啓明醫大 論文集 第3卷 第1號
The Keimyung Univ. Med. J.
Vol.3, No.1, June 1984

염색체연구에 있어서 Q-band와 G-band의 차이

계명대학교 의과대학 해부학교실

장 성 익

경북대학교 의과대학 해부학교실

주 강

=Abstract=

Differences between Q-band and G-band in human chromosome

Chang Sung Ik

Department of Anatomy, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea.

Joo Kang

Department of Anatomy, Kyungpook National University School of Midicine, Taegu, Korea.

The cause of the appearance of chromosome bands may be many-fold. Four factors have been found to be of particular importance; The occurrence of repetitive DNA, differences in the base composition of DNA, differences in the protein components and differences in the degree of packing of the DNP-complex. These factors may of course mutually related. Moreover, All these factors may influence the disposition of the DNA to denature and reassociate under certain conditions, which may be an important factor in producing chromosome bands.

The authors attempted to search these mechanism: a series of thermal, 2xSSC, trypsin and pH 9 were utilized to investigate for the G-band and quinacrine, for the Q-band.

The Y-chromosome was the most brilliant and was easily distinguished between G-group disorder chromosome, It seems, as for now, that Q-band is more favorable for male-sex chromosomal patients than Giemsa band. For the G-band, authors may propose the treatment 2xSSC plus trypsin in cytogenetic laboratory.

서 론

최근 염색체연구가 활발해 지면서 염색체에 대한 관심이 높아지고 있으며 특히 band法이 개발되고 나서 급속한 진전을 보이고 있다. Q-band는 Casspersen 등[1]에 의하여 quinacrine에 全 염색체가 형광 됨을 처음 알게 되었으며 이런 토대로 해서 pearson[2]은 quinacrine dihydroohloride를 사용하였던 바 휴지기 세포에서 밝게 형광됨을 발견 하였

* 이 논문은 1983년 한국의학재단 연구보조비로 이루어졌음.

는데 Nitowsky[3]에 의하여 그것이 Y-chromatin 임을 조직배양法으로 판명되어 Y-body라 칭하게 되었다. Q-band法에 의한 염색체진단은 비싼 장비와 slide의 영구보존이 불가능 하여 오직 현미경 사진에만 의존해야 하는 결점이 있으므로 slide의 영구보존이 가능한 새로운 band法이 필요하게 되었다. 그래서 Seabright[4]는 단백질을 가수분해 시키는 효소를 이용했고 Schnedle[5]은 염기성생리식염수를 사용했고 Sumner[6]는 생리식염수에 열을 加하였고 Lomholt와 Mohr[7]는 열(heat)처리만 했고 patil 등[8]은 알카리 만으로 좋은 band를 얻는데 성공 하였다. 이것이 G-band의 시초이다. 이렇게 여러 가지 방법으로 band를 얻을 수 있는 요인을 요약해 보면 1) 연속 반복된 DNA가 얼마만큼 존재 하는가? 2) DNA의 기본 염기배열의 相異 3) 단백질 요소의 相異 4) DNA가 packing된 정도의 차이 등을 열거할 수 있다. 대체로 염색체內의 DNA의 기본염기는 adenine과 thymidène의 이중결합(A=T)과 guanine과 cytosine의 삼중결합(G≡C)으로 되어 있는데 이중 A=T가 풍부한 부위는 lysine을 중심으로 G≡C가 풍부한 부위는 arginine을 중심으로 모여 있다. lysine이 풍부한 histone은 염색질의 농축을 일으키는 반면 arginine이 풍부한 histone은 염색질. 농축을 방해한다. 그러므로 中期時 염색체에서는 lysine이 많은 부위에 DNA가 많이 packing되어 있음을 알 수 있다.

Q-band나 G-band는 모두 이런 원리를 이용한 기술이나 실제로 실험실에서 하고 있는 염색체의 band 양상을 보면 Q-band와 G-band가 일치하고 있지 않음을 알 수 있다. 저자들은 이런 Q-band와 G-band의 차이점이 왜 생기며 실제로 임상적으로 어떤 band를 이용할 것인지를 알고저 다음과 같은 실험을 하여 이것을 규명하고 어떤방법이 가장 바람직한 것인가를 찾았으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 임파구배양

사람의 혈액 1ml를 RPMI 1640 8.0ml와 20% fetal calf serum을 혼합시켜 만든 media에 0.1ml의 phytohemaglutinin을 첨가하여 CO_2배양기에 72시간 배양 시켰다. cell harvest 2시간 전에 colchicine 0.1μl/ml를 넣고 배양을 완료한 후 1,000 rpm으로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리된 혈액 성분중 임파구를 채취하여 HANKS액에 씻은 후 KCl 6ml를 첨가하여 37°C water bath에 8분간 두었다. 고정은 acetic acid와 methanol을 1:3의 비율로 만든액으로 하였으며 3회 연속 반복 하였다. slide는 flame 방법으로 작성 하였다.

2. Q-band3法

건조된 slide 표본을 37°C 일반 incubator에 4일간 두었다가 꺼내어 100%, 75%, 50% alcohol에 차례로 5분간 씩 고정 시킨 후 증류수로 씻고 2.5 mg/50ml D.W의 quinacrine mustard액으로 8분간 염색한 후 MacIlvaine buffer(pH8.0)에 3번 연속적으로 씻어내고 cover glass로 덮은 다음 형광현미경으로 관찰한 후 사진을 찍어 각 숫자마다 염색체를 분류 하였다.

3. G-band法

건조된 slide를 37°C 일반배양기에 1주일간 둔 후 A군은 87°C Bt plate에 1시간 뒀다가 buffer에 씻고 5% Giemsa에 6분 15분 30분씩 염색했으며 B군은 60°C 2xSSC에 2시간 둔 후 5% Giemsa에 30분간 염색 하였으며 C군은 trypsin에 15분간 둔 후 바로 염색 하였으며 D군은 pH 9 buffer에 15분간 둔 후 Giemsa에 염색을 각각 시행 하였다.

성 적

表 1에서 보는 바와 같이 사람의 임파구를 배양해 본 결과 G-ban의 양상은 조건을 각기 달리 했을때 87°C hot plate를 이용한 thermal 조건 하에서는 Giemsa 염색 시간을 달리하여도 바람직한 band는 아니었다. 2xSSC에 30분간 염색하였으나 염색농도에 관계없이 band의 형태는 취하지만 바람직한 것은 아니었다. 단백질을 가수분해 시키는 trypsin을 처리해 본 결과 Giemsa 2% 농도에 15분간 염색하여 좋은 band를 얻을 수 있었다. 그리고 pH 9에서 10% Giemsa 농도에 15분간 염색하여 좋은 band를 얻을 수 있었다. 圖 1은 국제규격의 banding 양상과 저자들이 행한 Q-band 및 2xSSC and trypsin 처리하여 얻은 G-band 양상이다.

Q-band와 G-band는 A group의 제 1번, 3번 염색체의 장완 시작부위와 제9번, 제16번 그리고 Y 염색체의 장완에서 틀리게 나타나고 있었다. 아마도 polymorphism 때문이 아닌가 사료된다. (圖 1)

Table 1. Banding results with different conditions of postfixation treatment, buffer composition and staining time

Postfixation treatment	Buffer	Dye concentration(%)	Staining time (min)	Quality of banding Giemsa
Thermal	0.05MP	0.005	6	++
	0.05MP	0.005	15	++
	0.05MP	0.005	30	+
2xSSC	0.05MP	0.005	30	++
	0.05MP	0.015	30	++
Trypsin	0.05MP	0.002	15	+++
	0.05MP	0.005	15	++
	0.05MP	0.020	15	+
pH 9	0.05MP	0.002	15	++
	0.05MP	0.005	15	++
	0.05MP	0.010—0.015	15	+++
	0.05MP	0.020	15	+
	0.05MP	0.005	6	—

+++: excellent banding ++: good banding
+: poor banding —: no banding

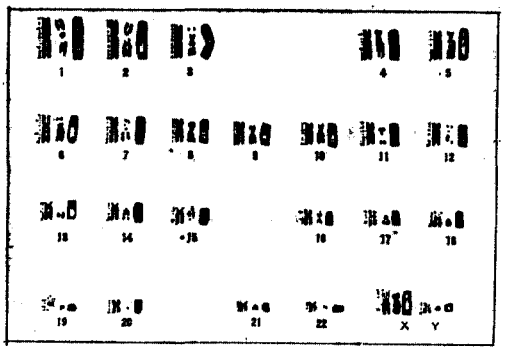

Fig. 1. ISCN(71, 75), G-band and Q-band Karyotyping on human chromosome.

고 찰

염색체에 band를 일으키는 원인은 다음의 4가지 요인들에 의해 생긴다.

1. 연속반복된 DNA의 존재(ouurance of repetitive DNA); DNA를 cesium chloride下에서 원심분리 하여 밀도계측기(densitometer)로 DNA fraction 곡선을 그려보면 사람에서는 4가지 형의 곡선이 그려진다. 大體로 사람 genome의 30~35%는 repetitive DNA로 되어있고 이中 절반은 고도로 꼬여져 있으며 나머지 절반은 중등도로 꼬여져 있다. 이런 repetitive DNA가 mouse에서는 동원체(centromere) 부위에 있고 (Pardue and Gall)[9] 사람에서는 염색체 제1, 9, 16번의 동원체 근처에서 Satellite Ⅱ, 즉 A=T가 풍부한 DNA가 많으며 (Jones and Corneo)[10], Satellite Ⅰ, 즉 고도로 꼬여진 DNA는 Y 염색체 장완(long arm)에 많다. 이런 부위는 constitutive heterochromatine 부위로서 quinacrine에 밝게 염색되고 유전적으로 inactive한 곳이다. 그러므로 C-band 부위는 고도로 꼬여진 DNA를 가지는 부위가 되며 이런 trivial DNA는 유전자 복제의 진화에 중요한 역할을 하며 돌연변이를 감소 시키는데 결정적 역할을 한다. 본 연구에서도 그와 유사한 band가 나타났다(Fig Ⅰ).

2. DNA의 기본 염기배열의 相異(Differences in base composition of DNA); repetitive DNA의 형성과정에 중요한 것은 GC/AT의 상관관계이다. 사람에 있어서 DNA Satellite Ⅰ과 Ⅱ는 A=T가 풍부한 반면 Ⅲ과 Ⅳ는 G≡C가 풍부한 곳이다. Ellison과 Barr[11]는 A=T가 풍부한 부위에서 quinacrine이 밝게 염색됨을 발표하였으며 A=T가 풍부한 DNA는 G≡C가 풍부한 DNA보다 낮은 온도조건에서 변성이 잘되고 열(heat)로서 차츰 변성을 시켜보면 A=T가 풍부한 DNA가 변성을 일으켜 Giemsa에 염색이 잘되나 G≡C가 풍부한 DNA는 변화하지 않는다. Weiblum[12]은 AT나 GC 염기의 quinacrine 형광은 형광되는 정도가 AT/GC 비율에 기인할 뿐 아니라 AT 기본염기 가운데 GC 기본염기가 스며들어있는 정도에도 관계가 있다고 보고 하였다. 본 연구에서도 Y 염색체에 특히 형광이 잘 되어 있음(Fig. Ⅰ)을 알 수 있고 단순히 열만 가하여도 G-band를 얻을 수 있었다(Table Ⅰ).

3. 단백질요소의 相異(differences in the protein

components) ; 단백질을 가수분해 시키는 효소들 즉 trypsin, pronase, pancreatine, chymotrypsin 으로 처리하면 Q나 G-band 양상과 비슷하게 나타난다. 그러나 Mackey[13]에 의하면 trypsin의 작용은 단백질 가수분해 성질 과는 무관하며 염색체의 양이온인자를 제거하므로서 염색체에 부종을 일으키는 성질이 있다고 하였다. Giemsa액 자체가 또한 이런 성질을 가지고 있기 때문에 trypsin과 유사한 반응을 일으키며 trypsin外에 potassium permagnate와 urea도 band를 일으키는 성질이 있다. Clark와 Felsenfeld[14]는 AT가 풍부한 DNA는 lysine이 많은 histone과, GC가 풍부한 DNA는 arginine이 많은 histone과 관계가 있고 전자는 chromatin을 응축시키는 반면 후자는 chromatin이 응축되는 것을 방해하는 성질이 있다고 했다. 그러므로 Q-band에서 밝게 빛나는 부위는 lysine이 많으며 고도로 응축되어 있다고 말할 수 있다. 그러나 comings[15]는 histone 자체가 염색을 다르게 나타내는 원인이 되지 않음을 증명한 바 있다.

4. 응축된 정도의 차이(packing differences) : DNA의 염기와 histone의 아미노산이 모든 염색체에서 일정한 비율로 존재하는 것이 아니다. 부위에 따라 고도로 꼬여져 많이 packing되어 있는 곳과 그렇지 못한 부위가 있으며 또한 variable region (변화영역)이 생기게 된다. 이런 변화영역은 polymorphism으로 인종과 국가간의 차이가 있음이 밝혀져 있고 어떤 유전질환과는 무관하다고 되어있다.

이상에서 언급한 것 들이 band를 얻을 수 있는 원인이 된다. Sumner와 Evans[15]는 Giemsa는 DNA에 결합되고 단백질에 결합되는 것이 아니라고 했으며 Giemsa가 양이온의 성질을 갖고있기 때문에 이들을 결합시키는 역할을 하고 DNA-protein 복합체의 응축상태나 배열정도에 따라 각각 다르게 나타난다. 또한 고정액이 어느정도 단백질을 제거하는 성질이 있어 단백질과 DNA의 결합이 자연히 변하게 되므로서 염색성도 달라진다고 했다. Q-band가 AT가 풍부한 부위에 밝게 형광됨은 이론상 합당 하다고 하겠으나 G-band는 위에 언급한 4가지 원인중 어느 한 가지 만으로는 설명할 수 없고 4가지 원인들이 복합적으로 작용하기 때문이라고 사료되며 실제로 실험해 본 결과 고온, 2xSSC, trypsin 및 pH 9에서 모두 G-band가 나타났다. 그러나 실제로 실험실에서 가장 잘 얻을 수 있었던 G-band는 2xSSC에 선처리 하여 DNA를 변성시키고 trypsin으로 후처리 하여 단백질을 가수분해 시켜서 훌륭한 band를 얻을 수 있었다. 그리고 환자진단용으로는 D군(제13, 14, 15번)과 G군(제21, 22번) 그리고 Y염색체이상으로 의심되는 환자에게는 Q-ndba가 좋으며 그 나머지는 G-band로 진단하는 것이 바람직 스럽다고 강조하고 싶다.

요　약

사람의 임파구를 배양하여 Q-band와 G-band를 각각 행 하였던 바 Q-band는 DNA 염기중 AT부위에 강하게 염색되어 D군의 판별 및 G군과 Y염색체 이상이 있을 때 유효한 것 같았으며 G-band는 여러 가지 복잡한 기전으로 인한 복합적인 작용에 의해 나타났다. Q-band에서 밝게 형광되는 부위와 G-band에서 Giemsa에 잘 염색되는 부위가 거의 일치 하였으나 제 1, 9, 16번 염색체의 동원체 근처에서 약간의 차이가 생겼다. 이것은 heteromorphism에 기인 된다고 사료 되었으며, 전위염색체(translocation) 등을 진단할 경우는 Q-band보다 G-band가 더 유효한 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Caspersson, T., Zech, L., and Johansso: C. Quinacrine mustard fluorescence of human chromosomes. Exp. Cell Res., 61 : 474—475, 1970.
2. Pearson, P. : The use of new staining techniques for human chromosome identification. J. Med. Genet., 9 : 264—275, 1972.
3. Nitowasky, R. W. : Problems of Giemsa banding. Ann. Acad. Sci., 80 : 54—64, 1973.
4. Seabright, M. : A rapid banding technique for human chromosome. Lancet, Ⅱ : 971—972, 1971.
5. Schnedl, W. : Banding patterns of human chromosome. Nature New Biol., 233 : 93—94, 1971.
6. Sumner, A. T. : New techniques for distinguishing between human chromosome. Exp. Cell Res., 81 : 223—236, 1971.
7. Lomholt, B., and Mohr: J. Human karyotyping by heat Giemsa staining and comparison with fluorochrome techniques. Na-

ture New Biol., 234 : 109—110, 1971.

8. Patil, S. S., Merrick, and Lubs, H. : Identification of each human Chromosome with a modified Giemsa stain. Science, 173 : 821, 1971.
9. Paredue, M.L. and Gall, J.G.: Chromosomal localization of mouse Sattelite DNA. Sience, 168 : 1356—1358, 1970.
10. Jones, H.W., and Corneo, J.L.: Sattelite DNA in the mouse. Sience, 169: 1412—1413, 1971.
11. Ellison, J.R., and Barr, M.L.: The relation between DNA synthesis and chromosome structure. J. Cell Biol. 30 : 525—540, 1973.
12. Weiblum, K. : Animal cytology and evolution. 2nd ed., Cambridge University Press, London, 1974.
13. Mackey, T.: Banding in human chromosomes with trypsin. Nature New Biol., 235 : 52—54, 1972.
14. Clark, C.M., and Felsenfeld, J.H.; Techniques in the study of human chromosomes. Lancet: 1028—1030, 1961.
15. Comings, D.E. : Mechanism of chromosome banding. Ⅳ optical properties of Giemsa dyes. of Giemsa dyes. Chromosome, 50 : 89—110, 1975.
16. Sumner, A.T., and Evans: H.J.: Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. Exp. Cell Res., 81 : 223—236, 1973.