

중합효소연쇄반응을 이용한 다운증후군의 진단

고려대학교 의과대학 산부인과학교실, 정신과학교실*

김영태 · 이희경 · 임혜경 · 김정현 · 김선행 · 구병삼 · 주갑순 · 이민수*

Diagnosis of Down Syndrome Using PCR

Young Tae Kim, Hee Kyung Lee, Hye Kyung Lim, Jung Hyun Kim, Sun Haeng Kim,
Pyong Sahn Ku, Gap Soon Ju and Min Soo Lee*

Department of Obstetrics and Gynecology, Psychiatry, College of Medicine,
Korea University, Seoul, Korea*

= Abstract =

Down syndrome is one of the major chromosomal anomalies in Korea. To decrease incidence of Down syndrome, antenatal diagnosis is essential. At present, antenatal diagnosis of Down syndrome is done by karyotyping from chorionic villus sampling, amniocentesis, and cordocentesis. All these methods have some problems such as a risk of abortion, a long waiting time, difficulties in sampling, and so on.

The aim of study was to confirm that PCR(Polymerase Chain Reaction) using D21S11 primers could be a diagnostic tool for Down syndrome. PCR using D21S11 primers with ³²P labeling at 5' end was done in 21 cases of DNA from 21 Trisomy and 20 cases of DNA from normal karyotype. PCR product was running for 10 hours on the 6% polyacrylamide gel under 1,000 V or for 8 hours under 1,500 V. After X-ray film exposure, it was read by densitometry.

Normal group showed 1:1 band or single band. 21 Trisomy group showed 1.3-2:1 band or 2.3 times of density compared to normal single band or 3 bands. This method gave the result within 24 hours.

It can be an useful diagnostic tool to detect 21 Trisomy antenatally, especially in late pregnancy, and in preimplantation diagnosis.

서 론

다운증후군은 가장 대표적인 염색체이상의 하나로 Trisomy 21이 다운증후군의 95%를 차지하며, 그 발생 빈도는 평균 800-1,000 출생당 1명이나 임신부의 연령이 증가할수록 발생빈도가 증가하는 것으로 알려져 있다(Cunningham 등, 1993).

다운증후군의 증상은 정신박약, 얼굴이 작고 크가 낮으며 epicanthus는 쌍거풀처럼 보이며 안열은 외상방으로 찌진모양의 특징적인

안면기형과 endocardial cushion defect와 같은 심장기형, 손바닥의 Simian crease, 손가락등의 기형(clinodactyly)과 생후의 백혈병의 위험성 증가, 면역계의 이상, 내분비계의 이상, 알츠하이머와 흡사한 치매증상등을 특징으로 한다(Connor 등, 1993).

다운증후군의 진단은 임상증상과 함께 핵형 분석으로 21번 상염색체의 삼체성이나, 전좌 또는 mosaicism등의 진단이 가능하며 최근에 FISH를 이용한 진단방법이 많이 보고되고 있다(Zheng 등, 1992; Munne 등, 1994).

다운증후군은 치료의 질환의 성격상 근원적인 것이 아니라 보조적이기 때문에 개인과 가족, 사회적, 국가적인 불행과 부담이 크며, 따

본 논문의 요지는 1994년 제 73차 대한산부인과학회에서 발표되었음.

라서 가능하다면 산전에 진단하여 발생빈도를 낮추는 것이 현재로는 최상의 방법이라고 할 수 있다.

대부분의 다운증후군은 생후 생존에 큰 어려움이 없으며 고위험군 임신으로 분류되지 않는 35세 미만의 임신부에서의 발생이 2/3를 차지하기 때문에 기존의 검사방법보다 간편하고, 신속하고, 정확하며 비용이 저렴한 새로운 검사방법이 절실하게 요구되고있는 실정이다.

일반적으로 다운증후군의 선별검사로써 산모의 연령, Maternal Serum alphafetoprotein, hCG(human Chorionic Gonadotropin), uE3(unconjugated Estiol), SPI(Maternal Serum Pregnancy-specific β 1-glycoprotein)등이 사용되지만 이들의 문제점은 간접적이며 정확도가 낮다는 것이다(Lott등, 1992; Ganiats등, 1994; Spencer 등, 1994).

산전에 다운증후군의 확진을 위하여는 양수 천자, 융모막 융모생검, 제대천자등을 통한 태아의 핵형분석이 필요한데 이들의 문제점은 유산과 출혈, 감염, 결과를 얻기까지의 기간이 길다는 점, 따라서 산모와 가족의 불안감이 크다는 것, 세포배양이나 판독에 숙련된자등이 있어야 된다는 것 등이 있다(Silver등, 1994).

따라서 상기 문제점을 해결하기 위한 방법으로 임신시 모체내에 존재하는 태아혈액을 얻어서(Bianchi등, 1993; Ganshirt-Ahlert등, 1992; 김등, 1993) 다운증후군을 산전에 진단할 수 있다면 다운증후군의 발생빈도를 크게 낮출수 있으며, 또한 고위험 임신군에서 체외 수정을 하는 경우에는 착상 전진단을 통하여 다운증후군의 출생을 예방할 수 있다.

이를 위한 전단계로 다운증후군과 정상인의 말초혈액에서 핵산을 분리하여 증합효소연쇄 반응을 이용하여 다운증후군의 진단방법을 개발하고자 본 실험을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

말초혈액내의 임파구배양을 통한 핵형분석으로 확진된 다운증후군(21 Trisomy) 21예와 정상 핵형을 보인 대조군 20예를 실험대상으로 하였다.

2. 방법

1) 핵산분리

혈액 1.5ml을 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 serum을 제거한다. 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH_4Cl 8g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 1g/L)을 500 μl 넣고 서서히 3분간 흔들어준다. 상층액을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400 μl 의 Nuclei lysis Buffer(Tris (pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM)를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27 μl 와 proteinase K 10 μl 를 첨가하고 56 $^\circ\text{C}$ 에서 2시간동안 반응시킨다. 반응 후 saturated NaCl 135 μl 를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 tube에 옮긴다. 2배 부피의 에탄올을 넣고, 침전된 Deoxynucleic Acid(이하 DNA로 약함)를 회수하여 새 tube에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시킨다. 건조된 DNA를 증류수 100 μl 에 녹인다(김등, 1993).

2) 증합효소연쇄반응

사용된 primer들은 상염색체 21번에 있는 D21S11 locus에 특이하게 고안된 것이며 (Sharma등, 1992), 이들의 염기서열은 다음과 같으며 (주)한국생공에 합성을 의뢰하여 사용하였다.

5'-GTGAGTCAATCCCCAAG-3'

5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3'

이 primer 중 첫번째 primer를 ^{32}p 로 5' 말단을 labeling하였다. 증합효소연쇄반응(Easy cyclor, Ericomp, USA)은 25 μl 의 반응 volume으로 총 42 cycle을 수행하였고, 반응액의 조성은 다음과 같다.

template DNA	50 ng
labelled primer	5 pmole
primer	5 pmole
MgCl_2	1.5 mM
Tris-Cl (pH 8.3)	10 mM
KCl	50 mM
gelatin	0.1% (w/v)
dGTP, dCTP, dTTP, dATP	100 μM
Taq polymerase	1 U

반응 온도와 시간은,

94 $^\circ\text{C}$ 10분

에서 1 cycle 반응시키고나서

94 $^\circ\text{C}$ 1분

52 $^\circ\text{C}$ 1분

72 $^\circ\text{C}$ 1분

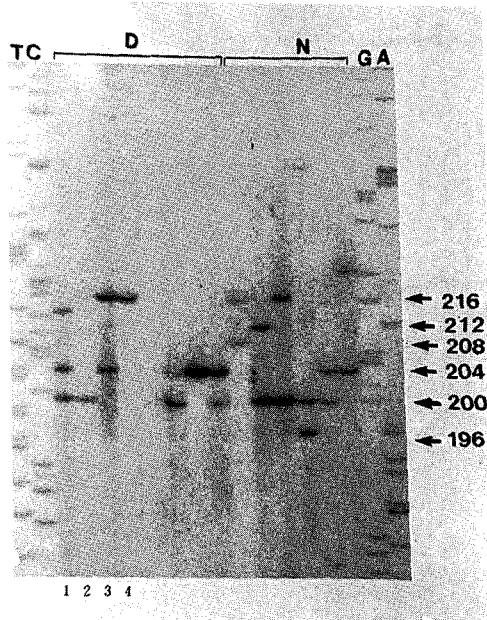


Fig. 1. Autoradiogram of D21S11 amplified from Trisomy 21 and control DNA. Lane 1 shows 3 bands, lane 2, 3 shows 2 bands, and lane 4 shows 1 band in Trisomy 21 (D, Down Syndrome) group. All lanes in control group (N, Normal Group) show 2 bands. T,C,G, and A are used for size marker. Arabic numbers at right mean sizes of base pairs, and they show tetranucleotide repeat.

에서 40 cycle을 수행하고, 마지막으로 72°C에서 10분을 수행하였다.

3) 중합효소연쇄반응 생성물의 분석

증폭된 DNA들은 allele에 따라 4bp 정도의 차이를 보이는데, 이를 구별하기 위해서 6% urea polyacrylamide sequencing gel에서 전기영동을 수행하였다. 증폭된 DNA들을 reaction stop solution과 섞은 후 10분 간 끓여 denaturation 시킨 후 6% urea polyacrylamide gel에 약 2 μ l씩 loading하고 1,500 V에서 8시간 또는 1,000V에서 10시간동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 후 X-ray film에 약 8시간동안 노출시켰다. 이 film을 현상한 후 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 DNA를 M13 sequencing ladder와 비교하여 정확한 길이를 분석하였다.

4) 밀도측정

중합효소연쇄반응생성물을 6% urea polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 얻은 X-ray film에서 allele의 정확한 크기를 결정한

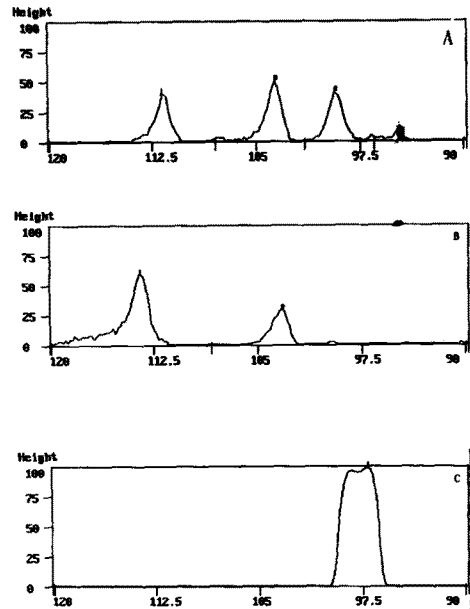


Fig. 2. Densitograms of autoradiograms of D21S11 amplified from Trisomy 21. The Y-axis displays density of the lane and X-axis displays the computed length of PCR products in base pairs as determined automatically. Panel A displays 3 bands, triplozygous pattern, which shows equal density. Panel B displays 2 bands, diplozygous pattern, which shows 2:1 density. Panel C displays single band, homozygous pattern, which shows 3 times of density compared to 1 band of the double bands of control group.

후 각 allele의 분자비율 (molar ratio) 을 densitometer (Advanced American Biotechnology, CA, USA)로 측정하였다.

결 과

그림 1에서 보는 바와 같이 정상인 경우는, heterozygote는 동일한 밀도를 갖는 band가 1:1, homozygote인 경우는 1.3-2배 밀도를 갖는 band가 1개로 나타난다. 다운증후군인 경우는, D21S11 allele가 모두 heterozygote일 경우 동일한 밀도를 갖는 band가 1:1:1(triplozygous라고 표현하였음), 두 allele이 homozygote이고 한 allele이 heterozygote일 경우는 1.3-2:1(diplozygous라고 표현하였음), D21S11 allele이 모두 homozygote일 경우는 2.3배 이상의 밀도를 갖는 band가 1개가 나타난다. 이

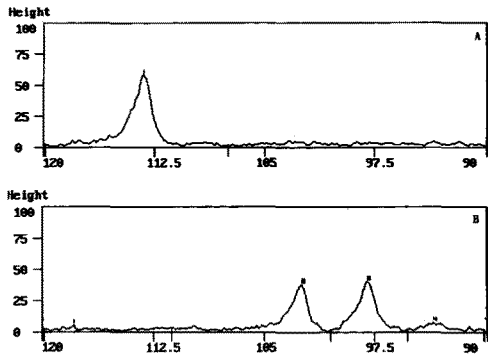


Fig. 3. Densitograms of autoradiograms of D21S11 amplified from control DNAs. Panel A displays single band, homozygous pattern, which shows 1.5 times of density compared to 1 band of the double bands of normal group. Panel B displays 2 bands, heterozygous pattern, which shows equal density.

러한 밀도의 차이는 육안으로도 가능하지만 정확을 기하기 위하여 상기 밀도계로 측정된 결과를 그림 2, 그림 3에서 볼 수 있다.

정상 대조군에서 단일 band는 4예, 2개의 band는 16예에서 나타났으며, 다운증후군의 경우 단일 band는 3예, 2개의 band는 10예, 3개의 band는 8예에서 나타났다.

고 찰

다운증후군을 유발하는 상염색체 21번에 관한 분자생물학적인 접근은 somatic cell hybrids, irradiation hybrids, Southern blot hybridization, pulsed field gel electrophoresis, Polymerase Chain Reaction(이하 PCR로 약함), sequencing등의 다양한 기법을 사용하여 상염색체 21번 장완에만 50-400 kb마다 한개 이상의 표지물질이 발견되어 현재 75개 이상이 보고되고 있다(Burmeister등, 1990; Cox등, 1990; Gardiner등, 1989; Korenberg등, 1990).

상기 기법들을 임상적으로 사용하기에는 실험방법의 어려움과 오랜 실험기간등의 문제점이 야기되는데 PCR은 너무 민감하다는 장점과 단점외에는 간편한 사용 방법, 결과를 얻기까지의 기간이 짧다는 장점때문에 진단을 위한 분자생물학적 기법중 가장 선호되는 방법이다(Innis등, 1990).

다운증후군에서 알려져 있는 hypervariable repeats는 크게 3가지로 분류되는데 그것은

VNTR(variable number of tandem repeats)와 minisatellites, CA repeats, 3-6개의 염기 차이를 보이는 STR(small tandem repeats)이다. 이중 STR marker를 사용하는 것이 VNTR이나 CA repeats보다 예민하고 취급하기 쉽고 결과 판독이 용이하기 때문에 gene mapping이나 linkage analysis에서 많이 사용된다. 따라서 본 실험은 상기 이유로 STR을 선정하였다.

Sharma과 Litt(1992)에 의하면 Cosmid ICRFc 102B06134를 사용하여 D21S11부위에 (TCTA)₄(TCTG)₆(TCTA)₃TA(TCTA)₃TC(ATCT)₁₀반복서열이 Alu I subclone(VS17B2) 내에 존재하며 PCR primers(VS17T # 3 3': 5'-GTGATCAATTCCCAAG-3', VS17T # 4: 5'-GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC-3')는 linkage analysis상 최대 LOD치가 14.1임을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 상기 PCR primers를 사용하였다.

Mansfield(1993)는 핵형분석으로 확진된 12예의 Trisomy 21을 대상으로 상기 PCR primers를 사용하여 PCR 산물에 Fluorescent tagging하여 800볼트에서 8시간 전기영동하여 Fluorescent Fragment Analyzer로 판독하여 본 실험과 동일한 결과를 얻었음을 보고하였다.

본 실험은 형광물질대신에 ³²P를 사용하게 되었는데 그 이유는 Fluorescent Fragment Analyzer의 가격이 고가이며 국내에서 가장 흔히 손쉽게 사용되는 ³²P를 사용하여 경제적으로 저렴하고 검사시 쉽게 접근할 수 있는 검사방법을 개발하기 위한 목적에서였다.

본 실험의 결과는 형광물질을 사용한 것과 차이가 없었으며 임상적으로 방사능동위원소의 취급만 정확하게 한다면 저렴한 가격으로 진단할 수 있음을 확인케 하였다.

본 실험의 문제점으로는 빈도가 낮기는 하지만 다운증후군의 원인의 하나인 전좌의 경우는 진단할 수 없다는 것이고 또한 밀도계가 없이 육안적으로도 판독이 가능하지만 정확한 진단을 위하여는 밀도계가 필수적이라는 것이며, 동시에 다운증후군에서 단일 band의 경우가 2개의 band를 보일때 몇배의 밀도치를 양성으로 판독하는가는 실험실마다의 기준치를 정해야하나 본 실험의 결과는 적어도 1.3배이상의 밀도를 보이기 때문에 1.3배이상의 밀도를 보이는 경우를 다운증후군으로 판독하였다.

향후 실험 방법의 개선 또는 개발을 통하여

sequencing gel에서 전기영동을 좀더 짧게 시행하면 결과를 얻을 때 까지의 시간을 좀더 줄일 수 있을 것으로 사료되며, 환경오염과 방사능의 피해를 막기위하여 silver staining (Bassam 등, 1991)의 방법과 화학적 발색 방법등(Kricka, 1992)을 적극 모색해야 될 것으로 사료된다.

본 실험의 결과는 향후 임상적으로 유용하게 사용될 것으로 사료되는데 그 사용범위는 첫째, 다운증후군의 고위험군에서 채취한 양수나 용모와 같은 시료가 기대보다 적을 경우, 둘째, 짧은 시간내에 결과를 얻어야 하는 경우 예를들어 체외수정시 미세조작을 위한 착상전진단에서 다운증후군의 진단이 24시간내에 가능하며, 임신후반기에 양수검사를 시행할 경우 등이다. 셋째, 좀더 많은 연구가 이루어진다면 다운증후군의 태아를 임신한 경우 산모의 혈액내에서 본 실험 방법과 동일한 방법을 사용하면 비침습적인 방법으로 진단가능할 것으로 사료되며, 마지막으로 PCR은 inviable cell에서도 가능하기 때문에 세포배양에 실패한 경우에도 진단가능하며 또한 모체세포의 오염도 피할수 있을 것으로 사료된다.

결 론

중합효소연쇄반응을 이용한 다운증후군 진단을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. D21S11 primers를 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였고, 증폭된 중합효소연쇄반응생성물에 ³²P를 붙여서 sequencing gel에서 전기영동을 1,000V에서 10시간 또는 1,500V에서 8시간동안 시행하고 X-ray film에 노출시켜 24시간내에 결과를 얻을 수 있었다.

2. 정상대조군의 경우 단일 band 또는 1:1 band를 얻었다.

3. 다운증후군의 경우 2.3배 이상의 밀도를 보이는 단일 band 또는 1.3-2배 이상의 밀도를 보이는 2개의 band 또는 동일한 밀도를 보이는 3개의 band를 얻었다.

4. 상기 결과는 향후 임상적으로 착상전진단이나, 임신후반기에 빠른 진단이 요구될때 또는 양수검사나 용모막양모생검사에 얻은 시료가 아주 적거나, 세포배양에서 실패한 경우, 다운증후군을 임신한 경우 모체혈액에서 다운증후군의 진단등에서 유용하게 사용될 수 있

을것으로 사료된다.

감사의 말씀

다운증후군의 혈액을 채취하는데 많은 도움을 주신 정박아 교육기관인 인강원계 감사의 뜻을 전하고자 한다.

인 용 문 헌

- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshof PM: Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. *Analy Biochem* 1991, 196, 80-83.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Flint AF, Geifman OH, Erikson MS, Williams AM: Erythroid-specific Antibodies Enhance Detection of Fetal Nucleated Erythrocytes in Maternal Blood. *Prenat Diag* 1993, 13, 293-302.
- Burmeister M, Kim W, Roydon-Price E, De Lange T, Tantravahi U, Myers R, Cox D: A Map of the Distal Region of the Long Arm of Human Chromosome 21 Constructed by Radiation Hybrid Mapping Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Genomics* 1990, 9, 19-30.
- Connor JM, Ferguson-Smith MA: Essential medical genetics. 4th Ed. *Blackwell Scientific Publications* 1993, 13, 129.
- Cox D, Burmeister M, Roudon-Price E, Kim S, Myers R: Radiation Hybrid Mapping: A Somatic Cell Genetic Method for Constructing High-Resolution Maps of Mammalian Chromosomes. *Science* 1990, 250, 245-250.
- Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Levono KJ, Gilstrap LC: Williams Obstetrics. 19th Ed. *Appleton & Lange* 1993, 40, 919.
- Ganiats TG, Halverson AL, Bogart MH: Incremental Cost-effectiveness of Incorporating Oestriol Evaluation in Down Syndrome Screening Programmes. *Prenat Diag* 1994, 14, 527-536.
- Ganshirt-Ahlert D, Burschlyk M, Garritsen HSP, Helmer L, Miny P, Horst J, Schneider HPG, Holzgreve W: Magnetic Cell Sorting and the Transferrin Receptor as

- Potential Means of Prenatal Diagnosis from Maternal Blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992, 166, 1350-1355.
- Gardiner K, Horisberger M, Kraus J, Tantravahi U, Korenberg J, Rao V, Reddy S, Patterson D: Analysis of Human Chromosome 21: Correlation of Physical and Cytogenetic Maps: Gene and CpG Island Distribution. *EMBO* 1989, 19, 25-34.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ: PCR protocol. *Academic press* 1990.
- 김영태, 임혜경, 김선행, 이규완, 나중열, 구병삼, 이민수: 임신부 말초혈액에서 남성특이 DNA 증폭에 의한 산전 성감별에 관한 연구. 대한불임학회지 1993, 20, 295-300.
- Korenberg J, Kawashima H, Pulst S, Ikeuchi T, Ogasawara M, Yamamoto K, Schonberg S, Kojis T, Allen L, Magenis E, Ikawa H, Taniguchi N, Epstein C: Molecular Definition of the Region of Chromosome 21 that Causes Features of the Down Syndrome Phenotype. *Am J Hum Genet* 1990, 47, 236-246.
- Kricka LJ: Nonisotope DNA Probe Techniques. *Academic Press, Inc.* 1992.
- Lott IT, McCoy EE: Down Syndrome. *Wiley-Liss* 1992, 13.
- McCormick MK, Schinzel A, Peterson MB, Stetten G, Driscoll DJ, Cantu ES, Tranebjaerg L, Mikkelsen M, Watkins PC, Antonarakis SE. Molecular Genetic Approach to the Characterization of the "Down Syndrome Region" of Chromosome 21. *Genomics* 1989, 5, 325-331.
- Mansfield ES: Diagnosis of Down Syndrome and Other Aneuploidies using Quantitative Polymerase Chain Reaction and Small Tandem Repeat Polymorphism. *Hum Mole Genet* 1993, 2, 43-50.
- Munne S, Grifo J, Cohen J, Weier H-U G: Chromosome Abnormalities in Human Arrested Preimplantation Embryos: A Multiple-Probe FISH Study. *Am J Hum Genet* 1994, 55, 150-159.
- Sharma V, Litt M: Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mole Genet* 1992, 1, 67.
- Spencer K, Salonen R, Muller F: Down's Syndrome Screening in Multiple Pregnancies Using Alpha-fetoprotein and Free Beta hCG. *Prenat Diag* 1994, 14, 537-542.
- Silver RK, MacGregor SN, Muhlbach LH, Knutel TA, Kambich MP: Congenital Malformations Subsequent to Chorionic Villus Sampling: Outcome Analysis of 1048 Consecutive Procedures. *Prenat Diag* 1994, 14, 421-428.
- Zheng YL, Ferguson-Smith MA, Warner JP, Ferguson-Smith ME, Sargent CA, Carter NP: Analysis of Chromosome 21 Copy Number in Uncultured Amniocytes by Fluorescence In Situ Hybridization using A Cosmid Contig. *Prenat Diag* 1992, 12, 931-943.