

## 正常人 染色體의 帶狀構造에 關하여

### Banding Patterns of Normal Human Chromosomes

서울大學校 醫科大學 生化學教室\*, 內科學教室\*\* 및 人口醫學研究所\*\*\*

金 昇 元\* · 徐 廷 瑄\* · 崔 圭 完\*\* · 宋 庭 子\*\*\*

#### 緒 論

1960年代末까지 人類細胞遺傳學 分野에 있어서 주로 사용되었던 染色體檢査 方法은 古典的인 Giemsa染色法에 의한 核型分析方法이었다. 이 方法에 의한 染色體의 識別은 染色體의 크기, 中心節의 位置 및 第二次 狹窄部의 有無等에만 依存하였다(Denver Conference, 1960). 그러나 이러한 몇가지 指標에만 依存하는 在來의 方法으로는 46個의 人體染色體 全부를 個別的으로 識別 分類하기가 不可能할 뿐 아니라, 染色體의 缺失, 重複, 轉倒, 轉位와 같은 構造異常을 正確하게 찾아내기가 困難하다.

한편 1968년 Caspersson 등은 acridine誘導體와 quin-acrine mustard를 染色劑로 使用하여 染色體를 螢光顯微鏡下에서 觀察한 결과, 한 染色體의 全長에 걸쳐 帶狀構造가 交代로 나타나는 事實을 처음으로 報告하였다. 그후 많은 研究者들(Caspersson et al., 1970, a, b, c, d; Pearson and Bobrow, 1970; Pearson et al., 1971; Zech, 1969)이 이 螢光染色法을 導入하여 實驗한 結果, 染色體의 帶狀構造는 再現性이 높아 染色體의 構造의 異常을 確認하는 標識로서 利用될 수 있음을 報告하였다.

한편 이와 同時에 染色體를 먼저 trypsin과 같은 變性劑로써 處理한 다음 再來의 Giemsa染色을 施行하면 光學顯微鏡下에서도 螢光染色法의 染色體帶狀構造와 거의 비슷한 形態의 帶狀構造가 觀察된다는 것도 報告되고 있다(Arrighi and Hsu, 1970; Dutrilleaux and Lejeune, 1971; Seabright, 1972; Wang and Fedoroff, 1972). 이 方法으로는 染色體의 帶狀構造를 比較的 簡便하게 觀察할 수 있기 때문에 현재에는 螢光染色法보다 더 廣範圍하게 使用되고 있다. 뿐만 아니라 1971年度에 開催된 第4次 人體染色體 標準化學會(The 4th

Human Chromosome Standardization Conference, Paris Conference, 1971)에서는 染色體의 帶狀構造를 이용한 核型分析을 앞으로의 人體染色體 同定에 公式의 으로 使用하도록 決定한 바도 있다.

著者들은 螢光染色法을 利用하여 休止期의 細胞核에서 Y螢光體(Y-fluorescent body)의 發現率을 이미 調査한 바 있거니와(Seo and Choi, 1975), 人體染色體의 螢光核型分類도 試圖하였던 바, 螢光染色法에 의한 染色體의 帶狀構造의 檢査보다는 簡便한 Giemsa染色法이 實用性이 크다는 點에 着眼하여 本 研究를 試圖하게 되었다. 따라서 著者들은 本 研究에서 正常 成人 男女 各 10名의 淋巴球染色體를 Giemsa染色法을 利用하여 染色한 후 各 染色體에 나타나는 帶狀構造의 位置 및 크기를 確立하고자 한 것이다.

#### 對象 및 方法

##### 1. 細胞培養

本 研究의 對象으로는 서울大學校 醫科大學 學生 및 實驗室技士 가운데 正常 男女 各 10名의 志願者를 擇하였다. 染色體檢査方法으로는 末梢血液의 淋巴球를 培養하여 檢査하는 Moorhead 方法의 變法(1960)을 使用하였다. 이를 簡單히 要約하면 대체로 다음과 같다.

末梢血液 10ml을 heparin을 抗凝固劑로 하여 採取하고, 이를 滅菌된 試驗管에 옮겨 45分間 冷蔵 保管하였다. 그 다음 1,000rpm으로 1分間 遠心分離하여 淋巴球가 濃縮된 血清分割을 얻고, 그 중 1.0ml(細胞數 約  $6.0 \sim 8.0 \times 10^6$ 에 該當함)을 組織培養 flask에 옮기고, 여기에 培養液 NCTC 109(Difco會社製品) 8ml, 胎生牛血清(Difco會社製品) 1.5ml, 그리고 0.1ml의 phytohemagglutinin(PHA, Gifco會社製品)을 첨가한 후  $37^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$ 培養器에서 培養하였다.

##### 2. 染色體標本 製作

위와 같이 46~50時間 培養한 후 Colcemid(Ciba會社製品) 0.4ml을 첨가하여 2時間동안 더 培養하였다. 이

本 論文의 研究費 一部는 서울醫大 同窓會 研究基金에서 充當하였음.

를 다시 1,000rpm에서 遠沈한 후 沈澱物과 0.1ml程度의 上澄液만 남기고 나머지는 버린 뒤에 低張溶液(0.075M KCl) 8.0ml을 첨가하여 37°C에서 15分間 放置했다. 이 溶液을 다시 500rpm에서 10分間 遠沈시켜 低張溶液의 處理時間이 통털어 25分이 되게 하였다. 遠沈 후 沈澱된 細胞를 Pasteur pipette을 使用하여 少量의 上澄液(약 0.1ml)에다 浮離시킨 후 固定液(빙초산: methanol=1:3) 6~10방울을 넣고 15分間 室溫에서 放置하였다. 培養된 細胞數가 많으면 固定液을 2~3ml까지 넣기도 하였다. 이를 다시 1,000rpm에서 8分間 遠沈한 다음 위와 같은 方法으로 細胞浮遊液을 얻어 깨끗한 slide 中央에 1~2방울씩 떨어뜨리고 空氣中에서 乾燥시켜 60°C oven에 12時間 내지 24時間동안 넣어둔 후 使用하였다.

### 3. Trypsin-EDTA-Giemsa Banding 方法

染色體의 帶狀構造를 檢査하기 위한 方法으로는 Wang 및 Fedoroff의 方法(1972)을 약간 修正하여 다음과 같이 施行하였다.

위의 過程을 거친 slide를 0.025M 磷酸 kalium緩衝溶液(pH 6.8)에 넣어 56°C 恒溫槽에서 10分間 放置한 후에 trypsin-EDTA 溶液(Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>을 除去한 平衡鹽溶液에 溶解한 0.1% trypsin과 0.02% EDTA를 同量 混合한 溶液, pH 7.0)에 넣어 25°C 恒溫槽에 5~6分間 담가두었다. 그 후 平衡鹽溶液으로 2번 잘 洗滌하고, 1.0ml의 Gurr R66 Giemsa stock 溶液을 50ml의 磷酸 kalium緩衝溶液(pH 6.8)에 稀釋하여 만든 Giemsa 染色溶液에 넣어 10~12分間 放置하였다. 그 다음 slide를 증류수에 넣어 잘 洗滌하고 乾燥시켜서, 24時間이 지난 후 染色體가 잘 피진 中期細胞를 찾아 oil immersion으로 處理하여 光學顯微鏡으로 觀察하였다.

### 結果 및 考案

本 研究의 對象이 된 20名의 淋巴球로써 만든 染色體標本을 分析함에 있어, 먼저 한 個體當 10個씩의 中期細胞를 찾아 染色體의 帶狀構造를 顯微鏡下에서 直接 觀察하였다. 그 가운데서 5個의 中期細胞는 寫眞을 찍어 核型分析을 試圖하였다.

各 染色體에서 나타나는 帶狀構造는 染色體標本이 歪曲되거나 膨大된 몇몇 境遇를 除外하고는 男女의 區別이 없이, 또 個個人의 差異가 없이 大部分에서 거의 一致하는 結果를 보였다. 帶狀構造를 나타내는 染色體들의 分類命名은 Denver規約(1960)에 의거하였으며, 이를 第1圖에 整理하여 나타내었다. 그리고 第1圖에 나타난 各 染色體의 帶狀構造를 idiogram으로 整理하

여 第2圖에 圖示하였다.

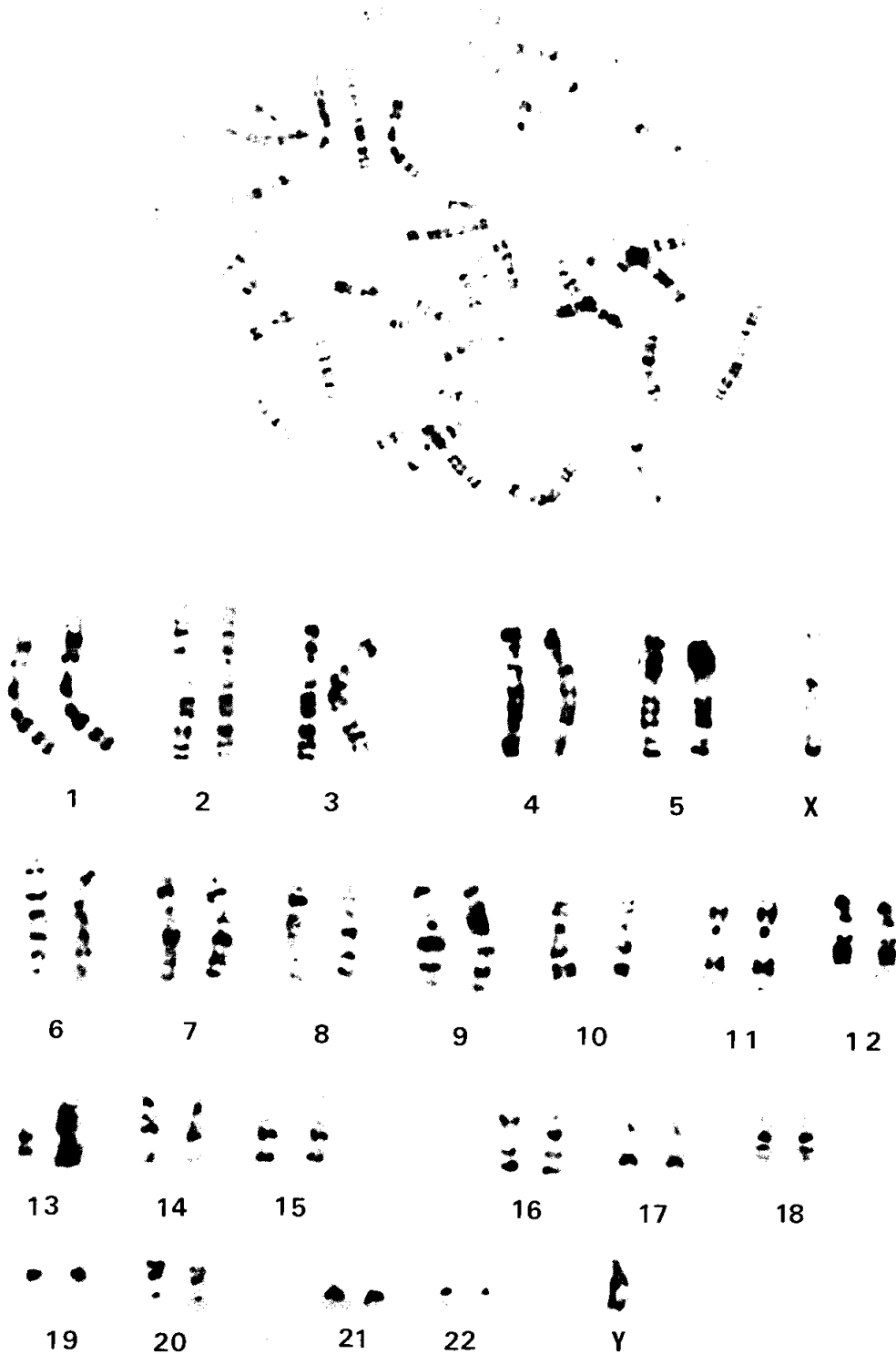
著者들의 結果를 다른 研究者들의 idiogram 結果와 比較하면 몇개의 亞帶(sub-band)의 差異는 있으나 全體의인 帶狀構造의 樣相에는 큰 相異點이 없었다. 뿐만 아니라 著者들의 研究室에서 꼭 같은 過程에 의하여 處理된 染色體들은 모두 같은 帶狀構造를 나타내었는데 이點은 技術의 確立이라는 觀點에서 매우 重要한 事實이다. 그러나 再現性이 높은 染色體 帶狀構造를 얻기 위해서 주의해야 할 點은 染色體標本 製作時에 細胞의 分裂時期를 맞추는 것으로서, 예를 들면 前期細胞의 染色體는 中期細胞에 비하여 染色體의 길이가 길고 더 많은 亞帶가 나타나므로 帶狀構造의 樣相이 달라질 수도 있었다.

이러한 帶狀構造의 檢査가 비교적 쉽게 이루어질 수 있고, 또 正常韓國人에서의 染色體帶狀構造가 確立되었으므로 앞으로 여러가지 細胞遺傳學的 疾患의 診斷에 이 方法을 利用할 수 있는 可能性이 생겼다. 그 몇 가지 實例를 들면 다음과 같다.

第2圖에서 보는 바와 같이 A群染色體 가운데 1番과 3番染色體는 中心節 近處部位에 진하게 染色되는 帶(band)를 나타내는데 반하여, 2番染色體에서는 同一部位에 帶가 나타나지 않는다. 이러한 帶狀構造의 特徵을 利用하면 3番染色體와 비슷한 形態를 나타낸 異狀染色體, 例컨대 X<sub>q1</sub>(X染色體의 長腕으로 形成된 等腕染色體)나 t(D<sub>q</sub>, D<sub>q</sub>)(D群染色體의 長腕끼리 轉位를 일으킨 染色體)에서도 正確한 鑑別이 可能하다.

B群染色體 가운데서 4番 및 5番染色體의 鑑別, 그리고 D群染色體 가운데서 13番, 14番 및 15番染色體의 鑑別도 帶狀構造의 分析으로 可能하게 되었다. 뿐만 아니라 特히 G群染色體 가운데 21番 및 22番의 鑑別이 可能하므로 Down症候群의 染色體와 Philadelphia 染色體에 關聯된 染色體의 差異點이 分明해졌다(Caspersson et al., 1970 a,b). 그밖에도 側中心節轉倒(paracentric inversion)이나 相互的轉位(reciprocal translocation) 등과 같이 染色體의 크기에는 별다른 變動이 없는 微細한 構造異常의 鑑別에 있어서 帶狀構造의 重要性은 매우 크다고 하겠다.

染色體 帶狀構造의 染色機轉에 관하여는 아직 確實한 定說이 없으나, Pardue와 Gall(1971)에 의하면 trypsin 등의 處理로 發生한 染色體內的 變性DNA(denatured DNA)의 Giemsa 染色성이 再生DNA(renatured DNA)보다 낮기 때문이라고 報告하였으며, 한편 Commings와 Mattaccia는 진하게 染色되는 部位가 바로 DNA의 反復鹽基序列(repetitive base sequence)이 存在하는 部位와 一致한다는 것을 報告하였다. 이렇게



**Fig. 1.** Human male metaphase cell, stained by the modified method of Wang and Fedoroff (1972): Karyotype and banding patterns characteristic of each chromosome pair are visible.

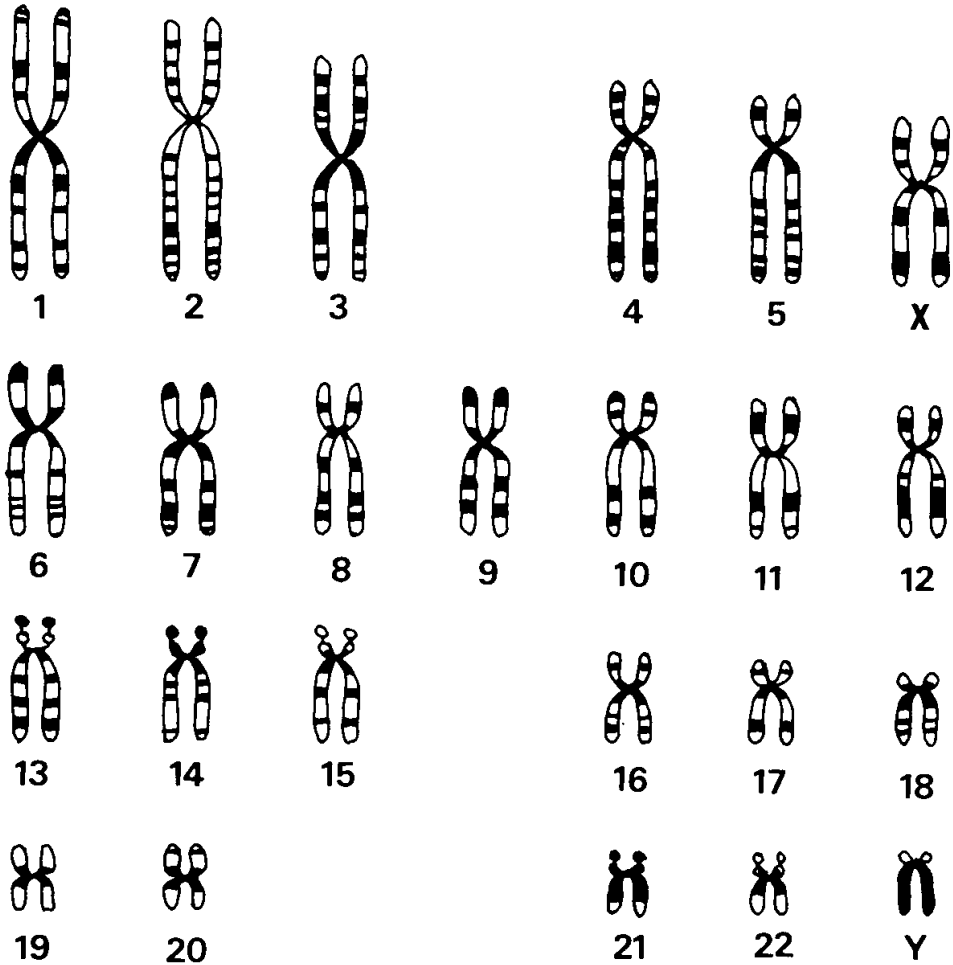


Fig. 2. Diagram of the most characteristic pattern for each chromosomal pair.

Giemsa染色의 機轉이 明白하게 밝혀져 있지 않음에도 불구하고 이 帶狀構造의 分析方法은 精密한 細胞遺傳學的 檢査를 可能하게 하므로 實際로 臨床的인 目的으로서는 勿論이고 研究를 위한 技術로서도 매우 有用한 것으로 評價되고 있다.

### 結 論

正常韓國人 染色體의 帶狀構造를 檢査하기위한 새로운 技術을 確立하기 위하여, 서울大學校 醫科大學 學

生들가운데 志願者 20名의 末梢血液淋巴球에서 中期染色體 標本을 만들어서 Giemsa-trypsin-EDTA溶液으로 染色하였던 바, 染色된 slide에서 各 染色體의 帶狀構造를 뚜렷하게 볼 수 있었다. Trypsin-EDTA의 處理로 얻은 染色體의 帶狀構造는 螢光染色法이나 다른 方法으로 얻은 核에서 나타나는 帶狀構造와 類似하게 나타났으며, 이렇게 하여 얻은 idiogram은 앞으로 우리나라에서의 여러가지 染色體異常에 대한 細胞遺傳學的 檢査를 實施하는데 標準 idiogram으로 使用할 수 있을 것으로 생각된다.

—ABSTRACT—

**Banding Patterns of Normal Human Chromosomes**

Seung Won Kimm, Jeong Sun Seo

*Department of Biochemistry*

Kyoo Wan Choi

*Department of Internal Medicine*

Jung Ja Song

*Institute of Reproductive Medicine and Population,  
College of Medicine, Seoul National University*

To establish a new technique for chromosome banding, 20 human chromosome preparations (10 males and 10 females) were obtained from the medical school volunteers, and were stained with Giemsa-trypsin-EDTA solution. The stained slides showed banding patterns clearly in each chromosome. The bands produced by trypsin-EDTA treatments appeared to be similar to those found in fluorescent and other karyotypes; and it was confirmed that the bands produced by all the various techniques visualized a fundamental organization of mammalian chromosomes.

**REFERENCES**

- Arrighi, F.E. and Hsu, T.C.: *Localization of heterochromatin in human chromosomes*, *Cytogenetics*, 10: 81, 1971.
- Caspersson, T., Zech, L., Modest, E.J., Foley, G.E., Wagh, U., and Simonsson, E.: *DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus*, *Exp. Cell Res.*, 58:141, 1969.
- Caspersson, T., Gahrton, G., Lindsten, J., and Zech, L.: *Identification of the Philadelphia chromosome as number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis*, *Exp. Cell Res.*, 63:238, 1970a.
- Caspersson, T., Hulton, M., Lindsten, J., and Zech, L.: *Distinction between extra G-like chromosomes by quinacrine mustard fluorescence analysis*, *Exp. Cell Res.*, 63:240, 1970b.
- Caspersson, T., Lindsten, J., and Zech, L.: *The nature of structural X chromosome aberrations in*

- Turner's syndrome as revealed by quinacrine mustard fluorescence analysis*, *Hereditas*, 66:287, 1970c.
- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., and Modest, E.J.: *Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents*, *Chromosoma (Berlin)*, 30:215, 1970d.
- Comings, D.E. and Mattoccia, E.: *Buoyant density and satellite composition of DNA isolated from nuclear sub-fractions (Abstr.)*, *Ann. Meet. Amer. Soc. Human Genet., Indianapolis, 1970*.
- Denver Conference, 1960: *Ann. Human Genet.*, 24: 319, 1960.
- Dutrilleaux, B. and Lejeune, J.: *Sur une nouvelle technique d'analyse caryotype humain*, *Compt. Rend.*, 272:2638, 1971.
- Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M., and Hungerford, D.A.: *Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood*, *Exp. Cell Res.*, 20:613, 1960.
- Pardue, M.L. and Gall, J.G.: *Chromosome localization of mouse satellite DNA*, *Science*, 168:1356, 1971.
- Paris Conference, 1971: *Standardization in Human Genetics. Birth Defects: Orig. Art. Series*, 8:1, 1972.
- Pearson, P.L. and Bobrow, M.: *Fluorescent staining of the Y chromosome in meiotic stages of the human male*, *J. Reprod. Fert.*, 22:177, 1970.
- Pearson, P.L., Bobrow, M., Vosa, C.G., and Barlow, P.W.: *Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes*, *Nature (London)*, 231:326, 1971.
- Seabright, M.: *A rapid banding technique for human chromosomes*, *Lancet*, ii:971, 1972.
- Seo, J.S. and Choi, K.W.: *Y fluorescence in human interphase nuclei*, *Seoul J. Med.*, 16:253, 1975.
- Seo, J.S., Song, J.J., and Choi, K.W.: *Differential staining of human chromosomes by quinacrine mustard*, (unpublished).
- Wang, H.C. and Fedoroff, S.: *Banding in human chromosomes treated with trypsin*, *Nature New Biol. (London)*, 235:52, 1972.
- Zech, L.: *Investigation of metaphase chromosomes with DNA-binding fluorochrome*, *Exp. Cell Res.*, 58:463, 1969.