

〈중 설〉

人間の 染色體 研究法

姜 永 善
(서울대 문리대 동물학과)

The Method for the Study of Human Chromosome

Yung Sun Kang

(Dept. of Zoology, Seoul National University)

사람은 물론 모든 생물의 體細胞는 여러 타일의 染色體를 이중으로 지니고 있어서 倍數(diploid number)라 하고 生殖細胞는 그의 한쪽만을 갖어서 半數(haploid number)라 한다. 1956년에 이르기까지도 사람의 染色體의 倍數는 48로 알려지고 性染色體 구성은 확실하지 못한 상태에 있었다. 1956년 이래 體細胞 染色體 研究에 관한 기술 방법의 비약적인 발견으로 인하여 사람의 정상인 核型은 물론 異常形質을 나타내는 個體의 染色體에 관해서도 정확한 데이터를 얻을 수 있게 되었다.

染色體研究에 있어 개선된 기술방법의 가장 큰 것은 組織培養의 도입이다. 종래의 切片作成法(section method)을 지양하고, 사람 몸에서 지극히 적은 분량의 組織을 얻어가지고 生體에서와 거의 비슷한 환경을 주어 인공적으로 단층의 細胞를 이루어 증식시키는 방법이다. 1956년 사람의 染色體를 정확히 파악하여 倍數로 46개이며, 남자는 XY, 여자는 XX의 性染色體를 지닌다는 점을 밝힌 Tjio 및 Levan도 사람의 胎兒의 肺 組織을 培養한 것을 재료로 삼았던 것이다.

보통 쓰는 마이크로테크닉에서 특별히 개선된 점을 요약해 보면 다음과 같다(Yunis, 1965).

① 培養을 하고 있는 細胞에다 콜키신 또는 콜세마이드의 처리를 함으로서 적당한 分裂像을 보다 많이 얻을 수 있게 하였다.

② 低調液前處理를 해서 細胞내지 核을 팽창시키고 (swelling) 그 결과로 染色體가 넓게 퍼지는 일을 돕는다.

③ 스퀘쉬法(squash method)과 空氣乾燥法(air-drying method)을 개발하여 染色體의 관찰을 쉽고 정확하게 하였다.

그 밖에도 細胞에 H³-thymidine을 처리하는 自己放射法(autoradiography)를 이용하여, 染色體 안에서 이루어지는 DNA 合成의 시기와 패턴(pattern)을 구명하므로써 보다 정확하게 染色體研究를 추진할 수 있게 되었다. 여기 사람의 染色體研究에 있어 현재 이용되고 있는 새로운 기술방법의 개요를 소개해 볼까한다.

다음은 사람의 染色體를 연구한 대표적인 업적에서 나타낸 연구방법 및 재료를 표로써 나타낸 것이다.

표 1. 사람 染色體 研究方法和 材料

Author	Year	Method	Material
Tjio & Levan	1956	Culture, squash	Lung
Ford & Hamerton	1956	" "	Seminiferous tubules
Kodani	1957	" "	" "
Ford et al.	1958	Culture, (short term)	Bone marrow cells
Tjio & Puck	1958	Culture, squash (long term)	Skin & fascia
Lejeune et al.	1959	" "	" "
Hungerford et al.	1959	Culture, air drying (short term)	Leucocytes
Moorhead et al.	1960	" "	" "
Fraccaro et al.	1960	Culture, squash (long term)	Skin & fascia
Harnden	1960	" "	" "

1. 다이크로티크닉의 개선

사람의 染色體研究를 손쉽게 한 소인의 하나는 콜키신(colchicine)의 사용이라 하겠다. 콜키신은 원래 倍數性의 유발원으로 널리 쓰이던 것인데, 1955년 Eigsti 및 Dustin에 의하여 처음으로 細胞分裂抑制要因(a spindle inhibitor)으로 染色體研究에 사용하게 되었다. 다음 Tjio 및 Levan(1956), Ford 및 Hamerton(1956)는 사람 세포의 中期核像의 수를 증가시키는데 효과를 얻기 위하여 사용하였으며, 이것이 발단이 되어 현재에 이어서는 사람만이 아니라 널리 동물의 染色體研究에 이용되고 있다.



그림 1. 정상인 남자의 染色體(2n=46, XY).

만일 白血球나 皮膚의 培養細胞에다 콜키신을 사용할 경우에는 細胞를 固定하기 조금 전에 처리를 하고,

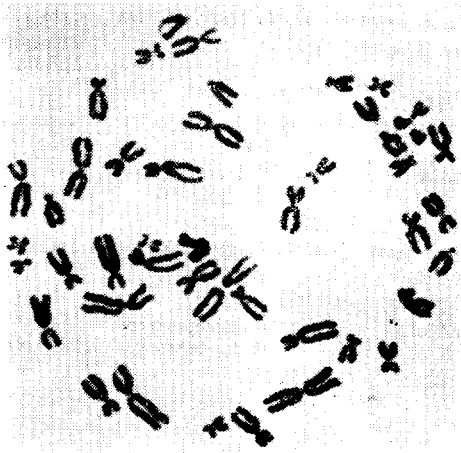


그림 2. 정상인 여자의 染色體(2n=46, XX).

骨髓細胞의 懸濁液일 경우에는 등골을 죽이기 전에 목강에다 일정한 분량을 집어넣어 준다. 근자에 콜키신과 같은 목적으로 콜세마이드(colcemide)가 쓰이고 있는데 여러모로 콜키신보다도 효과적이라 한다. 일찌기 Ford 및 Hamerton이 처음으로 콜세마이드를 포유류의 細胞에 사용하여 성과를 거두었으며, 한편 Boittura 및 Ferrai(1960), Stewart(1960) 등은 異常形質을 지니는 사람의 染色體研究에서 콜키신 보다도 효과적이라 할 점을 밝힌 이래, 현재는 콜키신과 더불어 染色體研究에 널리 사용되고 있다.

染色體가 슬라이드 위에 잘 붙어져서 관찰하기 쉽게 하는 데는 低調液前處理(hypotonic pretreatment)에 의하여 되는데, 대개 이것은 콜키신(혹은 콜세마이드)처리 이후 固定하기 이전에 해야 된다. 일찌기 Makino 및 Nishimura(1952)는 水處理(water treatment), Hsu(1952)와 Hughes(1952)는 低調培養液(hypotonic culture medium)을 사용하여 細胞 속에 물을 많이 집어넣어 팽대시켜서, 染色體를 넓은 범위로 흐트러뜨리는데 효과적임을 알게 되었다. 이것이 低調液前處理의 발단이 되었으며, 현재 대개는 低調培養液을 사용하고 있다. 좀 더 자세히 말한다면 骨髓細胞나 白血球培養에 있어서는 0.95~1.16%의 sodium citrate로 처리하여 효과를 얻고 있다.

이와 같은 처리를 한 뒤 細胞를 固定하는데 대개 固定液으로는 45~60%의 水醋酸 또는 水醋酸과 無水알코올(또는 에탄올)을 1:3의 비율로 섞은 용액(醋酸알코올)을 사용한다. 染色에는 김사(giemsa), 올세인(orcein)을 쓰거나 또는 포일겐반응(Feulgen reaction)에 의한다.

제트를 固定, 染色한 뒤 染色體가 보다 넓은 범위로 흩어지도록 특별한 조치를 한다. 그 중의 하나는 스퀴슈(squashing)라 해서 슬라이드 위에 올려진 細胞를 카와글라스를 써운 뒤 손가락으로 눌러서 細胞가 더지고 속에 들어 있는 染色體가 흩어지도록 하는 방법인데, 간단한 기술이지만 染色體研究에는 많은 도움을 주고 있다. 이 방법은 일찌기 Heitz(1936)가 식물 細胞에 처음으로 시도했던 것이며, 또 초파리의 唾腺染色體研究에도 많이 쓰여왔다. 손가락으로 누르는 정도는 재료에 따라 차이가 있는데 사람의 骨髓細胞같은 것은 굉장히 힘을 주어야 되지만, 한편 白血球의 培養細胞는 간단히 스퀴슈해도 충분한 효과를 얻는다. 이 방법이 근자에 와서 개량된 것이 空氣乾燥法(air-drying method)이다. 일찌기 Rothfels 및 Siminovitch(1958), Tjio

및 Puck(1958)가 처음으로 개발한 방법이며, 固定한 細胞를 固定液과 더불어 일정한 높이(30~40cm)에서 슬라이드 위에 떨어뜨려 가지고 그대로 놓아두어 대기 중에서 건식시켜 슬라이드 위에 재료가 박붙도록 한다. 이 空氣乾燥法은 血液培養이나 長期培養인 細胞의 경우 스퀴슈법보다도 훨씬 효과적인 결과를 가져온다.

2. 染色體研究材料과 培養法

(1) 精巢 (testis)

減數分裂像의 연구를 할 수 있는 유일한 재료가 精巢 組織바이옵시(testis biopsy)이다. 일찍이 Ford 및 Hamerton(1956), Kodani(1957, 1958 a,b) Miller 등(1960)은 이를 통하여 사람의 染色體研究를 한바 있다. 이 바이옵시를 사용할 경우에는 組織培養은 하지 않고 특별한 처리를 한 뒤 그대로 組織을 스퀴슈해서 染色體를 관찰할 수 있다.

Ford 및 Hamerton에 따르면 精巢組織을 15mm³ 정도로 떼내어 가지고 우선 低調液(sodium citrate, potassium glycerophosphate 혹은 sodium chloride 등)으로 실은에서 30분간 처리한다. 다음 재료를 醋酸알코올액(1:3)으로 1시간 固定을 한뒤 증류수에 10분간 담근다. 다음 60°C에서 보통인 鹽酸에 8분간 집어 넣어 加水分解를 시킨다. 이렇게 한 뒤, 도일젠시약(Feulgen reagent)으로 1시간 染色을 하고, SO₂용액에 담갔다가 45% 氷醋酸으로 옮긴다. 다음 재료를 -14°C에서 45% 氷醋酸속에 둔채 오래 저장할 수 있다. 이렇게 한 재료를 조금씩 끄집어내어 물로 씻어 가지고 1% papain용액에 10분간 담근다. 이 처리는 細胞를 늘어나게 하는데 꼭이나 효과적이다 한다. papain용액에 든 재료를 끄집어내어 물로 옮기고 다음 組織의 작은 한토막을 꺼내 60% 氷醋酸에 든채로 실리콘처리한 카바글라스(siliconized cover slip)를 덮고 슬라이드 위에서 스퀴슈를 한다. 이렇게 해서 이루어진 標本은 임시 프레파라타트기에 오래 보존할 수 없으며, 영구프레파라트로 옮길 경우는 dry-ice 방법을 쓴다(Conner & Fairchil, 1953).

(2) 皮膚 (skin)

피부바이옵시(skin biopsy)를 얻어가지고 培養을 해서 (skin culture) 수 많은 分裂像을 얻는 방법인데, 적은 분량의 組織으로 단기간에 많은 수의 分裂像을 얻을수 있다는 것이 특징이다. 이 방법은 Ingenito등(1958), Puck등(1958), Tjio 및 Puck(1958), Chu 및 Giles(1959), Fraccaro등(1960), Harnden(1960)등에 의해 확립되었다. 개개 피부바이옵시는 3mm×4mm 정도의

크기로 해서 멸균된 培養液(흔히 TC medium 199 혹은 human serum/glucose saline medium)에 넣어 살린다. 이것을 장기간 培養할 경우에는 染色體 수가 변할 우려가 있기 때문에 대개 2주일 정도 이내에서 프레파라트를 만드는 것이 좋다. 대개 장기로 培養할 경우에 染色體 변환된 倍數性인 細胞의 출현률이 높아지는 것이다.

Harnden(1960)은 일찍이 Harris(1954)가 생장 중에 있는 쥐의 纖維芽細胞(fibroblast cells)을 트립신 처리(trypsinization)로 개개의 細胞를 분리시키기 전에 플라즈마 클롯트(plasma clot) 속에서 기른 고전적인 방법을 사람의 細胞에 이용하여 皮膚組織培養의 기본을 삼았던 것이다. 약 1mm² 정도의 작은 피부조직 5~6장을 2ml의 培養液이 들어 있는 5ml용량의 카렐플라스크(Carrel flask) 안에서 플라즈마 클롯트 속에 매몰시킨다. 플라즈마 클롯트는 병아리 胚抽出液(chick embryo extract)와 닭의 플라즈마(chick plasma)를 각각 반씩 섞어서 만든 것이다. 재료가 든 카렐플라스크는 항온기 안에서 37°C로 유지시키며, 항온기 안의 공기가 CO₂를 5%정도 잔직하도록 콘트롤한다(CO₂ control). 그러면서 培養液은 2일마다 갈아준다. 여기 쓰이는 培養液은 다음과 같이 배합한다.

- 20% 사람의 AB 타입 血清
- 70% TC medium 199
- 10% 병아리 胚抽出液

재료를 플라즈마 클롯트에 매몰한 뒤 대략 3일째 되는 날 繼代培養(subculture)을 시작한다. 즉 묽은 培養液을 버리고, 2ml의 0.05% trypsin/versene 혼합액을 더움제 해서 플라스크 속에 집어넣어 가지고 20분간 37°C로 유지되어 있는 항온기 속에 집어넣어서 플라즈마 클롯트로부터 細胞가 떨어져도록 한다. 이렇게 해서 얻어지는 細胞가 든 용액을 500 rpm으로 5분간 遠沈을 시킨뒤 細胞를 8ml의 카렐플라스크 속의 培養液 안에 집어넣어 준다. 다음에는 일정한 수의 細胞를 카바글라스가 들어있는 샤페(petri dish) 안의 5ml의 培養液이 들은데다 옮겨 培養시킨다. 이때도 역시 공기안에 5%의 CO₂를 잔직하도록 해서 22시간 항온기내에 집어넣어둔다. 다음 최종농도가 0.0005%로 한 쿨키신을 6시간 처리하고 25% Hank 용액으로 15분간 低調液前處理를 하며 醋酸알코올로 固定, 락틱醋酸올세인(lactic acetic orcein)으로 染色을 해서 프레파라트를 만든다.

(3) 骨髓(bone marrow)

骨髓細胞(bone marrow cells)로 染色體研究를 하기 위한 프레파라트 작성에는 두가지 방법이 있다.

① 短期培養法(short-term suspension culture method)

이것은 Ford 등 (1958)이 개발한 아주 짧은 시간 培養하는 방법이다. 헤파린을 섞은 링거용액(heparin-Ringer's solution) 안에 긴뿔을 담근채로 실온에서 길이 3인치 정도의 注射針이 달린 注射器를 써서 뼈속 骨髓 부분에 注射針을 집어넣어 링거용액을 빨아올리고 또 내뱉는 일을 여러번 되풀이해서 骨髓細胞(1ml 정도)를 얻는다. 이때 기포가 생기지 않도록 해야 한다. 15분 후에 재료를 1500 rpm으로 10~15분간 遠沈을 시키고, 다시 注射器를 사용해서 上澄液(supernatant)를 빨아내고 2~3ml의 포도당식염액(glucose saline solution) 속으로 옮겨 넣는다. 포도당식염액은 100ml의 증류수에다가 0.6g의 포도당과 0.7g의 sodium chloride를 섞어서 만든다. 용액 안에서 細胞가 잘 섞이도록 하는데 기포는 절대로 생기지 않도록 해야 한다. 나중에 細胞가 든 용액을 注射器 같은데 옮겨가지고 이를 수경으로 뒤여서 1~2분간 흔들어 赤血球가 산화하도록 한다. 이렇게 한 뒤 37°C의 항온기 속에 넣어 일정한 시간 培養을 해가지고 포도당식염액에 0.04% 콜세마이드를 섞은 것을 培養液의 1/10의 비율로 집어넣고 1시간동안 다시 항온기 안에 넣어둔다. 다음 細胞가 든 용액을 500rpm으로 4~5분간 遠沈을 하고, 그 上澄液을 버리고 細胞를 37°C에서 1.1% sodium citrate액 3ml 속에 옮겨서 뒤섞는다. 다시 15분후 細胞를 앞에서와 같이 遠沈을 한 뒤 上澄液을 버리고 固定液으로 바꾼다. 固定液은 역시 醋酸알코올(1:3)를 쓰며, 잠시후 새로운 液으로 바꾸어 가지고 30분간 固定한다.

다음 細胞를 50%알코올에 2번, 증류수에 2번 담그는데 시간은 전체로 20분간을 준다. 다음 증류수를 버리고 실온에서 보통인 鹽酸을 넣어가지고 그릇을 60°C의 물탕안에 8분간 집어넣는다. 그뒤 바로 그릇을 어둠물 안에 담겨서 加水分解를 중지시킨다. 이렇게한 細胞는 포인젠시약으로 1시간동안 染色을 하며, 끝으로 SO₂액으로 2번 씻고 차게한 45% 氷醋酸으로 한번 씻어 가지고 다시 잘아얇게 하는데 이렇게 된 細胞는 -14°C에서 오래 보존할 수도 있고, 바로 프레파라트를 만들 수도 있다.

② 單層細胞培養(monolayer cell culture)

이 방법은 Fraccaro 등(1960)이 처음으로 시도한

것이다. 앞에서 설명한바와 같이 해서 얻어진 骨髓細胞를 실리콘 처리한 시험관에다 3ml의 培養液과 1%헤파린을 2방울 섞은 용액과 같이 집어넣어 뒤섞는다. 여기 쓰이는 培養液은 다음과 같이 배합한다.

40% 사람의 血液

30% TC medium 199

30% Hank 식염액(Hank's balanced salt solution)

상기 3용액을 섞어서 100ml를 만들고 다시 5ml의 소의 胚抽出液을 섞어서 만든다.

이렇게 해서 이루어진 細胞가 섞인 용액 1ml을 21×26mm의 크기의 샤페안에 카바글라스와 2ml의 培養液이 들어있는데다가 집어넣는다. 이 샤페는 37°C, 5%CO₂로 콘트롤된 상태에서 보존하여 培養한다. 그 뒤의 과정은 앞에서 설명한 피부마이오시의 경우와 동일하다. 骨髓細胞는 약 24시간에서 카바글라스에 붙게되고 2~3일이 지난 뒤 잘 증식하고 있음을 볼 수 있다.

(4) 末梢血液(peripheral blood)

末梢血液의 白血球의 培養은 血液培養(blood culture)이라 불리우며, 일찌기 Osgood 및 Brooke (1955)에 의해 개발이 되었지만, 이를 染色體研究에 이용한 것은 Hungerford 및 그의 공동연구자이며(1959), 그뒤 Moorhead 등 (1960)에 의해 더 한층 발전을 보게 되었다.

血液培養의 경우 프레파라트는 약 3일정도(72시간)에서 이루어지며, 白血球의 제1차 分裂에서 中期分裂像을 포착해야 된다. 다른 방법에 비해 특이한것은 재료인 血液에 헤파린(heparin) 처리를 하고 또 白血球의 分裂을 촉진시키기 위해 PHA(Difco의 bacto-phytohaemagglutinin)란 약을 집어넣어야 한다는 점이다. 10~15ml의 末梢靜脈血을 4mg/ml의 헤파린액으로 적셔있는 注射器로 빨아내어 0.2ml의 PHA용액이 들어 있는 그릇안에 집어넣는다, 다음 血液과 PHA를 잘 뒤섞으며, 이 그릇을 어둠물 속에 30~45분간 세워둔다. 다음 재료를 4°C의 상태에서 5~6분간, 400rpm으로 遠沈을 한다. 白血球가 섞여 있는 플라스마를 아래층인 赤血球와 떼어 가지고 플라스마의 분량의 약 4배 정도의 培養液(TC medium 199)을 섞어 희석시켜서 1mm³의 분량 안에 800~1500개의 白血球가 들어가도록 한다. 이와 같이 白血球가 섞인 培養液을 밀크병에 8ml 정도씩 분배해 가지고 37°C의 항온기 안에서 72시간 培養한다. 白血球가 들은 병은 하루에 2번씩 흔들어 주며 pH를 약 7.2정도로 해 준다. 70시간 培養한 뒤 콜세마이드를 집어넣고 2시간 항온기내에서 처리한다. 이렇게 한뒤의 과정은 이미 앞에서 설명한 骨髓細胞培

양의 경우와 같게 하는데 0.95% sodium citrate의 前處理는 하지 않는 것이 보통이다. 다음 수확方法이나 空氣乾燥法을 통하여 프레파라아트를 만든다. 이 밖에도 腎臟, 肺臟, 子宮, 卵巢, 心臟, 肝臟, 脾臟 등의 組織을 재료로 培養을 해서 프레파라아트를 만들 수도 있다.

3. 自己放射法에 의한 染色體研究

自己放射法 (autoradiography)이란 放射性同位元素 또는 그 標識化合物의 分布를 특별히 만든 寫眞乳劑에 의해서 기록하는 방법이다. 이 방법을 최초로 染色體研究에 도입한 이는 Taylor 등 (1957)이며, 식물의 일종인 *Vicia faba*의 細胞를 재료로 삼았다. 다음 Lima-de-Faria (1959)는 메뚜기의 한 종류 *Melanoplus differentialis*를 재료로 이 방법을 통해 개개의 染色體에서 DNA 合成에 시간적인 차이가 있음 (非同調複製, asynchronous DNA replication)을 처음으로 밝혔다. 自己放射法에 의한 포유류의 染色體研究는 Taylor (1960)에 의해 햄스타(Chinese hamster) 細胞에서 처음으로 이루어졌으며, 한편 Wimber (1961)는 *Tradescantia paludosa*에 시도한 바 있다.

그 뒤 사람의 細胞에도 自己放射法이 응용되어 정상인 사람의 細胞는 물론 여러 종류의 染色體異常個體 또는 培養細胞株(culture cell strain)의 染色體研究에도 많은 공헌을 하고 있다(Lima-de-Faria 등, 1961; Morishima 등, 1962; German, 1962; Giannelli, 1963; Grumbach 등, 1963; Kikuchi & Sandberg, 1963, 1964; Kikuchi, 1965). 사람의 細胞에 있어서도 개개의 染色體에서 DNA의 非同調複製를 하고 있음을 밝혔다. 더 나가 정상인 여자의 細胞에서 보이는 1개의 X 染色體가 DNA 合成의 후기에 강하게 標識됨을 밝혔으며, 이것을 後複製X 染色體(late replicating X chromosome) 또는 hot X라고 부르게 되었다. 그러나 남자의 細胞에서는 이와같은 hot X를 찾아볼 수 없다.

自己放射法에 의한 染色體標本의 작성 및 관찰은 다음과 같이 7개의 단계로 나누어 설명할 수 있다.

1) 材料의 標識

染色體觀察에는 生體細胞에서 보는 방법과 組織培養을 통하는 경우의 두 가지가 있는데, 自己放射法을 이용하는 染色體研究에는 組織培養을 통하는 방법이 적당하며, 그중에도 末梢血液培養이 가장 효과적이라 하겠다. 또 그 밖에도 皮膚培養, 培養株 등에도 이용되고 있다. 실제로 Moorhead 및 Defenidi (1963)는 2배

性培養株(diploid cell strain)을, Stubblefield 및 Mueller (1962) 등은 각각 헬라細胞(HeLa cells)를 사용한 바 있다. 한편 Gavosto 등 (1963)은 白血病(leukemia) 환자에서 H^3 -thymidine을 투여하여 *in vivo*인 상태로 標識을 시도한 바 있다. 그러나 이와같은 生體細胞를 사용할 경우는 標識化合物을 직접 生體내에 투여하는 때문에 染色體를 충분히 標識하기 위하여는 대량의 標識化合物을 필요로 하며, 또 뒤에서 설명할 시간적인 처리를 정확히 하기가 곤란하다는 등의 불편한 점이 있어 좋은 방법이라고 할 수 없다.

H^3 로 標識한 前驅物質은 細胞내에 집어넣는 데는 그 實驗目的에 따라서 그의 농도, 細胞와의 접촉시간, 培養시간 등을 결정하게 된다. 또 培養液 속에 非標識前驅物質 또는 그 物質에 拮抗하는 物質이 크게 문제가 되기 때문에 가능하면 이들 物質을 전혀 간직하지 않는 培養液을 사용해야 된다. 따라서 H^3 -thymidine을 사용할 경우에는 TC199과 같은 thymidine이나 thymine을 간직하지 않는 培養液을 사용하는 것이 좋다. 染色體研究를 위한 自己放射法에 있어 일반적으로 사용하는 H^3 -thymidine의 용량은 $0.2 \sim 0.3 \mu\text{Ci/ml}$ 이다. 지나치게 H^3 -thymidine의 용량을 많이 할 경우에 H^2 의 β 線에 의한 染色體의 切斷(breakage) 또는 核分裂의 장애를 일으킨 우려가 있다. 다음은 H^3 -thymidine을 細胞에 접촉시키는 시간이 문제가 된다. 만일 H^3 -thymidine을 細胞에 집어넣는 것만이 목적이라면, 이 시간을 아무리 오래해도 무방하겠지만 대개의 染色體研究는 細胞週期(cell cycle)의 여러 시기에서 細胞가 받아들인 것을 조사함을 목적으로 하기 때문에 細胞와 접촉하는 시간은 되도록 짧게 해야 된다. 실제로 染色體研究의 경우 10~30분 동안 접촉시키는 것이 보통이다. H^3 -thymidine은 細胞내로 빨리 흡수됨으로 위와 같이 단시간 접촉으로도 충분히 목적을 달성할 수 있다. 접촉시간을 정확히 유지시키기 위하여 H^3 -thymidine 처리가 끝나면 바로 H^3 로 標識하지 않은 thymidine을 많은 분량 집어넣어 줌으로써 H^3 -thymidine이 지나치게 많이 細胞내로 들어가는 것을 억제할 수 있다. 실제로 사용한 H^3 -thymidine의 용량의 100배의 標識되지 않은 thymidine을 집어넣는다면 細胞내로 들어가는 H^3 -thymidine의 분량은 1/100이 되며, 실질상 거의 들어가지 못하도록 억제할 셈이 된다. 이렇게 한 뒤 遠沈을 해서 H^3 -thymidine을 간직하고 있는 培養液을 버리고 새로운 것으로 바꾸어 넣은 뒤 다시 37°C 로 보존한다.

재료의 標識處理에서 固定까지의 시간을 여러 가지로 달리 해서 시도해 보고, 어느 때 標識處理를 하면 染色體에 있어 自己放射가 적당한가를 명백히 해 둘 필요가 있다. 만일에 末梢血液培養인 경우에는 標識 시간에 구애없이 培養 시간은 대개 전체로 합쳐서 72시간으로 일정하게 유지해야 된다. 다음에 중요한 것은 溫度인데 標識處理에 사용하는 모든 용액은 미리 37°C로 더욱게 해야 하며 처리하는 동안도 이 溫度를 유지시킨다.

2) 染色體標本 作成

재료의 固定은 培養 개시후 72시간때 한다. 固定 30분 전에 최증농도가 0.005% 가 되도록 콜키신을 처리한다. 대개 染色體研究에 콜키신처리는 1~2 시간동안 하는 것이 보통이지만 이 실험에 있어는 처리시간을 위와 같이 짧게 한다. 다음에 低調液前處理로 Hank 용액과 증류수를 1:3의 비율로 혼합한 용액을 사용하며 37°C로 10분간 처리한다. 다음에 遠沈을 통해 細胞를 모은 뒤 氷醋酸알코올(acetic acid 1 : methanol 3)로 1시간 동안 고정한다. 固定液을 새로운 것으로 몇번 바꾼 뒤 최후로 細胞가 섞여있는 固定液을 깨끗한 슬라이드 위에 떨어뜨려 가지고 급속히 건조시킨다(air-drying method).

3) 染色

自己放射法을 실시하기 전에 染色하는 방법과 뒤에 하는 경우가 있지만 染色體研究를 목적으로 하는 自己放射法에 있어는 먼저 染色하는 것이 편리하다. 그것은 自己放射法을 실시하기 전에 染色體를 관찰하고 顯微寫眞까지 찍어두는 것이 편리한 때문이다.

前染色을 할 경우는 染色液을 잘 선택해야 된다. 즉 自己放射法을 실시하는 동안에 김자(giemsa) 같은 色素는 재료에 化學的인 안개가 끼게 하고 또 헤마토키시린은 現像液에서 脫色이 된다. 自己放射法을 사용할 경우에는 醋酸올세인(acetic orcein)이 가장 적합한 染色液이라 하겠는데 이를 사용할 경우에도 寫眞處理의 시간은 가급적 짧게 해서 脫色하는 것을 막아야 된다. 그밖에 포일겐 반응(Feulgen reaction)도 효과적인 방법으로 되어 있다.

染色을 끝마친 뒤 곧 染色體觀察로 들어간다. 카바글라스를 덮지 않은 채 슬라이드 위의 재료에다 직접 임멜존 오일(immersion oil)를 떨어뜨려 가지고 관찰하며 寫眞을 찍는다. 관찰을 마친 標本은 싸이롤(xylol)를 써서 임멜존 오일을 제거하는데, 포일겐반응을 통해 얻은 標本은 알코홀로 다시 싸이롤을 제거한 뒤 脫水한다. 醋酸올세인 染色을 할 경우는 알코홀로는 脫色이 됨으로 흐르는 물로 5~6시간 씻어서 싸이롤을 제거한 뒤 건조시킨다.

4) 自己放射 處理

寫眞乳劑(autoradiographic film)를 標識한 재료에 접촉시키는 과정이다. 이 방법에는 2가지가 있다.

① 디핑法(dipping method)

액체로 된 寫眞乳劑를 사용하는 것이며, Kodak NTB-2, NTB-3 Ilford L4, K5 또는 NR-M1(日製)등이 있다. 따라서 슬라이드를 용액인 寫眞乳劑 속에 집어넣어서 재료위에 얇은 膜이 이루어 지도록 한다.

② 스트립핑法(stripping method)

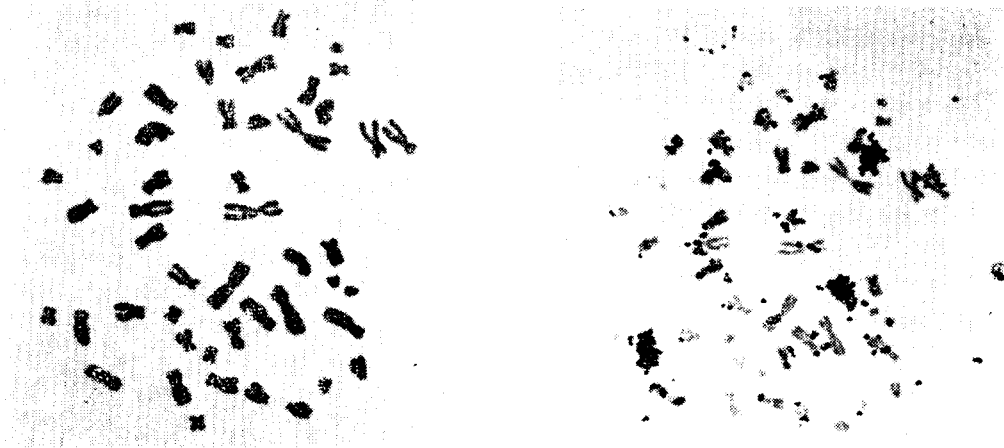


그림 3. 自己放射處理를 받은 사람의 染色體(染色體異常個體, XXXXY).
왼편은 處理前, 바른편은 處理후이며, 黑化된 銀粒子에 의해 구별된다.

얇은 필름으로 된 寫眞乳劑(autoradiographic strip-ping film)를 슬라이드 위의 재료 겔에다 붙이는 방법이다. 寫眞乳劑로는 AR-10이 있다. 다이핑법은 스트립핑법보다 조작이 간단하며 신속하게 많은 재료를 처리할 수 있지만 기술을 얻는데 상당한 시간을 요한다. 현재 액체인 寫眞乳劑를 사용하는 다이핑법이 보다 많이 사용되고 있다.

여기서는 다이핑법을 쓰는 自己放射處理를 설명한다. 모든 처리는 暗室내에서 하며, 安全光으로 Kodak의 Wratten safelight No. 2를 사용하며, 寫眞乳劑로부터 약 1m의 거리에 고정시킨다. 실온은 16°C, 濕도는 10~20%인 상태가 가장 이상적이다. 액체인 寫眞乳劑라 해도 보통인 실온에서는 굳어 있기 때문에 이를 더운게 해서 용해시켜 가지고 사용한다. 대개 寫眞乳劑의 용기를 42~45°C의 부란기에 집어넣어 1시간쯤 두면 완전히 용해된다. 액체표면의 기포를 완전히 제거한 뒤 슬라이드를 가만히 이 속에 집어넣어 1~2초 동안 둔 뒤 끄집어내 가지고 그 뒷면을 카체나 여지로 씻은 뒤 슬라이드를 수직으로 세워둔다. 이 경우 슬라이드의 아래 끝에 여지를 깔아두면 여분인 寫眞乳劑를 씻어낼 수 있다. 이렇게 약 30분동안 놓아두어서 건조시킨다. 이렇게 해서 약 4 μ 의 두께인 乳劑膜을 슬라이드 위에만 들게 되는 것이다. 이를 흔히 코오팅(coating)이라 부른다. 이 코오팅을 할 때 寫眞乳劑의 溫度를 가장 정확히 유지시켜야 하는데, 溫度가 내리면 乳劑膜이 두꺼워지고, 溫度가 높아지면 乳劑膜은 지나치게 얇아지기 때문이다. 寫眞乳劑는 늘 冷蔵庫속에서 보존하는데 새로운 것일수록 효과적이며, 열, 광선, 放射性物質등을 엄중히 피해야 한다.

5) 露出 (exposure)

寫眞乳劑가 완전히 건조하면 슬라이드는 乾燥劑와 함께 소형인 흑색의 標本상자에 집어넣어 엄중히 봉한 뒤 冷蔵庫속에서 보존하여 露出을 시킨다. 이때 광선이나 공기가 새들어가지 않도록 밀봉을 해야 된다. 露出 중에 濕도가 높아지면 반응이 현저하게 저해된다. 그래서 標本상자 안에 乾燥劑를 넣는 것이며, 실제로 실리카 겔(silica gel)이 사용된다. 한편 溫度는 4°C를 露出期間중 유지시켜야 한다. H³-thymidine의 사용량이 0.5~1 μ Ci/ml 정도인 경우에는 1~3 주일동안 露出시키는 것이 가장 적당하다.

6) 寫眞處理

露出이 끝난 標本은 최후 과정으로 寫眞現像 및 定着處理를 받게 된다. 現像液, 定着液은 각각 寫眞乳

劑에 따라 지정되어 있다. 실제로 더핑법에서 사용하는 Kodak의 NTB-2나 NTB-3乳劑를 사용할 경우에는 現像液은 Kodak D-19, 定着液은 역시 Kodak acid fixer가 지정되어 있다. 앞에서도 말했지만 色素에 따라서는 寫眞處理에서 脫色될 우려가 있기 때문에 가능한 한 짧은 시간에 완성하도록 해야 한다(1.5~5분 정도). 寫眞處理는 18°C의 온도 밑에서 하는 것을 원칙으로 삼고 있다. 寫眞處理가 끝난 뒤 標本을 완전히 건조시키고 封入劑를 떨어뜨리고 카바글라스를 덮어 영구 프레파라아트를 만든다.

7) 觀察

이상의 처리에 의해서 細胞내에 집어넣어준 H³-thymidine의 β 선은 寫眞乳劑 속의 銀粒子(silver grain)를 검은 색으로 黑化시킨다. 따라서 標本을 乳劑膜을 통해 顯微鏡 밑에서 조사하여 黑化된 銀粒子的 분포를 알아봄으로써 細胞내에 들어간 thymidine의 위치를 명백히 할 수 있다.

染色體研究에 있어서는 우선 自己放射處理로 들어가기 전에 일반적인 경우와 마찬가지로 모든 슬라이드를 檢鏡하며, 좋은 中期核像을 포착하여 寫眞을 찍어 核型分析하며, 관찰한 모든 分裂像은 슬라이드 위의 그들의 위치를 정확히 기록해 둔다. 이렇게 한 뒤에 自己放射法의 모든 처리를 하게 되고 영구프레파라아트가 이루어진 뒤 이미 관찰한 中期分裂像을 乳劑膜을 통하여 다시 관찰한다는 것이다. H³-thymidine을 받은 細胞에 있어서는 染色體 위에 黑化된 銀粒子가 나타남을 볼 수 있다.

染色體를 標識할 경우에는 染色體의 複製가 언제 일어나는가를 확실히 해야 된다. DNA合成은 細胞週期中에 DNA合成기에 한해서만 이루어지고 다른 시기에는 전혀 일어나지 않는다. 정상인 사람의 血液培養에서 보면 DNA合成期은 分裂中期전 3~4시간 정도에서 끝나며, DNA合成期은 사람 細胞에서 15시간 정도가 된다.

여자의 細胞의 1개의 X染色體(hot X)는 合成期の 끝까지 DNA合成을 해서 대량의 銀粒子로 標識되어 있음을 본다. 남자 細胞에서 보이는 Y染色體도 늦게까지 DNA合成을 해서 다른 染色體와 구별이 되며, 또 常染色體에 있어서도 B₄, D₁₃ 등의 染色體가 가장 늦게까지 合成을 하고 있음을 본다. 일반적으로 대형인 染色體는 소형인 染色體에 비하여 빨리 DNA合成을 시작하여 늦게까지 合成을 계속한다. 그리고 모든 相同

染色體에서 DNA의非同調인複製가 이루어지고 있음을 볼 수 있다.

예전에는 사람을 재료로 染色體研究란 거의 불가능했던 것인데 組織培養法의 도입으로 이점을 완전히 해결하게 되었다. 앞에서 설명한바와 같이 組織培養에도 여러가지 방법이 있는데 그중에서 研究者가 2가지만택해서 실시할 경우 결과로 완전한 데이터를 얻을 수 있다. 종래에 알고 있는 일발적인 마이크로테크닉의 설명은 여기서 생략했지만, 培養 중의 細胞에다가 여러 가지 개선된 마이크로테크닉을 가미한 방법을 통해 標本을 작성하게 되면 손 쉽게 사람의 染色體研究를 추진할 수 있다. 더구나 근자에 개발된 放射性同位元素를 이용하는 自己放射法을 사람의 染色體研究에 응용할 경우 보다 세밀하고 정확한 데이터를 얻게 된다.

참 고 문 헌

- Bottura, C. and I. Ferrari, 1960. A simplified method for the study of chromosomes in man. *Nature* 186: 904.
- Chu, E.H. Y. and N. Giles, 1959. Human chromosome complements of somatic cells in culture. *Am. J. Hum. Genet.* 11: 63.
- Conger, A.D. and L.M. Fairchild, 1953. A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Techn.* 28: 281.
- Eigsti, O.J. and P. Dustin, 1955. Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry. Ames, Iowa, Iowa State College Press.
- Ford, C.E. and J.L. Hamerton, 1956 a. The chromosomes of man. *Nature* 178: 1020-1023.
- Ford, C.E. and J.L. Hamerton, 1956 b. A colchicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Techn.* 31: 247.
- Ford, C.E., P.A. Jacobs and L.G. Lajha, 1958. Human somatic chromosomes. *Nature* 181: 1565-1568.
- Fracarro, M., K. Kaijser and J. Lindsten, 1960. Somatic chromosomes complement in continuously cultured cells of two individuals with gonadal dysgenesis. *Lancet* 2: 899.
- Gavosto, F., A. Pileri, L. Pegoraro, and A. Mcmeigliano, 1963. In vivo incorporation of tritiated thymidine in acute leukemia chromosomes. *Nature* 200: 807-809.
- German, J. L., 1962. DNA synthesis in human chromosomes. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 24: 395-407.
- Giannelli, F., 1963. The pattern of X-chromosome deoxyribonucleic acid synthesis in two women with abnormal sex-chromosome complements. *Lancet* 1: 863-865.
- Grumbach, M.M., A. Morishima, and J. H. Taylor, 1963. Human sex chromosome abnormalities in relation to DNA replication and heterochromatinization. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 49: 581-589.
- Harnden, D.G., 1960. A human skin culture technique used for cytological examinations. *Brit. J. Exp. Path.* 41: 31.
- Harris H., 1955. Some quantitative studies on the multiplication of connective tissue cells *in vitro*. *Brit. J. Exp. Path.* 36: 115.
- Heitz, E., 1936. Die Nucleal-Quetschmethode. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 53: 870.
- Hsu, T. C., 1952. Mammalian chromosomes *in vitro* X. The karyotype of man. *J. Heredity* 43: 167-172.
- Hughes, A., 1952. Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. *Quart. J. Micr. Sci.* 93: 207.
- Hungerford, D.A., A.J. Donnelly, P.C. Nowell and S. Beck, 1959. The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Am. J. Human Genet.* 11: 215-236.
- Ingenito, E.F., J. M. Craig, J. Labesse, M. Gautier, and D.D. Rutstein, 1958. Cells of human heart and aorta grown in tissue culture. *A. M. A. Arch. Path.* 65: 355.
- Kikuchi, Y., 1965. The method for the autoradiographical study of human chromosome replication. *Japan. J. Genet.* 40: 73-80.
- Kikuchi, Y. and A.A. Sandberg, 1963. Chronology and pattern of human chromosome replication. *J. Clin. Invest.* 42: 947.

- Kikuchi, Y., and A.A. Sandberg, 1964. Chronology and pattern of human chromosome replication. I. Blood leucocytes of normal subjects. *J. Nat. Cancer Inst.* **32**: 1109—1143.
- Kodani, M., 1957. Three diploid chromosome numbers of man. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**: 285.
- Kodani, M., 1958 a. The supernumerary chromosome of man. *Amer. J. Hum. Genet.* **10**: 125.
- Kodani, M., 1958 b. Three chromosome numbers in Whites and Japanese. *Science* **127**: 1139.
- Lejeune, J., M. Gautier and R. Turpin, 1959. Les chromosomes humaines en cultures de tissus. *C. R. Acad. Sci. Paris* **248**: 1721.
- Lima-de-Faria, A., 1959. Differential uptake of tritiated thymidine into hetero- and euchromatin in *Melanoplus* and *Secale*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **6**: 457—466.
- Lima-de-Faria, A., J. Reitalu, and S. Bergman, 1961. The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of man. *Hereditas* **47**: 695—704.
- Makino, S. and I. Nishimura, 1952. Water pre-treatment squash technique. *Stain Techn.* **27**: 1—7.
- Miller, O.J., U. Mittwoch and L.S. Penrose, 1960. Spermatogenesis in man with special reference to aneuploidy. *Heredity* **14**: 456.
- Moorhead, P.S. and V. Defendi, 1963. Asynchrony of DNA synthesis in chromosomes of human diploid cells. *J. Cell Biol.* **16**: 202—209.
- Moorhead, P.S., P.C. Nowell, W.J. Mellman, D. M. Battips and D.A. Hungerford, 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**: 613—616.
- Morishima, A., M.M. Grumbach and J.H. Taylor, 1962. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **48**: 756—763.
- Osgood, E.E. and J.H. Brooke, 1955. Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by application of "gradient principles". *Blood* **10**: 1010—1022.
- Puck, T.T., S.J. Cieciora and A. Robinson, 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.* **108**: 945.
- Rothfels, K.H. and L. Siminovitch, 1958. An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. *Stain Tech.* **33**: 73—77.
- Stewart, J.S.S., 1960. Chromosome analysis. *Lancet* **2**: 651.
- Stubblefield, E., and G.C. Mueller, 1962. Molecular events in the reproduction of animal cells. II. The focalized synthesis of DNA in the chromosomes of HeLa cells. *Cancer Res.* **22**: 1091—1099.
- Tjio, J. H. and A. Levan, 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* **42**: 1—6.
- Tjio, J.H. and T.T. Puck, 1958. Somatic chromosomes of man. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **44**: 1229.
- Taylor, J.H., 1960. Asynchronous duplication of chromosomes in culture cells of Chinese hamster. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**: 455—463.
- Taylor, J.H., P.S. Wood, and W.L. Hughes, 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**: 122—128.
- Wimber, D. E., 1961. Asynchronous replication of deoxyribonucleic acid in root tip chromosomes of *Tradescantia paludosa*. *Exp. Cell Res.* **23**: 402—407.
- Yunis, J. J., 1965. Human chromosome methodology. Academic Press. New York and London.