

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 산부인과²

이형송¹ · 김민지¹ · 강인수^{2*}

Preimplantation Genetic Diagnosis for Single Gene Disorders

Hyoung-Song Lee¹, Min Jee Kim¹ and Inn Soo Kang^{2*}

¹Laboratory of Reproductive Biology and Infertility, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) has become an assisted reproductive technique for couples who are at risk that enables them to have unaffected baby without facing the risk of pregnancy termination after invasive prenatal diagnosis. The molecular biology and technology for single-cell genetics has reached an extremely high level of accuracy, and has enabled the possibility of performing multiple diagnoses on one cell using whole genome amplification. These technological advances have contributed to the avoidance of misdiagnosis in PGD for single gene disorders. Polymerase chain reaction (PCR)-based PGD will lead to a significant increase in the number of disorders diagnosed and will find more widespread use, benefiting many more couples who are at risk of transmitting an inherited disease to their baby. In this review, we will focus on the molecular biological techniques that are currently in use in the most advanced centers for PGD for single gene disorders, including biopsy procedure, multiplex PCR and post-PCR diagnostic methods, and multiple displacement amplification (MDA) and the problems in the single cell genetic analysis.

Key Words: Preimplantation genetic diagnosis (PGD), Single gene disorder, Polymerase chain reaction (PCR), Biopsy, Allele drop-out (ADO)

Introduction

착상전 유전진단(preimplantation genetic diagnosis, PGD)은 1990년 처음 보고된 진단 방법으로 유전질환이 이환된 아이를 출산할 확률이 높은 부부들을 대상으로 착상전 배아

단계에서 단일 유전자 질환(single gene disorder)이나 염색체의 수적, 구조적 이상 유무를 진단한 후 질환이 이환되지 않은 배아만을 선별하여 이식함으로써 유전적으로 정상적인 태아의 임신을 가능케 도와주는 방법이다¹⁾. 이러한 진단 방법은 임신이 된 후 임신 기간에 따라 양수천자(amniocentesis), 융모막 융모생검법(chorionic villi sampling) 등을 통하여 채취한 태아의 세포를 대상으로 각각의 유전질환이나 염색체 이상을 진단하는 기존의 산전진단(prenatal diagnosis, PND)과는 다르게 착상전에 진단이 이루어지기 때문에 임신중절에 따르는 육체적, 정신적 고통을 최소화할 수 있으며 생명 존엄에 따르는 윤리적인 문제 또한 극복할 수 있다는 장점이 있다. 또한 착상전 유전진단 적응증의 하나인 염색체 이상으로 인한 반

접 수: 2009년 12월 8일

수정본접수: 2009년 12월 22일

게재승인일: 2009년 12월 27일

게재일: 2009년 12월 31일

책임저자: 강인수

우100-380 서울시 중구 목정동 1-19

관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과

Tel: (02)2000-7581, Fax: (02)2267-0490

E-mail: ikang67@yahoo.co.kr

복 자연유산(recurrent pregnancy loss) 또는 반복적인 착상 실패(repeated implantation failure)의 경우 대체로 산전진단이 가능한 시기 이전에 유산이 일어나기 때문에 산전진단을 시행할 수 있는 시기 이전에 이환 유무를 진단할 수 있는 대체 방법이 필요하며, 이러한 여러 가지 측면에서 착상전 유전진단은 매우 효과적이며 유용한 방법이라 할 수 있다. 이외에 체외 수정 및 배아 이식술 분야(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF and ET)에서 이식하기에 좋은 배아를 선택하기 위해 전통적으로 시행되어 온 형태학적인 기준(morphological criteria)을 대체할 수 있는 방법으로도 사용되고 있다^{2, 3)}.

최초의 착상전 유전진단에서는 X-연관 유전질환을 가진 가계의 부부로부터 배아를 얻고 그 배아로부터 할구(blastomere)를 생검(biopsy)한 후 단일세포 수준에서 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 Y 염색체의 특이 서열을 증폭시켜 남성과 여성을 진단함으로써 정상인 또는 보인자인 여아를 선별, 이식하여 임신을 보고하였다¹⁾. 이와 같이 성공적인 착상전 유전진단을 위해서는 체외 수정 및 배아이식술, 할구와 배아에 영향을 미치지 않고 생검을 시행할 수 있는 고도의 미세조작기술, 그리고 DNA 양이 극히 적은 단일세포 수준(약 6 pg)에서도 정확성을 유지할 수 있는 분자생물학적 기술 등이 요구된다.

현재까지 착상전 유전진단을 적용할 수 있는 유전질환은 계속 증가되고 있으며, 배아의 염색체 이상 유무를 진단하여 반복적 유산 등의 질환에 적용함으로써 보조생식술의 효율을 증대시키는 방법으로도 사용되고 있다. 또한 외국의 경우 late onset disease나 HLA typing 등으로 그 범위가 점차 확대되고 있다. 유럽 생식의학회(European Society for Human Reproduction and Embryology, ESHRE) 산하의 PGD consortium의 제 9차 보고에 의하면 1997년부터 2007년까지 전세계적으로 약 20,800주기의 착상전 유전진단이 시행되었으며 이 중 약 3,900주기에서 임상적 임신이 이루어졌으며, 약 3,160 건의 분만을 통해 약 3,840명의 건강한 아이가 태어났다고 한다⁴⁾.

착상전 유전진단은 질환의 원인과 그에 따른 진단 방법에 따라 주로 염색체의 수적, 구조적 이상을 진단할 수 있는 FISH (fluorescence *in situ* hybridization, 형광직접조합법) 방법과 질환 원인 유전자의 돌연변이 등을 진단할 수 있는 PCR 방법으로 크게 구분할 수 있다. 이 중에서 PCR 방법을 이용하여 단일 유전자 질환(single gene disorders)에 대한 착상전 유

전진단을 시행하는 센터는 전세계적으로 90여 센터에 불과한 것으로 알려져 있다⁴⁾. 이는 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 경우 정확한 분자생물학적 기술과 이를 분석할 수 있는 능력 등이 뒷받침되어야 한다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단을 중심으로 착상전 유전진단의 임상적 적용, 분자생물학적 진단 기법, 그리고 본원의 사례에 대해 알아보고자 한다.

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 적응증

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 적응증이 되는 유전질환들은 유전방식에 따라 크게 4가지(상염색체 우성, 상염색체 열성, X-연관 질환, 삼핵산 반복서열 질환)로 분류할 수 있다. 또한 최근 서구에서는 cancer predisposition 또는 이미 질환이 이환된 아이를 위한 줄기세포 치료의 목적으로 HLA typing을 단독으로 혹은 돌연변이 진단과 함께 사용하는 등 그 범위가 점차 확대되어가고 있다^{5, 6)}. 이론적으로는 단일 유전자의 어떤 돌연변이라도 단일 세포 수준에서 진단이 가능하다고 볼 수 있으며 유럽 생식의학회 PGD consortium 제 9차 보고에 따르면 cystic fibrosis, myotonic dystrophy, beta-thalassemia, Huntington's disease, fragile X syndrome 그리고 spinal muscular atrophy 등이 많은 사례를 차지하고 있다⁴⁾.

한편, 우리나라에서는 2009년 7월 “생명윤리 및 안전에 관한 법률” 제25조 제2항, 동법 시행령 제14조 및 [별표 1의2]의 제63호 규정에 따라 배아 또는 태아를 대상으로 유전자검사를 할 수 있는 유전질환을 63종에서 총 139종으로 확대 지정 고시한 바 있다.

1. 상염색체 우성 유전질환(Autosomal dominant inheritance)

상염색체 우성 유전질환이란 한 쌍의 염색체에서 오직 한 염색체만이 정상 대립유전자를 지니고 있고, 다른 쪽 염색체는 그 유전자 자리에 돌연변이 대립유전자를 지녔을 때 즉, 2 alleles 중 1 allele에만 돌연변이 유전자가 존재해도 질환이 발현되는 유전질환으로 자식의 50%가 이환되는 질환이다. 따라서 우성 유전질환에 대한 착상전 유전진단 시에는 이형접합(heterozygous) 세포의 2 alleles 중 1 allele에서는 소량 증폭이 일어나고 나머지 다른 allele에서는 대량 증폭이 일어나는 현상(preferential amplification, PA)과 1 allele에서만 증폭이 일

어나고 나머지 1 allele에서는 증폭이 전혀 일어나지 않는 경우인 allele drop-out (ADO)에 주의를 하여 정확한 진단을 내려야 한다(see section 5: 5절 참조). 가장 흔한 질환으로는 myotonic dystrophy, Huntington's disease, Charcot-Marie-Tooth disease, neurofibromatosis이며, 이 외에도 familial adenomatous polyposis coli, achondroplasia, osteogenesis imperfecta, tuberous sclerosis 등이 있다.

2. 상염색체 열성 유전질환(Autosomal recessive inheritance)

한 쌍의 염색체에서 양쪽 염색체 모두 어떤 유전자자리에 돌연변이 대립유전자를 지니고 있을 때, 즉 2 alleles 모두 변이 유전자가 존재할 때 질환이 발현되는 유전질환을 의미한다. 지금까지 알려진 대부분의 열성질환들은 유전자 산물의 기능을 줄이거나 제거하는 돌연변이들이 많이 있으며 특히, 효소의 기능에 관여하는 경우가 많다. 가계도에서 보면 남성과 여성 모두 동일하게 이 환되는 질환으로 cystic fibrosis, beta thalassemia, spinal muscular atrophy 등이 있으며 그 외에도 phenylketonuria, congenital adrenal hyperplasia, epidermolysis bullosa 등의 유전질환에서 착상전 유전진단이 시행되었다.

3. X-연관 유전질환(X-linked inheritance)

원인이 되는 변이 유전자가 X 염색체에 존재하는 경우에 해당되며 남성과 여성에게 똑같이 영향을 주는 상염색체 유전방식과는 달리 X-연관 유전질환의 경우 남성은 1개의 X 염색체를 가지고 있기 때문에 X-연관 유전자자리에 대해 반접합(hemizygous) 상태이며, 따라서 남성의 경우 X-염색체 상의 유전자자리에 돌연변이가 있을 경우 질환이 이환되는 반면 여성의 경우 X-연관 유전자자리에 이형접합 또는 동형접합(homozygous)이 될 수 있기 때문에 증상이 없는 보인자이거나 정상이다. 따라서 모친이 증상이 없는 보인자일 경우라도 그 아이들의 절반은 질환에 이환될 가능성이 있다. 또한 정확한 변이 유전자를 발견하지 못 했을 경우 gender selection을 통해 정상 또는 보인자인 여아를 선별하여 이식하기도 한다. 흔한 유전질환으로는 Duchenne muscular dystrophy, fragile X syndrome, hemophilia A 등이 있다. 또한 변이유전자가 X 염색체에 존재하며 보인자인 여자에서도 증상이 나타나는 X-연관 우성 유전질환인 ornithine transcarbamylase deficiency, Alport syndrome 등도 있다⁷⁾.

4. 삼핵산 반복서열 유전질환(Tri-nucleotide repeat disease)

질환을 일으키는 대부분의 원인 돌연변이는 한번 발생하여 다음 세대로 전달될 때 가계의 모든 환자들이 동일한 돌연변이를 가지는 반면, 일부 유전질환에서는 돌연변이가 불안정하게 반복, 확장되는데, 그 반복단위는 보통 CAG나 CGG와 같이 3개의 핵산으로 이루어지며 정상 집단에서는 비교적 적은 횟수의 반복단위를 가지지만 환자의 경우 반복 횟수가 정상적인 범위를 넘게 되고 세대가 거듭될수록 반복의 수가 확장되어짐을 관찰할 수 있다. 이러한 유전질환으로는 myotonic dystrophy, Huntington's disease, fragile X syndrome, spinocerebellar ataxia 등이 있으며 성공적으로 착상전 유전진단이 적용되고 있다.

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단 과정

1. 유전상담

착상전 유전진단을 시행하기 이전에 해당 질환에 대한 일반적인 사항 및 기술적 한계에 따른 오진율과 그로 인해 이환된 환아를 가질 수 있는 위험성, 정상 태아가 없어 이식하지 못 할 가능성, 정상과 보인자의 구분이 불가능할 경우 보인자의 이식 여부, 그리고 질환의 이환을 막을 수 있는 또 다른 여러 가지 선택사항(정자공여, 난자공여, 산전진단 등) 등에 대한 상담이 이루어져야 하며, 또한 착상전 유전진단을 위해 시행하는 체외수정 시술 전반에 대한 상담과정이 선행되어야 한다. 또한 착상전 유전진단으로 임신에 성공했을 경우에도 기술적 한계에 따른 오진이 있을 수 있기 때문에 반드시 산전진단을 통해 확인하는 과정이 필요하다는 것도 상담되어야 한다.

2. 과배란 유도(Controlled Ovarian Hyperstimulation, COH)를 통한 체외수정 시술

착상전 유전진단 시 수정란으로부터 할구를 분리해 낸 후 단일 할구를 대상으로 검사를 진행해야 하기 때문에 체외수정 시술이라는 보조생식술(assisted reproductive technology, ART)을 통해 수정란을 획득해야 한다. 많은 수의 난자를 얻기 위해 controlled ovarian stimulation을 시행하게 되며, GnRH (gonadotropin releasing hormone) analogue와 gonadotrophin을 사용하여 과배란 유도 후 난포가 적절하게 자라게 되면 hCG (human chorionic gonadotrophin)를 주사하고 36시간 후 난

자를 채취한다. 획득된 난자의 경우 착상전 유전진단 과정 중 발생할 수 있는 오염(contamination)의 원인 중 하나인 cumulus cells을 제거한 후 일반적으로 사용되는 체외수정법(in vitro fertilization)이 아닌 세포질내 정자주입법(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 사용하여 수정을 시키게 된다. 세포질내 정자주입법의 경우 예상치 못한 수정의 실패를 피하기 위해서 또는 일반적인 체외수정법 사용시 난자의 투명대(zona pellucida, ZP)에 붙어 있을 수 있는 잉여의 정자로 인한 오염의 방지를 위해 사용된다^{8, 9)}.

정상적으로 수정이 되어 배아가 발달하는 경우 수정 1일째 전핵 단계(pronucleus, PN stage), 3일째 8-세포기, 5일째 포배기(blastocyst)로 발달한다.

3. 생검

생검 과정은 2단계로 진행되는데 1단계는 할구 또는 극체(polar body, PB)를 생검하기 위해 투명대를 제거하는 단계로서 기계적, 화학적, 또는 laser 방법 중에서 선택하여 사용하게 되며 2단계에서는 일부 제거된 투명대를 통하여 제1극체, 제2극체, 혹은 할구를 방출(extrusion)시키거나 흡입(aspiration)하여 생검을 시행하며 또한 포배기 상태에서의 영양세포(trophectoderm, TE)를 생검하기도 한다¹⁰⁾. 현재 대부분의 착상전 유전진단 센터에서는 수정 후 3일째 6-10 세포기 배아로부터 미세조작술을 이용하여 할구 생검을 시행하며 배아의 세포수에 따라 1-2개의 할구를 분리해 낸다. 또한 생검 시 핵이 뚜렷이 잘 보이는 할구를 선택하여 생검을 실시하여야 한다.

1) 투명대 제거 방법

생검을 하기 위해 난자 또는 수정란을 감싸고 있는 투명대를 먼저 제거해야 한다.

(1) Chemical zona drilling using acidified Tyrode's solution

pH 2.3 정도의 산성용액을 이용하여 투명대를 녹이는 방법으로써 초기에는 산성용액에의 배아 노출, 배양액의 국소적 산성화, cell lysis, 착상이나 배아 발달에의 영향 등 여러 문제점이 제기되기도 했으나 drilling pipette과 aspiration pipette의 분리 사용, 배아의 단독 배양과 충분한 washing 등 방법의 개선으로 유럽생식의학회 PGD consortium 보고에서 볼 수 있는 바와 같이 가장 많은 센터에서 사용하고 있으며 안전한 것으로 생각되고 있다.

(2) Mechanical zona opening

물리적인 방법으로 “-”자, “X”자, 또는 “V”자 형태로 투명대를 일부 절개하는 방법으로써 acidic Tyrode's solution에 비해 사용이 제한적이며 흔히 극체를 분리할 때 많이 시행되고 있다.

(3) Laser-assisted zona opening

위의 2가지 방법보다 수정란에 가장 영향을 미치지 않으며, 사용이 간단하고 구멍 크기 조절이 가능하며 정확한 위치에 구멍을 뚫을 수 있다. 또한 작업 시간이 짧아 많은 배아를 처리할 수 있는 장점이 있다.

2) 세포 생검

(1) 극체 생검(polar body biopsy)

극체 생검은 Verlinsky와 Cieslak(1993)¹¹⁾에 의해 처음 기술되었으며 초기에는 insemination 전에 제 1극체만 생검하였으나¹²⁻¹⁴⁾ (Fig. 1A) 현재에는 insemination 후 제 1, 제 2극체를 동시에 생검하여 진단에 이용하고 있다¹⁵⁾ (Fig. 1B, C).

극체 생검의 장점은 극체가 배아 발달에 어떤 생물학적 역할을 하는 것이 아니기 때문에 제거하더라도 수정이나 배아 발달에 영향을 미치지 않는다는 것이다. 그러나 극체를 이용한 진단 시 단지 난자의 유전 정보만을 진단할 수 있다는 것이 단점으로 알려져 있으며, 재조합 등의 문제점을 해결하기 위해 현재 제 1극체와 함께 제 2극체까지 동시에 분석함으로써 오진을 감소시키고 정확한 진단을 할 수 있게 되었다¹⁶⁻¹⁸⁾.

(2) 난할 과정의 할구 생검(cleavage-stage biopsy)

할구 생검이라는 과정을 성공적으로 마치기 위해서는 첫째, 생검 시 1개의 뚜렷한 핵을 가지고 있는 완전한 할구를 생검하여 PCR이나 FISH로 진단 시 정확한 결과를 얻을 수 있어야 하며, 둘째, 생검 과정 후에도 배아 발달이 정상적으로 이루어져야 한다.

난할 과정의 할구 생검의 장점은 극체 생검이 모계 유래 질환만 검사할 수 있는 반면 부계와 모계 유래의 유전질환이나 염색체 이상을 모두 검사할 수 있다는 것이다. 단점으로는 첫째, 배아의 mosaicism을 들 수 있으며 이럴 경우 분리해 낸 할구의 유전형이 나머지 배아 전체의 유전형이라 할 수 있는가 하는 문제점이 있다. 둘째, 염색체 mosaicism이나 우성 유전질환, 그리고 염색체 이상에 대한 오진을 감소시키기 위해 2개의 할구에서 같은 진단 결과가 나온 경우에만 이식을 하는 경우가 있는데 이럴 경우 정확한 진단을 위해 사용할 수 있는 세포 수와 생

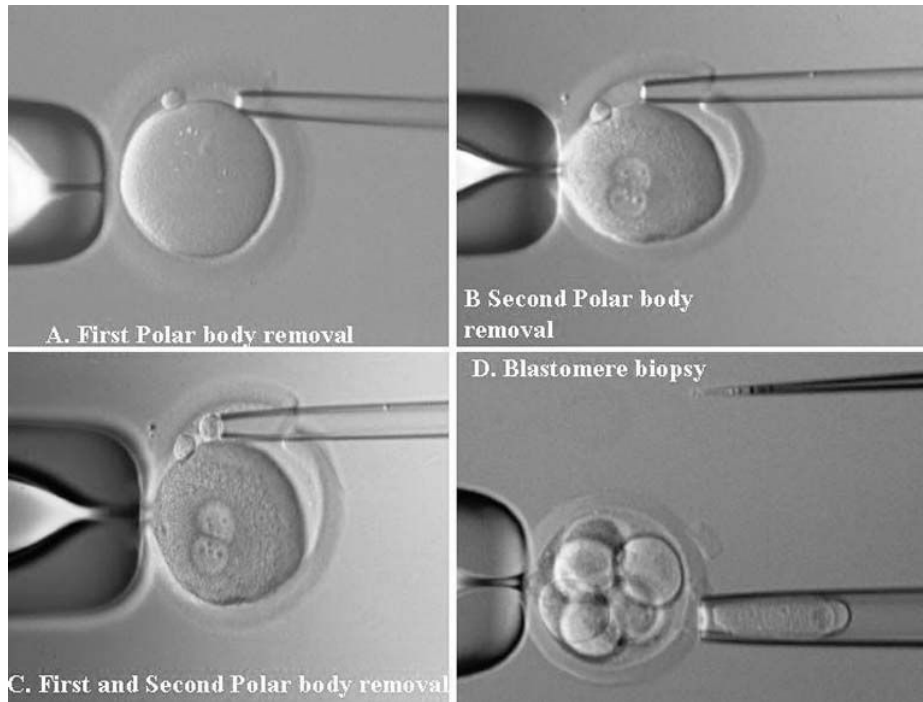


Fig. 1. A) First polar body removal. B) Second polar body removal. C) First and second polar body removal. D) Blastomere biopsy. (Verlinsky Y, Kuliev A. Glob. Libr. Women's med., (ISSN: 1756-2228) 2008; DOI 10. 3843/GLOWN.10373).

검 후 남은 할구의 수가 적다는 것이다.

수정란에서 compaction이 일어나게 되면 할구를 분리해 내기 어려워지기 때문에 보통 수정 3일째 오전에 생검을 시행한다(6-10-세포기). 착상전 유전진단에서의 할구 생검은 acid Tyrode's solution 또는 laser를 이용하여 투명대 일부를 제거한 후 내경 35-40 μm의 aspiration pipette을 사용하여 흡입하는 방법(Fig. 1D)과 배양액을 이용하여 할구를 밀어 내거나 배아를 누르는 압력을 이용하여 할구를 밀어내어 방출하는 방법이 사용된다^{19, 20}.

(3) 포배기 영양세포 생검(blastocyst trophectoderm biopsy)

수정란이 발달하여 포배기 상태에 도달하게 되면 inner cell mass와 trophectoderm으로 나뉘게 되는데, 여러 실험 동물을 이용하여 trophectoderm 세포의 생검이 개체 발생에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였으며 마찬가지로 인간에서도 나쁜 영향이 없다는 것을 보고한 바 있다²¹. 따라서 trophectoderm 세포 생검의 장점으로서는 분석을 위해 10-30개의 세포를 생검할 수 있다는 것과 태아형성에 관여하는 inner cell mass를 건드리지 않고 trophectoderm 세포만 생검을 하기 때문에 어떤 태아 발달에도 영향을 미치지 않는다는 것이다.

투명대를 열기 위해 inner cell mass 반대쪽에 micro-

needle²¹)이나 laser²²)을 이용하여 slit을 만들고 그 slit를 통해 trophectoderm 세포들이 이탈(herniation) 되어 나오면 그 일부를 생검한다. 또한 PCR이나 FISH 분석을 위해 충분한 양의 세포를 얻기 위해서는 연속적으로 생검을 할 수도 있다. 하지만 난할 과정 배아에서 보여지는 mosaicism보다는 비율이 낮지만 포배기 배아에서도 마찬가지로 mosaicism이 나타나기 때문에 결과 분석에 주의를 기울여야 한다²³). 또한 IVF를 통해 얻은 배아의 일부만이 포배기 배아 단계까지 발달하게 되기 때문에 결국 유전진단 단계까지 도달할 수 있는 배아의 수는 제한적이라 볼 수 있으며 진단을 위한 충분한 시간이 주어지지 않는다는 것이 단점으로 지적되고 있다.

4. 단일세포 수준에서의 진단을 위한 분자생물학적 기법

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단에 있어서 가장 기본이 되는 진단 방법은 PCR이다. 물론 Duchenne muscular dystrophy와 Becker muscular dystrophy와 같이 큰 결실(deletion)이 있는 경우 FISH 방법을 사용하여 간단하게 진단을 하기도 하며, X-염색체 연관 질환의 경우 정확한 돌연변이를 알 수 없을 때에도 gender selection을 위해 FISH 방법을 사용하기도 한다.

1) Multiplex PCR

한번의 PCR 반응으로 여러 다른 부위를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 방법은 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단에서 필수 기법이다. 성공적인 multiplex PCR을 시행하기 위해서는 각각의 primer들 사이의 간섭 작용 여부, 각 primer에 의해 증폭되어 나오는 산물의 크기, annealing temperature, 반응 시간, MgCl₂ 농도 등을 최적화시켜야 한다.

Multiplex PCR은 여러 개의 돌연변이가 부위 그 자체만을 증폭하기도 하지만 대체로 돌연변이가 있는 문제의 유전자 내에 있거나 인접한 위치에 있는 polymorphic markers를 포함하여 시행한다. 이러한 marker들은 돌연변이와 같이 분리(segregation)되기 때문에 markers를 이용한 multiplex PCR을 시행할 경우 돌연변이가 자체를 진단하지 않더라도 간접적으로 돌연변이가 유무를 진단할 수 있으며 또한 여러 개의 markers를 사용함으로써 1개의 marker에서 ADO가 발생하더라도 다른 marker의 결과와 비교 분석하여 정확한 진단을 할 수 있는 장점이 있다. 이 외에도 multiplex PCR은 예상치 못한 유전형이 나오거나 음성대조군에서 증폭된 산물 등이 감지되었을 때 오

염의 여부를 확인할 수 있으며 그 오염의 원인 또한 파악할 수 있다. 그러나 이러한 장점을 이용하고 또한 연관 분석을 하기 위해서는 가계 내의 환자와 그 가족에 대한 분석을 시행하여야 하며, 각 부부에게 적어도 2개 이상의 informative markers가 있을 경우 더욱 효과적이며 또한 재조합(recombination) 유무를 확인하기 위해서는 돌연변이가 부위를 감싸고 있는 각각의 marker가 있어야 한다(Fig. 2).

2) Fluorescent PCR

최근 가장 많이 사용되고 있는 기법 중의 하나로서 fluorescent PCR에 사용되는 primer 쌍 중 1개 primer의 5 말단 쪽에 형광물질을 부착시켜 PCR 반응을 시행한 후 자동 염기서열분석기기에서 분석하는 방법이다. 이 방법은 1 bp의 차이도 구별해 낼 수 있을 정도로 매우 정확하게 분자량(크기)을 결정할 수 있으며 일반적인 PCR과 ethidium bromide-agarose gel 전기영동법에 비해 약 1,000배 정도 민감한 방법이며 또한 동시에 여러 시료 및 부위를 진단할 수 있다. 또한 민감도가 높기 때문에 일반적인 PCR과 전기영동법으로는 감지할 수 없었던 산물을 감지해 낼 수 있어 PA와 ADO를 감소시킬 수 있는

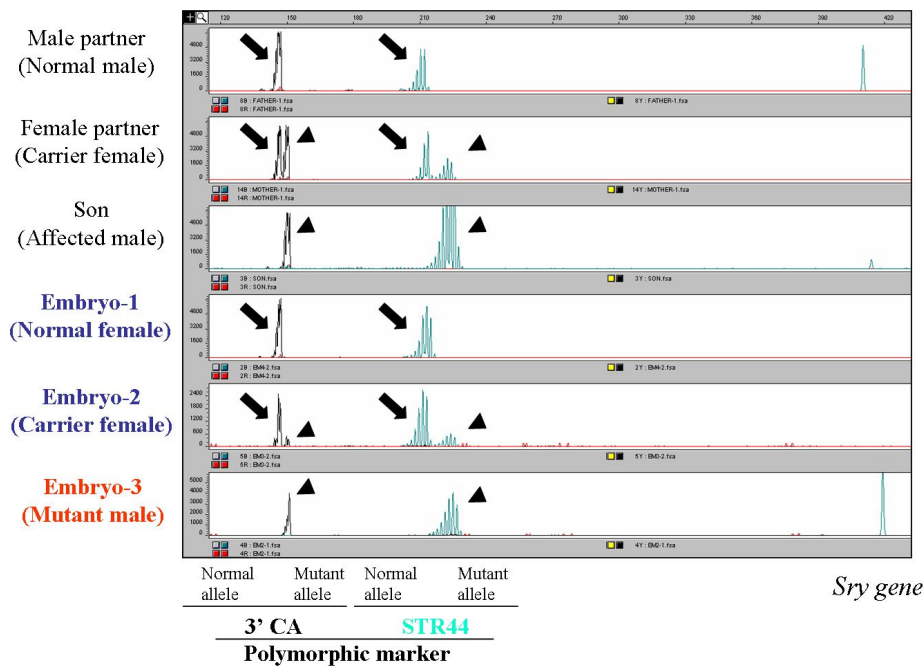


Fig. 2. Electropherogram of the dinucleotide repeat markers (3'CA and STR44) analysis and Sry for preimplantation genetic diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. The approximate length of the repeats (base pairs) is represented on top of the electropherogram. Electropherogram A (top): the unaffected male partner; B) the carrier female partner; C) the affected son; D) the normal female embryo; E) the carrier female embryo; F) the affected embryo. Arrows and arrow heads indicate normal and mutant alleles, respectively (Lee et al., 2005).

방법이기도 하다(Fig. 2).

3) Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

서로 다른 2 alleles을 비교하기 위해 간단히 사용할 수 있는 방법으로써 제한효소 인식 서열 내에 존재하는 돌연변이 또는 single nucleotide polymorphism (SNP)로 인해 제한효소

인식 서열이 새로 생겨 절단 가능한 서열이 되든가 아니면 인식 서열이 바뀌어 제한효소가 인식하지 못 하게 됨으로써 절단되지 않는 현상을 이용하는 방법이다. PCR 산물을 돌연변이 서열에 맞는 각각의 제한효소와 반응시킨 후 전기영동법을 이용하여 분리시키게 되면 절단 양상에 따라 특정 부위 서열의 변화 여부를 확인할 수 있다(Fig. 3).

4) Mini-sequencing

제한효소를 이용하는 RFLP 방법은 partial digestion으로 인한 오진의 위험성과 반응시간 등의 이유와 최근 자동 염기서열분석기기의 발달과 활발한 SNP 연구로 인하여 mini-sequencing 방법으로 대체되고 있다. Mini-sequencing 방법은 mini-sequencing primer를 문제의 염기서열 직전까지 부착되도록 고안한 후 단지 1개의 염기만이 붙으면 반응이 끝나도록 서로 다른 형광물질이 부착된 dideoxy nucleotide를 넣어 반응을 시킨 후 자동 염기서열분석기기로 분석하는 방법이다^{24, 25} (Fig. 4).

5) Whole genome amplification

최근 1개의 할구로부터는 PCR 방법으로 돌연변이 진단을, 다른 1개의 할구로부터는 FISH 방법으로 aneuploidy 진단을 하는 사례가 증가하고 있으며²⁶ 착상전 유전진단을 비롯해 중앙연구, 법의학 등의 연구 분야에서는 극소량의 DNA가 연구 진행의 한계점으로 여겨져 왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위

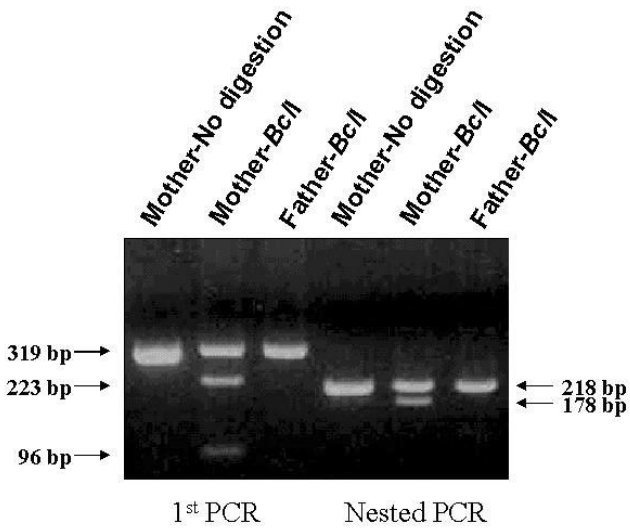


Fig. 3. Identification of the maternal mutation (heterozygote type) in exon 9 of the OTC gene. After restriction enzyme digesting the PCR product with BclI, the 319 or 218 bp PCR products of the affected mother were digested into 223 and 96 bp (lane 2) or 178 and 40 bp products (lane 5), respectively (Lee et al., 2004).

Minisequencing Single Base Extension

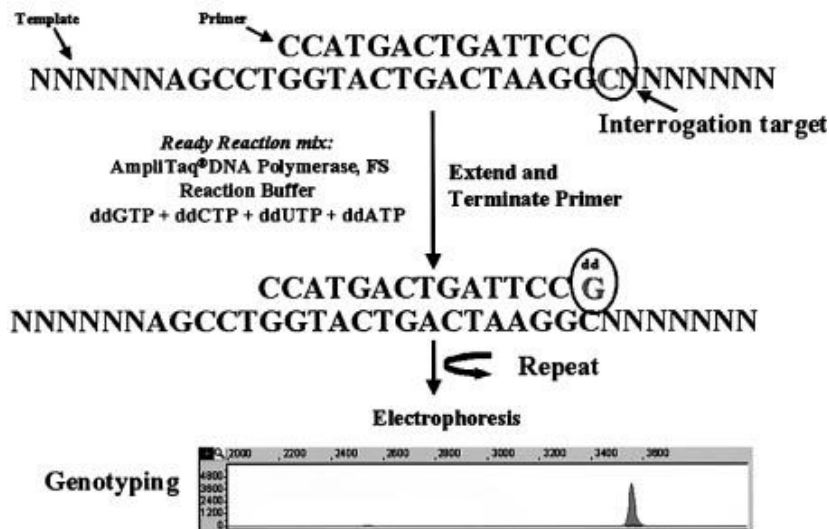


Fig. 4. Minisequencing technique (Fiorentino et al., 2003).

해 primer extension preamplification (PEP)-PCR, degenerate oligonucleotide primed (DOP)-PCR 등의 whole genome amplification 방법들이 개발되었다^{27, 28)}. 이 방법들은 기존의 PCR에서 사용했던 특정 서열에만 결합하여 증폭하는 specific primer 대신 DNA 전체 서열에 걸쳐 결합한 후 증폭할 수 있는 random oligonucleotide primer 또는 degenerate oligonucleotide primer를 사용함으로써 극소량의 DNA로부터 다량의 DNA (~ μg)를 얻을 수 있다. 이러한 방법을 이용하여 다량의 DNA 시료를 확보할 경우 한번의 착상전 유전진단으로 돌연변이 분석과 linked markers 분석, 그리고 comparative genomic hybridization (CGH), array-CGH 등을 이용한 aneuploidy screening, HLA typing 등을 동시에 진행할 수 있다²⁹⁾.

최근에는 bacteriophage에서 추출한 phi29 DNA polymerase와 random hexamer primer를 이용한 multiple displacement amplification (MDA) 방법이 착상전 유전진단에 널리 사용되고 있다. 이 방법은 PCR 방법에 기초한 기존의 whole genome amplification 방법과는 달리 isothermal 방식으로 DNA를 변성시킨 후 일정 온도에서 random hexamer를 결합시키고 strand displacement 방법으로 합성을 유도하는 방법이다³⁰⁾. Handyside 등(2004)²⁹⁾과 Hellani 등(2004)³¹⁾이 MDA를 이용한 착상전 유전진단을 처음 제안한 이후 2005년부터 여러 연구자들에 의해 시도되었고 성공적인 결과를 보고하고 있다³²⁻³⁴⁾. 하지만 MDA의 단점으로 높은 ADO rate와 PA 현상을 들 수 있는데, Burlet 등(2006)³³⁾에 의하면 약 25%의 ADO rate가 발생하고, PA 현상 역시 약 25% 정도 발생한다고 한다.

6) Oligonucleotide array

최근에는 반도체산업으로부터 유래된 기술을 이용하여 microarray에 존재하는 수백 개에서 수만 개에 이르는 spots에 특정부위 혹은 전체 염기서열을 모두 포함하는 oligonucleotide를 고정시켜 chip으로 고안 제작하게 되었다. 각각의 spot에는 25개 정도의 염기로 이루어진 oligonucleotide에서부터 350 kb에 이르는 BAC clone까지 다양하게 부착시켜 사용할 수 있다. 이 array에 형광물질이 부착된 시료(시험군과 대조군)를 혼합하여 hybridization 한 후 여기서 발현되는 형광의 차이로 염색체 혹은 유전자의 이상 유무를 확인할 수 있다^{35, 36)}. 이러한 방법으로 큰 결실이나 중복(duplication), 또는 현미경 하에서 관찰하지 못 하는 미세결실이나 중복 등 copy

number variation (CNV), 그리고 이미 알려진 돌연변이나 SNP에 대한 oligonucleotide probe를 이용할 경우에는 각각의 유전자에 대한 돌연변이와 SNP를 짧은 시간에 진단할 수 있다.

5. 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 문제점

착상전 유전진단에서의 PCR 즉, 단일 세포 수준에서의 PCR 시행 시 일반적인 분자생물학적 실험에서는 겪지 못하는 여러 가지 문제점에 당면하게 된다. 첫째, 진단 시료(genomic DNA)의 제한적인 양(약 6 pg/cell)을 들 수 있다. 따라서 PCR 반응 조건을 확립하기 위해 매우 오랜 시간이 소요되며, 정확한 조건을 확립하였다 하여도 증폭 실패(amplification failure) 또는 2 alleles 중 1 allele만 많이 증폭되는 PA가 자주 일어나게 된다. 둘째, PCR 반응의 특이성이다. 소량의 DNA를 사용하게 되고 시료의 재 채취가 거의 불가능하기 때문에 PCR 반응시 비특이적인 산물을 얻게 되면 다음 단계의 실험이 어려워지고 따라서 정확한 결과를 얻을 수 없다. 따라서 비특이적인 증폭을 방지하고 정확성을 증가시키기 위해 대부분의 착상전 유전진단 센터에서는 semi-nested PCR 또는 nested PCR 방법을 사용하고 있다⁷⁾. 셋째, 오염(contamination)의 문제이다. 극소량의 DNA를 가지고 실험을 진행하기 때문에 공기 중의 DNA, 선행 실험에서 사용되었던 template DNA나 PCR 반응 산물 등 여러 오염원으로부터의 오염은 진단 해석에 어려움을 주며 오진의 원인이 된다. 이를 방지하기 위해 각각 독립된 PCR 공간(pre-PCR, 1차, 2차 PCR)이 확보되어 있어야 하며 반드시 멸균된 시약을, 적당한 양으로 분주를 해서 사용해야 한다. 또한 laminar flow hoods 하에서 장갑과 마스크 등을 착용하고 실험을 진행해야 하며 hoods는 UV를 조사하여 멸균해야 한다³⁷⁾. 넷째, 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단에서 가장 심각한 문제점 중의 하나인 ADO 문제이다(Fig. 5). 예를 들어 실제로는 이형접합자인데 돌연변이 allele에서 ADO가 발생하여 정상 allele만 증폭되어 결국 정상 배아로 오진을 하게 되는 심각한 문제를 초래하게 된다. 특히, 상염색체 우성 유전질환의 경우에는 그 심각성이 매우 크다. 따라서 ADO를 감소시키기 위해 최근에는 할구 2개를 생검하거나 informative linked polymorphic markers를 이용한 multiplex PCR 방법이나 민감도가 높은 fluorescent PCR 등을 사용한다^{7, 38)}. 이러한 ADO의 원인으로는 세포의 불완전한 lysis와 너무 낮은 denaturation 온도 등을 들 수 있으며, 나쁜 형태의 배아

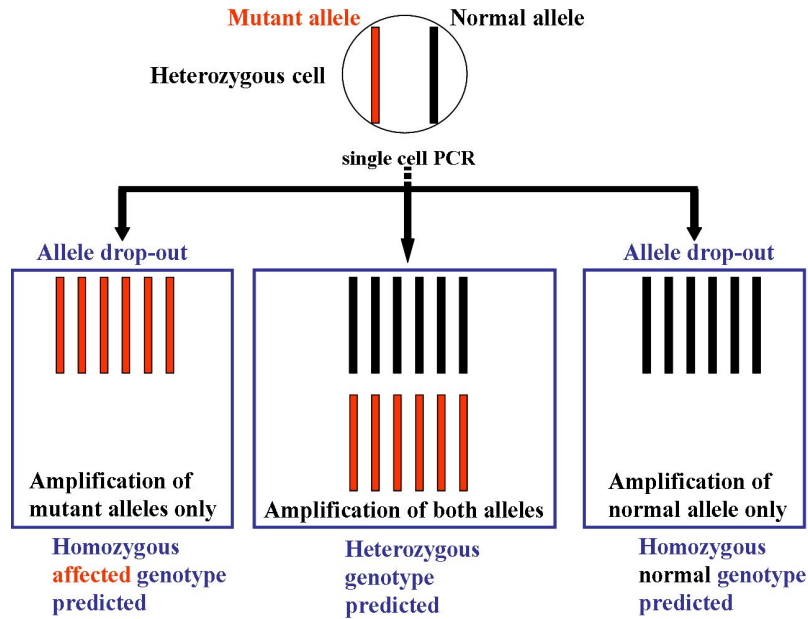


Fig. 5. A schematic diagram of allele drop-out (ADO) in the single cell PCR.

나 핵이 뚜렷이 보이지 않는 할구에서 관찰되는 DNA 자체의 degradation 또한 ADO의 원인으로 알려져 있다^{39, 40)}.

과 direct sequencing 방법을 사용하여 착상전 유전진단을 시행하였고 건강한 남아를 출산하였다(Fig. 6).

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 임상적 적용 사례

단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 경우 전세계적으로도 시행하는 센터가 많지 않으며 국내에서도 소수의 센터만이 시행하고 있다. 본원에서 시행한 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 경우 X-염색체 연관 유전질환인 DMD (근이영양증)를 가장 많이 시행하였으며, 상염색체 우성 유전질환으로는 osteogenesis imperfecta (골형성부전증), 상염색체 열성 유전질환으로는 epidermolysis bullosa (수포성 표피박리증)과 phenylketonuria (페닐케톤뇨증)을 많이 시행하였고, 삼핵산 반복서열 유전질환으로는 fragile X syndrome (FXS), spinocerebellar ataxia 3 (SCA3), Huntington’s disease (HD) 등을 시행하였다.

1. 상염색체 우성 유전질환

1) 골형성부전증

내원 당시 가게 내에 이환된 환자가 없는 26세의 여성 환자로서 collagen 합성에 중요한 역할을 하는 Col1A1 유전자에 *de novo* 돌연변이를 갖고 있었다. 이 부부의 경우 nested PCR

2. 상염색체 열성 유전질환

1) 수포성 표피박리증

본 환자의 경우 첫 임신 당시 정상분만을 통해 여아를 출산하였으나 23개월 만에 수포성 표피박리증으로 사망하였으며, 그 후 네 번의 임신 경험이 있었으나 출산 후 사망하거나 양수천자와 용모막 용모생검을 통해 돌연변이가 발견되어 인공유산을 시켰고 착상전 유전진단에 의한 임신을 위해서 본원에 내원하였다. 이들 부부의 질환 원인은 17번 염색체에 위치하고 있는 integrin β4 유전자(*ITGB4*)에서의 돌연변이로 밝혀졌으며 부부가 각각 서로 다른 위치에 1개씩의 돌연변이를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 여성의 경우 *ITGB4* exon 7에서 nucleotide C가 삽입(c.601InsC)되어 frameshift가 발생하며 결국 premature termination되는 돌연변이였으며, 남성의 경우 같은 유전자의 exon 11에서 nucleotide A가 C(c.1274A>C)로 치환되어 glutamine이 proline으로 바뀌는 돌연변이(p.Q425P)를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 이들 부부 각각 *ITGB4*에 돌연변이를 가지고 있었기 때문에 *ITGB4* exon 7과 11에 대해 duplex nested PCR 방법으로 증폭시킨 후 direct sequencing 방법으로 진단을 하였으며 이들 부부 역시 임신에 성공하여 건강한 아이를 출산하였다⁴¹⁾.

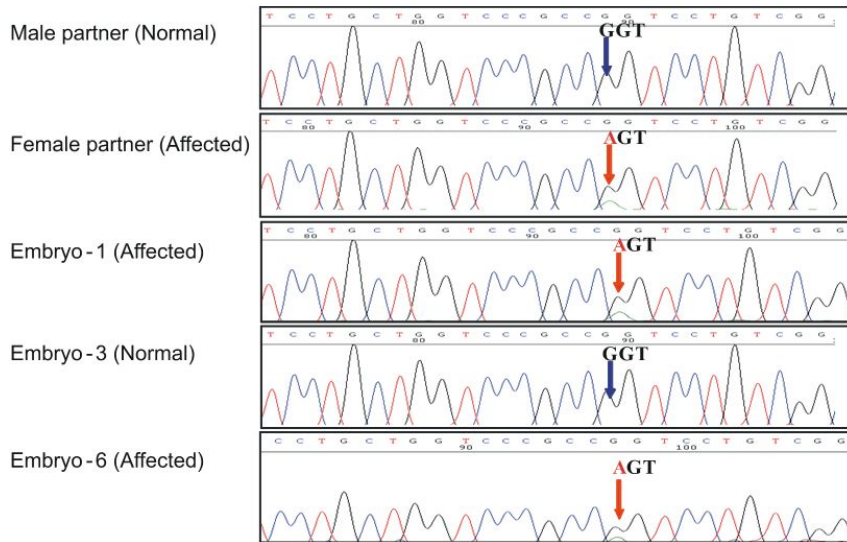


Fig. 6. The results of preimplantation genetic diagnosis for osteogenesis imperfecta. Direct sequencing of the PCR product spanning Col1A1 exon 44 shows normal homozygous G/G sequence in the male partner and embryo-3 (the blue arrows indicate normal G/G sequences), while the heterozygous G/A sequence in the affected female partner, embryo-1, and embryo-6 (the red arrows indicate heterozygous G/A sequences).

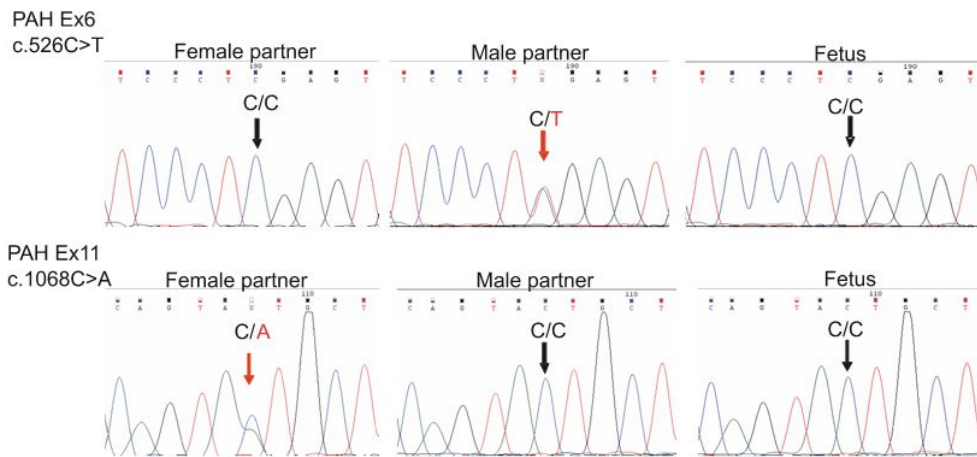


Fig. 7. The results of amniocentesis for phenylketonuria. Direct sequencing of the PCR product spanning phenylalanine hydroxylase (PAH) exon 6 (upper) and exon 11 (lower) represent normal homozygous C/C sequences in the fetus (the black arrows indicate normal C/C sequences).

2) 페닐케톤뇨증

본 환자의 경우 내원 당시 페닐케톤뇨증 환자 아들을 둔 32세의 여성이었으며 1번의 자연유산과 융모막 융모생검을 통한 1번의 인공유산 후 착상전 유전진단을 위해 본원에 내원하였다. 이 부부의 경우 부인은 phenylalanine hydroxylase 유전자 (PAH)의 exon 11 c.1068C>A 돌연변이, 남편은 exon 6 c.526C>T 돌연변이를 각각 가지고 있는 보인자로 밝혀졌으며 2개의 돌연변이를 동시에 진단하기 위해 duplex nested PCR을 시행하였고, 그 산물을 이용하여 direct sequencing 방

법으로 진단하여 정상 배아만을 이식하였으며 역시 임신에 성공하여 건강한 아이를 출산하였다(Fig. 7).

3. X-염색체 연관 유전질환

1) 근이영양증

본 환자의 경우 DMD 환자인 남동생이 있는 보인자 여성으로서 gender selection을 위한 amelogenin과 polymorphic marker인 STR44 그리고 pERT84-15-XmnI marker를 사

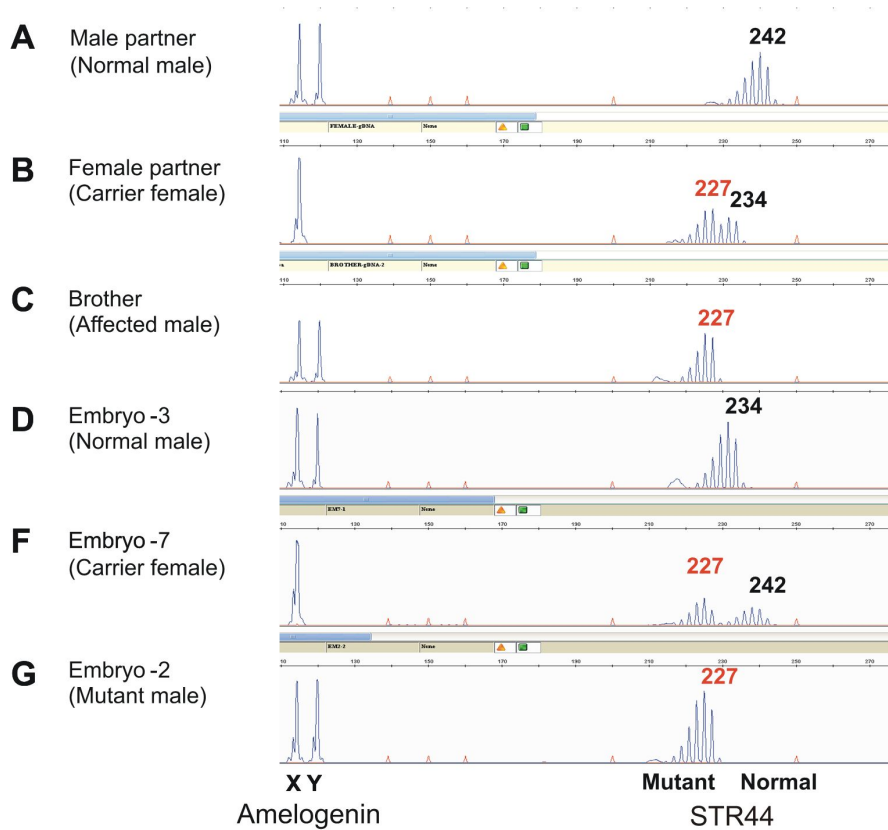


Fig. 8. Electropherogram of the multiplex fluorescent PCR of polymorphic marker, STR44 and amelogenin for PGD of Duchenne muscular dystrophy. A) the unaffected male partner, B) the carrier female partner, C) the affected brother, D) the normal male embryo, F) the carrier female embryo, G) the mutant male embryo.

용하여 triplex nested fluorescent PCR 방법과 fragment analysis 방법을 이용하여 착상전 유전진단을 시행하였다 (Fig. 8). 연관 markers의 사용으로 ADO rate를 감소시킬 수 있었으며 또한 X-염색체 연관 유전질환의 특성상 여성 배아의 경우 이식하지 않는 경우가 자주 보고되어 왔으나 이러한 informative linked markers의 사용으로 보인자와 정상 배아를 확실하게 구분할 수 있게 되어 이식 가능 배아의 수를 증가시킬 수 있었다⁷⁾.

4. 삼핵산 반복서열 유전질환

1) 척수소뇌성 운동실조증

척수소뇌성 운동실조증은 상염색체 우성 유전방식으로 이환되는 신경퇴화성 질환으로 Machado-Joseph disease 유전자(MJD1)의 CAG 삼핵산 반복서열의 확장에 의해 발병된다. 이 CAG 반복서열은 정상인에서도 매우 다양하여 12-43을 나타내며, 척수소뇌성 운동실조증 환자의 경우 보통 62-84

CAG 반복서열을 보이는 것으로 알려져 있다. 본원에 내원한 부부의 경우 남편의 CAG 반복서열이 27/69로서 한 allele이 확장되어 있었으며, 부인의 경우에는 26/32 반복서열로 정상이었다. MJD1의 CAG 반복서열을 증폭할 수 있는 primer를 고안하여 fluorescent semi-nested PCR 방법과 fragment analysis 방법을 이용하여 착상전 유전진단을 시행한 결과 정상 배아만을 진단할 수 있었으며 건강한 아이를 출산하였다³⁸⁾ (Fig. 9).

2) Huntington's disease

헌팅톤병은 점진적인 신경퇴화성 질환(neurodegenerative disease)으로 상염색체 우성 유전방식으로 이환되며, 10,000명당 1명의 발병률을 보이는 것으로 알려져 있다. 이 질환은 Huntingtin 유전자의 5' 말단에 위치하는 CAG 삼핵산 반복서열의 불안정한 확장에 기인하며, 지금까지의 연구 결과에 따르면 CAG 반복서열이 11-34일 경우 정상, 35-39일 경우는 grey zone, 그리고 40 이상으로 CAG 반복서열이 확장된

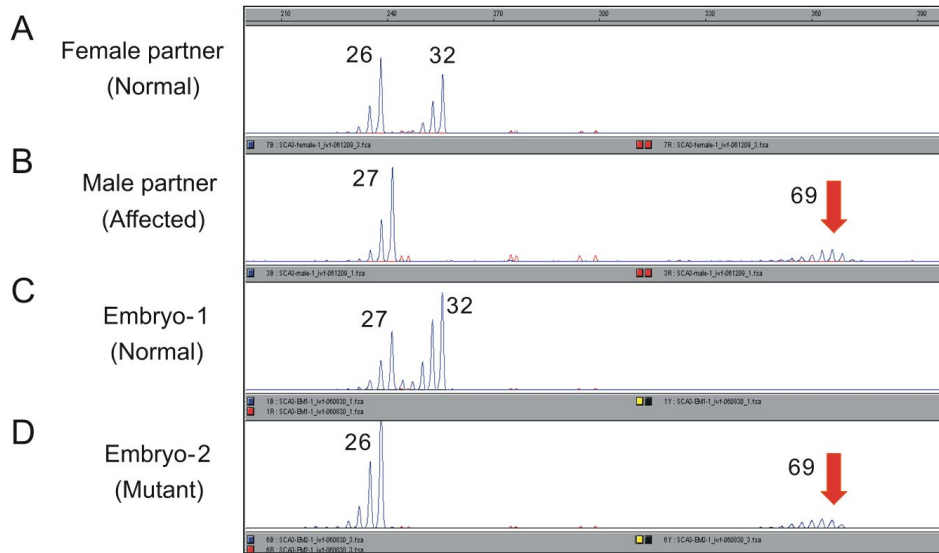


Fig. 9. Electropherograms of the CAG repeats in the preimplantation genetic diagnosis for spinocerebellar ataxia 3 with fluorescent semi-nested PCR. An arrow indicates the expanded mutant allele. Numbers represent the number of the CAG repeats.

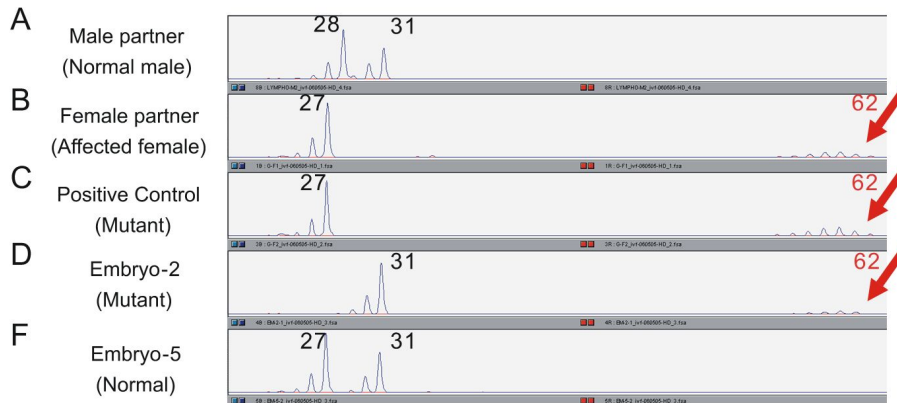


Fig. 10. Electropherograms of the CAG repeats in the preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease with fluorescent semi-nested PCR. An arrow indicates the expanded mutant allele. Numbers represent the number of the CAG repeats.

경우 발병하는 것으로 보고되고 있다. 본원에 내원한 환자의 경우 남편은 28/31 CAG 반복서열로 정상이었지만, 부인의 경우 CAG 반복서열이 27/62로 한 allele이 확장되어 있었다. 정확한 반복서열을 진단하기 위해 fluorescent semi-nested PCR 방법을 사용하여 착상전 유전진단을 시행하였다³⁸⁾ (Fig. 10).

결론

1990년 처음 보고된 착상전 유전진단은 유전질환이 이환된 아이를 출산할 확률이 높은 부부들을 대상으로 시행함으로써 질환이 이환된 아이의 출생을 예방하기 위한 매우 효과적인 방법이다. 단일 유전자 질환뿐만 아니라 염색체의 수적, 구조적

이상, 습관성 유산, 그리고 최근에는 HLA typing 또는 late onset disease 같은 질환으로까지 그 적용 범위가 점차 확대되어 가고 있다. 이를 뒷받침하기 위해 단일세포 수준에서의 매우 높은 분자생물학적 기술의 정확성이 요구될 것이며 또한 단일 세포로부터 여러 가지 진단을 동시에 수행하기 위한 MDA와 같은 whole genome amplification 같은 기술의 발전 또한 이루어져야 할 것이다. 이러한 분자생물학적 기술들의 발전으로 착상전 유전진단은 더욱 정확하고 안전한 진단방법으로 발전해 나아갈 것이며, 더 많은 사람들에게 건강한 아이의 출산 기회를 제공해 줄 것이다.

국문초록

착상전 유전진단은 유전질환이 이환될 가능성이 있는 부부들을 대상으로 산전진단을 통한 임신중절의 위험성 없이 정상적인 아이를 가질 수 있게 도와주는 보조생식술의 한 방법으로 확립되었다. 단일 할구를 대상으로 하는 분자생물학 및 분자생물학적 기술의 발전은 착상전 유전진단의 정확성을 높은 수준에 이르게 하였고 whole genome amplification 방법을 이용함으로써 단일세포로부터 여러 가지 다양한 진단을 동시에 수행 가능케 하였으며 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단에서의 오진을 감소시킬 수 있었다. 따라서 PCR을 이용한 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단의 적용가능 유전질환은 더욱 확대될 것이며 건강한 아이의 출산을 원하는 더 많은 부부들에게 기회를 제공해 줄 것이다. 본 종설에서는 현재 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단을 시행하는 대부분의 센터에서 시행하고 있는 생검 방법과 multiplex PCR, PCR 후 진단 방법, 그리고 multiple displacement amplification 등의 분자생물학적 방법과 단일 세포 분석에서의 문제점 등을 포함한 단일 유전자 질환에 대한 착상전 유전진단 전반에 관하여 논의할 것이다.

참고문헌

- 1) Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-70.
- 2) Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, et al. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril* 2004;82:292-4.
- 3) Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007;14:628-34.
- 4) Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC. ESHRE PGD Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;24:1786-810.
- 5) Van de Velde H, Georgiou I, De Rycke M, Schots R, Sermon K, Lissens W, et al. Novel universal approach

- for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia in combination with HLA matching of embryos. *Hum Reprod* 2004;19:700-8.
- 6) Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H, Biricik A, Sertyel S, Karlikaya G, et al. Short tandem repeats haplotyping of the HLA region in preimplantation HLA matching. *Eur J Hum Genet* 2005;13:953-8.
- 7) Lee HS, Choi HW, Lim CK, Park SY, Kim JY, Koong MK, et al. Efficacy of duplex-nested PCR and fluorescent PCR in the preimplantation genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Korean J Fertil Steril* 2005;32:17-26.
- 8) Staessen C, Camus M, Clasen K, De Vos A, Van Steirteghem A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum Reprod* 1999;14:2474-9.
- 9) Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod* 2005;20:35-48.
- 10) De Vos A and Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2001;21:767-80.
- 11) Verlinsky Y and Cieslak. Embryological technical aspects of preimplantation genetic diagnosis. In *Preimplantation Diagnosis of Genetic Disorders: A New Technique for Assisted Reproduction*, Verlinsky Y, Kuliev AM(eds). Wiley-Liss: New York:49-67.
- 12) Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1990;5:826-9.
- 13) Verlinsky Y, Rechitsky S, Evsikov S, White M, Cieslak J, Lifchez A, et al. Preconception and preimplantation diagnosis for cystic fibrosis. *Prenat Diagn* 1992;12:103-10.
- 14) Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995;10:1014-20.
- 15) Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med* 1997;62:182-7.
- 16) Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Ivakhnenko V, Kukharenko V, et al. Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:253-7.
- 17) Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, Amet T, Iva-

- khnenko V, Kukharenko V, et al. Accuracy of pre-implantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1999;16:192-8.
- 18) Verlinsky Y, Kuliev A. *Glob. Libr. Women's med.*, (ISSN: 1756-2228) 2008; DOI 10. 3843/GLOWN. 10373
 - 19) Pierce KE, Michalopoulos J, Kiessling AA, Seibel MM, Zilberstein M. Preimplantation development of mouse and human embryos biopsied at cleavage stages using a modified displacement technique. *Hum Reprod* 1997; 12:351-6
 - 20) Tarin JJ and Handyside AH. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril* 1993;59: 943-52.
 - 21) Dokras A, Sargent IL, Ross C, Gardner RL, Barlow DH. Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 1990;5:821-5.
 - 22) Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, Boada M, Carrera M, Santaló J, et al. Laser blastocyst biopsy for pre-implantation diagnosis in the human. *Zygote* 1997;5: 351-4.
 - 23) Evsikov S and Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998;13: 3151-5.
 - 24) Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, et al. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 2003;9:399-410.
 - 25) Fiorentino F, Biricik A, Karadayi H, Berkil H, Karlikaya G, Sertyel S, et al. Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Mol Hum Reprod* 2004;10:445-60.
 - 26) Lee HS, Jun JH, Choi HW, Lim CK, Yoo HW, Koong MK, et al. Preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency by simultaneous analysis of duplex-nested PCR and fluorescence in situ hybridization: a case report. *J Korean Med Sci* 2007; 22:572-6.
 - 27) 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* 1992;89:5847-51.
 - 28) Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 1992;13: 718-25.
 - 29) Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, Omar MB, Shaw MA, Grudzinskas JG, et al. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod* 2004;10:767-72.
 - 30) Blanco L, Bernad M, Lazaro JM, Martin G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* 1989;264:8935-40.
 - 31) Hellani A, Coskun S, Benkhalifa M, Tbakhi A, Sakati N, Al-Odaib A, et al. Multiple displacement amplification on single cell and possible PGD applications. *Mol Hum Reprod* 2004;10:847-52.
 - 32) Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S. Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* 2005;10:376-80.
 - 33) Bulet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyereisen E, et al. Multiple displacement amplification improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod* 2006;12:647-52.
 - 34) Lledo B, Bernabeu R, Ten J, Galan FM, Cioffi L. Preimplantation genetic diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy with gender determination using multiple displacement amplification. *Fertil Steril* 2007; 88:1327-33.
 - 35) Kurg A, Tonisson N, Geogious I, Shumaker J, Tollett J, Metspalu A. Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test* 2000;4:1-7.
 - 36) Madhuri RH, Ephrem LHC, Jennifer GM, David TO, Stephen TW, Michael EZ. Microarray-Based Mutation Detection in the dystrophin Gene. *Hum Mutat* 2008; 29:1091-9.
 - 37) Sermon K. Currents concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. *Hum Reprod Update* 2002;8:11-20.
 - 38) Kim MJ, Lee HS, Lim CK, Cho JW, Kim JY, Koong MK, et al. Optimized Methods of Preimplantation Genetic Diagnosis for Trinucleotide Repeat Diseases of Huntington's Disease, Spinocerebellar Ataxia 3 and Fragile X Syndrome. *Korean J Reprod Med* 2007;34: 179-88.
 - 39) Piyamongkol W, Bermúdez MG, Harper JC, Wells D. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003;9:411-20.
 - 40) Goossens V, Harton G, Moutou C, Scriven PN, Traeger-Synodinos J, Sermon K. ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to

- December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006. *Hum Reprod* 2008;23:2629-45.
- 41) Lee HS, Choi HW, Lim CK, Min DM, Byun HK, Kim JY, et al. Successful preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency, junctional epidermolysis bullosa and lactic acidosis using nested PCR: delivery of healthy baby by specific preimplantation genetic diagnosis for ornithine transcarbamylase deficiency. *Kor J Obstet Gynecol* 2004;47:708-18.