

## 한국인 뉴센형 근디스트로피 가계에서의 보인자 진단을 위한 DNA 제한효소 단편 장다형에 관한 연구

연세대학교 의과대학 임상병리파학교실, 연세대학교 원주의과대학 임상병리파학교실\*  
연세대학교 근육병재활 연구소\*\*, 연세대학교 의과대학 재활의학파학교실\*\*\*

송경순 · 최종락 · 이창훈\* · 박영숙\*\* · 강성웅\*\*\* · 문재호\*\*\*

### = Abstract =

### Analysis on Restriction Fragment Length Polymorphisms of Duchenne Muscular Dystrophy Gene for the Diagnosis of Carrier in Korean

Kyung Soon Song, Jong Rak Choi, Chang Hoon Lee\*, Young Sook Park\*\*  
Seong Woong Kang\*\*\*, and Jae Ho Moon\*\*\*

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul;  
Department of Clinical Pathology, Yonsei University Wonju College of Medicine\*, Wonju;  
Department of Rehabilitation Institute of Muscle Disease, Yonsei University\*\*, Seoul;  
Department of Rehabilitation Medicine, College of Medicine, Yonsei University\*\*\*, Seoul, Korea

**Background :** Duchenne muscular dystrophy(DMD) is a severe X-linked recessive disease and cloned probes recognize genetic variations of restriction endonuclease sites (restriction fragment length polymorphisms(RFLPs)). These RFLPs may be inherited together with nearby genes and can be useful for the diagnosis of carrier.

**Methods :** We obtained peripheral blood from unrelated individuals for the analysis of 51-78 X-chromosomes in number and from 27 members of seven DMD families. DNA was isolated from white blood cells and RFLP analysis were performed using pERT series of probes(87-1, 87-8, 87-15), which detects a BstNI, TaqI and XmnI RFLP, respectively. Allelic frequencies and heterozygosity rates were calculated to

〈접수 : 1996년 3월 25일〉

〈수정본 접수 : 1996년 8월 28일〉

이 연구는 1994년도 한국과학재단 특정기초연구비 지원에 의한 결과임 (과제번호: 94-0403-01-2).

\*교신저자 : 송 경 순

서울시 강남구 도곡동 146-92

연세의대 영동세브란스 병원·임상병리과(전화 : 02-3450-3531, FAX : 02-557-9480)

## — 송경순 외 5인 : 듀센형 근디스트로피 보인자 진단 —

assess the diagnostic usefulness and linkage analysis was performed to observe the informativeness in DMD families.

**Results :** The allele frequencies of three intragenic pERT probes were 0.49/0.51, 0.69/0.31 and 0.49/0.51 among 87-1/BstNI, 87-8/TaqI, and 87-15/XmnI, respectively. Among the three polymorphic sites, calculated and observed heterozygosity rates of 87-1/BstNI and 87-15/XmnI were higher than those of 87-8/TaqI. The total informativeness in seven DMD families could be as high as 86% in our patient population.

**Conclusions :** By using three intragenic pERT probes, different genotypes could be determined and the heterozygosity was high enough to be effective in carrier diagnosis. The combined use of linkage analysis based on pERT RFLPs and deletion analysis by cDNA or rapid multiplex polymerase chain reaction can provide an improved method for carrier detection and prenatal diagnosis of DMD(Korean J Clin Pathol 1996;16(5):760~70).

**Key Words :** Duchenne muscular dystrophy, carrier diagnosis, RFLP

### 서 론

듀센형 근디스트로피(Duchenne Muscular Dystrophy:DMD)는 성 염색체에 의해 열성 유전되는 근육 질환으로서 외국에서는 3500-4000 명의 출생 남아중 1 명의 빈도로 발생한다[1]. 환아는 흔히 3-6세에 근육 쇠약증을 주소로 하는 임상증세가 나타나며 점차 진행되어 20세 이전에 거의 사망하는 치명적 질환이다[2]. 이러한 심각한 질환임에도 불구하고 현재는 특별한 치료책이 없기 때문에 환자 개인의 육체적 고통은 물론 주변 가족들의 정신적, 경제적 부담은 이루 형언할 수 없다. 따라서 현재로서의 최선의 방책은 사전 예방 조치이며 이는 정확한 환자의 진단하에 관련 가족들에서의 보인자 검색 및 산전진단을 통해서만이 가능하다. 다행히 최근 분자생물학적 기법이 발달되어 DNA 분석 법에 의한 보인자 및 산전진단이 가능하게 되었으며 이러한 DNA 분석법은 주로 X 성염색체 단위에 DMD 유전자 부위와 가까이 있는 유전자의 다형성 분석에 의한다. 이를 위하여 일찌기 Harper 등[3]은 멘델리안 반성 유전법칙에 의해 가계 유전상 연관성(linkage)이 관찰된 두 DNA 서열(XRC8 및 L1.28)에 대한 제한효소 단편 장다형(restriction fragment length polymorphism:RFLP) 분석을 통해 근육병 유전자형(genotype)을 추정할 수 있음을 보고한 바 있다. 그

후에도 여러 연구자들에 의해 유용한 RFLP 검색을 위한 DNA 탐식자(probe)의 개발이 계속되어 왔다[4-6]. 이 중에서도 DMD 유전자 부위내에 존재하여 약 4-6%의 recombination 빈도를 나타내는 pERT 87 시리즈 (DXS164: 87-1, 87-8, 87-15)의 유용성에 관한 보고가 가장 많다[7-11]. 이에 저자들은 정상 한국인에서의 heterozygosity 양상 및 대립유전자 비율을 조사하였으며 실제로 DMD 환자 가계에서 보인자의 검색 가능성을 관찰하여 보았다.

### 재료 및 방법

서로 혈연 관계가 없는 정상 한국인 남여(총 X 염색체 수: 51-78)를 대상으로 DMD 유전자내 탐식자(intragenic probe)인 3 종류의 pERT 시리즈(87-1, 87-8, 87-15)와 이를 위한 각각의 제한효소 BstNI, TaqI, 및 XmnI를 사용하여 DNA 제한효소 단편 장다형(Restriction Fragment Length Polymorphism:RFLP) 분석을 실시하였으며 이를 통해 각 유전자형의 대립인자 빈도(allele frequency)와 이형접합율(heterozygosity rate)을 조사하였다. 또한 연세의대 부속 영동세브란스 병원 재활의학과 및 근육병 재활연구소에 등록된 DMD 환자의 가계중 7 가계(가족수: 27 명)를 대상으로 하여 pERT 시리즈에 대한 유전자형을 추적 관찰하였다. 대상 가계의 DMD 환자는 모두 남자

## — 송경순 외 5인 : 듀센형 근디스트로피 보인자 진단 —

로서 각 가계당 1명이었으며 전형적인 DMD 입상증세와 함께 혈중 creatine kinase 치의 상승과 근전도 검사상 DMD에 일치되는 이상소견을 보았다.

Genomic DNA는 EDTA 항응고제를 사용한 말초혈액(10-20mL)으로부터 phenol/chloroform 법[12]을 이용하여 추출하였다. 약 10 $\mu$ g의 genomic DNA를 최적의 조건하에서 각종의 제한효소 (5 U/ $\mu$ g)로 분해 시킨 후 0.8-1.2% agarose gel에 20-30V로 약 18시간 동안 전기 영동시켰다. Ethidium bromide로 20분간 염색하여 자외선하에서 완전 분해상을 확인한 후 변성용액 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에 gel을 담가 천천히 흔들면서 45분간 방치시켰다. 증류수로 gel을 세척한 후 중화용액 (3M NaCl, 0.5M Tris-HCl; pH 7.2)에서 30분씩 두번 중화시켰다. 변성된 genomic DNA를 Southern blotting에 의해 20X SSC 용액에서 Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham)으로 이전시킨 후 membrane을 실온에서 건조시킨 다음 80°C에서 2시간 동안 방치하였다.

pERT 87 탐식자는 87-1, 8, 15 subclone들이 삽입된 plasmid vector를 보유한 *E. coli* HB101 host cell을 American Type Culture Collection (ATCC: Rockville, Maryland, USA)으로부터 구입하여 제조하였다. 즉, LB media에 subculture 한 다음 mini 제조법[13]으로 plasmid를 분리정제 하였다. Probe들을 삽입시킬 때 사용한 제한 효소로 잘라서 전기 영동 시킨 후 Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed Inc., Research Triangle Park, N.C. USA)를 이용하여 정제한 후 농도를 측정하였다. Probe들은 random primed DNA labelling kit (Boehringer Mannheim)를 이용하여 ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham)로 labelling 시킨 후 사용하였다.

Membrane을 전보합결합용액인 5X SSC, 1% SDS, 1X Denhardt's solution (Ficoll 400, polyvinylpyrrolidone, bovine serum albumin: 0.2 $\mu$  g/mL)에서 65°C로 1시간 이상 흔들어 준 다음 보합결합용액인 0.75M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.5mM EDTA, 1% SDS, 1X Denhardt's solution, 50 $\mu$ g/mL denatured salmon testes DNA (Sigma), denatured radiolabelled probe(Table 1)에 65°C에서 하룻밤 흔들면서 방치해 두었다. 용액을 모두 제거한 후 membrane을 상온에서 2X SSC, 0.1%

SDS 용액에 10분간 두번 세척하였다. 이어서 1X SSC, 0.1% SDS 용액에 65°C에서 30분간 1회 세척한 후 0.2X SSC, 0.1% SDS 용액에 65°C에서 10분간 1회 세척하였다. Membrane을 상온에서 건조시킨 후 랙으로 쓴 다음 Hyperfilm<sup>TM</sup>-MP film (Amersham)과 intensifying screen을 이용하여 -72°C에 24-48시간 보관 후 현상하여 결과를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. pERT 87-1/BstNI RFLP 분석 결과

서로 혈연관계가 없는 정상 한국인 남여 X 염색체 78개(남자 28명; 여자 25명)를 대상으로 하여 pERT 87-1/BstNI RFLP 분석을 한 결과 3.1 kb(p) 와 2.45/0.65 kb(q) 절편들이 공통 절편(constant band)인 0.7 kb와 함께 관찰되었으며, 각각 0.49와 0.51의 대립유전자 빈도를 나타내었다. 실제 대상에 포함된 정상 한국인 여자 25명 중 14명(56%)에서 두 대립인자를 모두 보유한 이형접합상태(heterozygosity) 임이 관찰되었으며 이론적 ( $p^2+2pq+q^2=1$ ) 계산에 의한 50%와 유사한 결과를 보였다(Table 2).

### 2. pERT 87-8/TaqI RFLP 분석 결과

서로 혈연관계가 없는 정상 한국인 남여 X 염색체 51개(남자 29명; 여자 11명)를 대상으로 하여 pERT 87-8/TaqI RFLP 분석을 한 결과, 공통 절편인 1.0kb 절편과 함께 2.7/1.10 kb(p) 와 3.80 kb(q) 절편들이 각각 0.31, 0.69의 대립유전자 빈도로 관찰되었다. 실제 대상에 포함된 정상 한국인 여자 11명 중 5명(45%)에서 두 대립인자를 모두 보유한 이형접합상태(heterozygosity) 임이 관찰되었으며 이론적 계산에 의한 43%와 유사한 결과를 보였다(Table 2).

### 3. pERT 87-15/XmnI RFLP 분석 결과

서로 혈연관계가 없는 정상 한국인 남여 X 염색체 61개(남자 25명; 여자 18명)를 대상으로 하여 pERT 87-15/XmnI RFLP 분석을 한 결과, 2.8 kb(p) 와 1.6/1.2 kb(q) 절편들이 각각 0.49, 0.51의 대립유전자 빈도로 관찰되었다. 실제 대상에 포함된 정상 한국인 여자 18명 중 12명(67%)에서 두 대립인자를 모두 보유한 이형접합상태(heterozygosity) 임이 관찰되었으며 이론적 계산에 의한

— 송경순 외 5인 : 뉴센형 근디스트로피 보인자 진단 —

Table 1. Characteristics of probes used in this study

Probe name	Size (kb)	ATCC No. Bact/ Phage DNA		Probe	RFLP enzyme	Polymorphic size
pERT87-1	1.25	59406	59407	Intragenic Xp DXS164	BstNI	3.10/2.45+0.65
pERT87-8	1.30	59408	59409	Intragenic Xp DXS164	TaqI	3.80/2.70+1.10
pERT87-15	1.50	59410	59411	Intragenic Xp DXS164	XmnI	2.80/1.60+1.20

Table 2. The pERT 87 polymorphisms of the Duchenne muscular dystrophy gene in Korean population

Polymorphisms	Allele length (kb)		Allele frequency		Heterozygosity (%)	
	p	q	p	q	calculated (n*)	observed (n**) (%)
pERT 87-1/BstNI	3.10	2.45+0.65	0.49	0.51	50 (78)	56 (14/25)
pERT 87-8/TaqI	2.70+1.10	3.80	0.31	0.69	43 (51)	45 (5/11)
pERT 87-15/XmnI	2.80	1.60+1.20	0.49	0.51	50 (61)	67 (12/18)

\* No. of X chromosomes calculated.

\*\* No. of heterozygotes/No. of females observed

50%에 비해 다소 높은 결과를 보였다(Table 2).

#### 4. DMD 환자 가계에서의 보인자 검색 결과

##### 1) 정보 제공율(informativeness)

DMD 환자가 속한 총 7 가계(남자 13명, 여자 14명)에서 보인자일 가능성이 있는 여자들을 중심으로 유전자 추적 분석을 실시한 결과, 5 가계(71%)에서 pERT 87-15/XmnI RFLP 분석에 의해 보인자 진단이 가능하였다. 나머지 2가계에 대해서 pERT 87-1/BstNI RFLP 과 pERT 87-8/TaqI RFLP 분석을 추가로 실시한 결과 1 가계에서도 역시 보인자 진단이 가능하였다.

결과적으로 pERT 87-15/XmnI, pERT 87-1/BstNI, pERT 87-8/TaqI RFLP 분석을 통한 보인자 진단은 7가계중 6가계에서 가능하여 86%의 정보제공율을 나타내었다. 그러나 나머지 1 가계에서는 세 유전자형의 다양성이 관찰되지 않아 보인자 진단에 유용한 정보를 얻을 수 없었다.

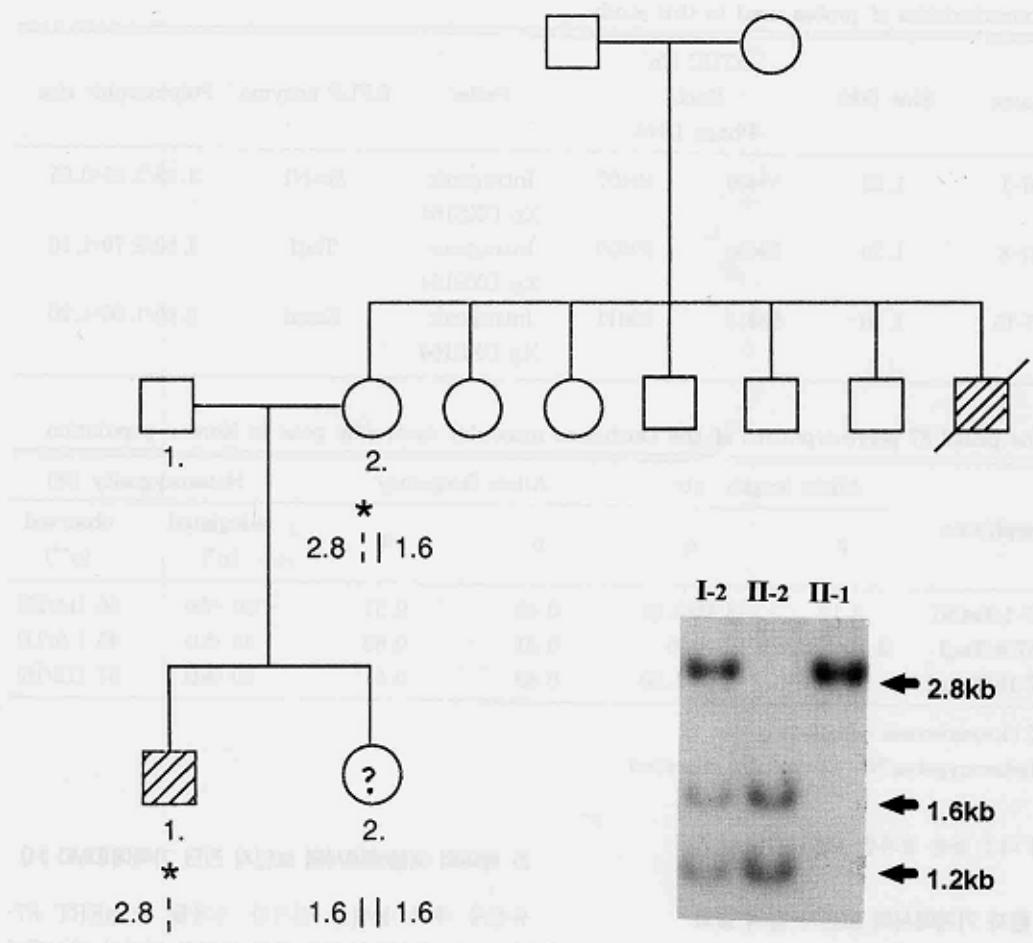
##### 2) 환아의 여동생에서의 보인자 진단 가족예(DMD #1)

유전자 추적 분석을 실시한 가계들 중 pERT 87-15/XmnI RFLP 분석을 통해 보인자 진단이 가능했던 가계도(DMD #1) 및 유전자형은 Fig. 1. 과 같다. 이 가계는 10세 DMD 남아(II-1)(혈청 creatine kinase 치: 12,662 IU/L)의 여동생에 대해 보인자 진단을 시도하였다. pERT 87-15/XmnI RFLP 분석을 실시한 결과 환아의 어머니는 p (2.8 kb) 및 q (1.6 kb+ 1.2 kb)의 두 대립유전자를 모두 갖는 heterozygote이며, II-1의 동일 대립 유전자 p (2.8 kb)를 보유한 것으로 나타나 보인자일 것으로 진단되었다. 한편 환아의 여동생 I-2는 환아 II-1에 전해진 대립 유전자 p (2.8 kb)와는 다른 q 대립 유전자(1.6 kb+ 1.2 kb)를 양 부모로부터 유전받은 것으로 나타나 보인자가 아닌 것으로 진단되었다(Fig. 1).

##### 3) 환아의 이모에서의 보인자 진단 가족예(DMD #2)

유전자 추적 분석을 실시한 가계들 중 pERT 87-

— 송경순 외 5인 : 듀센형 근디스트로피 보인자 진단 —

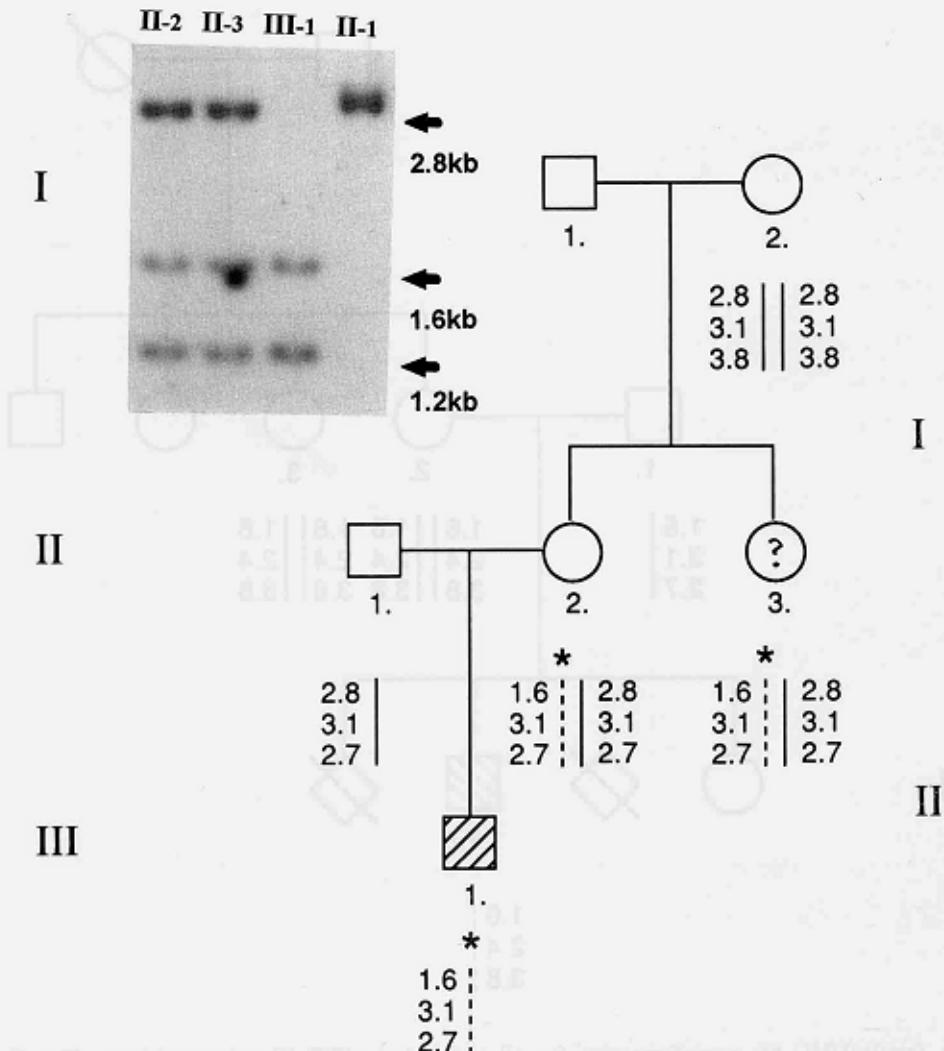


**Fig. 1.** A family(DMD #1) informative for carrier detection by the pERT 87-15/XmnI RFLP analysis. The X chromosome with the asterisk carries the Duchenne muscular dystrophy locus. Daughter II-2 is demonstrated to be a noncarrier.

15/XmnI RFLP 분석을 통해 보인자 진단이 가능했던 가계도(DMD #2) 및 유전자형은 Fig. 2. 와 같다. 그 결과, 환아의 어머니(II-2)와 이모(II-3)는 모두 p (2.8kb) 와 q (1.6 + 1.2 kb)의 두 대립 유전자를 갖는 heterozygote였으며, 이 중 q 대립 유전자가 환아의 X염색체에 유전되었음을 알 수 있다. 따라서 이모(II-3)는 보인자일 가능성이 높으므로 향후 임신을 할 경우 산전진단의 대상이 될 수 있겠다. 즉, 태아가 남자인 경우, 환아와 동일한 1.6 kb의 대립 유전자를 갖는지에 대한 RFLP 분석과 함께 환아에서 검색된 유전자

결손(deletion) 여부를 태아 혈액 또는 용모막 채취로 검사해 볼 수 있을 것이다. 그러나 이 가계에서 조모(I-2)의 두 X 염색체가 p/p homozygote로서 환아의 q 대립 유전자를 갖지 않은 것으로 나타났다. 따라서 멘델리안 유전법칙에 따른 세대간의 유전분리 전달 상태를 보다 정확하게 분석하기 위하여 이 가계에 대해 pERT 87-1/BstN I RFLP 와 pERT 87-8/Taq I RFLP 분석을 추가로 실시하였다. 그 결과, I-2는 두 유전자형이 각각 3.1 kb, 3.8 kb로서 모두 homozygosity 상태이었으며, II-2와 II-3은 두 유전자형이 서

— 송경순 외 5인 : 듀센형 근디스트로피 보인자 진단 —



**Fig. 2.** A family (DMD #2) with a possible carrier (II-3) whose X chromosome with the asterisk was not inherited from the maternal grandmother.

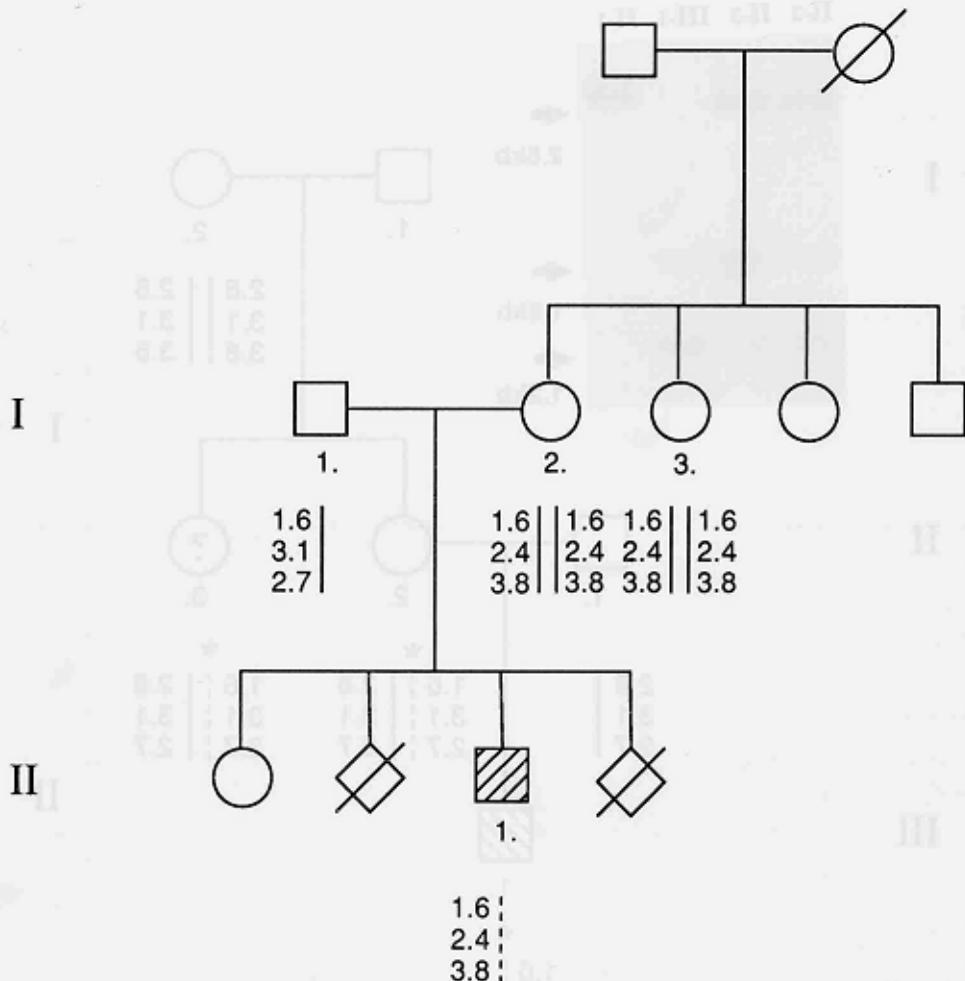
로 같은 3.1; 2.7 kb 로서 I-2의 두 X 염색체 중 어느 것도 II-2 혹은 II-3에 전해지지 않은 것으로 보여진다. 이는 II세대에서부터 자발적으로 발생한 새로운 돌연변이 상태이거나 germline mosaicism의 가능성성을 나타내었다.

#### 4) 보인자 진단이 불가능하였던 가족에 (DMD #3)

유전자 추적 분석을 실시한 가계들 pERT 87 RFLP 분석으로 보인자 진단이 불가능했던 가계도 (DMD #3)

및 유전자형은 Fig. 3과 같다. 이 가계는 환아의 이모인 I-3에 대해 보인자 진단을 시도하였으나 환아의 어머니(I-2)와 이모(I-3)가 3종의 pERT 87 RFLPs 분석 결과, 모두 homozygote 으로서 두 X 염색체 중 어느 것이 환아(II-1)에 전해졌는지 알 수가 없었다. 따라서 본 연구에 포함되지 않은 다른 제한효소를 사용하여 추가적으로 pERT 87-1/Xmn I, pERT 87-8/BstN I, pERT 87-15/Taq I에 대해서도 RFLP 분석을 시행하였으나 모두 마찬가지로 homozygosity를 나타내

— 송경순 외 5인 : 듀센형 근디스트로피 보인자 진단 —



**Fig. 3.** A family(DMD #3) noninformative for all the tested pERT 87 polymorphisms. The X chromosomes of I-2 and I-3 could not be differentiated from one another by RFLPs studied owing to the homozygosities.

어 noninformativeness 결과를 보였다.

### 고 찰

듀센형 근디스트로피 (Duchenne muscular dystrophy:DMD)는 비교적 흔한 유전 질환으로서 효과적인 치료법이 없기 때문에 현재로서는 산전 진단을 통한 예방이 최선의 방법이다. 이를 위하여 DMD cDNA 와 genomic clone을 이용한 보인자 검색에 관한 많은 연

구가 계속되고 있다. 보인자 진단을 위한 탐색 지표중에는 여러 종류가 있으나(3, 14-16), X 성 염색체 (Xp21.2)의 dystrophin 유전자 위치에 위치하는 intragenic probe인 pERT 87-1, 87-8, 87-15와 4종류의 제한효소 (BstN I, BstX I, Taq I, Xmn I)를 이용한 RFLP 분석이 가장 보편화된 방법이다(11). 이 중, 본 연구에서는 우선적으로 pERT 87-1/BstNI, pERT 87-8/TaqI, pERT 87-15/XmnI 을 선택하여 정상 한국인에서의 대립유전자의 빈도와 heterozygos-

— 송경순 외 5인 : 듀셸형 근디스트로피 보인자 진단 —

**Table 3.** Comparison of allelic frequencies of Duchenne muscular dystrophy gene by the restriction fragment length polymorphism analysis using pERT 87 probes between Koreans and Caucasians

Polymorphisms	Allele length(kb)	Allele frequency		
		Koreans	Chinese*	Caucasians**
pERT 87-1/BstNI	3.10	0.49	0.53	0.67
	2.45+0.65	0.51	0.47	0.33
pERT 87-8/TaqI	3.80	0.69	0.62	0.31
	2.70+1.10	0.31	0.38	0.69
pERT 87-15/XmnI	2.80	0.49	0.52	0.46
	1.60+1.20	0.51	0.48	0.54

\* Data from reference (28)

\*\* Data from reference (11)

ity 빈도를 조사하고자 하였다.

그 결과, 정상 한국인에서 발견된 대립 유전자의 다형성은 Caucasian의 경우와 비교하여 유사한 다형성을 나타내었으나 대립유전자 빈도에 있어서는 다소 차이를 보였다(Table 3). 즉, 세 종류의 다형성 중 pERT 87-1/BstNI의 경우, Caucasian에서는 restriction site의 보유자에 비해 비보유자가 많은 반면 한국인의 경우는 거의 비슷한 비율이었다. 또한 pERT 87-8/TaqI의 경우, Caucasian에서는 restriction site의 비보유자에 비해 보유자가 많은 반면 한국인의 경우는 이와 반대로 restriction site 보유자보다는 비보유자의 수가 많음을 알 수 있었다. 그러나 pERT 87-15/XmnI의 경우에는 대립인자 비율이 거의 반반으로 동일하였다(11).

따라서 이 세 다형성에 따른 linkage analysis의 유용성은 외국의 경우와 마찬가지로 DMD 가계에 실질적인 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 특히 세 다형성 중에서도 pERT 87-15/XmnI의 경우에는 실제 여자에서 관찰된 heterozygosity 빈도가 다른 탐색자(pERT 87-1/BstNI, pERT 87-8/TaqI)의 45-56%에 비해 67%로 높아 우선적으로 적용시킬 수 있을 것으로 생각된다. 이는 DMD 환자가 속한 7 가계를 포함시킨 본 연구 결과, 5 가계(71%)에서 이 탐색자를 이용한 보인자 검색이 가능함을 확인할 수 있었다. 따라서 보인자 진단을 위하여 우선적으로 이 탐색자를 적용시킨 후 homozygote로서 noninformativeness에 해당 할 경우 2차적으로 pERT 87-1/BstNI, pERT 87-8/TaqI 을 적용함이 바람직하겠다.

한편 이러한 intragenic probe를 환자에게 적용하는 경우 5-8%에서는 유전자 결손이(deletion)이 발견되는 것으로 보고(17) 된 바 있어 향후 homozygosity를 나타내는 DMD 가계의 여자에서 hybridization band의 강도(intensity)를 관찰함으로써 보인자 여부를 추가적으로 진단할 수도 있을 것으로 생각된다. 즉 정량적 Southern blot 분석으로 gene dosage를 파악하여 강도가 50%로 감소한 경우에도 보인자 진단이 가능하나(18), 본 연구에서 다형성 분석이 도움이 되지 않았던 가계(DMD #3)의 경우는 이에 해당되지 않았다. 최근에는 간단한 증합효소연쇄반응(polymerase chain reaction:PCR)으로 DMD 환자에서 결손 검색율이 약 60%(19, 20)에 달하므로 결손이 확인된 환자에서의 보인자 검색에서도 PCR 산물의 dosage 분석(21)을 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

이와같이 몇가지 DNA 다형성 분석이나 dosage 분석이 산전 진단을 위한 보인자 검색에 유용한 것은 사실이나 DMD 유전자가 매우 크기 때문에 해당 유전자 부위에서의 crossover가 가능하므로 진단적 오류의 발생 소지가 있음을 주의해야 하며(12) 이러한 유전자내 재조합율(intragenic recombination rate)은 약 5%로 보고된 바 있다(22). 이외에도 다형성 분석을 통한 보인자 검색의 제한점으로는 가족 구성원 결여 상태나 환자에서의 새로운 돌연변이(new mutation)의 경우가 있다(21). 실제로 DMD 환자의 약 1/3은 가족력이 없이 환자에서만 독립적(isolated case)로서 이환되는 것으로 보고된(23) 바 있어 유전상담시 아직도 당면 문

## — 송경순 외 5인 : 뉴센형 근디스트로피 보인자 진단 —

제로 남아있다. 본 연구에서도 Fig. 2의 DMD #2 가계에서는 환아이외의 가족에는 DMD 환자가 없어 sporadic mutation의 가능성성이 높기 때문에 보인자의 소견에 합당한 환아의 이모(II-3)에서의 산전진단에 대한 필요성에 관하여는 논란의 여지가 있겠다. 1990년 Clastres(24)는 특이한 유전 양상을 나타내는 한 DMD 가계에서 환아의 부모가 환자와는 달리 정상적 RFLP 양상이나 외할아버지로부터 유래된 germinal mosaicism 일을 관찰 보고한 바 있다. 이러한 familial DMD 외에도 많은 sporadic case에서의 germline mosaicism에 관한 보고(25-27)가 있는 데, 한국인 DMD 가계에서도 다수가 이에 해당할 것으로 추측되므로 향후 이에 대한 별도의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 요약

**배경 :** 뉴센형 근디스트로피은 X 염색체 열성으로 유전되는 질환으로서, 탐식자를 이용하여 제한효소 단편 장다형(RFLP)을 관찰할 수 있다. 이러한 제한효소 단편 장다형(RFLP)은 인접한 유전자와 함께 유전되므로 보인자를 진단하는데 유용하게 사용할 수 있다.

**방법 :** 총 7 가계의 27명을 대상으로 하였으며, 친척이 아닌 사람들로부터 얻은 말초혈액에서 X 염색체의 51-78 위치를 분석하였다. DNA는 말초혈액의 백혈구에서 추출하였으며, 각각 BstNI, TaqI, XmnI RFLP를 관찰할 수 있는 pERT 탐식자(87-1, 87-8, 87-15)를 사용하여 제한효소 단편 장다형을 분석하였다. 진단적 유용성과 연관성 분석을 위해 대립인자 빈도와 이형접합율을 계산하였다.

**결과 :** 3개의 유전자내 pERT 탐식자에 의한 대립인자 빈도는 87-1/BstNI, 87-8/TaqI 그리고 87-15/XmnI 사이에서 각각 0.49/0.51, 0.69/0.31, 0.49/0.51이었다. 3개의 다형성 위치에서 계산된 결과 87-1/BstNI와 87-15/XmnI의 이형접합율이 87-8/TaqI 보다 높은 수치를 보였다. 일곱 뉴센형 근디스트로피 가계에서 전체 정보 제공율은 86% 정도로 높았다.

**결론 :** 3개의 유전자내 pERT 탐식자를 이용하여 상이한 유전자형을 알 수 있었으며, 보인자를 진단할 수 있을 정도의 충분히 높은 이형접합성을 관찰할 수 있었다. pERT RFLP에 기초한 연관성 분석과 cDNA 또

는 rapid multiplex PCR에 의한 유전자 결손 분석을 통해 보인자 발견은 물론 뉴센형 근디스트로피의 산전 진단에 도움을 줄 수 있다.

### 참고문헌

- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel L. Dystrophin : The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cells* 1987; 51:919-28.
- Emery AEH. Muscle histology and creatine kinase levels in the fetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1977;31:472-3.
- Harper PS, O'brien T, Murray JM, Davies KE, Pearson P, Williamson R. The use of linked DNA polymorphisms for genotype prediction in families with Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1983;20:252-4.
- Hofker MH, Wapenaar MC, Goor N, Bakker E, van Ommen GJB, Pearson PL. Isolation of probes detecting restriction fragment length polymorphisms from X chromosome-specific libraries: potential use for diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1985;70:148-56.
- Francke U, Ochs HD, de Martinville B, Giacalone J, Lindgren V, Disteché C, et al. Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am J Hum Genet* 1985;37:250-67.
- Hejtmancik JF, Harris SG, Tsao CC, Ward PA, Caskey CT. Carrier diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using restriction fragment length polymorphisms. *Neurology* 1986;36:1553-62.
- Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldridge J, Fischbeck KH, et al. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature*

— 송경순 외 5인 : 뉴센형 근디스트로피 보인자 진단 —

- 1985;316:842-5.
8. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986;323:646-50.
  9. Fischbeck KH, Ritter AW, Tirschwell, Kunkel LM, Monaco AP, Hejtmancik JF. Recombination with PERT87(DXS164) in families with X-linked muscular dystrophy. *Lancet* 1986;ii:104.
  10. Lanman JT, Pericak-Vance MA, Bartlett RJ, Chen JC, Yamaoka L, Koh J, et al. Familial inheritance of DXS164 deletion mutation from a heterozygous female. *Am J Hum Genet* 1987;41:138-44.
  11. Katayama S, Montano M, Slotnick N, Lebo RV, Golbus MS. Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy by restriction fragment length polymorphism analysis with pERT 87 deoxyribonucleic acid probes. *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:548-55.
  12. Darras BT, Harper JF, Francke U. Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1987;316:985-92.
  13. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co., New York, 1986, pp 102-4.
  14. Davis KE, Pearson PL, Harper PS. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res* 1983;11: 2303-12.
  15. Harper PS. DNA markers and Duchenne muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 1984; 59:195-6.
  16. Wieacker P, Davies K, Pearson P, Ropers HH. Carrier detection in Duchenne muscu-
  - lar dystrophy by use of cloned DNA sequences. *Lancet* 1983;1:1325-6.
  17. Forrest SM, Cross GS, Flint T, Speer A, Robson KJH, Davies KE. Further studies of gene deletion that cause Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Genomics* 1988;2:109-14.
  18. Darras BT, Koenig M, Kunkel LM, Francke U. Direct method for prenatal diagnosis and carrier detection in Duchenne/Becker muscular dystrophy using the entire dystrophin cDNA. *Am J Med Genet* 1988;29:713-26.
  19. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy(DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-17.
  20. Baumbach LL, chamberlain JS, Ward PA, Fairwell NJ, Caskey CT. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 1989;39:465-74.
  21. Prior TW, Papp AC, Snyder P, Highsmith Jr. WE, Friedman KJ, Perry TR, et al. Determination of carrier status in Duchenne and Becker muscular dystrophies by quantitative polymerase chain reaction and allele specific oligonucleotides. *Clin Chem* 1990;36:2113-7.
  22. Bartlett RJ, Pericak-Vance MA, Koh J, Yamaoka LH, Chen JC, Hung WY, et al. Duchenne muscular dystrophy: High frequency of deletion. *Neurology* 1988;38:1-4.
  23. Boelter WD, Burt BA, Spector EB, Hinton DR, Pavlova Z, Fujimoto A. Dystrophin protein and RFLP analysis for fetal diagnosis and carrier confirmation of Duchenne muscular dystrophy. *Prenatal Diag* 1990;10:703-15.

— 송경순 외 5인 : 듀센형 근디스트로파 보인자 진단 —

24. Claustres M, Kjellberg P, Desgeorges M, Bellet H, Demaille J. Germinal mosaicism from grand-paternal origin in a family with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1990;86:241-3.
25. Darras BT, Blattner P, Harper JF, Spiro AJ, Alter S, Francke U. Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy(DMD)/Becker muscular dystrophy(BMD) families studies with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglII exon containing fragments maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. *Am J Hum Genet* 1988;43:620-9.
26. Wood S, McGillivray BC. Germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 1988;78:282-4.
27. Francke U, Darras BT, Hersh JH, Berg BO, Miller RG. Brother/sister pairs affected with early-onset, progressive muscular dystrophy: molecular studies reveal etiologic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1989;45:63-72.
28. Soong BW, Tsai TF, Su CH, KAo KP, Hsiao KJ, Su TS. DNA polymorphisms and deletion analysis of the Duchenne-Becker muscular dystrophy gene in the Chinese. *Am J Med Genet* 1991;38:593-600.