

## Evaluation of a Multiplex PCR Kit Used for Detecting Y Chromosome Microdeletions

Mi Young Park, M.D.<sup>1</sup>, Hye-Min Kang<sup>2</sup>, Sang-Hyun Hwang, M.D.<sup>1,5</sup>, Hyun-Jun Park, M.D.<sup>3</sup>, Nam-Cheol Park, M.D.<sup>3</sup>,  
Kyung Un Choi, M.D.<sup>4</sup>, Hyung-Hoi Kim, M.D.<sup>1</sup>, Chulhun L. Chang, M.D.<sup>1</sup>, and Eun-Yup Lee, M.D.<sup>1,5</sup>

Departments of Laboratory Medicine<sup>1</sup>, Medicine<sup>2</sup>, Urology<sup>3</sup>, and Pathology<sup>4</sup>, Pusan National University School of Medicine;  
Medical Research Institute<sup>5</sup>, Pusan National University Hospital, Busan, Korea

**Background** : In addition to Klinefelter's syndrome, microdeletion of Yq is the most common genetic cause of male infertility; 15% of azoospermic or 5-10% of oligozoospermic males have Yq deletions. We evaluated a Yq microdeletion kit (LG Life Sciences, Korea) for identifying microdeletions in the azoospermic factor (AZF) regions of the Yq.

**Methods** : The kit was designed to amplify 3 regions of the AZF gene (AZFa, AZFb, and AZFc) using 15 sequence-tagged sites. We evaluated the preclinical performance of the kit. For clinical validation, 58 patients including 25 idiopathic azoospermic or oligozoospermic patients were examined.

**Results** : We observed clear bands on electrophoresis of DNA, up to a DNA concentration of 3.12 ng/ $\mu$ L; the known microdeletion regions of all 6 reference cell-lines (Coriell, USA) were accurately detected and no false positive/negative results showed with normal female (n=11) and fertile male (n=15) specimens. This kit could identify the same microdeletions in the common regions, similar to another commercial kit. Among the 58 male infertile patients, 7 (12.1%) had microdeletions of the Yq. Among the idiopathic azoospermic (n=22) and oligozoospermic (n=3) patients, 3 (12.0%) had microdeletions. Further, 2 of 21 varicocele patients (9.5%), 1 of 4 patients with testicular failure, and 1 patient with a 45,X/46,XY mosaic had microdeletions.

**Conclusions** : The kit was effective for detecting microdeletions of the Yq. We identified microdeletions in 12% of the infertile patients. This Y chromosome microdeletion detection kit is useful for screening Yq microdeletions in infertile patients. (*Korean J Lab Med* 2010;30:432-9)

**Key Words** : Infertility, Y chromosome, Azoospermic factor, Microdeletion

### 서 론

부부 중 약 10-15%가 불임으로 알려져 있으며, 우리나라 부

부 8쌍 중 1쌍이 불임으로 고통 받고 있고 이 중 남성 원인의 불임이 약 절반을 차지한다[1, 2]. 남성 불임은 고환 이상, 전신질환, 내분비 질환 또는 정관 이상 등으로 생길 수 있다. 유전적 원인으로는 Klinefelter 증후군이 가장 흔하고, Y 염색체 장완의 미세결손이 그 다음으로 흔하다. Y 염색체의 미세결손은 비폐쇄성 무정자증의 약 15%, 정자부족증 환자의 약 5-10%에서 검출되는 것으로 알려져 있다[3]. 1976년 Tiepolo와 Zuffardi [4]는 Y 염색체에서 정자 형성과 관련이 있는 중요한 유전자들이 위치하고 있는 부위를 azoospermic factor (AZF)로 정의하였다. AZF는 AZFa, AZFb, AZFc 등 3개의 부위로 나누어져 있고, 300개의 sequence tagged sites (STS)로 이루어져 있다 [5]. 최근 intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI)과 같은 새로운 남성 불임 치료법이 사용되면서 임상소견, 정액검사

Received : February 24, 2010 Manuscript No : KJLM10-038

Revision received : April 27, 2010

Accepted : April 28, 2010

Corresponding author : Sang-Hyun Hwang, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Pusan National University,  
School of Medicine, 205 Gudeok-ro, Seo-gu, Busan 602-739,  
Korea

Tel : +82-51-240-7403, Fax : +82-51-247-6560

E-mail : mindcatch@hanmail.net

\*This work was supported by Pusan National University Hospital Research Grant 2010 and supported by Medical Research Institute & Pusan Cancer Center Grant (2010-28), Pusan National University Hospital.

ISSN 1598-6535 © The Korean Society for Laboratory Medicine

또는 세포유전학 검사 등으로 감별하지 못하던 Y 염색체의 미세결손 여부를 분자유전학적 기법으로 확인하는 것이 불임의 치료방향을 결정하는데 중요하게 되었다. 현재 전 세계적으로 Y 염색체 미세결손 검사는 원인을 알 수 없는 무정자증 및 정자 부족증 불임 환자에 있어 선별 검사로 추천되고 있다[6-8].

최근 국내에서 개발된 Y chromosome microdeletion detection kit (LG Life Sciences, Seoul, Korea; Y 염색체 미세결손 검출 키트)는 다중 중합효소연쇄반응 검사법으로 15개의 STS를 증폭하여 Y 염색체 장완 부위의 결손을 검출하며, European Academy of Andrology (EAA)와 European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)에서 제시한 지침에 따라 제작되었다[8]. 본 연구에서는 Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)의 성능 평가와 함께 남성 불임을 주소로 내원한 환자를 대상으로 이의 진단적 유용성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

2008년 4월부터 2009년 5월까지 불임을 주소로 부산대학교 병원 비뇨기과에 내원한 환자 중 남성불임이 의심되는 58명의 환자를 대상으로 하였다. 검체는 염색체 검사와 함께 의뢰되었으며 연구 대상자로부터 문서화된 동의서를 받아 Y 염색체 미세결손 검사를 시행하였다. Y 염색체 미세결손 선별검사의 적응증, 즉, 다른 불임 요인이 없는 비폐쇄성 무정자증과 정자부족증에 해당하는 환자는 25명(무정자증 22명, 정자부족증 3명)이었고, 덩굴정맥류 환자는 21명(무정자증 4명, 정자부족증 12명, 정상 정자 수 5명)이었다. 그리고 임상적으로 고환부전이 의심되는 환자 4명과 불임의 원인이 밝혀진 8명(Klinefelter 증후군 3명, 정관 무형성 2명, 45,X/46,XY 모자이시즘 1명, 내분비계 이상 1명, 발기부전 1명)을 평가에 포함하였다.

### 2. Genomic DNA 추출 및 확인

채혈 후 말초혈액 검체는 DNA 추출 전까지 4°C에서 보관하였고 추출한 DNA는 검사 실시 전까지 -70°C에서 보관하였다. Genomic DNA는 QIAamp DNA micro kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany)를 이용하여 혈액 100 µL에서 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 1% 아가로오스 겔에서 전기영동으로 확인하였고, Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 농도 및 순도를 측정하였다.

### 3. Y 염색체 장완의 미세결손 검출을 위한 다중 중합효소연쇄반응

Y 염색체 장완의 미세결손 검출을 위해 다중 중합효소연쇄반응을 원리로 한 Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)를 이용하였다. 검사는 제조사의 지시대로 시행되었다. 각각의 STS PCR premix 19 µL에 추출한 genomic DNA 1 µL (50 ng/µL)를 첨가하여, 총 20 µL 반응액을 제조하여 다중 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 다중 중합효소연쇄반응은 95°C에서 10분 반응 후, 95°C 30초, 60°C 1분 30초, 72°C 1분 30초의 반응을 35회 반복하였다. 증폭 산물은 3% 아가로오스 겔에서 전기영동하였고 정상 남성 genomic DNA와 비교하여 각 STS의 결손 유무를 판단하였다.

각각의 다중 중합효소연쇄반응을 수행할 때, 양성 대조군으로 정상 남성 genomic DNA인 G152A 23981301 (Promega, Madison, WI, USA)를, 음성 대조군으로 genomic DNA를 첨가하지 않은 반응액과 정상 여성 genomic DNA인 G147A 23778401 (Promega)를 사용하였다. 키트의 시발체는 15개의 STS 표지자와 1개의 내부대조물질(zinc finger protein, X-

Table 1. Sets of sequence-tagged sites of Y chromosome microdeletion detection kit

STS set	STS marker	Locus	Size (bp)	STS set	STS marker	Locus	Size (bp)
STS-1	ZFX	X	519	STS-2	ZFX	X	519
	sY14	Yp	472		sY14	Yp	472
	sY254	AZFc	380		sY84	AZFa	326
	sY86	AZFa	318		sY134	AZFb	238
	sY127	AZFb	274		sY255	AZFc	123
STS-3	ZFX	X	519	STS-4	ZFX	X	519
	SPGY1	AZFc	460		sY157	AZFc	286
	sY158	AZFc	215		sY242	AZFc	233
	sY152	AZFc	125		sY130	AZFc	173
	sY147	AZFc	100		sY124	AZFc	109

Abbreviations: STS, sequence-tagged sites; ZFX, zinc finger protein, X-linked; AZF, azoospermic factor.

linked, ZFX)을 포함하는 4개의 STS 세트에 구성되어 있다 (Table 1).

#### 4. Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)의 성능 평가

##### 1) 검출한계

검출한계 평가를 위하여 정상 남성의 genomic DNA인 G152A 23981301 (Promega) 50 ng/ $\mu$ L을 계단 희석하여 25 ng/ $\mu$ L, 12.5 ng/ $\mu$ L, 6.25 ng/ $\mu$ L, 3.12 ng/ $\mu$ L, 1.56 ng/ $\mu$ L, 0.78 ng/ $\mu$ L의 genomic DNA 반응액을 제조한 후 Y 염색체 미세결손 검출 키트로 증폭산물을 확인하였다.

##### 2) 정확도

결손 부위를 알고 있는 표준 세포주인 GM16718, GM20434, GM18336, GM20118, GM22032, 그리고 GM18333 (Coriell Cell Repositories, Camden, NJ, USA) 등을 이용하여 Y 염색체 미세결손 검출 키트의 정확도를 평가하였다.

##### 3) 교차반응성

성인 여성 11명의 검체를 이용하여 Y 염색체 미세결손 검출 키트의 Y 염색체 특이성 여부를 확인하였고, Y 염색체 미세결손의 위양성 여부는 정상 가임력을 지닌 남성 15명의 혈액을 이용하여 평가하였다.

##### 4) 재현성

재현성 검사를 위하여 불임 남성에서 채취한 혈액 중 결손이 없는 검체와 Y 염색체 미세결손을 보인 검체 각각 하나씩과 표준 세포주 GM20118 (Coriell Cell Repositories)을 5일 연속으로 반복 검사하여 결과를 확인하였다.

##### 5) 비교검사

불임 남성에서 채취한 검체 중 Y 염색체 미세결손 검출 키트에서 결손을 나타낸 5명의 검체와 결손이 관찰되지 않은 20명의 검체로 Y chromosome Deletion Detection System (Promega)과 비교 평가를 시행하였다. Y chromosome Deletion Detection System (Promega)은 21개의 STS 표지자와 1개의 내부

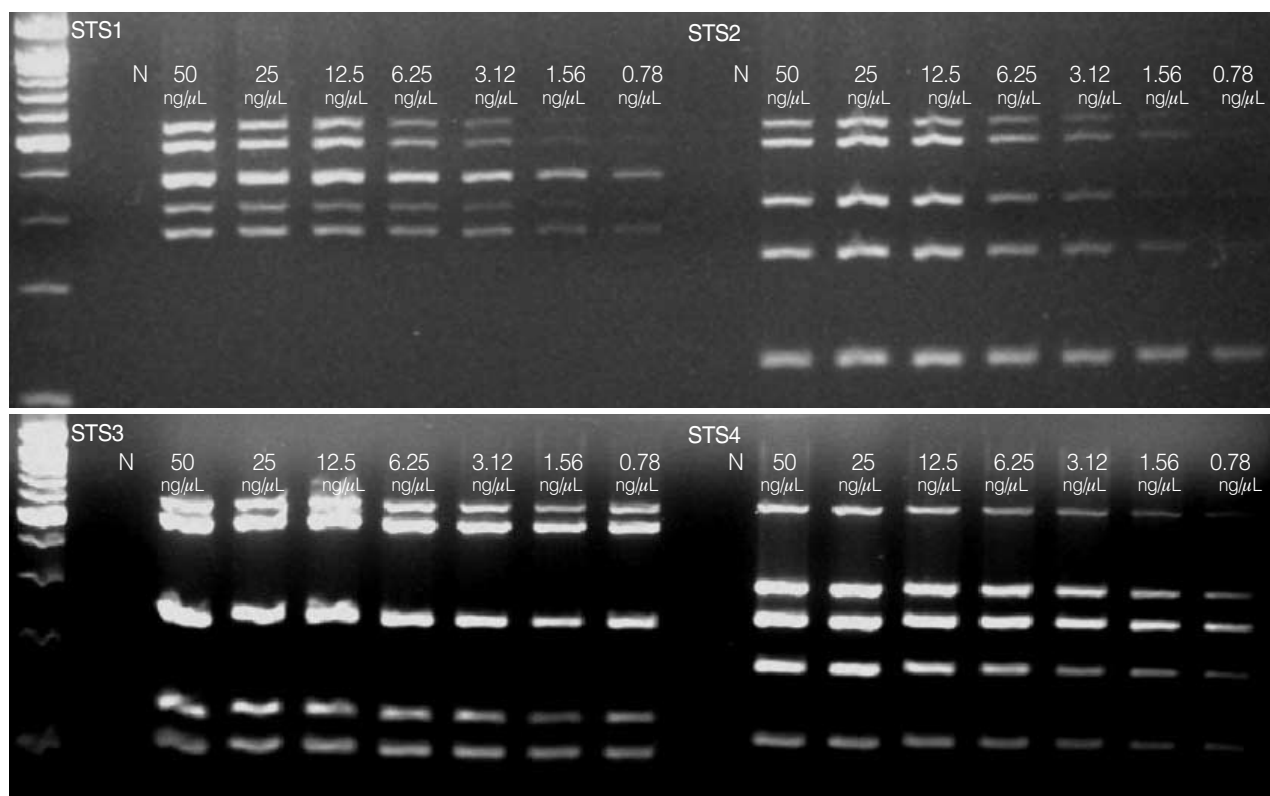


Fig. 1. Multiplex PCR products of various concentrations of genomic DNA. The electrophoresis of PCR products revealed clear bands up to a concentration of 3.12 ng/ $\mu$ L of genomic DNA. Abbreviation: N, No DNA.

대조를 포함한 5개의 세트로 구성되어 있고 내부대조를 제외하고 두 키트를 통해 공통적으로 증폭되는 부위는 *AZFa* 부위의 sY86과 sY84, *AZFb* 부위의 sY124, sY127, sY130과 sY134, 그리고 *AZFc* 부위의 sY152, sY242, sY254, sY255와 sY157였다. 검사는 제조사의 지시대로 시행하였다. 각 세트 마다 PCR premix 20  $\mu$ L, Taq polymerase 0.2  $\mu$ L에 genomic DNA 1  $\mu$ L (50 ng/ $\mu$ L)를 첨가하여, 총 반응액을 21.2  $\mu$ L로 제조하였다. PCR 반응은 94°C 2분, 94°C 1분, 57°C 30초, 72°C 1분의 반응을 35회 반복하였다. PCR 산물은 3% 아가로오즈 겔에서 전기영동하였고 정상 남성 genomic DNA와 비교하여 각 STS의 결손 유무를 판단하였다.

## 결 과

### 1. Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)의 성능 평가

#### 1) 검출한계

DNA의 농도가 낮아질수록 증폭된 밴드의 강도는 점점 약해

졌고, 육안적으로 선명한 밴드는 DNA 농도 3.12 ng/ $\mu$ L까지 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

#### 2) 정확도 및 교차반응성

표준 세포주를 이용한 정확도 평가에서 6개의 세포주 모두 이미 알려진 결손 부위와 일치하는 결과를 보였다. 정상 여성 11명의 검체를 대상으로 시행한 평가에서 ZFX STS 이외의 비특이 증폭산물이 발견되지 않았고, 가임 남성 15명 역시 결손이 관찰되지 않았다.

#### 3) 재현성

1개의 정상 검체와 결손을 보인 2개의 검체 모두 5일 동안의 연속 검사에서 동일한 결과를 나타내었고, 밴드 강도의 육안적 변화는 관찰되지 않았다.

#### 4) 비교검사

Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)에서 결손이 발견된 5명의 검체 모두 Y chromosome Deletion Detection System (Promega)에서 동일한 결과를 보였다. 결손을 보이지

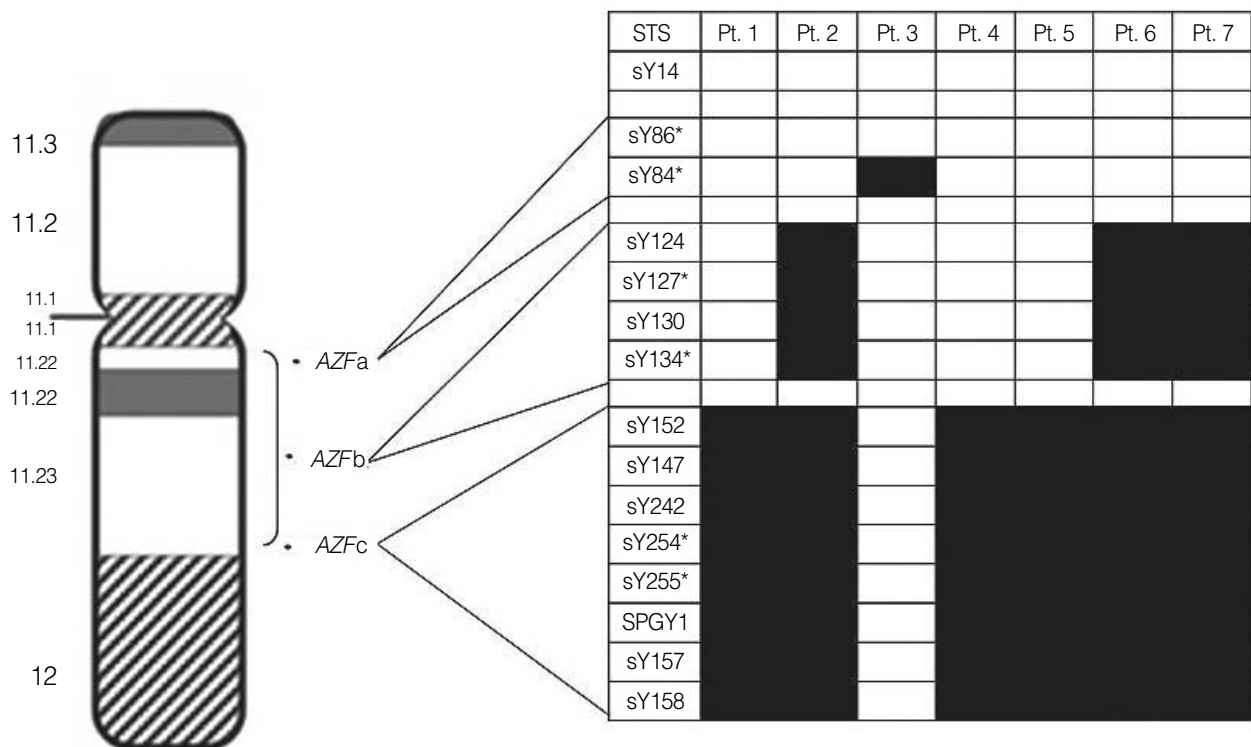


Fig. 2. Seven patients have microdeletions of the Y chromosome. Black squares indicate the sites of deletions. The first choice of STS markers recommended in European Academy of Andrology/European Molecular Genetics Quality Network guideline are marked with an asterix.

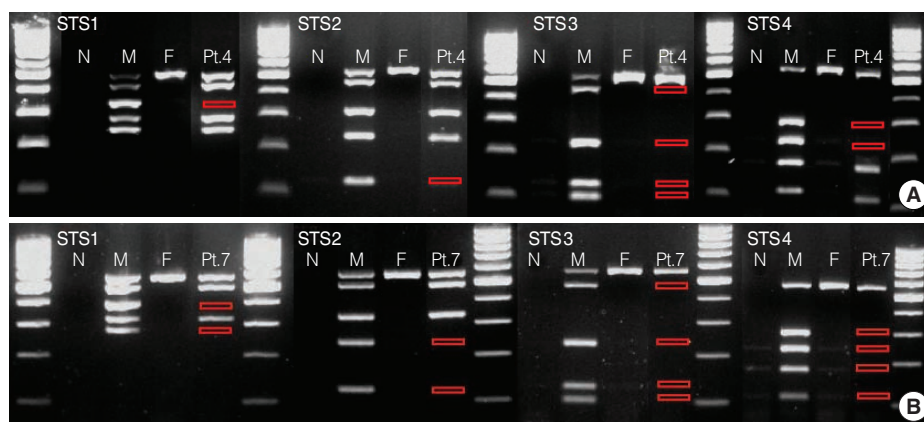


Fig. 3. The boxes on the gel image indicate microdeletions of Y chromosome of patient 4 (A) and patient 7 (B). Patient 4 has deletions of sY254, sY255, SPGY1, sY158, Y152, sY147, sY157, and sY242. Patient 7 has deletions of sY127, sY254, sY134, sY255, SPGY1, sY158, sY152, sY147, sY157, sY242, sY130, and sY124.

Table 2. Clinicopathologic findings of 7 patients with Y chromosome microdeletion determined using Y chromosome microdeletion detection kit

STS set	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
Age (yr)	36	32	28	34	34	21	37
Sperm count	Azoospermia	Azoospermia	Azoospermia	Oligozoospermia	Azoospermia	Azoospermia	Azoospermia
Clinical impression of infertility	Idiopathic	Idiopathic	Idiopathic	Varicocele	Varicocele	Testicular failure	Chromosomal abnormality
FNAC/biopsy	Hypospermato-genesis	NT	Normal	NT	SCOS	NT	SCOS
Karyotype	46,XY	46,XYqh-	46,XY	46,XY	46,XY	46,XYqh-	mos 45,X[5]/46,X,del(Y)(q12)[25]
AZF deletion	AZFc	AZFb, AZFc	AZFa	AZFc	AZFc	AZFb, AZFc	AZFb, AZFc

Abbreviations: FNAC, fine needle aspiration cytology; NT, not tested; SCOS, sertoli cell-only syndrome; AZF, azoospermic factor.

않은 20개의 검체는 비교 키트에서도 결손이 검출되지 않았다.

## 2. 불임 남성 환자를 대상으로 한 임상 성능 평가

불임의 다른 원인이 없는 무정자증 또는 정자부족증 환자 25명 중 3명(12.0%)에서 Y 염색체 AZF 부위의 미세결손이 검출되었다(Fig. 2, Table 2). 결손 부위는 AZFc 1명, AZFbc 1명, 그리고 AZFa 1명이었다. 덩굴정맥류 환자 21명 중 2명(9.5%)에서 Y 염색체 결손이 검출되었고, 결손 부위는 2명 모두 AZFc 이었다(Fig. 2, 3, Table 2). 고환부전이 의심되는 4명 중 1명(25%)에서 AZFbc 부위의 미세결손이 관찰되었다. 그 외 불임의 원인이 알려진 8명 중 45,X/46,XY 모자이시즘을 보이는 1명에서 AZFbc 부위의 미세결손이 관찰되었다(Fig. 2, 3, Table 2).

## 고 찰

본 연구에서 평가한 Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)는 낮은 검출한계와 교차반응성, 높은 정확도와 재현성, 그리고 기존 kit와 일치하는 결과를 보이는 등 우수한 성능

을 보였다. 검출한계 평가에서 16배수 희석인 3.12 ng/ $\mu$ L까지 선명한 PCR 밴드를 보여 실제 검사에서 권장되는 genomic DNA 50 ng/ $\mu$ L는 검사에 충분한 양으로 판단된다.

Y 염색체 미세결손은 정자형성 장애의 원인 중 하나로 원인이 불명확한 남성 불임 환자에서 Y 염색체 미세결손 검사는 치료방침을 결정하는데 유용할 수 있다. AZF의 palindromic/ampliconic 구조는 재배열이 쉽게 발생하고[9] 유전 물질의 결손이 흔히 발생하므로 미세결손이 병적인지 다형성인지 판단하기 어렵다[10]. 따라서, 불임과 관련된 Y 염색체 미세결손을 검출하기 위해서는 다형성을 보이지 않는 Y 염색체 부위에 위치하며, 무정자증 또는 정자부족증에서 특이적으로 결손되는 부위의 STS 표지자를 선정하는 것이 중요하다. Y 염색체 미세결손은 결손의 위치, 범위, 빈도 등에서 매우 큰 차이를 보이므로 현재 다양한 STS 표지자의 수와 종류를 적용한 검사법들이 사용되고 있다. 유럽에서는 Y 염색체 미세결손 검출법에 대한 외부정도관리를 시행하여 표준화와 질관리를 시도하였으며, EAA/EMQN 지침을 제시하였다. 이에 따르면 sY84, sY86 (AZFa), sY127, sY134 (AZFb), 그리고 sY254, sY255 (AZFc) 등 모두 6개의 STS 표지자로 90% 이상의 미세 결손을 검출할

수 있으며, 추가적인 STS 표지자를 사용함으로써 정확도를 높일 수 있다[8]. 본 연구에서 평가한 Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)에는 임상적으로 Y 염색체 미세결손과 관련이 있지만 다형성을 보이지 않는 15개의 STS를 이용하여 *AZFa*, *AZFb*, *AZFc* 부위의 미세결손을 검출할 수 있게 설계되어 있다. 15개의 STS에는 EAA/EMQN 지침에서 권고하는 6개의 기본 STS 표지자 뿐 아니라 9개의 STS 표지자가 추가되어 있어 검출 범위를 확장시켰다[11].

문헌에 따르면 불임 남성에서 Y 염색체 미세결손의 빈도는 1%에서 55%까지 다양하다[8, 12]. 이는 대상 환자군과 PCR 시발체 구성 등의 차이에서 기인하며, 일반적으로 불임 남성의 약 5-10%[13], 무정자증 환자의 약 15%와 정자부족증 환자의 약 5-10%에서 Y 염색체의 미세결손이 관찰된다[3]. 본 연구에서 불임 환자 58예 중 7예에서 Y 염색체 미세결손이 발견되어 총 12.1%의 불임 환자에서 미세 결손이 발견되었고, 다른 불임 요인이 없는 무정자증 환자 중 12.0%에서 Y 염색체 미세결손이 발견되었다. 이는 앞선 연구와 유사한 빈도를 보이는 결과이다. 하지만, 정자부족증 환자에서는 대상수가 적어 미세결손이 발견되지 않았다. 향후 더 많은 수의 정자부족증 환자를 대상으로 한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 4명의 고환부전 환자 중 1명에서 Y 염색체 미세결손이 검출되었다. 4명의 고환부전 환자들 모두 남성호르몬이 생성되지 않았으며, Y 염색체 미세결손이 관찰된 1명은 무정자증을 보였다.

결손 부위에 따른 빈도에 관한 이전 연구에 의하면 *AZFc*의 완전 또는 부분 결손이 가장 흔하고(60%), 35% 정도가 *AZFb* (16%), *AZFbc* (14%) 또는 *AZFabc* (<1%) 부위 결손이며, 2-5%만이 *AZFa* 부위의 결손이다[14-16]. 본 연구에서 *AZFabc*는 발견되지 않았고 *AZFa*의 결손이 1명으로 가장 적은 비율을 나타내기는 하였으나 *AZFb*와 *AZFbc*의 결손은 각각 3명으로 그 빈도가 앞선 연구들과는 일치하지 않았다. 이는 적은 대상수에 기인한다고 생각된다.

미세결손의 부위가 중요한 이유는 각각의 *AZF* 부위가 생식 세포 발달의 서로 다른 시기에 영향을 미치므로 결손 부위별로 특징적인 표현형과 연관되기 때문이다[5]. 본 연구에서 *AZFbc* 결손을 보인 3명은 무정자증을 나타내었고, *AZFc*의 결손을 보인 1명의 경우 정자부족증이라는 하나 정자의 농도가  $0.6 \times 10^6/\text{mL}$ 로 아주 낮은 정자 농도를 보였다. *AZFa* 결손을 보인 환자의 경우 sY84만 결손된 부분형으로 고환 조직 검사에서는 정상을 보였다. 또한 결손 부위는 예후 예측 및 치료 방향을 결정하는데 도움을 주기도 한다. 예를 들면 *AZFabc*와 *AZFa*의 전체 결손이 되는 경우 임상적으로 무정자증을 보이는 sertoli cell-

only syndrome (SCOS)을 유발하기 때문에 ICSI를 위한 고환 정자 채취가 불가능함을 의미한다[5, 17]. 반면, *AZFa*의 특정 유전자(예, *USPY9* 또는 *DBY*)만 결손되는 경우에는 다른 다양한 표현형을 보인다[18]. *AZFb*와 *AZFbc*의 전체 결손은 조직학적으로 SCOS 또는 정자형성 정지를 보이고, 무정자증을 유발하며, *AZFa* 전체결손과 유사한 양상을 보이는 것으로 알려져 있다[17, 19]. 결과적으로 *AZFa*, *AZFb* 그리고 *AZFbc*의 결손 일 경우에는 ICSI가 추천되지 않는다. *AZFc* 부위의 결손은 보다 다양한 임상증상과 조직학적 소견을 보이는 것으로 알려져 있고, 일반적으로 어느 정도 정자가 형성되므로 *AZFc* 결손이 동반된 무정자증 환자는 ICSI의 좋은 적응증이 된다[20, 21]. 한 연구에 따르면 *AZFa*, *AZFb*, *AZFbc*의 경우 고환 정자 채취를 통한 생식 보조술 성공률이 희박하나, *AZFc* 단독 결손인 경우 고환 정자 채취의 성공률이 75% 정도로 높다고 한다[19].

일반적으로 Y 염색체 미세결손의 확인은 원인을 알 수 없는 비배쇄성 무정자증 및 정자부족증 환자에서 추천된다[22]. 그러나 세포유전학적으로 검출 가능한 크기의 미세결손은 흔하지 않으므로 Y 염색체 미세결손의 검출은 PCR을 기반으로 한 *AZF* 부위의 선별검사를 통해 이루어진다. 본 연구에서는 Y 염색체 미세결손 키트로 검출된 7명 모두 염색체 검사를 함께 시행하였는데, 2명의 환자에서 Y 염색체 장완이 다소 짧아 보였고, 이들은 모두 무정자증 소견을 보였다. 따라서 무정자증을 보이면서 염색체 검사에서 Y 염색체 장완의 길이가 짧아 보이는 경우에 Y 염색체 미세결손 검사를 시행하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 그러나 정상 정자 농도를 가진 사람에서도 드물게 Y 염색체 미세결손이 발견되므로 원인이 불명확한 정상 정자 농도를 보이는 불임 남성에서도 Y 염색체 미세결손 검사가 불임의 원인을 밝히는 데 의미가 있을 것으로 생각한다.

당굴정맥류 환자에서도 Y 염색체 미세결손이 동반되기도 한다. 당굴정맥류는 남성 불임의 주요 요인 중 하나로, 일반인의 15%가 당굴정맥류를 가지며 불임 환자군에서는 19-41%의 빈도를 보인다[23]. Rao 등[24]은 5.26%의 당굴정맥류 환자에서, Dada 등[25]은 9.7%의 당굴정맥류 환자에서 Y 염색체의 미세결손을 보고한 바 있다. 당굴정맥류에서 Y 염색체 미세결손이 있는 경우 고환의 비가역적인 손상을 가져와 당굴정맥류 수술 후에도 나쁜 예후를 보이므로, 당굴정맥류 환자에서 Y 염색체 미세결손은 중요한 예후인자이다. 본 연구에서는 당굴정맥류를 가진 환자 21명(무정자증 4명, 정자부족증 12명, 정상 정자 수 5명) 중 2명(9.5%)에서 Y 염색체의 미세결손을 확인하였다. Y 염색체 미세결손이 관찰된 당굴정맥류 환자는 모두 정자부족증 또는 무정자증을 보였던 환자들이었다. 국내에서도 당굴정맥류



의 치료 후 예후판정을 위해 Y 염색체의 미세결손 검사가 필요할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 원인이 알려진 불임 환자 8명(Klinefelter 증후군 3명, 정관 무형성 2명, 45,X/46,XY 모자이시즘 1명, 내분비계 이상 1명, 발기부전 1명)에 대해서도 Y 염색체 미세결손 검사를 시행하였다. 그 결과 45,X/46,XY 모자이시즘 1명에서 Y 염색체의 미세결손을 확인할 수 있었다. 이 환자는 무정자증으로 원인을 찾기 위해 시행한 염색체 분석에서 45,X[5]/46,XY[25]으로 모자이시즘을 보였는데, 함께 시행한 Y 염색체 미세결손 검사에서 결손이 관찰된 후 XY 형광제자리부합검사를 이용하여 Y 염색체 장완의 결손을 확인한 사례이다. 본 연구의 결과로 보아 원인을 알고 있는 불임 환자일지라도 Y 염색체 미세결손 검사를 추가하면 임상적으로 유용한 정보를 부가적으로 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 새롭게 개발된 Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)는 15개의 STS 표지자를 동시에 검출 가능하고 낮은 검출한계, 높은 정확도, 낮은 교차반응성, 높은 재현성 및 타 키트와의 높은 일치율 등 우수한 성능을 보였다. 이는 남성 불임의 유전적 원인을 밝히고, 치료방향의 결정 및 치료반응의 예측에 유용할 것으로 생각된다.

## 요 약

**배경 :** Klinefelter 증후군과 더불어 남성불임에 있어 Y 염색체 장완의 미세결손은 가장 흔한 유전적 원인으로, 비폐쇄성 무정자증의 약 15%, 정자부족증의 약 5-10%에서 Yq 결손이 발견된다. 저자들은 Y 염색체의 azoospermic factor (AZF) 부위의 미세결손을 검출하는 Yq 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences, Korea)의 성능을 평가하고자 하였다.

**방법 :** 이 키트는 세 개의 AZF 부위(AZF<sub>a</sub>, AZF<sub>b</sub>, AZF<sub>c</sub>)의 15개 sequence-tagged sites를 증폭시켜 결손 유무를 확인한다. 임상전 성능 평가와 함께 원인이 불명확한 무정자증/정자부족증 남성 25명을 포함한 58명을 대상으로 임상평가를 시행하였다.

**결과 :** 평가 대상 키트는 3.12 ng/ $\mu$ L의 DNA 농도까지 명확한 밴드를 보였다. 6개의 표준 세포주(Coriell, USA)의 결손 부위를 정확하게 검출하였고, 여성 11명과 정상 가임력을 지닌 남성 15명의 검체에서는 위양성/위음성 결과를 보이지 않았다. 타 키트와의 비교 검사에서 두 키트의 공통된 부위에서 모두 일치하는 결손 결과를 보였다. 남성 불임 환자 58명 중 7명(12.1%)에서 Y 염색체 미세결손이 관찰되었다. 원인이 없는 무정자증(n=22)/정자부족증 환자(n=3) 중 3명(12.0%)에서, 덩굴정맥류

환자 21명 중 2명(9.5%), 고환부전 환자 4명 중 1명 그리고 45,X/46,XY 모자이시즘 1명에서 Y 염색체 미세결손이 발견되었다.

**결론 :** 이 키트는 Yq 미세결손을 검출하는데 효과적이었다. 불임 남성을 대상으로 시행한 임상 성능평가에서 약 12%의 미세결손을 검출하였다. Y 염색체 미세결손 검출 키트(LG Life Sciences)는 Y 염색체 미세결손의 선별검사로 유용할 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

1. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001;22:226-39.
2. Korea Institute for Health and Social Affairs. <http://www.kihasa.re.kr> (Accessed on April 2010).
3. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Yq microdeletions--azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest. *J Biomol Tech* 2004; 15:176-83.
4. Tiepolo L and Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976;34:119-24.
5. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996;5:933-43.
6. Land JA and Evers JL. Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. *Hum Reprod* 2003;18:455-7.
7. Mitra A, Dada R, Kumar R, Gupta NP, Kucheria K, Gupta SK. Screening for Y-chromosome microdeletions in infertile Indian males: utility of simplified multiplex PCR. *Indian J Med Res* 2008;127:124-32.
8. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J Androl* 2004;27:240-9.
9. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001;29:279-86.
10. Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pynikova T, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation

- and haploid selection. *Nat Genet* 2003;35:247-51.
11. Y chromosome microdeletion detection kit. Seoul, Korea: LG Life Sciences, Ltd.; 2009 Sep. Package insert.
  12. Simoni M, Bakker E, Eurlings MC, Matthijs G, Moro E, Muller CR, et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *Int J Androl* 1999;22:292-9.
  13. Ferlin A, Arredi B, Foresta C. Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol* 2006;22:133-41.
  14. Cram DS, Osborne E, McLachlan RI. Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception. *Med J Aust* 2006;185:433-4.
  15. Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* 2003;26:70-5.
  16. Sadeghi-Nejad H and Farrokhi F. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urol J* 2007;4:192-206.
  17. Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod* 2000;15:1431-4.
  18. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 1999;14:1710-6.
  19. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 2003;18:1660-5.
  20. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002;17:17-24.
  21. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Hum Reprod* 2002;17:2813-24.
  22. Bhasin S. Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1995-2004.
  23. Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, et al. Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl* 2006;27:106-11.
  24. Rao L, Babu A, Kanakavalli M, Padmalatha V, Singh A, Singh PK, et al. Chromosomal abnormalities and y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele and idiopathic infertility of South Indian origin. *J Androl* 2004;25:147-53.
  25. Dada R, Kumar R, Shamsi MB, Sidhu T, Mitra A, Singh S, et al. Azoospermia factor deletions in varicocele cases with severe oligozoospermia. *Indian J Med Sci* 2007;61:505-10.