staining.

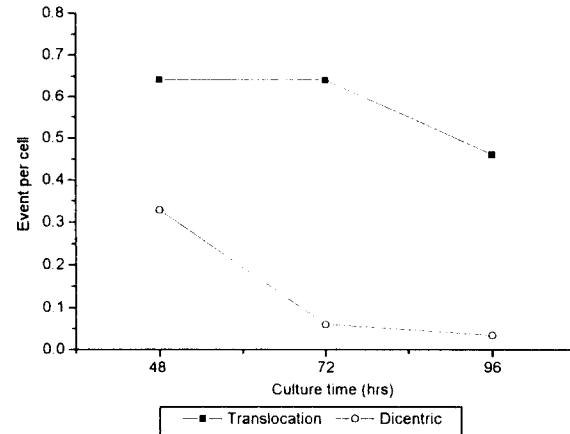


Fig. 7. Frequencies of translocations and dicentric chromosomes induced by radiation using FISH with the DNA probe for chromosome 4 by culture time.

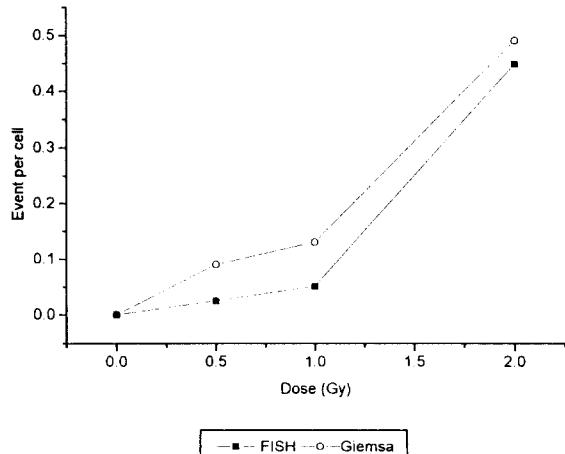


Fig. 6. Comparison of the frequency of acentric chromosome induced by radiation between FISH and conventional Giemsa staining.

IV. 토 의

각 염색체에 특이한 DNA probe를 이용하는 FISH 기법은 염색체의 구조적 재배열을 쉽게 확인해주는 매우 효과적인 방법으로 그 이용이 증가하고 있다. 염색체 전체 길이를 모두 paint할 수 있는 FISH 기법은 과거에 이용되어 왔던 염색분염법에 비해 상호전좌나 insertion 등을 명확히 구분할 수 있으며, 암세포 유전학에서 배수성이나 다중이상등의 현상, 방사선 등에 피폭된 사람들에 대한 생물학적 선량계로서의 활용 및 여러 염색체 이상 유발물질(clastogen)등의 이상유발 기전등을 연구하는데 매우 유용하다.

임상적인 응용을 위해 염색분염법을 통한 명명방법(ISCN, 1981)이 잘 확립되어 있으나 염색분염법을 이용할 때는 좋은 상태의 염색체에 대한 핵형분석이 이루어 져야하는 번거러움과 전문가만이 측정가능한 점 등의 단점이 있는데 반하여, FISH를 이용하게 되면 염색체 상태가 조금 나쁘더라도 쉽게 측정이 가능한 장점이 있다.

본 연구에서는 biotin이 표지된 DNA probe를 hybridization 한 후, fluorescein이 표지된 avidin을 사용하는 간접적인 방법을 사용하였다.

간접방법시에 이용한 biotin은 Vitamin B의 복합체 중 하나로서 Vitamin H로 불리는데 Langer 등(1981)에 의해 DNA에 표지시키는 방법이 개발되었다. Biotin은 anti-biotin antibody에 의해 측정될 수 있으나, streptavidin 또는 avidin이 결합력이 매우 크기 때문에 가장 많이 사용된다. avidin은 egg-white로부터 추출한 68 kD 크기의 glycoprotein이다.

본 실험에서는 4번 염색체의 PBS library의 plasmid DNA를 biotin으로 표지한 후, Nuctrap column을 이용하여 DNA를 정제하여 사용하였다. Probe mixture를 denaturation하는 온도는 여러 실험방법마다 차이가 나는데 본 실험에서는 일반적으로 이용하는 온도인 70 °C에서 5분간 시행하였다. Hybridizatin 과정은 여러 실험방법마다 차이가 나는데 본 실험에서는 37 °C 및 50 °C에서 24시간, 48시간, 72시간 배양하여 그 결과를 비교하여 37 °C에서 72시간 배양했을 때 가장 좋은 결과를 얻었다.

Tucker 등(1993)은 37 °C에서 24시간 배양하였으며 특히 Oncor사의 hybridization kit는 16시간 배양을 권하고 있어서, 사용한 DNA의 종류 및 양에 따라 차이가 나는 것을 알 수 있다.

Hybridization 후 biotin을 확인하는 과정도 실험방법마다 차

이가 나지만 본 실험의 경우 Oncor회사의 *chromosome in situ hybridization system*을 따랐다. Signal을 증폭시키기 위해 anti-avidin을 거쳐 다시 FITC-avidin을 처리하는 과정을 통해 좋은 signal을 얻을 수 있었다.

본 실험결과 방사선 조사에 의해 나타나는 염색체 이상은 상호전좌가 대부분이며 이동원염색체보다 훨씬 더 많이 나타났다. 이론적으로는 방사선에 의해 유발되는 상호전좌와 이동원염색체의 빈도는 같이 나타나는 것으로 추정되고 있지만 (Evans, 1962; Buckton, 1976) 실제로는, 염색분염법이나 FISH를 이용한 결과 상호전좌의 빈도가 높은 것으로 보고되고 있다. X-선이나 γ -선등의 이온화 방사선을 조사한 후 염색체 이상 빈도를 측정하기 위한 연구는 여러 연구자에 의해 수행되었는데(Lucas et al., 1989; Lucas et al., 1992; Nakano et al., 1993; Matsuoka et al., 1994; Natarajan et al., 1992; Tucker et al., 1993; Tucker et al., 1995b), 많은 연구에서 상호전좌의 빈도가 이동원염색체의 빈도보다 크게 나타난다고 보고하고 있다.

본 연구에서는 PAINT 명명법(1995)을 따랐기 때문에 상호전좌가 나타나는 기전은 무시하고 상호전좌가 나타난 모든 염색체를 측정하게 되어 그 이전에 보고한 경우보다 상호전좌의 빈도가 훨씬 높게 나타났으며, t:dic의 비도 타 연구보다 훨씬 높게 측정되었다. 즉, 이는 표 1에서 보는 바와 같이 상호전좌를 지닌 세포에 의해 상호전좌의 수가 두배 가까이 나타났기 때문에 타 연구결과에 비해 t:dic의 비가 크게 나타난 것으로 설명된다. Tucker 등(1993)은 상호전좌가 이동원염색체보다 많이 나타나는 이유로서 관찰자의 편견 및 배양시간에 따라 두번재 세포분열을 하는 세포가 존재할 수 있는 점, 그리고 사람 림프구에서 실제로 상호전좌가 더 많이 나타나는 것이 원인일 것인 가능성을 제시하고 있으나 확실치는 않다. 또 다른 가능성으로는 FISH를 이용하여 염색체 이상을 분류할 때는 일반적으로 염색체 이상을 분류하는 경우와는 그 기준이 다르기 때문에 나타나는 결과일 수도 있다.

FISH를 이용한 chromosome painting에 의해 염색체 이상을 측정할 때는 여러 site를 포함한 nonreciprocal exchange (Nonreciprocal Exchange involving Multiple Mutual Sites: NEMMS)를 다룰 때이다. 즉, 한 염색체에 특이한 한가지 색깔의 fluorescein을 사용할 때 나타날 수 있는 문제로서 같은 기전에 의한 교환(exchange)이 여러 다른 형태로 나타날 수 있고, 또한 같은 형태로 관찰되는 것도 여러 다른 형태기전에 의해 나타날 수 있다는 것이 문제로 지적되고 있다(Natarajan et al., 1992; Lucas and Sach, 1993; Tucker et al., 1994, 1995b). 그러므로 관찰되는 염색체 교환형이 어떠한 과정에 의해 형성되었는가를 정확히 판단하기 힘들기 때문에, FISH에 의하여

는 painting에 의해 관찰될 수 있는 교환형의 형태에 의해서만 염색체 이상의 분류가 가능하게 된다. 즉, 예를 들면 상호전좌는 상호전좌된 염색체의 조각을 가지고 있는 두 염색체로 묘사되고, 이동원염색체의 경우도 연관되어 나타나는 무동원염색체와는 독립적으로 각각 분류된다. 즉, 이상염색체가 나타나는 기전은 무시하며, 그러므로 연관되어 나타나는 염색체 이상의 경우도 각각 별개로 분류한다.

일반적으로 FISH를 이용하여 세포유전학적인 손상정도를 평가할 때 모든 염색체에 대해 painting을 시행할 수 없기 때문에 유전물질을 많이 포함하고 있는 큰 염색체를 대상으로 이루어진다. 주로 이용되는 염색체는 1, 2, 3, 4번 등인데, 특히 4번 염색체는 다른 염색체에 비해 훨씬 깨끗하고 균일하게 염색되기 때문에 염색체 재배열을 측정할 때 추천된다(Matsuoka, 1994). 각 염색체가 전체 genome 중 차지하는 비율이 알려져 있으며(Mendelsohn et al., 1973; Lucas et al., 1992), 4번 염색체의 경우 6.23%를 차지하며, 만약 1, 2, 4번을 동시에 사용하게 되면 22.4%, 1, 3, 4번을 이용한 경우 26.5%가 되어 이를 전체 염색체에 대해 환산할 수 있다(Tucker, 1995). 즉 측정된 상호전좌는 4번 염색체의 경우 전체 상호전좌의 11.7%에 해당 되며, 1, 2, 4번을 동시에 이용하면 33.4%, 1, 3, 4번을 동시에 이용하면 32.9%에 해당한다. 그러나 여러개의 염색체를 painting할 때 이용하는 형광물질을 같은 색깔로 할 경우 이들 염색체 사이에서 나타나는 상호전좌는 측정이 불가능하다는 단점이 있다. 이러한 점을 극복하기 위해 각 염색체마다 각기 다른 형광물질로 표지하게 되면 구분이 가능하지만 분석이 복잡해진다(Weier H-U G. et al., 1991; Tucker et al., 1995b).

본 실험결과 방사선 조사에 의해 각 염색체 이상 빈도가 증가되었으며 특히, 상호전좌의 빈도를 형태별로 비교한 결과 0.5 Gy에서는 t(Ab)가 t(Ba)보다 더 큰 빈도로 나타났지만 1 Gy 및 2 Gy에서는 비슷한 빈도로 관찰되었다.

Tucker 등(1995b)은 1, 2, 4번 염색체의 probe를 동시에 이용하여 방사선에 의한 염색체 이상 빈도를 조사하였는데, 1 Gy, 2 Gy, 3 Gy 및 4 Gy의 선량에서 t(Ab)의 빈도가 t(Ba)보다 상대적으로 높았음을 보고한 바 있으며 Finnon 등(1995)도 2, 3, 5번 염색체의 probe를 동시에 사용한 연구에서 t(Ab)가 t(Ba)보다 더 높은 빈도로 관찰됨을 보고하였다. PAINT 명명법이 1995년도에 권고되었기 때문에 이를 뒷받침할 만한 후속 연구는 찾아 볼 수 없었다. 실제로 t(Ba)의 염색안된 부위는 현미경 관찰시 누락되는 경우가 나타날 수 있으나 실제적으로 t(Ab)의 염색된 부위의 관찰이 용이하기 때문에 실제 같은 빈도로 나타나더라도 t(Ab)가 현미경하에서 더 많이 측정될 수 있다. 또한 color junction의 수도 선량에 따라 증가하였는데 color

junction은 염색체 이상의 복잡성을 나타내주는 기준이 된다. 즉, 같은 수의 염색체 이상을 나타내더라도 color junction의 수가 크다는 것은 염색체 이상 양상이 복잡하다는 것을 의미 한다. 즉, dic(AB)와 dic(ABa)의 경우 둘 다 1개의 dicentric으로 측정되지만 color junction의 수는 각각 1개와 2개로 나타나므로 이것으로부터 염색체 이상의 복잡한 양상을 비교할 수 있다.

본 실험에서 방사선을 조사한 후 48시간, 72시간 및 96시간 배양한 결과 상호전좌의 빈도는 배양시간에 따라 안정하게 유지되지만 이동원염색체는 배양시간에 따라 급격히 감소하는 것으로 보아, 방사선에 의한 상해를 평가할 때 FISH기법에 의해 상호전좌를 측정하게 되면 오래 전에 폭로된 결과를 더 정확히 반영해 준다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Boei 등(1996)의 X선을 조사한 사람의 림프구를 이용한 연구와도 일치하였다.

이상의 결과에서 보는 바와같이 FISH에서는 염색체 재배열을 일반적인 염색체 이상 분석법보다 구체적으로 설명해 줄 수 있으며, 안정한 염색체 이상인 상호전좌를 측정할 수 있기 때문에 오래 전에 유해물질에 노출된 정도를 훨씬 더 정확하게 확인해 줄 수 있는 것으로 판단되지만 이에 대한 연구는 아직 초보단계에 머물러 있다. 그러므로, 유해물질에 폭로된 집단을 대상으로 FISH를 적용하여 생물학적 선량계로서의 활용성을 평가하여야 할 것이다.

참고문헌

- Au, W.W., (1991): Monitoring human population for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques, *Occupational Med.*, **6**, 4, 597-611.
- Awa, A.A., M. Nakano, K. Ohtaki, Y. Kodama, J. Lucas, and J. Gray, (1994): Factors that determine the *in vitro* dose response relationship for stable chromosome aberrations in A-bomb survivors, *J. Radiat. Res(Tokyo)*, **33**(suppl), 206-214.
- Bauchinger, M., E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, and U. Nahrstedt, (1993): Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 2, 179-184.
- Boei, J.J.W.A., S. Vermeulen and A.T. Natarajan, (1996): Detection of chromosomal aberrations by fluorescence *in situ* hybridization in the first three postirradiation divisions of human lymphocytes, *Mutat. Res.*, **949**, 127-135.
- Buckton, K.E., (1976): Identification with G and R banding of the position of breakage points induced in human chromosome by *in vitro* X-irradiation, *Int J. Radiat. Biol.*, **29**, 475-488.
- Cremer, T., S. Popp, P. Emmerich, P. Licher, and C. Cremer, (1990): Rapid metaphase and interphase deletion of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression *in situ* hybridization, *Cytometry*, **11**, 110-118.
- Evans, H.J., (1962): Chromosome aberrations induced by ionizing radiation, *Int. Rev. Cytol.*, **13**, 221-320.
- Finnon, P., D.C. Lloyd and A.A. Edwards, (1995): Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.*, **68**, 4, 429-435.
- Harper, H.E., L.M. Marselle, R.C. Gallo and F. Wong-Stahl, (1986): Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph node and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 772-776.
- IAEA, (1986): Biological dosimetry : chromosomal aberration analysis for dose assessment, STI/DOC/10/10/260 IAEA vienna.
- ISCN, (1981): An international system for human cytogenetic nomenclature- High-Resolution Banding, *Cytogenet. Cell Genet.*, **31**, 1,1-23.
- Jhanwag, S.C., B.G. Neel, W.S. Hayward, R.S.K. Chaganti, (1984): Localization of the cellular oncogenes ABL, SIS and FES on human germ-line chromosome, *Cytogenet. Cell Genet.*, **38**, 73-75.
- Langer, P.R., A.A Waldrop, and D.A. Ward, (1981): Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6633-6637.
- Lucas, J.N., A Awa, T. Strauma, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H-U. Weier, D. Pinkel, J. Gray, and G. Littlefield, (1992): Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 53-63.
- Lucas, J.N., T. Tenjin, T. Straume, D. Pinkel, D. Moor, M. Litt, and J.W. Gray, (1989): Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization, *Int. J. Radiat. Biol.*, **56**, 35-44.
- Lucas, J.N., and R.K. Sachs, (1993): Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 1484-1487.
- Matsuoka, A., J.D. Tucker, M. Hayashi, N. Yamazaki, and T. Sofni, (1994): Chromosome painting analysis of X-ray-induced aberrations in human lymphocytes *in vitro*, *Mutagenesis*, **9**, 2, 151-155.
- Mendelsohn, M.L., B.H. Mayall, E. Bogart, D.H. Moore II, and B.H. Perry, (1973): DNA content and DNA based centromere index of the 24 human chromosome, *Science*, **179**, 1126-1129.
- Nakano, M., E. Nakashima, D.J. Pawell, Y. Kodama, and A.

- Awa, (1993): Frequency of reciprocal translocation and dicentrics induced in human blood lymphocyte by X-irradiation as determined by fluorescence *in situ* hybridization, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 5, 565-569.
- Natarajan, A.T., R.C. Vyas, F. Darroudi, and S. vermeuler, (1992): Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocyte as detected *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries, *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 199-203.
- Pinkel, D., T. Strauma, and J.W. Gray, (1986): Cytogenetic analysis using quantitatitie, high-sensitivity, fluorescence hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2934-2938.
- Pinkel, D., J. Lamdegent, C. Collons, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, and J. Gray, (1988): Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9138-9142.
- Schmid, E., H. Zitgelsberger, H. Braselmann, J.W. Gray, and M. Bauchinger, (1992): Radiation-induced chromoseme aberrations analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes, *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 6, 675-678.
- Tucker, J.D., M.J. Ramsey, D.A. Lee, and J.L. Hinkler, (1993): Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 27-37.
- Tucker, J.D., D.A. Lee, and D.H. Moore, (1995): Validation of chromosome painting. II : A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*, *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**, 1, 19-28.
- Tucker, J.D., W.F. Morgan, A.A. Awa, M. Bauchinger, D. Blakey, M.N. Cornforth, L.G. Littlefield, A.T. Natarajan, and C. Shassere, (1995): A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting, *Cytogenet. Cell Genet.*, **68**, 211-221.
- Weier, H-U G., J.N. Lucas, M. Poggensee, R. Segraves, D. Pinkel, and J.W. Gray, (1991): Two-color hybridization with high complexing chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations, *Chromosoma*, **100**, 371-376.