대한산부회지 제45권 제2호 2002
Vol. 45 No. 2 February 2002

모체의 말초 혈액에 존재하는 태아 세포 분리에 의한 새로운 기형아 진단 - Microdissection에 의한 CGH 기법의 사용

연세대학교 의과대학 산부인과학 교실*, 임상병리학 교실†, 산전 유전 클리닉‡,
임상의학 연구 센터 유전학 검사실§
양영호*†,‡ · 김성훈* · 김세광* · 박용원* · 조재성* · 김인규*
최종락† · 김미순§

=ABSTRACT=

A New Prenatal Diagnosis of Fetal Cells Isolation from Maternal Peripheral Blood -Using Comparative Genomic Hybridization by Microdissection

Young Ho Yang*†,‡, Sung Hoon Kim*, Sei Kwang Kim*, Yong Won Park*,
Jae Sung Cho*, In Kyu Kim*, Jong Rak Choi†, Mi Soon Kim§
*Department of Obstetrics and Gynecology**, *Department of Clinical Pathology†*,
Division of Prenatal Genetic Clinic‡,
The Genetic Laboratory of the Medical Research Center§,
College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Objective : The objective of this study was to determine the clinical use of CGH (comparative genomic hybridization) for detection of fetal aneuploidy from fetal cells (nucleated red blood cells, nRBCs) isolated from maternal peripheral blood.

Methods : Maternal peripheral venous blood sample was collected and treated by heparin. Triple density gradient centrifugation, and MACS (magnetic activated cell sorting) using CD45 and CD 71 were used to isolated the fetal nRBCs. With microdissection, DOP (degenerate oligonucleotide primed)-PCR (polymerase chain reaction), and nick translation, CGH was performed.

Results : Fetal nRBCs were successfully isolated from maternal peripheral blood. After microdissection of fetal nRBCs, DOP-PCR. and nick translation, DNA size was suitable for hybridization. In CGH analysis, we can confirm normal female and trisomy 21 male fetus.

Conclusion : Prenatal diagnosis from fetal cells in maternal peripheral blood by comparative genomic hybridization shows clinical promise in terms of speed, accuracy, and non-invasiveness. To enable widespread use of this method, further studies involving many cases are warrented.

Key Words : Prenatal diagnosis, Fetal nRBCs, Microdissection, Comparative genomic hybridization

비교 게놈 교잡법 (CGH, comparative genomic hybridization)**은 형광 동소 교잡법** (FISH, fluorescence in situ hybridization)**을 이용하여 전체** genome **중 한 염색체 전체 혹은 부분 이배수성** (aneuploidy)**을 선별해 낼 수 있는 최신 분자 세포 유전학적 방법으로** Kallioniemi (1992) **등이 개발하여 종양 세포의 염색체 이상 분석이 시도되어져 왔다.**[1] **이후** Bryndorf (1995) **등에 의해 임상 세포 유전학에서 염색체 전체 혹은 부분적인 단염색체성** (monosomy), **삼염색체성** (trisomy)**를 분석하고 발견하는데 응용되어 졌다.**[2] **기존의 염색체에 특이적인** DNA probe**를 사용하**

접수일 : 2001. 10. 30.
주관책임자 : 양영호

* **이 논문은** 1998**년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음.** (KRF-98-526, 99-537)
* **이 논문은 제** 87**차 대한산부인과 추계학술대회에서 구연 되었음.**

여 간기 (interphase)의 핵에서 염색체 이상을 관찰할 수 있는 FISH법이 제한된 수의 소식자 (probe)를 이용한 이수배수체의 진단만이 가능한 한계점이 있는 반면에 CGH는 한번의 교잡으로 전체의 genome을 검사할 수 있는 장점으로[3] 인해 Lapierre (2000)[4] 등은 비배양 양수 세포들을 이에 적용하여 산전 유전 진단에 있어 성공적인 결과를 보고하였다.

이와 더불어 임산부의 말초 혈액에 존재하는 태아 세포들 중 유핵 적혈구들 (nRBCs)이 기존의 침습적인 산전 유전 진단 기법들 [양수천자, (Amniocentesis),[5] 융모막 채취 (Chorionic villi sampling),[6,7] 태아 제대 혈액 채취 (Cordocentesis)[8]]에 비하여 비침습적인 산전 유전 진단의 한 방법으로써 연구의 초점이 되고 있다.[9,10] 근래에 들어 태아 유핵 적혈구들의 표면에 존재하는 특이 항원에 대한 항체를 이용한 MACS나 FACS를 적용하여 분리, 농축시키고 있으나,[11-15] 그 수가 $1/10^5$-$1/10^7$개로 극히 적어,[16,17] 아직까지 대량으로 태아 유핵 적혈구들을 분리하여 낼 수 있는 방법은 확립되어 있지 않다.

따라서, 분석할 세포가 단일 세포이거나 그 수가 매우 적을 때 CGH기법의 효용성이 더욱 중요시 되어지고 있으며, 최근에 이를 이용하여 시험관 수정 (in vitro fertilization)시 할구세포 (blastomere)를 이용한 착상 이전 단계의 산전 유전 진단법이 소개되었으나,[18] 현재까지 모체 혈액 내에 존재하는 극소수의 태아 유핵 적혈구를 CGH에 적용하여 임신 초·중기에 비침습적인 산전 유전 진단을 시도한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구는 모체 혈액 내에 미량으로 존재하는 태아 세포 중 유핵 적혈구들을 순수하게 분리한 후 micromanupulator을 이용하여 분리, 이들로부터 DNA를 추출, DOP-PCR로 증폭한 후, CGH기법을 이용하여 염색체의 유전자 분석을 통한 산전 유전 진단의 유용성을 보고자 시도되었다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본원에 내원한 산모를 대상으로 하였으며, 산모는 임신 주수, 과거 임신력, 기형아 출산의 기왕력등을 기준으로 분류하였으며, 실험전에 산모의 동의를 구하였다. 동의한 산모로부터 20-30 ml의 말초 혈액을 얻어 heparin 처리한 후 실험에 사용하였다.

2. 연구 방법

(1) 태아 세포의 분리

태아 세포를 분리하기 위하여 변형된 Gänshirt-Ahlert 방법을 적용한다.[22] 채취된 혈액은 PBS나 HBSS (Gibco)로 1:2로 혼합하여 실온에 보관하였다. 50 ml tube에 Ficoll-Histopaque (Sigma)로 1119 1110 1077의 세층의 서로 다른 gradient를 만든 후 그 위에 혼합된 혈액 6 ml를 얹고 3000 rpm에서 30분간 (4℃) 원심분리하였다. Mononuclear층 세포를 15 ml polyetylene tube에 옮긴후 1XPBS로 3-4회 washing한 후 CD45 (Miltenyi Biotec)를 10^7cell당 20 μl를 처리하여 냉장고에서 20분간 반응시킨 후 MACS (Miltenyi Biotec)를 사용하여 column을 걸었다. Column을 통과한 세포만을 선택하여 1XPBS로 2-3회 수세하였다. 모아진 세포를 1,200 rpm 10분간 (4℃) 원심분리하여 10^7cell당 30 μl의 CD71 (Miltenyi Biotec)을 처리하고, 냉장고에서 20분간 반응시킨 다음 다시 MACS (Miltenyi Biotec)를 사용하여 column을 통과시켜 column 내에 남은 세포들을 MACS kit내의 압력 syringe를 이용하여 모았다.

(2) 현미경 분석

태아 혈색소 (hemoglobin)의 존재 유무를 확인하기 위하여 Los 등 (1979)에 의해 변형되어진 Kleihäuer-Betke염색을 슬라이드에 시행하였다. K-B염색을 시행한 후 현미경 분석에 의해 모체의 말초 혈액으로부터 태아의 유핵 적혈구를 형태학적으로 구분하였다.

(3) Microdissection of nRBC (Fig.1)

Micromanupulator를 이용하여 염색된 slide위의 nRBC를 하나씩 떼어낸 후 10 ul PBS가 담긴 eppendorf tube로 옮겼다.

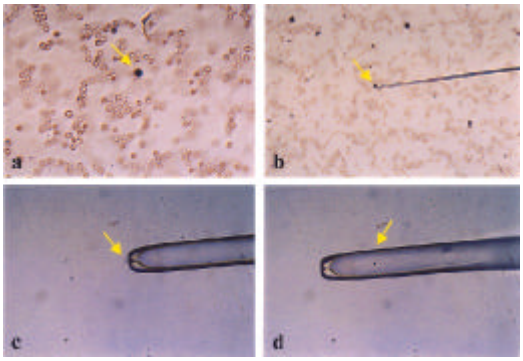


Fig. 1. Fetal nRBC isolation using micromanupulator

(4) DNA분리 및 DOP-PCR증폭 from microdissected nRBCs

분리한 nRBC를 PBS로 세척한 후 PCR tube에 옮기고, lysis buffer (200 mM KOH) 5 μl를 넣어 lysis시킨 후 65℃에서 10분간 heating하고 4℃에서 cooking시킨 후 neuturalizing buffer (500 mM Tris (pH8.3) : 300 mM KCL : 200 mM HCL)를 5 μl 첨가하여 DNA를 분리하고, 이를 template로 DOP-PCR (ROCHE)을 수행하였다. DOP-PCR을 위한 반응액은 최종 농도가 2.5U Taq DNA polymerase : 200 μM dNTP : 10 mM Tris-HCl : 50 mM KCl : 1.5 mM

MgCl2 : 2uM DOP-PCR primer가 되게 하였다. DOP-PCR 조건은 95℃에서 5분간 denaturation후 94℃ 1분 (denaturation), 30℃ 1분30초 (annealing), 72℃ 3분 (extension)으로 8 cycles 시행 후 94℃ 1분 (denaturation), 62℃ 1분 (annealing), 72℃ 2분 (extension)으로 35cycles 시행하였다. 각각의 PCR 수행시 negative (water)와 positive (genomic DNA) control도 반드시 test하여 PCR solution의 contamination 여부를 확인하였다 (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.). PCR 시행 후 증폭된 DNA용액 중 일부를 취하여 1% agarose gel에 전기영동시키고 Gel Documentation (FUJI)으로 염색된 gel을 촬영하여 판독하였다.

(5) Target metaphase slides

정상인의 말초 혈액을 통상 염색체 배양법으로 배양하여 표본 제작하고, CGH를 시행하기에 적합한 슬라이드를 선택하여 hybridization전에 73℃의 70% formamide, 2×SSC에 3-4분간 denaturation시킨 후 70%, 85%, 100% EtOH를 1분씩 거치면서 탈수시켰다.

(6) CGH와 digital imaging

Nick translation kit (Vysis)를 이용하여 증폭된 genomic DNA를 15℃에서 90-105분간 labeling시킨 후 72℃에서 10분간 처리하여 반응을 중지시켰다. reference DNA는 spectrum Red (Vysis)로 test DNA는 spectrum Green (Vysis)으로 labeling하며, DNA크기는 1% agarose gel상에서 500-1500base pair로 하였다. 1.5 ml microtube에 500 ng의 labelled test DNA와 500 ng reference DNA, 20 μg Cot1 DNA (Vysis)를 섞어서 3M sodium acetate (0.1vol)와 100% EtOH (2.5vol)로 침전시킨 후 간단히 vortex하고 deep frigerator에 30분간 보관하였다. Microcentrifuge에 12000 rpm으로 30분간 (4℃) 원심분리하여 DNA를 침전시키고, 상층액을 제거한 후 37℃에 30분간 처리하여 pallet를 건조시켰다. pellet를 purified H2O로 resuspend시킨 후 hybridization buffer를 첨가하였다. probe혼합액을 73℃에서 5분간 처리하여 denaturation시키고, 이를 denaturation된 target mataphase slide에 떨어뜨린 후 cover slip을 씌우고 rubber cement로 밀봉하였다. 이를 humidity box에 넣어 37℃ 배양기에서 48-72시간 동안 hybridization하였다. 슬라이드로부터 cover slip을 제거한 후 0.4XSSC/0.3% NP-40와 2XSSC/0.1% NP-40에 각각 1분간 처리한 후 어두운 곳에서 공기건조하였다. DAPI로 분별 염색한 후 형광 현미경하에서 관찰하고, 관찰된 image를 Cytovision image analysis system (Applied imaging Co.)을 이용하여 gene의amplification과 deletion을 분석 판정하였다.

결 과

Triple density gradient를 이용한 원심분리와 CD45, CD71을 이용한 MACS를 시행하여 분리된 세포들로 라이드를 만든 후 Kleihäuer-Betke 염색을 실시하고, 현미경하에서 태아 유핵적혈구를 형태학적으로 분석한 후 micromanupulator를 이용하여 미세분리 (microdissection)하였다. 분리되어진 태아 유핵 적혈구들을 hybridization을 위해서는 DOP-PCR과 Nick translation의 과정이 필요하였으며, 본 연구에서는 회수된 태아 유핵 적혈구에서 추출된 DNA로부터 DOP-PCR을 시행하여 fetal DNA를 500-1,500 base pair의 크기로 증폭시킬 수 있었다 (Fig. 2). 또한, TexasRed를 이용한 reference DNA에 Nick translation 및 test DNA에 대한 FITC labelling이 성공적으로 수행되었다. Nick translation 후의 DNA size는 Fig. 3에서 보여 주는 바와 같이 hybridazation에 적합하였다.

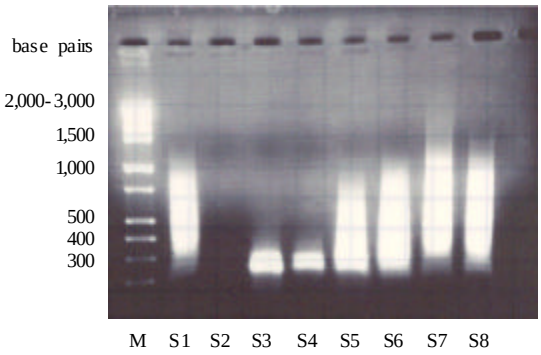


Fig. 2. Assessment of DNA Quality after DOP-PCR.
M : DNA marker
S1, S5, S6, S7, S8 : Good quality after DOP-PCR
S2, S3, S4 : Good quality after DOP-PCR

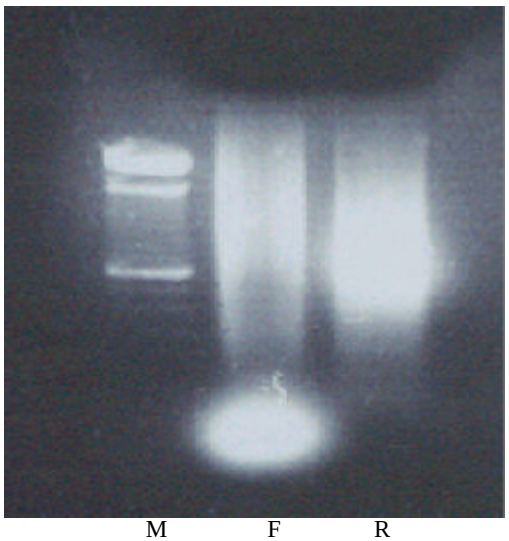
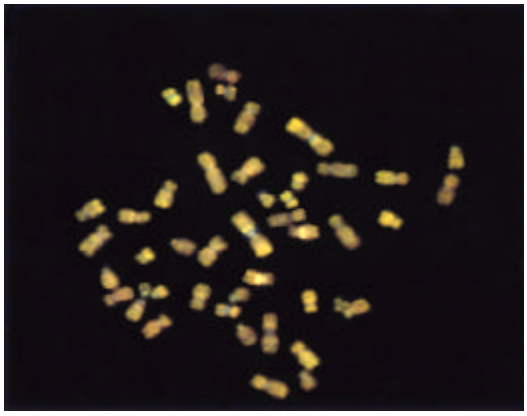
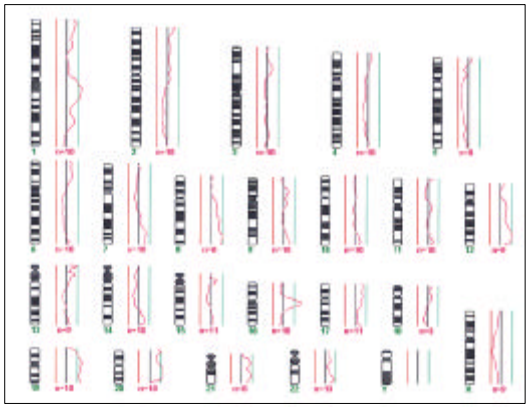


Fig. 3. Assessment of DNA Quality after Nick Translation.
M : DNA marker, F : FITC labeling (test DNA)
R : TexasRed labeling (reference DNA)



(a) Metaphase images

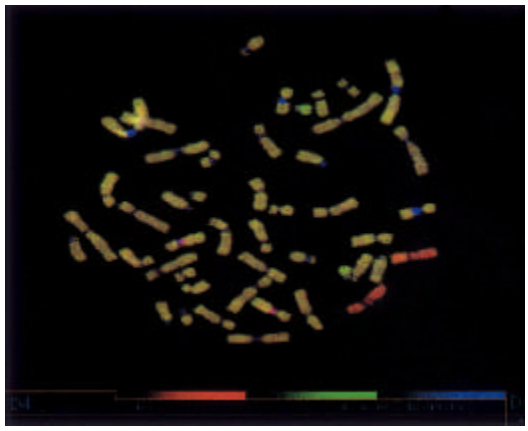


(b) DNA profiles

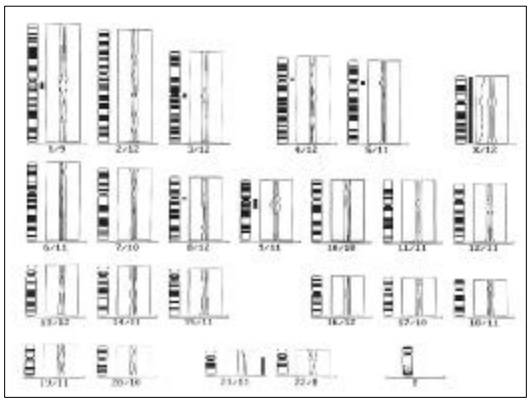
Fig. 4. Metaphase images and CGH fluorescent ratio profiles obtained following hybridization of the DOP-PCR product from a single female fetus cell labelled with Spectrum Green together with the DOP-PCR product from normal female DNA labelled with Spectrum Red. The fluorescent ratios for all chromosomes are within the cut-off thresholde of 0.8-1.2.

Fig. 4(a)는 metaphase image로 모든 염색체에서 동일한 색을 나타내고 있다. Fig. 4(b)의 경우 reference DNA로 정상 여성의 DNA를 사용하였으며, test DNA는 정상적인 여자 태아였던 profile로 1번, 16번, 19번, 20번의 염색체에서 standard deviation을 우측으로 약간씩 벗어나는 부위가 관찰되었다. 이 중 1번과 16번 염색체의 경우 이질염색질 부위 (heterochromatic region)가 풍부한 중심절 (centromere) 부위로 정상적인 소견으로 볼 수 있다. 19번과 20번 염색체의 경우 점선의 그래프가 우측으로 편위되어 있어 염색체 이배수성의 가능성이 있으나, 이는 DOP-PCR과정에 있어 19번과 20번 염색체가 부분적으로 과잉 발현 (overexpression)되어졌으며, 10개의 염색체를 accumulation하는 과정에서 제어 (control)하지 못하여 나타난 것으로 사료되어지며, 양수 검사에 의해 정상 여성임을 확인하였다.

Fig. 5(a)는 metaphase image로 X염색체는 붉은색에, 21번 염색체는 녹색에 가까운 색을 나타내고 있다. Fig. 5(b)은 이를 DNA profile로 나타낸 것으로, 12개의 X 염색체를 분석한 그래프가 좌측으로 치우쳐진 것은 염색체 소실 (deletion)을 의미하며, 이는 reference DNA로 정상 여성의 DNA를 사용하였기 때문에, 염색체의 소실처럼 보이는 결과로 샘플이 남자 태아임을 알 수 있었다.



(a) Metaphase images



(b) DNA profiles

Fig. 5. Metaphase images and CGH fluorescent ratio profiles obtained following hybridization of the DOP-PCR product from a single trisomy 21 male fetus cell labelled with Spectrum Green together with the DOP-PCR product from normal female DNA labelled with Spectrum Red. The fluorescent ratios for all chromosomes except 21 and X are within the cut-off thresholde of 0.8-1.2. The profile for the X chromosome shows a deviation to the left and the profile for chromosome 21 shows a deviation to the right indicating increased copy number for 21 in the test cell.

11개의 21번 염색체를 분석한 그래프가 전반적으로 우측으로 치우쳐져 standard deviation을 벗어나 amplification된 비정상적인 소견으로 볼 수 있으며, 이로써 trisomy 21을 추정할 수 있었다. 기타의 상염색체들 (특히, 1번과 9번 염색체)의 실선 그래프 중 염색체의 부위에 따라 standard deviation을 좌측으로 약간씩 벗어나는 부위가 관찰되었는데, 이는 Fig. 4(b)의 1번과 16번 염색체의 경우와 마찬가지로 정상적인 현상으로 볼 수 있다. 양수검사 결과 Fig. 5의 경우 trisomy 21의 남자 태아임을 확인할 수 있었다.

고 찰

현재 비침습적 산전 유전 진단을 위하여 이용되어지는 방법에는 분리된 태아 세포로 Y-specific DNA sequence를 사용한 PCR[20,21], specific DNA probe를 이용한 FISH[22-25], CGH 등이 있다.

이 기법들 중 CGH는 검체 세포를 배양하지 않고도 검체의 DNA를 통해서 전체적 혹은 부분적인 이수성을 검사하고 지도화할 수 있는 새로운 분자 세포 유전학적 방법이다. 중기 (metaphase)의 염색체를 이용하여 시행되어 온 기존의 FISH법에 비하여, 중기 상태의 국한되지 않은 전체 genomic DNA를 가지고 분석함으로써 충분한 중기의 세포를 얻기 힘들었던 종양 세포의 염색체 이상을 분석하는 암 유전학분야에서 주로 연구용으로 사용되었으며 (Kallioniemi 등, 1994)[26], Bryndorf 등 (1995)에 의해 염색체 전체나 부분적인 단염색체성 혹은 삼염색체성을 분석할 수 있음이 보고되면서, 여분의 혹은 소실된 염색체의 기원을 명백히 밝힐 수 있고, 불균형적인 염색체 이상에 대한 genome 전반적인 선별이 가능한 이유에서 임상 세포유전학 (cytogenetics)에 응용되기 시작하였다[2].

극소수의 세포로부터 많은 양의 유전 정보를 얻어내어야 하는 산전 진단에 있어 소수의 특이 소식자 (probe)들만을 사용할 수 있는 FISH법에 비해 CGH는 한번의 교잡 (hybridization)으로 전체 염색체에 대한 복잡하고 불균형적인 이상을 검사해 낼 수 있는 장점 (Bryndorf 등, 1995)이[2] 있다. 따라서, 임신의 성공률이 염색체의 이배수체 (aneuploidy) 발생에 영향을 받고 (Gianaroli 등, 1997)[27] 시험관 수정 (in vitro fertilization)에 있어, 임상적으로 중요한 13, 18, 21번 염색체 이외의 다른 염색체의 삼염색체성 (trisomy)은 대개 임신 초기 (1주일 이내)에 태아가 소실되기 때문에 착상 이전의 산전 진단에서 전체 염색체에 대한 검사의 중요성이 강조되고 있으며, 초기 배아의 이배수성을 찾기 위하여 염색체 특이 소식자 (probe)만을 이용한 FISH법이 대치되어질 수 있는 방법으로 CGH기법이 착상전 유전 진단 분야에 있어 시도되어지고 있다 (Wells 등, 1999)[18]. 최근에는 Lapierre 등 (2000)[4]이 비배양 양수 세포들을 이에 적용하여 산전 유전 진단에 있어 성공적인 결과를 보고한 바 있으나, 아직까지 모체 혈액 내에 존재하는 극소수의 태아 유핵 적혈구를 CGH에 적용하여 임신 초·중기에 비침습적인 산전 유전 진단을 시도한 연구는 전무한 실정이다.

그러나, 이러한 CGH도 그 기법의 특성상 mosaicism이 DNA추출에 사용되어지는 세포들에 의해 평균적으로 만들어지는 핵형에 의해 발견되어 질 수 없다는 것으로, 이는 Kallioniemi 등 (1994)[26]에 의해 정상 DNA에 의해 이상 DNA가 30-50% 희석되었을 때 그 발견이 불가능함이 단점으로 알려져 있다.

단일 이배체 (diploid) 인간 세포는 대략 6 pg의 DNA를 함유하고 있다 (Morton, 1991).[28] CGH기법이 분석할 세포의 세포수가 하나 혹은 극소수일 때 유용하다고는 하나, 분자적 (molecular) 분석을 위해서는 0.2-1.0 μg의 DNA가 필요하기 때문에 중합 효소 연쇄 반응을 이용한 증폭이 선행되어야 한다. Single cells의 template DNA는 효과적인 일련의 중합 효소 연쇄 반응을 일으킬 수 없어 결과적으로 얻을 수 있는 정보의 양이 한번의 중합 효소 반응에 한정될 수 밖에 없다. 따라서 하나의 genome에서 일련의 많은 중합 효소 연쇄 반응에 충분한 량의 DNA를 얻기 위해서는 전체 genome을 증폭 (whole genomic amplification, WGA)시키는 과정이 요구되어진다. WHA의 방법에는 DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed-PCR), T-PCR (tagged-PCR), PEP (primer extension preamplification), alu PCR 등의 방법이 있다.[18] DOP-PCR에 의해 증폭시킨 후 추출된 DNA에 의한 CGH는 Kuukasjärvi 등 (1997)에 의해 고정된 조직 표본에서 microdissection에 의해 얻어진 세포들이 종양 세포의 분석에 최초로 사용되었으며,[29] Griffin 등 (1998)에 의해 flow sorted chromosome들에서 미세한 중복 (duplication)을 발견하는데 이용되어졌다.[30] 이 두 경우는 다수인 분석 재료를 DOP-PCR에 의해 증폭한 것이다. Wells (1999) 등은 섬유모세포 (fibroblast), 구강 점막 세포 (buccal cell), 양막세포 (amniocyte), 할구세포 (blastomere) 같은 여러 단일 세포에서 25개 정도의 단일 세포들로부터 얻어진 DNA에 여러 가지 WHA 방법들을 적용한 결과 DOP-PCR에 의한 방법이 CGH에 적용하여 13, 14, 18, 21번등의 염색체 이수배수성을 진단함에 있어 가장 뛰어남을 보고하였으며,[18] 최근 들어 여러 연구자들에 의해 이보다 더 적은 수의 단일 세포들로부터 충분한 량의 DNA를 얻기 위한 노력이 진행 중이다.

본 연구는 태아의 염색체 이상의 산전 유전 진단을 위해 모체 내의 태아 유핵 적혈구를 분리·농축하고,[22] microdissection법을 이용하여 단일 세포로 분리한 후 추출된 태아 유핵 적혈구의 DNA를 DOP-PCR법을 사용하

여 증폭하여 CGH기법에 응용하였다.

Kallioniemi (1994) 등에 의해 CGH분석에 있어 중기 도말 표본의 준비, 추출된 genomic DNA의 농축도, 표지된 genomic probe의 분절 길이, reference와 test genomic DNA에 존재하는 산재된 반복적 DNA sequence의 억제, 영상 분석 등이 결론 도출에 있어 중요함은 이미 알려진 사실이다.[26] 또한, hybridization siganal의 질은 표지된 (labelled) genomic probes의 절편 길이에 영향을 받기에, 강한 signal을 얻기 위해서는 절편 길이가 적절한 염기쌍의 범위 내에 있어야 한다. 본 연구에서는 DOP-PCR과정을 수행함에 있어 CGH를 시도하기 위한 500-1,500 base pair의 DNA를 얻어내는데 있어 그 질 (quality)이 떨어져 연구 초반에 태아 DNA에 FITC labeling을 하는데 signal의 강도를 교잡 후 결과 분석에 충분할 정도로 증강시키는데 어려움이 있었으나, 수회의 반복 실험을 통하여 기술적 결함을 극복할 수 있었다.

CGH에 의한 염색체 분석 방법은 WHA를 통하여 증폭되어진 DNA (test DNA)와 정상 핵형을 가진 DNA (reference DNA)에 Nick translation을 이용하여 형광 색소인 fluorescein (녹색)과 TexasRed (적색)을 각각 표지한 후 각각 1:1로 섞는다. 표지 안된 반복 DNA (Cot1 DNA)를 과량 첨가하여 검사 및 대조 DNA sequence 표현을 억제한 후, 정상의 세포 분열 중기 세포에 동소 교잡 (in situ hybridization)하여, 디지털 영상 분석기기를 이용, 대상 염색체의 녹색 대 적색 형광 강도의 비율로 이배수성 (aneuploidy) 여부를 결정하는 것이다[31]. CGH기법의 민감도와 특이도는 결과 분석의 한계치를 어떻게 설정하느냐에 따라 부분적으로 바뀌게 되며, 결과 분석에 있어 표본을 비정상으로 정의하고 간주하기 위하여 사용되는 한계치는 일반적으로 1.10에서 1.25사이의 상한치와 0.75에서 0.90사이의 하한치이다. 넓은 한계치 (0.75-1.25)는 특이도는 높아지나 위음성율이 높아지며 민감도는 떨어지고, 좁은 한계치 (0.90-1.10)에서는 민감도는 높일 수 있으나 위양성율이 높아지게 된다. 본 연구에서는 0.8-1.20의 한계치를 사용하였다.

정상 여자 태아와 trisomy 21 남자 태아의 CGH 결과를 분석해 보면, 각각 1번과 16번, 1번과 9번 염색체의 경우 실선 그래프 중 염색체의 부위에 따라 standard deviation을 약간씩 벗어나는 부위가 관찰된다. 이는 Cot1 DNA를 과량 첨가하여 검사 및 대조 DNA의 sequence 발현이 효과적으로 억제될지라도 1qh, 9qh, 16qh, Yqh의 이질염색질 부위, 선단동원체인 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 중심절 부위, 그리고 대다수 염색체의 말단 소립과 같이 반복 sequence의 농축률이 높은 genome 부위들에서 얻어진 CGH의 결과는 신용할 수 없다는 du Manoir (1995)등의 보고와 일치하며,[32] 이는 이러한 부위에서 얻어진 결과 분석에 있어 신중을 기해야함을 알 수 있었다. 정상 여자 태아의 경우에서 19번과 20번 염색체의 경우 점선의 그래프가 standard deviation을 벗어나는 부위가 관찰되었는데, 이는 19번과 20번 염색체의 이배수성이라기 보다는 DOP-PCR과정에 있어 염색체가 부분적으로 과잉 발현 (overexpression)되어진 것을 accumulation하는 과정에서 제어 (control)하지 못하여 나타난 것으로 사료되어진다. Trisomy 21 남자 태아의 경우 Reference DNA로 정상 여성의 DNA를 사용하였기에, 21번 염색체의 경우 실선 그래프가 우측으로 편위 (amplification)되고, X 염색체의 경우 실선 그래프가 좌측으로 편위 (deletion)된 결과를 종합하여 test DNA 염색체의 이배수성을 추정할 수 있었다. 2예 모두에서 그 결과는 양수검사의 결과와 비교하여 확인하였다.

결론적으로, 모체의 혈액내에 존재하는 극소수의 태아 세포에 CGH를 이용한 유전자 분석법은 trisomy 21을 포함한 태아의 이수배수성 진단에 있어 빠르고, 정확하며, 비침습적인 혁신적 방법이나, 임상적으로 이용하기 위해서는 향후 더 많은 예의 실험이 필요할 것으로 사료되어진다.

- 참고문헌 -

1. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 1992; 258(5083): 818-21.
2. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhu R, et al. Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. Am J Hum Genet 1995; 57: 1211-20.
3. Yu LC, Moore II DH, Magrane G, Cronin J, Pinkel D, Lebo RV et al. Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). Cytometry 1997; 28: 191-7.
4. Lapierre JM, Cachheux V, Luton D, Collot N, Oury JF, Aurias A. Analysis of uncultured amniocytes by comparative genomic hybridization: a prospective prenatal study. Prenat Diag 2000; 20: 123-31.
5. Golbus MS, Loughman WD, Epstein CJ, Halbasch G, Stephens JD, Hall BD. Prenatal genetic diagnosis in 3000 amniocenteses. N Engl J Med 1979; 300: 157-63.
6. Yang YH, Kim MS, Park YW, Kim SK, Cho JS, Jeong HJ. Chorionic villus sampling : Experience of first 510 cases in Korea. Kor J Obstet Gynecol 1993; 36: 906-15.
7. Yang YH, Park YW, Cho JS. Chorionic villus Sampling : Clinical experience of the initial 750 cases. J Obstet Gynaecol Res 1996; 22(2): 143-9.
8. Daffos F, Capella-Pavlovsky M, Forestier F. Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound : a study of 606 consecutive cases. Am J Obstet Gynecol 1995; 153: 655-60.
9. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. J Pediatr 1995; 127(6): 847-56.
10. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll J, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 3279-83.
11. Milteneyi S, Muller W, Weichel W. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 1990; 11: 231-4
12. Gänshirt-Ahlert D, Burschyk M, Garritsen H, Helmer L, Miny P, Horst J, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. Am J Obstet Gynecol 1992; 166: 1350-5.

13. Gänshirt-Ahlert D, Garritsen H, Holzgreve W. Prenatal diagnosis using fetal cells in maternal circulation. Fetal Matern Med Rev 1995; 7: 77-85.
14. Bianchi DW. Deve1opment of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. Prenat diagn. 1996; 16(4): 289-98.
15. Gänshirt-Ahlert D. Enrichment of fetal nucleated red blood cells from the maternal circulation for prenatal diagnosis : experiences with triple density gradient and MACS based on more than 600 cases. Fetal Diagn Ther 1998; 13(5): 276-86.
16. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood : frequency and relationship to gestational age. Hum Genet 1993; 91: 427-32.
17. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood : estimation by FACS analysis. Prenat Diagn 1997; 17: 743-52.
18. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JDA. Detailed chromasomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization. Nucleic Acids Resear 1999; 27(4): 1214-8.
19. Gänshirt-Ahlert D, Borjesson-Stroll R, Burschyk M, Dohr A, Hemer E, Velasco M, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. Am J Reprod Immunol 1993; 30: 194-201.
20. Lo Y, Patel P, Wainscoat J. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet 1989; 2: 1363-7.
21. Yang YH, Yoo HS, Kim IK, Kin DU, Lee MH, Kim MS. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using PCR and its clinical application for prenatal genetic diagnosis. Korean J Obstet Gynecol 1995; 38: 370-7.
22. Yang YH, Jee KJ, Kim SK, Park YW, Kim IK, Cha DH et al. Prenatal genetic diagnosis from maternal blood : Simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative and positive magnetic activated cell sorting. YMJ 2000; 41(2): 258-65.
23. Zheng YL. Prenatal diagnosis from maternal blood : simultaneous immunophenotying and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. J Med Genet. 1993; 30(12): 1051-6.
24. Price J, Elias S, Wachtel S. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. Am J Obstet Gynecol 1991; 165: 1731-7.
25. Elias S, Price J, Dockter M, Wachtal S, Tharapel A, Simpson JL, et al. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. Lancet 1992; 340: 1033.
26. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. Genes Chrom Cancer 1994; 10: 231-43.
27. Gianaroli L, Magli M, Ferraretti A, Fiorentini A, Garnisi J, Munne S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. Fertil Steril 1997; 68: 1128-31.
28. Morton NE. Parameters of the human genome. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7474-6.
29. Kuukasjärvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. Genes Chrom Cancer 1997; 18: 94-101.
30. Griffin DK, Sanoudou D, Adamski E, McGriffert C, O'Brien P, Weinberg J et al. Chromosome specific comparative genomic hybridization for determining the origin of intrachromosomal duplications. J Med Genet 1998; 35: 37-41.
31. Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. Prenat Diag 1999; 19: 846-51.
32. Du Manoir S, Schröck E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T. Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 1995; 19: 27-41.

=국문초록=

목적 : 모체의 말초 혈액에서 분리된 태아의 유핵 적혈구에 CGH기법을 이용하여 태아 염색체 이상을 진단함에 있어 임상적 유용성을 알아보고자 한다.

방법 : 임산부의 말초혈액을 채취하여 heparin 처리한 후 triple density gradient 원심분리, CD45와 CD71을 이용한 MACS의 방법을 거쳐 태아의 유핵 적혈구를 분리한다. 얻어진 태아의 유핵 적혈구들을 microdissection 하여 분리, DOP (degenerate oligonucleotide primed) - PCR (polymerase chain reaction)로 증폭시킨 후, nick translation 과 CGH를 시행한다.

결과 : 모든 예에서 모체의 말초 혈액으로부터 태아의 유핵 적혈구가 분리 가능하였으며, 이는 Kleihäuer-Betke 염색법에 의하여 증명되었다. 얻어진 태아 유핵 적혈구들에 microdissection, DOP-PCR, Nick translation 시행 후의 DNA의 크기는 교잡에 적합하였으며, CGH를 시행하여 정상 여자 태아와 trisomy 21 남자 태아를 진단할 수 있었다.

결론 : 모체의 말초 혈액에서 분리된 태아 유핵 적혈구를 이용한 CGH 분석을 통한 태아 염색체 이배수성의 산전 유전 진단법은 정확하고 빠르며, 비침습적인 방법으로써 임상적으로 유용하다. 향후 더 많은 예의 연구가 되어진다면, 이러한 방법은 산전 유전 진단에 있어 더욱 유용하게 사용될 것으로 사료되어 진다.

중심단어 **:** Prenatal diagnosis, Fetal nRBCs, Microdissection, Comparative genomic hybridization