

사람 Y 염색체 특이 DNA Probe의 개발과 이를 이용한 FISH 기술의 임상적 적용

진주산업대학교 동물생명과학과¹, 세화산부인과 불임/유전연구소²
류란숙^{1,2} · 이상찬² · 이채식² · 김종흥² · 류은경¹ · 손시환^{1*}

Identification of a Human Y Chromosome Specific DNA Probe and Their Clinical Application by Fluorescence *in situ* Hybridization Techniques

Ran Suk Ryu^{1,2}, Sang Chan Lee², Chae Sik Lee², Jong Heung Kim²,
Eun Koung Ryu¹, Sea Hwan Sohn^{1*}

Department of Animal Science & Biotechnology, Chinju National University¹,
SaeWha Obstetrics and Gynecology²

Objective: The present study was undertaken to synthesize a human Y chromosome specific probe and to confirm the usefulness of the probe for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in various types of human cells.

Methods: An approximately 400 bp DNA fragment of the DYZ1 sequences was synthesized by PCR using digoxigenin labeled dUTP (dig-PCR). The fidelity of probe was tested by FISH for cultured and uncultured human lymphocytes, amniocytes, chorionic villus cells, embryos, sperms, and germ cells of seminiferous tubule.

Results: The human Y chromosome specific probe hybridized specifically to Y chromosome of the cells that had been tested. This probe assigned to the Yq12 region where the DYZ1 repetitive sequence is concentrated.

Conclusion: We have identified a human Y chromosome specific probe that hybridized specifically to the Y chromosome by FISH for various types of uncultured as well as cultured cells. Therefore FISH technique using human Y chromosome specific probe should be useful for clinical application as a diagnostic tool for the detection of human Y chromosome.

Key Words: FISH, DYZ1, Y chromosome, Amniocytes, Sperms

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 기술이란 특정 nucleic acid가 염색체상 혹은 세포나 조직상에 어디에 위치하는가를 인지하는 방법으로서 면역세포화학적 기술 (immunocytochemistry)과 결합하여 현미경적으로 이들의 유전적 활성도를 직접 확인할 수 있는 방법이다. 이의 원리는 nucleic acid가 상보적 결합속성이 있으므로 특정 서열을 지닌 DNA 혹은 RNA probe와 single strand DNA를 혼합하여 가열 용

해 후 서서히 냉각하면 상동성이 존재하는 영역에서 검색자 (probe)와 대상분자 (target molecule)간에 염기쌍을 형성하게 되는 것이다. 이전까지의 *in situ* hybridization 기술은 주로 방사성 동위원소를 부착시키고, 방사선사진 (autoradiography)을 통해 검색하였으나 최근에는 nonradioactive label 방법으로 형광물질을 이용하여 *in situ* hybridization에 응용함으로써 FISH란 기법이 개발되게 되었다.

*교신저자: 손시환, 경남 진주시 칠암동 150, 진주산업대학교 동물생명과학과, 660-758
전화: 055) 751-3264, Fax: 055) 761-8308, e-mail: shsohn@cjcc.chinju.ac.kr

이러한 기술을 이용하여 임상적으로 단일 유전자 질환 검색, 염색체의 수적 및 구조적 이상 검색, 염색체의 미세 결손 검색 및 특정 종양의 진단 등을 신속하게 판정할 수 있을 뿐만 아니라 특정 유전자의 염색체상 위치 파악 등 유전자의 물리적 지도 작성에도 적극 활용되고 있다. 산전유전진단에 있어서 이의 활용을 살펴보면 양수세포에서 FISH 기술을 이용한 13, 18, 21, X 및 Y 염색체에 대한 이상 양상의 검색,^{1,3} 특정 염색체로부터 결실된 marker chromosome의 검색,^{4,5} ring chromosome의 검색,^{6,7} translocation의 검색 및 triploid의 검색 등이 보고되고 있고,⁸⁻¹⁰ 단일 유전자 질환인 Charcot-Marie-Tooth disease나 Williams syndrome, DiGeorge syndrome의 검색도 보고되고 있다.^{11,12} 양수세포뿐만 아니라 용모막 용모 (CVS) 및 태아 혈액으로부터도 FISH 기술에 의한 효율적인 결과들을 보고하고 있으므로,¹³⁻¹⁵ 산전유전진단에 있어 FISH 기술이 매우 신속하고 정확한 진단기법임을 제시하고 있다.^{16,17} 또한, 수정란을 이용한 착상 전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis; PGD)에 있어서 단일 할구를 분리하고 FISH 기술을 적용함으로써 특정 염색체의 이상 유무나 특정 유전자의 결손 유무의 검색을 가능하게 한다.¹⁸⁻²⁰ 이밖에 생식세포에 대해서도 FISH 기법을 적용한 연구들이 많이 소개되고 있는데 특히, 정자의 염색체 이상을 검색하여 불임의 원인을 구명하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다.²¹⁻²³

이러한 FISH 기법의 효율성에도 불구하고 아직까지는 상대적으로 처리과정이 복잡하고, 무엇보다 FISH용 probe의 개발이 미흡하며, 개발된 상업용 probe가 매우 고가이므로 일반적 시행에는 다소 어려움이 있다. FISH 수행을 위한 probe는 크게 특정 유전자를 대상 (target)으로 한 single copy DNA probe와 염색체상의 repetitive DNA들을 대상으로 한 염색체 특이 probe가 있다. 사람에게 있어서 지금까지 개발되어 현재 상업용으로 시판되고 있는 FISH용 probe들로는 몇몇 특정 염색체상 미세 결손 (micro-deletion)에 기인된 유전 질환 검색용 probe, 특정 종양세포의 검색을 위한 probe, 이수성 (aneuploid) 검색을 위한 산전진단용 probe 및 각 염색체별 특이 probe들이 있다. 이들 중 Y 염색체 특이 probe (human Y-chromosome specific DNA probe)를 이용한 FISH는 세포 내 Y 염색체의 수적 및 구조적 이상과 모자 이시증 (mosaicism)을 탐지하는데 이용될 수 있을 뿐만 아니라 sex-mismatched bone marrow transplants의 검색 및 X-linked disease의 산전 혹은 착상 전 유전

진단을 가능하게 한다.^{24,25}

따라서 본 연구에서는 Y 염색체 말단의 반복서열로 알려진 DYZ1을 근간으로 하여 사람의 Y 염색체 특이 DNA 'probe'를 개발하고, 이를 이용하여 백혈구, 양수세포, 용모막세포, 수정란, 정자 및 정자형성세포에 FISH를 수행함으로써 본 probe의 신뢰성을 확인하고 FISH의 폭넓은 임상에서의 적용 가능성을 제시하고자 한다.

연구 대상 및 방법

FISH 분석을 위하여 공시된 세포표본들은 1999년 3월부터 2000년 10월까지 부산 세화산부인과에 내원한 환자들의 검사표본들로서 이들의 양수세포, 용모막 용모, 수정란, 정자형성세포 및 정자를 대상으로 하였다. DNA 분리 및 probe 제작은 진주산업대학교에 재학 중인 정상 남성 15명으로부터 혈액을 공여 받고 이들의 말초혈액으로부터 백혈구를 분리하여 이용하였다.

1. 사람의 Y 염색체 특이 DNA probe의 제작

1) Y 염색체 특이 DNA primers의 제작

Nakahori²⁶가 제시한 사람의 Y 염색체 특이 반복염기서열군 (human Y-chromosome specific repeated DNA family)으로 알려진 3,564 bp의 DYZ1 염기서열을 이용하여 사람의 Y 염색체 특이 PCR primers를 제작하였다. Primers는 DYZ1 3,564 DNA 염기쌍 중 약 400염기서열을 대상으로 하였고, 양쪽 primers의 크기를 20 mers 정도로 하여 Primer 3 software를 이용하여 최적의 oligomer를 제작하였다.²⁷ 검색된 염기서열은 총 410 bp로서 forward 및 reverse primers는 각 20 mers이고, DYZ1의 2,029 bp부터 2,438 bp까지 hybridization 되도록 설계하였다.

DYZ1으로부터 제작된 Y 염색체 특이 primers의 염기서열은 다음과 같다.

Forward sequence 5'-cgattgcatgcatagata-3' (20 mers)

Reverse sequence 5'-aatggaatcacaaggaattg-3' (20 mers)

2) Probe의 염기서열 (sequencing) 결정

상기 primers로 PCR된 산물들을 QIAquick PCR purification Kit (Bio, CO., Ltd)로 정제하고 이를 1.5% agarose gel에 loading한 후 약 400 bp의 band만을 잘라내어 이를 Gene clean kit (Bio 101, CO., Ltd)로 분리하였다. 이것을 pGEM-T easy Vector에 cloning한 후 EcoRI를 처리하여 삽입 유무를 확인하였다. USS sequence kit와 ³⁵S-dATP를 이용하여 dideoxy chain-ter-

Table 1. Thermal conditions of Dig-PCR probe synthesis

	Temperature	Time	No. of cycles
Initial denaturation	94°C	5 min	1
Denaturation	94°C	1 min	
Annealing	58°C	1 min	35
Extension	72°C	45 sec	
Last extension	72°C	5 min	1

mination 방법으로 염기서열을 결정하였다.²⁸

3) Labeling

본 실험에서는 Dig-PCR probe synthesis 방법을 이용하여 labeling을 실시하였다. PCR reaction mixture (BM)로는 전체량이 50 µl가 되도록 PCR buffer 5 µl, PCR DIG mix 5 µl, primer (10 pmol/µl) 각 3 µl, enzyme mix 0.75 µl (2.6 unit), human Y-chromosome specific DNA 2 µl (100 ng), ddH₂O 31.25 µl를 tube에 넣고, 가볍게 혼합한 후 PCR machicine (Bio-Rad)으로 labeling 하였다.

PCR 조건은 Table 1과 같고, 생산된 산물 (PCR product)은 2% agarose gel에 전기영동한 후 100 bp DNA ladder와 비교하여 band 위치와 그 농도를 확인하였다.

2. 표본 제작

FISH를 위한 세포표본들을 다음과 같이 제작하였다.

1) 백혈구 세포 (Lymphocytes)

혈액 배양을 이용한 염색체 표본을 제작하기 위하여 헤파린으로 처리한 말초혈액 0.3 ml을 10%의 fetal bovine serum과 0.1%의 penicillin-streptomycin, 그리고 0.2%의 phytohemagglutinin이 함유된 RPMI 1640 배양액에 넣고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양한 후, 배양 종료 1시간 전에 0.1 ml의 colcemid (10 µl/ml)를 첨가하였다. 배양이 종료된 백혈구 세포는 0.075 M KCl을 첨가하여 37°C 항온수조에서 약 20분간 정지시켜 저장 처리를 하고 고정액 (3:1 methanol:acetic acid, v/v)으로 3회 고정 처리 후 슬라이드를 제작하였다.

배양없이 전혈액을 이용한 표본은 혈액 1방울을 슬라이드의 끝부분에 떨어뜨리고 또 다른 슬라이드를 이용하여 반대편 방향으로 끌어 고르게 도말시켰다. 20~30분간 상온에서 건조시킨 후 고정액이 담긴 코플랜자에 담겨 냉장상태로 30~60분간 고정

시키고, 자연 건조 후 FISH를 위한 공시 표본으로 사용하였다.

2) 양수세포 (Amniocytes)

15주~19주 된 태아의 양수 2~3 ml을 micro tube로 옮긴 후 8000 rpm에서 10분간 원심분리 시켰다. 세포막의 용해를 위해 0.05% protease를 1 ml 첨가하여 37°C 항온수조에서 20분간 배양하고 원심분리시킨 후 1 ml의 저장액 (0.4% sodium citrate+6% calf serum)을 넣고 잘 섞은 다음 다시 37°C 항온수조에서 20분간 저장 처리하였다. 이후 고정액으로 고정 처리 후 냉장 보관된 슬라이드에 세포액을 떨어뜨려 표본 제작하였다.

3) 융모막 융모세포 (Chorionic villus cell)

채취한 융모막 용모로부터 모체세포를 제거하고 잘게 분리하였다. 이들 중 1 mg 정도의 융모막을 FISH 표본으로 공시하고 나머지 융모막은 염색체 분석을 위해 장기 배양을 실시하였다.

채취한 융모막은 2~3회 HBSS용액으로 세척 후 1%의 sodium citrate로 30분간 저장 처리하고 고정액으로 2~3회 고정 처리 후 고정액을 뽑아내고 자연 건조시켰다. 이 후 60%의 acetic acid액을 0.5 ml 첨가한 후 20~30초 정도 정지시키고 주사기를 이용하여 융모막으로부터 용출된 세포액을 흡입하였다. 미리 세척 건조시킨 슬라이드 위에 1~2방울 떨어뜨려 세포가 고루 잘 퍼질 수 있게 위 아래로 슬라이드를 움직이며 도말하고 이를 건조시킨 후 표본으로 사용하였다.

4) 수정란 (Human embryos)

체외 수정시켜 배양된 4세포기에서 배반포기 (blastocyst)까지의 수정란 중 이식에 공여할 수 없는 비정상 수정란을 대상으로 FISH를 위한 표본으로 제작하였다. 수정란의 표본 제작은 Munne 등²⁹이 제시한 방법으로 현미경하에서 수정란을 PBS로 세척하고 슬라이드에 올린 후 0.1% Tween 20이 함유된 0.01N HCl액을 수정란에 서서히 떨어뜨려 세포질

을 완전히 제거한 다음 건조시켜 공시 표본으로 사용하였다.

5) 정 자 (Sperms)

2~3 ml의 정액을 5 ml의 Ham's F-10으로 희석하여 400 g에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 다시 2~3회 정도 세척한 후 슬라이드 위에 도말하여 상온에서 건조시켰다. 제작된 슬라이드를 고정액이 담긴 코플린자에 넣어 냉장상태에서 1시간 정도 고정시킨 후 다시 건조시켰다. 정자의 탈응축 (decondensation)을 위하여 Matthew 등³⁰이 제시한 방법을 이용하였는데 2 mM dithiothreitol이 함유된 PBS (phosphate-buffered saline)를 처리하여 37°C 항온기에서 45분간 배양시켰다. 이후 PBS로 세척한 다음 에탄올 (80%, 90%, 100%)로 각각 탈수 후 표본을 제작하였다.

6) 정자형성세포 (Germ cells of seminiferous tubule)

ICSI를 위하여 세정관에서 추출한 정자형성세포들을 PBS로 한번 세척한 후 슬라이드에 도말 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 고정액이 담긴 코플린자에 넣어 냉장상태에서 1시간 정도 고정시킨 후 다시 건조시키고 2 mM dithiothreitol이 함유된 PBS를 처리하여 37°C 항온기에서 45분간 배양시킨 후 PBS로 세척하고 에탄올 (80%, 90%, 100%)로 각각 탈수하여 표본 제작하였다.

3. FISH

Kobayashi 등³¹이 제시한 방법을 다소 변형하여 다음과 같이 실시하였다.

준비된 슬라이드 표본을 50 μ l RNase A (100 mg/ μ l)가 함유된 50 ml의 2 \times SSC 용액에 넣고 37°C의 항온수조에서 30분간 처리하여 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수시켜 상온에서 건조시켰다. 이 후 5 μ l의 formamide

와 4 μ l의 4 \times hybridization액 (8 \times SSC, dextran sulphate 40%, DNA MBB grade 4 mg/ml)에 1 μ l의 probe를 넣은 총 10 μ l의 hybridization 용액을 슬라이드에 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮고 가장자리를 rubber cement로 밀봉하였다. 이를 72°C에서 10분간 처리하여 probe와 표본을 변성시키고 다시 38.5°C에서 1시간 동안 hybridization 시킨 후 2 \times SSC, PN buffer (0.1% Nonidet P-40/0.1% sodium phosphate)에서 세척하였다. 접합 탐지를 위하여 슬라이드에 20 μ l의 anti-digoxigenin-fluorescein을 떨어뜨리고 coverslip을 덮은 후 38.5°C에서 10분간 배양하였다. 이를 PN buffer에 3회 세척 후 배경염색으로 propidium iodide solution을 20 μ l 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮고 검경하였다. 형광접합 발현양상은 523 nm 파장대의 필터를 부착한 형광현미경 (Olympus AX-70 with WIB filter)으로 검경하였고, 관찰된 상은 ASA 400 칼라 필름 (Kodak)을 이용하여 촬영하였다.

결 과

1. 사람 Y 염색체 특이 DNA probe의 제작과 검증

사람의 Y 염색체 특이 반복 염기서열로 알려진 3,564 bp의 DYZ1의 일부를 이용한, Y 염색체 특이 FISH용 probe를 제작하여 이의 신뢰성을 검증하고자 하였다. 우선 본 primers가 Y 염색체 특이적인 primers로 이용될 수 있는가를 검증하기 위하여 정상 남녀의 혈액세포로부터 분리된 genomic DNA를 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR 결과 Figure 1과 같이 남성 genomic DNA에서만 약 400 bp 위치에 증폭 band가 나타났고, 여성 genomic DNA로 PCR을 한 경우 band가 나타나지 않았다. 또한 이 primers가 종 (種) 특이적인가를 살펴보기 위하여 다른 포유동물인 소와 생쥐 및 조류인 닭의 genomic DNA를 이용하여 PCR을 시행해 본 결과 증폭양상을 관

```
5`-cgattgcattgcatactagaccattccaacgagtcattccattctatctcaacatttcattccactctgttcgag  
tccattccattccagtcatttaattcaagggcattccattccattccattccattccattccattccattccattcaat  
tccattccagatgattccattctataaccattgctctctgttcattcattccatctgtctcattcctttcgttcgattcct  
ttcattccattacattacattcgcattcttttataaattgcattctattcgagtgttcattccgagtcctttccattcga  
ttcattccattctattccatttcttggattccattccattccggtccacatcaattccttctgttcattccatt- 3`
```

Figure 1. DNA sequences of PCR product using human Y chromosome specific DNA primers

찰할 수 없었다. 따라서 본 primers로 증폭된 DNA 산물이 사람 Y 염색체에 특이적인 DNA임을 알 수 있었다.

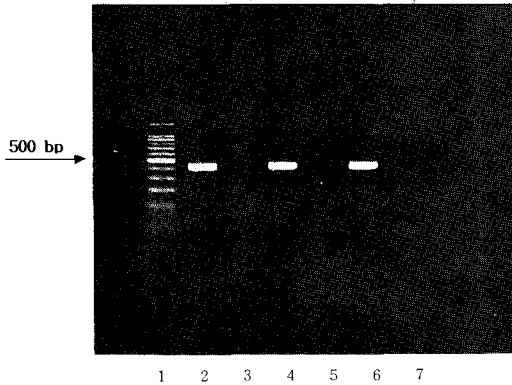


Figure 2. PCR results from human male and female genomic DNA using human Y-chromosome specific DNA primers; lane 1: 100 bp size marker, lane 2, 4, 6: normal male. lane 3, 5, 7: normal female

본 primers로 생산된 PCR 산물들에 대한 분석을 위하여 gel loading한 결과, 예상되는 410 bp 정도의 크기로 나타났다. 이들을 분리하여 염기서열을 분석한 결과, 예상되는 410 bp와는 다소 차이가 있는 412 bp로 나타났고 또한, 대삼 부위의 DYZ1 염기서열과는 62%의 상동성 (homology)을 나타내었다. 분석된 412 bp의 염기서열은 Figure 2와 같다.

본 연구에서는 제작한 사람 Y 염색체 특이 DNA probe를 FISH에 이용하기 위하여 Dig-PCR probe synthesis 방법으로 labeling 하였다. Dig-labeled된 산물들은 원래의 DNA보다 다소 커져 약 500~600 bp의 위치에 band양상을 나타내었다.

제작한 probe가 Y 염색체에 특이적으로 접합되는지를 확인하기 위하여 혈액 배양으로부터 염색체 표본을 제작하여 G-banding을 실시한 후 동일한 상을 FISH에 공시하였다. FISH 결과 Figure 3과 같이 본 probe가 Y염색체 q-arm 말단 부위에 접합 (hybridization)되어 형광발현이 나타남을 관찰할 수 있었다. 즉 염색체의 증기상에서 Y 염색체로 인지되었던

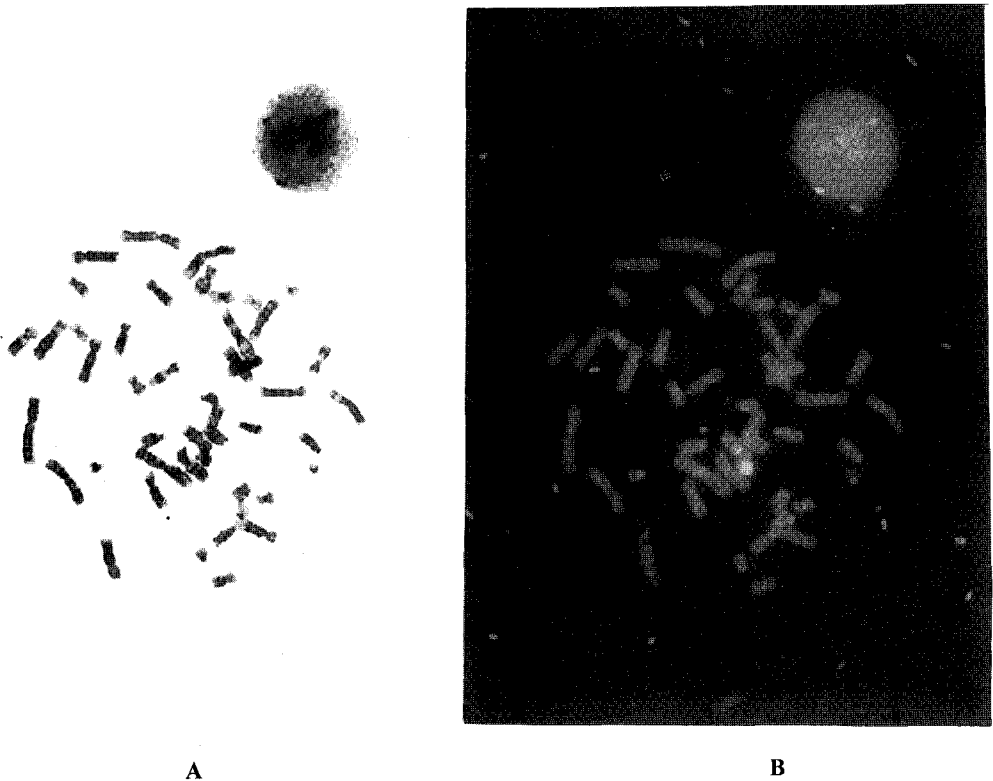


Figure 3. Metaphase chromosome spread by FISH using FITC-labeled human Y chromosome specific DNA probe after G-banding; a) G-banded metaphase chromosome spread b) FISH analysis of G-banded metaphase chromosome spread.

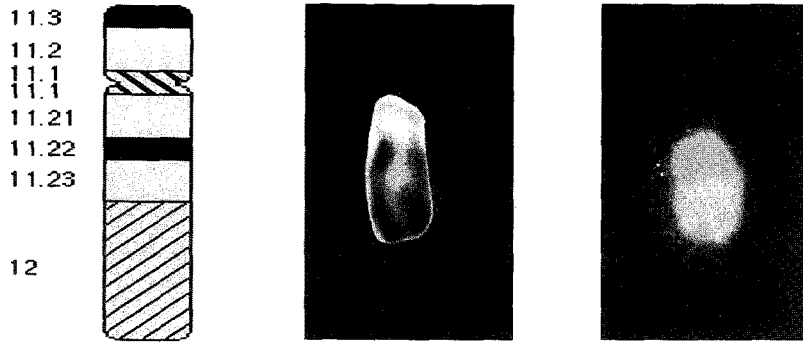


Figure 4. Assignment of 412 bp human Y-chromosome specific DNA; The standard human G-banded Y chromosome idiogram (left), G-banded Y chromosome (middle), and Y chromosome by FISH using FITC-labeled human Y chromosome specific DNA probe (right) were presented

염색체에 FISH를 시행한 결과 본 probe가 동일한 위치에 특이적으로 접합하는 양상을 나타내고 있다.

본 probe의 염색체상 좌위 (locus)를 결정하기 위하여 Figure 4에서는 사람의 Y 염색체 표준 G-band 모식도, G-banding된 Y 염색체 및 FISH 처리된 Y 염색체를 비교 제시하였다. 비교분석 결과 본 연구에서 제작된 사람 Y 염색체 특이 DNA probe의 염기 서열들은 Yq12위치에 폭넓게 존재하는 것이 확인되었다.

2. 사람 Y 염색체 특이 DNA probe를 이용한 FISH 분석

본 연구에서 제작된 probe로 FISH의 이용 가능성을 모색하고자 사람의 혈액세포, 양수세포, 용모막세포, 수정란, 정자 및 정자형성세포를 대상으로 분석하였다.

혈액세포의 경우 백혈구를 배양한 후 염색체를 분리하여 본 probe로 FISH를 시행한 결과 분석된 Y 염색체 중 약 80~90% 정도에서 q-arm의 말단 부위에 강한 probe의 형광접합양상을 보였다. 한편 배양하지 않은 전 혈액세포를 도말하여 FISH를 시행한 결과 남자의 경우 관찰된 세포의 90% 이상에서 한 점의 형광접합 발현양상을 보이고, 여자의 백혈구 세포에서는 전혀 접합양상을 보이지 않았다 (Figure 5a, 5b, 5c). 양수세포를 이용하여 FISH를 시행한 결과 형광접합발현이 나타나는 표본과 전혀 나타나지 않는 표본으로 구분되어졌고, 발현양상이 나타난 경우 혈액세포에서와 같이 관찰된 세포들 중 80~90% 정도가 발현을 나타내었다. 발현을 보였던 양수세포를 장기 배양 후 핵형분석한 결과 Y 염색체의 존재를 100% 확인할 수 있었다 (Figure 5d). 용모막 용모세

포를 이용하여 FISH를 시행한 결과도 양수세포에서와 동일한 결과를 나타내었다 (Figure 5e). 수정란을 이용한 FISH는 시술에 공여할 수 없는 낮은 등급의 수정란을 공시하고 이를 이용하여 FISH를 시행하였는데 형광접합 발현양상을 보이는 것과 그렇지 못한 할구를 구분 관찰할 수 있었다. 그러나 하나의 수정란으로부터 얻어진 전체 할구는 동일한 발현양상을 보여야 하나 형광접합발현이 나타난 수정란의 경우 80% 정도의 할구에서만 발현양상을 보이고 20% 정도는 형광접합양상을 관찰할 수 없었다 (Figure 5f). 생식세포인 정자와 정자형성세포에 본 probe를 이용하여 FISH를 시행한 결과 모든 표본에서 probe의 형광접합 발현양상을 나타내었다. 표본 내 형광발현율은 30~50% 정도로 표본에 따라 다양하게 나타났으며, 형광접합양상은 각 정자의 두부에 하나의 점의 형태로 발광됨을 관찰할 수 있었다 (Figure 5g, 5h).

고 찰

본 연구는 사람의 Y 염색체 특이 DNA probe를 개발하고, 이를 이용하여 백혈구, 양수세포, 용모막세포, 수정란, 정자 및 정자형성세포에 FISH를 수행함으로써 본 probe의 신뢰성을 확인하고, 이를 이용한 임상에서의 적용 가능성을 제시하고자 한 것이다.

Y 염색체 특이 probe를 이용한 FISH는 세포 내 Y 염색체의 존재 유무뿐만 아니라 Y 염색체의 수적 및 구조적 이상의 탐지에 이용될 수 있고, sex-mismatched bone marrow transplants의 검색 및 X-linked disease의 산전 혹은 착상 전 유전진단에 활용 가능하게 한다.^{24,25} Y 염색체의 q-arm은 정상적인 남성들 사이에서도 극히 다양하게 나타나는 hetero-

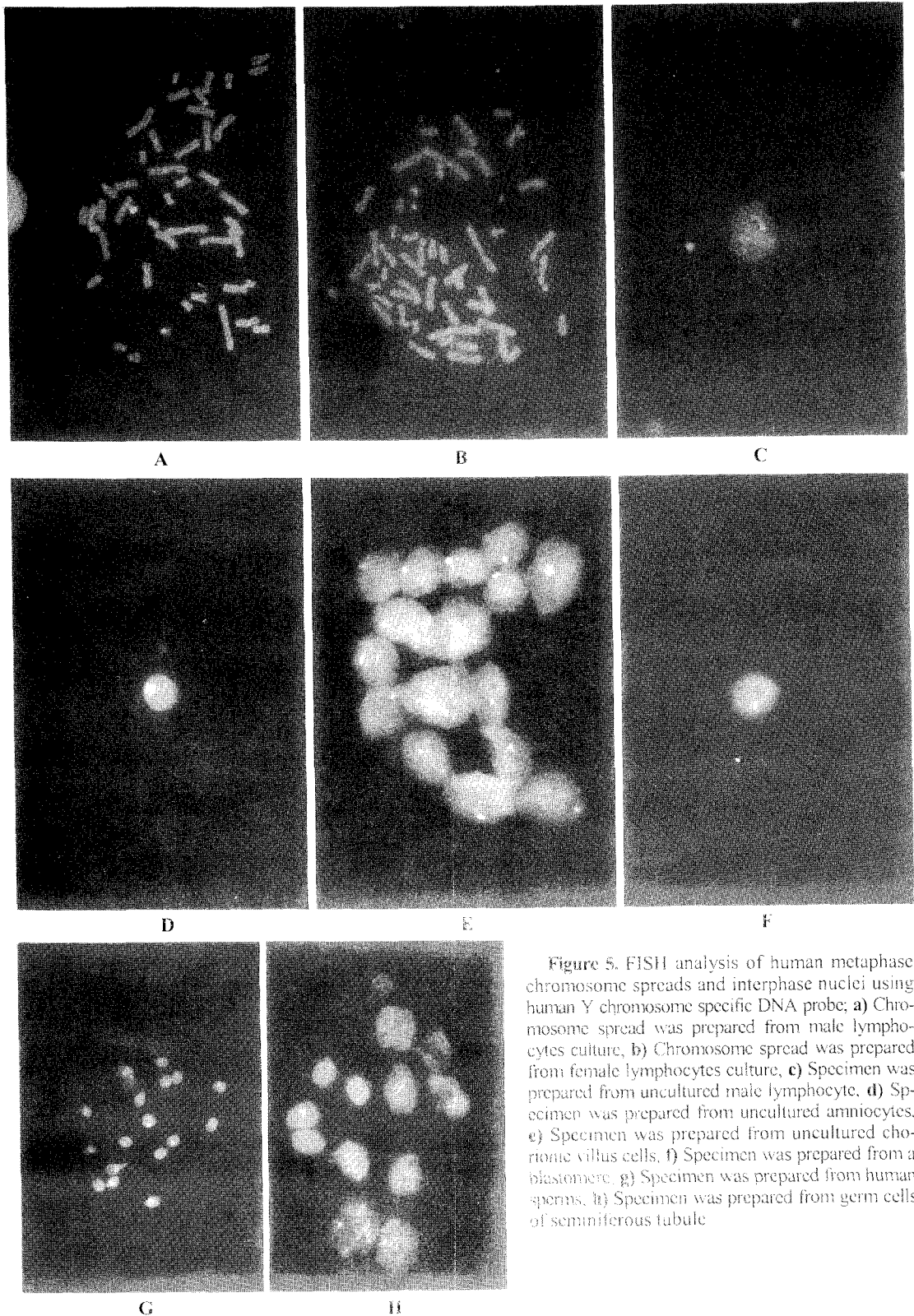


Figure 5. FISH analysis of human metaphase chromosome spreads and interphase nuclei using human Y chromosome specific DNA probe; a) Chromosome spread was prepared from male lymphocytes culture, b) Chromosome spread was prepared from female lymphocytes culture, c) Specimen was prepared from uncultured male lymphocyte, d) Specimen was prepared from uncultured amniocytes, e) Specimen was prepared from uncultured chorionic villus cells, f) Specimen was prepared from a blastomere, g) Specimen was prepared from human sperm, h) Specimen was prepared from germ cells of seminiferous tubule

chromatin site로 알려져 있다.²⁶ 이 부위에는 2개의 반복 염기서열 (DYZ1, DYZ2)이 차지하고 있는데 이들 중 DYZ1은 전체 Y 염색체의 40%를 차지하고 있다.³² DYZ1은 male genomic DNA를 HaeIII로 분리시킨 3.4 kb band로 1976년 Cooke³³에 의해 처음 보고되어졌고, 1986년에 Nakahori 등²⁶에 의해 전체 3,564 염기쌍의 서열이 분석되어졌다. 본 분석을 통하여 DYZ1은 heterochromatin의 가장 주요한 구성 성분의 하나로 대부분 5'-TTCCA-3'의 반복 염기서열로 구성되어져 있음이 밝혀졌다. 이 부분의 DNA 단편을 clone하거나 제한효소를 이용하여 probe에 접합시켜 Y 염색체를 탐지할 수 있다. DYZ1과 DYZ2 단편은 Yq 부위의 heterochromatin 탐지를 위해 독립적으로 이용되기도 하고, 전좌나 모자이시즘 등 이상 Y 염색체의 구조적 분석과 성별 확인을 위해 이용되기도 한다.³²

본 연구에서는 반복 염기서열로 구성된 DYZ1 중 일부인 410 bp DNA를 이용하여 사람 Y 염색체 특이 DNA probe를 제작하고 이를 labeling하여 FISH용 probe로 개발하고자 하였다. 제작된 probe의 sequencing 결과 예상되는 410 bp보다 2 bp가 많은 412 bp로 확인되었고, 제시된 DYZ1 염기서열과는 3부위 총 252 bp만이 일치되어 62%의 상동성을 나타내었다. 그러나 본 probe와 대상 DYZ1간 염기서열에 있어 부분적으로 상동성을 보이는 영역은 총 12군데로 비교분석 결과 둘 간에 전체 중 95.4%의 염기서열이 동일한 것으로 나타났다. 이러한 차이는 sequencing을 위한 cloning상의 차이일수도 있고, template DNA의 차이일수도 있으나 거의 모든 영역에서 5'-TTCCA-3'의 반복 염기서열로 구성됨에 따라 FISH를 위한 probe로서 아무런 문제가 없을 것으로 생각된다. 제작된 probe를 이용하여 FISH를 시행한 결과 사람의 Yq12 site에 다소 넓게 접합 분포를 이루고 있어 DYZ1 좌위와 일치되는 결과를 나타내었다.

제작된 probe의 신뢰성과 이용 가능성을 살펴보고자 사람의 혈액세포, 양수세포, 용모막세포, 수정란, 정자 및 정자형성세포를 대상으로 FISH 분석을 수행하였다. 분석 결과 모든 남성 세포에서 본 probe의 형광접합 발현양상을 관찰할 수 있었고, 배양한 세포에서뿐만 아니라 배양하지 않은 세포들에서도 FISH를 통한 신속한 결과를 얻을 수 있었다. 산전 유전진단을 위한 양수검사나 CVS의 경우 핵형분석을 위하여 약 2주간의 배양기간이 소요되며, 또한 분석을 위한 채취 시료의 양도 많아야 한다. 그러나 FISH 분석을 위해서는 극소량의 조직이나 세포만으

로도 가능하고 더욱이 배양하지 않은 용모막세포나 양수세포의 이용이 가능함으로 특정 염색체 질환에 대해서는 채취 당일 결과를 알 수도 있다. Liu 등³⁴은 양수세포 그대로 슬라이드에 도말하여 FISH를 시행하였고, 황 등³⁵은 저장, 고정 처리를 한 후 FISH에 공시하였으나, 본 실험에서는 양수세포의 세포막 제거를 위하여 짧은 시간 protease를 처리 후 FISH를 수행함으로써 형광접합발현율과 발광도에서 훨씬 좋은 결과를 획득할 수 있었다.

인간의 생식세포의 세포유전학적 이상 유무를 확인하는 것은 수정 이전 염색체 이상을 미리 파악함으로써 불임의 원인이나 유전적 결함의 태아를 착상 전에 방지할 수 있다. 통상 정자의 염색체 분석을 위해서는 햄스터의 난자에 인간의 정자를 융합시켜 핵형을 분석하였으나 많은 시간이 소요되고 기술적으로도 어려움이 많다. 최근 FISH 기술을 이용함으로써 정자의 염색체 이상 여부를 보다 쉽게 확인할 수 있게 되었고, 생식보조술의 기술 개발과 더불어 IVF나 ICSI의 보조 진단 수단으로도 적극 활용이 가능하다. 본 연구 결과에서처럼 정자의 FISH 기법은 처리상의 큰 어려움이 없이 단시간 내 특정 염색체의 이상 유무를 명확하게 검색할 수 있다. Lim 등³⁶은 47,XYY의 mosaic 핵형을 가진 남성의 정자를 FISH를 통해 분석한 결과 YY 정자가 0.44%로 정상인의 이상률보다 4배 높음을 확인하고 다음 세대로 그 유전적 이상의 전달 위험성이 높음을 보고하였다.

IVF 시술의 발달과 더불어 착상 전 유전진단에 대해 많은 연구들이 소개되고 있으며 이들 중 가장 효율적인 진단방법으로 FISH의 기술이 이용되어지고 있다.¹⁸⁻²⁰ 수정란의 분열 단계에서 하나의 할구만을 분리하여 FISH를 수행함으로써 특정 염색체성 유전 질환의 진단이 가능한데, 13, 18, 21, X 및 Y 염색체에 대한 착상 전 이상 유무의 검색이 보편화되는 추세이다. 본 연구에서 수정란을 이용한 FISH의 경우 시술에 공여하지 못하는 수정란을 표본으로 공시한 바 할구들의 형태가 불량하였고, 세포질의 파다 침착이 많아 정확한 FISH의 결과를 획득하기가 어려웠다. 특히 본 실험에서 형광접합발현이 되는 수정란의 경우 전체 할구 모두에서 동일한 형광접합양상을 관찰하기 어려웠고, 분석 결과에 따른 검증이 불가능하였으므로 결과에 대한 신뢰를 할 수 없었다. 착상 전 유전진단을 위한 FISH의 경우 검증되는 할구수가 제한되고 또한 모든 할구에서 동일한 발현 결과가 나와야만 신뢰성을 가질 수 있으므로 기존 세포유전

학적 방법과 병행 검증되어야만 보다 정확한 진단을 할 수 있을 것으로 사료된다.

염색체성 유전진단에 있어 신속한 결과의 획득이 무엇보다 중요한데 본 연구에 사용된 FISH 기법은 3~4시간 이내에 결과를 확인할 수 있고 명확한 검색이 가능하였다. 기존의 FISH 기술은 hybridization의 처리시간이 길기 때문에 전체 소요시간이 길었는데 본 실험에서는 hybridization의 처리시간을 1시간 이내로 제한함으로써 전체 소요시간을 줄일 수 있었다. Hybridization 처리시간이 짧았음에도 높은 형광집합 발현양상을 관찰할 수 있었던 것은 본 연구에 사용된 DNA가 반복적인 염기배열이 많았고 또한 probe를 제작할 때 PCR을 이용함으로써 보다 많은 양의 DNA를 확보할 수 있었기 때문으로 생각된다.

이상과 같이 본 연구에서는 기존 DYZ1 염기서열의 일부를 이용하여 사람의 Y 염색체 특이 probe를 제작하였고 이를 이용하여 FISH를 수행한 바 Yq12 site에만 존재하는 Y 염색체 특이 DNA임이 입증되었다. 따라서 본 probe를 이용하여 모든 세포들에서 Y 염색체의 존재 유무를 쉽게 확인할 수 있으며 더욱이 배양하지 않은 양수, 융모막, 수정란 및 정자세포들에서도 본 probe의 신뢰성이 확인됨에 따라 이를 이용한 FISH 기술의 다양한 임상적 적용이 가능하리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Marguerat P, Gaide AC, Thonney F, Schorderet D. Quick prenatal diagnosis using FISH in the analysis of cultured amniotic fluid cells. *Rev Med Suisse Romande* 2000; 120(5): 401-7.
- Meyer LM, Ramin KD, Ramsey PS, Ogburn PL, Jalal SM. Fluorescent *in situ* hybridization technique for the rapid of chromosomal abnormalities. *Obstet Gynecol* 2000; 95: S64.
- Thilaganathan B, Sairam S, Ballard T, Peterson C, Meredith R. Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolor fluorescent *in situ* hybridisation. *BJOG* 2000; 107(2): 262-6.
- Sanz R, Anabitarte MA, Querejeta ME, Lorda-Sanchez I, Ibanez MA, Rodriguez de Alba MR, et al. Rapid identification of a small dicentric supernumerary marker derived from chromosome 16 with a modified FISH technique on amniotic fluid. *Prenat Diagn* 2000; 20(1): 63-5.
- Arab S, Chitayat D, Gardner HA, Winsor EJ. Mosaicism for a small marker chromosome resulting from a familial Robertsonian translocation (21;22). *Clin Genet* 1999; 56(5): 362-6.
- Grass FS, Brown CA, Backeljauw PF, Lucas A, Brastrington C, Gazak JM, et al. Novel ring chromosome composed of X- and Y-derived material in a girl with manifestations of ullrich-turner syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 93(5): 343-8.
- Siffroi JP, Dupuy O, Joye N, Le Bourhis C, Benzacken B, Portnoi M, et al. Usefulness of fluorescence *in situ* hybridization for the diagnosis of Turner mosaic fetuses with small ring X chromosomes. *Fetal Diagn Ther* 2000; 15(4): 229-33.
- Leppig KA, Ball S, Au K, Opheim KE, Norwood T. Familial cryptic (20;21) translocation identified by *in situ* hybridization technologies. *Am J Med Genet* 2000; 93(4): 273-7.
- Fert-Ferrer S, Guichet A, Tantau J, Delezoide AL, Ozilou C, Romana SP. Subtle familial unbalanced translocation t (8;11) (p23.2; 15.5) in two fetuses with Beckwith-Wiedemann features. *Prenat Diagn* 2000; 20(6): 511-5.
- Fernandez-Moya JM, Sanz R, Rodriguez De Alba M, Ibanez MA, Ayuso C, Diaz-Recasens J, et al. Sonographic, cytogenetic and DNA analysis in four 69,XXX fetuses diagnosed in the second trimester. *Fetal Diagn Ther* 2000; 15(2): 97-101.
- Kashork CD, Chen KS, Lupski JR, Shaffer LG. Prenatal diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 883: 457-9.
- Hoovers JM, Mellink CH, Leschot NJ. Fluorescence *in situ* hybridization in the study of chromosomal abnormalities. *Ned Tijdschr Geneesk* 1999; 143(45): 2265-8.
- Bryndorf T, Lundsteen C, Lamb A, Christensen B, Philip J. Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence *in situ* hybridization: a one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79(1): 8-14.
- 김인규, 양영호, 최은경, 김미순, 김진영. FISH를 이용한 신속한 산전 염색체 이수성 진단. *대한산부회지* 1998; 41(5): 1315-22.

15. 지관자, 김석찬, 김구련, 지일운, 정재현, 문영규. 모체혈액에서 분리한 태아세포의 FISH를 이용한 분석. 대한산부회지 1997; 40(5): 1019-23.
16. Ulmer R, Pfeiffer RA, Kollert A, Beinder E. Diagnosis of aneuploidy with fluorescence *in situ* hybridization (FISH); value in pregnancies with increased risk for chromosome aberrations. Z Geburtshilfe Neonatol 2000; 204(1): 1-7.
17. Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, Mossafa H, Szpiro-Tapia S. Defining the efficiency of fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27407 prenatal diagnoses. Prenat Diagn 2000; 20(1): 1-6.
18. Scriven PN, O'Mahony F, Bickerstaff H, Yeong CT, Braude P, Mackie Ogilvie C. Clinical pregnancy following blastomere biopsy and PGD for a reciprocal translocation carrier: analysis of meiotic outcomes and embryo quality in two IVF cycles. Prenat Diagn 2000; 20(7): 587-92.
19. Harper JC, Delhanty JD. Detection of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos using FISH. J Assist Reprod Genet 1996; 13(2): 137-9.
20. Munne S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J, Rosenwaks Z. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. Am J Obstet Gynecol 1995; 172(4): 1191-9.
21. Acar H, Kilinc M, Cora T, Aktan M, Taskapu H. Incidence of chromosome 8,10,X and Y aneuploidies in sperm nucleus of infertile men detected by FISH. Urol Int 2000; 64(4): 202-8.
22. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence *in-situ* hybridization in infertile men. Hum Reprod 2000; 15(2): 351-65.
23. Nishikawa N, Murakami I, Ikuta K, Suzumori K. Sex chromosomal analysis of spermatozoa from infertile men using fluorescence *in situ* hybridization. J Assist Reprod Genet 2000; 17(2): 97-102.
24. Crescenzi B, Fizzotti M, Piattoni S, La Starza R, Matteucci C, Carotti A, et al. Interphase FISH for Y chromosome, VNTR polymorphisms, and RT-PCR for BCR-ABL in the monitoring of HLA-matched and mismatched transplants. Cancer Genet Cytogenet 2000; 120(1): 25-9.
25. Sarasophon S, Promsawat K, Rerkamnuaychok B. Identification of sex chromosome by fluorescence *in situ* hybridization. J Med Assoc Thai 2000; 83 suppl 1: S89-94.
26. Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y. A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. Nucleic Acids Res 1986; 14(19): 7569-80.
27. Whitehead Institute. Primer 3 software. 2000. Available from: URL: <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi>.
28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74(12): 5463-7.
29. Munne S, Weier H-UG, Stein J, Grifo J, Cohen J. A fast and efficient method for simultaneous X and Y *in situ* hybridization of human blastomeres. J Assist Reprod Genet 1993; 10(1): 82-9.
30. Matthew T, Pang MG, Brugo S, Gustavo F, Stanton F. Cytogenetics of somatic cells and sperm from a 46,XY/45,X mosaic male with moderate oligoasthenoatozoospermia. Fertility and Sterility 1998; 69(1): 146-9.
31. Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, Sasada H, et al. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence *in situ* hybridization. Mol Reprod Dev 1998; 51(4): 390-4.
32. Gauri, Bala S, Ahmad J, Ali S. Genomic distribution of 5'TTCCA 3' repeat motif and its diagnostic potential in human Y-chromosome-related anomalies. Clinical Genetics 1996; 50(5): 358-65.
33. Cooke H. Repeated sequence specific to human males. Nature 1976; 262(5565): 182-6.
34. Liu J, Zheng XZ, Baramki TA, Yazigi RA, Compton GM, Katz E. Ultrarapid detection of sex chromosomes with the use of fluorescence *in situ* hybridization with direct label DNA probes in single human blastomeres, spermatozoa, amniocytes, and lymphocytes. Fertility and Sterility 1998; 70(5): 927-32.
35. 황도영, 장은주, 정경순, 김기철, 민응기, 최진, 등. 미배양 양수세포에서 다운증후군과 에드

워드증후군의 확인을 위한 FISH의 이용. 대한
산부회지 1998; 41(11): 2859-63.

36. Lim AST, Fong Y, Yu SL. Analysis of the sex
chromosome constitution of sperm in men with a

47,XYY mosaic karyotype by fluorescence *in situ*
hybridization. Fertility and Sterility 1999; 72(1): 121-
3.