

착상전 배아의 분리된 할구에서 중기염색체 상을 획득하기 위한 효율적인 방법의 개발에 대한 연구: 미세소관 형성 저해제의 효과

삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 성균관대학교 의과대학 산부인과학교실²

임천규¹ · 민동미¹ · 이형송¹ · 김진영² · 궁미경² · 강인수² · 전진현¹

Development of an Efficient Method for Obtaining Metaphase Chromosomes in Individual Blastomeres of Mouse and Human Preimplantation Embryos: Effect of Microtubule Depolymerizing Agents

Chun Kyu Lim¹, Dong Mi Min¹, Hyoung-Song Lee¹, Jin Young Kim²,
Mi Kyoung Koong², Inn Soo Kang², Jin Hyun Jun¹

¹Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, ²Department of Obstetrics and Gynecology,
Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center, Sungkyunkwan University
School of Medicine, Seoul, Korea

Objectives: The development of an useful method for obtaining metaphase chromosomes from a biopsied blastomere would allow differentiation between embryos with balanced and normal chromosome complements in the preimplantation genetic diagnosis for chromosomal translocations. This study was performed to evaluate the effects of microtubule depolymerizing agents (MTDAs) on the blastomeres of mouse and human preimplantation embryos, and to establish an effective method for obtaining metaphase chromosomes of biopsied blastomeres in human early embryos.

Materials and Methods: Early embryos (2-4 cell stage) from superovulated mice (ICR strain) were collected and treated with single or mixture MTDAs, such as vinblastine, nocodazole and colcemid. After the treatment of MTDAs for 16 hours, the metaphase acquisition (MA) rates were evaluated by the observation of chromosome status with bis-benzimide or DAPI staining. The optimal condition from the above experiment was applied to human embryos, which were developed from abnormal fertilization (3-pronuclei). Fluorescence in-situ hybridization (FISH) with whole chromosome probes was conducted on the human metaphase chromosomes by the MTDAs.

Results: In mouse embryos, the effective concentrations of each MTDAs for obtaining metaphase chromosomes were 1.0 μ M of vinblastine (20.3%), 5.0 μ M of nocodazole (28.1%) and 1.0 μ M colcemid (55.6%), respectively. The highest MA rate (91.2%) in the mouse embryos was obtained by a mixture of vinblastine (1.0 μ M) and nocodazole (1.0 μ M). In the human embryos, the metaphase chromosomes of blastomeres were obtained in 44 of 113 blastomeres (38.9%) by treatment of the mixture of vinblastine and nocodazole. FISH signals of the metaphase chromosomes were successfully

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 삼성제일병원, 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7590, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: junjh55@hanmail.net
본 연구는 제일의료장학재단 연구비 지원으로 수행되었음.

observed in human individual blastomeres.

Conclusions: The treatment of a mixture MTDAs for obtaining metaphase chromosomes was an efficient method, and the MA rate was above 90% in the mouse embryos. However, only a relatively small proportions of the blastomeres yielded metaphase chromosomes by the MTDAs in the human embryos. The inconsistent effects of MTDAs may be related to the variation of different species and the poor developmental potency of abnormally fertilized human embryos. We should develop more reliable and efficient methods for obtaining the metaphase chromosomes in the biopsied blastomeres of human preimplantation embryos.

Key Words: Preimplantation genetic diagnosis, Metaphase chromosomes, Microtubule depolymerizing agent (MTDA), Fluorescence in-situ hybridization (FISH)

염색체의 균형 전좌 또는 역위와 같은 염색체의 구조적 이상은 인간에게서 흔히 관찰되는 염색체의 이상이다. 이러한 염색체의 구조적 이상을 갖는 보인자들은 감수분열을 통한 배우자 형성과정의 감수분열에서 매우 적은 수의 정상적인 배우자를 형성하고, 다양한 염색체 변이를 갖는 많은 수의 비정상적인 배우자를 형성하게 된다. 이러한 비정상적인 염색체를 갖는 배우자인, 정자나 난자에서 유래한 배아는 정상적인 발생과정을 진행하지 못하여 임신 초기에 자연유산되는 확률이 매우 높다.¹⁻³

1990년대 초에 형광직접조합법 (fluorescence in-situ hybridization: FISH)이 착상전 유전진단에 도입되어, 초기에는 X-염색체 연관 유전병의 방지를 위한 성감별에 주로 이용되었었다.⁴ 최근에는 FISH를 이용한 염색체의 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌의 보인자에서 정상 또는 balanced 염색체 조성을 갖는 배아를 선별하여 이식하는 착상전 유전진단이 시행되어, 염색체 전좌의 보인자에서 임신율을 높이고 자연유산율을 감소시키는데 효과적으로 적용되고 있으며,⁵⁻⁷ 본 연구진도 착상전 유전진단의 성공적인 임상 적용을 보고한 바 있다.^{8,9} Iwason 등은 염색체의 구조적 이상을 갖는 보인자들에게서 얻어진 배아의 73%가 mosaic이거나 chaotic 형태의 염색체 구성을 갖는 것으로 보고하였다.¹⁰ 최근에는, 다양한 probe를 이용한 형광직접조합법을 통하여 배아의 배수성 (polyploidy)과 이수성 (aneuploidy), 반수성 (haploidy)과 단수성 (monosomy), 그리고 배아의 모든 할구가 분석 가능할 경우에는 mosaicism의 유무까지 구분할 수 있다.^{11,12} 그러나 형광직접조합법은 탐침자 (probe)에 특이적인 염색체에 대한 정보만을

얻을 수 있어 전체 염색체에 대한 분석이 불가능하고, 간기 (interphase)의 핵상에서 실시되기 때문에 정상과 보인자의 핵형을 구분할 수 없다는 제한을 가지고 있다.

염색체의 구조적 이상으로 기인한 착상전 유전진단에서 정상과 보인자 염색체 조성을 구분하기 위해서는 배아에서 분리한 할구로부터 효과적으로 중기염색체 상을 획득해야만 한다. 현재까지 보고된 인간의 할구에서 중기염색체를 획득할 수 있는 가장 효율적인 방법은 제핵된 포유류의 난자 또는 수정란에 분리한 배아의 할구를 융합시키는 방법으로, Verlinsky 등은 이러한 융합 방법을 이용하여 91%의 할구에서 중기염색체를 획득하였다고 보고했다.^{13,14} 그러나 이와 같은 제핵 난자와 할구의 융합 방법을 이용하기 위해서는 제핵을 성공적으로 수행할 수 있는 숙달된 미세조작술과 고가의 세포융합기가 필수적이므로 실제적으로 이를 임상에 적용하기에는 많은 어려움이 있다.

따라서, 본 연구에서는 착상전 배아의 분리된 할구에서 중기염색체 상을 획득할 수 있는 경제적이고 효과적인 방법을 개발하고자, 일반적인 핵형 검사 및 세포주기 조절에 사용되고 있는 미세소관 형성 저해제 (microtubule depolymerizing agent: MTDA)를 생쥐 및 인간의 착상전 배아의 할구에 처리하여 그 효과를 관찰하였다. 이러한 연구를 통해 인간의 착상전 배아에서 분리한 할구의 중기염색체를 획득할 수 있는 효율적인 방법이 정립된다면, 염색체의 구조적 이상으로 기인한 착상전 유전진단에서 정상과 balanced 염색체 조성의 효율적인 구분이 가능할 것으로 생각된다.

연구 대상 및 방법

1. 생쥐 배아에 대한 미세소관 형성 저해제의 농도별 처리

생쥐 배아의 할구에서 중기염색체를 획득하기 위한 적정 농도를 결정하기 위해 과배란을 유도한 생쥐 (ICR strain)로부터 2-4 세포기의 배아를 회수하여 미세소관 형성 저해제를 농도별로 처리하였다. 핵이 뚜렷하게 관찰되는 배아만을 수확하여 bovine serum albumin (BSA)가 0.4% 첨가된 T6 배양액으로 4회 세척한 후, 미세소관 형성 저해제인 vinblastine, nocodazole, colcemid (Sigma)가 각각 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μM 첨가된 배양액에서 16시간 배양하였다. 또한, 생쥐 배아의 할구에서 중기염색체 상의 획득률을 높이기 위하여 미세소관 형성 저해제를 혼합하여 처리하였다. 생쥐 배아의 회수와 배양은 위와 동일한 방법으로 시행하였으며 vinblastine과 nocodazole, nocodazole과 colcemid, colcemid와 vinblastine, 그리고 세 가지의 미세소관 형성 저해제가 모두 첨가된 배양액에서 16시간 배양한 후 각 할구의 핵상을 관찰하여, 배아의 할구에서 중기염색체 상을 획득하기 위한 미세소관 형성 저해제의 최적 조건을 결정하였다.

2. 생쥐 배아의 할구에서 핵상의 관찰

생쥐 배아의 할구에서 핵상을 관찰하기 위하여 0.1% formaldehyde가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)에서 2시간 고정된 후, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 bis-benzimide (Sigma)가 첨가된 PBS에서 1시간 염색한 후 형광현미경 (Optiphot-2, Nikon)하에서 각 할구의 핵상을 관찰하였다. 일부의 배아에서는 모든 할구를 분리하여 각각의 할구에서 핵상을 관찰하였다. 투명대를 제거하기 위해 ZD-10TM (Vitrolife)을 처리하고, 각각의 할구들을 분리하기 위해 EB-10TM (Vitrolife) 배양액에서 5분간 배양한 후 미세 유리판을 이용하여 할구를 분리하였다. 분리된 할구들은 0.5% sodium citrate와 0.5% BSA가 첨가된 저장액에서 5분간 처리한 후, slide glass 위로 옮겨 미세 유리판을 이용하여 세포질을 터뜨리고 제거하였다. 이렇게 준비된 slide glass는 상온에서 완전히 건조시킨 후, methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 Carnoy's solution을 이용하여 고

정하였다. 고정된 할구의 핵상은 DAPI (125 ng/ml)로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 관찰한 핵상은 핵이 보이는 간기 (interphase), 핵막이 존재하지 않지만 염색체의 형태가 뚜렷하지 않은 PCC (pre-mature chromosome condensation)와 전형적인 염색체의 형태가 관찰되는 중기염색체 (metaphase chromosome)로 구분하였다. 중기염색체 획득률 (metaphase acquisition rate)은 관찰한 전체 할구 중에 중기염색체 상을 보이는 할구의 백분율로 나타내었다.

3. 인간 배아에 미세소관 형성 저해제의 처리 및 할구의 핵상 관찰

인간 배아의 할구에서 중기염색체를 획득하기 위하여 생쥐 배아를 이용한 실험에서 확인된 최적 조건의 미세소관 형성 저해제를 인간의 배아에 처리하였다. 본 연구에 사용한 인간의 배아는 체외수정 및 배아이식술에서 3개의 전핵 (pronucleus, PN)이 관찰된 비정상적인 수정란을 공여받아 사용하였다. 공여받은 인간의 3-PN 수정란은 G1.2 배양액 (Vitrolife)에서 48시간 동안 배양하여 6-8 세포기까지 발생시켰다. 이와 같은 인간 배아에 생쥐 배아를 이용한 실험에서 확인된 미세소관 형성 저해제의 최적 조건인 1 μM 의 vinblastine과 1 μM 의 nocodazole을 동시에 첨가하여 16시간 동안 배양하였다. 배양된 인간 배아는 생쥐 배아에서와 동일한 방법으로 할구를 분리하고 고정하였으며, 고정된 할구의 핵상은 DAPI로 염색하여 관찰하였다.

4. 인간 배아의 할구에서 획득된 중기염색체에 대한 형광직접조합법

위에서 기술한 생쥐 배아의 할구에서와 같은 방법으로 분리하고 고정된 할구의 핵은 상온에서 완전히 건조시킨 후, 0.01% pepsin (Sigma)이 첨가된 0.01 N의 HCl 용액으로 37°C에서 5분간 처리하여 잔여 세포질을 완전히 제거하였다. 증류수와 PBS로 세척한 후 1% paraformaldehyde 용액에서 10분간 고정한 후, PBS와 증류수로 세척하였다. 그리고 70%, 85%, 100% ethanol 용액으로 탈수시킨 후 완전히 건조시켰다. 이렇게 준비된 인간 배아 할구의 중기염색체에 whole chromosome probe (WCP) 7-spectrum green, centromeric probe (CEP) 7-spectrum orange, WCP

Table 1. Effects of microtubule depolymerizing agents on individual blastomeres of mouse early embryos

Treatments	Number of				
	Treated embryos	Examined blastomeres	Interphase nuclei	Premature chromosome condensations	Metaphase chromosomes
Vinblastine-0 μ M	16	123	117 (95.1)	0	6 (4.9) ^a
Vinblastine-0.1 μ M	17	61	1 (1.6)	48 (78.7)	12 (19.7) ^b
Vinblastine-0.5 μ M	17	62	0	52 (83.9)	10 (16.1) ^b
Vinblastine-1.0 μ M	17	64	1 (1.6)	50 (78.1)	13 (20.3) ^b
Vinblastine-5.0 μ M	17	62	0	57 (91.9)	5 (8.1)
Nocodazole-0 μ M	22	196	185 (94.4)	2 (1.0)	9 (4.6) ^c
Nocodazole-0.1 μ M	21	167	153 (91.6)	6 (3.6)	8 (4.8)
Nocodazole-0.5 μ M	22	92	24 (26.1)	48 (52.2)	20 (21.7) ^d
Nocodazole-1.0 μ M	23	88	7 (8.0)	66 (75.0)	15 (17.0) ^d
Nocodazole-5.0 μ M	23	89	9 (10.1)	55 (61.8)	25 (28.1) ^d
Colcemid-0 μ M	26	173	166 (96.0)	0	7 (4.0) ^e
Colcemid-0.1 μ M	26	59	23 (39.0)	18 (30.5)	18 (30.5) ^f
Colcemid-0.5 μ M	26	57	9 (15.8)	26 (45.6)	22 (38.6) ^f
Colcemid-1.0 μ M	25	54	2 (37.0)	22 (40.7)	30 (55.6) ^f
Colcemid-5.0 μ M	25	50	8 (16.0)	18 (36.0)	24 (48.0) ^f

Data in parentheses were percentages by the number of blastomeres. ^{a vs b, c vs d} $p < 0.05$, ^{e vs f} $p < 0.01$

Table 2. Effects of mixtures of microtubule depolymerizing agents on individual blastomeres of mouse early embryos

Treatments	Number of				
	Treated embryos	Examined blastomeres	Interphase nuclei	Premature chromosome condensations	Metaphase chromosomes
Control	43	385	373 (96.9)	0	12 (3.1) ^a
VIN + NOC	42	113	3 (2.7)	7 (6.2)	103 (91.2) ^b
VIN + COL	43	115	15 (13.0)	16 (13.9)	84 (73.0) ^b
NOC + COL	42	114	13 (11.4)	27 (23.7)	74 (64.9) ^b
VIN + NOC + COL	43	119	27 (22.7)	22 (18.5)	70 (58.8) ^b

VIN: vinblastine, NOC: nocodazole, COL: colcemid. Concentrations of each microtubule depolymerizing agents were 1.0 μ M, respectively. Data in parentheses were percentages by the number of blastomeres. ^{a vs b} $p < 0.01$

17-spectrun orange, CEP 17-spectrum green probe (Vysis) 등을 이용하여 형광직접조합법을 실시하였다. 혼합된 probe 혼합액을 준비된 증기염색체에 떨어뜨린 후 cover slip을 덮고, probe 혼합액의 건조를 막기 위하여 rubber cement로 밀봉하였다. 밀봉 후 75°C에서 5분간 denaturation시킨 후 37°C로 유지되는 습도가 유지되는 chamber에서 16시간 hybridiza-

tion시켰다. Hybridization 후 잔여 probe들은 50% formamide / 2X SSC, 2X SSC 용액, 42°C에서 10분씩 세척한 후, 125 ng/ml의 DAPI로 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

5. 통계적 분석

통계적인 분석은 ABstat (rel 6.54, Anderson-Bell

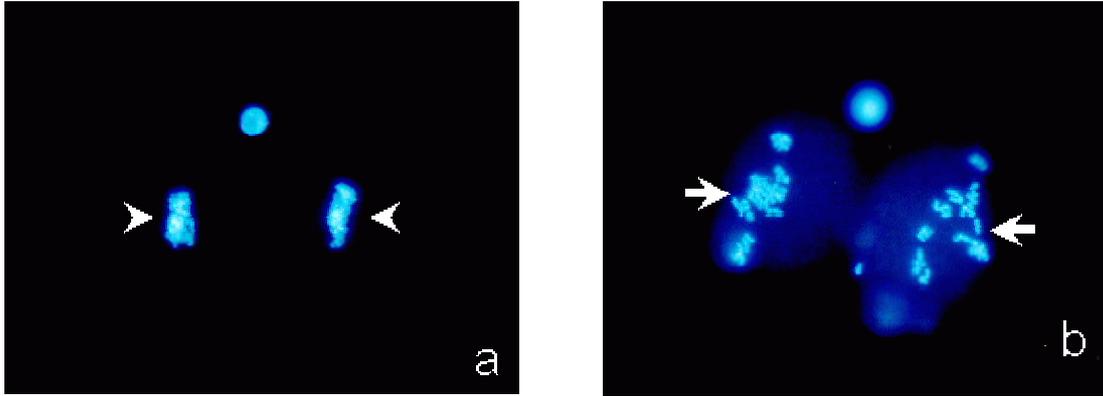


Figure 1. Bis-benzamide staining of the mouse early embryos after the treatments of microtubule depolymerizing agents (MTDAs). **(a)** Mouse embryos were cultured with 1.0 μM of vinblastine. White arrow heads indicate premature chromosome condensations. **(b)** Mouse embryos were cultured with a mixture of vinblastine (1.0 μM) and nocodazole (1.0 μM). White arrows indicate metaphase chromosomes. Original magnification $\times 200$.

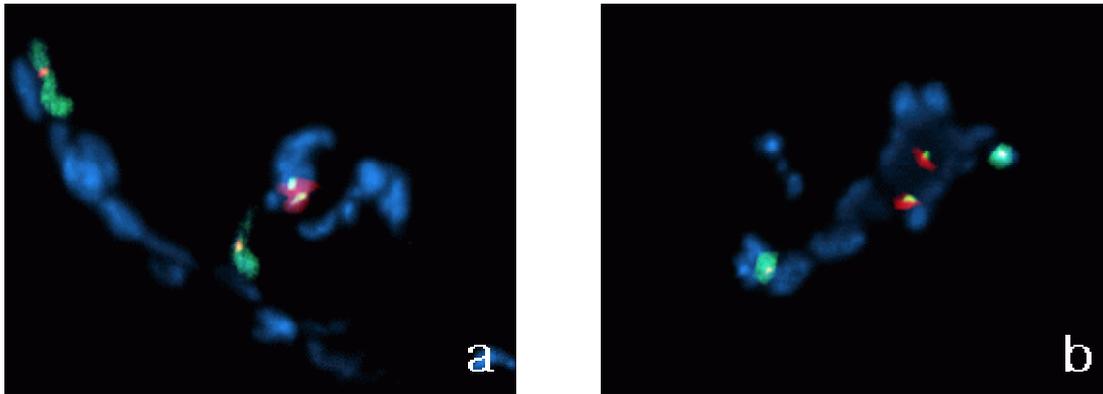


Figure 2. Fluorescent in-situ hybridization (FISH) on metaphase chromosomes of human individual blastomeres obtained after treatment of a mixture of vinblastine (1 μM) and nocodazole (1 μM). Centromeric probe for chromosome 7 (spectrum orange) and 17 (spectrum green) were added to whole chromosome probe for chromosome 7 (spectrum green) and 17 (spectrum orange). Original magnification $\times 1,000$.

Co.)의 χ^2 -test와 Fisher exact test를 이용하였고, p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

생쥐 배아에 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μM 의 vinblastine, nocodazole, colcemid를 각각 처리하여 할구에서의 중기염색체 획득률을 살펴보았다 (Table 1). 미세소관 형성 저해제를 처리하지 않은 대조군에서는 전체적으로 5% 정도의 할구에서만 중기염색체 상이 관찰

되었으며, vinblastine을 처리한 경우에는 1.0 μM 에서 가장 높은 20.3%의 중기염색체 획득률을 나타내었다. Nocodazole은 5.0 μM 의 농도에서 28.1%의 중기염색체 획득률을 보였으며, colcemid는 1.0 μM 을 처리하였을 때 55.6%의 가장 높은 중기염색체 획득률을 나타내었다. 한 가지 종류의 미세소관 형성 억제제를 처리한 후 관찰한 생쥐 배아 할구의 핵상은 50% 이상에서 핵막은 보이지 않으나 염색체의 형태가 뚜렷하지 않은 PCC (premature chromosome condensation)의 양상으로 관찰되었다 (Figure 1). 보다 높은 중기염색체 획득률을 얻기 위해 두 가지 이상

Table 3. Effect of a mixture of vinblastine and nocodazole on individual blastomeres of human early embryos from abnormally fertilized (3-PN) oocytes

Number of	Vinblastine (1.0 μ M) + Nocodazole (1.0 μ M)
Treated embryos	16
Examined blastomeres	112
Interphase nuclei	68 (60.7%)
Metaphase chromosomes	44 (39.3%)

의 미세소관 형성 저해제를 혼합하여 처리하였다. 가장 높은 생쥐 배아 할구에서의 중기염색체 획득률은 0.1 μ M의 vinblastine과 0.1 μ M의 nocodazole을 동시에 처리한 경우에 91.2%로 관찰되었다 (Table 2). 이러한 생쥐 배아를 이용한 실험의 결과를 토대로 인간의 배아에 적용하기 위한 가장 적절한 미세소관 형성 저해제의 조건을 결정하였다.

체외수정 및 배아이식술에서 공여받은 인간의 비정상적인 수정란을 배양하면서, 생쥐의 배아에서 가장 효과적이었던 0.1 μ M의 vinblastine과 0.1 μ M의 nocodazole을 동시에 처리하여, 핵이 관찰되는 112개의 할구 중에서 44개 (39.3%)의 중기염색체 상을 획득할 수 있었다 (Table 3). 이렇게 얻어진 중기염색체 상에 7번과 17번 염색체에 대한 WCP를 이용한 형광직접보합법을 수행하여 각각의 염색체에 대한 전체적인 모양을 성공적으로 관찰할 수 있었다. 또한, 7번과 17번 염색체에 대한 CEP를 이용하여 WCP의 signal이 해당 염색체를 나타내는 것임을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

고 찰

현재 전 세계적으로 인간의 배아에서 염색체의 구조적 이상에 대한 착상전 유전진단은 매우 활발하게 진행되고 있으며, 염색체 전좌의 보인자들을 대상으로 시행한 착상전 유전진단을 통하여 성공적인 임신과 자연유산율의 유의한 감소가 보고되고 있다.⁵⁻⁷ 그러나 이러한 착상전 유전진단의 대부분은 간의 핵을 대상으로 하고 있어, 정상과 보인자를 구분할 수 없는 한계점이 있다. 따라서, 정상과 보인자를 구분하기 위해서 중기의 염색체를 대상으

로 착상전 유전진단을 시행하려는 연구들이 진행되고 있다.

최근 인간 배아의 할구에서 중기염색체를 획득하고 이를 착상전 유전진단에 적용하기 위하여, 인간 배아의 할구와 생쥐와 소의 난자 또는 수정란과의 융합을 통한 중기염색체 상의 획득 방법들이 보고되고 있다.¹³⁻¹⁵ Willadsen 등은 비정상적으로 수정된 배아 또는 발생이 정지된 배아의 할구를 소의 난자와 융합시킨 후 97%의 hybrid 세포에서 분석 가능한 인간의 중기염색체를 획득할 수 있으며, 이를 염색체 전좌의 보인자를 대상으로 적용하여 정상아의 성공적인 임신을 보고하였다.¹⁵ 또한, Velinsky 등에 의하면 생쥐의 수정란 또는 탈핵된 생쥐의 수정란에 인간 배아의 할구를 융합시킨 후 90% 이상의 할구에서 인간의 중기염색체 상을 획득할 수 있는 것으로 알려져 있다.^{13,14} 그러나 이러한 방법을 이용하여 중기염색체를 획득하기 위해서는 난자의 핵을 제거하거나 성공적으로 세포들을 융합하기 위한 많은 시간과 노력 뿐만 아니라 연구자의 숙달된 미세조작술이 필수적이다. 이러한 단점으로 인해 이를 실제적인 임상에 적용하는 데는 많은 제약이 따르게 된다.

본 연구에서 시도한 미세소관 형성 저해제의 처리는 혈구세포를 이용한 일반적인 염색체 분석에서 널리 사용되고 있는 방법으로 그 편리함에 많은 장점이 있다. 현재까지의 보고에 의하면 인간의 난자에 colcemid를 처리하여 35.5~53.4%의 난자에서 중기염색체를 획득하여 염색체의 구성을 확인할 수 있었으며, 인간의 배아에서도 30.5~47%에서만 중기염색체를 획득할 수 있어, 시료의 일부에서만 염색체에 대한 정보를 획득할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁻¹⁸ 본 연구에서는 생쥐 배아를 이용한 실험에서 중기염색체 획득에 최적의 조건을 확인하여 이를 인간의 배아에 적용하고자 하였으며, 또한, 기존의 보고들과 달리 미세소관 형성 저해제를 혼합하여 처리함으로써 할구에서의 중기염색체 획득률을 높이고자 하였다. 생쥐 배아에 각각의 미세소관 형성 저해제를 단독으로 처리하였을 때, 비정상적인 염색체의 조기 응축 (PCC)으로 인해 절반 정도의 할구에서 PCC가 관찰되었지만, 저해제들을 복합적으로 처리하여 PCC의 비율을 낮추고 중기염색

체 상의 획득률을 높일 수 있었다. 이러한 미세소관 형성 저해제들의 복합 처리가 초기 배아에서 중기 염색체 상을 획득하는데 보다 효과적인 것으로 생각된다.

결론적으로 생쥐 배아 할구를 이용한 실험에서 90% 이상의 중기염색체 획득률을 얻을 수 있는 조건인 0.1 μ M의 vinblastine과 0.1 μ M의 nocodazole을 동시에 인간의 배아에 처리하였지만, 종전의 보고들과 유사한 38.9%의 중기염색체 획득률을 나타내었다. 생쥐의 배아에서는 90% 이상의 중기염색체 획득할 수 있었던 조건이 인간의 배아에서는 효과적이지 못한 이유로는, 체외배양에서 나타나는 종간의 발생능력의 차이점과 비정상적인 수정란에서 일반적으로 관찰되는 낮은 발생능력 때문으로 생각된다. 그러나, 이러한 방법으로 획득한 중기염색체에서 각각의 염색체에 특이적인 형광직접조합법의 결과를 확인할 수 있어, 차후의 연구를 통해 효율적인 중기염색체 획득 방법이 개발된다면 염색체의 구조적 이상에 대한 더욱 정확한 착상전 유전진단이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie M. Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1437-49.
2. Munne S, Bahce M, Schimmel T, Sadowy S, Cohen J. Case report: chromatid exchange and predivision of chromatids as other sources of abnormal oocytes detected by preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1450-8.
3. Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, et al. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescent *in-situ* hybridization for the most common reciprocal translocation t(11;22). *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 682-90.
4. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. Dual fluorescent *in-situ* hybridization for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 1992; 89: 18-22.
5. Munne S, Scott R, Sable D, Cohen J. First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil Steril* 1998; 69: 675-81.
6. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J, et al. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000; 73: 1209-18.
7. Scriven PN, O'Mahony F, Bickerstaf H, Yeong C-T, Braude P, Ogilvie CM. 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: 587-92.
8. 임천규, 한미현, 전진현, 송건지, 김정옥, 박소연 등. 균형 전좌 또는 Robertsonian 전좌 보인자의 체외수정 및 배아이식술에서 형광직접조합법을 이용한 착상전 유전자 진단의 임상적 적용. *대한산부학회지* 2000; 43(7): 1147-53.
9. 김진영, 임천규, 송인옥, 유근재, 양광문, 한국선 등. 유전질환 및 염색체 이상의 예방을 위한 착상전 유전진단의 결과. *대한불임학회지* 2002; 29(4): 269-78.
10. Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J, Ahrlund-Richer L, Sjoblom P, Rosenlund B, et al. Highly abnormal cleavage divisions in preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenat Diagn* 2000; 20: 1038-47.
11. Munne S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994; 51: 373-9.
12. Munne S, Alikani M, Grifo J, Cohen J. Monospermic polyploidy and atypical embryo morphology. *Hum Reprod* 1994; 9: 506-10.
13. Verlinsky Y, Evsikov S. A simplified and efficient method for obtaining metaphase chromosomes from individual human blastomeres. *Fertil Steril* 1999; 72: 1127-33.

14. Evsikov S, Verlinsky Y. Visualization of chromosomes in single human blastomeres. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 133-7.
 15. Willadsen S, Levron J, Munne S, Schimmel T, Marquez C, Scoot R, et al. Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with *in-vitro* matured bovine eggs. *Hum Reprod* 1999; 14: 470-5.
 16. Papadopoulos G, Templeton AA, Fisk N, Randall J. The frequency of chromosome anomalies in human preimplantation embryos after *in-vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1989; 4: 91-8.
 17. Micheli G, Fejgin M, Ghetler Y, Ben Nun I, Beyth Y, Amiel A. Chromosomal analysis of unfertilized oocytes and morphologically abnormal preimplantation embryos from an *in vitro* fertilization program. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1990; 7: 341-6.
 18. Edirisinghe WR, Murch AR, Yovich JL. Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an *in-vitro* fertilization programme. *Hum Reprod* 1992; 7: 230-6.
-