

Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer를 이용한 HLA-DRB1 유전자의 DNA 다형성

진주보건대학 임상병리과

장 순 모

Genotyping of HLA-DRB1 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 is derived from sequence differences predominantly localized to discrete hypervariable regions of the amino-terminal domain of the molecule. In this study, the HLA-DRB1 genotypes were determined in twenty students using the PCR-SSP (polymerase chain reaction-sequence specific primer) technique. Two specific primer pairs in assigning the DRB1 gene were used. The results of PCR-SSP, the HLA-DRB1*0101 primer detected nine and HLA-DRB1*1501 primer detected three people. This study shows that the PCR-SSP technique is relatively simple, fast and a practical tool for the determination of the HLA-DRB1 genotypes. Moreover, these genotype frequency results of the HLA DRB1 gene could be useful for database study before being applied to individual identification and transplantation immunity.

Key Words : HLA, HLA-DRB1, PCR-SSP

I. 서 론

HLA Class II 유전자(DR, DP, DQ)들의 다형성은 세포 외막 말단 부위에만 존재하며, 각각의 유전자들의 exon 2 에 의해 이 유전자들의 단백질이 암호화 되어 있다(Falk 등, 1991; Gustincich 등, 1991). 이러한 고도의 HLA 분자들의 다형성은 외부물질이나 자가 항원성 펩티드에 결합하며, 특히 항원성 T 세포를 감작시켜 면역 반응을 조절

하는 것으로 잘 알려져 있다(Fernandez 등, 1992; Bunce 등, 1995). HLA Class II의 다형성을 알아보는 방법으로 이전에는 혈청학적 혹은 cellular typing에 의한 방법을 이용하였으나, 점점 PCR을 이용한 genotyping으로 대체 되어 왔다(Lee 등, 1995; Lee 등, 1996). HLA 다형성의 정확한 genotyping은 HLA 유전자들의 기능을 이해하는데 가장 필수적인 것이지만, HLA Class II 유전자들 사이의 아주 작은 유전적 다형성은 정확한 HLA genotyping을 어렵게 만든다. 최근 HLA Class II 유전자들의 genotyping을 위한 몇 개의 genotyping 방법이 개발되었는데, PCR-SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism), PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-SSP(Sequence Specific Primers) (Thomsen 등, 1990; Anasetti 등, 1995; Young 등, 1998)

교신저자 : 장순모, (우)660-757 경남 진주시 상봉서동 1142 진주보건대학 임상병리과
Tel : 055-740-1849, 016-9507-1056
E-mail : smchang54@hanmail.net
이 연구는 2005년도 진주보건대학 학술연구조성비에 의하여 이루어진 것임

등이 있다. 본 연구에서는 무작위로 선출된 20명의 학생에게서 얻은 검체로 HLA-DRB1 유전자의 다형성을 PCR-SSP법을 이용하여 조사해 보고, HLA-DRB1 유전자들의 genotyping에 PCR-SSP 방법이 유용한지를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

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

2. 혈액으로부터의 DNA 분리

채혈한 혈액을 각각 200 μ L씩 사용하여, Bioneer사의 Genomic DNA Extraction kit(cat. No. K-3032)를 이용하여 회사에서 지시한(전혈 200 μ L을 1.5 mL 시험관에 주입 \rightarrow proteinase K를 binding buffer에 첨가 후 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation \rightarrow isopropanol 100 μ L 첨가 \rightarrow binding column 시험관에 이동 \rightarrow 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 \rightarrow washing buffer 500 μ L를 첨가 \rightarrow 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 \rightarrow elution buffer 첨가 \rightarrow DNA 추출)대로 전혈로부터 지놈 DNA를 분리하였다.

3. Sequence Specific Primer의 합성

이 실험에 사용된 primer들은 Marsh와 Bodmer에 의해 밝혀진 HLA-DRB1 유전자의 exon 2에서 특이적이고 잘 보존된 DNA 염기서열을 이용하여 제작하였다(Table 1).

4. PCR을 이용한 HLA-DRB1 유전자의 증폭

PCR-SSP을 위한 혼합액은 dNTP(2.5 mM) 4 μ L, 10x buffer 2 μ L, HLA-DRB1 primer(100 pmol) 각각 1 μ L 같이 넣었고, genomic DNA(25 μ g) 1 μ L, Taq DNA polymerase(2unit) 1 μ L, 그리고 반응 용액이 20 μ L 되도록 증류수를 넣어서 제조하여 PCR을 시행하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer)에서 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 20초, annealing은 58 $^{\circ}$ C에서 20초, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 20초의 순서로 35회를 시행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 final extension 하였다.

5. 증폭된 DNA의 확인

PCR 증폭산물을 1.5% agarose gel, 0.5x TBE buffer에서 70 volt, 100 mA로 3시간 동안 전기영동을 실시한 다음, gel을 ethidium bromide(0.5 μ g/mL) 수용액에서 20분간 염색하고 증류수에 10분간 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하고, polaroid camera로 사진 촬영하였다.

III. 결과

PCR-SSP 결과, HLA-DRB1*0101는 20명 중 9명(45%)이 검출되었고, HLA-DRB1*1501는 20명 중 3명(15%)이 검출되었다(Fig. 1, Fig. 2). 이 실험군의 결과에서는 HLA-DRB1*0101 유전자의 빈도가 HLA-DRB1*1501 유전자의 빈도보다 3배 정도 더 높게 검출된 것으로 보아 HLA-DRB1*0101의 유전자가 더 일반적인 것을 알 수 있었다. 또한 두 명의 학생에게서 HLA-DRB1*0101과 HLA-DRB1*1501이 검출되었다. 따라서 20명의 학생 중 2명은 HLA-DRB1 유전자의 분포가 상당히 유사할 것이라 생각되어진다.

Table 1. The sequences of DRB1 specific primer pairs and PCR products for HLA-DRB1 typing

Primer	Sequence	PCR-SSP Product
HLA-DRB1*0101	5-GCGGGTGCGGTTGCTGGAA-3 3-TGCACTGTGAAGCTCTCAC-5	219bp
HLA-DRB1*1501	5-TCCTGTGGCAGCCTAAGAGG-3 3-TGCACTGTGAAGCTCTCCA-5	255bp

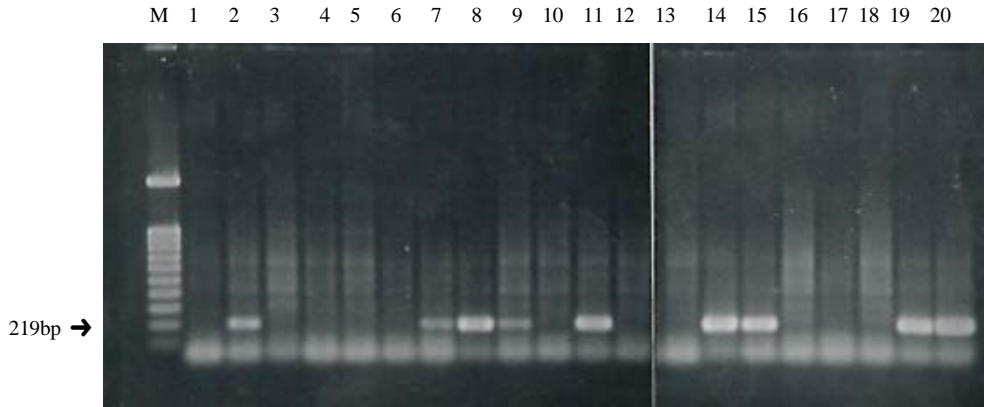


Fig. 1. PCR-SSP patterns of HLA-DRB1 isolates produced by DRB1*0101 primer. Lane M, molecular size marker; lane2, lanes 7 to 9, lane11, lanes 14 to 15, lanes 19 to 20 are HLA-DRB1*0101.

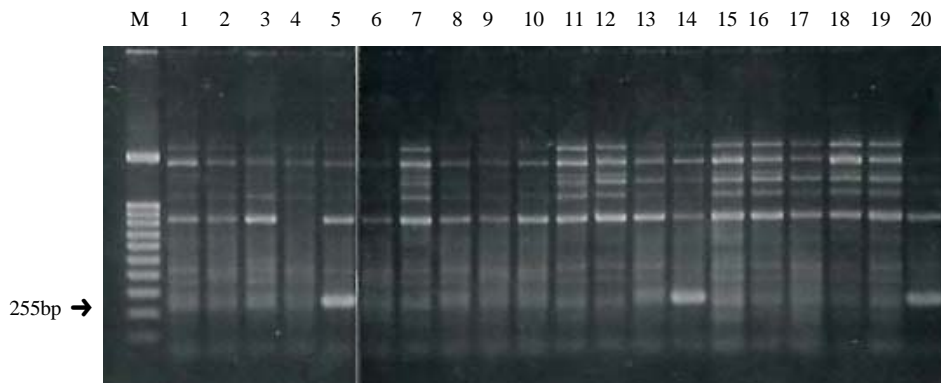


Fig. 2. PCR-SSP patterns of HLA-DRB1 isolates produced by DRB1*1501 primer. Lane M, molecular size marker; lane5, lane14, lane20 are DRB1*1501.

V. 고 찰

최근 몇 년 전까지 HLA Class II 대립유전자의 다형성은 혈청학적 방법이나 세포학적 방법으로 동정을 하였다 (Schwartz 등, 1985). 그러나 DNA typing 방법은 혈청학적 typing의 대체방법으로 점점 더 널리 알려졌다 (Schwartz 등, 1985). HLA-DRB1 유전자의 다형성은, 이러한 유전자(-DQ 그리고 -DP 유전자)들의 exon 2에 의해 세포외막 영역에 제한적으로 발현하게 되는데, 발현된 단백질이 유전자 다형성에 의해 변이가 심하기 때문에 장기 이식 수술에서의 공여자와 수여자 사이에서의 HLA-DRB1 유전자들의 대립유전자의 차이는 가끔 심각한 합병증의 초래를 야기 시키기도 한다. 따라서 HLA-DR 유전자에 간단하면서도 정확한 genotyping이 임상에서 가장 중요한 역할을 한다. DRB1의 exon 2의 염기

서열은 아주 특이적이고 잘 보존되어 있기 때문에 대립 유전자 분석에 이 부위의 primer을 이용하여 PCR-SSP를 많이 이용한다(Bunce 등, 1995).

본 연구에서, HLA-DRB1*0101은 45%로 검출되었고, HLA-DRB1* 1501은 15%로 나타났다. 따라서 HLA-DRB1*0101의 유전자가 더 일반적으로 분포되어 있는 것을 알 수 있었고, 모든 primer에 검출이 된 2명의 학생은 HLA-DRB1 유전자가 상당히 유사할 것이라 생각되어진다. 앞으로 더 많은 실험군을 선택해서 실험을 실시하여, 한국 사람에서의 일반적인 대립유전자의 분포를 더욱 자세히 밝혀려고 한다.

본 연구에서 사용한 PCR-SSP 방법은 HLA-DRB1 DNA typing에 간단하면서도 아주 강력한 방법이라고 생각된다

V. 결 론

HLA 유전자가 만드는 단백질의 말단은 다형성이 상당히 심하다. 이는 이 단백질을 만드는 HLA-DRB1 유전자의 변이가 존재한다는 유전적 다형성을 의미한다. 이런 유전적 다형성을 알아보는 방법으로 PCR-SSP 방법이 유용한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 PCR-SSP을 이용하여 총 20명의 학생에서 HLA-DRB1 유전자의 다형성을 조사하였다. 실험결과 HLA-DRB1*0101 유전형은 9명의 학생이 HLA-DRB1*1501 유전형은 3명의 학생에게서 나타났고 2명의 학생이 두 가지 형을 모두 가진 것으로 나타났다.

본 연구결과 PCR-SSP 방법은 HLA-DRB1 유전형 결정에 비교적 간단하고 빠른 방법으로 생각되어 지며, 더욱이 이 연구결과는 장기이식에 있어서 조직적합여부검사의 기초 자료로 제공이 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Anasetti C, Etzioni R, Petersdorf EW, Martin PJ, Hansen JA. Marrow transplantation from unrelated volunteer donors. *Annu Rev Med* 46:169-179, 1995.
2. Bunce M, Fanning GC, Welsh KI. Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 45:81-90, 1995.
3. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-296, 1991.
4. Fernandez-Vina MA, Falco M, Sun Y, Stastny P. DNA typing for HLA-class I alleles, *Hum Immunol* 33:163-173, 1992.
5. Gustincich S, Manfioletti G, Delsal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high quality genomic DNA extractions from whole human blood. *Biotechniques* 11:298-302, 1991.
6. Lee KO, Park TK. A study on genotyping of HLA-DPB1 gene using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). *Aca J Konkuk Univ* 39:35-40, 1995.
7. Lee KO, Park TK, Park YS, Oh MJ, Kim YJ. DNA polymorphism analysis of HLA-DPB1 gene using PCR-SSP. *J Biochem Mol Biol* 29:45-51, 1996.
8. Schwartz RZ. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann Rev Immunol* 3:237-242, 1985.
9. Thomsen M, Essaket M, Thomsen AC, Robbins FM, Hartzman RJ, Arnaud J, Ohayon A. Analysis of HLA-DP in HLA-DR/GLO recombinant families and in the population of southwestern France. *Tissue Antigens* 36:116-121, 1990.
10. Young JA, Lindsay J, Bodmer JG, Trowsdale J. Epitope recognition by a DP alpha chain specific monoclonal antibody is influenced by the interaction between the DP chain and its polymorphic DP partner. *Hum Immunol* 23:37-42, 1998.