

Multiplex PCR과 Conformation Sensitive Gel Electrophoresis를 이용한 혈우병B *F9* 유전자 돌연변이 직접 진단법

한국혈우재단 서울의원, 성균관대학교 대학 삼성의료원 진단검사유전학과*, 고려대학교 의과대학 소아청소년과†

유기영 · 김희진* · 이광철†

= Abstract =

Direct detection of hemophilia B *F9* gene mutation using multiplex PCR and conformation sensitive gel electrophoresis

Ki Young Yoo, M.D., Hee Jin Kim, M.D.* and Kwang Chul Lee, M.D.†

Korea Hemophilia Foundation, Seoul, Department of Laboratory Medicine & Genetics*
Sumsung Medical Center, School of Medicine, Sungkyunkwan University, Seoul
Department of Pediatrics†, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Purpose: The *F9* gene is known to be the causative gene for hemophilia B, but unfortunately the detection rate for restriction fragment length polymorphism-based linkage analysis is only 55.6%. Direct DNA sequencing can detect 98% of mutations, but this alternative procedure is very costly. Here, we conducted multiplex polymerase chain reactions (PCRs) and conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) to perform a screened DNA sequencing for the *F9* gene, and we compared the results with direct sequencing in terms of accuracy, cost, simplicity, and time consumption.

Methods: A total of 27 unrelated hemophilia B patients were enrolled. Direct DNA sequencing was performed for 27 patients by a separate institute, and multiplex PCR-CSGE screened sequencing was done in our laboratory. Results of the direct DNA sequencing were used as a reference, to which the results of the multiplex PCR-CSGE screened sequencing were compared. For the patients whose mutation was not detected by the 2 methods, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was conducted.

Results: With direct sequencing, the mutations could be identified from 26 patients (96.3%), whereas for multiplex PCR-CSGE screened sequencing, the mutations could be detected in 23 (85.2%). One patient's mutation was identified by MLPA. A total of 21 different mutations were found among the 27 patients.

Conclusion: Multiplex PCR-CSGE screened DNA sequencing detected 88.9% of mutations and reduced costs by 55.7% compared with direct DNA sequencing. However, it was more labor-intensive and time-consuming. (*Korean J Pediatr* 2010;53:397-407)

Key Words: Hemophilia B, DNA mutational analysis, Polymerase chain reaction, Electrophoresis

서 론

혈우병B는 IX번 혈액 응고인자가 부족하여 출혈시 지혈이 되지 않는 질환으로 X-연관 열성 유전을 한다. 혈우병B의 병인 유전자인 *F9* 유전자는 X-염색체 장완 27.1 유전자좌에 위치한다.

F9 유전자의 염기서열은 1985년에 완전히 해독되었는데, 당시로는 가장 길고 연속적으로 해독된 인간의 유전자중 하나였다¹⁾. 총 길이는 약 33.5 kb이며 8개의 exon과 7개의 intron으로 구성되어 2.8 kb의 mRNA를 암호화하며, 이중 1.4 kb의 mRNA만이 461개의 아미노산으로 번역된다²⁾. IX번 응고인자는 다른 응고 단백질들과 공통되는 영역(domain)들을 가지고 있는데, 특히 VII번, X번, 그리고 protein C와 일치되는 영역을 가지고 있어, 이들 단백질은 하나의 공통된 조상을 가지고 있다고 여겨지고 있다.

혈우병 유전자 돌연변이의 진단에는 간접 진단법과 직접 진단법이 있다. 간접 진단법은 PCR과 제한효소 절편 길이 다형성(restriction fragment length polymorphism) 혹은 PCR과 single strand conformation polymorphism (SSCP) 등을 이용

Received : 19 December 2009, Revised : 14 January 2009

Accepted : 12 February 2010

Address for correspondence : Ki Young Yoo, M.D.

Seoul Clinic, Korea Hemophilia Foundation, 1628-26 Seocho-dong, Seocho-ku, Seoul, 137-032, Korea

Tel : +82.2-3473-6100, Fax : +82.2-3473-6634

E-mail : gowho@hanmail.net

한 연관분석법(linkage analysis)을 주로 이용한다. 연관분석법은 유전자 재조합 과정에서 같은 염색체 위에 서로 가까운 유전자들이 함께 자손에게 유전되는 성질을 이용한 방법이다. 사람에게 1 cM (1%의 유전자재조합이 일어날 확률의 유전자 지도 거리)는 약 100kb-10,000 kb이고, *F8* 유전자는 186 kb, *F9* 유전자는 34 kb이므로 유전자내 표식자(intragenic marker)를 이용하면 재조합에 따른 오류는 1% 이하라 할 수 있다³⁾. 유전자외 표식자(extragenic marker)들은 유전자내 표식자에 비해 재조합에 따른 위험성이 3-5%로 높은 편이다. 연관분석법은 경제적이면서 실험이 비교적 용이한 분석법이나, 환자 자신 뿐 아니라 가족들도 검사를 받아야 하고 또한 응고인자 활성도가 경도로 감소된 경우와 같이 혈우병의 확진 검사로서 유전자 검사가 필요한 경우 도움이 되지 못하였다. 무엇보다 *F9* 유전자에 대한 연관분석은 정보제공율이 떨어져 한국인 혈우병B 환자에 대해 *MseI*과 *HhaI*를 이용하여 연관분석을 시행했을 때 정보제공율은 55.6% 정도에 불과하였다⁴⁾.

한편 직접 진단법은 DNA 염기서열 분석을 하는 방법이다. *F9* 유전자는 비교적 길이가 짧은 편에 속하며, 98%의 돌연변이가 염기서열 분석법으로 진단이 가능한 것으로 알려져 있다. 그러나 이는 비용과 시간이 많이 드는 단점이 있어 주로 연구목적으로 사용되어 왔다.

이런 직접 염기서열 분석법의 단점을 극복하기 위해 SSCP, CSGE, denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC) 등의 선별검사 후 돌연변이가 의심되는 특정 부위만 서열 분석을 하는 방법들이 고안되었다. 우리나라에서는 직접 염기서열 분석법에 의한 *F8* 및 *F9* 유전자 돌연변이에 대한 보고는 있었으나^{5, 6)}, 돌연변이 선별검사 후 염기서열 분석법에 의한 돌연변이 보고는 아직까지 없었다. 본 연구는 *F9* 유전자에 대한 직접 염기서열 분석법과 mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법을 비교하여 mPCR-CSGE에 의한 돌연변이 선별의 정확성, 경제성, 신속성, 편리성을 평가하기 위해 고안되었다.

대상 및 방법

1. 대 상

본 연구에는 가계도 조사를 통해 비혈연 관계로 확인된 혈우병 B 환자 27명이 참여하였다(Table 1). 이중 6 가족에게 제한효소 절편길이 다형성에 기초한 연관분석을 시행하였으나, 5 가족에서는 환자의 모친에게 이형접합체가 형성되지 않아 보인자와 산전진단을 위한 정보제공을 받을 수 없었다. IX번 응고인자 활성도(FIX:C)의 측정은 one-stage assay를 이용하였다. 이때 사용한 FIX-deficient plasma는 HemosIL™ (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy; 참고치 65-150%)이었으며, 응고기기는 ACL 9000 (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy)이었다. IX인자 항체가는 Bethesda assay를 이용하여 측정하였

고, 혈우병 진단을 받은 후 한번이라도 항체가가 0.6 BU/mL 이상이었던 환자를 항체 환자로 분류하였다. 1명의 중등증 환자를 제외한 26명의 환자는 모두 중증 혈우병B 환자였다. 3명의 환자에게 항체가 있었으며, 영구적 항체를 가진 환자가 1명이었고, 나머지 2명은 일시적 항체 양성 환자였다. 가족력이 있던 환자는 10명이었으며, 나머지 17명은 산발성(sporadic)이었다. 환자들의 평균 연령은 19.8세였으며, IX번 응고인자 활성도는 평균 0.63%였다. 본 연구는 삼성서울병원의 임상심의위원회의 승인을 득한 후 실시되었고, 환자들에게는 유전자 검사 동의를 받았다.

2. 연구 방법

27명의 혈우병B 환자들의 말초혈액을 채취하여 2개로 등분하였다. 1개의 등분은 삼성의료원 진단검사유전학과로 보내져 직접 염기서열 분석법을 시행하였고, 또다른 1개의 등분은 한국혈우재단 서울의원에서 mPCR-CSGE로 선별검사를 시행한 후 돌연변이가 의심되는 특정 부위에 대해서만 염기서열 분석법을 시행하였다. PCR 증폭이 안되어 직접 염기서열 분석법으로 분석이 되지 않는 환자에 대해서는 대결실 돌연변이를 감별하기 위해 삼성서울병원과 한국혈우재단 서울의원에서 각각 MLPA를 이용하여 exon dosage test를 시행하였다. 실험이 끝난 후 두 방법의 정확성, 경제성, 신속성, 편리성을 비교하였으며, 이때 인건비와 감가상각비 등을 제외하였고 시약 등의 소모품 비용만을 계산하였다.

1) 직접 염기서열 분석법

말초혈액 림프구에서 Wizard Genomic DNA Purification Extraction Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 DNA를 추출하였다. *F9* 유전자의 모든 exon들과 인접한 intron에 대해 PCR을 시행하였다. 사용된 시발체는 Table 2와 같았다. 염기서열 분석은 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA)에서 BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied biosystems, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. 발견된 유전자의 변이는 Sequencher program (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 해석하였으며, *F9* wild-type 서열(GenBank accession no. : NM_000133.3)을 참조서열로 이용하였다. 발견된 돌연변이의 명명은 Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>)의 명명법을 따랐는데, 이는 번역 시작 코돈인 ATG 전사의 A를 +1로 명명한다. 단백질에 대해서는 Yoshitake 등¹⁾의 명명법을 따라 기능 단백질의 첫 아미노산을 +1로 하였다. 또한 Human Genome Variation Society의 Met를 +1로 하는 명명법에 따른 명명도 괄호 안에 병기하였다. 확인된 변이의 novelty를 알기 위해서 Human Gene Mutation Database (HGMD)와 locus specific database인 The Hemophilia B Mutation Database (http://www.kcl.ac.uk/ip/peter_green/hemBdatabase.html)를 참조하였다⁷⁾. SNP 여부

Table 1. Patients' Characteristics

Patient's No.	Age (yrs)	FIX:C (%)	FHx of hemophilia	Peak inhibitor titer (BU/mL)	RFLP-based linkage analysis
1	14	0.4	familial	0.36	uninformative
2	4	0.6	sporadic	0.10	NT
3	30	0.6	familial	0.42	uninformative
4	9	0.9	sporadic	0.26	NT
5	40	0.3	sporadic	0.24	NT
6	27	0.7	sporadic	0.80*	uninformative
7	5	0.8	sporadic	0.06	NT
8	8	0.3	sporadic	0.02	NT
9	20	0.6	sporadic	0.26	NT
10	29	0.4	familial	0.18	NT
11	8	0.4	sporadic	0.24	uninformative
12	28	0.1	sporadic	0.18	NT
13	21	0.9	sporadic	0.18	NT
14	23	0.5	familial	0.16	NT
15	13	0.7	familial	0.44	NT
16	21	0.5	sporadic	0.20	uninformative
17	18	0.8	familial	1.20*	NT
18	6	0.3	sporadic	0.16	NT
19	35	0.5	familial	0.34	NT
20	24	0.9	sporadic	0.38	NT
21	23	3.4	sporadic	0.10	NT
22	11	0.6	familial	0.36	NT
23	43	0.3	familial	0.46	NT
24	6	0.0	sporadic	30.00†	informative
25	13	0.6	familial	0.30	NT
26	39	0.2	sporadic	0.46	NT
27	18	0.8	sporadic	0.12	NT

*Transient inhibitor; †Permanent inhibitor

Abbreviations : yrs, years; FHx, familial history; NT, not tested

Table 2. Primers for Direct Sequencing of *F9* Gene

Primer set	Sequence
<i>F9_EaF</i>	5'-CCCATTGAGGGAGATGGAC-3'
<i>F9_EaR</i>	5'-ATTGCTGTCAAATCATGTAATCA-3'
<i>F9_Eb-cF</i>	5'-GCTCCATGCCCTAAAGAGAA-3'
<i>F9_Eb-cR</i>	5'-CCCACATAATTCTCATATGTTTCA-3'
<i>F9_EdF</i>	5'-TGGCTTCCAGGTCAGTAGTTT-3'
<i>F9_EdR</i>	5'-TTCAACTTGTTCAGAGGGAAA-3'
<i>F9_EeF</i>	5'-GCCCCCAATGTATATTTGACC-3'
<i>F9_EeR</i>	5'-TGTAGGTTTGTAAAATGCTGAAG-3'
<i>F9_Eff</i>	5'-TGGGCTCAATCTCAATTTT-3'
<i>F9_EfR</i>	5'-TCACATCCCAATAGGTCTGTCT-3'
<i>F9_EgF</i>	5'-TGCAAAGCTCACATTTCCAG-3'
<i>F9_EgR</i>	5'-CCTTCTGCCTTTAGCCCAAT-3'
<i>F9_EhF</i>	5'-TTGCCAATTAGGTCAGTGGTC-3'
<i>F9_EhI</i>	5'-TCCTCAAATTTGGATCTGGC-3'
<i>F9_EhR</i>	5'-TCCCCTGTAAAGAGAAAAAGCA-3'

는 dbSNP build 130을 참조하였다. CpG hotspot과 계통분류학적 분석을 위해서 UCSC (University of California Santa Cruz; <http://genome.ucsc.edu/>) genome browser를 이용해 분석하였다. 단백질 3-D 구조의 예측에는 Swiss-model⁸⁾을 이용하였

고, UCSF chimera program (University of California San Francisco; <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)을 이용하여 단백질 3-D 구조를 영상화 하였다.

2) mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법

(1) DNA 추출

EDTA 처리된 환자의 말초혈액 3 mL을 채취하여 Wizard Genomic DNA Purification Extraction kit[®]를 사용하여 말초혈액 림프구에서 genomic DNA를 추출하였다.

(2) Multiplex PCR

Multiplex PCR은 Jayandharan 등⁹⁾의 방법을 따랐다. *F9* 유전자를 promoter, exon, polyadenylation region을 포함하는 3개의 multiplex PCR 그룹과 1개의 uniplex PCR 세트로 나누어 증폭시켰다. 하나의 multiplex PCR 그룹은 불일 온도는 동일하지만 PCR 산물의 크기는 서로 다른 분절로 구성 되도록 그룹화되었다. PCR은 PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, NV, USA) 를 이용하였다. exon h는 h1과 h2로 나누었는데, 그중 h1은 uniplex PCR 그룹으로 증폭되었다. Multiplex PCR의 조건은 Table 3과 같았다. PCR 반응은 master mix (ABgene, Epsom, UK)를 사용하여 총 30 μ L의 reaction mix-

ture를 만들어 반응하였다. 사용된 2X master mix의 조성은 1.25 units Thermoprime Plus DNA Polymerase, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% (v/v) Tween 20, 0.2 mM dNTP 이었다. 하나의 PCR tube에 각각 multiplex PCR 그룹별로 각 upstream, downstream 시발체와 추출한 genomic DNA 1 µL를 넣어 환자 1인당 4개의 sample을 만들었다. PCR 반응은 programmable heat block (MJ Research, Waltham, MA, U.S.A.)을 사용하였다. 초기 변성을 위해 94°C, 5분 반응시킨 후 변성을 위해 94°C, 40초, 각 그룹별 붙임 온도, 40초, 신장을 위해 72°C, 40초를 30회 반복하였으며, 마지막 신장을 72°C, 5분간 실시 하였다. Heteroduplexing PCR을 실시하기 위해 환자 뿐아니라 정상 대조군의 DNA 1 µL에 대해서도 동일한 시발체와 조건 하에 multiplex PCR을 시행하였다. 한편 CSGE 기구에 한번에 걸 수 있는 환자가 5명 정도 이므로, 정상 대조군의 PCR 산물이 heteroduplexing PCR시 필요한 환자 샘플의 양보다 최소한 5배가 되도록 조정하였다. 본 연구에서는 PCR 산물이 30 µL이 되어 heteroduplexing PCR시 필요한 5 µL의 5배가 넘었다.

(3) Multiplex PCR 증폭의 확인

CSGE를 하기 전, 각 PCR 산물의 증폭을 확인하기 위해 multiplex 그룹별로 PCR 산물 5 µL와 loading dye 1 µL를 혼합하여, 5% agarose gel에서 100 volts, 1시간 전기영동 하였으며, band의 확인은 자외선 램프 하에 육안으로 하였다.

(4) Heteroduplexing PCR

증폭된 환자의 특정 multiplex PCR 그룹 DNA 5 µL와 그에 해당하는 정상 대조군 특정 multiplex PCR 그룹 DNA 5 µL를 동량 섞어 95°C, 8분간 변성 시킨 후, 다시 50°C, 45분 붙임 반응시켜 heteroduplexed DNA를 만들었다.

(5) CSGE

Sequi-Gen[®]GT Sequencing Cell (500×380×0.7 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 10% polyacrylamide gel을 만들었다. 0.5X TTE buffer를 이용하여 750 volts/30분 동안 gel과 buffer의 상태를 고르게 하기 위한 prerun을 실시하였다. 이후 heteroduplexing PCR로 얻은 PCR 산물 5 µL를 2 µL의 loading dye와 혼합하여 gel에 걸고, 실온에서 400 volts/18시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝나면 ethidium bromide stain 후 Gel-Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 band를 확인하였다.

(6) 염기서열 분석(DNA sequencing)

CSGE상 heteroduplex가 형성되어 band가 2개로 분리된 그룹 혹은, wild type에 비해 월등히 넓은 band를 보이는 그룹을 양성으로 판단하였다(Fig. 1). 선별검사상 양성으로 나온 그룹에 해당하는 Table 3의 시발체를 이용하여 다시 한번 sequencing PCR한 후 ABI Prism 3130 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 나머지 생정보학적 분석방법은 상기의 직접 염기서열분석법과 동일하였다.

Table 3. Conditions for Multiplex PCR of *F9* Gene

	Primer sequence	Size (bp)	Region amplified	Annealing temp. (°C)
<i>MPX1</i>				57.0
<i>Ex-bcf</i>	5'-AGAGATGTAAAAATTTTCATGATGTT-3'	513	62589-6771	
<i>Ex-bcr</i>	5'-GCAGAGAAAAACCCACATAAT-3'			
<i>Ex-ef</i>	5'-CATGAGTCAGTAGTTCCATGTAAGTT-3'	272	17592-17866	
<i>Ex-er</i>	5'-TGTAGGTTTGTAAAAATGCTGAAAGTT-3'			
<i>Ex-h2f</i>	5'-GAAGAGTCTCCACAAAAGGG-3'	397	31053-31449	
<i>Ex-h2r</i>	5'-AAGATGGGAAAGTGATTAGTTA-3'			
<i>MPX2</i>				52.5
<i>Poly Af</i>	5'-AAGAGAACCGTTCGTTTGCA-3'	510	32410-32920	
<i>Poly Ar</i>	5'-AGAACTAAAGGAACTAGCAAG-3'			
<i>Promotor+Ex-af</i>	5'-GATGGACATTATTTCCAGCA-3'	256	-68~91	
<i>Promotor+Ex-ar</i>	5'-GAAGAAGACAGCATCAGATC-3'			
<i>Ex-gf</i>	5'-AAGCTCACATTTCCAGAAAAC-3'	393	29898-30293	
<i>Ex-gr</i>	5'-TGGGTTCTGAAATTATGA-3'			
<i>MPX3</i>				62.0
<i>Ex-df</i>	5'-CTGCAGGGGAGGACCGGGCATTCTA-3'	245	10328-10563	
<i>Ex-dr</i>	5'-GAATTCAACTTGTTCAGAGGGAA-3'			
<i>Ex-ff</i>	5'-TTTAAATACTGATGGGCCTG-3'	458	20238-20698	
<i>Ex-fr</i>	5'-GTTAGTGCTGAAACTTGCCT-3'			
<i>Uniplex</i>				50.0
<i>Ex-h1f</i>	5'-TAAGAATGAGATCTTTAACA-3'	393	30708-31101	
<i>Ex-h1r</i>	5'-CTAAGGTAAGTGAAGAACTAA-3'			

Abbreviations: MPX, multiplex PCR group; Ex, exon

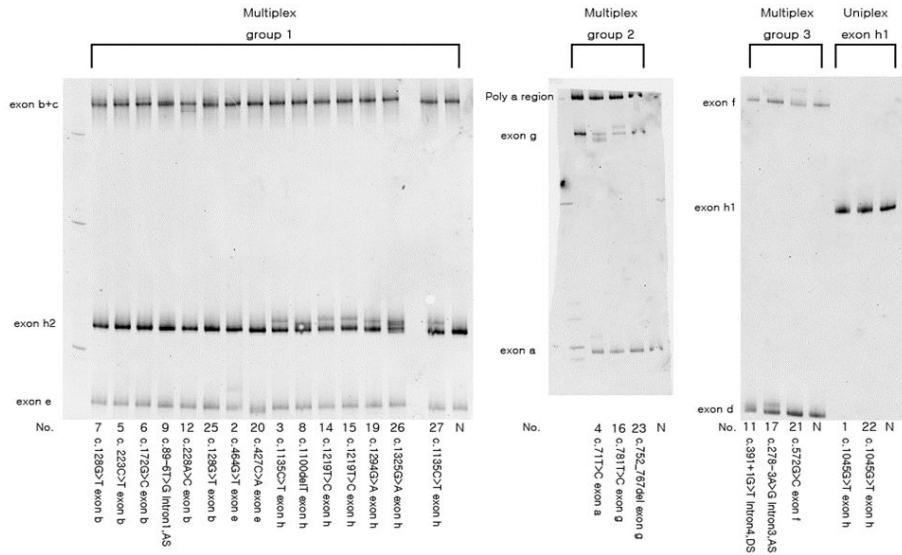


Fig. 1. Gel photograph of conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE) results in multiplex (groups 1-3) and uniplex (exon h1) PCRs. MPX1 (exon b, e, and h2), MPX2 (poly A, promotor +exon a, and exon g), MPX3 (exon d and exon f), and uniplex (exon h1) are grouped on the CSGE gel. The CSGE profiles for all 9 PCR fragments in a 10% polyacrylamide gel are labeled. A given fragment was presumed to have a mutation if it resulted in an abnormal CSGE pattern in comparison with the normal control (N) PCR loaded on the gel. Each patient's CSGE results are shown and the corresponding mutation data are denoted below each column.

3) MLPA

MLPA는 Salsa MLPA kit P207 Factor IX (MRC-Holland bv, Amsterdam, Netherlands)를 이용하였다. P207 kit에는 *F9* 유전자의 8개 exon에 대해 10개의 소식자(exon a과 exon h에 각각 두 개의 소식자)가 있고, *F8* 유전자에 대해 5개의 소식자가 포함되어 있다. 실험하고자 하는 환자의 샘플과 정상 대조군 샘플의 genomic DNA를 약 100-250 ng 정도의 같은 농도로 맞추어 준비하였다. 준비된 genomic DNA를 98°C에서 5분간 변성시킨 후 *F9*-MLPA probe mix와 혼합하여 60°C에서 16시간 교잡화(hybridization) 시켰다. 이어 부합화된 소식자를 ligase-65 mix와 잘 혼합하여 54°C에서 15분간 연결(ligation)시킨 후 산물을 PCR 시발제, dNTPs, SALSA PCR buffer와 SALSA polymerase를 첨가하여 PCR 반응을 수행하였다. 각각의 소식자 증폭산물 2 µL를 0.5 µL의 Genescan™-500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK)와 8.5 µL의 HiDi Formamide (Applied Biosystems, Warrington, UK)와 혼합하여 94°C에서 5분간 반응시킨 후 ABI 3130 Genetic Analyzer를 통해 전기영동 하여 GeneMapper v.3.7 software (Applied Biosystems, Warrington, UK)를 통해 분석하였다. 정상 대조군의 copy number는 신호값 1의 정상치를 보이는데, 정상 대조군과 환자와의 각 exon별 높이를 비교하여 두 개의 높이가 같은 경우를 정상으로 보고, 정상 대조군보다 현저히 낮은 경우를 결손으로 판독하였다

결 과

직접 염기서열 분석법에 의해서 27명중에 26명(96.3%)에서 질병을 일으키는 돌연변이를 확인할 수 있었다. mPCR-CSGE에 의해 돌연변이 선별이 가능했던 환자는 27명중 23명(85.2%)이었다(Table 4). 24번 환자 1명에서는 PCR 증폭이 안되어 직접 염기서열 분석법을 시행할 수 없어서 MLPA를 시행하였고, 그 결과 exon a의 대결실을 확인할 수 있었다. 이 환자는 multiplex PCR MPX2에서도 증폭이 안되어 wild type DNA와 환자의 DNA를 heteroduplexing PCR를 할 경우 homoduplex로 나타나기 때문에 돌연변이 선별이 불가능하다. 직접 염기서열 분석법과 MLPA를 시행하여 27명의 환자에서 서로 다른 21개의 돌연변이를 발견할 수 있었다. 21개의 돌연변이중 기존 돌연변이(known mutation)는 19개 였으며, 8번과 23번 환자에서는 새로운 돌연변이(novel mutation)가 발견되었다.

21개의 돌연변이 중에는 12개의 과오 돌연변이(missense mutation), 3개의 무의미 돌연변이(nonsense mutation), 3개의 mRNA 짜집기 돌연변이(mRNA splicing mutation), 2개의 소결실 돌연변이(small deletion mutation), 1개의 대결실 돌연변이(large deletion mutation)가 있었다. 2개의 새로운 돌연변이들은 각각 1개의 과오 돌연변이와 소결실 돌연변이를 일으켰다.

Table 4. Mutations Detected with Direct Sequencing and with mPCR-CSGE Screened Sequencing

No.	Location	Nucleotide* change	Amino acid† change	mPCR-CSGE	Hot spot	CpG	Conservation score‡
1	exon h	c.1045G>T	Gly303X (Gly349X)	HeD		No	0.12
2	exon e	c.464G>T	Cys109Phe (Cys155Phe)	HeD		No	1.00
3	exon h	c.1135C>T	Arg333X (Arg379X)	HeD	Arg333X	Yes	0.97
4	exon a	c.71T>C	Leu-23Pro (Leu24Pro)	HeD		No	1.00
5	exon b	c.223C>T	Arg29X (Arg75X)	HeD	Arg29X	Yes	0.99
6	exon b	c.172G>C	Gly12Arg (Gly58Arg)	HeD		No	0.99
7	exon b	c.128G>T	Arg-4Leu (Arg43Leu)	HeD	Arg-4Leu	No	0.25
8	exon h	c.1100delT	Leu321X (Leu367X)	HeD		-	0.00
9	Intron1, AS	c.89-6T>G	-	HeD		-	0.72
10	exon h	c.1150C>T	Arg338X (Arg384X)	HoD	Arg338X	Yes	0.74
11	Intron4, DS	c.391+1G>T	-	HeD		-	1.00
12	exon b	c.228A>C	Glu30Asp (Glu76Asp)	HeD		No	1.00
13	exon h	c.1295G>A	Gly386Asp (Gly432Asp)	HoD		No	1.00
14	exon h	c.1219T>C	Cys361Arg (Cys407Arg)	HeD		No	0.99
15	exon h	c.1219T>C	Cys361Arg (Cys407Arg)	HeD		No	0.99
16	exon g	c.781T>C	Trp215Arg (Trp261Arg)	HeD		No	1.00
17	Intron3, AS	c.278-3A>G	-	HeD		-	0.99
18	exon h	c.1150C>T	Arg338X (Arg384X)	HoD	Arg338X	Yes	0.74
19	exon h	c.1294G>A	Gly386Ser (Gly432Ser)	HeD		No	1.00
20	exon e	c.427C>A	Gln97Lys (Gln143Lys)	HeD		No	1.00
21	exon f	c.572G>C	Arg145Pro (Arg191Pro)	HeD		No	0.92
22	exon h	c.1045G>T	Gly303X (Gly349X)	HeD		No	0.12
23	exon g	c.752_767del	Phe205SerfsX8 (Phe251SerfsX8)	HeD		-	0.73
24	exon a	Del exon 1	-	-		-	-
25	exon b	c.128G>T	Arg-4Leu (Arg43Leu)	HeD	Arg-4Leu	No	0.25
26	exon h	c.1325G>A	Gly396Glu (Gly442Glu)	HeD		No	1.00
27	exon h	c.1135C>T	Arg333X (Arg379X)	HeD	Arg333X	Yes	0.97

*Numbered based on the cDNA sequence with A of ATG translation initiation codon as +1 (GenBank accession: NM_000133.3); † Number primarily according to Yoshitake et al., followed by first Met as +1 (per the Human Gene Variation Society guidelines) in parentheses; ‡ Evolutionary conservation of amino acid residue as defined by Bottema et al. Novel mutations are shown in Bold Abbreviations : HeD, Heteroduplexed; HoD, Homoduplexed; AS, acceptor site; DS, donor site

Hemophilia B Mutation Database에 5번 이상 발생한 것으로 보고된 *F9* 유전자의 hotspot에서 발견된 돌연변이는 7개(3번, 5번, 7번, 10번, 18번, 25번, 27번 환자)였으며, 이가운데 CpG dinucleotide에서는 5개(3번, 5번, 10번, 18번, 27번 환자)가 발견되었다. 한편 dbSNP build 130에 의하면 *F9* 유전자에는 194개의 SNP가 보고 되어 있는데, 기존의 보고된 SNP에 대조한 결과 본 연구에서 발견된 염기서열 변이에는 SNP가 하나도 없었다. 계통분류학적 분석을 보면 돌연변이들은 평균 0.72의 conservation score를 가진 염기서열에서 발생하였다. Conservation score 0.95 이상의 highly conserved sequence에서 발생한 돌연변이가 16명의 환자에게 관찰되었다. MLPA로 진단된 1명의 환자는 mPCR-CSGE중 multiplex PCR에서 exon a만 증폭이 되지 않아 돌연변이의 선별이 가능하였다(Fig. 2).

새로운 돌연변이 중 8번 환자에게 생긴 무의미 돌연변이는 단백질 주형(template)이 밝혀져 있어 단백질 3-D 구조 예측이 가능했다(Fig. 3). 무의미 돌연변이로 인한 단백질 3-D 구조의 변형은 과오 돌연변이로 인한 그것(Fig. 4)보다 훨씬 심하게 발생하였다.

기존의 연관분석, 직접 염기서열 분석법 그리고 mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법을 비교하면 Table 5와 같다. mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법과 직접 염기서열 분석법을 좀더 구체적으로 비교하면 경제성에 있어 mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법은 직접 염기서열 분석법에 비해 환자 1인당 검사 비용(인건비, 감가상각비 제외)이 57.7%에 불과하였으나, 소요시간은 약 하루가 더 걸리고, 실험 과정에서도 multiplex PCR과 CSGE를 시행하는 단계가 추가적으로 더 필요하였다(Table 6).

고 찰

혈우병B는 이질적인 돌연변이가 많은 질환이기 때문에 각 가계들은 서로 다른 유형의 돌연변이를 가지기 쉽다. Sommer 등¹⁰⁾에 의하면 경증 혈우병B 환자의 97%에서 과오 돌연변이가 발견되었는데, 이들 중에서 41%만이 서로 다른 돌연변이였다. 한편 중등증 및 중증 환자의 단 59%에서 과오 돌연변이가 발견되었는데, 그 대부분(95%)이 서로 다른 돌연변이였다. 이렇듯 *F9* 유전자의 돌연변이 양상이 다양하기 때문에 돌연변이 database

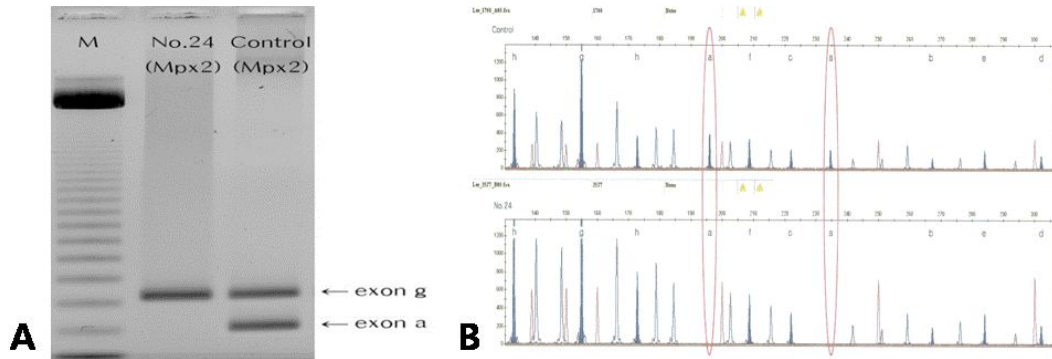


Fig. 2. Deletion of exon a of the *F9* gene in patient No. 24. (A) M, 123 DNA ladder marker, and multiplex PCR group 2 of normal control male and patient No. 24. In the normal control male, exon a (expected amplicon size, 256 bp) and exon g (expected amplicon size, 393 bp) were identified. However, in patient No. 24, the band of exon a was not seen. (B) Results from MLPA P207 kit in the patient (lower) and the normal control male (upper). The patient's exon a (left and right) is deleted (left: *F9* probe 6788–L6380, right: *F9* probe 6789–L6381 for exon a).

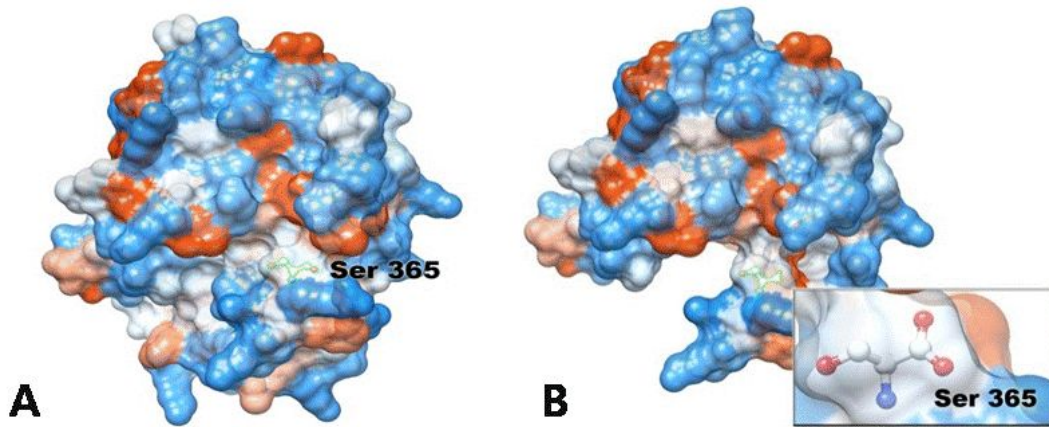


Fig. 3. Homology model of wild type and nonsense mutation (No. 8 patient) of factor IX. Template is 1rfnA, with a residue range of 227 to 416, identity of 100%, and RMSD of 2.80Å. (A) A 3D structure of wild type sequence (amino acids 227 to 416). (B) Conformational change took place because of a nonsense mutation at residue 367 in the patient. Hydrophilic domain is shown in blue and hydrophobic in red.

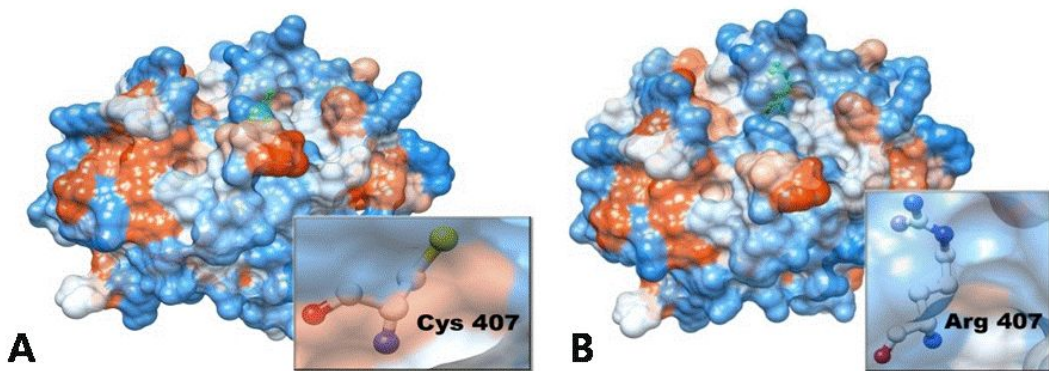


Fig. 4. Homology model of wild type and missense mutation (patient No. 15) of factor IX. Template is 1rfnA, with a residue range of 227 to 416, identity of 100%, and RMSD of 2.80Å. (A) A 3D structure of wild type sequence (amino acids 227 to 416). (B) Conformational change took place because of a missense mutation (Cys407Arg) at residue 407 in the patient. Hydrophilic domain is shown in blue and hydrophobic in red.

Table 5. Comparison of Linkage Analysis, Direct Sequencing, and mPCR-CSGE Screened Sequencing

	Linkage analysis	Direct sequencing	mPCR-CSGE screened sequencing
Detection rate	55.6%* <i>Hha</i> I : 25.5% <i>Mse</i> I : 49.7%	96.3%	88.9%
Cost [†]	23,468 KRW for 1 person [‡]	83,978 KRW	48,462 KRW
Time	5 hrs +o/n PCR-3 hrs incubation-o/n EP-2 hrs	14 hrs PCR-3 hrs EP-1hr purification-1 hr sequencing PCR-3 hrs purification-1 hr sequencing-5 hr	19 hrs+o/n multiplex PCR-3 hrs EP-1 hrs CSGE-8hrs and o/n stain-2 hrs sequencing PCR-3 hrs purification-1 hr sequencing-1 hr

*Informativeness; [†]Labor cost and depreciation expense are excluded; [‡]Total cost comes from multiplying cost by the number of subjected family members.

Abbreviations: KRW, Korean won; EP, eletrophoresis; o/n, overnight; hr, hour

Table 6. Detailed Cost Comparison between Direct Sequencing and mPCR-CSGE Screened Sequencing

mPCR-CSGE screened sequencing			Direct sequencing		
Steps	Repeat or No. of samples	Cost* (KRW)	Steps	Repeat or No. of samples	Cost* (KRW)
DNA extracton	2	15,738	DNA extraction	2	15,738
Multiplex PCR (primer conc. : 10 pmole)	4	13,647	Primer for PCR & sequencing PCR (primer conc. : 50 pmole)	1	7,736
Electrophoresis (1.5% agarose)	1	2,962	PCR excluding primers	7	10,458
Heteroduplexing PCR & CSGE (6 pts+control)	1	8,937	Electrophoresis (1.5% agarose)	1	2,962
PCR purification	1	309	PCR purification	7	2,163
Sequencing PCR	1	1,313	Sequencing PCR	15	3,251
Sequencing purification	2	1,810	Sequencing purification	15	13,575
Sequencing (1:8 dilution)	1 for upstream 1 for downstream	3,746	Sequencing (1:8dilution)	15	28,095
Total cost		48,462	Total cost		83,978

*Labor cost and depreciation expense are excluded
Abbreviations : KRW, Korean won; pts, patients

구축이 필수적이다.

1990년 영국에서 시작된 The Hemophilia B Mutation Database는 다양한 혈우병B 환자들의 돌연변이 정보를 수록하여 병적인 돌연변이 여부를 판별하는데 큰 도움을 주었다⁷⁾. The 12th edition of the hemophilia B mutation database에는 전 세계 혈우병B 환자중 5명 이상에서 동일하게 발견된 돌연변이 hotspot 52개가 보고되어 있다¹¹⁾. *F9* 유전자에서는 Gardiner-Garden & Frommer's Criteria¹²⁾에 따른 CpG island는 없는 것으로 알려져 있으나, 52개의 hot spot중 CpG dinucleotide에서 21개의 돌연변이가 관찰되었다. Mukherjee 등¹³⁾은 2,348명의 혈우병 B 환자의 돌연변이 중에서 CpG dinucleotide에 발생한 돌연변이는 37.7%로 보고하였다. CpG에서 발생한 돌연변이 숫자와 non-CpG에서 10번 이상 발생한 것으로 보고된 돌연변이

이 숫자는 각각 22개와 5개로서 이들은 전체 돌연변이의 42.2%를 차지하였다. Bottema 등¹⁴⁾에 의한 CpG site에서의 전이(tr ansition)는 다른 지역의 그것에 비해 약 24배, 변이(transversion)는 7.7배가 증가되는 것으로 보고하였다.

Hot spot의 또다른 원인으로는 founder effect가 있다. 미국 과 서유럽의 혈우병B 환자에게는 I397→T, G60→S, T296→M 이 흔한데, 이들의 일배체형(haplotype)이 동일한 것으로 밝혀져 이들은 공통된 한 명의 조상으로부터 유래된 환자들임을 알 수 있었다¹⁵⁾. 미국 혈우병B 환자의 약 25%가 이 3개의 돌연변이 중 하나를 가지고 있으며, 특히 경증 혈우병B 환자의 경우에는 2/3에게서 이 3개의 돌연변이 중 하나가 발견되고 있다.

이번 연구에서 관찰된 돌연변이 중에서는 CpG dinucleotide에서 5개(21.8%)가 발견되었으며, 5번 이상 보고된 돌연변이

hotspot에서 발생한 돌연변이는 7개(33.3%)로서 이는 Mukherjee 등¹³⁾의 연구와 차이를 보이고 있었다. 기존의 보고들과 비교하여 hotspot이나 CpG dinucleotide에서 상대적으로 적은 돌연변이가 발생한 점을 볼 때, *F9* 유전자 염기서열분석은 특정한 hotspot을 우선적으로 해야 할 필요성에 의문을 던지게 된다. 하지만 본 연구는 대상 환자 숫자가 27명에 불과하였다. 최근에 완성된 Korean Registry of Hemophilia Mutations (<http://www.kohemgene.org/>)를 통해 좀더 많은 환자들의 염기서열 분석 결과가 알려지게 되면 우리나라 환자의 고유한 hot spot이 있을지 여부가 밝혀지리라 예상된다.

돌연변이를 정확히 진단하기 위해 염기서열 분석법은 매우 추천할 만하다. 임상적으로 질병의 확진, 산전 진단, 보인자 진단, 유전자형-표현형의 관계 분석 뿐만 아니라 질병의 병인, 유전자 재조합 응고인자제제의 제조, 향후 유전자 치료를 위한 기초자료로서 염기서열의 분석이 필수적이라고 할 수 있다. 환자의 돌연변이 유형을 알 수 있게 되면 항체 발생 위험성을 예측할 수 있으며, 이에 따라 1세 이전의 응고인자제제에 대한 조기 노출을 회피하고, 1세 이후 주기적 보충요법을 앞당기는 등의 항체 회피 노력을 할 수 있으며, 또한 환자에게 가장 최적화된 면역관용요법을 시행하여 항체를 영구적으로 없앨 수 있게 될 것이다.

그러나 이러한 장점에도 불구하고 직접 염기서열 분석법은 많은 비용과 시간이 들고, 노동집약적이어서 여러 연구자들이 돌연변이가 있을만한 특정 유전자 부위를 먼저 선별해 내고, 그 부위에 대해서만 염기서열 분석법을 시행하는 전략을 채택하고 있다. 그 가운데 CSGE는 Ganguly 등¹⁶⁾이 처음으로 고안한 방안으로 heteroduplex 형성에 기초한 돌연변이 선별법이다. Heteroduplex는 Nagamine 등¹⁷⁾이 mouse testis-determining Y gene에 대한 PCR 실험 도중 발견한 PCR artifact로서 보고되었다. 그 원리는 wild type 가닥과 mutant type 가닥이 섞이게 되어 형성된 heteroduplex 안의 mismatched 된 염기쌍 사이에 기포나 팽출이 생기게 되고, 이것들의 물리적 성질에 의해 선별이 가능해지는 것이다. Ganguly 등¹⁶⁾은 heteroduplex의 돌연변이 선별율을 높이기 위해 10% ethylene glycol과 15% formamide를 포함한 tris/taurine buffer를 이용하여 변성 조건을 약하게 하였다. 즉 CSGE는 약한 변성 조건 하에서 homoduplexed DNA와 heteroduplexed DNA가 polyacrylamide gel 전기영동 하에서 차별적 이동을 하는 성질을 이용하는 것이다. Heteroduplex는 ethidium bromide 염색 후 자외선에서 볼 때 비정상적인 band를 보인다. 연구자들은 비정상적 band를 보이는 DNA 부분만을 염기서열 분석 할 수 있게 되어 염기서열 분석의 경제성, 신속성을 높일 수 있게 된다. Ganguly 등¹⁶⁾은 CSGE를 이용하여 M13 Phage DNA 안의 58개의 돌연변이중 86%를 선별해 낼 수 있었다. 하지만 PCR 산물의 마지막 50 bp 이내 혹은 독립된 high-melting-temperature domain에서는 돌연변이를 잘 선별해 낼 수 없었다. CSGE는 200-800 bp의 PCR 산물에 대해 효과적인 것으로 알려져 있다. Williams 등¹⁸⁾은 7명의 역위가 없는 중증

혈우병A 환자와 38명의 가족들에게 CSGE를 이용하여 돌연변이를 100% 선별할 수 있었다. Hill 등¹⁹⁾도 역위 돌연변이가 없는 31명의 혈우병A 환자에게 CSGE를 적용하여 돌연변이를 100% 선별할 수 있었다. 혈우병B에 대해 CSGE를 처음으로 적용한 사람은 Hinks 등²⁰⁾이었는데, 21명의 혈우병B 환자에서 돌연변이를 100% 선별하였다. Belvini 등²¹⁾은 혈우병B 201명에 대해 CSGE를 시행하여 89%의 돌연변이를 선별하였다. Habart 등²²⁾은 돌연변이 선별력의 저하 없이 완료량(throughput)를 높이기 위해 CSGE를 변형시켜 multiplex conformation sensitive gel electrophoresis를 고안하였다. 그들은 24개의 PCR 그룹을 이용한 multiplex conformation sensitive gel electrophoresis를 통해 역위가 없는 81명의 혈우병A 환자에게 94%의 돌연변이를 선별하였다. Jayandharan 등²³⁾은 이를 더욱 단순화 시켜 13개의 multiplex PCR 그룹으로 CSGE를 시행하였는데, 역위가 없는 56명의 혈우병A 환자에서 85.7%의 선별도를 보고하였다. 그들은 또한 5개의 multiplex PCR 그룹을 이용한 CSGE를 고안하여 10명의 혈우병B 환자에서 그 선별도를 90%로 보고하였다⁹⁾.

혈우병B 환자 27명을 대상으로 한 본 연구에서는 돌연변이 선별력이 85.2%로 나왔는데, 이는 Jayandharan 등⁹⁾의 보고(90%)에 비교할 때 낮은 수치였다. 이는 연구자의 숙련도에 관련될 수도 있지만 본 연구의 대상 환자수가 27명으로 Jayandharan 등⁹⁾의 10명보다 많기 때문에 선별력을 단순 비교하기는 어려울 것으로 보인다.

Conservation score는 계통분류학적 다중서열정렬을 통해 0 (unconserved)에서 1 (conserved)까지 점수를 매기게 되며, conserved elements는 적어도 100 bp의 간격으로 70% 이상 일치되는 서열을 보이는 구간을 의미한다. Conservation score가 높은 염기서열일수록 중요한 역할을 수행하는 아미노산을 생성하는 것으로 여겨지기 때문에 highly conserved sequence에 생긴 돌연변이는 단백질 기능에 중요한 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다²⁴⁾. 본 연구에서 돌연변이는 평균 0.72점의 conservation score를 가진 염기서열에서 발생하였으나, 연구대상 환자의 중증도가 중등증 환자 1명을 제외하고 모두 중증 환자여서 conservation score와 중증도 사이의 통계학적 분석이 어려웠다. 향후 중등증 및 경증 환자의 염기서열 분석이 가능한 경우 conservation score를 이용하여 환자의 중증도 및 나아가 환자의 임상양상을 예측하는데 도움이 될 수 있을지 추가적인 연구가 필요하다.

Swiss-model은 단백질 3-D 구조 예측에 쓰이는 프로그램으로 아미노산 변화가 단백질 구조 및 기능에 미치는 영향을 예측할 수 있다. UCSF Chimera를 이용하면 각각의 돌연변이가 국지적으로 일으킨 구조의 변화를 형상화 할 수 있기 때문에 분자 구조에서의 아미노산 변화의 정확한 유형과 위치를 알 수 있다. 단백질 구조 예측에는 상동성 모델(homology modeling), 접힘 구조 인식(fold recognition), 순이론적 방법(*ab initio*)이 있는데²⁵⁾, 본 연구에서는 상동성 모델을 이용하였다. 돌연변이로 인

해 변형될 수 있는 환자들의 IX인자 단백질의 3-D 모형을 알려진 단백질 구조를 주형으로 하여 예측해 볼 수 있다. 목표 단백질과 주형 구조 사이의 서열 일치도가 80%를 넘으면 신약 개발에 이용할 수 있을 정도로 3-D 모형은 정확한 것으로 알려져 있다²⁹⁾. Root mean square deviation (RMSD)는 같은 단백질 혹은 유사한 단백질이 다른 구조 상태에 있을 때 그 두 구조간의 차이를 정량적으로 나타내는 데 쓰인다. 두 단백질의 구조를 최대한 겹쳐서 배치한 후에 각각 대응되는 원자간의 3차원 거리를 재서 이들의 평균을 내서 수치화 한 것이다^{27, 28)}. 일반적으로 서열 일치도가 70%를 넘을 때 RMSD는 2.5 Å (10^{-9} m) 정도를 유지한다. F9 유전자의 경우 일치도 100%이고, RMSD 2.8 Å인 주형 단백질 구조는 1rfnA와 1 rfnB가 있다. 1rfnA는 461개 아미노산 중 189개(227-416번), 1rfnB는 55개(132-187번)의 아미노산 주형으로써, IX번 응고인자는 52.9%의 아미노산에 대해 단백질 3-D 주형이 밝혀져 있는 셈이다. Fig. 4와 Fig. 5는 각각 No. 8 환자의 무의미 돌연변이와 No.15 환자의 과오 돌연변이가 단백질 3-D 구조에 일으킨 변화를 보여준다. 무의미 돌연변이는 과오 돌연변이에 비해 구조 변화를 크게 일으킴을 알 수 있다.

mPCR-CSGE 선별 후 서열분석법의 장점으로는 직접 염기서열 분석법에 비해 비교적 높은 선별력을 보이면서도 경제적이라는 것이다. 본 연구에서 mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법의 비용은 직접 염기서열분석법의 57.7%에 불과하였다. 한편 실험의 편이성 측면에서 multiplex PCR 단계, heteroduplexing PCR단계, CSGE 단계가 추가로 요구되어 노동집약적이었다. 또한 CSGE gel 제작 중에 기포의 형성, 얇고 큰 gel 판을 처리하는 과정에서 gel의 찢어짐, 여과지에 충분히 band가 흡착되지 않아 heteroduplex 형성 여부를 판독하기 어려운 점 등이 발생하였다. 시간적으로도 직접 염기서열 분석법에 비해 약 1일이 더 소요되는 단점이 있었다.

결론적으로 mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법은 85.2%의 돌연변이 선별력을 보이고, 직접 염기서열 분석법의 57.7%의 비용만 소모하였으나, 실험 과정에 세심한 주의가 필요하였고, 노동집약적이었으며, 실험기간도 1일이 더 걸렸다.

요 약

목적: F9 유전자는 혈우병B의 병인 유전자이다. 기존의 RFLP를 이용한 연관분석은 정보제공율이 55.6%에 불과하였다. 직접 염기서열 분석법은 98%의 돌연변이를 진단할 수 있지만, 고가의 비용이 든다. 본 연구는 F9 유전자를 대상으로 돌연변이의 선별 검사로써 mPCR-CSGE를 사용하고, 이후 특정 유전자 부위만을 염기서열 분석하여 mPCR-CSGE의 유용성을 확인하기 위해 고안되었다.

방법: 연구대상은 비혈연 관계인 27명의 혈우병B 환자였다. 직접염기서열 분석법은 독립된 다른 기관에서 시행하였고, mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법은 본 연구자의 기관에서

시행되었다. 직접 염기서열 분석법의 결과가 참고치가 되어 mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법을 정확성, 경제성, 신속성, 편이성 측면에서 비교하였다. 두가지 방법으로 진단이 되지 않는 환자에게는 MLPA를 이용하여 돌연변이를 발견하였다.

결과: 직접 염기서열 분석법으로 26명(96.3%)의 환자에서 돌연변이를 확인할 수 있었다. mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법으로는 23명(85.2%)의 환자에서 돌연변이를 찾아낼 수 있었다. 1명의 환자는 MLPA로써 돌연변이를 확인할 수 있었다. 27명의 환자에게 21개의 독립적인 돌연변이가 있었다. mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법은 직접 염기서열 분석법에 비해 비용은 55.7%로 줄일 수 있었으나, 실험 단계는 더욱 복잡하였고, 시간도 하루가 더 걸렸으며, 세심한 실험상의 주의가 필요하였다.

결론: mPCR-CSGE 선별 후 염기서열 분석법은 85.2%의 높은 돌연변이 선별력을 보이고, 직접 염기서열 분석법의 57.7%의 비용만 소모하였으나, 실험과정에 세심한 주의가 요구되었으며, 노동집약적이고, 실험 시간도 하루가 더 소요되었다.

References

- 1) Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K. Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (anti-hemophilic factor B). *Biochemistry* 1985;24:3736-50.
- 2) Roberts HR. Molecular biology of hemophilia B. *Thromb Haemost* 1993;70:1-9.
- 3) Goodeve AC, Peake IR. Diagnosis of hemophilia A and B carriers and prenatal diagnosis. In: Forbes CD, Aledort L, Madhok R, editors. *Hemophilia*. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1997:63-74.
- 4) Lee JH, Choi YM, Choe J, Hwang DY, Lee JY. Usefulness of HhaI and MseI DNA polymorphism of factor IX gene in the molecular genetic diagnosis of hemophilia B in Korean population. *Korean J Obstet Gynecol* 1999;42:2761-7.
- 5) Choi YM, Kim EJ, Lee MR, Son YS, Choe J, Hwang DY, et al. Factor VIII gene mutations in Korean patients with hemophilia A. *Korean J Obstet Gynecol* 2004;47:1975-81.
- 6) Yoon HS, Song KS, Kwon OH, Cho CH. Detection of factor IX gene mutation and carriers in Korean hemophilia B patients by DNA sequencing. *Korean J Clin Pathol* 1993;13:363-71.
- 7) Haemophilia B Mutation Database (version 13, 2004). Available from URL: <http://www.kcl.ac.uk/ip/petergreen/haemoBdatabase.html>.
- 8) Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006;22:195-201.
- 9) Jayandharan G, Shaji RV, Chandy M, Srivastava A. Identification of factor IX gene defects using a multiplex PCR and CSGE strategy—a first report. *J Thromb Haemost* 2003;1:2051-4.
- 10) Sommer SS, Bowie EJ, Ketterling RP, Bottema CD. Missense mutations and the magnitude of functional deficit: the example of factor IX. *Hum Genet* 1992;89:295-7.

- 11) Green PM. Hemophilia B—molecular basis. In: Lee CA, Berntorp E, Hoots WK, editors. Textbook of hemophilia. ** the ed, Massachusetts: Blackwell Publishing, 2005: 91–6.
- 12) Gardiner–Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987;196:261–82.
- 13) Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Chaudhuri K, Ray K. Analysis of haemophilia B database and strategies for identification of common point mutations in the factor IX gene. *Haemophilia* 2003;9:187–92.
- 14) Bottema CD, Bottema MJ, Ketterling RP, Yoon HS, Janco RL, Phillips JA, et al. Why does the human factor IX gene have a G+C content of 40%? *Am J Hum Genet* 1991;49:839–50.
- 15) Ketterling RP, Bottema CD, Phillips JA, Sommer SS. Evidence that descendants of three founders constitute about 25% of hemophilia B in the united states. *Genomics* 1991;10:1093–6.
- 16) Ganguly A, Rock MJ, Prockop DJ. Conformation–sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single–base differences in double–stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent–induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10325–9.
- 17) Nagamine CM, Chan K, Lau YFC. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet* 1989;45:337–9.
- 18) Williams IJ, Abuzenadah A, Winship PR, Preston FE, Dolan G, Wright J, et al. Precise carrier diagnosis in families with hemophilia A: use of conformation sensitive gel electrophoresis for mutation screening and polymorphism analysis. *Thromb Haemost* 1998;79:723–6.
- 19) Hill M, Deam S, Gordon B, Dolan G. Mutation analysis in 51 patients with haemophilia A: report of 10 novel mutations and correlations between genotype and clinical phenotype. *Haemophilia* 2005;11:133–41.
- 20) Hinks JL, Winship PR, Makris M, Preston FE, Peake IR, Goodeve AC. A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis. *Br J Haematol* 1999;104:915–8.
- 21) Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, et al. Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica* 2005;90:635–42.
- 22) Habart D, Kalabova D, Novotny M, Vorlova Z. Thirty–four novel mutations detected in factor VIII gene by multiplex CSGE: modeling of 13 novel amino acid substitutions. *J Thromb Haemost* 2002;1:773–81.
- 23) Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A. Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modeling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia* 2005;11:481–91.
- 24) Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome research* 2005;15:1034–50.
- 25) Ahn SA, Ahn IS, Lee SJ, Son HS. Progress in protein structure prediction: CASP and CAFASP experiments. *Korean J Public Health* 2005;42:73–84.
- 26) Kopp J, Schwede T. Automated protein structure homology modeling: a progress report. *Pharmacogenomics* 2004;5:405–16.
- 27) Maiorov VN, Crippen GM. Significance of root–mean–square deviation in comparing three–dimensional structures of globular proteins. *J Mol Biol* 1994;14:625–34.
- 28) Kim WC, Park SH, Won JI. Protein structure alignment based on maximum of residue pair distance and similarity graph. *Journal of KIISE:Database* 2007;34:396–408.