

근이양증 가계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상전 유전자진단

제일병원 유전학연구실, 불임연구실**, 산부인과*

최수경 · 이은호 · 이호준** · 전진현** · 강인수* · 백은찬* · 류현미* · 전종영*

Preimplantation Genetic Diagnosis Using Primer Extension Preamplication in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy(DMD/BMD) Families

Soo Kyung Choi, En Ho Lee, Ho Joon Lee**, Jin Hyun Jun**,
Inn Soo Kang*, Eun Chan Paik*, Hyun Mee Ryu* and Jong Young Jun*

Genetic Research Laboratory, IVF Research Laboratory**, and Department of Obstetrics and Gynecology*, Cheil General Hospital, Seoul, Korea

=Abstract=

General PCR technique alone has a limitation for preimplantation genetic diagnosis(PGD) using single blastomere. Recently developed primer extension preamplication(PEP) technology amplifies the whole genome and thus, simultaneous multiple locus analysis became possible. In this study, we report the efficacy of PEP-PCR for PGD in three muscular dystrophy carriers undergoing IVF-ET. A total of 37 blastomeres were obtained from 40 embryos at six to eight cell stage in three IVF cycles in two DMD and one BMD carriers. Whole genome from single blastomeres were amplified using 15-base oligonucleotide random primers.

PCR amplified products of exon 45 in the dystrophin gene and aliphoid X/Y loci for gender determination were analysed by 2% metaphor gel electrophoresis.

A total of 37 PEP-PCR replicates from 37 single blastomeres from 40 embryos and 37 blanks were performed. We obtained the reliable results for exon 45 and aliphoid X/Y. Transfer of female embryos and unaffected male embryo was attempted in three couples. Unfortunately, pregnancy was not achieved in these cases. PEP-PCR is a reliable and efficient PGD method in multiple locus analysis using single blastomere.

Key Words: Preimplantation genetic diagnosis, Primer extension preamplication

서 론

단일유전자 질환 및 염색체 이상과 관련된 산전 진단은 임신 초기나 중기에 시행되는 융모막 융모채취법(chorionic villi sampling)이나 양수천자(amniocentesis)로부터 얻어진 태아세포를 이용하여 생화학적 또는 세포 및 분자 유전학적 분석을 통하여 시행되고있다. 그러나 이와같은 임신중의 산전 진단은 태아가 환아로 판명되면 임

신중절만이 유일한 예방 방법으로 고려되므로 산모의 정신적, 육체적 고통이 뒤따르게 된다. 이러한 유전 질환과 관련된 유전자 결함을 임신중의 산전진단이 아닌 착상전에 수정란 단계에서 조기 진단할 수 있다면 이로 인한 사산아, 기형아의 출산을 줄일 수 있으며 같은 유전병 환자가 계속 출생하는것을 예방할 수 있다(Liebaers et al., 1992; Handyside, 1993; Winston and Handyside, 1993).

최근 체외수정, 보조 생식기술(assisted repro-

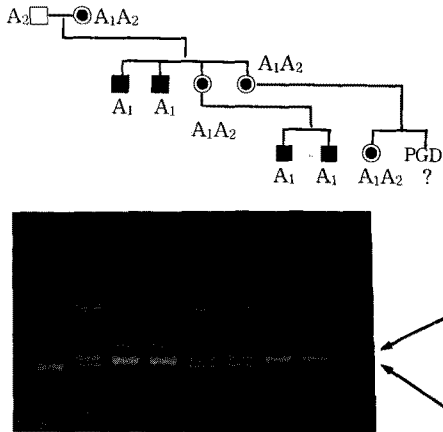


Fig.1. Pedigree and PCR-RFLP analysis of Becker muscular dystrophy family using 3'-CA repeat polymorphic marker on 3'-untranslated region of dystrophin gene. ■ : male patient(A₁), □ : normal male(A₂), ● : female heterozygote carrier(A₁A₂).

ductive technology : ART)과 수정란 이식 기술등이 발달됨에 따라 체외수정 시술후 4-8세포기의 수정란에서 1개 혹은 2개의 할구를 분리하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR)과 형광 직접 보합법(fluorescent in situ hybridization : FISH)을 이용한 착상전 진단이 일부 유전질환에 적용되고 있다(Handyside et al., 1990 ; Grifo et al., 1992; Chong et al., 1993; Delhanty et al., 1993; Liu et al., 1994). 따라서 염색체 이상이 있는 환자 또는 보인자, 유전 질환이 있는 가계의 환자 및 보인자 부부도 건강한 아기를 임신할 수 있게 되었다. 그러나 남아에서 환자의 발생빈도가 높은 X-연관 열성유전병(X-linked recessive inheritance disease)에서 성의 구별과 동시에 결손 유전자를 확인해야 할 경우나, 몇 개의 유전자와 연관된 질환의 유전 진단을 동시에 필요로 하는 경우에는 목표 유전자 하나만을 대상으로 하는 기존의 PCR 이나 FISH 방법으로는 한계점이 있었다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 Zhang등(1992)은 단일세포에 미량 존재하고 있는 DNA를 15bp 정도의 oligonucleotide primer를 이용하여 전체 게놈 DNA를 먼저 증폭시킨 후 여러 유전자 부위를 동시에 분석할 수 있는 primer extension preamplification(PEP) 방법을 처음 보고하였다. 이러한 방법으로 증폭된 전체 게놈 DNA의 양은 한개의 단일세포에서 약 60 copies의 증폭된 전체 게놈 DNA를 얻을 수 있으며 이것은 총 게놈

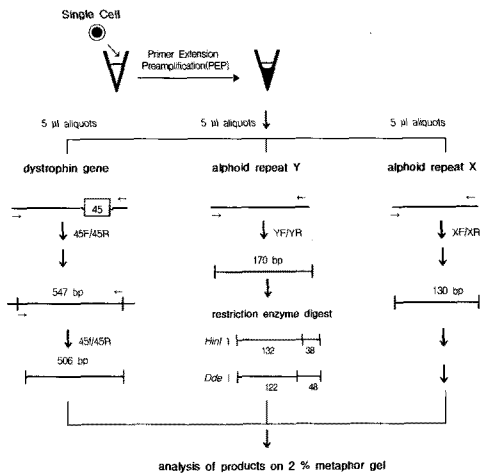


Fig.2. Procedure for exon 45 analysis at the dystrophin gene and alphoid loci of X and Y chromosome from a single human blastomere cell. Outer forward and reverse primers are indicated by F and R; heminested primers by f and R.

DNA의 약 78%에 이른다(고 보고하고 있다(Zhang et al., 1992). 저자들은 이러한 방법을 응용하여 dystrophin 유전자의 엑손 결실이 확인된 근이양증 가계의 보인자 및 현재까지 유전자 결실을 찾을 수 없었던 가계의 보인자를 대상으로 체외수정 시술을 통하여 얻어진 수정란에서 각각 한개의 할구를 분리하였다. 분리된 1개의 할구를 이용하여 여러 유전자 부위를 동시에 진단할 수 있도록 충분한 양의 게놈 DNA를 얻은후 목적에 따라 착상전 진단을 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

dystrophin 유전자의 엑손(exon) 45-47 부위가 결실된 베커 유형(Becker muscular dystrophy)의 환자가 있는 가계(Fig. 1)의 보인자 여성 1명과 현재까지 dystrophin 유전자 결실을 확인할 수 없는 듀센 유형(Duchenne muscular dystrophy)의 환자가 존재하는 가계의 보인자 여성 2명을 대상으로 착상전 진단을 4회 시행하였다. 실험과정은 Fig.2에 제시하였다.

2. 방법

2-1. 할구 준비

난자 채취후 자연수정(normal insemination) 또

는 난자의 세포질내 정자주입법(intracytoplasmic sperm injection)으로 수정된 4-8 세포기의 수정란에서 미세현미경 조작기를 이용하여 핵이 존재하는 할구 하나를 분리하여 혈청이 첨가되지 않은 Earle's 배지에서 3회 세척을 시행하였다. 세척이 끝난 할구는 미리 준비된 증류수 10ul 와 mineral oil 50ul가 덮힌 PCR 튜브에 넣었다. 각 할구에 대한 표준 대조군으로 할구가 포함되지 않은 배지만을 튜브에 넣고 -70℃에 1시간 정도 보관하였다.

2-2. PEP-PCR 과정

-70℃에 보관된 할구를 실온에서 10분 동안 녹인후 다시 -20℃ 냉동 보관과 실온에서 녹이는 과정을 3회 반복한 후 30ul의 PEP 혼합용액(final concentration : Tris-HCl 10mM, pH 8.3, KCl 50mM, MgCl₂ 2.5mM, dNTPs 100mM of each, 35uM 15-base random oligomers)을 첨가하였다. 즉시 1.0ul의 Taq polymerase(5U/ul Perkin Elmer Cetus)를 넣어 혼합액이 잘 섞이도록 짧게 원심 분리 하였다. PCR은 thermal cycler system(TP 3000, TaKaRa)을 이용하였으며 92℃에서 30초, 37℃에서 90초, 55℃에서 3분의 조건으로 45회 반복 증폭 시켰다.

2-3. PEP을 이용한 특이 유전자 부위의 증폭

PEP 생성물 5ul씩을 각기 주형으로 하여 목적에 따른 특이 유전자 증폭을 시행하였다. 먼저 성을 결정하기 위하여 X와 Y염색체에 존재하는 alphoid 반복배열 부위의 염기배열을 primer로 이용하여 PCR을 수행하였다. X와 Y염색체 특이 부위의 PCR은 동일하게 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초의 조건으로 50회 반복

증폭시켰다.

dystrophin 유전자 부위의 엑손 45에 대한 PCR은 정상 남아의 수정란을 선택하기 위하여 남아로 판명된 할구의 PEP 생성물을 이용하여 수행하였다.

primer는 dystrophin 유전자의 엑손 45 양말단의 염기배열을 선택하여 사용하였고 heminested primer는 처음 primer의 5' 말단 염기배열 안쪽으로 21mer로 고안하였다. 특이성과 민감도를 높이기 위하여 2-rounded PCR을 수행하여 결과를 얻었다.

결 과

분리된 할구 37개를 대상으로 PEP-PCR을 이용하여 4회의 유전자 진단을 시행하였다. 성의 구별을 위하여 PEP-PCR 생성물을 이용한 X와 Y염색체의 alphoid 반복배열 부위를 증폭한 결과 37개의 할구중 여아로 판명된 경우가 19에, 남아로 판명된 경우가 18에였으며 각각에 해당되는 할구가 들어있지 않은 대조군 시험관 37에는 모두 음성으로 확인되어 실험의 전 과정에 오염이 되지 않았음을 알 수 있었다. 할구가 들어있는 시험관 37에는 모두 PEP-PCR 및 목표 유전자 부위를 정확하게 증폭시킬 수 있었으며 12% polyacrylamide gel에서 PCR 생성물을 확인하였다(Fig.3).

dystrophin 유전자 결실에 의한 베커 유형의 환자 가계의 보인자 여성인 경우는 3개의 할구에서 남아로 성이 판명되었다(Fig.4). 3개의 남아로 판명된 PEP 생성물을 이용한 엑손 45 부위의 유

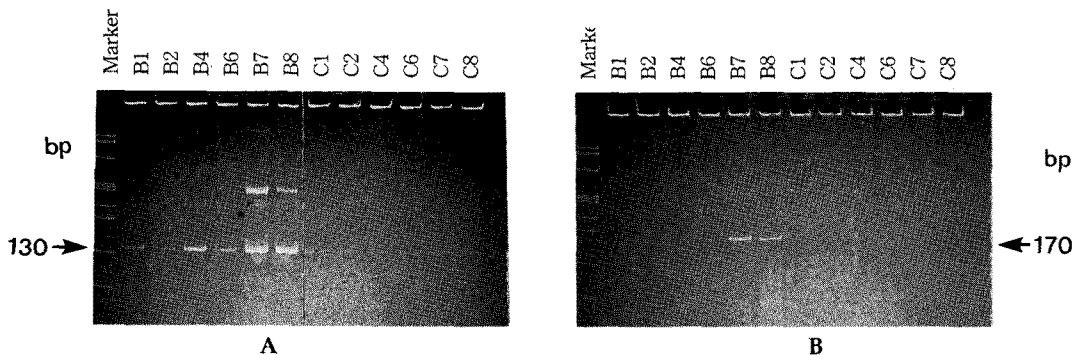


Fig.3. Detection of the alphoid X and Y repeat loci on 12% polyacrylamide gel analysis after whole genome amplification PCR. A: X-specific PCR, B: Y-specific PCR, B1-B8: blstomers, C1-C8: control, Marker: \emptyset X 174.

Table 1. Clinical preimplantation diagnosis at the Cheil General Hospital

Disease	No. of blastomeres	Results		No. of embryos transferred
		♂	♀	
DMD*	12	7	5	4
DMD	6**	2	4	4
BMD (deletion 45-47)	9	3	6	1
		exon 45(+): 1 (-): 2		
DMD*	10	6	4	4

*: not identified of mutant gene, **: frozen-thawed embryos

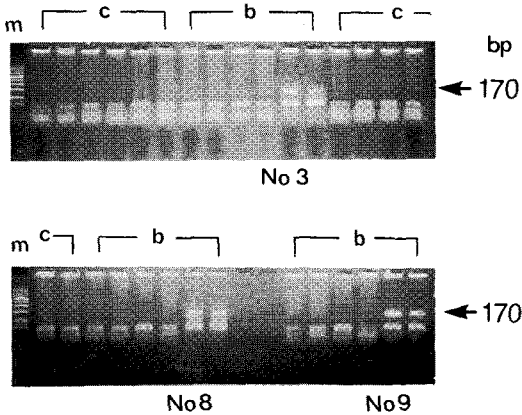


Fig.4. 2% metaphor gel electrophoretic analysis of the amplified alpha10 Y-repeat fragments from biopsied single blastomeres by PEP-PCR. m: 100bp ladder, b: blastomere, c: control, No 3, 8, 9: male.

전자 결실여부를 확인하기 위한 2-rounded PCR 결과는 3개중 1개에서만 dystrophin 유전자의 엑손 45가 존재하여 정상임을 알 수 있었고 나머지 2개는 결실 되었음을 확인할 수 있었다(Fig.5). 따라서 dystrophin 유전자 결실이 확인되지 않은 듀센 유형 가계의 보인자 여성은 근이양증 환아가 될 가능성이 높은 남아를 피하고 여아로 판명된 수정란을 선택하여 모체의 자궁내에 이식하였으며, 엑손 45-47 결실의 보인자 여성은 남아로 판명된 3개의 수정란중 엑손 45 유전자가 존재하는 1개의 건강한 수정란을 선택하여 모체의 자궁내에 이식하였다(Table 1).

고 찰

착상전 유전자 진단은 유전병 치료가 불가능한 현 상태에서 착상 이전에 건강한 수정란을 선택하여 모체의 자궁내에 이식하게 되므로 유전병 가계의 보인자 여성들은 환자의 임신을 피할 수 있게 되었다. 따라서 유전병 환자가 같은 가

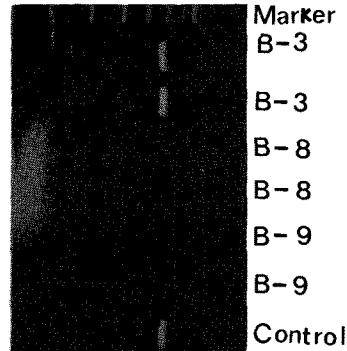


Fig.5. PCR results for dystrophin gene in biopsied single blastomere. The whole genome of a single cell was pre-amplified and analysed for the presence of exon 45 locus. Marker: 100bp ladder, Exon 45 locus was existent only in B-3 embryo.

계에 출생하는 것을 사전에 예방할 수 있는 첨단 진단 방법이라 할 수 있다. 그러나 많은 연구 단계를 필요로 하는 이 진단 방법은 X-연관 열성 유전질환에서 유전자가 밝혀지지 않았거나, 유전자 분석이 불가능해서 성을 구별하여(gender determination) 정상 및 보인자 여아의 수정란을 선택해야 되는 경우와 비교적 유전병의 발생빈도가 높은 질환(Cystic fibrosis, Muscular dystrophy, Tay-sachs disease, Lesch-Nyhan disease, etc)에 제한적으로 적용되고 있다. 또한 기존의 PCR이나 FISH 방법은 동시에 여러개의 목표 유전자를 분석할 수 없는 문제점이 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 random oligomer를 이용한 PEP-PCR 방법이 Zang (1992) 등에 의해 처음 개발, 보고되었다. 이 방법은 한 개의 정자에 미량 포함되어 있는 게놈을 먼저 증폭시켜 충분한 생성물을 얻은 후 X와 Y의 특이 유전자 부위를 각각 증폭하여 확인하는 방법으로서 5-10pg의 DNA를 포함하고 있는 단일세포의 유전자 진단에 매우 적합한 실험 방법이라 할 수 있다. 저자들은 이러한 방법을 응용하여 수정

란의 4-8세포기 상태에서 핵이 존재하는 단일 할구를 분리하여 원하는 여러개의 유전자 진단을 동시에 수행할 수 있었다. 이와같은 진단 방법은 충분한 주형을 얻을 수 있기 때문에 단일 할구에서 성의 구별과 유전자 진단은 물론 동시에 여러 유전자 결손을 찾아내는데 용이하다. 최근 Liu 등(1995)에 의하면 dystrophin 유전자 엑손 3-18이 결실된 환자가 있는 가계의 보인자를 대상으로 엑손 17에 대한 착상전 진단을 시행하여 정상 여아의 임신 성공이 보고된 바 있다. 그러나 현재까지 건강한 남아의 임신과 출생 예가 없으므로 본 실험의 엑손 45의 결실 여부에 대한 유전자 진단의 성공은 앞으로 이러한 유전질환의 여러 엑손 결실에 대한 착상전 진단에 적용될 것이며 그 가능성은 매우 높을 것으로 생각된다. Kristleifur 등(1994)의 연구결과에서는 단일 세포(amniocyte, chorionic villi cell, blastomere)를 이용한 PEP-PCR의 증폭율을 93%로 보고하였으나 본 실험에서는 37개의 할구가 모두 증폭되어 100%의 높은 증폭율을 보여주었으며 이중, 삼중 실험을 반복할 수 있어 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 충분한 게놈 DNA를 얻을 수 있는, PEP을 이용한 착상전 진단은 추후 nested-PCR을 수행하지 않고도 한번의 PCR로서 현재까지 진단이 어려운 유전자 분석 및 연관 분석, 직접염기서열 결정 등으로 많은 유전병의 진단이 가능하게 될 것이다.

결 론

DMD 2 가계와 BMD 1 가계의 보인자를 대상으로 3회의 IVF를 시행하여 37개의 할구를 얻었다. 성의 구별 및 유전자 진단을 수행하기 위하여 PEP-PCR 방법을 적용하였다. 그 결과 DMD 2 가계에서는 환아가 될 남아를 피하고 여아로 판명된 수정란을 이식하였으며, dystrophin 유전자의 엑손 45-47의 결실 가계에서는 3개의 수정란이 남아로 판명되었지만 그중 정상 dystrophin 유전자를 갖고 있는 1개의 수정란만을 이식하였다. 이와 같이 착상전 유전자 진단 방법에 적용된 PEP-PCR 방법은 한개의 할구로 여러부위의 유전자를 분석할 수 있으며 반복실험으로 결과의 신뢰도와 정확도를 얻을 수 있어 착상전 유전자 진단에 매우 적합한 실험 방법으로 적용되었음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Chong SS, Kristjansson K, Cota J, Handyside AH, Hughes MR: Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences. *Hum Mol Genet* 1993, 2, 1187-1191.
- Delhanty JDA, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GHG, Pieters HEC, Winston RML: Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos, during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation(FISH). *Hum Mol Genet* 1993, 2, 1183-1185.
- Grifo JA, Tang YX, Cohen J, Gilbert F, Sanyal MK, Rosenwaks Z: Pregnancy after embryo biopsy and coamplification of DNA from X and Y chromosomes. *J Am Med Assoc* 1992, 268, 727-729.
- Handyside AH: Diagnosis of inherited disease before implantation. *Reprod Med Rev* 1993, 2, 51-61.
- Handyside AH, Konotogianni EH, Hardy K, Winston, RML: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990, 344, 768-770.
- Kristleifur K, Samuel SC, Ignatia B, Van den Veyver, Stephanie S, Michael CS, Hughes MR: Preimplantation single cell analyses of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nature Genetics* 1994, 6,19-23.
- Liebaers I, Sermon K, Lissens W, Liu J, Devroey P, Tarlatzis B, Van Steirteghem AC: Preimplantation diagnosis. *Hum Reprod* 1992, 7(Suppl. 1), 107-110.
- Liu J, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I: Amplification of X- and Y- chromosome-specific regions from single human blastomeres by polymerase chain reaction for sexing of preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1994, 9, 716-720.
- Liu J, Lissens W, Van Broeckhoven C, Lofgren A,

- Camus M, Liebaers I, Van Steirteghem AC: Normal pregnancy after preimplantation DNA diagnosis of a dystrophin gene deletion. *Prenatal Diagnosis* 1995, 15, 351-358.
- Winston RML, Handyside AH: New challenges in human in vitro fertilization. *Science* 1993, 260, 932-936.
- Zhang L, Xiangfeng C, Karin S, Rene H, William N: Whole genome amplification from a single cell : Implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci* 1992, 89, 5847-5851
-