

Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD: 착상전 유전진단)

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과

강 인 수

I. 산전 유전진단과 착상전 유전진단

1. Prenatal Diagnosis (PND, 산전 유전진단)

유전병에 이환될 아기가 출생하는 것을 예방하기 위한 방법이다. PND에서는 일단 자연임신이 된 후, 임신 10주 경에 태반 용모막 생검 (chorionic villi sampling: CVS)을 시행하거나, 16~18주에 양수천자에 의한 유전자 또는 염색체검사를 하여 태아에서 유전병이 발현될 것으로 판정되면 임신을 종료시켜 출산되는 것을 막는다.

2. Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD, 착상전 유전진단)

PGD는 유전병에 이환될 태아가 수태되거나, 자연유산으로 종료될 임신을 사전에 차단하고 정상적인 임신을 성립시키기 위한 방법이다.

방법은 체외수정 (in vitro fertilization: IVF)을 시행하여 난자의 극체 (polar body)나 수정란의 할구를 생검 (blastomere biopsy)하여 착상 이전 단계에서 유전진단을 시행하여 유전병이 발현되지 않을 수정란을 자궁에 선별적으로 이식하여 정상적인 임신을 시도한다.

1) 착상전 유전진단과 산전진단의 비교

	PGD (착상전 유전진단)	PND (산전진단)
적응증	염색체 이상 유전질환	염색체 이상 유전질환
임신방법	체외수정	자연임신
진단시기	수정란 이식하기 전	임신 10주 (CVS), 16주 (양수천자)
진단할 세포	극체 또는 수정란의 할구	chorionic villi 또는 양수내 세포
진단 세포수	single cell	numerous cells
진단방법	PCR, FISH	염색체검사, PCR, FISH
진단후 결과	수정란의 정상여부를 판정하여 정상인 경우만 자궁에 이식시킨다.	산전진단에서 비정상적으로 판정되면 임신을 종료시킨다
심리적 불안감	much less	greater

2) 착상전 유전진단의 장점

산전 유전진단에 비해 PGD가 갖는 장점은 유전병이 발현될 배아가 임신되는 것을 막음으로써 산모에게 유산시킬 필요가 없으며, 유산에 따르는 산모의 정신적인 고통과 신체적인 부담이나 합병증을 피할 수 있다. 또한 산전진단에서는 환아로 판명되면 태아를 유산시켜야 하는 반면에, 착상전 유전진단에서는 환아가 될 수정란을 이식하지 않는다는 점에서 윤리, 도덕적으로 수용하기가 더 쉬울 것으로 생각된다.

3) PGD의 특징

PGD는 IVF와 prenatal diagnosis가 결합하여 생겨난 방법이다. PGD는 목적이 PND와 마찬가지로 건강한 아기를 출산하기 위한 것이지만, 유전진단을 하는 시기가 출산 전에서 착상 전으로 앞당겨지기 위해서는 수정란을 사용한 미세조작술이 뒷받침되어야 하며 할구 (blastomere)나 극체 (polar body)를 이용한 단일세포 수준에서 유전진단이 이루어진다는 특징이 있다.

II. 역 사

1989년 A.H. Handyside가 X-linked recessive 질환을 가진 가계의 부부에게 체외수정 후에 PGD를 시행하여 정상인이나 보인자가 되는 여아를 선택적으로 이식하여 첫 임신이 되었다. 1996년까지 전 세계적으로 600 PGD-IVF cycle이 시행되었고 100여명의 아기가 태어났는데 대부분이 X-linked disease이었고 그 외에 염색체 이상이나 단일 유전자결손에 의한 유전병들이 포함되었다. 염색체 이상의 흔한 형태로서 다른 염색체의 절단 부분들이 서로 교환되는 reciprocal translocation이 있는데, 보인자인 부모는 표현형이 정상이지만 감수분열 및 수정과정에서 염색체 불균형을 가진 수정란이 많이 생기므로 이들 부부는 습관성 유산을 경험하게 된다. 이런 경우에도 telomeric, subtelomeric probe를 이용하여 정상 염색체나 balanced carrier를 선별하여 PGD를 시행할 수 있게 되었다.

지금까지 PGD가 다소 느린 속도로 발전하게 된 이유는, 첫째로 생식의학기술이 발달하여 단일세포를 능숙하게 다루고 분자 유전진단을 정확히 수행할 수 있는 센터에서 PGD program이 가능했으며, 둘째로 염색체나 유전자 이상 질환들이 광범위하고 다양해서 각 질환마다 FISH나 PCR로 진단하기에 적합한 계획을 수립하는 데는 많은 연구자들의 노력이 필요하였기 때문이다.

III. PGD의 적응증

1. 유전질환

1) Autosomal Recessive

Cystic fibrosis

Tay-Sachs disease

Lesch Nyhan syndrome

β -thalassemia

Spinal muscular atrophy
Adrenoleukodystrophy

2) Autosomal dominant

Marfan syndrome
Myotonic dystrophy
Huntingtons chorea
Familial adenomatous polyposis coli
Charcot-Marie-Tooth disease 1A

3) X-linked disease

Duchenne muscular dystrophy
Fragile X syndrome

2. Chromosomal abnormality

1) 구조적 이상

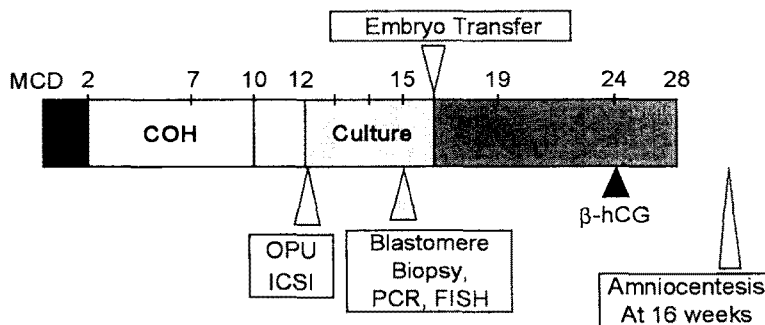
Translocation (염색체 전좌)
Robertsonian translocation
Reciprocal translocation
Chromosomal inversion

2) 수적인 이상

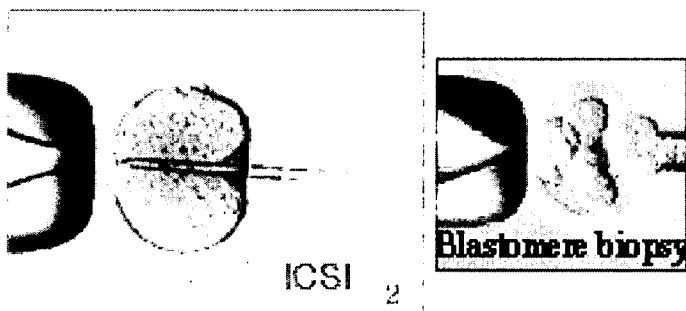
Age-related aneuploidy
Sex chromosome mosaicism

IV. PGD 방법

1. IVF – PGD procedure 일정 및 개요



PGD에서는 수정란을 검사해야 하기 때문에 체외수정을 시행해야 한다. 우선 통상적인 IVF 방법으로 gonadotropin과 GnRH (gonadotropin releasing hormone) analogue를 사용하여 (controlled ovarian hyperstimulation: COH) 난소를 자극하여 다수의 우성 난포를 자라게 한다. 난자 채취일에 정자와 수정을 시키는데 다른 세포의 유전물질이 혼입되는 것을 막기 위해서 미세조작술로 세포내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI)을 시행하여 한 개의 정자만 넣어준다.



정상적으로 배아가 발생하는 경우에는 수정 1일 후 PN stage, 제 2일에 4 cell stage, 제 3일에 8 cell stage embryo로 발달한다. 대개 할구 생검 (blastomere biopsy)은 6~10 cell stage embryo에서 시행하며 미세조작술로 할구를 1~2개 분리해 낸다. Genetic diagnosis는 PCR에 의한 돌연변이 유전자검사, 또는 Fluorescence in situ hybridization (FISH)를 시행하여 염색체검사를 시행한다. 검사결과, 비정상적인 수정란 즉, 돌연변이 유전자가 있어 유전병이 발현될 수정란 또는 습관성유산이나 기형아를 초래할 불균형 염색체를 가진 수정란은 이식에서 제외된다. 나머지 유전병이 발현되지 않을 수정란 또는 균형 염색체를 가진 수정란만을 선택하여 수정 제 4일에 자궁에 이식하여 임신을 시도한다. 임신이 성공하면 산전진단 (CVS 또는 amniocentesis)을 시행하여 염색체나 유전자 상태를 확인한다.

2. Cell Preparation Methods

과배란 유도 및 난자채취를 하여 얻은 난자나 체외수정 후 얻은 수정란의 일부를 생검하여 세포를 얻어내는 과정은 다음과 같다.

1) Making a hole in zona pellucida (투명대 천공)

우선 난자나 수정란을 둘러싸고 있는 투명대를 열어준다.

(1) Acidified Tyrodes solution

pH 2.2~2.4의 산성을 이용하여 배아의 투명대를 녹이는 방법으로 현재 가장 널리 사용되고 있으며 난자의 극체를 생검하는 데는 적합하지 않다.

(2) Mechanical dissection (partial zona dissection: PZD)

물리적인 방법으로 V 또는 X 자 형태의 투명대 절개를 하는 방법으로 극체를 생검하는 데 많이 사용된다.

(3) Laser hatching

최근에 보고되기 시작하였는데 사용이 간단하며 구멍의 크기를 정확히 조절할 수 있고 수정란에 해를 줄 가능성이 적어 이상적인 방법으로 생각된다.

2) Biopsy

(1) Polar body biopsy

감수분열의 결과로 형성된 극체는 배아발달에 필수적 요소가 아니므로 생검하여 진단에 활용될 수 있다. 난자, 즉 모계에서 유전되는 병인 경우에만 사용할 수 있으며 oocyte와 zygote로부터 제1극체 또는 제1, 제2극체 모두 조사할 수 있다. 극체의 염색체나 유전자 상태는 난자의 것과 상호 관련되므로 극체를 생검하여 유전검사를 시행하면 난자의 상태를 진단할 수 있다. 그러나 모계에서 유래되는 질환에만 적용가능하고, 2개의 극체를 모두 얻어야 진단이 정확한테 작업량이 많아서 현재까지 세계적으로 약 2 center 만이 이용하고 있다.

(2) Blastomere biopsy

현재 가장 널리 사용되는 방법이며 수정란을 진단에 이용하므로 모계나 부계 어느쪽에서 유전되든지 사용할 수 있다. 수정란의 compaction이 완전히 일어나면 세포를 분리하기가 어려우므로 수정 3일째 (6~19 세포기) 오전에 시행하며 이때는 mitotic index가 가장 높아서 생검 후에 세포의 회복이 빠르며 할구 사이에 junction이 잘 발달하여 경구를 통해 자궁에 이식할 때 수정란의 구조를 그대로 잘 유지하기 때문에 가장 널리 사용된다. 8세포기 수정란에서 할구 1~2개를 생검해 내어도 inner cell mass와 trophectoderm 세포의 비율이 정상으로 유지되며, 남은 할구세포로부터 정상적으로 온전한 개체가 발생한다는 사실은 이미 생쥐와 사람에서 증명되었다. 방법은 acid Tyrodes solution 또는 laser hatching으로 투명대 (zona pellucida)에 구멍을 뚫은 후에 pipet으로 할구를 흡입하거나 액체를 이용하여 밀어내는 방법으로 할구를 분리해 낸다. 이 방법의 단점으로는 1~2개의 세포만 진단에 이용된다는 제한이 있고, mosaics를 진단하기 힘들며, 체외수정 시술 기간 내에 metaphase의 염색체 배열을 얻기가 어렵다는 점이다.

ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology) PGD Consortium의 통계에 의하면 acid Tyrodes solution에 의한 zona drilling과 blastomere aspiration이 가장 널리 사용되고 있으며, 약 97%의 배아에서 할구 생검이 성공적이다.

(3) Trophectoderm biopsy

수정란 발생이 blastocyst stage에 도달하면 inner cell mass와 trophectoderm으로 나누인다. Trophectoderm은 주로 태반을 형성하며 태아형성에는 직접 관여하지 않으므로 trophectoderm 세포를 여러 개 떼어 내어도 태아에게 해를 주지 않는다는 장점이 있다. 발생 5~6일째에 10~30개의 많은 세포를 분리할 수 있다. 10개 이상 제거하면 hCG 생성이 다소 감소하는데 외부에서 주사를 하여 보충할 수 있겠다. 5~20개의 세포를 얻으면 metaphase chromosome spread를 얻기가 훨씬 수월하여 blastocyst 배양조건이 잘 갖추어지면 이상적인 방법이 될 수 있다. 그러나 단점으로는 수정란의 약 25~60%만이 blastocyst에 도달하므로 사용 가능한 수정란에 수적인 제한이 따르며 태아와 태반세포 사이에 염색체 상태가 다른 confined placental mosaicism인 경우에는 태반세포로 진단해도 태아를 유전자 상태를 정확히 알 수 없다는 점이다.

V. Molecular diagnostic tools

일반적으로 single gene defect인 경우에는 PCR로 진단한다. X-linked disease이면서 PCR primer가 있는 경우에는 PCR을 시행하고, PCR primer가 없는 경우에는 유전병이 발현되지 않을 성 (gender)을 선택하기 위하여 FISH를 시행한다. 또 여성의 나이가 35세 이상인 경우에 염색체의 이수성 (異數性, aneuploidy)을 판정하기 위하여 FISH를 사용한다.

1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

돌연변이가 일어난 특정 유전자 부위 전후에 충분한 길이의 염기서열을 알고 있으면 2개의 oligonucleotide sequence를 선택하여 PCR로 유전자를 증폭할 수 있다. 대부분의 PCR-PGD에서는 정확성을 높이기 위하여 hemi-nested 또는 nested primer를 사용하여 two-step PCR을 시행한다. 즉, first PCR에서 일단 증폭한 fragment의 내부에 second PCR의 primer들이 결합할 수 있도록 하여 원하는 부위를 증폭하는 방법이다.

1) Heteroduplex analysis

heterozygous DNA sample을 변성시킨 후 reanneal시키면 원래 homoduplex를 만들면서 추가로 mutant와 normal allele strand가 결합한 hybrid form을 만든다. Heterduplex는 DNA 염기배열 중 1-2 allele에 mismatch가 있는 경우, 이 부위에서는 결합하지 않으므로 전기영동에서 서서히 이동하기 때문에 sample에 heterozygosity가 있다고 할 수 있다.

이 방법은 cystic fibrosis, Tay-Sachs disease, familial adenomatous polyposis 등의 진단에 사용된다.

2) Single strand conformational polymorphism (SSCP)

Scanning assay이며 100~500 bp의 DNA fragment에서 작은 deletion, insertion이나 단일 염기의 변화를 발견할 수 있는 방법이다. PCR에 의해 증폭된 DNA sample을 denaturation시켜 single strand로 만들면 염기의 차이에 의해서 intrastrand interaction에 의해서 구조가 다른 형태가 되고 non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 다른 allele이 발견될 수 있다.

SSCP는 장비가 간단하고 procedure가 간단하며 저 비용이고 방사성동위원소를 사용하지 않는다는 점에서 많이 사용된다. SSCP는 familial adenomatous polyposis coli (FAPC)의 PGD에 사용되었다.

3) Fluorescent PCR

종래의 PCR은 정성적인 방법이므로 비슷한 크기의 product를 구별할 수 없었다. Fluorescent PCR에서는 한 primer 대신에 fluorescent oligonucleotide를 사용하여 증폭시켜 laser analysis system으로 product를 감지해 낸다.

Fluorescent PCR의 민감도는 기존 PCR의 1000배 이상되며 cystic fibrosis에서 normal allele과 3 bp가 결손된 508 allele을 정확히 구별해 낼 수 있다. 또 single cell에서 PCR cycle을 35~40회 만 시행해도 되므로 PGD를 할 때 시간을 절약할 수 있다.

Fluorescent PCR을 사용하면 allele drop out (ADO)이나 preferential amplification (PA) 문제를 해결할 수 있다. 일반적인 PCR 방법에서 heterozygotic cell에서 allele 중 한 allele에서 약하게 증폭이 일어나며 다른 allele에서 많이 증폭되는 경우를 PA라고 하며 PA가 극단적인 경우 즉, 한쪽 allele에서만 증폭이 일어나고 다른 쪽에서는 증폭이 거의 안되면 ADO라고 한다. 그런데 fluorescent PCR의 민감도는 매우 높기 때문에 PA 경우에도 peak를 발견할 수 있어 PCR에서 잘못 ADO로 나와 오진되던 문제가 많이 해결되었다. 실제로 Dr. Sermon 등은 myotonic dystrophy에서 ADO율을 1/4로 줄일 수 있었다.

4) Multiplex PCR

PGD에서는 단일세포를 이용하여 PCR 증폭을 실행하게 된다. 그러나 multiplex PCR을 사용하면 2개 이상의 여러 유전자를 동시에 조사할 수 있다. 여러 개의 서로 관계없는 primer set를 혼합하여 한번에 PCR을 시행하는 방법이다. 이때에는 primer들과 또는 PCR product들 사이에 상호작용이 없어야 한다. 첫번째 PCR을 할 때 다른 종류의 primer 쌍을 여러 개 넣어 증폭하고, 2번째 PCR에서는 sample을 나누는 후에 각기 다른 nested primer 쌍을 이용하여 증폭한다. 이 복합반응이 잘 일어나도록 primer들의 상대적인 농도, annealing temperature, reaction buffer를 최적화 시켜야 한다. 검사에는 6~8시간이 소요되어 PGD를 시행하는데 문제가 없다.

Multiplex PCR은 ADO 문제를 해결하는데 도움이 된다. 병을 유발하는 돌연변이와 관련된 polymorphism을 조사하면 이 두 부위에서 동시에 ADO가 일어날 확률은 매우 적으므로 거의 대부분에서 mutant allele을 발견할 수 있다. 이것은 특히 autosomal dominant 질환의 진단에 중요하다.

5) Whole genome amplification

PGD는 단일세포로 유전진단을 하는데 어떤 경우에는 2개 이상의 돌연변이를 진단해야 한다. 이것을 해결하기 위하여 primer extension preamplification (PEP)이 개발되었다. 기존 PCR에서 사용하는 specific primer 대신에 15-base random oligonucleotide primer를 이용하면 low stringency 조건에서 DNA 전체에 결합하여 증폭한다. 실제로 sperm을 이용하며 조사하면 전체 genome의 70~80%가 증폭되므로 multi-locus analysis를 원활히 시행할 수 있다.

2. Fluorescent in situ hybridization (FISH)

FISH를 이용하면 수 시간 내에 interphase nucleus의 염색체에서 발광체의 signal을 세어서 sex나 수를 판정할 수 있다. 최근 probe의 개발로 과거에 시행하기 어려웠던 염색체의 구조적 이상도 수월하게 판정할 수 있게 되었다. 일반적으로 FISH는 각 염색체에 특이한 반복서열의 DNA probe를 사용한다. 다른 색깔의 형광물질과 밝은 signal을 내는 repetitive satellite probe를 사용하면 여러 개의 DNA target을 동시에 관찰할 수 있다. Red (tetra-rhodamine isothiocyanate: TRITC), green (fluorescein isothiocyanate: FITC), blue (AMCA) 형광물질만 FISH에 적합하기 때문에 두개의 형광물질 혼합비율에 따라 다른 색상이 나타날 수 있다. 이렇게 하면 휴지기 세포에서 X, Y, 13, 18, 21 등을 동시에 관찰할 수 있다.

VI. PGD의 임상적 효용성

1. 유전질환

위에서 기술한 PGD 적응증 이외에도 성공적으로 시도된 유전질환의 종류는 급증하고 있으며 거의 대부분에서 유전질환의 발현을 막을 수 있었다.

2. 염색체 이상에 의한 습관성 유산

습관성 유산 중 염색체의 구조적 이상으로 인한 자연유산은 그 원인과 진단이 뚜렷하며 PGD로 예방할 수 있다. 염색체 이상에 의한 자연유산은 거의 대부분이 CVS를 시행하기 전에 발생하므로 산전진단의 임상적 효용성은 매우 낮으며, 착상전 유전진단이 유일한 임상적 대안으로 볼 수 있다. 이런 군에서 자연임신이 되면 자연 유산율이 87%~95%로 매우 높으나, 착상전 유전진단을 시행함으로써 5~20%로 현저히 감소된다. 또 unbalanced chromosome에 의한 기형아도 임신전에 예방할 수 있다.

VII. 결 론

염색체의 구조적 이상으로 발생하는 습관성 유산의 경우에 착상전 유전진단 (PGD)은 비정상 임신 가능성으로 인한 신체적, 심리적 부담을 해결하는 유일한 예방적 치료법이 될 수 있다. 가계에 유전병이 있는 경우에는 genetic risk와, termination of pregnancy를 반대하는 부부 또는 risk를 우려하여 피임을 하는 부부에게 산전진단의 alternative treatment로서 PGD가 이용될 수 있다. 또한 유전질환의 적응증이 급속도로 확대되고 있어서 부부가 안심하고 임신을 할 수 있는 여건이 더 넓어질 것이다.

단일세포를 통한 착상전 유전진단이 가능하게 된 것은 나날이 발전하는 분자생물학적 진단법과 체외수정과 관련한 미세조작술의 발달에 의한 것이며 앞으로 단일세포 수준의 진단법이 더 발달하면 aneuploidy에 의한 유산율을 더 감소시키고 유전질환에서 오진율을 줄일 수 있겠다. 또한 FISH의 개발로 full karyotyping이 실용화되면 염색체 이상을 포괄적으로 진단하여 자연 유산율을 현저히 감소시킬 수 있겠다.

그러나 수정란을 다루는 제반 관련규정 및 윤리적 측면을 고려하여 유전병이나 염색체 이상을 치료하는 차원에서만 PGD를 시행해야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. Harper JC, Delhanty JD, Handyside AH, editors. Preimplantation Genetic Diagnosis. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2001.
2. Anthony JFG, William MG, Jeffrey HM, Richard CL, editors. An Introduction to Genetic Analysis. 7th ed. New York: W H Freeman & Co; 1999.
3. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preim-

- plantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.
4. Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM. Chromosome translocations: Segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn* 1998; 18: 37-1449.
 5. 임천규, 한미현, 전진현, 송건지, 김정옥, 김계현, 최범채, 궁미경, 강인수. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아 이식술에서 형광직접조합법을 이용한 착상전 유전자 진단의 임상적 적용. *대한산부인과학회잡지* 2000; 43(7): 1147-53.
 6. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000; 73: 1209-18.
 7. Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlikovsky Y. Neonatal outcome of preimplantation genetic diagnosis by polar body removal: The first 109 infants. *Pediatrics* 2000; 106: 650-3.
 8. Krzyminska UB, Lutjen J, O'Neill C. Assessment of the viability and pregnancy potential of mouse embryos biopsied at different Preimplantation stages of development. *Hum Reprod* 1990; 5(2): 203-8.
 9. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH. Human Preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5: 708-4.
 10. Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. Human trophoctoderm biopsy and secretion of chorionic gonadotrophin. *Hum Reprod* 1991; 6: 1453-9.
 11. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5847-51.
 12. Kristjansson K, Chong SS, Van den Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single cell analysis of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nature Genetics* 1994; 6: 19-23.
 13. 최수경, 김진우, 조은희, 류현미, 강인수. 단일 태아세포에서의 PEP-PCR을 이용한 성의 결정과 Dystrophin 유전자 분석. *대한불임학회잡지* 1997; 24(1): 51-6.
 14. 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수. 근 이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상 전 유전자 진단. *대한불임학회잡지* 1996; 23(1): 109-14.
 15. Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1389-1401.
 16. Harper JC, Handyside AH. The current status of Preimplantation diagnosis. *Curr Opinion Obstet Gynecol* 1994; 4: 143-9.
 17. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JDA. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995; 13(1): 41-9.
 18. Ray PF, Handyside AH. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(3): 213-328.
 19. Munne S, Grifo J, Cohen J, Weier HUG. Chromosome abnormalities in arrested human reimplantation embryos: a multiple probe fluorescence in situ hybridization (FISH) study. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 150-9.

20. Pergament E. Application of fluorescence in-situ hybridization to prenatal diagnosis. *Curr Opinion Obstet Gynecol* 2000; 12: 73-6.
 21. Coonen E, Hopman AHN, Geraedts JPM, Ramaekers FCS. Application of in-situ hybridization technique to study human preimplantation embryos: a review. *Hum Reprod Update* 1998; 4(2): 135-52.
 22. 김계현, 최범채, 박소연, 양광문, 유근재, 송인옥, 강인수. 염색체 전좌를 갖고 있는 반복유산 환자에 있어서 태아의 비정상 염색체 발현 빈도. *대한산부인과학회잡지* 2000; 43(7): 1189-93.
 23. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection II. *Human Reproduction* 2000; 15(12): 2673-83.
-