

유전자진단에 있어서 Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA)의 이론과 실제

¹서울아산병원 의학유전학클리닉, ²울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아청소년과

김구환¹ · 이범희^{1, 2} · 유한욱^{1, 2}

MLPA Applications in Genetic Testing

Gu-Hwan Kim¹, Beom Hee Lee^{1, 2} and Han-Wook Yoo^{1, 2}

¹Medical Genetics Clinic and Laboratory, Asan Medical Center,

²Department of Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) is a PCR-based method to detect gene dosage. Since its introduction, MLPA has been used to test a large number of genes for major deletions or duplications. Genetic testing, as a diagnostic tool for genetic disease, has been used primarily to identify point mutations, including base substitutions and small insertions/deletions, using PCR and sequence analysis. However, it is difficult to identify large deletions or duplications using routine PCR-gel based assays, especially in heterozygotes. The MLPA is a more feasible method for identification of gene dosage than another routine PCR-based methods, and better able to detect deleterious deletions or duplications. In addition to detection of gene dosage, MLPA can be applied to identify methylation patterns of target genes, aneuploidy during prenatal diagnoses, and large deletions or duplications that may be associated with various cancers. The MLPA method offers numerous advantages, as it requires only a small amount of template DNA, is applicable to a wide variety of applications, and is high-throughput. On the other hand, this method suffers from disadvantages including the possibility of false positive results affected by template DNA quality, difficulties identifying SNPs located in probe sequences, and analytical complications in quantitative aspects.

Key Words: MLPA, MS-MLPA, Gene dosage, Genetic test

서론

단일유전자 질환에 대한 유전자의 돌연변이 종류는 점돌연변이와 함께 결실, 삽입 및 중복돌연변이 등이 있다. 이러한 돌

연변이의 규명을 위하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP), artificial refractory mismatch systems (ARMS), allele specific oligonucleotide (ASO), olig-ligase assay (OLA), single base primer extension reaction (SNapShot) 등의 선별방법(screening)과 single strand conformation polymorphism (SSCP), denaturation/temperature gradient gel electrophoresis (DGGE/TGGE), denaturation high pressure liquid chromatography (dHPLC) 등의 scanning 방법들이 사용되어 왔다. 이들 방법은 대부분 약 100-500 bp 정도의 짧은 크기의 중합

접 수: 2009년 12월 8일

수정본접수: 2009년 12월 22일

게재승인일: 2009년 12월 27일

게재일: 2009년 12월 31일

책임저자: 김구환

우-138-736, 서울시 송파구 풍납동 388-1

서울아산병원 신관 B1층 의학유전학클리닉

Tel : 02)3010-4704, Fax : 02)3010-4702

E-mail : Kgh982@amc.seoul.kr

효소 연쇄반응에 기초하여, 하나 또는 두세 개 염기의 변이를 탐색하는데 초점이 맞춰져 있다. 대부분의 검사실에서 시행하는 유전자에 대한 검사방법도 이러한 점돌연변이의 탐색에 집중되어있다¹⁾. 중합효소 연쇄반응으로 적절하게 증폭할 수 있는 인간 게놈의 크기는 약 23 kb로 이 보다 큰 경우는 중합효소 연쇄반응으로는 탐색이 어려운 점이 있다²⁾. 단일 유전자 질환들 중 다수가 점돌연변이 외의 전체 유전자 혹은 여러 개의 엑손에 걸쳐서 일어나는 거대 결실/중복돌연변이를 포함하고 있어, 중합효소연쇄반응에 기초한 방법으로는 이와 같은 돌연변이의 탐색이 어렵다. 거대 결실/중복돌연변이의 탐색을 위해서는 Fluorescence in situ hybridization (FISH)을 통해 염색체상에서의 결실 여부를 확인하거나(예: *PMP22*³⁾, *SNRPN*⁴⁾ 등), 또는 게놈 서던을 통하여 게놈내의 제한효소부위의 차이에 의한 결실 여부를 확인하는 방법을 이용하거나⁵⁾, 거대결실 또는 중복돌연변이에 의해 생겨나는 유전자의 농도 차이를 확인하기 위한 실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 통한 정량방법⁶⁾ 등을 사용할 수 있다. 예를 들면 RETT syndrome의 원인유전자인 *MECP2*의 경우, *MECP2* 유전자의 염기서열 분석을 통하여 70-80%의 돌연변이만의 점돌연변이 등을 규명할 수 있으며, 20-30%의 돌연변이는 거대결실돌연변이가 차지하고 있다⁷⁾. X-연관우성유전인 RETT syndrome은 거의 대부분 여성에게서 나타나며, 반드시 이형접합자의 돌연변이를 보이므로, 거대결실돌연변이의 경우 중합효소연쇄반응에 기초한 염기서열 분석 방법을 통하여 결실되지 않은 정상 allele이 정상 동형접합자의 양상으로 잘못 보이게 되어, 거대결실돌연변이의 규명이 어려웠다. 많은 수의 염기를 포함하는 거대결실돌연변이는 DNA의 양적 차이를 나타내게 되므로, 양적인 차이를 확인할 수 있는 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR) 방법이나, 제한효소의 절단부위 차이를 이용한 게놈 서던교잡법을 이용하여 돌연변이를 확인하였으나, 실시간 중합효소 방법은 수 차례에 걸친 실험자료를 토대로 양적인 차이를 계산하여야 하며, 서던교잡법은 많은 양의 DNA를 필요로 하며, 시간과 노력이 많이 소요되는 작업을 요한다^{8, 9)}.

DNA의 양적 차이를 확인할 수 있는 방법으로 2000년도에 multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH) 방법이 소개되었는데, 이 방법은 준비된 탐침자(probe)를 membrane에 고정된 표적 DNA에 교잡시킨 후, 교잡되지 않은 탐침자를 세척한 후, 교잡된 탐침자만을 수집하여 수집된 탐침자를 증폭시켜 표적DNA의 존재여부를 확인하는 방법으로 DMD의 결실돌연변이 여부를 효율적으로 확인하였다. MAPH는 표적

DNA를 membrane에 흡착시키는 과정을 요하고, 세척과정에서 교잡된 탐침자가 함께 소실되는 등의 문제점으로 인해 민감도와 특이도가 좋지 않은 방법이었다¹⁰⁾.

두 개의 탐침자를 나란히 표적 DNA에 교잡시킨 후 ligation을 통하여 표적 DNA의 존재여부를 확인하는 방법은 MAPH의 membrane의 흡착과정과 세척과정에서 보였던 문제점을 해결할 수 있는 좋은 방법이었다¹⁰⁾.

한번에 여러 ligation산물을 확인하기 위하여 각각의 탐침자의 길이를 서로 다르게 제작하였는데, 이때 M13 박테리오파아지에서 유래된 SALSA 벡터를 이용하여 길이가 130-480 bp에 이르는 삽입자(stuffer)를 포함하는 서로 다른 탐침자를 제작하였다. SALSA 벡터에서 유래한 stuffer로 인해, 20-40개에 이르는 탐침자를 한 개의 실험군으로 만들 수 있게 되었고, 유전자가 평균 8-10개의 엑손¹¹⁾을 가지고 있어, 대부분의 유전자에 대해 모든 엑손의 유전자농도(dosage)를 확인할 수 있는 실험군의 제작이 가능해졌다.

MLPA 방법은, 파킨슨병 관련유전자인 *SCNA*의 A30P, *LRRK2*의 G2019S 변이에 대한 탐침자, 월슨병 관련유전자인 *ATP7B*의 R778L, A874V, N1270S 변이 등^{12, 13)}과 같이, 유전자의 농도뿐 아니라 돌연변이에 의해 교잡 또는 ligation이 저해되는 현상을 이용하여 single nucleotide polymorphism (SNP)의 확인도 가능하여, 유전자진단에 다양하게 응용된다.

본 론

1. MLPA의 원리

MLPA는 ligation을 이용하여 탐침자를 증폭시키는 과정을 말한다. Multiplex 과정을 위하여 M13 박테리오파아지 기원의 SALSA 벡터를 이용하여 길이가 130-480 bp 범위의 stuffer를 탐침자내에 끼워 넣어주게 된다. 탐침자는 길이를 달리하게 하는 stuffer와 표적 DNA와 교잡할 수 있는 표적염기서열 부분, 그리고 ligation 산물을 한번에 증폭시킬 수 있는 중합효소 연쇄반응 시발체 염기서열 부분으로 구성되어 있다 (Fig. 1A). 다른 한쪽의 탐침자는 하나의 염기차이를 둔 표적염기서열 부분과 함께 시발체 염기서열 부분으로 구성되어 있어, 두개의 탐침자가 표적 DNA에 성공적으로 교잡되면 ligation을 위한 3'말단과 5'말단이 마주보게 된다. Ligation 후 탐침자 각각의 말단에 위치하고 있는 시발체 염기서열부분을 이용하여 형광물질을 붙힌 시발체로 중합효소 연쇄반응을 하

면 성공적으로 교잡된 ligation 산물만이 증폭되게 된다. 각각의 표적염기서열에 해당하는 ligation 산물은 형광물질이 붙은 서로 다른 크기의 절편을 형성하게 된다. 형성된 각각의 절편들은 Genetic analyzer (ABI-Prism of Appliedbiosystems; CEQ of Beckmann; Megabase of Amersham 등)를 통하여 크기 별로 분리하고, 크기 별 산물의 형광도로 유전자의 농도를 확인한다^{14, 15)} (Fig. 1B).

MLPA 분석의 과정은 표적 DNA의 단일가닥 열성분리, 탐침자와 교잡반응, ligation, 그리고 ligation 산물의 중합효소연쇄반응을 통한 증폭, 증폭된 산물의 분리 및 분석의 단계로 나눌 수 있다. 열성분리 후 교잡과정에서 정확한 교잡을 유도하기 위하여 주형 DNA의 순도가 중요한 요인이 되며, Genetic analyzer를 거쳐 분리된 ligation 산물의 분석 또한 MLPA의 가장 중요한 부분이라 할 수 있다. Genetic analyzer를 거쳐 분리된 중합효소연쇄반응 산물의 분석은 두가지 단계를 거친다. 우선 가로축(중합효소연쇄반응 산물의 크기별)의 표식화로, 디자인된 유전자내의 표적부위를 산물의 크기별로 표식화하는

작업이 선행된다. 이 작업을 통하여 각각의 ligation 산물들이 유전자내의 어느 부위에 해당하는 지를 확인한다. 크기별로 확인된 산물들은 두번째로 세로축(중합효소연쇄반응 산물의 농도)의 비교로 유전자내에 위치한 표지들의 존재여부 또는 농도를 측정할 수 있게 된다(Fig. 1B, C). MLPA를 위한 한 개의 실험군에는 표적유전자에 대한 탐침자와 함께 내부대조군으로 표적유전자와 다른 유전자좌에 위치한 정상유전자들에 대한 탐침자와 함께 ligation의 여부와 교잡여부 등에 대한 정도관리를 위한 탐침자로 ligation에 의존하지 않는 탐침자(DNA-Quality fragment)와 ligation에 의존하는 탐침자(DNA-denaturation)가 함께 포함되어 있다.

표적유전자의 정확한 농도 확인을 위하여 정상대조군의 비교가 필요하며 양적인 측정을 하므로 적어도 3개 이상의 정상대조군을 사용하여야 한다. 실험군내의 내부대조군과 정상인을 대상으로 실험한 정상대조군을 이용하여 표적유전자의 농도를 확인해 주는 프로그램으로는 엑셀프로그램에 기반을 둔 Coffalyser¹⁴⁾와 상용프로그램인 GeneMarker[®] (Soft-

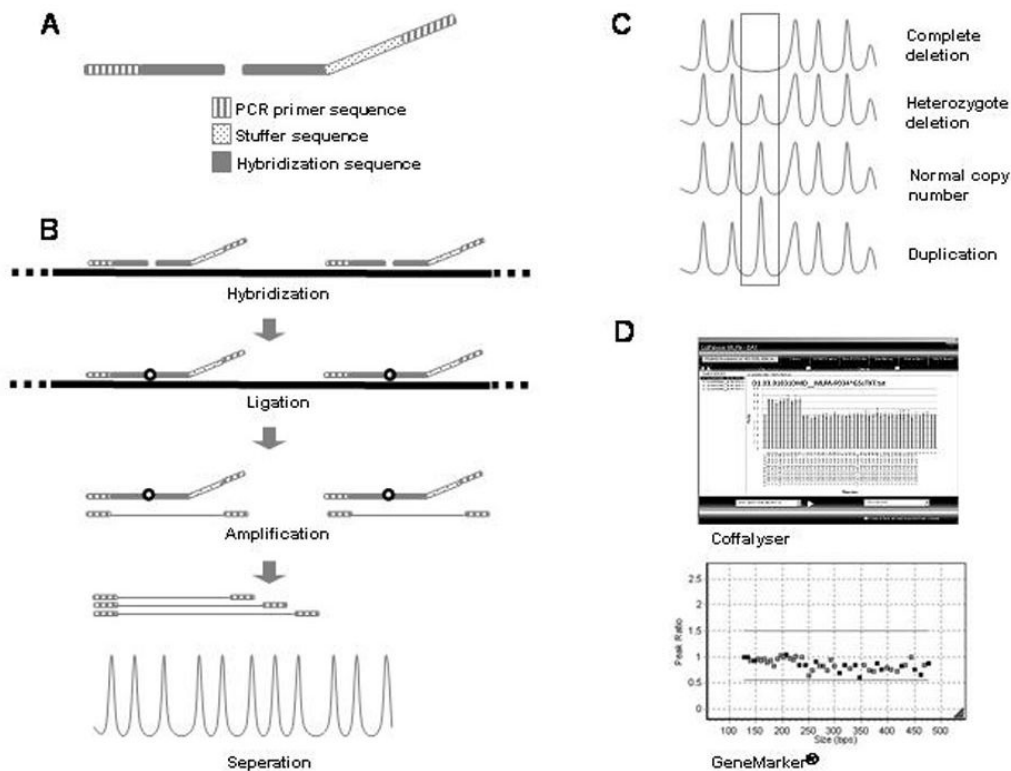


Fig. 1. Principle of MLPA. A) The probe consists of three components, PCR primer is used for amplification of ligated products. Stuffer for size variation of each probe and hybridization for binding site to target DNA sequence. B) Procedures of MLPA. C) Analytical principle of MLPA. The ratio of target peak is determined to compare with control peak and target peak (indicated in the box) height. D) Example report form of softwares. (<http://www.mlpa.com>, GeneMarker[®])

Genetics, PA, USA)가 대표적이다(Fig. 1D). 또한 절편의 분리과정에서 크기가 큰 절편이 작은 절편에 비해 신호(signal)가 약하게 나타나는 신호기울임(signal sloping, 또는 ski-slope effect) 현상이 발생할 수 있다. 이런 경우 각각의 peak는 이웃한 peak를 대조군으로 보정해 주어야 하는데, 위의 프로그램들을 이용하면 손쉽게 보정이 가능하다.

2. 유전자 농도 이상(deletion or duplication mutation) 탐색의 예

1) DMD

거대결실 돌연변이의 비율이 높은 유전자에 해당하는 경우로, Xp21에 위치한 Duchenne/Becker muscular dystrophy 유전자(DMD)는 적어도 79개 이상의 엑손으로 구성된 2.4Mb에 이르는 가장 큰 유전자중의 하나로 진행성 근이영양증의 원인 유전자이다. DMD의 돌연변이는 60%가 거대결실돌연변이, 10-20%가 거대중복돌연변이를 보이며 나머지 20-30%는 점돌연변이를 보인다. 약 60%에 해당하는 DMD의 결실 돌연변이 여부의 확인을 위하여 multiplex PCR의 방법으로 결실 여부를 확인하였으며¹⁶⁾, 이 방법을 통해서도 중복돌연변이나 결실돌연변이의 여성보인자의 확인이 불가능하였다. MLPA 방법을 통하여 10-20%에 해당하는 중복돌연변이의 탐색이 가능하여 돌연변이 확인율이 70-80%로 높아졌으며, 이형접합자의 결실돌연변이의 보인 여부를 확인할 수 있게 되었다. 그러나 MLPA를 이용하여 20-30%에 해당하는 DMD 유전자의 점 돌연변이 여부는 확인할 수 없으므로, 전염기서열 분석이나 dHPLC 등과 같은 scanning 방법을 통한 돌연변이 분석이 요구된다¹⁷⁾.

2) PLP1

거대중복 혹은 전체유전자의 중복돌연변이가 높은 비율을 차지하는 경우로, Xq22에 위치한 proteolipid protein 1 유전자(PLP1)은 Pelizaeus Merzbacher disease의 원인유전자로 PLP1 유전자 돌연변이의 70%이상 정도에서 PLP1 유전자의 중복돌연변이를 보인다¹⁸⁾. 15-20% 정도에서 점돌연변이를 보이므로, 비율이 높은 중복돌연변이의 여부를 확인한 후, 염기서열 분석을 통한 돌연변이 규명의 순서가 필요하다. 중복돌연변이의 탐색을 위해서 FISH 방법이나 정량을 위한 실시간중합효소연쇄반응법 등의 방법이 사용되었다¹⁹⁾. MLPA를 통하여 비교적 쉽게 중복돌연변이의 여부를 확인할 수 있다.

3) PMP22

유전자의 중복 또는 결실돌연변이에 따라 전혀 다른 질환을 나타내게 되는 경우로, 17p11.2에 위치한 peripheral myelin protein 22 유전자(PMP22)의 중복돌연변이에 의해 상염색체 우성유전을 하는 Charcot-Marie-Tooth neuropathy type1A (CMT1A)가 발병되고, 결실돌연변이에 의해서 Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP)가 발병된다. 이러한 결실 또는 중복돌연변이의 탐색을 위하여 FISH, long PCR / long PCR-RFLP, 게놈 서던법 등이 사용되었다^{3, 20)}. MLPA를 통하여 비교적 쉽게 결실 또는 중복돌연변이 여부의 확인이 가능해 졌다.

4) MECP2 / VHL

거대결실돌연변이의 비율이 점돌연변이의 비율에 비해 높지는 않으나, 돌연변이의 규명을 위해서는 거대결실여부의 확인이 요구되는 경우로, Xq28에 위치한 Methyl CpG binding protein 2 유전자(MECP2)의 돌연변이에 의해 X-염색체 연관 우성유전의 레트증후군과, 3p26-p25에 위치한 Von Hippel Lindau 유전자(VHL)의 돌연변이에 의한 상염색체 열성유전의 폰히펠린다우증후군이 있다. 전체 혹은 부분 유전자의 결실돌연변이의 비율은 각각 10%²¹⁾, 30%²²⁾를 차지하고 있으며, 염기서열 분석 등을 통한 점돌연변이 분석에서 음성 결과가 나왔을 경우, 결실 돌연변이의 가능성을 검사해 보아야 한다. 실시간중합효소연쇄반응 등을 통한 정량분석법을 사용했다²³⁾. MLPA를 통하여 비교적 쉽게 결실 여부를 판단할 수 있으나, 엑손이 각각 4개와 3개로 비교적 작은 유전자에 해당하며, 연속적인 결실보다는 한 점에서의 결실이 관찰될 수 있다. 이런 경우, long PCR이나 정량분석법 등을 통해 추가 검증이 필요하다²⁴⁾.

5) ATP7B

거대결실/중복돌연변이를 거의 동반하지 않는 유전자의 경우로, 13q41.3-q21.1에 위치한 ATPase, Cu(+2) transporting, beta polypeptide 유전자(ATP7B)의 돌연변이에 의한 상염색체 열성유전의 윌슨병을 예로 들 수 있다. 윌슨병의 원인유전자는 ATP7B이나, 환자의 약 80%에서만 ATP7B 유전자의 점돌연변이를 heterogeneous하게 보이며 나머지 20%에서는 돌연변이를 발견할 수 없었다¹³⁾. 이 20%내에 거대결실 돌연변이가 포함되어 있을 것으로 기대하고 80여명의

월슨병 환자를 대상으로 결실돌연변이 여부를 확인한 결과, 모두 음성 결과를 보였다(unpublished data). *ATP7B* 유전자의 돌연변이는 거대결실돌연변이를 거의 포함하고 있지 않은 것으로 보이며, *ATP7B*에 대한 MLPA 분석은 의미가 없다는 것을 의미한다.

비슷한 예로 Idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism/Kallmann 증후군에 해당하는 유전자중, *FGFR1*, *GNRH1*, *GNRHR*, *GPR54* 및 *NELF* 유전자에서 100명을 대상으로 거대결실 여부를 확인했을 때 결실돌연변이를 발견하지 못하여, 이들 유전자에 대한 MLPA 분석이 의미가 없음을 보고하였다²⁵⁾.

3. 메틸화 양상(Methylation pattern)탐색의 예

프라더윌리증후군 또는 엔젤만증후군은 15q 염색체 부위의 미세결실이나 uniparental disomy (UPD) 등에 의해 그 부위의 메틸화양상이 변화하여 생기는 imprinting 질환으로 메틸화 특이 제한효소를 이용한 계층 서던분석이나, bisulfite 등으로 계층 DNA의 변성을 유도한 후, 중합효소연쇄반응을 이용하여 메틸화 양상의 확인을 통하여 유전자 진단을 하였다²⁶⁾. 이 방법들은 메틸화의 양상만을 확인하는 것으로 미세결실 또는 UPD의 여부는 FISH 방법을 통하여 다시 한번 확인을 해야 한다^{4, 5)}.

MLPA 방법을 이용하면 15q 부위의 표적 DNA의 유전자농도를 함께 확인하므로 FISH 방법을 대체할 수 있으며, ligation 후 *HhaI*의 메틸화 특이 제한효소를 이용하여 비메틸화 DNA를 절단함으로써 표적 DNA의 메틸화 양상을 확인할 수 있어 bisulfate 처리 후 메틸화 특이 중합효소연쇄반응(Methylation specific PCR, MS-PCR) 방법을 대체할 수 있다. 즉, 한번의 MLPA 분석으로 FISH와 bisulfate를 이용한 MS-PCR의 두 가지 방법을 대체할 수 있다. MS-MLPA는 *HhaI* 제한효소를 처리한 반응물과 처리하지 않은 반응물의 두 번의 ligation 산물을 요하며, *HhaI* 제한효소를 처리하지 않은 반응물은 유전자농도를 의미하므로 미세결실 여부를 확인이 가능하며, *HhaI* 제한효소를 처리한 반응물은 정상적인 메틸화를 가진 염색체는 절반만 절단되는 양상의 peak을 보이게 된다. 이 부분이 완전히 절단이 되면 메틸화가 없어진 것을 의미하므로, 모계로부터 유래된 메틸화된 부분이 결실되었거나, 메틸화가 없는 부계의 부분만이 UPD로 존재하는 엔젤만 증후군에 해당함을 알 수 있다. 반대로 전혀 절단되지 않은 양상을 보이면, 모두 메틸화되어 있는 것을 의미하므로, 부계의 일부분이 결실되거나 모계의 UPD에 의한 프라더윌리증후군임을 알 수 있다²⁷⁻²⁹⁾

(Fig. 2).

프라더윌리 / 엔젤만증후군 외에도 메틸화 이상으로 발병하는 질환으로, 11p15 부위의 메틸화 양상 차이에 따른 질환으로, 모계로부터 유래된 유전자가 결실된 양상을 보이는 Beckwith-Wiedemann 증후군(BWS)와 반대로 부계로부터 유래된 유전자의 결실 양상에 의한 Silver-Russell 증후군(SRS)에 대한 MLPA 분석이 가능하다. BWS의 경우 70-80%가 메틸화 이상 양상을 통해 발병하며³⁰⁾, SRS의 경우도 40-50% 해당한다³¹⁾.

그리고, pseudohypoparathyroidism (PHP)은 20q13.3에 위치한 guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating activity polypeptide 1 유전자(*GNAS*)의 돌연변이에 의하며, *GNAS*의 5' upstream에 위치하는 syntaxin16 유전자(*STX16*)의 부분 결실에 의한 *GNAS*의 imprinting 이상이 야기되어 PHP type 1b가 된다. PHP는 메틸화 양상에 따른 돌연변이를 부계로부터, 또는 모계로부터 유래되느냐에 따라 질

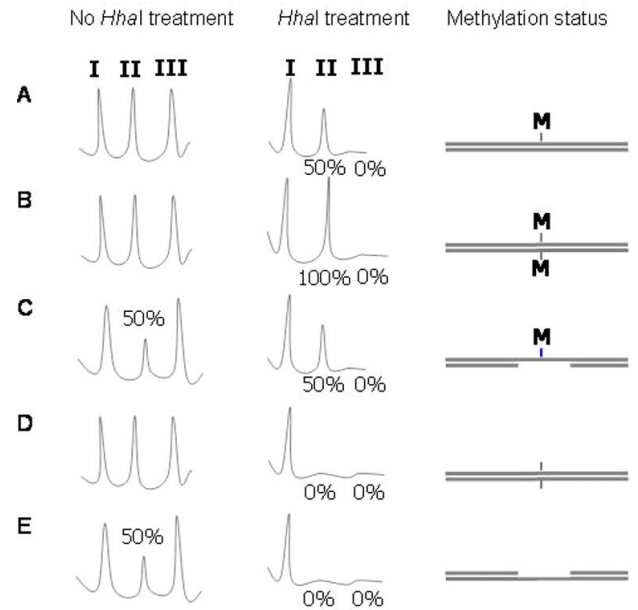


Fig. 2. The analysis example of MS-MLPA with Prader-Willi (PWS) and Angelmann syndrome (AS). MS-MLPA requires two running sets. One set is not treated by *HhaI* for detection of gene dosage and the other treated by *HhaI* for detection of methylation status. The peaks of MS-MLPA are composed of three parts of indicators. Peak I indicates dosage control with no *HhaI* digestion site. Peak II indicates methylation status with *HhaI* digestion site. Normal methylation status reveals half undigested peak. Peak III indicates *HhaI* digestion control, which always reveals complete digestion. A) Normal, B) PWS with maternal UPD, C) PWS with paternal micro-deletion, D) AS with paternal UPD, and E) AS with maternal micro-deletion.

환의 양상이 달라지는 특징을 보이는 질환이다³²⁾. MLPA를 통하여 환자에 대한 메틸화 양상을 모니터링 할 수 있으며, 주요부분에서의 결실 여부를 판단할 수 있어 MLPA는 PHP의 진단에 유용한 도구로 사용된다.

4. 기타 - 염색체 배수체검사 및 암관련 유전자 검사

MLPA를 이용하여 양수로부터 염색체 배수체 이상을 확인할 수 있다. MLPA의 구성은 염색체 13,18,21에 대한 탐침자를 각각 8개, X 및 Y 염색체에 대한 탐침자를 각각 4개씩 조합하여 대조군과의 농도 측정을 통하여 각 염색체에 대한 배수체를 확인할 수 있다. 이 방법을 통하여 파타우, 에드워드, 다운증후군 및 터너, 클라인-펠터증후군 등의 염색체 수적이상 질환의 양수를 통한 산전진단이 가능하다. MLPA법에 의한 염색체 배수체 검사는 QF-PCR이나 FISH 방법에 비해 많은 수의 탐침자를 사용하여 검사되는 유전자수가 더 많고, 비용이 상대적으로 적게 소요된다는 장점을 가지고 있으나, DNA의 질에 많은 영향을 미치는 관계로 양수로부터의 검사에 대한 실패율이 다른 방법에 비해 높고, 시간이 더 많이 걸린다는 단점을 가지고 있다³³⁾.

또한 MLPA방법은 암관련 유전자(predisposition gene)의 진단에 유용하게 사용되는데, 암관련유전자가 우성유전의 양상을 주로 보이며, 비교적 큰 크기의 유전자가 관련되어 거대 결실 돌연변이의 가능성이 높다. *hMSH1*, *hMSH2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *APC* 유전자의 copy number를 효율적으로 탐색하였고, 이러한 암관련유전자(predisposition gene)에서 유전자농도 측정이 필수적임 보고하였다³⁴⁾.

5. 향후의 전망

MLPA 하나의 실험군은 40개의 탐침자로 구성되어 있으며, Genetic Analyzer의 분리 능력으로 인해 40개 이상의 탐침자를 동시에 사용하기가 힘들다¹⁵⁾. 이러한 한계를 극복하기 위하여 array-MLPA 방법이 고안되었다. 시발체-교잡염기서열-stuffer의 세 부분으로 나누어진 기존 MLPA 탐침자(Fig. 1A)에 array에 교잡될 수 있는 array 특이염기서열 부분을 도입하여, Genetic analyzer에서 분리하던 절편을 array를 이용하여 되며, 이 방법은 엑손수가 79개에 이르는 DMD의 결실/중복돌연변이 탐색에 성공적으로 응용되었다^{35, 36)}.

또한, MS-MLPA는 염색체 이상 질환³⁷⁾ 뿐 아니라 신경교종(glioma)에서 MGMT promoter의 메틸화 양상 분석³⁸⁾과

수막종(menigiomas)에서의 TP73 메틸화 양상 분석³⁹⁾과 같은, 유전자의 양적 변화가 다양한 암세포에서의 메틸화 양상변화도 효과적으로 진단이 가능하다.

마지막으로 최근에 대두되고 있는 copy number variation (CNV)의 연구에도 응용되고 있다. Array-CGH (comparative genome hybridization) 방법을 통하여 나타나는 다양한 CNV에 대한 검증을 위한 방법으로 사용된다. MLPA 방법이 가지는 편의성과 적응성(flexible)의 장점을 이용하여 빠르고 간편하게 CNV에 대한 검증이 가능하고, 이 부위들에 대한 집단검사로의 응용도 가능하여 CNV 연구에서 중요한 역할을 담당할 것이다⁴⁰⁾.

결론

MLPA는 유전자 돌연변이 중 거대 결실 또는 중복돌연변이를 효과적으로 탐색할 수 있는 방법이다. 중합효소연쇄반응에 의존하는 한두 개 염기의 결실 및 삽입돌연변이 및 점돌연변이 등과 같은 돌연변이의 탐색과 달리 거대 결실 또는 중복돌연변이의 탐색을 위해서는 정량분석법이나 계놈 서던분석 등과 같은 방법을 사용해야 하는데, 이러한 방법들은 시간과 노력이 많이 드는데 비해 정확도가 높지 않은 문제점을 안고 있다. 이에 비해 MLPA는 이러한 거대 결실 또는 중복 돌연변이의 탐색을 중합효소연쇄반응 방법을 이용할 수 있게 하였다라는 점에서 큰 의의를 줄 수 있다. X-염색체 연관 결실돌연변이의 보인자 확인(예, *DMD*, *OTC*) 등의 유전자와 우성유전 질환의 이형접합자 결실돌연변이의 확인(예, *MECP2*, *VHL*, *BRCA1,2*) 등과 중복돌연변이의 확인(예, *PLP1*, *PMP22*) 등에 대한 탐색에 효과적으로 이용되고 있다. 위와 같은 유전자의 농도 측정을 통한 유전자진단뿐 아니라 메틸화 특이 제한효소를 이용한 Methylation-Specific (MS)-MLPA로 메틸화 이상 질환들, PWS/AS, BWS/RSS, PHP 등의 유전자 진단에도 응용되고 있다.

MLPA 방법은 유전자 농도 및 메틸화 양상의 확인을 위해 사용된 MLPA 이전의 방법들과 비교하여 시간과 노력, 비용 면에서 상당한 이점을 가지고 있다. 사용되는 주형 DNA의 양은 약 20ng으로 적은 양만으로도 검사가 가능하며, 한번에 많은 검체의 처리(high throughput)가 가능하고 결과를 보기까지 24-48시간 정도로 타 검사방법들에 비하여 빠르다. 검사과정 이 간단하고 적응력이 높은 이 한가지의 원리로 다양한 응용이 가능하여, 다수 질환의 진단법에 적용 및 유전자 연구에 대한 다

양한 적용이 가능하다. 모든 시약이 용액으로 구성되어 있어 자동화로의 전환이 가능하다는 등의 장점을 가진다.

반면 검사과정에서 주형 DNA의 질에 대한 의존도가 높으며, 탐침자의 염기서열에 해당하는 주형 DNA내에 SNP가 존재할 경우, 위양성(false-positive)의 결과를 나타내기도 한다. 민족간 SNP의 다양성 때문에 상용화된 MLPA 실험군내의 탐침자에 SNP가 있을 가능성이 있으며, 이로 인해 MLPA 탐침자군에 대한 version이 여러가지가 있어 분석에 어려움을 줄 수 있다. 유전자농도를 측정하지만, 40-50bp에 해당하는 탐침자 범위 외의 DNA의 결실, 중복 여부는 확인할 수 없고, 하나의 세포에서 유전자의 존재여부를 확인하는 FISH 방법과는 달리 MLPA는 많은 수의 세포내의 유전자 농도의 평균을 확인하는 것이기 때문에 정상세포군과 혼합된 암세포에서의 탐색은 잘못된 분석을 야기할 수도 있다. 또한 단일염기의 변이, 그리고 하나 또는 두세 개 염기의 결실, 중복돌연변이도 이론적으로는 MLPA 방법으로 검출이 가능하나, 교잡온도 조건이나 탐침자내의 위치 등에 따라 위음성(false-negative)의 결과가 나타나기도 한다²⁴⁾.

이러한 장단점을 가지고 있는 MLPA는 MS-MLPA 방법으로 기존에 탐색이 힘들었던 암세포에서 메틸화 양상의 확인에 응용되고, 최근 많은 연구가 진행되고 있는 CNV의 연구에서 신속하고 정확하게 CNV에 대한 확인(validation)에 이용되는, 가장 중요한 기법 중 하나로 평가될 것이다. 또한, array에 기반을 둔 방법으로 응용이 가능하여 탐색이 가능한 위치(loci)를 방대한 양으로 사용할 수 있는 방법들이 개발되고 있어, 향후 MLPA는 다양한 분야의 유전자탐색에 이용될 중요한 방법일 것이다.

감사의 글

본 논문은 보건복지가족부 희귀질환 진단치료기술연구사업단(과제고유번호 A080588)의 지원에 의합니다.

국문초록

Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)은 탐침자를 표적지에 교잡시킨 후, ligation 시키고, 그 산물을 중합효소연쇄반응으로 증폭시킴으로써 표적지의 존재 여부 또는 농도를 확인할 수 있는 방법으로, 그 원리가 소개된 이래로 여러 유전자들에 대한 거대결실 및 중복돌연변이에

대한 탐색에 이용되었다. 유전자진단은 질환에 관련된 유전자에 대한 돌연변이를 탐색함으로써 질환을 진단하는 방법으로, 단일유전자 결핍 질환에 대한 유전자진단은 주로 중합효소연쇄반응과 염기서열 분석 방법을 통한 점돌연변이의 탐색에 집중되어 있다. 거대결실 또는 중복돌연변이의 경우, 특히 이형접합자를 형성하게 되는 경우는 중합효소 연쇄반응을 통하여 결실 또는 중복돌연변이 여부의 확인이 힘들다. PCR 방법에 기초하여 유전자의 농도(gene dosage)를 알 수 있는 방법으로 MLPA 방법이 소개되면서 거대결실 또는 중복돌연변이를 포함하고 있던 질병 관련돌연변이들의 규명이 한층 쉬워졌다. MLPA의 원리를 응용하여 단순한 유전자의 농도 측정뿐 아니라 유전자내의 메틸화양상의 차이를 확인하거나, 염색체의 배수체 이상 등 염색체이상의 돌연변이 규명과, 전체 유전자의 크기가 비교적 커서 거대결실 돌연변이를 많이 동반하는, 주로 우성유전의 암 관련 유전자 돌연변이의 규명에 유용하게 이용된다. MLPA는 상용적인 중합효소연쇄반응으로 확인할 수 없는 유전자의 농도를 효과적으로 규명할 수 있는 방법으로, 적은 양의 주형 DNA만을 사용하고, 한가지의 실험원리로 다양한 응용이 가능하며 high-throughput이 가능한 장점을 가지는 반면, 주형 DNA의 질에 결과의 의존도가 높고, 민족 또는 개인간의 차이를 보일 수 있는 표적 DNA 염기서열 내의 single nucleotide polymorphism (SNP) 등으로 인해 분석의 오류가 생길 수 있으며, 양적 차이를 규명하는 것이므로 수 차례의 대조군 검사가 함께 진행되어야 하는 단점이 있다.

여기서는 MLPA를 이용하여 질병유전자의 돌연변이를 밝힌 사례를 바탕으로 MLPA의 원리와 탐색할 수 있는 돌연변이의 종류, 그리고 이 방법의 장단점에 대해 고찰해 보고자 한다.

참고문헌

- 1) GeneTests: Medical Genetics Information Resource (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1993-2009. Available at <http://www.genetests.org>
- 2) Cheng S, Foxkler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. Proc Natl Acad Sci 1994;91: 5695-9.
- 3) Benjamin BR, Greenberg F, Gunaratne P, Shaffer LG, Lupski JR, Sauer CM, et al. Duplication of the PMP22 gene in 17p partial trisomy patients with Charcot-Marie-Tooth type-1A neuropathy. Hum Genet 1996;

- 97:642-9.
- 4) Crolla JA, Harvey JF, Sitch FL, Dennis NR. Super-numerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum Genet* 1995;95:161-70.
 - 5) Gillissen-Kaesbach G, Robinson W, Lohmann D, Kaya-Westerloh S, Passarge E, Horsthemke B. Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and non-deletion patients with Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 1995;96:638-43.
 - 6) Roberts SE, Thomas NS. A quantitative polymerase chain reaction method for determining copy number within the Prader-Willi/Angelman syndrome critical region. *Clin Genet* 2003;64:76-8.
 - 7) Fukuda T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Miyamoto K, Jin JJ, Ohmori I, et al. Methyl-CpG binding protein 2 gene (MECP2) variations in Japanese patients with Rett syndrome: pathological mutations and polymorphisms. *Brain Dev* 2005;27:211-7.
 - 8) Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, et al. Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 deletion and one case of MECP2 duplication. *Hum Mutat* 2004;24:172-7.
 - 9) Shi J, Shibayama A, Liu Q, Nguyen VQ, Feng J, Santos M, et al. Detection of heterozygous deletions and duplications in the MECP2 gene in Rett syndrome by Robust Dosage PCR (RD-PCR). *Hum Mutat* 2005; 25:505.
 - 10) den Dunnen JT, White SJ. MLPA and MAPH: sensitive detection of deletions and duplications. *Curr Protoc Hum Genet* 2006;Chapter 7:Unit 7.14. Review.
 - 11) Sakharkar MK, Chow VT, Kangueane P. Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* 2004;4:387-93.
 - 12) Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 2006;60:389-98.
 - 13) Park S, Park JY, Kim GH, Choi JH, Kim KM, Kim JB, et al. Identification of novel ATP7B gene mutations and their functional roles in Korean patients with Wilson disease. *Hum Mutat* 2007;28:1108-13.
 - 14) MRC Holland. MLPA-An Introduction. Available at <http://www.mlpa.com>
 - 15) Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e57.
 - 16) Kim JH, Kim GH, Lee JJ, Lee DH, Kim JK, Yoo HW. Diagnostic testing for Duchenne/Becker Muscular dystrophy using Dual Priming Oligonucleotide (DPO) system. *J Genet Med* 2008;5:15-20.
 - 17) Muscarella LA, Piemontese MR, Barbano R, Fazio A, Guarnieri V, Quattrone A, et al. Novel mutations of dystrophin gene in DMD patients detected by rapid scanning in biplex exons DHPLC analysis. *Biomol Eng* 2007;24:231-6.
 - 18) Inoue K, Osaka H, Imaizumi K, Nezu A, Takanashi J, Arai J, et al. Proteolipid protein gene duplications causing Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular mechanism and phenotypic manifestations. *Ann Neurol* 1999;45:624-32.
 - 19) Woodward K, Cundall M, Palmer R, Surtees R, Winter RM, Malcolm S. Complex chromosomal rearrangement and associated counseling issues in a family with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Am J Med Genet* 2003;118A:15-24.
 - 20) Chang JG, Jong YJ, Wang WP, Wang JC, Hu CJ, Lo MC, et al. Rapid detection of a recombinant hotspot associated with Charcot-Marie-Tooth disease type IA duplication by a PCR-based DNA test. *Clin Chem* 1998;44:270-4.
 - 21) Archer HL, Whatley SD, Evans JC, Ravine D, Huppke P, Kerr A, et al. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J Med Genet* 2006;43:451-6.
 - 22) Stolle C, Glenn G, Zbar B, Humphrey JS, Choyke P, Walther M, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 1998;12:417-23.
 - 23) Hoebeeck J, van der Luijt R, Poppe B, De Smet E, Yigit N, Claes K, et al. Rapid detection of VHL exon deletions using real-time quantitative PCR. *Lab Invest* 2005; 85:24-33.
 - 24) MRC Holland. Interpretation of MLPA results. Available at <http://www.mlpa.com>
 - 25) Pedersen-White JR, Chorich LP, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. The prevalence of intragenic deletions in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:367-70.
 - 26) Kubota T, Das S, Christian SL, Baylin SB, Herman JG, Ledbetter DH. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat Genet* 1997;16:16-7.
 - 27) Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Chem* 2006;52:1276-83.
 - 28) Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe ampli-

- fication analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test* 2007;11:467-77.
- 29) Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Krämer N, Janssen B, et al. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes* 2007;21:208-15.
- 30) Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet* 2001;10:2989-3000.
- 31) Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005;37:1003-7.
- 32) Bastepe M, Jüppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res* 2005;63:65-74.
- 33) Hochstenbach R, Meijer J, van de Brug J, Vosselbeld-Hoff I, Jansen R, van der Lijst RB, et al. Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenat Diagn* 2005;25:1032-9.
- 34) Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 2004;91:1155-9.
- 35) Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2008;29:4627-36.
- 36) Zeng F, Ren ZR, Huang SZ, Kalf M, Mommersteeg M, Smit M, et al. Array-MLPA: comprehensive detection of deletions and duplications and its application to DMD patients. *Hum Mutat* 2008;29:190-7.
- 37) Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005;33(14):e128.
- 38) Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, et al. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 2007;87:1055-65.
- 39) Ewald C, Hofmann T, Kuhn SA, Deufel T, Beetz C, Kalff R. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification in meningiomas. *J Neurooncol* 2008;90:267-73.
- 40) Shen Y, Wu BL. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J Genet Genomics* 2009;36:257-65.