

## 동물 염색체 분리를 위한 최적 혈액배양 조건에 관한 연구

손시환<sup>†</sup> · 이정업

경남과학기술대학교 동물생명과학과

### Methodology of Lymphocytes Culture for Animal Chromosome Preparation

Sea Hwan Sohn<sup>†</sup> and Jung Up Lee

Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

#### ABSTRACT

In general, the blood cell culture is a common method for animal chromosome preparation. However, every animal and its cells have unique physiological characteristics and functions. Hence, it is very difficult to find the suitable method of chromosome preparation using animal lymphocyte culture. This study was carried out to find the suitable method of chromosome preparation using lymphocytes cultures in mammalians and aves including cattle, rat, mouse and chicken. To seek the optimal method of lymphocyte culture in each animal, 2<sup>3</sup> factorial experiment was designed. The design evaluated three main effects in culture duration, kinds of mitogen supplements and colcemid exposure time with two levels within each effect. The mitotic index and the score of chromosome morphology were analyzed. In results, the suitable methods of lymphocyte culture for chromosome preparation were 72 hours culture, pokeweed mitogen(PWM) supplement and 90 minutes of colcemid exposure in cattle, 72 hours culture, PWM supplement and 50 minutes of colcemid exposure in chicken, 96 hours culture, concanavalin A supplement and 90 minutes of colcemid exposure in rat, and 72 hours culture, PWM supplement and 50 minutes of colcemid exposure in mouse, respectively. In conclusion, kinds of mitogen, culture duration and colcemid exposure time significantly affected the mitotic index and chromosome morphology in animal lymphocyte culture. The interaction effects between/among treatment factors were also statistically significant.

(Key words : Chromosome preparation, Lymphocyte culture, Cattle, Chicken, Rat, Mouse)

#### 서 론

세포 내 염색체의 발견은 유전자의 본질을 구명하고자 하는 많은 연구에 획기적 전기를 마련하였고, 최근 유전 공학의 발전과 더불어 분자유전학의 학문적 토대를 이루는 근간이 되었다. 인간의 염색체는 100여년 전에 처음으로 관찰되고 소개되었지만, 기술적인 문제로 인하여 이의 핵형을 명확히 제시하지 못하였다. 이후 Tjio와 Levan (1956)은 콜히친(colchicine)을 이용하여 인위적으로 중기상을 유도함으로써 양호한 염색체 양상을 얻을 수 있었고, 사람의 염색체 수가 46개임을 밝혔다. 인간의 핵형이 정립된 이래 염색체 분리를 위한 다양한 방법들이 개발된 바, Hungerford 등(1959)이 혈액 중 백혈구만을 분리해서 배양에 성공하고, Nowell(1960)은 붉은 강낭콩(red kidney bean)의 추출물인 phytohemagglutinin(PHA)이 백혈구의 분열을 촉진시킨다는 사실을 밝혔으며, 이후 Hungerford (1965)가 전혈(whole blood)을 이용한 염색체 분리에 성

공함으로써 혈액을 이용한 염색체 분리가 보편화 되었다. 1960년대 이후에는 사람의 염색체 연구뿐만 아니라 여러 종의 동물 염색체에 대한 분석 기법들이 개발되어 이를 이용한 많은 연구들이 진행되고 있다. 현재는 가축뿐만 아니라 대부분의 실험동물들에 대한 핵형이 완성되었고, 더불어 국내 사육되고 있는 거의 대부분의 재래가축들에 대한 핵형도 보고되었다(Hsu와 Benirschke, 1967; Ford 등, 1980; 손과 이, 1998; 백 등, 2003; 손 등, 2003; 박 등, 2007).

최근 생명공학 기술의 혁신적 발전과 더불어 많은 모델동물들이 이용되고 있고, 이를 이용한 결과물의 검증에는 필히 염색체 분석이 기본적인 과정으로서, 명확한 염색체의 분리는 모든 실험의 필수 조건이 되고 있다. 혈액을 이용한 염색체 분리는 생체로부터 쉽게 얻을 수 있는 시료일 뿐만 아니라 지금까지 많은 기술 개발에 힘입어 비교적 간단한 배양 방법으로 짧은 시간 내 만족할 만한 중기상을 얻을 수 있다. 그러나 혈액에서의 염색체 분리 기술이 보편화되었다고는 하나, 동물의 종류마다 혈액세포

\* 이 논문은 2011년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 및 농진청 차세대바이오그린21사업(PJ007981)의 지원에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-55-751-3264, E-mail: shsohn@gntech.ac.kr

의 특성이 다르고, 배양 조건 또한 같을 수 없으므로 모든 중에서 동일하게 만족할만한 중기상을 얻기란 쉽지 않다.

따라서 본 연구에서는 동물 중에 따른 혈액의 세포적 특성을 고려하여 소(cattle), 닭(chicken), 랫드(rat) 및 마우스(mouse)를 대상으로 각 종의 염색체 분리를 위한 최적의 혈액 배양 조건을 제시하고자 배양 시간, 세포분열 촉진제(mitogen)의 종류 및 colcemid 처리 시간을 중심으로 각 요인들이 중기상 유도율과 염색체의 형태적 양상에 미치는 영향을 비교 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 공시동물

경남과학기술대학교 종합농장 및 실험동물사육장에서 사육 중인 한우, ICR 마우스, 랫드 및 재래닭을 공시하고, 염색체 분리를 위하여 이들의 혈액을 이용하였다. 채혈은 헤파린(heparin) 처리된 주사기를 이용하여 소는 경정맥(jugular vein), 닭은 익정맥(wing vein), 마우스와 랫드는 심장(heart)으로부터 혈액을 채취하였다.

### 혈액세포 배양

소 혈액세포 배양 방법은 손과 정(1994)이 제시한 방법과 동일하게 수행하였다. 배양액 10 ml에 0.5 ml의 혈액을 첨가하여 잘 섞어준 다음 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 72~96시간 배양하였다. 배양액으로는 RPMI 1640(Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY, USA) 82%, fetal bovine serum(FBS) 15%, penicillin-streptomycin(PS) 1%를 첨가하였으며, 세포분열촉진제로는 phytohemagglutinin(PHA) 또는 pokeweed(PWM)을 각각 2%씩 첨가하였다. 닭의 혈액 배양 방법은 Sohn 등(1990) 및 손과 류(1999)가 제시한 ficoll을 이용한 염색체 분리 방법을 응용하였다. Ficoll(GE Healthcare, Sweden)용액 3 ml에 RPMI 1640 3 ml와 혈액 2 ml를 섞은 혼합액을 주입 후 1,550 rpm으로 40분간 원심분리하였다. 원심분리 종료 후 혈장층 아래 백혈구 층(buffy coat)만을 채취하여 RPMI 1640 용액으로 세척하고 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 이러한 과정을 2회 반복 후 부유물을 제거하고 남은 세포를 소에서와 동일한 배양액과 배양 조건으로 배양하였다. 랫드의 혈액세포 배양은 심장에서부터 혈액을 채취하여 5 ml 배양액에 0.25 ml의 혈액을 첨가하고 상기 방법과 동일 조건으로 배양하였다. 배양액으로는 RPMI 1640 82%, FBS 15%, PS 1%를 첨가하였으며, 세포분열촉진제로 Concanavalin A(ConA) 또는 PWM을 각각 2%씩 첨가하였다. 마우스 혈액세포 배양 방법은 Akesson과 Davisson(2001)이 제시한 염색체 분리 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 배양 조건은 랫드와 동일하나, 다만 배양액으로 RPMI 1640 79%, FBS 15%, PS 2%를 첨가하였으며, 세포분열촉진제로는 ConA 또는 PWM을 각각 4%씩 첨가하여 사용하였다.

### 염색체 분리 및 분석

중기상 유도를 위하여 배양 종료 전 colcemid 0.1 µg/

ml(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA)를 첨가한 후 50분 또는 90분 동안 재배양하였다. 배양이 끝난 세포는 0.06M KCl(Sigma, St. Louis, USA)을 이용하여 저장 처리하였다. 처리 방법은 세포침전물에 저장액을 한 방울씩 첨가하여 조금씩 양을 늘리어 최종 액을 5~10 ml로 하고 실온에서 15분간 정치하였다. 저장 처리 종료 시 고정액을 10방울을 첨가하여 혼합한 후 원심분리를 하였다. 고정처리는 acetic acid와 methanol을 1:3의 비율로 혼합한 Carnoy's액을 사용하였으며, 1차 고정처리에서는 고정액을 한 방울씩 첨가하여 조금씩 양을 늘렸다. 최종 액을 5~10 ml로 맞춘 후 원심분리하고 2회 반복 고정 처리를 하였다. 염색체 표본제작은 냉장보관해두었던 slide glass에 세포 현탁액 3~4방울을 떨어뜨리고 곧바로 슬라이드 건조기에 올려 하루 정도 건조시켰다. 분리된 염색체 양상을 분석하기 위해서 광학현미경(BX-50, Olympus, Japan, obj×100)으로 관찰하고, 중기상을 촬영하여 컴퓨터에 저장하였다. 세포분열지수(mitotic index) 분석은 표본의 일정 구획 내 간기와 중기의 모든 세포수 대비 중기 세포수의 비율(%)로 계산하였다. 염색체 형태 분석은 한 슬라이드 당 임의의 20개의 중기상을 기준으로 최적 형태를 5점으로 하고, 형태 저하 양상에 따라 4, 3, 2, 1점으로 감하여 채점하였다.

### 통계분석

각 동물별 배양 시간, 세포분열 촉진제, colcemid 처리 시간에 따른 효과 및 요인 간 상호 작용 검정을 위하여 SAS package(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)를 이용한 2<sup>3</sup> 요인 분석을 수행하였고, 요인별 평균간 다중 검정을 위해서는 Tukey 검정을 실시하였으며, 요인 내 두 처리 평균 간의 유의성 검정은 t-test로 분석하였다.

## 결 과

소, 랫드, 마우스 및 닭의 혈액을 이용한 염색체 분리의 최적 배양 조건을 확립하기 위하여 각 동물별 160여개의 표본을 제작하여 배양 시간 72시간과 96시간, 세포분열촉진제로 PHA 또는 ConA와 PWM, colcemid 처리 시간을 50분과 90분으로 나누어 2×2×2 요인 실험으로 결과를 비교분석하였다. 염색체의 형태적 양상 분석은 중기상 형태에 따라 Fig. 1~4와 같이 1~5점으로 분류하고, 최적 형태를 5점으로 하고 형태가 불량함에 따라 감점하였다. 중기상의 획득 정도는 특정 구획 내 최소 1,000개 이상의 간기상과 중기상을 세어 세포분열지수를 계산하여 분석하였다.

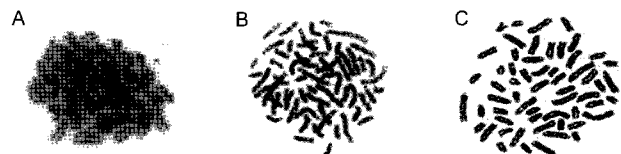


Fig. 1. Metaphase spreads of cattle lymphocytes; Chromosome morphology was scored by three grades according to the patterns of chromosome shape. (A) Very poor shape(scoring 1), (B) Fair shape(scoring 3), (C) Excellent shape(scoring 5).



Fig. 2. Metaphase spreads of chicken lymphocytes; Chromosome morphology was scored by three grades according to the patterns of chromosome shape. (A) Very poor shape(scoring 1), (B) Fair shape(scoring 3), (C) Excellent shape(scoring 5).



Fig. 3. Metaphase spreads of rat lymphocytes; Chromosome morphology was scored by three grades according to the patterns of chromosome shape. (A) Very poor shape(scoring 1), (B) Fair shape(scoring 3), (C) Excellent shape(scoring 5).

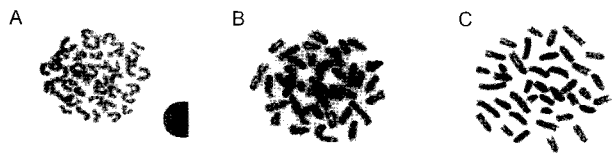


Fig. 4. Metaphase spreads of mouse lymphocytes; Chromosome morphology was scored by three grades according to the patterns of chromosome shape. (A) Very poor shape(scoring 1), (B) Fair shape(scoring 3), (C) Excellent shape(scoring 5).

Table 1은 동물별 세포분열지수에 대한 요인 분석 결과로서 모든 동물들에서 배양 시간, 세포분열촉진제의 종류 및 colcemid 처리 시간이 중기상 획득율에 유의한 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 배양 시간과 세포분열촉진제 간 상호 작용을 제외한 요인들 간의 상호 작용의 인정 유무는 동물에 따라 다소 다른 양상을 보였다. 한편, 염색체 형태적 양상에 미치는 요인 분석 결과는 Table 2와 같다. 분석 결과, 모든 동물들에서 세포분열촉진제 및 colcemid 처리 시간이 염색체의 형태에 영향을 미치는 것으로 나타났고, 또한, 염색체의 형태에 배양 시간×세포

Table 1. Analysis of variances for the factors affecting to the mitotic index of lymphocytes

Sources	P values			
	Cattle	Chicken	Rat	Mouse
Culture	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Mitogen	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Colcemid	0.0311	<.0001	<.0001	<.0001
Culture×Mitogen	<.0001	<.0001	<.0001	0.0007
Culture×Colcemid	0.1647	<.0001	<.0001	<.0001
Mitogen×Colcemid	<.0001	<.0001	<.0001	0.6808
Culture×Mitogen×Colcemid	0.0001	<.0001	<.0001	0.0827

Table 2. Analysis of variances for the factors affecting to the chromosome morphology of animal lymphocytes

Sources	P values			
	Cattle	Chicken	Rat	Mouse
Culture	<.0001	0.0699	<.0001	<.0001
Mitogen	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Colcemid	<.0001	<.0001	0.0007	<.0001
Culture×Mitogen	<.0001	<.0001	<.0001	0.0100
Culture×Colcemid	0.8735	0.0196	0.1463	<.0001
Mitogen×Colcemid	0.1048	<.0001	0.1009	<.0001
Culture×Mitogen×Colcemid	<.0001	<.0001	<.0001	0.0013

분열촉진제 및 배양 시간×세포분열촉진제×colcemid 처리 시간 간의 상호 작용이 있는 것으로 나타났다.

Table 3은 소의 최적 염색체 분리를 위한 혈액배양 조건 분석 결과이다. 혈액배양 시간은 72시간 배양이 96시간 배양에 비해, 세포분열촉진제의 경우 PWM 첨가가 PHA 첨가에 비해, colcemid의 처리 시간은 90분 처리가 50분 처리에 비해 보다 높은 세포분열지수와 양호한 염색체 형태를 나타내었다. 소의 경우 PWM 첨가로서 72시간 배양이 가장 바람직한 혈액 배양 조건이나 요인 간 상호 작용이 존재함에 따라 50분간 colcemid 처리와 90분간 colcemid 처리 간에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 4는 닭 혈액세포 배양에 대한 요인 분석 결과로서, 배양 시간, 세포분열촉진제의 종류 및 colcemid 처리 시간이 중기상 획득율에 영향을 미치나, 염색체 형태에서 배양 시간 간의 차이는 없는 것으로 나타났다. 혈액배양 시간은 72시간 배양이 96시간 배양에 비해, colcemid의 처리 시간은 50분 처리가 90분 처리에 비해, 세포분열촉진제의 경우 PWM 첨가가 PHA 첨가에 비해 월등히 높은 세포분열지수를 보였고, 형태지수의 경우 배양 시간을 제외하고는 동일한 결과를 나타내었다. 모든 요인 간에 상호 작용이 존재하기는 하였으나, 72시간 배양, PWM 첨가 처리 및 colcemid 처리 시간을 50분간 처리하였을 때 가장 높은 세포분열지수와 형태지수를 보였다.

Table 5는 랫드 혈액 배양 조건을 위한 처리별 요인 분석 결과로서 세포분열지수 및 염색체의 형태적 양상에서 모든 요인 간 유의적 차이를 보였다. 배양 시간은 96시간 배양이 72시간 배양에 비해, 세포분열촉진제의 경우 Con-A 첨가가 PWM첨가에 비해 모든 지수가 높게 나타났다. 그러나 colcemid의 처리 시간은 90분 처리가 50분 처리에 비해 세포분열지수는 높았으나, 염색체 양상은 낮게 나타났다. 또한, 세포분열지수의 경우 모든 요인 간에 상호 작용이 존재하였으나, 염색체 형태적 양상에 있어서는 배양 시간과 세포분열촉진제간 및 배양 시간, 세포분열촉진제, colcemid 처리 시간 간에만 상호 작용을 나타내었다.

Table 6은 마우스 혈액세포 배양에 대한 요인 분석 결과로서, 세포분열지수 및 형태적 양상에 있어 배양 시간, 세포분열촉진제, colcemid 처리 시간 모두가 유의적 영향

**Table 3. Mitotic index and chromosome morphology of cattle lymphocytes depending on culture duration, mitogen supplement and colcemid exposure**

Culture durations	Mitogens	Colcemid exposures	Mitotic indices	Scores of chromosome morphology*
72 hrs	PHA	50 min	0.69±0.19 <sup>d</sup>	1.99±0.36 <sup>f</sup>
		90 min	0.68±0.24 <sup>d</sup>	3.36±0.33 <sup>c</sup>
	PWM	50 min	4.61±0.67 <sup>a</sup>	4.23±0.15 <sup>a</sup>
		90 min	4.79±1.21 <sup>a</sup>	4.15±0.11 <sup>a</sup>
96 hrs	PHA	50 min	1.27±0.54 <sup>d</sup>	2.80±0.35 <sup>d</sup>
		90 min	0.70±0.21 <sup>d</sup>	2.54±0.39 <sup>de</sup>
	PWM	50 min	2.04±0.44 <sup>c</sup>	2.24±0.41 <sup>ef</sup>
		90 min	3.37±1.06 <sup>b</sup>	3.77±0.33 <sup>b</sup>

The values are means ± standard deviation (n=160).

<sup>a-f</sup> Different superscripts in same column significantly differ ( $p<0.05$ ).

\* The values were scored by chromosome morphology; very poor(1), poor(2), fair(3), good(4) and excellent(5).

**Table 4. Mitotic index and chromosome morphology of chicken lymphocytes depending on culture duration, mitogen supplement and colcemid exposure**

Culture durations	Mitogens	Colcemid exposures	Mitotic indices	Scores of chromosome morphology*
72 hrs	PHA	50 min	0.08±0.02 <sup>d</sup>	3.05±0.34 <sup>e</sup>
		90 min	0.11±0.03 <sup>d</sup>	2.78±0.39 <sup>f</sup>
	PWM	50 min	2.56±0.26 <sup>a</sup>	4.45±0.15 <sup>a</sup>
		90 min	1.54±0.40 <sup>b</sup>	4.26±0.21 <sup>b</sup>
96 hrs	PHA	50 min	0.08±0.02 <sup>d</sup>	3.96±0.19 <sup>c</sup>
		90 min	0.15±0.12 <sup>d</sup>	2.55±0.39 <sup>f</sup>
	PWM	50 min	0.60±0.17 <sup>c</sup>	3.58±0.27 <sup>d</sup>
		90 min	0.73±0.16 <sup>c</sup>	4.12±0.20 <sup>c</sup>

The values are means ± standard deviation (n=160).

<sup>a-f</sup> Different superscripts in same column significantly differ ( $p<0.05$ ).

\* The values were scored by chromosome morphology; very poor(1), poor(2), fair(3), good(4) and excellent(5).

**Table 5. Mitotic index and chromosome morphology of rat lymphocytes depending on culture duration, mitogen supplement and colcemid exposure**

Culture durations	Mitogens	Colcemid exposures	Mitotic indices	Scores of chromosome morphology*
72 hrs	ConA	50 min	1.69±0.25 <sup>c</sup>	3.90±0.30 <sup>b</sup>
		90 min	1.33±0.31 <sup>d</sup>	3.33±0.29 <sup>c</sup>
	PWM	50 min	0.81±0.44 <sup>e</sup>	1.94±0.17 <sup>f</sup>
		90 min	0.84±0.14 <sup>e</sup>	2.36±0.23 <sup>c</sup>
96 hrs	ConA	50 min	2.32±0.40 <sup>b</sup>	4.23±0.10 <sup>a</sup>
		90 min	4.25±0.35 <sup>a</sup>	4.40±0.13 <sup>a</sup>
	PWM	50 min	1.01±0.48 <sup>de</sup>	2.74±0.30 <sup>d</sup>
		90 min	1.00±0.32 <sup>de</sup>	2.18±0.36 <sup>ef</sup>

The values are means ± standard deviation (n=160).

<sup>a-f</sup> Different superscripts in same column significantly differ ( $p<0.05$ ).

\* The values were scored by chromosome morphology; very poor(1), poor(2), fair(3), good(4) and excellent(5).

Table 6. Mitotic index and chromosome morphology of mouse lymphocytes depending on culture duration, mitogen supplement and colcemid exposure

Culture durations	Mitogens	Colcemid exposures	Mitotic indices	Scores of chromosome morphology*
72 hrs	ConA	50 min	0.38±0.16 <sup>b</sup>	3.86±0.29 <sup>ab</sup>
		90 min	0.17±0.10 <sup>d</sup>	2.20±0.68 <sup>f</sup>
	PWM	50 min	0.73±0.16 <sup>a</sup>	4.22±0.21 <sup>a</sup>
		90 min	0.41±0.26 <sup>b</sup>	3.64±0.26 <sup>bc</sup>
96 hrs	ConA	50 min	0.18±0.12 <sup>cd</sup>	3.05±0.61 <sup>de</sup>
		90 min	0.12±0.10 <sup>e</sup>	2.71±0.62 <sup>e</sup>
	PWM	50 min	0.27±0.18 <sup>bcd</sup>	3.49±0.28 <sup>cd</sup>
		90 min	0.28±0.12 <sup>bc</sup>	3.32±0.26 <sup>cd</sup>

The values are means ± standard deviation (n=160).

<sup>a-f</sup> Different superscripts in same column significantly differ ( $p<0.05$ ).

\* The values were scored by chromosome morphology; very poor(1), poor(2), fair(3), good(4) and excellent(5).

을 미치는 것으로 나타났다. 배양 시간은 72시간 배양이 96시간 배양에 비해, 세포분열 촉진제의 경우 PWM 첨가가 ConA 첨가에 비해, colcemid의 처리 시간은 50분 처리가 90분 처리에 비해 보다 높은 세포분열지수와 형태지수를 나타내었다. 형태지수의 경우 모든 처리 요인 간에 상호 작용이 존재하였으나, 세포분열지수의 경우 배양 시간×세포분열촉진제 및 배양 시간×colcemid 처리 시간에만 상호 작용이 나타났다.

### 고 찰

초기의 동물 염색체 분리는 골수와 같은 지속적으로 분열 증식하는 일부 조직 세포로만 가능하였고, 시료의 채취가 쉬운 혈액으로부터의 염색체 분리는 Hungerford 등(1959)이 혈액 배양법을 소개한 이후 급진적 발전을 이루었다.

염색체 분리를 위한 처리 과정은 크게 세포배양, 증기상 유도를 위한 colcemid 처리, 저장 처리, 고정처리로 나누어진다. 혈액세포배양은 기본 배양액에 성장촉진인자인 FBS, 항생제, 세포분열 촉진제를 첨가하고, 이에 소량의 전혈을 첨가하여 72~96시간 정도 배양한다. 혈액세포배양으로부터 높은 염색체 분열지수와 양호한 염색체 양상을 얻기 위하여 적절한 배양 조건 및 배양 시간과 증기상의 유도 처리 방법이 중요하다. 손과 정(1994)은 염색체 분석을 위한 최적의 배양 시간으로 72~96시간임을 제시하였으며, 96시간 이상 배양시 증기상의 유도율에는 큰 변화가 없으나 염색체 양상은 급격히 저하된다고 보고하였다. 세포분열촉진제 또한 증기상 수와 염색체 양상에 아주 큰 영향을 미친다. Nowell(1960)이 세포분열 촉진제로 PHA를 사용하여 염색체 분리의 질적 양상이 크게 개선된 이래 손과 정(1994)은 이의 첨가 함량은 배양액의 1~2% 정도가 바람직하다는 연구 결과를 발표하였다. 혈액배양에 있어 필수첨가제가 된 세포분열촉진제로는 대

부분 lectin 계열의 물질로서 분리한 식물체에 따라 PHA, PWM, ConA, soybean agglutinin(SBA), wheat germ agglutinin(WGA) 등이 있고, 동물체로부터 분리한 lectin도 있다(Budavari 등, 1996). 이들은 glycoprotein으로 구성되어 세포막에 부착하여 막의 투과성을 변화시켜 분자의 흡수도를 증가시키는데, 특히 식물성 lectin의 경우 lymphocyte의 macromolecule의 합성을 촉진하게 된다. 염색체 수확을 위하여 유사분열 중기 상태에서 세포 분열을 저지시키기 위한 여러 종류의 방추사 억제제가 사용되고 있다. 일반적으로 사용되는 방추사 억제제로는 colcemid, colchicine, vincristin 등이 있으며, 이들의 노출시간과 농도가 염색체 형태에 큰 영향을 미친다(Knight, 1980; Peter와 Thomas, 1997). 일반적인 염색체 분석에 가장 많이 이용되고 있는 colcemid는 세포 내의 튜블린(tubulin)에 결합해서 그 기능을 방해하는 것으로 알려져 있다. 한편, Brinkley 등(1967)은 colcemid가 염색체의 응축을 억제하지는 않는다고 보고한 바 있으나, colcemid를 오랜 시간 처리하게 되면 증기상의 획득률은 높아지지만 세포분열이 진행됨에 따라 염색체의 형태는 자연이 응축되는 양상이 된다. 반면, 단시간 colcemid를 처리하게 되면 증기상의 획득률은 낮아지고, 염색체의 형태는 길어지는 양상을 보이게 된다. 배양 이후 염색체 표본을 위한 처리 과정 또한 염색체의 형태에 매우 큰 영향을 미친다(Rothfels와 Siminovitch, 1958). 저장 처리는 세포내 세포질의 삼투압작용 원리를 적용하여 염색체 분산을 돕는 중요한 과정으로 저장액에 세포가 과다 노출이 될 경우에는 세포벽이 약화되어 염색체 회수에 영향을 미치게 되고, 짧은 노출 시 염색체 응집 현상이 나타난다(Hsu, 1952; Danford, 1984; Holmquist와 Motara, 1987). 세포의 종류에 따라 다양한 저장액을 사용하나 혈액세포 저장액으로는 potassium chloride가 가장 바람직한 것으로 알려져 있다. 팽창된 세포를 고정하는 처리 과정에 있어서 고정액은 세포의 변화를 최소화시키고 세포내 침투가 용이해야 한다. 일반적으로 가장 널리 이용되고 있는 고정액은 Car-

noy's 액으로 메탄올과 아세트산의 비율을 3:1로 혼합한 것이다(Mehlhop와 Gardner, 1982; Korthof, 1986; Idris와 Moin, 2009). Yunis와 Sanchez(1975)는 좋은 양상의 염색체를 얻기 위해 4°C에서 24시간 이상의 고정 처리 과정이 필요하다고 하였다.

소의 최적 혈액 배양 조건 실험에서 방추사를 억제하는 물질인 colcemid는 처리 시간이 증가될수록 세포분열 주기 상 중기상 유도율이 높아지게 되는데, 본 실험에서도 이와 동일한 결과를 나타내어 이론적 근거를 실험적으로 재차 증명하였다. 대표적인 백혈구 세포의 분열 촉진제로 PWM과 PHA가 소개되고 있는데, PWM의 경우 주로 림프구의 B-cell의 분열을 촉진하고, PHA는 T-cell의 분열을 촉진한다고 알려져 있다. 본 실험에서 PWM의 첨가가 PHA 첨가에 비해 월등히 높은 분열지수를 보인 것은 소 백혈구의 경우 B-cell이 T-cell에 비해 분열 촉진율이 높았거나, 분포도가 높았음을 의미한다. 한편, 배양 시간의 경우 72시간 배양이 96시간 배양에 비해 높은 세포분열지수를 나타내었는데, 이는 손과 정(1994)이 제시한 바와 같이 배양 45~72시간째 급격한 세포분열이 이루어지고, 이후 완만한 세포분열을 보인다는 결과와 동일한 양상이다. 또한, 염색체 형태에 영향을 미치는 여러 배양적 요인의 분석에도 중기상 획득을 위한 최적의 배양 방법과 거의 동일한 결과들을 나타내었다. 그러나 colcemid의 처리 시간은 시간이 경과함에 따라 중기 유도율은 높아지나 염색체의 응축이 진행됨으로 형태에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 본 연구 결과 소 혈액세포의 경우 90분 처리가 50분 처리에 비해 보다 양호한 결과를 보이고 있어 소의 경우 90분 정도까지의 colcemid의 노출은 염색체 형태에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 닭 혈액을 이용한 최적 염색체 분리 조건의 실험 결과 공시한 PWM의 첨가가 PHA에 비해 월등히 높은 분열지수를 보인 것은 닭 백혈구의 경우 B-cell의 분포도와 분열 촉진율이 높다는 것을 의미한다. 또한, 배양 시간과 colcemid의 처리 시간이 중기상 획득율에 미치는 영향으로 적정 처리 시간이 지나면 오히려 유도율이 낮아짐을 시사하고 있다. 염색체의 형태에 미치는 여러 배양적 요인도 존재함을 제시하였는데, 요인별 효과는 세포분열지수에서 나타난 결과와 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. 랫드의 경우 소에서와 마찬가지로 배양 시간이 증가될수록 세포분열 중기 유도율이 높았고, 세포분열 촉진제로 동일한 lectin 계열로서 공히 B-cell을 촉진하는 PWM에 비해 ConA의 처리가 세포분열지수 및 염색체 양상에 바람직한 결과를 나타내어 분리물질의 분열 촉진 특이성을 나타내었다. 그러나 colcemid 처리 시간의 경우 처리 시간이 증가할수록 중기상 유도율은 높아지나, 형태적 양상은 저하되는 것으로 나타나 염색체의 응축이 처리 시간에 큰 영향을 받는 것으로 보여진다. 배양 시간의 경우 소나 닭의 결과와는 달리 96시간 배양이 72시간 배양에 비해 높은 세포분열지수를 나타내었는데, 이는 랫드 혈액 세포의 경우 배양에 따른 세포주기가 이들 중에 비해 다소 완만하게 진행되는 것으로 사료된다. 마우스의 경우 배양 시간 및 colcemid의 처리 시간이 중기상 획득율과 염색체 형태에 미치는 영향으로 공히 처리 시간이 증가될수록 바람직하지 못한 결과를 보이는데, 이는 다른 동물중에 비해 세포주기가 매우 짧다는 것을 간접적으로 시사한다. 또한, 세포분열 촉진제로 PWM 및 ConA 첨가

시험을 실시한 바 일반 포유동물에 비해 매우 낮은 분열지수를 나타내어 이들 림프구에 대한 분열 촉진을 유도할 수 있는 적합한 제제가 필요한 것으로 사료된다. 특히 마우스의 경우 백혈구를 이용한 염색체 분리기법의 확립이 제대로 되지 않아 통상적인 포유동물에서 적용하는 분리기법으로써 양호한 염색체의 분리 결과를 기대하기는 힘들 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 소 혈액배양으로부터 염색체 분리의 최적조건은 배양 시간 72시간, 세포분열 촉진제로서 PWM의 첨가, colcemid 처리 시간 90분이 바람직하며, 닭은 배양 시간 72시간, 세포분열 촉진제로 PWM 첨가, colcemid 처리 시간을 50분으로 처리하는 것이 좋고, 랫드의 경우 배양 시간 96시간, 세포분열 촉진제로 ConA 첨가, colcemid 처리 시간을 50분 처리하는 것이 최적 조건이며, 마우스는 배양 시간 72시간, 세포분열 촉진제로 PWM 첨가, colcemid 처리 시간은 50분으로 처리하는 것이 가장 양호한 것으로 사료된다. 따라서 동물의 염색체 분리를 위한 혈액 배양 조건에 있어 배양 시간, 세포분열 촉진제 종류, 그리고 colcemid 처리 시간이 모든 동물에 공히 영향을 미치며, 특히 이들 중 종에 따른 세포분열 촉진제의 선택이 가장 큰 영향을 미친다. 또한, 이들에 영향을 미치는 여러 배양적 요인들 간의 상호 작용도 존재하며, 동물 중에 따라 최적 배양 방법에 다소의 차이가 있으므로 상기 요인들을 고려하여 동물별 혈액 배양 방법을 선정하는 것이 바람직하다.

## 인용문헌

1. Akeson EC, Davisson MT (2001): Mitotic Chromosomes from Mouse Peripheral Blood. Oxford University Press, London.
2. Brinkley BR, Stubb LE, Hsu TC (1967): The effects of colcemid inhibition and reversal on the fine structure of the mitotic apparatus of chinese hamster cells *in vitro*. J Ultrastruct Research 19:1-8.
3. Budavari S. et al. (1996): The Merck Index. 12th ed. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ.
4. Danford N (1984): Measurement of levels of aneuploidy in mammalian cells using a modified hypotonic treatment. Mutation Research 139:127-132.
5. Ford CE, Pollock DL, Gustavsson I (1980): Proceedings of the first international conference for the standardisation of banded karyotypes of domestic animals. Hereditas 92(1):145-162.
6. Holmquist GP, Motara MA (1987): The magic of cytogenetic technology. In: Cytogenetics. Springer-Verlag, Berlin, pp30-47.
7. Hsu TC (1952): Mammalian chromosomes *in vitro*. Hereditas 43:172.
8. Hsu TC, Benirschke K (1967): An Atlas of Mammalian Chromosomes. Springer-Verlag, New York Inc.
9. Hungerford DA (1965): Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hy-

- potonic KCl. Stain Technology 40:333-338.
10. Hungerford DA, Donnelly AJ, Nowell PC, Beck S (1959): The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. American Journal of Human Genetics 11:215-236.
  11. Idris I, Moin S (2009): Somatic chromosomes of the Bornean Sambar deer and Rusa deer interspecific hybrids. American Journal of Applied Sciences 6 (5): 862-868.
  12. Knight L (1980): The Effect of Colcemid. Karyogram 6(3):31.
  13. Korthof G (1986): An improved fixation method for chromosome preparation of Chinese hamster, Chinese hamster-human hybrid, and mouse cell lines. Cytogenet Cell Genet 41:181-184.
  14. Mehlhop P, Gardner AL (1982): A rapid field technique for preparing ant chromosomes for karyotypic analysis. Stain Technology 57(2):99-101.
  15. Nowell PC (1960): Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Research 20:462-466.
  16. Peter A, Thomas H (1997): Chromosomal aberrations *in vitro* induced by aneugens. Mutation Research 379:83-93.
  17. Rothfels KH, Siminovitch L (1958): An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. Stain Technol 38:73-77.
  18. Sohn SH, Fechheimer NS, Ohh BK (1990): Leukocyte culture technique for the study of chromosomes in the Japanese quail. Korea Journal Animal Science 32:748-751.
  19. Tjio JH, Levan A (1956): The chromosome number of man. Hereditas 42:1-6.
  20. Yuins JJ, Sanchez O (1975): The G-banded prophase chromosomes of man. Humangenetik 27(3):167-172.
  21. 박진식, 조병욱, 손시환 (2007): 제주재래마의 핵형분석. 한국동물자원과학회지 51:361-368.
  22. 백규흠, 이철영, 상병돈, 최철환, 김학규, 손시환 (2003): 한국재래계의 염색체 분열 표지 분석. 한국동물자원과학회지 45(1):1-12.
  23. 손시환, 권오섭, 백규흠, 정원, 조은정, 강민영 (2003): 한국재래돼지의 G-, C- 및 NOR-banding. 한국동물자원과학회지 45(6):901-910.
  24. 손시환, 류은경 (1999): Ficoll을 이용한 닭 염색체 분리 기법에 관한 연구. 진주산업대학교 농업기술연구소보 12:131-140.
  25. 손시환, 이재익 (1998): 고분염법에 의한 한우 염색체의 표준 표지 설정. 한국축산학회지 40(5):467-484.
  26. 손시환, 정구민 (1994): 혈액세포를 이용한 염색체 분리분석에 관한 방법적 고찰. 대한불임학회지 21:207-214.

(접수일자: 2011. 9. 2 / 채택일자: 2011. 9. 9)