

Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer를 이용한 HLA-B 유전자의 DNA 다형성 조사

진주보건대학 임상병리과

장 순 모

Genotyping of HLA-B by Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer

Soon-Mo Jang

Department of Clinical pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

Most expressed HLA (human leukocyte antigen) loci exhibit a remarkable degree of allelic polymorphism, which derives from sequence differences predominantly localized to discrete hypervariable regions of the amino terminal domain of the molecule. In this study, the HLA-B genotypes were determined in twenty students unrelated koreans using the PCR-SSP (polymerase chain reaction-sequence specific primer) technique. Several specific primer pairs in assigning the HLA-B gene were used (B*4001/4007, B*4901/5001/4501, B*3701, B*5801). The results of PCR-SSP, the HLA-B3701 primer was detected one (5%), the HLA-B*5801 were detected four (20%), the HLA-B*4001/4007 were detected nineteen (95%) and the HLA-B*4901/5001/4501 were detected twenty. This study shows that the PCR-SSP technique is relatively simple, fast and a practical tool for the determination of the HLA-B genotypes. Moreover, these results genotype frequency of the HLA-B gene could be useful for database study before being applied to individual identification and transplantation immunity.

Key Words : HLA, HLA-B*4001/4007, HLA-B*3701, HLA-B*4901/5001/4501, HLA-B*5801, PCR-SSP

I. 서 론

HLA-B는 HLA(human leukocyte antigen) Class I 부위에서의 가장 다형성을 나타내는 유전자좌로 존재한다. HLA Class I 다형성은 일반적으로 alloantisera나 혹은 단클론 항체를 이용하여 검출해 왔다(Bodmer 등, 1979). 혈청학적 검사는 HLA Class I의 검출에 간편하면서도 비교

적 빠른 방법이긴 하지만, 혈청학적 교차반응이나, typing을 위한 유용한 시약의 제한이 있다는 문제점이 있다. 혈청학적 typing 검사는 점점 PCR 기법을 이용한 유전학적인 typing 방법으로 대체 되고 있는 추세이며, HLA 유전자의 다형성의 규명에 많이 이용되고 있다(Randall 등, 1989; Thonnard 등, 1995). HLA-B를 포함한 HLA Class I의 검출을 위한 DNA typing 방법은 모든 대립유전자들이 다른 대립유전자들과의 염기서열 부위의 공유나, 다른 Class I 유전자좌 뿐만 아니라, 같은 유전자들에서의 공유에 의한 복잡한 해석의 치환에 의해서 상당히 어려웠

교신저자 : 장순모, (우) 660-757 경남 진주시 상봉서동 1142 진주보건대학 임상병리과
Tel : 055-740-1849, 016-9507-1056
E-mail : smchang54@hanmail.net

다(Schwartz, 1985). 최근 Class I 대립인자들의 typing 방법을 위한 DNA 염기서열의 발견으로 이런 문제를 해결하였다(Fernandez 등, 1992; Yoshida 등, 1992).

HLA-B의 분자유전학적 typing을 위한 방법으로 PCR-SSOP(sequence specific oligonucleotide probe)이나, PCR-SSP(sequence specific primer)등이 자주 사용된다(Fleischhauer 등, 1995; Gustincich 등, 1991; Guttridge 등, 1994; Sadler 등, 1994; Bunce 등, 1995).

본 연구는 무작위로 선출된 20명의 학생으로부터 HLA-B 유전자의 다형성을 PCR-SSP 법을 이용하여 조사해 보고, HLA-B 유전자형 검사에 PCR-SSP 방법이 유용한지를 알아보고자 한다.

II. 대상 및 방법

1. 대 상

20명의 무작위로 선출된 건강한 한국 대학생을 대상으로 조사하였다. 20명의 학생으로부터 EDTA가 처리된 CBC bottle에 전혈 5 mL을 채혈하였다.

2. 핵산 분리

채혈한 혈액을 각각 200 µL 사용하여, Bioneer사의 Genomic DNA Extraction Kit(Cat. No. K-3032)를 이용하여 Bioneer사의 방법으로 전혈로부터 genomic DNA를 분리하였다.

3. Sequence Specific PCR을 위한 Primer의 합성

이 실험에 사용된 primer들은 Marsh와 Bodmer에 의해 밝혀진 HLA-B 유전자의 exon 2에서 특이적으로 잘 보존된 DNA 염기서열을 이용하여 제작하였다(Table 1).

4. PCR을 이용한 HLA-B 유전자의 증폭

PCR-SSP을 위한 PCR 혼합액 dNTP(각 2.5 mM), 10× PCR buffer 2 µL, primer(10 pmol) 각 1 µL씩 넣었고, genomic DNA(25 µg) 1 µL, Taq DNA polymerase (2 unit) 1 µL, 최종 반응액은 증류수로 20 µL 되게 실시하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer)에서 94°C에서 1분, 52~66°C(HLA-B*4901/5001/4501은 52°C, HLA-B* 3701, HLA-B*5801은 60°C 그리고 HLA-B*4001/4007은 62°C)에서 1분, 72°C에서 1분의 순서로 35회를 시행한 후 72°C에서 10분간 처리하였다.

5. PCR 산물의 확인

PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel에 1× TAE buffer에서 70 volt, 100 mA로 3시간 동안 전기영동을 실시한 다음, agarose gel을 ethidium bromide(0.5 µg/mL) 수용액에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고, polaroid camera로 사진을 촬영하였다.

Table 1. The sequence of HLA-B specific primer

Primer	Primer sequence	PCR product (bp)
HLA-B*4001/4007	5'-CCACTCCATGAGGTATTTCC-3' 3'-TACCAGCGCGCTCCAGCT-5'	784
HLA-B*3701	5'-GCCGCGAGTCCGAGGAC-3' 3'-CCTCCAGGTAGGCTCTGTCC-5'	606
HLA-B*4901/5001/4501	5'-CCACTCCATGAGGTATTTCC-3' 3'-ATCCTTGCCGTCGTAGGCT-5'	600
HLA-B*5801	5'-GAACATGAAGGCCTCCGCG-3' 3'-GCCATACATCCTCTGGATGA-5'	345

III. 결 과

PCR-SSP 결과 HLA-B*3701은 20명 중 1명(5%)에서 검출이 되었고, HLA-B*5801은 20명 중 4명(20%)이 검출되었다. 그러나 HLA-B*4001/4007에서는 20명 중 19명(95%), HLA-B*4901/5001/4501에서는 20명 중 20명(100%) 모두 검출이 되었다. 이 실험군의 결과에서는 HLA-B*4001/4007와 HLA-B*4901/5001/4501이 HLA-B*3701, HLA-B*5801군보다 높게 검출되었고, HLA-B*4001/4007, HLA-B*4901/5001/4501은 거의 모든 실험군에서 검출되는 것으로 보아 이 유전자가 가장 일반적으로 존재하는 유전자임을 알 수 있었다(Fig. 1).

IV. 고 찰

최근 몇 년 전 까지 HLA Class I 대립유전자의 다형성은 혈청학적 방법이나 세포학적 방법으로 동정을 하였다. 그러나 DNA typing 방법은 혈청학적 typing의 대체방법으로 점점 더 널리 알려졌다. HLA Class I의 발현된 단백질이 유전자 다형성에 의해 변이가 심하기 때문에 장기이식 수술에서의 공여자와 수여자 사이의 HLA Class I 유전자들의 대립유전자의 차이는 가끔 심각한 합병증의 초래를 야기시키기도 한다. 따라서 HLA Class I 유전자에 간단하면서도 정확한 유전자형 검사가 임상에서 중요한 역할을 한다. PCR-SSP의 방법으로 대립유전자의 분석에서 HLA-B*3701은 5%로 검출이 되었고,

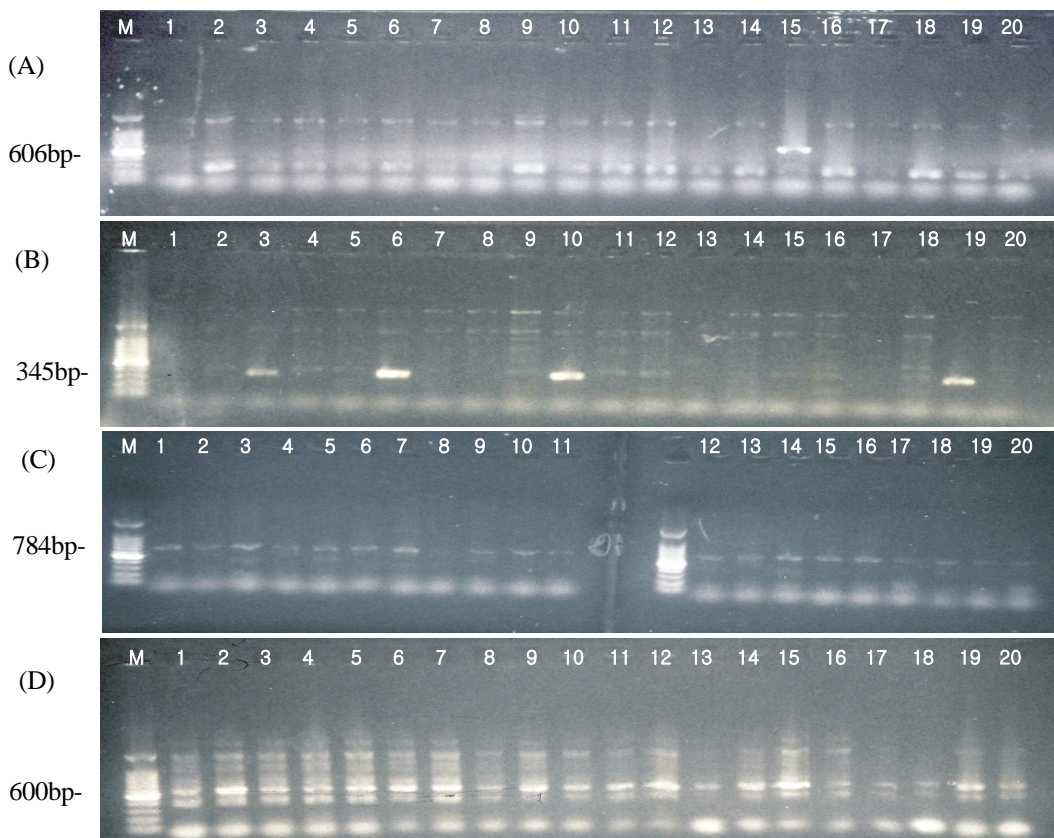


Fig. 1. PCR-SSP patterns of HLA-B.
 A : HLA-B*3701 primer, lane 15 was detected.
 B : HLA-B*5801 primer, lanes 3, 6, 10 and 19 were detected.
 C : HLA-B*4001/4007 primer, all lanes detected except lane 8.
 D : HLA-B*4901/5001/4501 primer, all lanes detected.
 Lane M, 100-bp molecular size marker

HLA-B*5801은 20%, HLA-B*4001/4007은 95% 그리고 HLA-B*4901/5001/4501은 100% 검출이 되었으며, HLA-B*4001/4007과 HLA-B*4901/5001/4501이 HLA-B*3701과 HLA-B*5801 군보다 더 높게 검출되었고, HLA-B*4001/4007과 HLA-B*4901/5001/4501은 거의 모든 실험군에서 검출되는 것으로 보아 이 유전자가 가장 일반적으로 존재하는 유전자임을 알 수 있었다. 앞으로 더 많은 실험군을 선택해서 실험을 실시하여, 한국 사람에서의 일반적인 대립유전자의 분포를 더욱 자세히 밝히려고 한다.

본 연구에서의 HLA Class I의 DNA typing 방법에 PCR-SSP법으로의 접근은 매우 간단하면서도 아주 강력한 방법이라고 생각되며, 더욱이 이 연구결과는 장기이식 수술에 있어서 조직적합여부검사의 기초자료로 제공이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 진주보건대학 학술연구비조성비에 의하여 이루어진 것임

참 고 문 헌

1. Bodmer WF, Bodmer JG. Cytofluorochromasia for HLA-A, -B and DR typing. In Ray JG (ed.), NIAID manual of tissue typing techniques, p46-51, NIH, Bethesda Mamyland, 1979.
2. Bunce M, Fanning GC, Welsh KI. Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primer. *Tissue Antigen* 45:81-90, 1995.
3. Fernandez-Vina M, Falco M, Sun Y, Stastny P. DNA typing for HLA class I alleles. *Hum Immunol* 33:

- 163-173, 1992.
4. Fleischhauer K, Zino E, Bordignon C, Benazzi E. Complete genetic and extensive fine-specificity typing of the HLA-B locus by the PCR-SSOP. *Tissue Antigens* 46:281-292, 1995.
5. Gustincich S, Manfioletti G, Del-Sal SG, Schneider C, Carninci. A fast method for high quality genomic DNA extractions from whole human blood. *Bio-techniques* 11:298-302, 1991.
6. Guttridge MG, Burr C, Klouda PT. Identification of HLA-B35, B53, B18, B5, B78 and B17 alleles by the polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 44:43-46, 1994.
7. Randall KS, Sean W, Corey HL, Henry AE. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci* 86:6230-6234, 1989.
8. Sadler AM, Petrozelli F, Krausa P, Mash SGE, Guttridge MG, Browning MJ, Bodmer JG. Low DNA typing for HLA-B using sequence-specific primers in allele- or group-specific ARMS/PCR. *Tissue Antigens* 33:148-154, 1994
9. Schwartz RZ. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann Rev Immunol* 3:237-250, 1985.
10. Thonnard J, Deldime F, Heusterspreute M, Delepaut B, Hanon F, Bruyere M, Philippe M. HLA class II Genotyping : Two Assay Systems Compared. *Clin Chem* 41:553-556, 1995.
11. Yoshida M, Kimura A, Numano F, Sazazuki T. Polymerase-chain-reaction-based. based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum Immunol* 34:257-266, 1992.