

DHPLC 를 이용한 Duchenne 형 근이영양증 보인자 검색 방법

연세대학교 대학원

의과학과

이 민 정

DHPLC 를 이용한 Duchenne 형 근이영양증 보인자 검색 방법

지도교수 이 진 성

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

이 민 정

이민정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006 년 6 월 일

감사의 글

제가 석사 학위과정을 무사히 마칠 수 있도록 도움을 주셨던 많은 분들께 이 면을 빌어 감사의 뜻을 포함합니다.

우선, 부족한 저를 아껴주시고 여러 연구 분야를 접할 수 있게 해주셨을 뿐만 아니라 이 논문이 완성되기까지 세심한 지도를 해주신 이진성 지도교수님께 깊이 감사드립니다.

또한, 이 논문이 있기까지 많은 조언을 해주신 김홍동 교수님과 이준수 교수님께도 깊은 감사를 포함합니다.

임상유전학과 실험실의 고참이시자 제 실험에 많은 도움을 주신 박은숙 선생님께도 감사합니다.

또한, 해박한 지식으로 부족한 저를 이끌어 주고 항상 후배를 챙겨주었던 고마운 사람 이철호 선배님께도 감사의 마음을 전합니다.

석사 과정 동안 곁에서 함께 웃어주고 슬퍼해주던 정원언니, 진주언니, 숙인이에게 감사드립니다.

고민 있고 어려울 때 가까이서 힘이 되어준 친구... 유경이, 다혜에게도 고마움을 전합니다. 항상 선배로서 챙겨주지도 못해서 미안한 후배 혜현이에게도 고마움을 전합니다. 그리고 제가 좋아하는 판소리 선배님들... 97학번 선배님등 많은 선배님들께도 감사드립니다.

10년지기 우리 고등학교 동창들... (항상 고마워 하는 거 알지?) 혜원이, 연주, 미영이, 이연이, 주미, 훈주, 현아, 소연이, 태리에게도 고마운 마음을 전합니다. 유학가서 많은 시간 함께 못했지만 마음만은 잘 통하는 친구 혜연이에게도 고마움을 전합니다. 또, 우리 중학교 동창들... 윤정이, 보람이, 기숙이, 유석이, 효성이, 동창은 아니지만 예쁜 후배 경민이에게도 고마운 마음을 전합니다.

항상 사랑과 믿음으로 어려울 때나 힘들 때 곁에서 지켜주었던 안성종님께 감사드립니다.

마지막으로 항상 버릇없게 굴고, 많이 속상하게 해드려도 이렇게 커서 석사 학위까지 받을 수 있게 사랑과 정성으로 보살펴 주셨던 사랑하는 부모님, 할머니, 할아버지, 동생과 사랑하는 많은 가족들에게 이 논문을 바칩니다.

저자 이 민 정 올림

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. DNA 추출	6
2. 유전자 증폭	6
3. DHPLC 분석	8
III. 결과	9
1. DHPLC 분석결과	9
IV. 고찰	22
V. 결론	24
참고문헌	25
영문요약	29

그림 차례

그림 1. DMD 유전자의 genomic map	4
그림 2-1. Exon 3 의 흡광도 분석 결과	11
그림 2-2. Exon 44 의 흡광도 분석 결과	12
그림 2-3. Exon 45 의 흡광도 분석 결과	13
그림 2-4. Exon 48 의 흡광도 분석 결과	14
그림 2-5. Exon 52 의 흡광도 분석 결과	15

표 차례

표 1. Gene copy 수의 계산	11
표 2-1. Exon 3 의 결과 값	17
표 2-2. Exon 44 의 결과 값	18
표 2-3. Exon 45 의 결과 값	19
표 2-4. Exon 48 의 결과 값	20
표 2-5. Exon 52 의 결과 값	21

국문요약

DHPLC 를 이용한 Duchenne 형 근이영양증 보인자 검색 방법

Duchenne muscular dystrophy (DMD) 는 소아에서 발병하는 가장 흔한 근육 질환의 하나로, 남아 3500명중의 1명꼴로 발생한다. DMD 유전자는 염색체 Xp21 위치에 2.4 Mb 크기로 존재하며, dystrophin 단백질을 만드는 작용을 한다. Dystrophin 유전자는 79 개의 엑손을 가지고 있고 mRNA 크기는 약 14kb에 달하며, 이제까지 밝혀진 사람의 유전자 중에서 가장 크다. 또한 전체 환자의 약 65%는 DMD 유전자의 한 개 이상의 엑손의 결실로 인한 기능적 이상으로 인하여 발생한다. 따라서 임상적으로 가장 많이 활용되는 DMD 환자의 진단 방법으로는 multiplex PCR (polymerase chain reaction) 을 이용하여 DMD 유전자의 결실을 확인하는 것이다. 또한 전체 환자의 2/3 의 경우 유전적 요인에 의하여 발병하므로 산전 진단 등의 임상적 목적으로는 보인자의 진단이 매우 중요하다. 보인자를 진단하기 위한 기존의 방법들은 southern blot analysis, fluorescence in situ hybridization (FISH), polymorphic short tandem repeat (STR) analysis, end point quantitative PCR and real-time quantitative PCR 분석법 등이 있다. 이들 방법은 동위원소를 사용하거나, 시간이 많이 걸리거나, 고가의 장비를 요하는 경우 등의 문제가 있다. 따라서 본 연구에서는 DHPLC를 이용한 새로운 유전자 검사 방법을 개발하여 이러한 임상적 문제를 해결해 보고자 하였다. 본 연구에서 개발된 새로운 방법은 결실이 있는 부위

를 PCR 증폭 후 DHPLC 결과로 비교하여 보인자에서 해당 부위의 결실 여부를 확인하는 방법으로서 가족의 검체 없이도 internal-control 과의 비교를 통해서 환자나 보인자의 이상 유무를 진단해 낼 수 있었다.

검사 대상은 10명의 정상여성과 1명의 정상남성, 37명의 DMD 환자, 그리고 15명의 환자의 어머니를 포함하였다. Dystrophin gene 내에 결실이 확인된 Exon 3, 44, 45, 48, 52 부위를 증폭하였으며 정확한 PCR 의 여부와 유전자 copy의 비율 측정을 위하여 X 염색체상의 G6PD 유전자를 control로 이용하여, DMD 유전자 각 exon primer와 함께 multiplex-PCR 후 DHPLC의 분석을 통해 보인자 여부를 확인하였다.

DHPLC 분석 결과, 두 가지 형태의 결과를 관찰할 수 있었으며 비교 결과 DHPLC 를 이용한 정량 분석법은 보인자와 정상여성 사이에서 확실한 차이를 보였다. DHPLC 를 이용한 DMD gene 의 보인자 검색방법은 간단하고 빠르며 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다. 또한, 이러한 결과는 DMD와 비슷한 기전을 보이는 다른 유전질환의 경우에서도 보인자 진단에 도움을 줄 수 있을 것이다.

핵심되는 말 : DMD 보인자, DHPLC, Duchenne 형 근이영양증, DHPLC 정량 분석

DHPLC 를 이용한
Duchenne 형 근이영양증 보인자 검색 방법

<지도교수 이진성>

연세대학교 대학원 의과학과

이 민 정

I. 서론

Duchenne muscular dystrophy (DMD) 는 소아에서 발병하는 가장 흔한 근육 질환 하나로, 남자 3500명중의 1명꼴로 발생한다. DMD 유전자는 염색체 Xp21 위치에 genomic DNA가 2.4 Mb 크기로 존재하며, 근육에서 작용하는 dystrophin 단백을 합성하는 작용을 한다. 이 유전자는 79개의 엑손을 가지고 있고 encode 되는 mRNA는 14kb 에 달하며, 이제까지 밝혀진 사람의 유전자 중에서 가장 크다. 환자의 약 65%는 dystrophin 유전자의 한 개 이상의 엑손의 결실로 인한 기능적 이상으로 질병을 나타내게 된다.²⁻⁹ 보고된 바에 의하면 유전자의 duplication 에 의한 경우가 5.1%, 한 개 염기서열의 돌연변이로 일어나는 경우가 25.3% 의 빈도를 차지한다. DMD는 근육을 심각하게 무력하게 만들고, 아직까지 효과적인 치료

법이 없어 대부분의 환자들이 어린 나이에 사망하게 된다.²⁻⁹

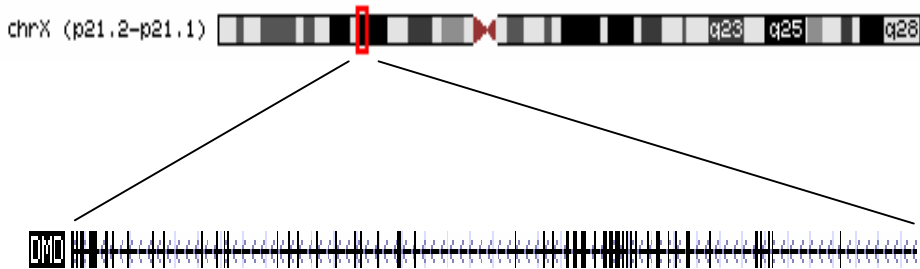


그림 1. DMD 유전자의 genomic map. DMD 유전자는 염색체 Xp21 부위에 위치하며 구조는 위와 같다.

DMD 환자의 진단은 보통 multiplex polymerase chain reaction 을 이용하여 DMD 유전자의 결실을 확인한다.²³ 그러나 이러한 방법으로는 한쪽 염색체의 결실을 확인할 방법이 없어 DMD 유전자의 보인자를 진단하기는 불가능하다. 또한 환자의 2/3 정도는 어머니의 유전적인 요인으로 발병하므로 산전 진단 등의 임상적 목적으로는 보인자의 진단이 매우 중요하다. 보인자를 진단하기 위한 기존의 방법들은 Southern blotting 방법을 쓰거나 fluorescence in situ hybridization (FISH), real-time PCR 등을 이용하여 정상 대조군과의 비교로 gene copy 를 분석하는 방법이 있다.^{2,6,7,9,15,16} 많이 사용되고 있는 진단법 중의 하나인 Dystrophin gene 내의 STR Marker 를 이용한 PCR 분석법은 비용, 노동력, 시간 면에서 이점을 갖고 있지만 진단을 위해서는 환자 가족의 DNA 샘플이 필요하고, 방사능 동위원소를 사용한다는 위험성과

육안으로 검사 결과를 확인하기엔 어려움이 따른다는 단점이 있다. 이 외에 다른 진단법들도 상대적으로 복잡한 과정과 많은 시간이 든다는 점, 그리고 고가의 장비를 필요로 한다는 점 등 여러 문제점을 지니고 있다.

본 연구에서는 현재 임상적으로 사용되는 보인자 진단 방법은 핵 가족화로 인한 질병의 가족력 여부의 확인이 힘들며 또한 방법적으로도 많은 어려움이 있어 이상적인 유전상담을 위한 충분한 정보 제공이 힘들 경우도 있으므로 Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) 를 이용한 정량분석을 통하여 적은 시간과 비용으로 DMD 보인자 진단의 어려움을 해결해 보고자 하였다.

이번 연구에서 이용한 Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)는 HPLC 의 원리를 이용하여 DNA를 분석 하는 기법으로 PCR 증폭산물을 부분적 변이 상태에서 acetonitrile column 을 통과하게 하여 나타나는 peak를 비교 분석 하는 것이다. 이는 이형접합체 변이를 찾는 데 매우 용이하여 DNA 변이나 SNP 검출을 정확하게 측정할 수 있고 또한 여러 PCR 증폭산물의 정량분석에도 이용 된다. DHPLC를 이용한 방법은 PCR 후에 모든 것을 자동화하게 되므로 매우 높은 특이도 및 재현성을 나타내는 방법이다. DHPLC의 결과는 시간 (minute) 에 따른 흡광도 (mV) 로 표시가 되며 이 흡광도 수치에 의해 정량적 분석이 가능하게 된다. 이러한 DHPLC의 특성을 이용하여 deletion에 해당하는 부위의 primer 와 DMD gene 내의 internal-control primer 를 제작^{19,20} 한 후 Multiplex PCR 과정을 거쳐 이 PCR 결과물을 DHPLC 에서 분석, 결과를 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. DNA 추출

10명의 정상여성, 1명의 정상남성, 37명의 dystrophin 유전자 exon 의 결실이 확인된 환자, 그리고 15명의 환자의 어머니를 검사 대상으로 하였다. DMD 환자의 DNA 는 multiplex-PCR 로 미리 진단된 환자의 DNA 로부터 준비하였다. DNA 추출은 Phenol-Chloroform 추출법을 이용하였다.

2. 유전자 증폭

PCR 은 TaKaRa Gradient Thermal Cycler Dice (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Otsu, Japan) 이용하며 한 검체 당 최종 부피가 25 μ l 가 되도록 조절하였다. DNA 30 ng/ μ l 를 1 μ l, 5pM sense/antisense primers 1 μ l, dNTP 50 μ M, Ex-taq reaction buffer 2.5 μ l, 그리고 1U 의 Ex-taq polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Ltd., Otsu, Japan) 를 사용하여 실시 하였다. Primer 는 dystrophin 유전자 내에 위치한 3번, 44번, 45번, 48번, 52번 primer 를 사용하였으며 염기서열을 각각 다음과 같다. Exon 3: forward primer, 5'-TCATCCATCATCTTCGGCAGATTAA- 3', reverse primer, 5'-CAGGCGGTAGAGTATGCCAAATGAAAATCA- 3'. Exon 44: forward primer, 5'-CTTGATCCATATGCTTTTACCTGCA- 3', 5'-TCCATCACCCCTTCAGAACCTGATCT- 3'. Exon 45: forward primer, 5'-AAACATGGAACATCCTTGTGGGGAC- 3', reverse primer, 5'-CATTCCTATTAGCTCTGTGCGCCCTAC- 3'. Exon 48: 5'-TTGAATACATTGGTTAAATCCCAACATG- 3', reverse

primer, 5'-CCTGAATAAAGTCTTCCTTACCACAC- 3'. Exon 52: forward primer, 5'-AATGCAGGATTTGGAACAGAGGCGTCC- 3', reverse primer, 5'-TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTC- 3'. X 염색체상의 G6PD 유전자를 internal-control 로 사용하여 DMD exon primer 와 함께 multiplex-PCR 을 시행하였다. G6PD 유전자 primer 의 염기서열은 다음과 같다. Internal-control primer: forward primer, 5'-AGGCTGCAGTTCCATGATGT- 3', reverse primer 5'-ATCTGTTGCCGTAGGTCAGG- 3'. 반응조건 은 94℃ 에서 5분간 변성 과정을 거친 후 94℃ 에서 30초, 60℃ 에서 30초, 72℃ 에서 30초, 이 과정을 25회 반복 실시하며 72℃ 에서 5분간 최종 증폭 단계를 거친다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel 에서 전기영동으로 확인하였다. 보인자와 정상여성의 정확한 비교를 위해 정상남성의 DNA 샘플과 DMD 유전자에 결실이 있는 환자의 샘플을 같은 DNA 농도로 섞은 후 PCR 증폭을 시행 하였다. PCR 에는 적은 양의 DNA 를 넣어 완전히 반응 할 수 있도록 하여 정확한 PCR 증폭산물의 분석을 가능하게 하였다.

3. DHPLC 분석

DHPLC 분석은 WAVE MD DNA fragment analysis system (Transgenomic Inc., Omaha, NE) 를 이용하였다. DNASep column 은 전기적으로 중성을 띄며 소수성 입자를 함유하고 있어 평상시 음전하를 띠고 있는 DNA 절편은 결합 할 수 없다. 실험에 사용되는 tri-ethyl-ammonium-acetate (TEAA) buffer 는 양전하를 띠고 있어 이러한 column 과 DNA 절편의 결합을 돕는다. 결합된 DNA 는 acetoniterile 에 의한 소수성 결합의 약화로 크기 별로 분류되어 column 밖으로 순차적으로 배출되며 260 nm 의 UV 검출기에 의해 확인된다. DHPLC 의 결과는 시간(minute)에 따른 흡광도(mV)로 표시가 되며 이 흡광도 수치에 의해 정량적 분석을 할 수 있다.

DHPLC 에 PCR 결과물 30 μ l 를 실시하여 결과를 얻었으며 DHPLC 의 non-denaturing 모드에서 실행하였다. Acetoniterile 의 유속은 0.9 ml/min 였으며 bufferA (0.1 mol/l TEAA 그리고 1 mM EDTA) 와 buffer B (25% acetoniterile in 0.1 mol/l TEAA) 를 이용하였다. 한 개의 검체 당 분석에 걸리는 시간은 약 18분이며 결과를 통해 보인자와 정상여성과의 차이를 확인하였다.

III. 결과

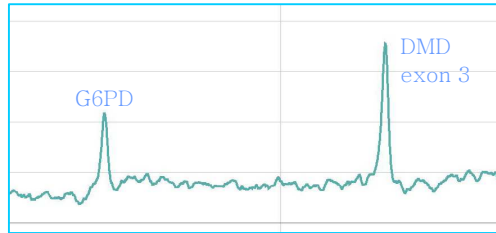
1. DHPLC 분석 결과

10명의 정상여성의 DNA, 1명의 정상남성의 DNA, 37명의 DMD exon 에 결실이 있는 환자의 DNA, 그리고 15명의 환자의 어머니의 DNA 의 연구대상으로부터 얻은 DHPLC 결과를 통해 DMD exon 별로 흡광도 값과 peak 비율을 정리하였다. DMD gene 의 각 exon 의 PCR 증폭 산물의 크기는 exon 3 은 410 bp, exon 44 는 268 bp, exon 45 는 547 bp, exon 48 은 506 bp, exon 52 은 113 bp 이며 X 염색체상의 internal-control 의 크기는 175 bp 이다. DHPLC 분석 결과 두 가지의 양상의 결과를 관찰할 수 있었으며 두가지의 종류로 분류된 DHPLC 결과를 peak 형태와 peak 비율로 종류별 구분을 하였다. 정상여성에서는 internal-control peak 에 비해 DMD gene dosage 가 두 개의 copy 인 peak 가 높게 나타났으며, 보인자 여성에서는 gene dosage 가 한 개의 copy 인 peak 가 낮게 나타났다. 각각의 DHPLC 결과는 internal-control 결과와 비교하여 비율을 측정하여 gene 의 copy 수를 수치와 하였으며, 그 공식은 다음과 같다.

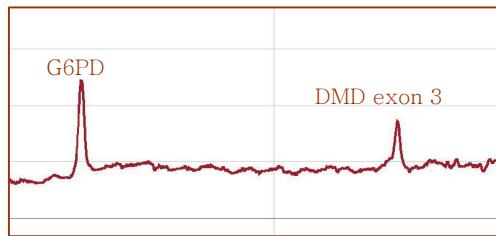
$$\frac{\text{실험군의 peak 높이(U) / 실험군의 Internal control(U)}}{\text{대조군의 peak 높이(C) / 대조군의 Internal control(C)}} \times 2$$

표 1. Gene copy 수의 계산. 실험군은 각 Exon 의 peak 높이이며 (U) 는 Unkwown 을 의미하며 대조군 (C)은 10명의 정상여성의 peak 높이를 평균을 계산하여 대입하였다.

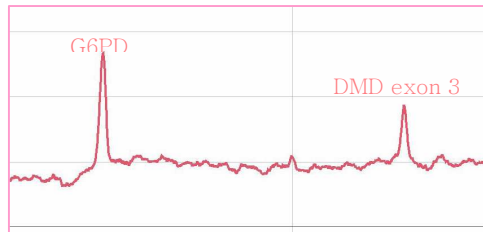
다음 그림은 DMD gene 의 각 Exon 별로 나타난 peak 의 형태이며, 표는 실험 결과를 표 1 에 대입하여 얻은 값을 각 Exon 별로 수치화 한 결과를 나타낸다.



(A)

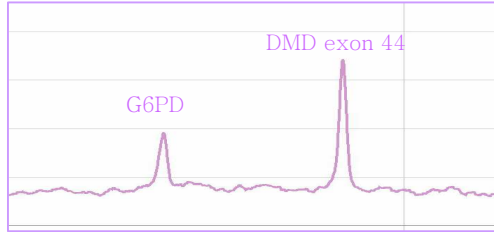


(B)

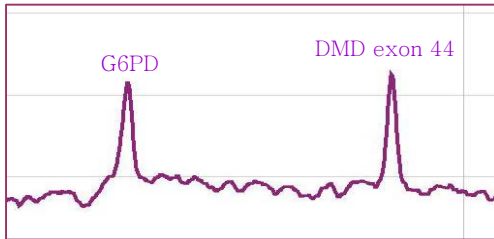


(C)

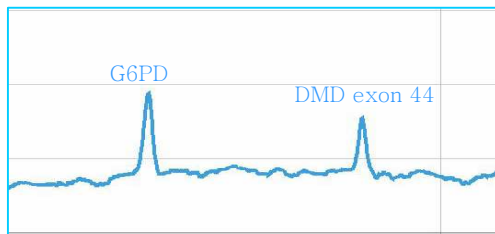
그림 2-1. Exon 3 의 흡광도 분석 결과. (A) Exon 3 정상여성, (B) Exon 3보인자, (C) Exon 3 의 결실이 있는 환자의 검체와 정상남성의 검체를 같은 농도로 섞은 샘플.



(A)



(B)



(C)

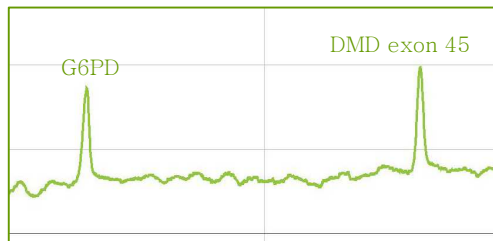
그림 2-2. Exon 44 의 흡광도 분석 결과. (A) Exon 44 정상여성, (B) Exon 44 보인자, (C) Exon 44 의 결실이 있는 환자의 검체와 정상남성의 검체를 같은 농도로 섞은 샘플.



(A)

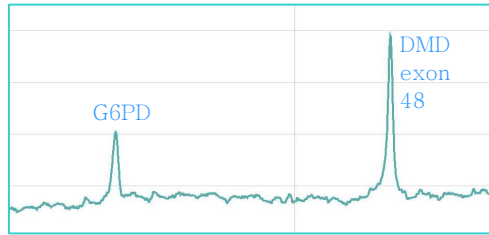


(B)

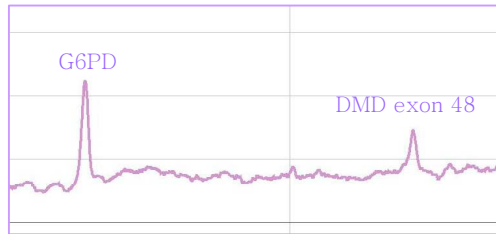


(C)

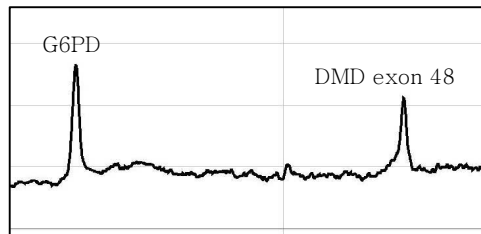
그림 2-3. Exon 45 의 흡광도 분석 결과. (A) Exon 45 정상여성, (B) Exon 45 보인자, (C) Exon 45 의 결실이 있는 환자의 검체와 정상남성의 검체를 같은 농도로 섞은 샘플.



(A)

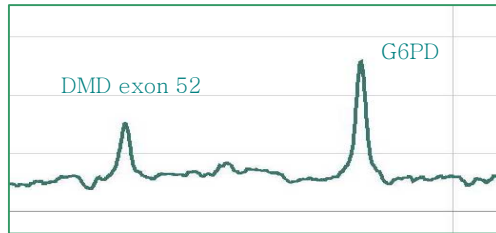


(B)

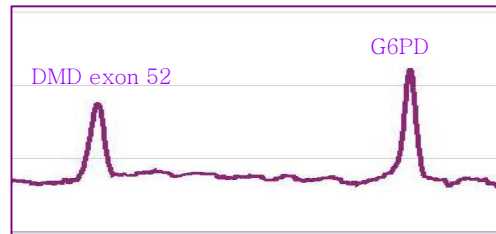


(C)

그림 2-4. Exon 48 의 흡광도 분석 결과. (A) Exon 48 정상여성, (B) Exon 48 보인자, (C) Exon 48 의 결실이 있는 환자의 검체와 정상남성의 검체를 같은 농도로 섞은 샘플.



(A)



(B)



(C)

그림 2-5. Exon 52 의 흡광도 분석 결과. (A) Exon 52 정상여성, (B) Exon 52 보인자, (C) Exon 52 의 결실이 있는 환자의 검체와 정상남성의 검체를 같은 농도로 섞은 샘플.

DHPLC 분석결과 각 Exon 별로 두 가지 형태의 결과를 관찰 할 수 있었다. 정상여성은 각 Dystrophin 유전자의 exon 부분에서 internal-control peak 보다 Gene dosage 가 두 개의 copy 인 peak 가 높게 나타났으며 보인자 여성은 각 DMD exon 부분에서 internal-control peak 보다 Gene dosage 가 한 개의 copy 인 peak 가 낮게 나타났다. 또한 정상남성과 DMD 유전자에 결실이 있는 환자의 DNA 를 같은 농도로 섞은 샘플은 보인자와 같은 형태를 보였다.

	Sample Name	G6PD	Peak	Converted
Exon 3	Patient 1 MIX	0.79	0.72	0.77
	Patient 2 MIX	0.90	0.78	0.73
	Patient 3 MIX	1.88	1.75	0.79
	Patient 1 Mother	1.18	3.36	2.38
	Patient 2 Mother	1.35	2.74	1.70
	Female Normal 1	0.74	2.33	2.40
	Female Normal 2	1.37	2.88	1.76
	Female Normal 3	1.15	2.29	1.67
	Female Normal 4	1.36	3.24	2.00
	Female Normal 5	1.77	3.72	1.76
	Female Normal 6	1.16	2.94	2.12
	Female Normal 7	1.00	3.46	2.89
	Female Normal 8	1.04	2.47	1.99
	Female Normal 9	1.16	2.32	1.67
Female Normal 10	1.35	3.32	2.05	

표 2-1. Exon 3 의 분석 결과. Patient 1 MIX, Patient 2 MIX, Patient 3 MIX 는 환자1, 2, 3 의 샘플과 정상남성의 DNA 를 같은 농도로 섞어 준비한 시료임.

	Sample Name	G6PD	Peak	Converted
Exon 44	Patient 1 MIX	1.04	0.74	0.63
	Patient 2 MIX	0.89	0.69	0.68
	Patient 3 MIX	1.29	0.84	0.58
	Patient 1 Mother	1.32	3.04	2.00
	Patient 2 Mother	0.91	2.46	2.35
	Patient 3 Mother	0.70	0.77	0.96
	Female Normal 1	0.99	2.85	2.31
	Female Normal 2	1.58	3.44	1.89
	Female Normal 3	1.09	2.31	1.84
	Female Normal 4	0.99	2.10	1.85
	Female Normal 5	0.71	1.89	2.32
	Female Normal 6	0.82	2.07	2.20
	Female Normal 7	1.11	2.01	1.58
	Female Normal 8	0.94	2.00	1.85
	Female Normal 9	0.84	1.85	1.92
Female Normal 10	1.30	3.41	2.28	

표 2-2. Exon 44 번에 대한 결과.

	Sample Name	G6PD	Peak	Converted
Exon 45	Patient 1 MIX	0.87	0.89	0.81
	Patient 2 MIX	1.12	0.98	0.69
	Patient 3 MIX	1.41	1.27	0.72
	Patient 4 MIX	1.63	1.42	0.69
	Patient 5 MIX	1.77	1.59	0.71
	Patient 6 MIX	1.79	1.58	0.70
	Patient 7 MIX	1.45	1.35	0.74
	Patient 8 MIX	1.43	1.31	0.72
	Patient 9 MIX	1.12	1.20	0.85
	Patient 10 MIX	1.42	1.37	0.76
	Patient 11 MIX	1.50	1.21	0.64
	Patient 12 MIX	1.51	1.27	0.67
	Patient 4 Mother	1.17	2.42	1.62
	Patient 5 Mother	0.99	1.06	0.85
	Patient 7 Mother	1.28	2.94	1.80
	Patient 12 Mother	1.16	1.19	0.81
	Female Normal 1	1.33	3.34	2.56
	Female Normal 2	1.74	3.45	1.56
	Female Normal 3	2.12	4.19	1.98
	Female Normal 4	1.26	3.77	2.35
	Female Normal 5	1.09	3.92	2.82
	Female Normal 6	1.50	3.56	1.86
	Female Normal 7	1.47	4.25	2.27
	Female Normal 8	0.86	2.78	2.54
Female Normal 9	1.45	3.45	1.86	
Female Normal 10	1.08	3.20	2.33	

표 2-3. Exon 45 번에 대한 결과.

	Sample Name	G6PD	Peak	Converted
Exon 48	Patient 1 MIX	1.82	1.66	0.88
	Patient 2 MIX	1.60	1.12	0.67
	Patient 3 MIX	1.27	0.82	0.62
	Patient 4 MIX	1.68	1.21	0.70
	Patient 5 MIX	1.81	1.21	0.64
	Patient 6 MIX	1.57	0.99	0.61
	Patient 7 MIX	2.05	1.62	0.77
	Patient 8 MIX	1.88	1.46	0.75
	Patient 9 MIX	1.84	1.77	0.93
	Patient 10 MIX	1.34	1.46	1.04
	Patient 11 MIX	1.23	1.10	0.86
	Patient 1 Mother	1.41	1.18	0.80
	Patient 4 Mother	1.55	3.08	1.90
	Patient 8 Mother	1.18	1.28	1.04
	Patient 11 Mother	1.91	1.36	1.10
	Female Normal 1	1.41	2.84	2.10
	Female Normal 2	1.12	2.46	2.10
	Female Normal 3	1.24	3.07	2.37
	Female Normal 4	1.52	3.16	1.99
	Female Normal 5	1.36	2.93	2.06
	Female Normal 6	1.46	2.87	1.88
	Female Normal 7	1.72	3.69	2.05
Female Normal 8	1.51	2.65	1.68	
Female Normal 9	1.13	2.68	2.27	
Female Normal 10	1.87	3.66	1.87	

표 2-4. Exon 48 번에 대한 결과.

	Sample Name	G6PD	Peak	Converted
Exon 52	Patient 1 MIX	0.98	0.97	0.81
	Patient 2 MIX	1.17	1.27	0.89
	Patient 3 MIX	1.10	1.32	0.98
	Patient 4 MIX	0.90	0.97	0.88
	Patient 5 MIX	1.06	1.13	0.87
	Patient 6 MIX	1.00	1.11	0.90
	Patient 7 MIX	1.24	1.16	0.77
	Patient 8 MIX	1.26	1.37	0.89
	Patient 1 Mother	1.03	0.93	0.74
	Patient 4 Mother	1.18	1.66	1.15
	Female Normal 1	1.23	3.11	2.47
	Female Normal 2	1.29	3.27	2.06
	Female Normal 3	1.24	3.24	2.13
	Female Normal 4	1.41	3.79	2.18
	Female Normal 5	1.29	3.18	2.00
	Female Normal 6	1.55	3.35	1.76
	Female Normal 7	1.65	3.54	1.75
	Female Normal 8	1.27	3.26	2.09
	Female Normal 9	1.11	2.99	2.19
	Female Normal 10	1.28	3.05	1.94

표 2-5. Exon 52 번에 대한 결과.

위의 표 2 을 통해 본 각각의 DMD exon 분석결과에서 표 1 의 공식에 대입하여 변환한 값이 하나의 copy 를 가진 경우 0.6 ~ 1.15 의 값을 나타냈으며, 두 개의 copy 를 가진 경우 1.5 ~ 2.2 의 값을 나타냈다.

IV. 고찰

DMD 보인자의 진단과 여러 가지 유전질환 중 보인자의 검색이 필요한 경우 STR marker 분석법과 real-time PCR 등을 이용한 분석법이 널리 사용되어왔다. 또한 Multiplex PCR 과 DHPLC 를 이용하여 정상여성과 보인자 여성을 비교하는 방법도 있지만, 이 방법도 결과의 재현성에 문제가 있어 임상적으로 활용하기에 적합한지는 더 많은 경험이 필요하다. 따라서 복잡한 과정과 비용과 시간 등의 문제와 Multiplex PCR 을 이용하여 보인자를 진단할 경우 같은 샘플간의 균일성 등이 문제가 되었는데, 이를 극복하며 재현성 있는 결과를 얻기 위한 방법으로 DHPLC 를 통한 PCR 증폭산물의 정량적 분석을 고안했다.

이번 실험에서는 10명의 정상여성의 DNA, 1명의 정상남성의 DNA, 37명의 DMD exon 에 결실이 있는 환자의 DNA, 그리고 15명의 환자의 어머니의 DNA 를 준비하여 실험을 진행하였으며 보인자 여성과 정상여성을 비교하기 위하여 인공적으로 보인자 샘플을 만들어 결과를 비교하여 보았다. 인공적인 보인자 샘플은 실험의 오차를 배제하기 위하여 정상남성 1명과 각 DMD 유전자에 결실이 있는 환자의 샘플을 같은 농도로 섞은 후 그것을 template 으로 이용하여 연구를 진행하였다. PCR 에 있어서 무엇보다 중요한 것은 정확한 DNA의 정량이며 정확한 정량을 위해서는 보다 정밀한 기계와 세밀한 자세가 필요하다. 모든 실험군에서 DNA 농도를 일정하게 하는 것이 매우 중요하며 이를 위해서 DNA 희석시에도 단계적으로 희석을 거쳐 오차를 줄여 DNA 샘플을 준비하여야 한다. PCR 증폭산물의 DHPLC 를 연계한 분석법을 통해 DMD 유전자의 보인자에 대한 결과를 알아보았으며 그 수치를 공식을 통해 변환하여

copy 수를 계산하였다.

실험 결과 peak 의 비율, peak 의 종류에 따라 DHPLC 의 결과를 보인자와 정상여성으로 정리할 수 있었으며 이와 함께 internal-control 의 결과와 비교하여 정확한 PCR 의 여부와 peak 간의 비율을 계산할 수 있었다. 그 결과 보인자 샘플은 0.5 ~ 1.15 copy 사이에 분포되어 있었으며 정상여성 샘플은 1.5 ~ 2.2 copy 사이에 분포되어 있었다.

이번 연구는 DHPLC 결과에 있어서 민감도 측면에서 제한점이 존재 할 수 있었으며 Template 로 이용하는 DNA 의 농도를 측정하는데 있어서 매우 정밀한 기계를 사용하여야 하는 한계점이 있었다. 또한, internal-control 을 이용하여 gene dosage 연구를 진행하였는데, 이 때 DMD gene 과 같은 gene dosage 를 유지해야 하기 때문에 X 염색체상에 있는 Housekeeping gene 을 사용해야 한다는 것이 중요하다. 보인자를 진단함에 있어서는 정확한 해석과 판단이 요구되지만 이번 연구에서처럼 정량적인 측면에서 결과를 해석할 시에는 자칫 결과의 판단에 민감도의 문제가 있을 수 있다. 이러한 제한점과 한계점을 보완하기 위해 DNA 희석을 단계적으로 여러 번 희석을 거침으로써 DNA 농도를 30ng/ μ l 로 정확히 정량했으며 internal-control primer 를 이용하여 multiplex-PCR 의 방법을 사용했다.

DHPLC 를 이용한 분석은 이번 실험에서 사용되었던 DMD exon primer 의 이용뿐 아니라 실험 결과에서 보았던 peak 의 비율을 통해 다른 primer, 즉, STR marker 와 다른 유전자 질환의 보인자를 검사하는 것에도 적용할 수 있을 것이다.

V. 결론

이번 실험에서는 PCR 을 통해 DMD 유전자의 Exon 부분을 증폭하여 이를 DHPLC 와 연계한 후 분석하여 쉽고 빠르게 결과를 낼 수 있었으며 가족의 DNA 없이도 하나의 검체만으로 internal-control 과의 비교를 통해서 보인자를 검사해 낼 수 있었다. 실험 결과 peak 의 비율, peak 의 수와 각각의 흡광도 값에 따라 DHPLC 의 결과를 두 가지 종류로 정리 할 수 있었으며 이와 함께 internal-control peak 의 결과를 비교하여 정확한 PCR 여부와 비율을 계산할 수 있었다. 유전자의 copy 수는 검체의 peak 와 internal-control peak 와의 비교를 통해 비율을 공식에 대입하여 계산하여 얻은 결과를 각 종류별로 보인자와 정상여성을 구분할 수 있었다.

DHPLC 를 이용한 DMD 유전자의 PCR 증폭산물의 분석은 결과에서 보았던 종류별 peak 와 비율을 계산한 결과를 토대로 DMD 보인자를 검사할 수 있고, 또한 다른 유전자 지역에서 STR marker 를 적용하여 분석함으로써 다른 유전질환에서 보인자 검사가 필요한 경우에 적용하여 임상적 적용이 가능하도록 보다 빠르고 간편하게 재현성 있는 결과를 얻을 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Su YN, Hung CC, Li H, Lee CN, Cheng WF, Tsao PN, Chang MC, et al. Quantitative analysis of SMN1 and SMN2 genes based on DHPLC: a highly efficient and reliable carrier-screening test. *Hum Mutat* 2005 ;25(5):460-467.
2. Traverso M, Malnati M, Minetti C, Regis S, Tedeschi S, Pedemonte M, et al. Multiplex real-time PCR for detection of deletions and duplications in dystrophin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 6;339(1):145-150.
3. Zhu HY, Wu LQ, Liang DS, Pan Q, Xia JH. Identify female carriers and de novo mutations in deletional Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *Yi Chuan Xue Bao* 2006 ;33(3):206-212.
4. Hoogerwaard EM, Ginjaar IB, Bakker E, de Visser M. Dystrophin analysis in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neurology* 2005 27;65(12):1984-1986.
5. Ferreiro V, Giliberto F, Francipane L, Szijan I. The role of polymorphic short tandem (CA)_n repeat loci segregation analysis in the detection of Duchenne muscular dystrophy carriers and prenatal diagnosis. *Mol Diagn* 2005 ;9(2):67-80.
6. Gatta V, Scarciolla O, Gaspari AR, Palka C, De Angelis MV, Di Muzio A, et al. Identification of deletions and duplications of the DMD gene in affected males and carrier females by multiple ligation probe amplification (MLPA). *Hum Genet* 2005 ; 117(1):92-98.

7. Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S. Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat* 2004 ;23(4):385-391.
8. Miyamoto A, Taguchi K, Hieda S, Kawamura M, Fukuchi K, Gomi K. Detection of micro mutation in dystrophin gene of DMD female carrier. *Rinsho Byori* 2004 ;52(6):493-499.
9. Huang W, Zhang C, Xie YM, Chen SL, Zhang WX, Lu XL, et al. Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Chinese families by microsatellite analysis. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2004 21(3):224-228.
10. Kumari D, Mital A, Gupta M, Goyle S. Deletion analysis of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients: use in carrier diagnosis. *Neurol India* 2003 ;51(2):223-226.
11. Alcantara MA, Garcia-Cavazos R, Hernandez-U E, Gonzalez-del Angel A, Carnevale A, Orozco L. Carrier detection and prenatal molecular diagnosis in a Duchenne muscular dystrophy family without any affected relative available. *Ann Genet* 2001 ;44(3):149-153.
12. Hussain T, Kumar DV, Sundaram C, Mohandas S, Anandaraj MP. Quantitative ELISA for platelet m-calpain: a phenotypic index for detection of carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Chim Acta* 1998 12;269(1):13-20.
13. Pastore L, Caporaso MG, Frisso G, Orsini A, Santoro L, Sacchetti L, et al. A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay completely discriminates between Duchenne and

- Becker muscular dystrophy deletion carriers and normal females. *Mol Cell Probes* 1996 ;10(2):129-137.
14. Ishii K, Sakuraba H, Minamikawa-Tachino R, Shimmoto M, Suzuki Y. Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy: computer-assisted direct quantitation of gene amplification products. *Brain Dev* 1992 ;14(2):80-83.
15. Xiao Y, Jiang X, Wang R. Screening for DMD/BMD deletion carriers by fluorescence in situ hybridization. *Genet Test*. 2003 Fall;7(3):195-201.
16. Delgado-Luengo WN, Borjas-Fuentes L, Zabala-Fernandez W, Fernandez-Salgado E, Solis-Anez E, Chavez C, et al. Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy by analysis of STRs loci linked to the gene of dystrophin in Venezuelan families. *Invest Clin* 2002 ;43(4):239-254.
17. Kim UK, Chae JJ, Lee SH, Lee CC, Namkoong Y. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy by polymerase chain reaction and microsatellite analysis. *Mol Cells* 2002 30;13(3):385-388.
18. Lee CC, Wu MC, Wu JY, Li TC, Tsai FJ, Tsai CH. Carrier detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy by using fluorescent linkage analysis in Taiwan. *Acta Paediatr Taiwan* 2000 ;41(2):69-74.
19. Toniolo D, Persico M, Alcalay M. A "housekeeping" gene on the X chromosome encodes a protein similar to ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 ;85(3):851-5.
20. Weisser M, Haferlach T, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger

S. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004 ;18(9):1551-1553.

21. Rosenberg C, Navajas L, Vagenas DF, Bakker E, Vainzof M, Passos-Bueno et al. Clinical diagnosis of heterozygous dystrophin gene deletions by fluorescence in situ hybridization. *Neuromuscul Disord* 1998 ;8(7):447-452.

22. Ligon AH, Kashork CD, Richards CS, Shaffer LG. Identification of female carriers for Duchenne and Becker muscular dystrophies using a FISH-based approach. *Eur J Hum Genet* 2000 ;8(4):293-298.

23. Alcantara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutierrez G, Saldana Y, Maulen I, et al. High frequency of de novo deletions in Mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin Genet* 1999 ;55(5):376-380.

Abstract

Quantitative Analysis of Dystrophin Gene Based on DHPLC and Its Clinical Application for Screening Carriers

Min Jung Lee

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jin-Sung Lee)

Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD) affect 1 in 3500 newborn male infants. DMD and BMD are both inherited in X-linked recessive pattern resulting from mutations in the dystrophin gene on Xp21.1. The disease caused by *de novo* mutations within the gene in one-third of the patients. Approximately 60% of the patients are associated with large intragenic deletions of one or more exons within 2 hot-spot regions in the proximal and central regions of the gene (exons 3, and exons 44-52). Affected males can be readily detected by the absence of an amplification product in a

multiplex PCR. Up to 98% of all frequent deletions can be detected using multiplex PCR. For the diagnosis of carriers, multiplex PCR cannot be used because the gene in the non-deleted X chromosome also produce PCR product for the deletion. Several DMD carrier identification strategies based on quantitative Southern blotting, fluorescent in situ hybridization, linkage analysis have been described. In this study, a simple, rapid, non-gel-based, non-fluorescence-based method for detecting female carrier of DMD by DHPLC is described. In total, 37 patients with deletions in different part of the gene, 15 carrier mothers and 10 female controls were analysed. Gene dosage of the deleted region was determined after multiplex PCR followed by DHPLC analysis. It was possible to discriminate among patients, carrier mothers and normal controls by comparing absorbance values. The ratio between peaks of carriers and internal controls showed the range from 0.6 ~ 1.15. This method is fast, easy and reproducible for detecting deletions in DMD carriers in practice. The method might also be useful for the diagnosis of other diseases that carry a deletion as a mechanism of the diseases such as microdeletion syndromes.

Key Words : DMD carriers, DHPLC, PCR, Duchenne muscular dystrophy, DHPLC quantitative analysis