

Fluorescence in Situ Hybridization 시행을 위한 인간정자 탈응축법의 적정화

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소

방 명 겔

The Optimization of Human Sperm Decondensation Procedure for Fluorescence in Situ Hybridization

Myung-Geol Pang

*Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center,
Seoul National University, Seoul, Korea*

= Abstract =

Studies were conducted to determine the efficiency of decondensation protocols. Sperm obtained from seven normal donors was immediately washed after liquefaction and then decondensed using the method of West *et al.* (1989) and my original protocol. My optimized protocol entailed mixing 1 ml aliquots of semen with 4 ml phosphate buffered saline (PBS). Following centrifugation, pellets were resuspended in 1 ml PBS containing 6 mM EDTA. After centrifugation, pellets were resuspended in 1 ml PBS containing 2 mM dithiothreitol at 37°C for 45 min. Following mixing with 2 ml PBS and centrifugation, pellets were resuspended by vortexing. While vortexing, 5 ml of fixative were gently added. Slide preparation was accomplished using the smear method and it was stored at 4°C.

When comparing these protocols, the degree of sperm decondensation and head swelling was monitored by measuring nuclear length, area, perimeter, and degree of roundness using FISH analysis software. Apparent copy number for chromosome 1 and, separately, for the sex chromosomes was determined by FISH using satellite DNA probes for loci D1Z1, DXZ1 and DYZ3.

Sperm treated by my decondensation protocol showed significant increases ($p < 0.05$) in length, area, perimeter, and degree of roundness. There was a significant decrease ($p < 0.05$) in the frequency of nuclei displaying no signal but no change in the frequency of nuclei with two signals in samples decondensed by my protocol.

My data suggested that decondensation using my original protocol may lower the frequency of cells with spurious "nullisomy" due to hybridization failure without inducing spurious "disomy" resulting from increased distances between split signals.

Key Words: Decondensation, Fluorescence in situ hybridization, Sperm, Chromosome 1, Sex chromosome

서 론

인간 생식세포의 세포유전학적 이상은 수정장애, 배아의 전핵시기 발생정지, 초기난할 정지, 임상적으로 인식이 불가능한 시기 즉 착상직후 배아의 사멸, 자연유산, 사산 및 분만후 신생아 사망 같은 인간의 전반적인 생식현상에 수많은 악영향을 끼친다. 다른 악영향으로는 후대에서 정신박약, 기형 혹은 불임과 같은 질환을 야기하기도 한다. 또한 전좌 (translocation) 혹은 역위 (inversion) 같은 세포유전학적 이상을 부모로부터 유전받은 경우 표현형으로는 정상일수 있으나 후에 불균형 생식세포를 생산하게되어 결국 생식현상에 장애를 초래하게 된다. 그러므로 이 생식학적 연관성 즉 세포유전학적 이상이 인간 생식력에 미치는 영향은 후대에 명백하게 나타난다.

투명대 제거 햄스터 난자와 침체반응이 야기된 인간정자의 융합기술에 의해 위의 언급한 현상의 남성 공헌도 즉 어느정도의 이상이 정자에서 기인하는가에 대한 접근을 가능하게 하였다 (Rudak *et al.*, 1978). 그러나 이 방법은 기술상 어렵고, 많은 시간이 소요되며 난자내에 침투한 소수 수정능력이 있는 정자만의 핵형을 분석할 수 있다는 단점이 있다. 최근들어 개발된 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) 기법에 의해 특정 염색체 및 염색체 특정 부위를 직접 관찰할 수 있게되었다 (Kearns & Pearson, 1994). 특정 염색체에 대한 DNA probe를 이용하는 이 방법에 의해 인간정자에서도 염색체 수의 이상 (aneuploidy) 및 다배성 (polyploidy)에 대한 연구가 진행되어 오고 있다.

포유동물 정자의 핵 염색질은 단단하며 종에 따라 크기와 모양이 다르고, DNA가 응축된 상태로 핵내에 포장되어 있다 (Wyrobek *et al.*, 1976; Pogany *et al.*, 1981). FISH를 시행할 때 이러한 정자의 염색질 구조에 의해 DNA probe가 정자핵내로 용이하게 침입할 수 없어 낮은 hybridization 효율 및 높은 위음성 결과를 보이기도 한다.

본 연구는 정자의 염색체 수 이상을 검색하기 위한 FISH 시행전 적정의 정자핵 탈응축 (decondensation) 방법을 개발하는데 있으며, 정자에서 FISH기법을 이용하여 염색체 수 이상 (aneuploidy) 을 검색하고자 할 경우 정확한 정보를 얻을 수 있

도록 기초기술을 제공하는데 목적을 두고 있다.

대상 및 방법

1. 연구대상

최근 2년 이내에 가임능력이 입증된 7명의 가임남성에서 3일간의 금욕기간을 가진 후 정액을 채취하여 본 연구에 이용하였다.

2. 연구방법

1) 정자핵의 탈응축

액화된 정액을 반분하여 한부분은 기존의 방법중 최고의 탈응축 결과를 보였던 방법 중 하나인 West 등 (1989)의 방법에 의거 처리하였고 나머지는 본인이 개발된 방법에 의거 처리하였다.

새로 개발된 방법은 1 ml의 정액을 4 ml의 phosphate buffered saline (이하 PBS로 약함)으로 희석하여 $650 \times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 정자괴에 6 mM ethylenediaminetetraacetic acid (이하 EDTA로 약함)가 함유된 PBS 1 ml로 희석하고 잘 섞은 후 원심분리하였다. 다시 상층액을 제거하고 37°C의 2 mM dithiothreitol (이하 DTT로 약함)이 함유된 PBS 1 ml로 희석하고 37°C 배양기에서 45분간 배양하였다. 배양후 PBS 2 ml를 첨가하고 원심분리하였다. 정자괴 양을 고려하여 적당량의 고정액 (3 parts methanol: 1 part glacial acetic acid)을 첨가하였으며 상온에서 5분간 정치시킨 후 도말법에 의해 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드는 사용전까지 4°C에 보관하였다.

2) FISH

사용한 DNA probe는 1번 염색체, X 염색체 및 Y 염색체에 대한 D1Z1, DXZ1 및 DYZ3였다. D1Z1은 biotin으로 label하여 이용하였고 DXZ1과 DYZ3는 fluorochrome-dUTP로 직접 label하여 이용하였다. D1Z1은 단독으로 이용하였으며, DXZ1과 DYZ3는 각각 Fluorescein isothiocyanate와 rhodamine으로 형광 signal을 구별하였다.

20 ng의 DNA probe (1 μ l), formamide 6 μ l, 20 \times SSC 1 μ l 및 증류수 2 μ l를 섞어 총 10 μ l의 probe mix를 제조하였다. 제조된 probe mix를 42°C로 미리 예열된 슬라이드에 떨어뜨리고 22 \times 22 mm의 coverslip을 덮고 rubber cement로 coverslip을 봉하였다. 이 슬라이드를 80°C에서 5분간 열처리 (denaturation) 한 후 42°C 배양기에서 2시간

hybridization 하였다.

D1Z1로 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. 100 µl의 4×SSC/5% 탈지분유 용액을 슬라이드에 첨가한 후 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. 이후 100 µl의 anti-Avidin 4×SSC/5% 탈지분유 용액 (anti-Avidin 최종농도 = 5 µg / 1000 µl)을 슬라이드에 첨가한 후 30분

간 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.

DXZ1과 DYZ3로 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-indole / ml)을 떨어뜨리고 22×40 mm의 coverslip을 덮은

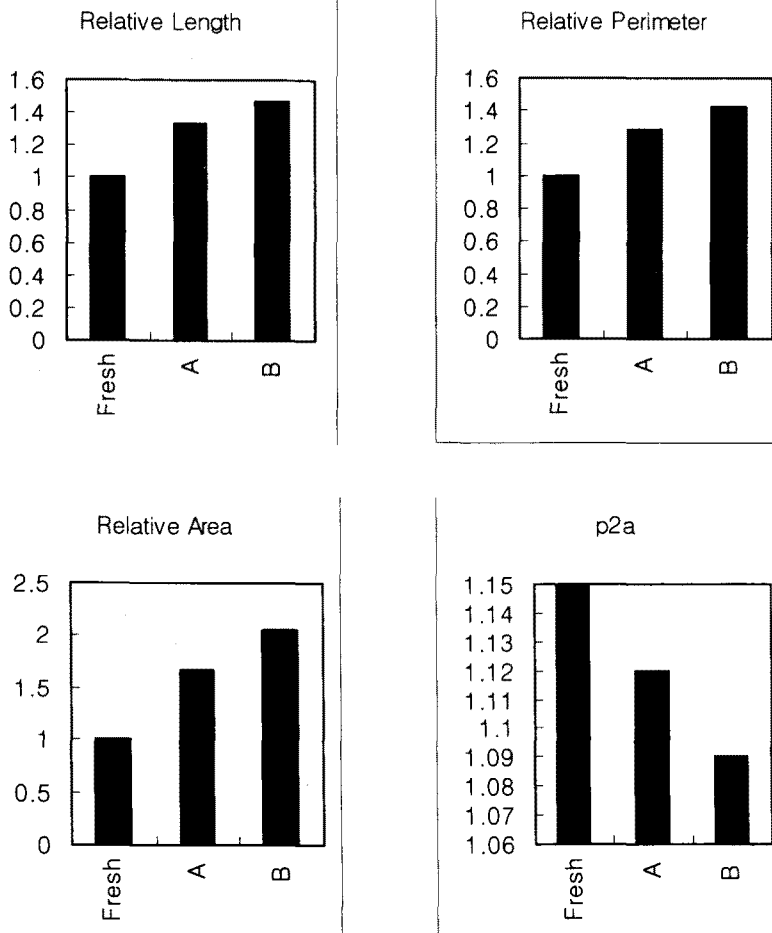


Figure 1. Effects of decondensation procedure on relative sperm nuclear length, perimeter, area, and roundness.

Table 1. Effects of decondensation procedure on sperm head parameters

	Decondensation Procedure		
	None	Procedure A	Procedure B
Relative Area	1.00±0.20	1.67±0.27	2.06±0.32
Relative Perimeter	1.00±0.11	1.28±0.14	1.42±0.15
Relative Length	1.00±0.16	1.33±0.14	1.47±0.16
p2a*	1.15±0.08	1.12±0.05	1.09±0.03

Mean ± S.D.

*Measurement of relative roundness where 1.00 is a perfect circle.

Table 2. Comparison of hybridization efficiencies for chromosome 1

Donor	No Signal		One Signal		Two Signals	
	A	B	A	B	A	B
1	13	3	985	997	3	4
2	15	2	981	996	4	2
3	13	1	983	995	4	4
4	9	3	987	994	4	3
5	8	1	987	993	5	6
6	13	5	984	991	3	4
7	18	6	978	989	4	5
Total	88	21	6885	6955	27	28
Percent	1.3	0.3	98.4	99.3	0.4	0.4

후 × 1,000 형광현미경하에서 형광 signal을 검색하였다.

3) 탈응축 정도 계측

탈응축 정도는 정자머리의 길이, 면적, 둘레 및 구형정도 (p2a)를 BDS Image software (Oncor, Inc., USA)를 이용하여 측정하였으며 상대치로 표시하였다. p2a의 경우 1을 완전한 구형으로 간주되었다.

4) 통계처리

연구결과에 대한 통계학적 분석은 SAS를 이용하여 Chi-square와 Fisher's exact tests를 시행하였으며, p<0.05인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 탈응축 정도의 비교

West 등 (1989)의 방법 (A)과 본인에 의해 개발

Table 3. Comparison of hybridization efficiencies for sex chromosomes

Donor	No Signal		One Signal		Two X's		Two Y's	
	A	B	A	B	A	B	A	B
1	14	5	983	991	0	2	3	2
2	13	6	986	992	1	1	0	2
3	16	2	979	993	3	3	2	2
4	18	4	981	994	1	0	0	2
5	16	3	980	994	2	2	2	1
6	13	7	979	986	5	4	3	3
7	19	9	976	985	3	3	2	3
Total	109	36	6864	6935	15	15	12	15
Percent	1.6	0.5	98.1	99.1	0.2	0.2	0.2	0.2

된 탈응축 방법 (B)의 결과를 표 1과 그림 1에 요약하였다. 탈응축 처리 후 각각 약 4,000개의 정자에서 정자의 물리변수를 계측하였는데 정자머리의 길이, 면적 및 둘레에 있어서 방법 B에서 유의하게 증가됨을 나타내었다 (p<0.05). p2a에 있어서 protocol B의 정자머리 모양이 1에 가까운 구형을 나타내었다.

2. Hybridization의 효용성

방법 B에서 FISH 시행 후 형광 signal을 나타내지 않는 정자의 빈도가 현저히 감소되었으며 (p<0.05), 1개의 signal을 보이는 정자의 빈도는 높았다 (p<0.05). 두 개의 signal을 나타내는 정자의 빈도는 양군간에 차이가 없었다 (Table 2, 3, Fig. 2). 이러한 경향은 염색체 1번 및 성 염색체에서 동일한 양상을 보였으며, FISH를 직접법으로 시행하건 혹은 간접법으로 시행하건 동일한 경향을 보였다. 방법 B의 hybridization 효용성은 99% 이상이었다.

고 찰

인간을 포함한 포유동물의 정자 염색질은 불활성화 되어 있으며 단단히 응축된 상태로 포장되어 있다. 일반 체세포에서 발견되는 histone은 정자합성 말기에 정자 특이 protamine으로 대체된다. 정자의 부고환내 성숙시 인접한 protamine 사이에 intermolecular disulfide bonds가 형성되어 정자 염색질이 단단히 응축되어 있도록 유지시킨다 (Balhorn, 1982; Rodman et al., 1982) (Fig. 3).

이 DNA-protamine 복합체의 견고한 포장때문

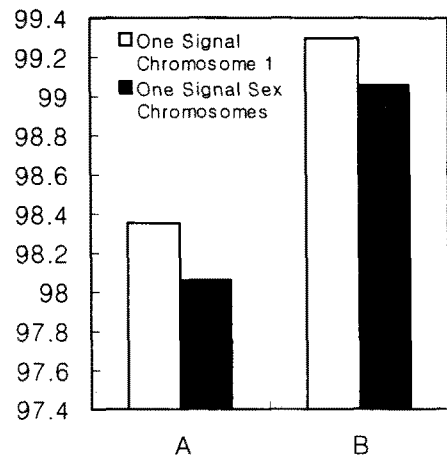
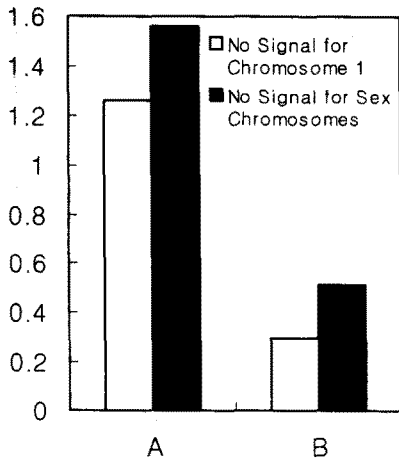


Figure 2. Comparison of hybridization efficiencies for chromosome 1 and the sex chromosomes after decondensation.

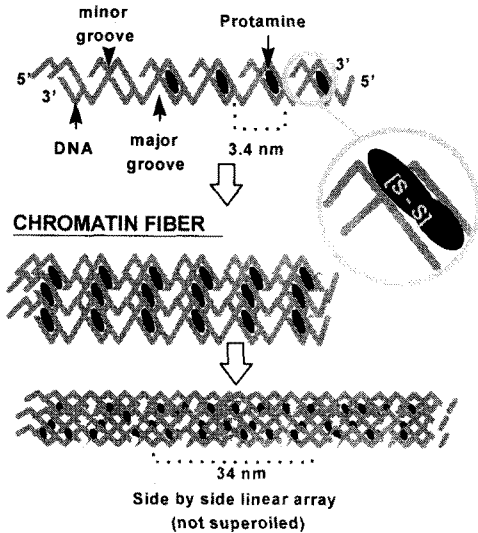


Figure 3. DNA packaging in sperm nuclei.

에 DNA probe가 정자 염색질내로 침투하기 어렵다. 그러므로 정자핵의 탈응축 (decondensation)은 FISH 적용에 선행되어야 할 우선과제이다.

정자에 FISH를 시행하기전 DNA probe가 용이하게 침입하여 정자 염색질과 hybridization이 되려면 우선 disulfide bridge를 열어 정자 염색질을 탈응축 시켜야 한다. 이를 위하여 disulfide 감소제가 이용되고 있다.

West 등 (1989)과 Han 등 (1992, 1993)은 정자의 탈응축을 EDTA와 DTT로 야기시킨 후 성공적으로 형광 signal을 관찰할 수 있었다. 다른 시도로는 trypsin과 DTT (Joseph *et al.*, 1984; Coonen *et*

al., 1991), sodium dodecyl sulphate와 DTT (Calvin and Bedford, 1971)를 이용하는 방법이 보고되었다. Guttenbach와 Schmid (1990, 1991)는 FISH 시행전의 DNA 변성시간 (denaturation)을 연장시킴으로서 80%의 정자를 팽창 또는 탈응축 시킬 수 있었다. Wyrobek 등 (1990)은 정자를 lithium diiodosalicylate로 탈응축 시킨 후 alkylmethylammonium과 DTT를 혼합하여 처리하므로서 좋은 결과를 얻을 수 있었으나 이 방법은 많은시간을 소비하여야 한다는 단점이 있다.

탈응축 방법의 효용성은 탈응축 후 정자핵의 물리적 변화 및 FISH 시행 후 정확한 signal의 발현빈도로 판단되어야 한다. 본 연구에서는 EDTA와 DTT를 이용하는 West 등 (1989)의 방법을 변형, 개선한 탈응축 방법을 개발하였다. 이 방법은 처리 후 정자핵의 길이, 면적, 둘레 등의 물리적 형태를 기존 방법에 비해 현저히 증가시켰으며, 구형정도 (degree of roundness)도 기존방법에 비해 훨씬 구형에 가까운 모양으로 변화시켜 효과적인 탈응축 방법으로 제시되었다. 또한 정상인의 정자에서 FISH 시행 후 99.6%의 정자가 형광 signal을 발현하였고 형광 signal을 발현하지 않는 정자의 빈도를 감소시켰다. 형광 signal을 발현하지 않는 경우에는 두가지의 가능한 해석을 할 수 있다. 실제로 해당 염색체가 존재하지 않거나 혹은 해당 염색체는 존재하나 DNA probe가 침투하지 못한 hybridization 실패로 인한 위음성 결과로 해석할 수 있다. 또한 두개의 signal을 발현하는 정자의 빈도가 기존방법에 비해 증가

하지 않았는데 이는 개발된 탈응축 방법에 의해 정자핵의 탈응축은 현저히 증가되었으나 이로 인한 위음성 결과 (split signals)는 증가하지 않았음을 암시한다. 두 개의 signal 발현도 역시 두가지의 가능한 해석을 할 수 있다. 즉 실제로 두 개의 해당 염색체가 존재하는 경우 혹은 해당 염색체는 한개 존재하나 과도한 탈응축에 의해 인위적으로 야기된 split signals로 생각할 수 있다.

Wyrobek 등 (1990)은 정자의 불완전한 탈응축에 의해 무염색체 (nullisomy)의 빈도가 높게 나타나기도 한다고 보고하였다. 또한 Wyrobek 등 (1993)은 탈응축된 인간정자에서 confocal microscopy를 이용하여 satellite DNA probes가 2개에서 8개의 domains로 쪼개져 보임을 보고하였다. 이러한 문제는 FISH시행전 정자의 탈응축 방법이 부적절하기 때문에 야기되는 문제이다. Kearns 등 (1996)은 정상인의 정자를 대상으로 FISH를 시행하였던 여러 연구자들의 이염색체 (disomy) 빈도가 큰 차이가 있는데 이는 각 보고자가 사용하는 정자핵의 탈응축 방법에 기인한다고 보고하였다.

본 연구결과와 본 연구자에 의해 새로 개발된 방법이 기존의 방법에 비해 정자핵의 탈응축 및 FISH 효율을 크게 개선하여 정자에서 정확한 염색체 수 이상 빈도를 검색할 수 있는 기초를 마련했으며 정자에서의 염색체 수 이상에 대한 정확한 정보를 얻을 수 있는 기술을 설정하였다고 사료된다.

결 론

본 연구는 정자의 염색체 수 이상을 검색하기 위한 FISH 시행전 적정의 정자핵 탈응축 (decondensation) 방법을 개발하고, 정자에서 FISH기법을 이용하여 염색체 수 이상 (aneuploidy)을 검색하고자 할 경우 정확한 정보를 얻을 수 있도록 기초기술을 제공하기 위하여 고안하였으며, 결과는 다음과 같다.

탈응축 처리 후 물리변수를 계측한 결과, 정자머리의 길이, 면적 및 둘레가 본인에 의해 개발된 방법에서 유의하게 증가됨을 나타내었으며 ($p < 0.05$), p2a에 있어서도 정자머리 모양이 1에 가까운 완전한 구형을 나타내었다.

개발된 방법에서 FISH 시행 후 형광 signal을 나타내지 않는 정자의 빈도가 현저히 감소되었

으며 ($p < 0.05$), 1개의 signal을 보이는 정자의 빈도는 높았다 ($p < 0.05$). 두 개의 signal을 나타내는 정자의 빈도는 양군간에 차이가 없었다. 이러한 경향은 염색체 1번 및 성 염색체에서 동일한 양상을 보였으며, FISH를 직접법으로 시행하건 혹은 간접법으로 시행하건 동일한 경향을 보였다. 방법 B의 hybridization 효용성은 99% 이상이었다.

본 연구결과 새로 개발된 방법이 기존의 방법에 비하여 정자핵의 탈응축 및 FISH 효율을 크게 개선시킨 것으로 생각된다. 따라서 정자의 정확한 FISH 결과를 검색할 수 있는 기초를 마련하였다고 사료된다.

인 용 문 헌

- Balhorn R: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982, 93, 298-305.
- Calvin H, Bedford JM: Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil* 1971, Suppl 13, 65-75.
- Coonen E, Pieters MHEC, Dumoulin JCM, Meyer H, Evers JLH, Ramaekers FCS, Geraedts JPM: Nonisotopic in situ hybridization as a method for nondisjunction studies in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1991, 28, 18-22.
- Guttenbach M, Schimid M: Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1990, 46, 553-558.
- Guttenbach M, Schimid M: Non-isotopic detection of chromosome 1 in human meiosis and demonstration of disomic sperm. *Hum Genet* 1991, 8, 261-265.
- Han TL, Webb GC, Flaherty SP, Correll A, Matthews CD, Ford JH: Detection of chromosome 17- and X-bearing human spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 1992, 33, 189-194.
- Han TL, Ford JH, Webb GC, Flaherty SP, Correll A, Matthews CD: Simultaneous detection of chromosome X- and Y-bearing human spermatozoa by double fluorescence in situ hy-

- bridization. *Mol Reprod Dev* 1993, 34, 308-313.
- Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC: Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridization. *Hum Genet* 1984, 66, 234-238.
- 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.
- Pogany GC, Corzett M, Weston S, Balhorn R: DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Exp Cell Res* 1981, 136, 127-136.
- Rodman TC, Pruslin FH, Allfrey VG: Mechanisms of displacement of sperm basic nuclear proteins in mammals. An in vitro simulation of post-fertilization results. *J Cell Sci* 1982, 53, 227-244.
- Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R: The chromosome constitution of human spermatozoa: a method of direct chromosome analysis. *Nature* 1978, 274, 911-913.
- West JD, West KM, Aitken RJ: Detection of Y-bearing spermatozoa by DNA-DNA in situ hybridization. *Mol Reprod Dev* 1989, 1, 201-207.
- Wyrobek AJ, Alhborn R, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D: Fluorescence in situ hybridization to Y chromosomes in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 1990, 27, 200-208.
- Wyrobek AJ, Meistrich ML, Furrer R, Bruce WR: Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophysical J* 1976, 16, 811-825.
- Wyrobek AJ, Robbin WA, Tang C, Kobayaski A, Baulch J, Weier HU, Pinkel D: Hierarchical organization of human chromatin is a critical factor in the detection of chromosome aneuploidies in fluorescence in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1993, Suppl, 53, 30.