

중증 혈우병 A 환자에서 Long - PCR 법을
이용한 Intron 22 역위 탐색

연세대학교 대학원

의 학 과

최 종 략

중증 혈우병 A 환자에서 Long - PCR 법을
이용한 Intron 22 역위 탐색

지도 송 경 순 교수

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 종 략

최종락의 석사학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

논문에 대한 구상과 자료를 주시고 부족한 저를 이끌어주시며 이 논문을 완성할 수 있도록 지도해 주시고 자문을 아끼지 않으신 송경순 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 그리고 바쁘신 가운데도 아낌없는 조언으로 격려해 주신 오상환 교수님, 민유흥 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 실험에 필요한 검체를 제공하여 주신 한국혈우재단 김은주 선생님과 논문의 완성까지 여러모로 배려하여 주신 김현숙 주임교수님, 의국 후배들께도 깊이 감사 드립니다.

아울러 논문의 완성까지 항상 옆에서 함께 지켜본 아내에게 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	8
1. 연구 대상	8
2. Intron 22 역위 검출을 위한 PCR	8
3. 결과의 판정	10
III. 결과	12
IV. 고찰	14
V. 결론	17
참고문헌	18
영문요약	24

표 차례

Table 1. Oligonucleotide positions and sequences of intron 22 in the
factor VIII gene

그림 차례

Fig. 1. Inversions involving the factor VIII gene. _____	7
Fig. 2. Schematic display of the PCR assay. _____	11
Fig. 3. Results of long - PCR analysis for intron 22 inversion of factor VIII gene at Xq28. _____	13

국문요약

중증 혈우병 A 환자에서 Long - PCR 법을 이용한

Intron 22 역위 탐색

FVIII 응고 인자의 유전자 결함에 의해 발생하는 혈우병 A는 X 염색체 열성으로 유전되며, 발병 빈도는 약 5,000명의 출생 남아 중 1명 정도이다. 혈우병 A는 임상적으로 FVIII 응고 인자의 활성도 저하 정도에 따라 경증, 중등도, 중증으로 구분되며 이는 유전자 변이의 차이에 기인하는 것으로 알려져 있다. 이 중에서도 중증 혈우병 A는 FVIII 응고 인자의 활성도가 1% 이하의 경우를 의미한다. 외국의 경우 이러한 중증 환자의 상당수에서 유전자 내 intron 22 부위의 역위가 관찰되는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 실제 역위 분석에 대한 유전자 검사가 용이하지 않아 국내에서는 이에 대한 보고가 많지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 비교적 긴 크기의 DNA 증폭을 목적으로 하는 long - PCR 법을 시도하여 중증 혈우병 A 환자에서 intron22 역위에 대한 유전적 결함을 밝힘으로써 향후 유전적 가계는 물론, 산발적 가계에서 보인자

진단, 및 산전 진단 등 유전 상담을 위한 기본 자료를 마련하고자 하였다.

본 연구를 위하여 연세의료원 및 한국혈우재단에 등록된 중증의 혈우병 A 환자 32예를 대상으로 하였다. 말초혈액으로부터 DNA를 추출하고, FVIII 응고 인자 유전자의 intron 22 자체 및 상동 부위에 위치하는 P, Q, A 및 B의 네 종류 시발체를 사용하여 Liu 등의 방법(1998)을 따라 PCR을 시행하였다. PCR 반응 산물을 0.6% agarose gel에서 100V로 전기영동 후 ethidium bromide 염색하여 UV transilluminator로 관찰 후 사진 촬영하였다.

실험결과, PQ, AB 시발체에 의한 12 kb, 10 kb의 반응 산물이 보이면 정상, PB+AQ, AB 시발체에 의한 11kb, 10 kb의 반응 산물이 보이면 역위를 가지고 있는 것으로 판정하였다. 또한 정상인 경우에는 A, B 시발체에 의해 *Int22h2* 또는 *Int22h3*의 증폭된 DNA (10 kb) 양이 P, Q 시발체에 의해 *Int22h1*의 증폭된 DNA (12 kb) 양에 비해 두 배 정도로 강하게 나타나는 반면, 역위인 경우에는 이와 반대로 PB+AQ에 의해 증폭된 DNA (11 kb) 양이 나머지 역위가 없는 부위의 증폭된 DNA (10kb) 보다 두 배 정도의 강도를 보이고 있음에 착안하였다.

그 결과, 중증의 혈우병 A 환자 총 32예 중 10예(31.3%)에서 역위에 대한 양성 결과를 보였다.

Long - PCR을 이용한 역위 분석법은 전통적인 Southern blotting법에 비해

간편하며 비교적 빠른 시간에 직접적으로 변이를 검출할 수 있는 방법이므로, 중증 혈우병 A 환자뿐만 아니라 그 가족들을 대상으로 보인자 및 산전 진단에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

핵심되는 말: 중증 혈우병 A, intron 22 역위, long - PCR

중증 혈우병 A 환자에서 Long - PCR 법을 이용한

Intron 22 역위 탐색

<지도교수 송경순>

연세대학교 대학원 의학과

최 종 략

I. 서론

혈우병 A는 X 염색체 열성으로 유전되며, 혈액 응고 인자 VIII(FVIII)의 유전자 결함으로 인한 출혈 증상을 보이는 혈액 응고 질환이다. 발병 빈도는 출생 남아 약 5,000 명중 1명 정도이다. FVIII의 유전자는 X 성염색체 장완의 말단 q28에 위치하며, 전체 X 염색체의 0.1%를 차지하는 매우 큰 유전자이다. 이 유전자는 186 kb의 염기로 구성되고 coding region은 9 kb로 크며, 26 개의 exon과 25 개의 intron으로 이루어져 있다. 유전자 결함은 염기 치환에 의한 점돌연변이(point mutation), 다양한 크기의 유전자 결손(deletion), 삽입(insertion), 중복(duplication) 등 여러 형태로 보고되고 있다.¹⁻⁴

1984년 Gitschier 등¹에 의해 FVIII의 coding region 염기 서열이 밝혀지면서 유전학적 진단 방법이 급속히 진전되었으나, 유전자 결함의 형태가 다양하기 때문에 직접적으로 각 가계에 특이한 돌연변이를 모두 찾는다는 것은 현실적으로 어려운 실정이다. 따라서 FVIII의 유전자 내부(intragenic)나 인접 부위에 존재하는 DNA 다형성(polymorphism) 사이의 연관 분석(linkage analysis)에 의한 가계 분석을 실시하여, 간접적으로 FVIII의 유전 경로를 추적하여 보인자 검색 및 산전 검사를 시행하고 있다. 다형성을 보이는 위치는 intron 18 - *BclI*, intron 19 - *HindIII*, intron 22 - *XbaI*, intron 25 - *BglI*, 3' flanking region - *MspI* 등이 보고되고 있다.⁵⁻⁸ 국내에서도 유전자 다형성을 이용한 방법으로 혈우병 A의 보인자 검색 및 산전 검사를 시행하여 분석한 보고들이 있다.⁹⁻¹²

혈우병 A는 임상적으로 FVIII 활성도 저하 정도에 따라 중증(<1%), 중등도(1 - 4%), 경증(5 - 25%)으로 분류된다. 이러한 혈우병 A 환자에서 Higuchi 등¹³은 genomic DNA의 coding 부위와 근접한 intron 부위의 염기 서열을 분석하여 원인이 되는 돌연변이를 찾고자 하는 시도를 하였다. 그러나 경증, 중등도 환자의 대부분 예에서는 돌연변이가 발견되었으나 중증의 환자에서는 약 50%에서만 돌연변이를 발견할 수 있었다. 그 후 Naylor 등은¹⁴⁻¹⁶ RT-PCR 방법을 이용하여 FVIII의 cDNA에서 돌연변이 검사를 시행하였고, 이 결과

24 명의 중증 환자 중 10 명에서 exon 22과 exon 23 주위에서는 PCR 증폭이 일어나지 않은 반면 exon 1 - 22 또는 exon 23 - 26에서는 예상했던 대로 증폭이 일어났으며 다른 돌연변이는 찾을 수 없었다. 따라서 Fig. 1에서와 같이 intron 22에 위치하는 상동 염기서열 부위와 VIII 유전자의 upstream 사이에 재조합이 발생할 수 있고 이로 인해 DNA의 역위를 초래하여 유전자의 결함을 초래한다고 보고하였다. 즉, intron 22번(*Int22h1*)의 9.5 kb는 X 염색체 장완 말단 부위에서 두 번 반복되는 부위(*Int22h2* 와 *Int22h3*)를 가지고 있는데 이 반복 부위는 서로 약 99% 이상의 상동성을 보이며, 역위는 *Int22h1*와 extragenic homology인 *Int22h2* 또는 *Int22h3* 사이의 염색체내 상동 재조합에 의함이 밝혀진 바 있다(Fig. 2).

역위를 밝히는 방법은 *Int22h1* 부위에서 소식자(probe)를 만들어 Southern blot을 이용하는 방법과 RT - PCR을 이용하는 방법이 주로 이용되었다. 그러나 최근까지 증폭 부위에 3.5 kb 크기의 GC 양이 65%인 부위와 이 가운데는 약 1 kb 정도의 GC 양이 79%인 부위를 포함하고 있어 PCR 방법으로 성공적인 증폭이 어려웠다.

최근 Liu 등은^{17,18} GC 양이 많은 부위와 적은 부위를 포함하는 multiplex long - distance amplification을 위한 PCR 법을 개발하여 intron 22의 역위를 보다 손쉽고 간편하게 측정함으로써 중증의 혈우병 A에 대한 유전적 진단이

가능하게 되었다.

혈우병 A는 유전적 질환임에도 불구하고 가족력이 전혀 없이 발단자 (proband)에서 새롭게 나타나는 경우가 흔한데 이렇게 산발적으로 발생하는 혈우병의 경우에는 발단자의 어머니가 보인자가 아니거나 혹은 외할머니로부터 유전된 돌연변이를 가지고 있는 보인자일 수 있으나 가계의 정보가 없어 그 진단이 어렵다. 따라서 구체적인 유전적 결함을 찾는 것은 유전상담에 있어 매우 중요하다. 이에 우리나라의 중증 혈우병 A 환자에서 intron 22 역위 탐색을 시도하여 향후 이를 이용한 보인자의 진단 및 산발적 가족 예에서 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

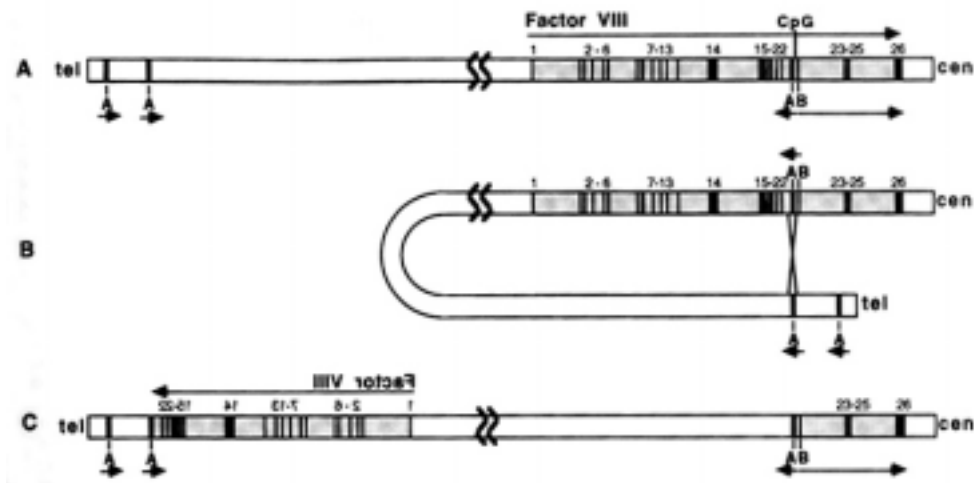


Fig. 1. Inversions involving the factor VIII gene. Three copies of gene A are indicated at homologous sites.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상

출혈 경향을 주소로 연세의료원에 내원한 남아 중 FVIII을 측정하여 1% 이하로 낮았던 환자 12명과 혈우재단에 등록된 혈우병 A 중증 환자 20명을 포함한 총 32명을 대상으로 하였다.

2. Intron 22 역위 검출을 위한 PCR

가. DNA 추출

Sodium citrate을 사용하여 채취한 말초혈액으로부터 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 High Pure PCR Template Preparation Kit(Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Germany)를 이용하였다.

나. 시발체(primer)의 제조

시발체의 제조는 Liu 등¹⁷이 보고한 방법에 따라 제조하였다. 즉 크기는 약 36 - 40 개의 뉴클레오타이드로 구성되어 있고 73°C의 T_m 값을 얻기 위해 2 - 5 개의 GC 뉴클레오타이드를 5' 부위에 첨가하였다. 자세한 시발체의 위치 및 염기순서는 Table 1과 Fig. 2에 표시하였다.

Table 1. Oligonucleotide positions and sequences of intron 22 in the factor VIII gene

Name (Position)	Sequence	GenBank Accession No.
P(-1212)	gcc cTG CCT GTC CAT TAC ACT GAT GAC ATT ATG CTG AC	AF062514
Q(+1334)	ggc ccT ACA ACC ATT CTG CCT TTC ACT TTC AGT GCA ATA	X86012
A(-167)	CAC AAG GGG GAA GAG TGT GAG GGT GTG GGA TAA GAA	AF062515
B(+118)	ccC CAA ACT ATA ACC AGC ACC TTG AAC TTC CCC TCT CATA	AF062516

Note : The high GC tails are indicated as lower case letters.
 - ; before the homology, + ; after the homology.

다. 유전자 증폭

중합효소연쇄반응 혼합액은 50 mM Tris - HCl, pH 9.2, 2.25 mM MgCl₂, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 7.5% DMSO, detergent가 함유되도록 하고 각 dNTP 500 μM, P, Q, A, B 각 시발체 0.4, 0.4, 0.12, 0.12 μM, DNA 500 ng, Expanded Long Template enzyme(Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Germany) 2.6 unit를 첨가하여 총 50 μL가 되도록 하였다. GeneAmp PCR System 9600(Perkin - Elmer, Foster City, CA, USA)을 이용하여 94°C에서 2분간 처리한 후 다음 반응(94°C에서 10초, 65°C에서 30초, 68°C에서 15분)을 10 회 반복하고, 나머지 20 회는 연장(elongation) 시간을 매회 10 초씩 증가시켜 반응 후 68°C에서 7 분간 마지막 연장반응 시켰다.

라. 전기영동 및 결과 확인

12 μ L의 반응 산물에 loading buffer 2 μ L를 섞어 0.6% agarose gel에서 100V로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator에서 반응 산물을 확인하였다.

3. 결과의 판정

Fig. 1.에 나타난 것과 같이 PQ, AB 시발체에 의한 12 kb, 10 kb의 반응 산물이 보이면 정상, PB+AQ, AB 시발체에 의한 11 kb, 10 kb의 반응 산물이 보이면 역위를 가지고 있는 것으로 판정하였다. 이때 정상인 경우 A, B 시발체에 의해 *Int22h2&3*의 증폭된 DNA(10kb) 양이 P, Q 시발체에 의해 *Int22h1*의 증폭된 DNA(12kb) 양 보다 두 배 정도의 강도를 보인다. 그러나 역위가 있게 되면 반대로 PB+AQ에 의해 증폭된 DNA(11kb) 양이 나머지 역위가 없는 부위의 증폭된 DNA(10kb) 보다 두 배 정도의 강도를 보이게 된다.

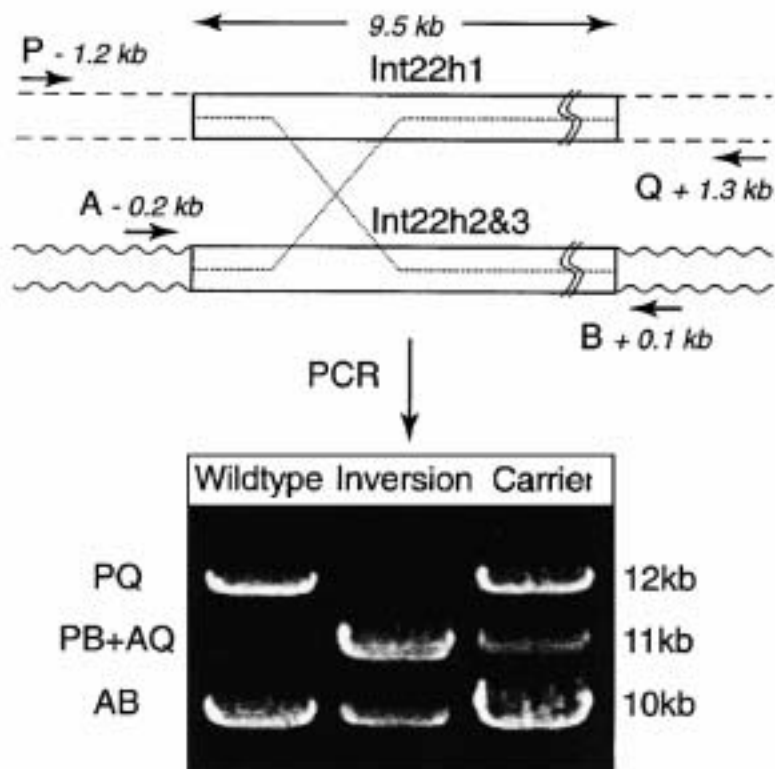


Fig. 2. Schematic display of the PCR assay. The location of four primers (P, Q, A and B) are represented by arrows, and amplified DNA products in cases with a wild - type or inversion, and in a case of carrier.

III. 결과

한국인 중증 혈우병 A 환자 32명을 대상으로 long - PCR 방법을 이용하여 FVIII 유전자 내 intron 22의 역위 빈도를 관찰한 결과, 역위 변이가 있는 10명(31.3%)에서는 *Int22h1*과 *Int22h2* 또는 *Int22h3* 사이 재조합이 유발되어 PB+AQ 시발체에 의해 증폭된 11kb 밴드가 나머지 재조합이 유발되지 않은 *Int22h2* 또는 *Int22h3*에서 AB 시발체에 의해 증폭된 10kb 밴드의 2배 정도의 강도를 보였다(Fig. 3). Long - PCR법을 이용함으로써 검사에 소요되는 시간은 약 6 시간 정도로 Southern blotting 법에 비하여 짧은 시간이 소요되고 blotting 과정이 필요 없기 때문에 검사 과정이 간편하였다.

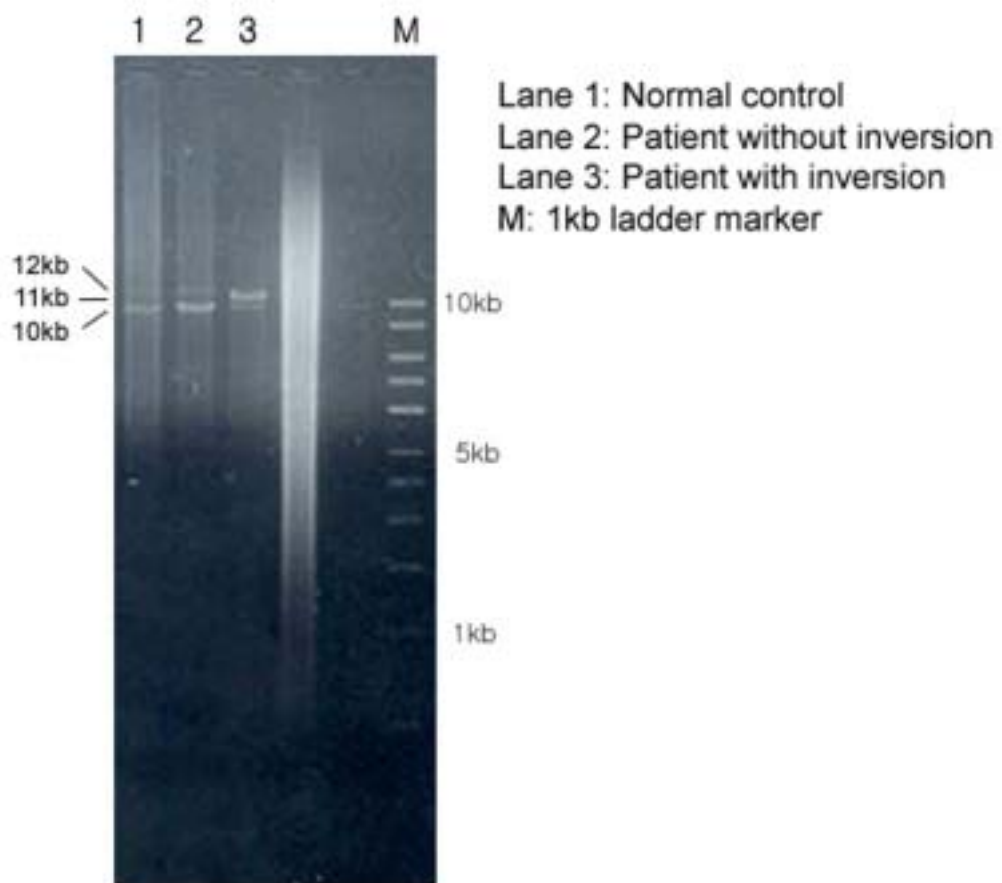


Fig. 3. Results of long - PCR analysis for intron 22 inversion of factor VIII gene at Xq28.

IV. 고찰

FVIII의 유전자는 X 염색체 장완의 원위부에 위치하며 26개의 exon으로 구성된 186 kb의 대단히 큰 유전자이다. 혈우병 A에서 나타나는 FVIII 유전자의 결함은 점돌연변이, 유전자 결손, 삽입 및 역위 등이 있다. 경증 및 중등도 혈우병 A 환자의 대부분에서는 점돌연변이가 나타나는 반면 중증의 혈우병 A 환자에서는 유전자 역위가 외국의 경우 약 50%에서 나타나며 그 다음이 점돌연변이의 순서로 보고 된 바 있다.^{1,16,19,20}

본 연구 결과, 한국인 중증 혈우병 A 환자 10명(31%)이 FVIII 유전자의 역위에 의한 것으로 밝혀졌으며, 이는 국내 연구자들에 의해 보고된 한 등²¹의 18.7%, 최 등²²의 39%, 국외 연구자들에 의해 보고된 Becker 등²³의 37%, Antonarkis 등²⁴의 43%와 유사한 결과를 보였다.

중증 혈우병 A 환자에서는 유전자 역위가 가장 흔한 유전자 결함이므로 환자 검색이나 보인자 검색에 있어서 역위의 탐색이 가장 효과적인 검사법일 것이다. 유전자 역위의 기전은 VIII 유전자의 intron 22에 위치하는 상동 염기서열 부위와 upstream 사이의 재조합이 있다는 것을 추측할 수 있으며 이 결과 DNA의 역위를 초래하여 유전자의 결함이 발생하는 것으로 알려져 있다. 즉 intron 22번(*Int22h1*)의 9.5 kb는 X 염색체 장완 말단 부위에 반복부위인 *Int22h2*와 *Int22h3*를 가지고 있으며, 이 반복부위는 약 99%이상의 상동성을

보인다. 역위는 *Int22h1*과 두 말단 반복부위 사이의 재조합에 의한 것으로 알려져 있다.^{19,24} 이렇게 발생한 유전자 결함은 intron 22에 위치한 양방향의 유전자 전사에 관여하는 promoter 유전자(F8A)의 역할을 하지 못하게 만든다. 따라서 intron22 역위는 유전자 전사에 영향을 미쳐 정상적인 cDNA 발현을 못하고 FVIII 형성을 하지 못하므로 중증의 혈우병이 발생하게 되는 것으로 알려져 있다.⁴

역위를 밝히는 방법은 *Int22h1* 부위에 소식자(probe)를 만들어 Southern blot을 이용하는 것과 RT-PCR을 이용하는 방법이 주로 이용되었다.^{25,26} 그러나 Southern blot은 장시간이 소요되는 단점이 있으며, 기존의 PCR은 증폭 부위에 GC 함유량이 매우 높아서 성공적인 증폭이 어려웠다. 다행히 최근 Liu 등^{17,18}은 기존의 방법들의 단점을 보완한 multiplex long-distance amplification을 위한 PCR법을 개발하여 역위 탐색을 보다 손쉽고 간편하게 수행할 수 있는 방법을 제시하였다. 본 연구에서는 Liu 등이 고안한 방법을 근거로 primer 농도, PCR 횟수와 조건, enzyme의 종류와 농도 등을 수회의 예비시험을 거쳐 최적의 반응 조건을 확립하여 실험을 수행하였다.

본 실험 결과 long-PCR법에 의한 intron 22 역위의 탐색은 기존의 Southern blot이나 RT-PCR 방법에 비해 단시간 내에 정확한 진단이 가능한 방법임을 알 수 있었다. 따라서 long-PCR법을 이용한 역위 탐색은 중증 혈

우병 A 환자의 유전자 변이를 효과적으로 탐색할 수 있을 것이며, 보인자 진단 및 산발적 사례에서도 유전자 결함을 밝히는데 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

역위가 없는 나머지 22명의 환자는 점돌연변이 등과 같은 역위 이외의 다른 돌연변이가 의심되며, 이에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 Long - PCR 방법을 이용한 유전자 내 intron 22의 역위 분석법을 성공적으로 확립하였으며, Southern blotting법에 비해 간편하며 비교적 짧은 시간 내에 FVIII DNA 변이를 검색할 수 있었다. 그리고 이 방법을 이용하여 중증 혈우병 A 환자의 31.3%에서 intron22 역위 양성을 확인할 수 있었다. 이 방법은 향후 혈우병 A 중증 환자뿐만 아니라 그 가족들을 대상으로 보인자 및 산전 진단에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 1984;312:326 - 30.
2. Tuddenham EG, Schwaab R, Seehafer J, Millar DS, Gitschier J, Higuchi M, et al. Hemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acid Res* 1994;22:4851 - 68.
3. Ljung RC, Sjorin E. Origin of mutation in sporadic cases of haemophilia A. *Br J Haematol* 1999;106:870 - 4.
4. Kazazian HH, Tuddenham EG, Antonarakis SE. Hemophilia A: Deficiency of coagulation factor VIII. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York: McGraw - Hill; 2001, p4377 - 81.
5. Antonarakis SE, Waber PG, Kittur SD, Patel AS, Kazazian HH, Mellis MA, et al. Hemophilia A: Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Eng J Med* 1985;313:842 - 8.

6. Bernardi F, Legnani C, Volinia S, Patracchini P, Rodorigo G, De Rosa V, et al. A *HindIII* RFLP and a gene lesion in the coagulation factor VIII gene. Hum Genet 1988;78:359 - 62.
7. Gitschier J, Drayna D, Tuddenham EG, White RL, Lawn RM. Genetic mapping and diagnosis of hemophilia A achieved through a *BclI* polymorphism in the factor VIII gene. Nature 1985;314:738 - 40.
8. Youssoufian H, Philips DG, Kazazian HH, Antonarakis SE. *MspI* polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. Nucleic Acid Res 1987;15:6312.
9. 송경순, 김백수, 이삼열. 혈우병 보인자 검사를 위한 Polymerase Chain Reaction법에 의한 DNA Polymorphism 분석에 관한 연구. 대한임상병리학회지 1991;11:381 - 6.
10. 송경순, 양영호. 한국인 혈우병 A 유전자의 제한효소 절편길이 다형성(RFLP)과 보인자 검색 및 산전 진단. 대한혈액학회지 1995;30:7 - 12.
11. 양영호, 유향숙, 송경순, 김동욱, 박용원, 김세광, 김인규. 분자생물학적 방법에 의한 혈우병 A의 보인자 및 산전 태아진단.

대한산부인과학회지 1994;37:2351 - 61.

12. 최영민, 황도영, 최진, 구승엽, 김석현, 신창재, 김정구.
중합효소연쇄반응을 이용한 한국인 혈우병 A 환자의 유전자 내 *BclI*
및 *XbaI* RFLP 양상에 관한 연구. 대한산부인과학회지
1994;37:2362 - 8.
13. Higuchi M, Kazazian HH, Kasch L, Warren TC, McGinniss MJ,
Phillips JA 3rd, et al. Molecular characterization of severe
hemophilia A suggests that about half the mutations are not within
the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. Proc
Natl Acad Sci USA. 1991;88:7405 - 9.
14. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F.
Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with
severe haemophilia A is due to large DNA inversions. Hum Mol
Genet 1993;2:1773 - 8.
15. Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F.
Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h)
and the associated inversion junctions. Hum Mol Genet
1995;4:1217 - 24.

16. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Giannelli F. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum Mol Genet* 1993;2:11 - 7.
17. Liu Q, Sommer SS. Subcycling - PCR for multiplex long - distance amplification of regions with high and low GC content: Application to the inversion hotspot in the factor VIII gene. *BioTechniques* 1998;25:1022 - 8.
18. Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single - tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998;92:1458 - 9.
19. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993;5:236 - 41.
20. Kemball - Cook G, Tuddenham EG. The factor VIII mutation database on the world wide web: the haemophilia A mutation, search, test and resource site. HAMSTeRS update (version 3.0). *Nucleic Acids Res* 1997;25:128 - 32.
21. 한진영, 김경희, 이영호, 이정녀, 이순용, 최욱한 등. Single - tube

PCR에 의한 혈액응고인자 VIII 유전자의 역위 검출.
대한임상병리학회지 2001;21:231 - 4.

22. 최영민, 박성효, 조세진. 한국인 혈우병 A 환자에 있어 Factor VIII 유전자의 Inversion 양상과 빈도 및 이를 이용한 혈우병 A 보인자 진단. 대한산부인과학회지 2000;43:1315 - 9.
23. Becker J, Schwaab R, Moller - Taube A, Schwaab U, Schmidt W, Brackmann HH, et al. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type - dependent sex ratio of mutation frequencies. Am J Hum Genet 1996;58:657 - 70.
24. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study. Blood 1995;86:2206 - 12.
25. Deutz - Terlouw PP, Losekoot M, Olmer R, Pieneman WC, de Vries - v d Weerd S, Briet E, et al. Inversions in the factor VIII gene: Improvement of carrier detection and prenatal diagnosis in Dutch haemophilia A families. J Med Genet 1995;32:296 - 300.

26. Weinmann AF, Schoof JM, Thompson AR. Clinical correlates among 49 families with hemophilia A and factor VIII gene inversions. *Am J Hematol* 1996;51:192 - 9.

Abstract

Detection of intron 22 inversion of factor VIII gene
using long - PCR technique in severe hemophilia A

Jong Rak Choi

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyung Soon Song)

Hemophilia A, characterized by defects in the gene for coagulation factor VIII, is inherited with X linked recessive pattern, and occurs one per every 5,000 male. Hemophilia A is clinically classified as mild, moderate or severe cases depending on the level of FVIII activity. The level of FVIII activity in the severe hemophilia A is less than 1 percent of the normal

level. Inversion at intron 22 of FVIII gene was reported in about half cases of severe hemophilia A. But, only a few study has been reported in Korea probably due to technical difficulties.

In this study, detection of inversion at intron 22 of VIII gene using long - PCR method was performed in order to provide a positive incidence for the detection of carrier state and prenatal diagnosis of hemophilia A.

The subjects were 32 severe hemophilia A patients registered in Yonsei University Medical College or Korean Hemophilia Foundation. DNA was obtained from peripheral blood and PCR was performed using primers P, Q, A and B matching sequences located in intron 22 and its homologs. PCR products were subjected to 0.6% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. DNA bands were observed and photographed using UV transilluminator.

DNA bands with 12kb and 10kb were detected in normal subjects when PCR was performed using PQ and AB primers, and DNA bands with 11kb and 10kb were detected in patients with severe hemophilia A. In normal cases primer A, B relevant products of *Int22h2* or *Int22h3* (10kb) were about as twice amount as the primer P, Q relevant products (12kb) of

Int22h1. However, in cases with inversion, PB+AQ amplified products (11kb) showed about as twice amount as the products (10kb) amplified in the remaining region. Ten (31.3%) of the 32 patients with hemophilia A showed inversion of intron 22 in this study.

A long - PCR method is simple and rapid for the detection of inversion in the factor VIII gene, as compared to the conventional Southern blotting technique, and may be applicable for the prenatal diagnosis or carrier detection in hemophilia A families.

Key words: severe hemophilia A, intron 22 inversion, long - PCR