

## Polymerase Chain Reaction을 이용한 성의 감별

서병희 산부인과의원 불임연구소

손성수 · 강남이 · 김재명 · 고영호 · 서병희

### Sex Determination by Polymerase Chain Reaction

Seong Soo Sohn, Nam I Kang, Jae Myung Kim, Young Ho Koh and Byung Hee Suh

*Infertility Research Laboratory, Suh Women's Clinic*

#### = Abstract =

Sex determination in genomic DNA from human blood leucocytes was performed by amplification of human Y chromosome-specific DNA sequences using PCR technique. A clear DNA fragment(154 nucleotides long) was appeared only in the male genomic DNA, but no specific band was observed in the case of female genomic DNA and negative control.

To know the sensitivity of this method, the amplification reaction was performed in genomic DNA diluted to 2pg equivalent to the amount present in the single human cell, and clear band also observed.

The PCR amplification was so successfully performed in the single leucocyte separated from human blood using micromanipulator that this technique is assumed to be applied to single blastomere before embryo transfer.

#### 서 론

약 200여가지 이상의 X-염색체와 연관된 열성유전질환이 보고되고 있다. 이들 질환의 일부는 용모막생검이나 양수천자등을 통해 산전진단이 가능하기도 하나, 대부분의 경우 기존의 방법으로는 유전여부를 판명하기가 어렵다. 뿐만아니라 그 치료 방법도 거의 전무한 편이다. 따라서 이들 질환에 대한 예방책으로는 간접적이거나 태아의 성을 조기에 알아내어 적절한 대비책을 강구하는 것이 바람직한 것으로 인정되고 있다(Kogan et al., 1987; Handyside et al., 1990).

전통적으로 성의 감별에 가장 일반적으로 널리 사용되고 있는 것이 염색체분석 방법이다. 이 방법은 정확성에서 다른 어느 방법보다 우수하고 단순히 성별이외에도 여러 유전질환을 검색할 수 있다는 장점이 있으나, 비용이 많이 들고 검사기간이 다소 오래 걸리며

배아의 초기 단계에서 성별의 판정이 대단히 어렵다는 단점이 있다.

근래에 Y-염색체에 특이적으로 존재하는 염기서열을 증합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction:PCR)으로 증폭함으로써 성을 감별하고자 하는 시도가 이루어지고 있다(Bradbury et al., 1990; Peura et al., 1991; Han et al., 1993). 이 방법은 비교적 짧은 시간에 간단한 장비를 이용하여 성을 확인할 수 있는 장점과 감도가 극히 높아 배아의 초기 단계에서도 성의 감별이 가능하다는 잇점이 있으나 그 유효성이 입증되어 있지 않아 아직 널리 이용되고 있지는 않다. 이에 본 연구에서는 상기 방법의 정확성과 감도를 검증하여 임상적 이용 가능성을 검토하여 보았다.

#### 재료 및 방법

##### 1. DNA의 추출

정상 남성과 여성의 혈액으로부터 genomic

DNA의 추출은 Lewin과 Stewart-Haynes (1992)의 방법에 따랐다. 이 방법은 유기용매나 고가의 단백질 또는 RNA분해효소를 사용하지 않고 보다 간편하고 신속히 혈액에서 PCR에 적합한 genomic DNA를 효과적으로 추출할 수 있는 방법이다. 약 20 $\mu$ l의 혈액을 0.5ml tube에 넣고 400 $\mu$ l의 증류수를 첨가하여 삼투압에 의해 적혈구 세포를 용혈시켰다. 10000g에서 1분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후 증류수로 3회 세척하여 hemoglobin과 다른 단백질을 제거하였다. 침전물을 10 $\mu$ l의 200mM KOH, 50mM dithiothreitol(DTT)에 재부유한 후 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 부치한 뒤 4 $^{\circ}$ C로 냉각한 다음 10 $\mu$ l의 neutralization buffer (900mM Tris-HCl, pH 8.3, 300mM KCl, 200mM HCl)를 넣어 중화시키고, 이중 2-4 $\mu$ l를 PCR에 사용하였다.

## 2. 백혈구세포의 분리

정상 남성과 여성으로부터 각각 2ml의 혈액을 채취하여 heparin이 들어있는 5ml tube에 옮긴 후 약 1시간 정도 방치하여 적혈구세포를 침전시켰다. Buffy coat층만을 분리한 후 phosphate-buffered saline(PBS)로 적절히 희석하여 petri dish에 점적한 뒤 micromanipulator(Leitz, Germany)를 이용하여 백혈구세포만을 하나씩 취하여 10 $\mu$ l의 증류수가 들어 있는 0.5ml tube에 각각 옮긴 다음, 100 $^{\circ}$ C에서 약 5분간 가열하여 백혈구세포로부터 DNA를 용출시킨 후 PCR용 template로 이용하였다.

## 3. Primers

성의 감별을 위하여 증폭하고자 하는 Y-염색체에 특이한 염기서열은 Nakahori등(1986)이 보고한 3.4kb의 반복염기서열로서, 최종증폭산물이 154bp가 되도록 아래와 같은 oligonucleotide primers를 사용하였다.

5'-TCCACTTTATTCAGGCCTGTCC  
5'-TTGAATGGAATGGGAACGAATGG

## 4. PCR

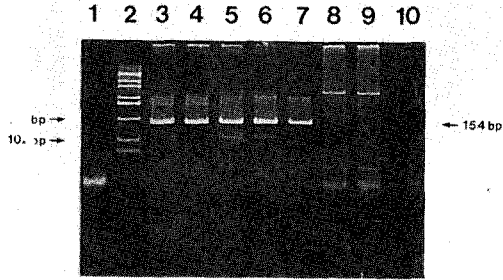
PCR은 Erlich등(1991)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 2 $\mu$ l의 genomic DNA 또는 백혈구세포가 들어 있는 0.5ml tube에 5 $\mu$ l의 1 $\times$  incubation buffer(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany), 각각 25pmol의

한쌍의 primers, 200nmol의 각 dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 및 1unit의 Taq polymerase(Boehringer Mannheim Biochemica, Germany)를 넣은 후 증류수를 첨가하여 최종 부피가 50 $\mu$ l가 되게 하였다. 여기에 50 $\mu$ l의 mineral oil을 넣은 후 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, USA)을 이용하여 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denaturation시키고 그 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분간의 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간의 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 extension을 35-45번을 반복하였으며, 마지막 주기의 extension은 10분간 시행하였다. 반응이 끝난 후 약 10 $\mu$ l의 증폭산물을 취하여 8% acrylamide gel에 loading하여 75volt로 전기영동한 후 ethidium bromide용액(0.5 $\mu$ g/ml)에서 10분간 염색한 뒤 uv하에서 관찰하였다.

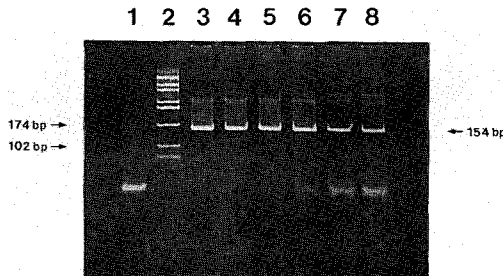
## 결 과

정상 남성과 여성의 혈액에서 추출한 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 시행한 결과는 그림 1에 나타나 있다. 정상 남성의 경우 모두 HaeIII로 절단된 pUC18 DNA 절편을 size markers로 하여 비교했을 때 약 154bp부위에서 증폭산물에 의한 명료한 band가 보였으며, 이것은 Kogan등(1987)이 보고한 것과 일치하였다. 반면에 여성의 경우는 비특이적인 몇개의 band가 희미하게 보였으나 154bp부위에서는 전혀 검출되지 않았다.

성을 감별하는데 있어 PCR이 갖는 장점중의 하나가 민감도가 극히 높아 이론적으로 단 하나의 세포에 존재하는 DNA만으로도 성공적인 증폭이 가능하다는 점이다. 이에 본 실험에서는 PCR의 감도를 알아보기 위해 인간의 세포하나에 존재하는 DNA의 양과 동일한 약 2pg의 농도까지 희석한 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 약 45주기의 증폭반응에서 그림 2에서 보는 것처럼 고농도의 DNA에서 보다는 다소 희미하지만 2pg의 genomic DNA에서도 뚜렷한 band가 보였다. 이것은 본 PCR방법이 단 하나의 세포만을 갖고도 성별 판정이 가능하다는 것을 간접적으로 시사한다. 그러나 이 방법을 단세포에 적용할 수 있는지의 가능성을 보다 확실히 검정해 보기 위하여 직접 세포 하나만으로 PCR을 실시하여 보았다. 그림 3은 micromanipulator를 이용하여 정상 남성과

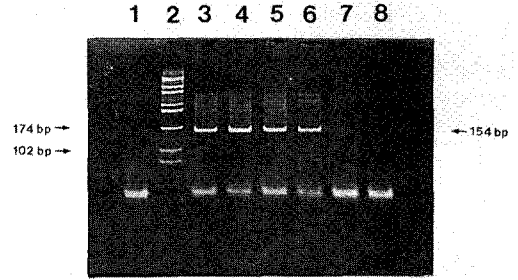


**Fig. 1.** Amplification of Y chromosome specific sequence in the genomic DNA extracted from human blood leukocytes by PCR. Primers used for PCR were described under Materials and Methods. A total of 35 cycles of amplification reaction were repeated for 1 min each at 94, 61 and 72°C. The reaction products were resolved individually using 8% acrylamide gel and visualized under ultraviolet light after staining with ethidium bromide. Template DNAs are as follows: lane 1, no template DNA; lane 2, Hae III-digested pUC18 DNA size markers; lane 3-7, human male genomic DNA (200-500ng); lane 8-10, human female genomic DNA (200-500ng).



**Fig. 2.** Amplification of Y chromosome specific sequence in male genomic DNA diluted to 2pg. A total of 45 cycle of amplification reaction were performed. Lane 1, no template DNA; lane 2, Hae III-digested pUC 18 DNA size markers; lane 3, 100ng male genomic DNA; lane 4, 5ng DNA; lane 5, 100pg DNA; lane 6 10pg DNA; lane 7-8, 2pg DNA.

여성의 혈액에서 백혈구 세포를 하나씩 분리하여 각각에 대해 PCR을 시행한 것으로 그림에서 보는 바와 같이 남성의 혈액에서 분리한 백혈구에서는 모두 Y-염색체에 특이하게 존재하는 부위가 증폭된 산물을 볼 수가 있다. 이 결과는 본 실험에서 사용한 PCR방법이 단 하나의 세포 예를 들어 배아에서 분리해낸 하나의 분할소구(blastomere)만을 갖고도 성별 판정이 가능하다는 것을 시사한다.



**Fig. 3.** Amplification of Y chromosome specific sequence in the single leucocyte isolated from human whole blood using micromanipulate DNA; lane 2, Hae III-digested pUC 18 DNA size markers; lane 3-6, human male leukocyte, lane 7-8, human female leukocyte.

## 고 찰

성의 감별 특히 배아의 초기단계에서의 감별은 경제적인 이유에서 가족을 중심으로 발전되어 오다 근래들어 각종 유전질환에 대한 억제 방편으로 인간에 적용되어지고 있다. 전통적으로 여러가지 방법들이 태아 혹은 배아의 성의 판정에 이용하고자 연구 개발되어지고 있으나 그들이 갖고 있는 각각의 장점에도 불구하고 염색체검사법을 제외하고는 신빙성이 입증되어 있지는 않다. 그러나 근래에 개발된 PCR을 이용한 성의 판정방법은 아직은 널리 이용되고 있지 않아 검사의 정확성이 불분명하나 기존의 염색체검사법에 비해 비교적 경제적이며 5-6시간 정도의 시간이 소요될 정도로 검사 시간이 짧을 뿐만 아니라 세포 하나에 존재하는 정도의 극미량의 DNA만 있어도 검사가 가능할 정도로 감도가 높아 단순히 성의 판정만을 원할 경우 염색체검사법을 대체할 수 있는 것으로 여겨지고 있다. 때문에 많은 연구자들이 PCR을 이용하여 보다 간편히 성을 감별할 수 있는 방법을 연구 개발한 결과 각종 실험동물과 가족에서의 성공 사례를 보고한 바 있다(Bradbury et al., 1990; Herr et al., 1990; Peura et al., 1991; Kunieda et al., 1992). 특히 Handyside등(1990)은 반성유전질환이 의심되는 인간의 배아로부터 하나의 분할소구를 분리한 후 PCR을 이용하여 성을 확인한 뒤 모체에 이식하여 정상적인 착상을 유도한 바 있으며, Han등(1993)은 생쥐 배아의 분할소구에서 성의 판정후 모체에 이식한 다음 산자의 성과 일치하는지의 여부를 관찰

한 바 있다. 본 연구에서도 micromanipulator를 이용하여 남성과 여성의 혈액에서 백혈구 세포를 하나씩 분리하여 각각의 세포에 대해 PCR을 이용하여 Y-염색체의 특이한 염기서열을 증폭한 결과 남성 혈액에서 분리한 세포에서만 특이적 증폭산물이 관찰되어, 이 방법이 궁극적으로 배아의 성을 착상전에 알아보는 데 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

한편 Bradbury등(1990)은 Y-염색체 특이 염기서열이 간혹 정상 남성에서 결손되어 있거나 다른 상동염색체에 전좌될 수 있어 본 방법에 의한 성의 판정에 이의를 제기한 바 있다. 그러나 본 연구에서 약 38명의 남성과 25명의 여성을 대상으로 검사한 결과 100% 성의 일치가 확인되어(결과 제시 안함) 그 가능성은 다소 희박한 것으로 사료된다.

## 결 론

Y-염색체의 특이한 염기서열을 선택적으로 증폭하여 성을 감별하기 위해 정상남성과 여성의 혈액에서 추출한 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 시행하였다. 그 결과 남성의 경우에서만 약 154bp의 증폭산물이 형성됨을 볼 수 있었다.

이 방법이 착상전 배아에 응용할 수 있을 정도로 감도가 높은지의 여부를 알아보기 위해 인간세포 하나에 존재하는 양에 해당하는 약 2pg농도까지 희석된 genomic DNA에 대해 PCR을 행한 결과 명료한 band가 관찰되었다. 또한 남성과 여성의 혈액으로 부터 백혈구 세포를 하나씩 분리한 후 각각의 세포에 대해서 PCR을 행했을 경우 Y-염색체에 특이한 염기서열의 증폭이 이루어져 이 방법이 각종 유전질환이 의심되어 배아의 착상전에 성을 알고자 할 경우 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

Bradbury MW, Isola LM, Gordon JW:Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse

embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87, 4053-4057.

Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ:Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991, 252, 1643-1650.

Han YM, Yoo OJ, Lee KK:Sex determination in single mouse blastomeres by polymerase chain reaction. *J Assisted Reproduction and Genetics* 1993, 10, 151-156.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML:Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990, 344, 768-770.

Herr CM, Matthaei KI, Petrzak U, Reed KC:A rapid Y-chromosome-detecting ovine embryo sexing assay. *Theriogenology* 1990, 33, 245.

Kogan SC, Doherty M, Gitschier J:An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 1987, 317, 985-990.

Kunieda T, Xian M, Kobayashi E, Imamichi T, Moriwaki K, Toyoda Y:Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol Reprod* 1992, 46, 692-697.

Lewin HA, Stewart-Haynes JA:A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. *Biotechniques* 1992, 13, 522-523.

Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y:A human Y-chromosome specific repeated DNA family(DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acid Res* 1986, 14, 7569-7580.

Peura T, Hyttinen JM, Turunen M, Janne J:A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1991, 35, 547-555.