

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

진주보건대학 임상병리과

장 순 모

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

Soon-Mo Jang

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

The human leukocyte antigen (HLA) is the name of the major histocompatibility complex (MCH) in humans. The superlocus contains a large number of genes related to immune system function in humans. This group of genes resides on chromosome 6. and encode cell surface antigen-presenting proteins and many other genes. HLA class I antigen (A, B & C) present peptides from inside the cell. These peptides are produced from digested proteins that are broken down in the lysozymes. Most expressed HLA 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-A 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-A gene were used (A*0201, A*33, A*2401). The results of PCR-SSP, the HLA-A*0201 primer was detected eleven (55%), the HLA-A*33 were detected seven (35%) and the HLA-A*2401 were detected seven (35%). This study shows that the PCR-SSP technique is relatively simple, fast and a practical tool for the determination of the HLA-A genotypes.

Key Words : HLA-A, PCR-SSCP, Genotyping

I. 서 론

HLA-A는 HLA(human leukocyte antigen) Class I 부위에서 가장 polymorphic locus로 존재한다. HLA Class I

polymorphism은 일반적으로 alloantisera나 혹은 단클론 항체를 이용하여 검출해 왔다(Browning 등, 1993). 혈청학적 검사는 HLA Class I의 검출에 간편하면서도 비교적 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 polymorphism의 규명에 많이 이용되고 있다(Town-

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

send와 Bodmer, 1989; Lee 등, 1996). HLA-A를 포함한 HLA Class I의 검출을 위한 DNA typing 방법은 모든 대립유전자들이 다른 대립유전자들과의 염기서열 부위의 공유나, 다른 Class I loci 뿐만 아니라, 같은 유전자들에서의 공유에 의한 복잡한 핵산의 치환에 의해서 상당히 어려웠었다(Schwartz, 1985). 최근 Class I alleles의 typing 방법을 위한 DNA sequence의 발견으로 이런 문제를 해결하였다(Fernandez-Vina 등, 1992; Yoshida 등, 1992).

HLA-A의 molecular typing을 위한 방법으로 PCR-SSOP(Sequence Specific Oligonucleotide Probe)이나, PCR-SSP(Sequence Specific Primer) 등이 자주 사용된다(Gustincich 등, 1991; Dominguez 등, 1992; Zemmour와 Parham, 1992; Krausa 등, 1993).

본 연구는 무작위로 선출된 20 명의 건강인으로부터 HLA-A 유전자의 다형성을 PCR-SSP 법을 이용하여 조사해 보고, HLA-A 유전자 genotyping에 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. 혈액으로 부터의 DNA 분리

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

리하였다.

3. Sequence Specific PCR을 위한 Primer의 합성

이 실험에 사용된 primer들은 Marsh와 Bodmer에 의해 밝혀진 HLA-A 유전자에서 특이적으로 잘 보존된 DNA 염기서열을 이용하여 제작하였다(Table 1).

4. PCR을 이용한 HLA-A 유전자의 증폭

PCR-SSP을 위한 PCR 혼합액 dNTP(각기 2.5 mM), 10 \times PCR buffer 2 μ L, primer(10 pmol) 각기 1 μ L씩 넣었고, genomic DNA(25 μ g) 1 μ L, Taq DNA polymerase (2unit) 1 μ L, 최종 반응액은 증류수로 20 μ L 되게 실시하였다. DNA thermal cycler(Perkin Elmer)에서 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 1 분, annealing은 59 $^{\circ}$ C에서 1 분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1 분의 순서로 35 회를 시행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 final extension 하였다.

5. PCR 산물의 확인

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

III. 결 과

PCR-SSP 결과 HLA-A*0201은 20 명 중 11 명(55%)이 검출이 되었고, HLA-A*33에서는 20 명 중 7 명(35%),

Table 1. The sequence of HLA-A specific primer typing

Primer	Primer sequence	PCR product (bp)
HLA-A*0201	5' -TCCTCGTCCCCAGGCTCT-3'	813
	3' -GTGGCCCCCTGGTACCCGT-5'	
HLA-A*33	5' -GGAGTATTGGGACCGGAAC-3'	461
	3' -AGCGCAGGTCTCGTTCAA-5'	
HLA-A*2401	5' -GGCCGGAGTATTGGGACGA-3'	555
	3' -CCTCCAGGTAGGCTCTCTG-5'	

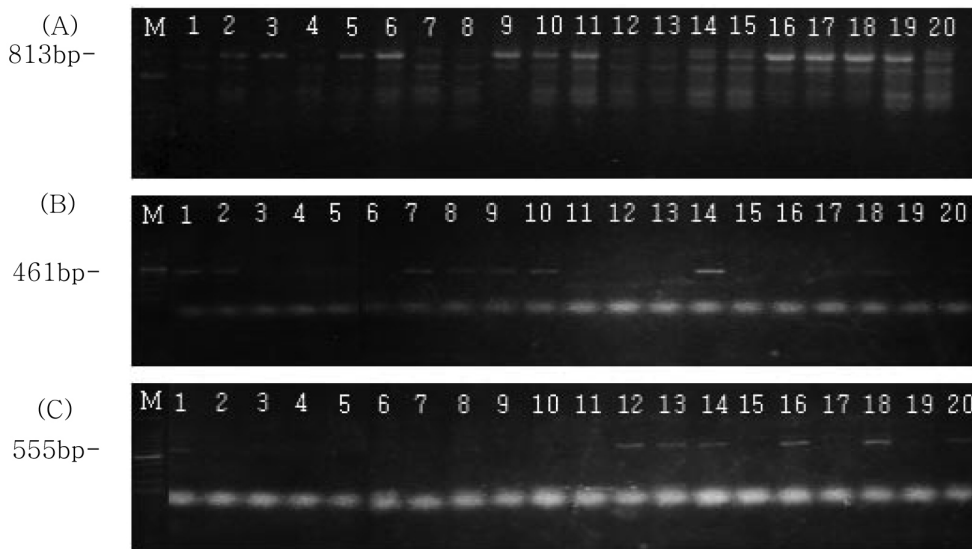


Fig. 1. PCR-SSP patterns of HLA-A.
 A : HLA-A*0201 primer, lane 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 16, 17, 18 and 19 was detected.
 B : HLA-A*33 primer, lane 1, 2, 7, 8, 9, 10 and 14 was detected.
 C : HLA-A*2401 primer, 1, 12, 13, 14, 16, 18 and 20 was detected.
 Lane M, 100-bp molecular size marker

HLA-A*2401에서는 7 명(35%)이 검출되었다. 이 실험군의 결과에서는 HLA-A*0201이 HLA-A*33, HLA-A*2401 군보다 높게 검출되었고, HLA-A*0201이 55%의 실험군에서 검출되는 것으로 보아 이 유전자가 가장 많이 존재하는 유전자임을 알 수 있었다(Fig.1).

IV. 고 찰

과거에는 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 사이에서의 HLA Class I 유전자들의 대립유전자의 차이는 가끔 심각한 합병증의 초래를 야기 시키기도 한다. 따라서 HLA Class I 유전자에 간단하면서도 정확한 genotyping이 임상에서 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 PCR-SSP의 방법으로 HLA-A*0201은 20 명 중 11 명 (55%)이 검출이 되었고, HLA-A*33에

서는 20 명 중 7 명(35%), HLA-A*2401에서는 7 명(35%)이 검출되었다. 이 실험군의 결과에서는 HLA-A*0201이 HLA-A*33, HLA-A*2401 군보다 높게 검출되었고, HLA-A*0201이 55%의 실험군에서 검출되는 것으로 보아 이 유전자가 가장 많이 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 생각된다.

감사의글

본 연구는 2008년도 진주보건대학 학술연구 조성비에 의하여 이루어진 것임

참 고 문 헌

1. Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DD,

- Bodmer JG, Bodmer WF. Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence specific PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2842-2845, 1993.
- Dominguez O, Coto E, Martinez NE, Choo WY, Larrea C. Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics* 36:277-282, 1992.
 - Fernandez-Vina MA, Falco M, Sun Y, Stastny P. DNA typing for HLA Class I alleles. *Hum Immunol* 33:163-173, 1992.
 - Gustincich S, Manfiolett G, Del SG, Schneider C and Carninci P. A fast Method for high quality genomic DNA extractions from whole human blood. *Biotechniques* 11:298-302, 1991.
 - Krausa P, Moses J, Bodmer WF, Bodmer JG, Browning MJ. HLA-A locus alleles identified by sequence specific PCR. *Lancet* 341:121-122, 1993.
 - Lee KO, Park TK, Park YS, Oh MJ, Kim YJ. DNA polymorphism analysis of HLA-DRB1 gene using PCR-SSP. *J Biochem Mol Biol* 29:45-51, 1996.
 - Schwartz RZ. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann Rev Immunol* 3:237-250, 1985.
 - Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by T Lymphocytes. *Annu Rev Immuno* 7:601-624, 1989.
 - Yoshida M, Kimura A, Numano F, Sazazuki T. Polymerase chain reaction based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Hum Immunol* 34: 257-266, 1992.
 - Zemmour J, Parham P. HLA class I nucleotide sequences. *Hum Immunol* 34:225-241, 1992.