

단일 태아세포에서의 PEP-PCR을 이용한 성의 결정과 Dystrophin 유전자 분석

삼성 제일병원 유전학연구소, 산부인과*

최수경 · 김진우 · 조은희 · 박소연 · 류현미* · 강인수*

Analyses of Dystrophin Gene and Sex Determination using PEP-PCR in Single Fetal Cells

Soo Kyung Choi, Jin Woo Kim, Eun Hee Cho, So Yeon Park,
Hyun Mee Ryu* and Inn Soo Kang*

Genetic Research Lab., Dep. of Obstetrics and Gynecology Samsung Cheil Hospital &
Women's Healthcare Center*

= Abstract =

Recently, through the development of the primer extension preamplification(PEP) method which amplifies the whole genome, simultaneous multiple DNA analysis has become possible. Whole genome from each single cell can be amplified using 15 base oligonucleotide random primer. The greatest advantage of PEP-PCR is the ability to investigate several loci simultaneously and confirm results by analysing multiple aliquots for each locus. This technique led to the development of preimplantation genetic disease diagnosis using blastomere from early embryo, sperm, polar body and oocyte. In this study, we applied PEP-PCR in 20 cases of single amniocyte and 20 cases of single chorionic villus cell for the clinical application of the prenatal and preimplantational genetic diagnosis. We analysed 7 gene loci simultaneously which are 46, 47 exons related to dystrophin gene, two VNTR (variable number tandem repeat) markers using 5'dys III, 3'CA related to dystrophin gene and DYZ1, DYZ3, DYS14 regions on chromosome Y. In all the tests, 97.5% of PEP-PCR amplifications with single cells were successful. We obtained 38/40 (95%) accuracy in gender determination through chromosome analysis comparison. Therefore, these results have significant implications for a sperm or oocyte analysis and prenatal or preimplantational genetic diagnosis.

서 론

최근 유전질환 및 염색체 이상을 수정란 시기에 유전적 진단을 수행하여 건강한 태아를 임신할 수 있는 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis: PGD)이 개발되었다 (Handyside 등, 1990). 이러한 착상전 유전진단은 체외수정 시술 후 4-8세포기의 수정란에서 1개 혹은 2개의 할구

를 분리하여 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction: PCR) 또는 형광 직접 보합법 (fluorescent in situ hybridization: FISH)을 이용하여 유전질환 여부 및 염색체 이상을 착상전에 진단, 정상 수정란을 선택하여 모체의 자궁내에 이식함으로써 건강한 아기를 임신케 하는 방법으로서는 환아의 출생을 예방할 수 있는 첨단 산전진단법이라 할 수 있다 (Munne 등, 1994; Rechitsky 등, 1996).

이 방법은 할구분리 후 8-12 시간 이내에 유전자 진단을 수행하는 것이 바람직하다 (Dawson 등, 1995). 기존의 PCR 방법은 4-6 시간내에 목표 유전자를 증폭하여 유전적 진단이 가능한 기술임에도 불구하고, 수정란에서 하나의 할구를 분리하여 진단을 할 경우 동시에 2개 이상의 유전자 증폭이 어려웠으며, 또한 할구세포의 미량 DNA의 증폭에도 어려움이 많아 4-21%의 실패율이 보고되고 있다 (Strom 등, 1991). 15염기의 random oligonucleotide primer를 이용하여 단일 세포의 핵내에 존재하는 전체 genome DNA를 증폭시킨 후 동시에 여러 유전자의 부위를 진단할 수 있으며 반복실험으로 결과의 신뢰도를 높힐 수 있는 primer extension preamplification PCR (PEP-PCR) 기술의 개발로 많은 유전질환에서 착상전 유전진단의 어려움을 해결할 수 있게 되었다 (Zhang 등, 1992; Xu 등, 1993).

듀센형 근이양증 (Duchenne muscular dystrophy: DMD)은 치명적인 X 연관 열성 유전병 (X-linked recessive disease)으로 3,500명 중 1명 꼴로 발병한다. 이 근이양증에 관여하는 유전자는 Xp21에 위치하며 2.3Mb 크기의 거대유전자로서 dystrophin이라는 근육의 세포막 단백질을 만든다. 근이양증 환자의 60% 이상이 dystrophin 유전자의 엑손 (exons) 결실로 질환이 발생된다. 이런 경우 Multiplex-PCR을 이용하여 98% 이상 엑손의 결실 여부를 직접적으로 확인할 수 있고, 또한 연관분석을 통하여 보인자 여부 및 태아의 산전진단을 수행할 수 있다 (Beggs 등, 1990; Chamberlain 등, 1988). 최근에는 이러한 근이양증 환자가 존재하는 가계의 보인자를 대상으로 착상전 유전자 진단을 수행한 후 정상 수정란만을 선택하여 환아의 임신 예방할 수 있다 (최 등, 1996).

본 연구는 추후 근이양증 가계의 착상전 유전자 진단의 임상적용 및 태아의 조기 유전진단에 적용하고자 음모막 음모채취법과 양수천자로 부터 얻어진 단일 태아세포를 대상으로 PEP-PCR을 수행한 후 dystrophin 유전자의 엑손 46, 47 부위와 성의 구별, 보인자 확인을 위한 연관분석을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

10-12주 임신부의 음모막 음모세포에서 분리

한 20개의 단일세포와 13-17주 임신부의 양수천자 (amniocentesis)로부터 얻어진 3-5개의 양수세포 20개의 태아 세포를 대상으로 PEP-PCR을 통한 유전자 분석을 수행하였다. 해부현미경 (stereo microscope)하에서 미세 파이펫을 이용하여 각각의 세포들로부터 하나의 세포를 분리한 후 Dulbecco's phosphate buffer saline (D-PBS: GIBCO) 용액에 3회 세척을 하였다. 미리 준비된 10 μ l의 증류수와 50 μ l의 mineral oil이 덮인 PCR 튜브에 세척이 끝난 단일 세포들을 넣었다. 또한 실험과정중의 오염 여부 확인을 위하여 각각의 양수세포 및 음모막 세포와 함께 D-PBS만을 첨가한 표준 대조군 튜브를 만들어 실험을 병행하였다. -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 보관하고 실온에서 20분 동안 녹인 후 다시 -70 $^{\circ}$ C에 옮겨 동결하는 과정을 3회 반복하고, 95 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열한 후 PEP-PCR을 수행하였다.

2. PEP-PCR 과정

50 μ l의 PEP 용액 (final conc.: 10mM HCl-Tris pH 8.3, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 100mM each of dNTP, 35 μ M 15 base oligonucleotide primers)을 첨가한 후 7.5U/ μ l Taq polymerase (TaKaRa)를 즉시 넣어 혼합액이 잘 섞은 후 짧게 원심분리 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분 1회 실시한 후 92 $^{\circ}$ C에서 1분 30초, 37 $^{\circ}$ C에서 2분 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 4분의 조건으로 50회 반복하여 증폭하였다.

3. PCR을 통한 특이 유전자 증폭 및 확인

성의 구별을 위해서 PEP-PCR 생성물 5 μ l씩을 각기 주형으로 하여 Y 염색체 내의 DYS14 부위 (Y1.5/Y1.6, Y1.7/Y1.8), DYZ3 부위 (aliphoid repeat Y: Y1, Y2), DYZ1 부위 (Y1.1, Y1.2)의 primers를 이용하여 PCR을 실시하였다 (Table 1). Y 염색체 특이 부위로서, Y1.5/1.6은 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 62 $^{\circ}$ C에서 1분 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 50회, Y1.7/1.8은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 25회, Y1/2는 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초씩 50회, Y1.1/1.2는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 61 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분씩 40회를 각각 실시하였다. dystrophin 유전자의 결실 여부를 측정하기 위하여 PEP-PCR 생성물 10 μ l와 엑손 46, 47 primers를 사용하여 PCR을 실시하였다. 엑손 46의 경우 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 57 $^{\circ}$ C에서 2분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분씩 30회 실시하였고, 엑손 47은

Table 1. Nucleotide sequences, product sizes and PCR time of oligonucleotide primers in exon 46, 47, 5'dysIII, 3'CA of dystrophin gene regions and Y specific regions(DYS14, DYZ1, DYZ3)

primers	sequences	sizes(bp)	time ^b
Exon 46	GCTAGAAGAACA AAAAGAATATCTT CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTT	148	2h 30m
Exon 47	CGTTGTTGCATTTGTCTGTTTCAGTTAC GTCTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	181	2h 30m
5'dysIII	TTTTTTAGGTATAACTTACATACAATAAAACC GTGACAATAAGCATATCAGTGGCTGCC	≈220 ^a	2h 20m
3'CA	GAAAGATTGTAAACTAAAGTGTGC GGATGCAAAACAATGCGCTGCCTC	≈134 ^a	2h 20m
DYS14	CTAGACCGCAGAGGGCCCAT TAGTACCCACGCCTGCTCCGG	239	3h
	CATCCAGAGCGTCCCTGGCTT TTTCCACAGCCACATTTGTC	198	2h
DYZ1	TCCACTTTATTCAGGCCTGTCC TTGAATGGAATGGGAACGAATGG	149	3h
DYZ3	ATGATAGAACGGAAATATG AGTAGAATGCAAAGGGCTCC	170	3h

^a : different alleles by polymorphism

^b : TaKaRa PCR Thermal Cycler TP 3000

94℃에서 30초, 68℃에서 4분씩 30회 실시하였다. Dystrophin 유전자의 연관분석을 위하여 5'dysIII와 3'CA primers 에 PEP-PCR 생성물 10μl 를 넣고 PCR을 실시하였다. 5'dysIII의 경우 94℃에서 30초, 53℃에서 30초, 65℃에서 4분씩 35회 실시하고, 3'CA는 94℃에서 30초, 58℃에서 4분씩 35회 실시하였다.

위의 모든 실험에 사용된 대조군의 DNA의 양은 50ng을 사용하였고, PCR 생성물의 확인은 ethidium bromide (EtBr)이 포함된 2% agarose gel 에 전기영동한 후 자외선에서 PCR로 증폭된 DNA 생성물을 확인하였으며, 5'dysIII 와 3'CA의 PCR 생성물의 확인은 8%의 polyacrylamide gel에 전기영동을 시행하여 EtBr solution에 염색한 후 자외선을 통하여 확인하였다.

결 과

각각 20예의 양수세포와 음모막세포를 대상으로 PEP-PCR을 실시하여 얻어진 생성물을 주형으로 하여 dystrophin 유전자의 엑손 46, 47 부위와 VNTR 마커인 5'dysIII 와 3'CA를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 양수세포 20예에서는 모두 PCR 생성물을 얻을 수 있었고 음모막세포는 20예중 19예에서 결과를 얻어 전체 97.5%

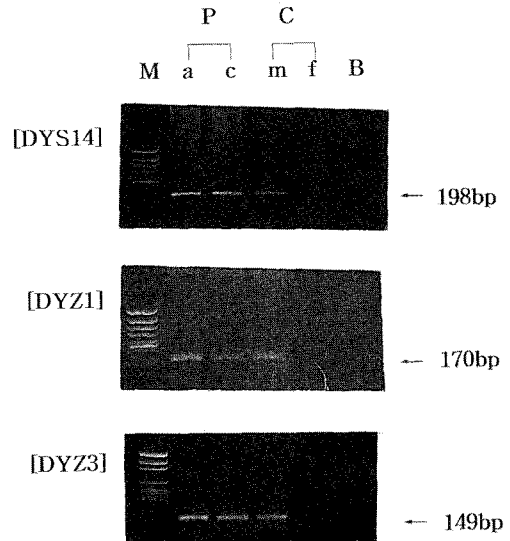


Fig. 1. PCR results for gender determination of single cells by PEP-PCR. M: marker(ϕ X174-hinc II), P: PEP-PCR samples(a: single amniocyte male, c: single chorionic villus cell male), C: control(m: male, f: female), B: blank.

(39/40)의 높은 증폭율을 보였다. 음모막세포 1예는 증폭되지 않은 위음성의 결과를 보여 PEP-PCR의 실패율은 2.5% (1/40)였다.

성의 구별을 위한 Y 염색체의 DYS14, DYZ1, DYZ3 유전자 부위의 PCR 결과 (Fig.1)는 염색체

Table 2. Comparison of sexing results of single amniocytes and chorionic villi cells between PCR and chromosome analysis

	false negative, male cells	false positive, female cells	same results
Amniocyte	0/9	1/11	19/20 (95%)
Chorionic villus cells	1/11	0/8	19/19 ^a (100%)

^a : including the two cases with abnormal karyotype, 1 case(47,XY+der(7)) and 1 case(45,X).

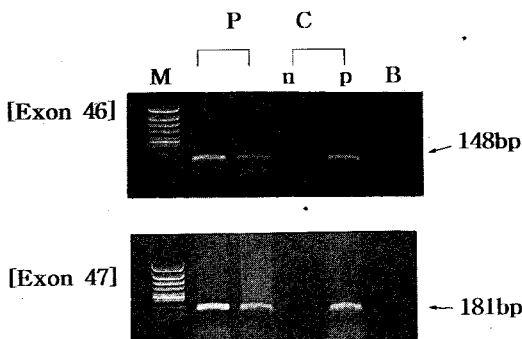


Fig. 2. PCR results for exon 46, 47 of dystrophin gene from single cells by PEP-PCR. M: marker(ϕ X174-Hinc II), P: PEP-PCR samples, C: controls(n: negative, p: positive), B: blank.

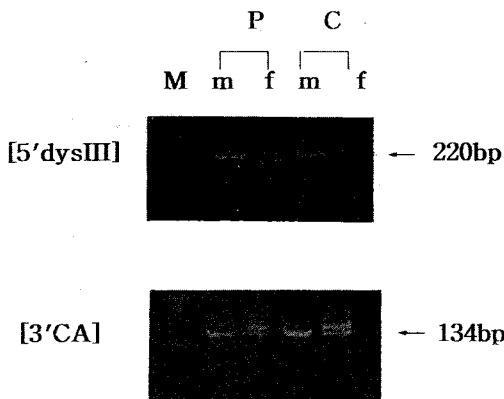


Fig. 3. PCR-based linkage analyses using 3'CA repeat and 5'dysIII microsatellite primers of dystrophin gene from single cells by PEP-PCR. M: marker(ϕ X174-Hinc II), P: PEP-PCR samples, C: controls (m: male, f: female).

의 분석 결과와 비교하였을 때, 20예의 양수세포 중 1예에서 여아이면서 Y 특이 유전자의 생성물이 관찰되어 위양성의 결과를 보였다. 나머지

19예에서는 염색체 분석 결과와 PCR 결과가 일치하였다. 또한 20예의 음모막세포에서는 PEP-PCR이 실패한 1예를 제외하고 염색체 결과와 일치하는 결과를 보였다 (Table 2).

엑손 46, 47의 PCR 결과는 PEP-PCR을 실패한 1예를 제외하고 39예에서 양성 반응을 나타냈고 (Fig.2) 보인자 여부를 확인하기 위한 연관분석에서는 dystrophin 유전자의 microsatellite primers인 5'dysIII 와 3'CA를 이용하여 PCR을 수행한 결과 여성에서는 동형접합체 (homozygote) 및 이형접합체 (heterozygote)로서 한 개 혹은 두 개의 밴드를 확인할 수 있었으며 남성에서는 반접합체 (hemizygote)로서 한 개의 밴드만을 관찰할 수 있었다 (Fig.3). 또한 40예의 표준 대조군으로서 D-PBS용액만 첨가한 blank에서는 성의 구별, 엑손 46, 47, 5'dysIII 와 3'CA의 PCR 생성물에서는 모두 음성의 결과를 보여 실험과정 중의 오염의 가능성을 배제할 수 있었다.

고 찰

5-10pg의 미량 DNA를 포함하고 있는 단일 태아세포를 이용하여 유전자 진단이 가능하게 된 것은 유전학 분야에 있어 매우 중요한 일이라 할 수 있다. 세포를 배양하지 않고 미량의 태아세포를 이용하여 산전진단이 가능하며, 생식세포와 단일세포의 유전자 진단 및 CGH (comparative genomic hybridization) 방법을 이용한 염색체 진단이 가능하여 임상에도 적용될 수 있기 때문이다 (Kallionemi 등, 1992). 이러한 단일세포 및 생식세포의 유전자 진단에 이용하기 위한 PEP-PCR 후의 DNA 양은 본래 DNA 양에 적어도 1,000 copies 정도 된다고 한다 (Paunio 등, 1996). 생식세포 및 단일세포를 이용한 기존의 PCR은 목표 유전자 1개 혹은 2개 부위의 분석만이 가능한 반면 PEP-PCR을 이용한 유전자 진단은 많은 주형을 얻을 수 있기 때문에 단일 세포 1개를 이용하여 동시에 여러 부위의 유전자 진단이 가능하며 연관분석 및 직접 염기서열 또는 점돌연변이의 유전자 분석까지도 가능하다. 본 실험에서는 단일 태아 세포를 이용하여 97.5% 증폭율을 얻었으며, 수정란의 할구세포를 이용한 Xu 등 (1993)의 결과 (78.3%)와 비교하여 높은 증폭율을 얻었다. 또한 양수세포를 이용한 결과에서는 95%의 증폭율을 얻어 Strom 등 (1991)의 80%에

비해 높은 결과를 얻을 수 있었으며, Findly 등 (1995)의 체세포 및 할구세포를 대상으로 수행된 PCR 결과는 97%의 증폭율을 보여 본 연구성과 유사하였다. 연구 결과의 차이는 PCR 과정의 조건이나 primer의 선택과도 관련이 있을 것으로 생각된다.

일반적으로 PEP-PCR을 30회 증폭했을 때 총 genome DNA의 약 78%가 증폭된다고 한다 (Zhang 등, 1992). 이러한 방법으로 많은 주형을 얻어 필요에 따른 유전자 부위 및 여러 가지 유전자 분석도 동시에 가능하였다. 본 실험에서는 높은 증폭율과 많은 양의 주형을 얻기 위하여 증폭 횟수를 50회로 증가시켜 수행하여 7개 유전자 부위를 동시에 진단할 수 있었다. PEP-PCR에 소요되는 시간은 약 7시간이며, 필요에 따른 유전자 분석을 위한 PCR의 경우 3-5 시간이 소요된다 (Table 1). 본 실험의 총 소요시간은 9-12 시간으로 수정 후 3일 이내에 수정란을 이식하여 착상과 임신에 있어 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. Rojas 등 (1995)은 10세포의 단일 양수 세포를 이용한 PCR 결과 100%의 정확율을 보였으나, 본 연구에서는 3-5 세포를 이용하여 97.5%의 결과를 얻을 수 있었다.

본 실험에서는 오염을 방지하기 위하여 멸균된 기구의 사용과 샘플의 전처리 및 PCR을 위한 시약제조를 위한 실험실을 따로 분리하여 수행하였으나 1예가 여아임에도 위양성의 결과를 보여 좀더 오염에 신중을 기해야 할 것으로 생각된다. 음모막 세포의 1예는 PEP-PCR 증폭에 실패하였다. 원인은 알 수 없지만 세포를 옮기는 과정, 비정상적 핵, 불충분한 세포 변성과정, 염색체 내의 단백질에 의한 DNA의 증폭 저해 등이 원인으로 판단된다. 또한 잘못된 진단을 막기 위해서 위양성 및 비특이적 밴드가 관찰될 수 있는 재증폭 (re-amplification)이나, 40회 이상 PCR을 실시하는 것은 바람직하지 않다 (Rojas 등, 1995). 또한 Y 유전자를 이용한 PCR의 경우, 음성의 결과가 나왔을 때 음성의 결과가 성이 여성이기 때문인지, 남성에서의 위음성으로 PCR 증폭의 실패인지를 확인할 수 있도록 X와 Y 염색체 특이 유전자 부위를 동시에 증폭하여 확인하는 dual PCR을 시행해 볼 만하다 (Strom 등, 1991; Katagiri와 Katayama, 1996).

착상전 유전진단시 PCR을 이용하여 성을 결정할 때 주의를 기울여야 할 것은 mosaicism 확

인이 불가능하므로 진단에 신중을 기해야 한다. 본 실험에서도 염색체 분석 결과, 1예의 47,XY+der(7)와 1예의 45,X가 관찰되었다. 특히 성의 결정 및 성염색체 이상을 함께 관찰하기 위해서는 PCR을 통한 성의 결정에는 한계가 있기 때문에 FISH를 병행하는 것이 유용하다 (Katagiri와 Katayama, 1996). 또한 103예의 남아 섬유아세포를 이용하여 성을 구별하였을 때, PCR 실패율 (10%)보다 FISH (5%)의 실패율이 낮은 것으로 보고된 바 있다 (Rechitsky 등, 1996). 하지만 일반적으로 FISH의 경우 염색체의 수적 이상 진단에만 이용될 뿐 여러 유전자 부위를 확인할 수 없는 단점이 있다.

따라서 태아의 단일세포를 이용한 PEP-PCR 방법은 성의 구별 및 여러 유전자 부위를 동시에 진단할 수 있으므로 세포배양을 하지 않고도 만 24 시간 이내에 결과를 얻을 수 있어 양수세포 및 음모막세포를 이용한 산전진단에도 유용하게 적용될 수 있을 것으로 생각되며, 착상전 유전자 진단의 임상적용에 유용하게 이용될 것으로 생각된다. 또한 이러한 방법으로 염색체 분석이 어려운 생식세포와 고형암세포의 핵형분석 및 유전자 분석에도 많은 도움을 줄 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 단일세포 및 생식세포의 산전진단 및 착상전 유전자 진단을 확립하기 위한 기초 연구로서 단일 양수세포와 음모막세포를 이용하여 PEP-PCR을 수행한 후 유전자 분석을 시행하였다.

1. 각각 20예의 단일 양수세포와 음모막세포를 이용하여 PEP-PCR을 시행한 결과 97.5% (39/40)의 증폭율을 얻었다. 1예의 음모막세포는 PEP-PCR 증폭에 실패하였다.

2. PEP-PCR 생성물을 이용한 성의 구별을 위한 분석결과에서는 95% (38/40)에서 염색체 분석 결과와 일치하였다. 양수 1예는 PCR 과정 중의 위양성으로 여아임에도 Y 유전자 밴드가 관찰되었으며, 음모막 세포 1예는 PEP-PCR에 실패하여 결과를 얻을 수 없었다.

3. dystrophin 유전자의 결실을 보기 위한 엑손 46, 47 유전자 부위와 보인자 여부를 확인하기 위한 5'dysIII와 3'CA 마커를 이용한 연관분석 결과에서는 PEP-PCR에 실패한 1예를 제외하고 39예 모두 증폭되어 97.5% (39/40)의 결과를 얻을

수 있었다.

따라서 본 연구에 사용된 태아세포의 PEP-PCR을 이용한 유전자 분석결과는 97.5%의 높은 증폭율을 얻었으며 추후 산전진단 및 생식세포를 이용한 착상전 유전자 진단의 임상적용에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Beggs AH, Koenig M, Boyce FM and Kunkel LM: Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990, 86, 45-48.
- Chamberlain J, Gibbs R, Ranier J, Nguyen PN and Caskey T: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988, 16, 11141-11156.
- Dawson KJ, Conaghan J, Ostra GR, Winston RML, Hardy K: Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. *Hum Reprod* 1995, 10, 177-182.
- Findly I, Ray P, Quirke P, Rutherford A and Lilford R: Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres: implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis. *Hum Genet* 1995, 10(6), 1609-1618.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K and Winston RML: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990, 344, 768-780.
- Kallionemi A, Kallionemi OP, Suder K, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F and Pinkel D: Comparative genomic hybridisation for molecule cytogenetic analysis of solid tumours. *Science* 1992, 258, 818-821.
- Katagiri Y and Katayama S: Influence of mosaicism of sexing of human preembryos detected by the polymerase chain reaction. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13(7), 586-591.
- Munne S, Grifo J, Cohen J and Weier HUG: Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple-probe FISH study. *Am J Hum Genet* 1994, 55, 150-159.
- Paunio T, Reima I and Syvanen AC: Preimplantation diagnosis by whole-genome amplification, PCR amplification, and solid-phase minisequencing of blastomere DNA. *Clin Chem* 1996, 42(9), 1382-1390.
- Rechitsky S, freidine M, Verlinsky Y and Strom CM: Allele dropout in sequential PCR and FISH analysis of single cells(cell recycling). *J Assist Reprod Genet* 1996, 13(2), 115-124.
- Rojas FJ, Asch RH, Garner C, Balmaceda JP, Schiewe M and Moretti-Rojas I: Enzymatic amplification of specific deoxyribonucleic acid sequences from single cells: evaluation of a simplified and rapid method for use in preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 1995, 64, 255-260.
- Strom CM, Rechitsky S and Verlinsky Y: Reliability of gender determination using the polymerase chain reaction(PCR) for single cells. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1991, 8(4), 225-229.
- Xu K, Tang Y, Grifo JA, Rosenwaks Z and Cohen J: Primer extension preamplification for detection of multiple genetic loci from single human blastomeres. *Hum Reprod* 1993, 8(12), 2206-2210.
- Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W and Arnheim N: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 5847-5851.
- 최수경, 이은호, 이호준, 전진현, 강인수, 백은찬, 류현미, 전종영: 근이양증 기계에서의 PEP-PCR을 이용한 착상전 유전자 진단. 대한불임학회잡지, 23, 109-114.