

국산 Fluorescence in Situ Hybridization 시스템을 이용한 다양한 검체에서의 염색체 분석

서울대학교 의과대학 산부인과학교실, *서울대학교 의학연구원 인구의학연구소,

함춘여성클리닉, *서울대학교 정밀기계설계공동연구소, ****바이오메드 랩

문신용 · 방명걸* · 오선경* · 류범용* · 황도영** · 정병준 · 최 진 · 손 철
장준근*** · 김종원**** · 김석현 · 최영민

Chromosome Analysis in Clinical Samples by Chromosome Diagnostic System Using Fluorescence in Situ Hybridization

Shin Yong Moon, Myung-Geol Pang*, Sun Kyung Oh*, Buom Yong Ryu*,
Doyeong Hwang**, Byeong Jun Jung, Jin Choe, Cheri Sohn, Jun Keun Chang***,
Jong Won Kim****, Seok Hyun Kim and Young-Min Choi

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University

**Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center,*

*Seoul National University, **Ham Choom Women's Clinic, ***Institute of*

*Advanced Machinery and Design, Seoul National University, ****Biomed Lab*

= Abstract =

Fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques allow the enumeration of chromosome abnormalities and form a great potential for many clinical applications. In order to produce quantitative and reproducible results, expensive tools such as a cooled CCD camera and a computer software are required.

We have developed a Chromosome Image Processing System (Chips) using FISH that allows the detection and mapping of the genetic aberrations.

The aim of our study, therefore, is to evaluate the capabilities of our original system using a black-and-white video camera.

As a model system, three repetitive DNA probes (D18Z1, DXZ1, and DYZ3) were hybridized to variety different clinical samples such as human metaphase spreads and interphase nuclei obtained from uncultured peripheral blood lymphocytes, uncultured amniocytes, and germ cells.

The visualization of the FISH signals was performed using our system for image acquisition and pseudocoloring. FISH images were obtained by combining images from each of probes and DAPI counterstain captured separately.

Using our original system, the aberrations of single or multiple chromosomes in a single hybridization experiment using chromosomes and interphase nuclei from a variety of cell types, including lymphocytes, amniocytes, sperm, and biopsied blastomeres, were enabled to evaluate. There were no differences in the image quality in accordance with FISH method, fluorochrome

* 본 연구는 보건복지부에서 주관한 '96년도 선도기술 의료공학기술개발사업의 지원 (HMP-96-G-1-11)에 의하여 이루어진 것임.

types, or different clinical samples. Always bright signals were detected using our system. Our system also yielded constant results.

Our Chips would permit a level of performance of FISH analysis on metaphase chromosomes and interphase nuclei with unparalleled capabilities. Thus, it would be useful for clinical purposes.

Key Words: Fluorescence in situ hybridization, Chromosome Image Processing System, Chips, Interphase nucleus, Amniocyte, Blastomere, Sperm

서 론

세포유전학적 검사는 염색체 수 및 구조 이상을 진단하는 귀중한 도구이다. 그러나 세포를 배양하여 세포분열 중기의 염색체에서만 핵형분석을 시행할 수 있으므로 신속한 결과를 얻기가 힘들며 30~100개의 적은 핵형정보만이 임상적으로 유용하며 미세결손과 같은 이상은 진단할 수 없다는 단점이 있다.

최근 개발된 Fluorescence In Situ Hybridization (이하 FISH로 약함)은 새로운 분자·세포유전학적 기법으로 특정 DNA 배열을 표적 DNA와 hybridization을 시행한 후 형광으로 그 특정 DNA 배열에 관한 정보를 얻어 염색체 이상을 신속하게 진단할 수 있는 기법이다 (Kearns and Pearson, 1994). 이 기술은 세포분열 중기의 염색체는 물론 세포분열 간기의 핵에서도 시행할 수 있어 추가적인 배양이 필요없고 많은 세포를 분석하여 염색체 이상에 관한 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다 (Ried *et al.*, 1992).

따라서 FISH의 적용범위는 일반 세포에 국한되지 아니하고 정자나 난자와 같은 생식세포 및 조직검체에서도 적용할 수 있다 (Kearns *et al.*, 1996). 특히 정자나 난자와 같은 세포에서의 세포유전학적 검사는 매우 어려운 것으로 알려져 있으며 이러한 검체를 이용하여 세포유전학적 검사를 시행하려면 상당한 기술이 있어야만 한다.

지금까지 FISH 방법의 분석은 형광현미경을 통하여 직접 눈으로 관찰하는 방법으로 주로 이루어져 왔다. 그러나 이러한 방법은 주관적인 면이 강하기 때문에 위음성 결과를 초래할 가능성이 크다.

최근에 들어 FISH 검사시 형광으로 나타나는 신호를 FISH 프로그램으로 탐지하는 경향이 늘어나고 있는데 FISH 프로그램을 이용한 분석시 우리가 원하는 신호만을 받기 위해서는 FISH 방

법을 잘 시행할 수 있어야 하며 이러한 과정이 후에 있을 분석 과정에 오류를 범할 가능성을 최소화하여 정확한 결과를 얻는데 기여하여야 한다.

그러나 FISH를 시행하기 위하여 고감도의 영상을 획득할 수 있고 정확히 영상을 분석할 수 있는 영상획득 및 영상처리 장치가 필요하다. 이러한 장치는 고가이며 국산화 장치가 없어 외제에 의존하여 시행되고 있으며 이러한 제약에 의해 FISH의 높은 민감도 및 폭 넓은 응용범위에도 불구하고 국내에서의 FISH의 이용은 제한적이다.

본 연구의 목적은 본 연구진에 의해 개발중인 국산 FISH 시스템을 이용하여 직접법 및 간접법의 FISH를 다양한 검체에서 시행한 후 본 시스템의 성능을 시험하고자 하는 것이었다.

재료 및 방법

1. 검체의 준비

1) 세포분열 중기 염색체 준비

말초혈액을 채취한 즉시 0.2~0.4 ml의 heparin (1000 unit/ml)이 있는 용기에 담아 잘 섞어준 후 10 ml의 배양액에 각각 8~10방울 떨어뜨려 혼합하고 37°C 5% CO₂, 배양기에서 72시간 배양하였다.

배양액은 RPMI (Gibco)와 Ham's F-10 (Gibco)에 나누어 배양에 사용하였는데, RPMI의 경우 우혈청 (Gibco) 10%, 항생제 (penicillin G 100 unit/ml, streptomycin 100 µg/ml)를 첨가하고 Ham's F-10의 경우 우혈청 20%와 항생제를 첨가하여 사용하였다.

배양종료 2시간 전에 colcemid를 0.2 µg/ml 농도로 첨가하여 세포분열을 유사분열 중기에 정지시킨 후, 650 × g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 10 ml의 37°C 저장액 (0.075M KCl)으로 섞은 후 20분간 정치시켰다. 다시 원심분리를 하고 Carnoy 고정액 (methanol: glacial acetic acid = 3 : 1)으로 3회 고정하고 슬라이드를 제

작하였다.

2) 비배양 양수세포 및 혈액세포의 준비

양수 혹은 혈액 2 ml을 취하여 원심분리한 후 침전물을 동량의 phosphate buffered saline (이하 PBS로 약함)용액과 혼합하여 다시 원심분리하였다. 침전물을 37°C 저장액과 혼합하여 20분간 정지한 다음 3회 고정시키고 원심분리하여 침전물을 얻은 후 슬라이드를 제작하였다.

3) 정자의 준비

방 (1997)의 방법에 의거 시행하였다. 즉 1 ml의 정액을 4 ml의 PBS로 희석하여 650 × g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 정자침전물에 6 mM ethylenediaminetetra-acetic acid가 함유된 PBS 1 ml로 희석하고 잘 섞은 후 재원심분리하였다. 다시 상층액을 제거하고 37°C의 2 mM dithiothreitol이 함유된 PBS 1 ml로 희석하고 37°C 배양기에서 45분간 배양하였다. 배양 후 PBS 2 ml를 첨가하고 원심분리하였다. 침전물의 양을 고려하여 적당량의 고정액을 첨가하였으며 상온에서 5분간 정지시킨 후 도말법에 의해 슬라이드를 제작하였다.

4) 생검 분할구의 준비

체외수정후 비정상적으로 수정 (다정자침입에 의한 배아)된 6~8세포기의 배아로부터 1개의 할구를 미세조작에 의해 생검하였다. 생검은 zona drilling방법에 의해 시행하였다. 먼저 acid Tyrode's solution으로 배아 투명대의 구멍을 뚫고 1개의 할구를 흡입하여 신선한 배양액으로 옮겼다. 분리된 할구는 저장액처리를 거친 후 슬라이드 위의 1~2 µl 0.01 N HCL/0.1% Tween 20 solution 소적에 옮긴 후 슬라이드를 공기중에서 건조시켰다.

2. FISH

사용한 DNA probe는 18번 염색체, X 염색체 및 Y 염색체에 대한 D18Z1, DXZ1 및 DYZ3였다. D18Z1은 biotin으로 label 하였거나 혹은 fluorochrome-dUTP로 label된 상품 (Vysis)을 이용하였고 DXZ1과 DYZ3은 fluorochrome-dUTP로 직접 label된 상품 (Vysis)을 이용하였다.

FISH 방법은 방 (1997)의 방법에 의거 시행하였다. 즉 20 ng의 DNA probe (1 µl), formamide 6 µl, 20×SSC 1 µl 및 증류수 2 µl를 섞어 총 10 µl의 probe mix를 제조하였다. 제조된 probe mix를 42°C로 미리 예열된 슬라이드에 떨어뜨리고 22×

22 mm의 coverslip을 덮고 rubber cement로 coverslip을 봉하였다. 이 슬라이드를 80°C에서 5분간 열처리 (denaturation)한 후 42°C 배양기에서 2시간 hybridization 하였다.

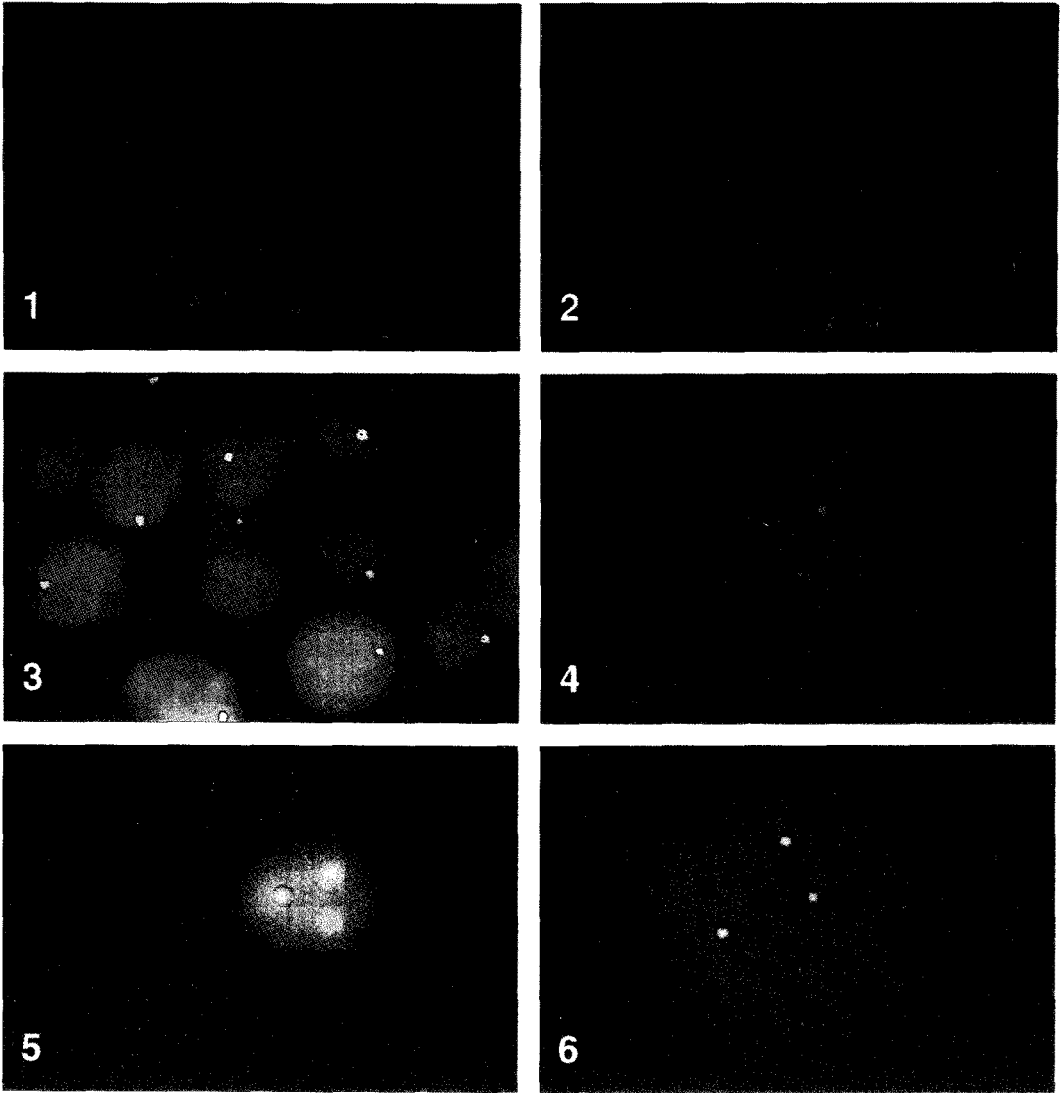
Biotin으로 label된 D18Z1로 hybridization된 슬라이드는 rubber cement를 제거한 후 37°C 50% formamide/2×SSC (pH 7.0) 용액에서 5분씩 3회 세척하고 상온의 4×SSC/0.05% Tween-20 용액에서 5분간 세척하였다. 이후 100 µl의 4×SSC/5% 탈지분유 용액을 슬라이드에 첨가하고 10분간 배양하였으며 4×SSC/0.05% Tween-20 용액에서 5분간 세척하였다. 다시 100 µl의 Avidin-FITC 4×SSC/5% 탈지분유 용액 (Avidin-FITC 최종농도 = 5 µg/1000 µl)을 슬라이드에 첨가한 후 30분간 어두운 상태에서 배양하였으며 4×SSC/0.05% Tween-20 용액에서 5분씩 3회 세척하였다. 100 µl의 anti-Avidin 4×SSC/5% 탈지분유 용액 (anti-Avidin 최종농도 = 5 µg/1000 µl)을 슬라이드에 첨가한 후 30분간 어두운 상태에서 배양하였으며 4×SSC/0.05% Tween-20 용액에서 5분씩 3회 세척하였다. 마지막으로 100 µl의 Avidin-FITC 4×SSC/5% 탈지분유 용액 (Avidin-FITC 최종농도 = 5 µg/1000 µl)을 슬라이드에 첨가한 후 30분간 어두운 상태에서 배양하였으며 4×SSC/0.05% Tween-20 용액에서 5분씩 3회 세척하였다.

Fluorochrome-dUTP로 label된 D18Z1, DXZ1 및 DYZ3으로 hybridization된 슬라이드는 rubber cement를 제거한 후 37°C 50% formamide/2×SSC (pH 7.0) 용액에서 5분씩 3회 세척하고 37°C 2×SSC/0.1% NP-40 용액에서 5분간 세척하였다.

세척이 끝난 슬라이드 위에 13 µl의 antifade medium (0.6 µg 4,6-diamidino-2-phenyl-lindole/ml)을 떨어뜨리고 22×40 mm의 coverslip을 덮은 후 본 연구진에 의해 개발중인 시스템을 이용하여 형광신호를 분석하였다.

결 과

본 시스템을 이용하여 FISH의 영상획득을 시행한 결과 그림 1, 2, 3, 4, 5, 및 6의 영상을 얻었다. 각각의 영상은 일반 흑백카메라로 각각 신호의 영상을 획득한 후 중첩시켜 얻은 pseudocolor image 이다.



FISH images captured by our system using direct fluorochrome-dUTP labeled DNA probes (Fig. 1, 3, 4, 5, and 6) and biotin labeled DNA probe (Fig. 2). These images were obtained by combining images from each of probes and DAPI counterstain captured separately

Fig. 1. DXZ1 (green fluorescence) and DYZ1 (red fluorescence) two-color probes hybridized to a normal male metaphase and counterstained with DAPI.

Fig. 2. D18Z1 (green fluorescence) hybridized to a normal metaphase.

Fig. 3. DXZ1 (red fluorescence) hybridized to uncultured male interphase lymphocyte nuclei.

Fig. 4. Two-color FISH with DXZ1 (red fluorescence) and DYZ1 (blue fluorescence) to an uncultured amniocyte.

Fig. 5. Three-color FISH with DXZ1 (green fluorescence), DYZ1 (red fluorescence) and D18Z1 (blue fluorescence) to a sperm cell. Note the 2 sex chromosome signals and one blue signal indicating sex chromosome disomy.

Fig. 6. D18Z1 hybridized to a biopsied blastomere nucleus. Three red signals indicate three copies of chromosome 18 (trisomy 18).

1. 세포분열 중기 염색체에서의 결과

그림 1은 X와 Y 염색체에 대한 DNA probe를

정상남성의 세포분열 중기 염색체에 hybridization

시킨 후 획득한 영상으로 X와 Y에 대한 신호가

X와 Y 염색체에 각각 발현된 것을 보여주고

있다. 그림 2는 염색체 18번에 대한 DNA probe를 정상인의 세포분열 중기 염색체에 hybridization 시킨 후 획득한 영상이다.

2. 세포분열 간기 세포에서의 결과

그림 3은 X 염색체에 대한 DNA probe를 정상 남성의 비배양 혈액 세포분열 간기세포에 hybridization 시킨 후 획득한 영상으로 X에 대한 신호가 각각의 세포내에 1개씩 관찰되었다. 그림 4는 X와 Y 염색체에 대한 DNA probe를 비배양 양수세포에 hybridization 시킨 후 획득한 영상으로 X와 Y에 대한 신호가 양수세포내에 발현되었다. 그림 5는 탈응축 시킨 정자에 성염색체 및 18번 염색체에 대한 DNA probe로 hybridization 시킨 후 획득한 영상으로 XY에 대한 각각의 신호와 1개의 18번 염색체에 대한 신호를 보이는 성염색체를 부가적으로 1개 더 함유한 이염색체 (disomy) 정자 영상이다. 이러한 정자가 정상적인 23, X 난자와 수정이 된다면 47, XXY (Klinefelter's syndrome)의 아기가 태어나게 된다. 그림 6은 체외수정 후 2개의 정자가 침입된 배아를 2일간 추가배양하여 생검된 1개의 분할구에서 18번 염색체에 대한 DNA probe로 hybridization 시킨 후 획득한 영상으로 18번 염색체를 1개 더 함유한 분할구의 영상이다 (trisomy 18). 이 부가적인 18번은 정자에서 유래된 것이다.

3. 직접법과 간접법의 비교

그림 1은 X와 Y 염색체에 대한 fluorochrome-dUTP labeled DNA probe를 세포분열 중기 염색체에 hybridization 시킨 후 획득한 영상으로 뚜렷한 신호가 X와 Y 염색체내에 강하게 발현된 것을 보여주고 있으며, 그림 2는 염색체 18번에 대한 biotin-labeled DNA probe를 정상인의 세포분열 중기 염색체에 hybridization 시킨 후 간접법에 의해 immunocytochemistry에 의해 녹색형광을 발현시킨 후 획득한 영상이다.

FISH를 직접법으로 시행하건 혹은 간접법으로 시행하건 잡음이 제거된 고감도의 동일한 영상을 얻을 수 있었으며, 형광색소에 따라서 획득영상의 차이를 보이지 않았다. 검체의 종류, 형광색소의 종류 및 FISH 방법과 무관하게 강한 형광 신호를 가지는 염색체 혹은 세포의 영상을 얻을 수 있었다.

지금까지 염색체이상유무는 세포분열 중기 (metaphase)의 염색체에서 핵형을 분석함으로써 관찰하였으나 2주 이상의 기간이 소요되고 있다. 최근에는 분자생물학적 방법을 적용시킨 FISH방법이 개발되어 세포분열 간기 (interphase)의 핵에서도 염색체의 이상유무를 확인할 수 있다는 이점으로 인해 "Interphase cytogenetics"로서의 가능성이 제시되었다 (Wolfe and Herrington, 1997; Jalal and Law, 1997).

초기 FISH는 실험적 기법으로만 제한되었으나 최근에는 염색체 수 및 구조 이상 진단, 암 진단, 미세결손 증후군 (microdeletion syndrome) 진단, 성 판정, 유전자 mapping, 유전자 amplification, 표적염색체의 기원 검색 등 광범위한 분야에서 귀중한 정보를 제공하고 있다 (McNeil *et al.*, 1991; Trask, 1991).

한국형 FISH 프로그램의 개발 목표는 이를 이용하여 실제 임상에 적용하는 것이다. 따라서 보다 정확하고 편리하게 유용한 정보를 제공함으로써 환자의 치료와 처치에 기여하는 것이다. 그러기 위하여는 본 프로그램의 정확성을 확인하는 과정이 선행되어야 하며, 검체의 다양화를 통하여 본 프로그램의 사용영역을 넓히는 과정이 뒤따라야 한다.

검체의 다양성 뿐만 아니라 FISH의 여러가지 방법을 적용하여 봄으로써 프로그램의 민감도를 확인할 수 있었다. 목적을 위해 다양한 DNA probe의 사용 경험은 민감도의 확인과 그에 따른 영상의 다양성을 분석하는데 매우 중요한 요소로 판단된다.

본 연구결과, FISH를 직접법으로 시행하건 혹은 간접법으로 시행하건 잡음이 제거된 고감도의 동일한 영상을 얻을 수 있었으며, 형광색소에 따라서 획득영상의 차이를 보이지 않았다. 검체의 종류, 형광색소의 종류 및 FISH 방법과 무관하게 강한 형광 신호를 가지는 염색체 혹은 세포의 영상을 얻을 수 있었으므로 본 시스템의 임상적 응용이 가능한 것으로 사료된다.

본 연구는 FISH를 이용한 염색체 검진 시스템을 다양한 세포에 적용하는데 있었다. 그러나 본 연구에서는 중앙세포나 병리조직을 이용한 FISH 분석은 시행하지 않았다. 이미 외국에서 수입되

고 있는 고가의 염색체 검진 장치를 이용하여 이 분야의 질환검진에 응용되고 있는 실정므로 본 연구진에 의해 국산화하고자 하는 염색체 검진 시스템은 타 질환의 검진에도 충분히 이용 가능할 것으로 예상된다. 또한 개발하고자 하는 검진 시스템을 저렴한 시스템으로 시판될 예정이므로 국내에서 수입 대체효과를 가져올 것으로 예상되며, 저렴한 첨단 진단 의료기기의 공급으로 국민 복지 향상에 기여할 것으로 사료된다. 더 나아가 수출에 대한 기대도 높으며, 현재 유전공학 혹은 분자생물학적 연구가 점진적으로 의학계에 활용되고 있는 실정에서 이러한 진단 의료기기가 보편화될 경우, 이 분야 연구가 활성화될 것으로 예상된다. 본 연구 개발 결과로 예상되는 염색체 검진 시스템의 국산화는 국산 의료기기 산업에도 폭넓은 영향이 기대된다.

결 론

본 연구의 목적은 본 연구진에 의해 개발중인 국산 FISH 시스템을 이용하여 직접법 및 간접법의 FISH를 다양한 검체에서 시행한 후 본 시스템의 임상적 적용성 성능을 검토하고자 하는 것이었다.

FISH를 직접법으로 시행하건 혹은 간접법으로 시행하건 잡음이 제거된 고감도의 동일한 영상을 얻을 수 있었으며, 형광색소에 따라서 획득영상의 차이를 보이지 않았다. 검체의 종류, 형광색소의 종류 및 FISH 방법과 무관하게 강한 형광 signal을 가지는 염색체 혹은 세포의 영상을 얻을 수 있었다.

그러므로 본 연구진에 의해 개발된 국산 FISH 시스템은 임상적 유전진단 및 기초연구에 훌륭한 도구로 사료된다.

인 용 문 헌

Jalal SM, Law ME: Detection of newborn aneu-

- ploidy by interphase fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc* 1997, 72, 705-710.
- Kearns WG, Hoegerman SF, Pang MG, Zackowski JL: Chromosomes of human spermatocytes, sperm and the male pronucleus. In Acosta AA, Kruger TF, eds., *Human spermatozoa in assisted reproduction*, New York: The Parthenon Publishing Group, USA, 1996, pp 333-343.
- Kearns WG, Pearson PL: Fluorescence in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. In Choo KHA, ed., *Methods in molecular biology*, New York: Humana Press Inc, USA, 1994, pp 15-22.
- McNeil JA, Johnson CV, Carter KC, Singer RH, Lawrence JB: Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genet Anal Tech Appl* 1991, 8, 41-58.
- 방명걸: Fluorescence in situ hybridization 시행을 위한 인간정자 탈응축법의 적정화. 대한 불임학회지 1997, 24, 369-375.
- Reid T, Landes G, Dackowski W, Klinger K, Ward DC: Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum Mol Genet* 1992, 1, 307-313.
- Trask BJ: Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 1991, 7, 149-154.
- Wolfe KQ, Herrington CS: Interphase cytogenetics and pathology: a tool for diagnosis and research. *J Pathol* 1997, 181, 359-361.