

## A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용

계명대학교 의과대학 임상병리학교실, 동국대학교 임상병리학교실\*

경북대학교 의과대학 소아과학교실\*\*, 영남대학교 의과대학 내과학교실\*\*\*, 대구의료원\*\*\*\*

전효진 · 박현찬 · 김재룡 · 전동석 · 하경임\* · 이건수\*\* · 현명수\*\*\* · 김영식\*\*\*\*

### =Abstract =

### Application of Polymerase Chain Reaction in Hemophilia A

Hyo Jin Chun, M.D., Hean Chan Park, M.D., Jaë Ryong Kim, M.D.,

Dong Seok Jeon, M.D., Gyoung Yim Ha, M.D.\* , Kun Soo Lee, M.D. \*\*

Myung Soo Hyun, M.D. \*\*\* , Young Sik Kim, M.D. \*\*\*\*

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Keimyung University, Taegu,

Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Dongguk University\*, Kyeongju,

Department of Pediatrics, College of Medicine, Kyungpook University\*\*, Taegu,

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Youngnam University\*\*\*, Taegu,

Department of Family Medicine, Taegu Medical Center\*\*\*\*, Taegu, Korea

**Background :** The polymerase chain reaction(PCR) which is used for the analysis of restriction fragment length polymorphism(RFLP) in the factor VIII gene and prenatal sex determination, is thought to be a useful tool for the diagnosis of hemophilia A. And thus, for carrier detection and prenatal diagnosis in hemophilia A, we attempted a trial of application of PCR to analysis of *Xba*- and *Bcl*-RFLP in the factor VIII gene and to amplify the sequence specific for Y-chromosome.

**Methods :** The samples were composed of peripheral blood from 120 kindreds(46 males and 64 females including 41 hemophilic patients) of hemophilia A families. In the PCR of *Bcl*-RFLP, oligonucleotide pairs for intron 18 in factor VIII gene were used as primers. After digestion of 142 bp amplified products with *Bcl*, two alleles were identified by neg-

〈접수 : 1995년 4월 3일〉

〈수정본 접수 : 1995년 5월 25일〉

\*교신저자 : 전효진

대구시 중구 동산동 194번지

계명의대 동산의료원 임상병리과(전화 : 053-250-7266)

## — 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용 —

ative allele(142 bp) and positive allele(99 and 43 bp). In the PCR of *Xba*I-RFLP, oligonucleotide pairs for intron 22 in factor VIII gene were used as primers. After digestion of 96 bp amplified products with *Xba*I, two alleles were identified negative allele(96 bp) and positive allele(68 and 28 bp). In the PCR of sequence specific for Y chromosome, the samples composed of 27 amniotic fluids and 9 abortus of which sex was determined by chromosome analysis, were amplified using Y1.0 and Y2.0 primers.

**Results :** Frequencies of *Bcl*I negative allele and *Bcl*I positive allele were 18.0% and 82.0% respectively, and female heterozygosity rate was 36.5%. Frequencies of *Xba*I negative allele and *Bcl*I positive allele were 63.5% and 36.5% respectively, and female heterozygosity rate was 51.1%. It was shown that among 72 females tested 54(75.0%) were heterozygote *Bcl*I- and/or *Xba*I-RFLP. In the PCR of sequence specific for Y chromosome for evaluation of prenatal sex determination, amplified products of 154 bp fragments were detected in all 18 amniotic fluids and fetal tissues of which karyotypes were confirmed as male by cytogenetic method.

**Conclusions :** These results suggested that the PCR-based analysis of the *Bcl*I- and the *Xba*I-RFLP, and sex determination provides very useful tools for carrier detection and prenatal diagnosis in hemophilia A [Korean J Clin Pathol 1995;15(3):341~52].

**Key Words :** PCR, Hemophilia A, factor VIII gene, RFLP, Y-specific repeat

## 서 론

A형 혈우병은 남자 약 만명당 한명에서 발생하는 반성 염성유전질환(X-linked recessive disorder)으로서 제8 혈액응고인자 유전자의 결손에 따른 혈액응고장애가 그 원인이며 제8혈액응고인자를 투여함으로써 교정이 가능하다[1-3]. 그러나 제8혈액응고인자의 투여는 혈액을 통한 후천성면역결핍증등 바이러스 질환을 전염시킬 위험이 있고 제8혈액응고인자 역제인자의 생성으로 인한 치료의 실패가 초래될 수 있으므로, 보인자의 검색 및 혈우병 태아의 산전진단을 통한 예방이 중요시 된다.

A형 혈우병 진단방법으로 제8혈액응고인자 활성도 (factor VIII procoagulant activity), 제8혈액응고인자 항원 (factor VIII antigen)을 검사하는 표현형 분석 (phenotypic analysis)이 있으나, 보인자중 6-20%는 검색이 불가능하고, 산전진단을 위해서는 많은 양의 태아 혈액이 요구되므로 임신 초기에는 검사가 불가능하다 [3,4]. 따라서 보다 정확하고 신속한 진단방법으로서 DNA 분석을 통한 유전형 분석(genotypic analysis)이

시도되고 있는데, 제8혈액응고인자 유전자내의 또는 외의 DNA의 다형성을 조사하는 유전적 관련성 분석 (genetic linkage analysis)이 임상적인 유용성이 높은 것으로 보고되고 있다[5-15]. PCR에 의한 *Bcl*I RFLP[7-11], *Xba*I RFLP[11] 및 (CA)<sub>n</sub> repeat VNTR[14, 15] 등의 제8혈액응고인자 DNA 다형성 분석은 유전질환의 조기 진단이 가능하고 정보제공률이 높다고 평가되고 있으며, Peake[13]에 의하면 인종에 따라 각 DNA 다형성의 대립형질 빈도 및 진단적 유의성에 차이가 있다고 하였으므로 인종에 따른 독립적인 연구가 필요하다고 사료된다.

이에 저자는 한국인의 A형 혈우병의 유전형 분석에 위한 진단체계를 확립하기 위한 노력의 일환으로, PCR을 이용하여 혈우병환자 및 그 가계구성원의 *Bcl*I 및 *Xba*I RFLP의 각 대립형질의 빈도를 조사하여 A형 혈우병의 산전진단 및 보인자검색의 기초자료로 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

PCR을 이용한 *Bcl*I RFLP와 *Xba*I RFLP 분석을 위하여 경북대학교 병원, 영남대학교 병원 및 계명대학교

### — 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 종합효소연쇄반응의 응용 —

병원 등 대구지역 3개 대학병원에 등록된 41예의 A형 혈우병 가족 구성원 120명(41명의 혈우병환자를 포함한 남자 46명과 여자 74명)의 말초혈액을 대상으로 하였으며, 또한 PCR에 의한 태아 성감별을 위하여 염색체 이상이 의심되어 염색체검사를 의뢰한 27예의 양수 및 9예의 유산태아를 대상으로 하였다.

PCR을 위한 검체의 전처치로 말초혈액은 해파린이 포함된 주사기에 3~5 mL를 채취하여 Ficoll-Hypaque(SG 1.077, Sigma사, 미국)용액으로 단핵구를 분리하였고, 양수 및 유산태아는 RPMI-1640 배지(Gibco사, 미국)로 세척한 다음 DNA를 분리하기 직전까지 -20°C에 보관하였다[16, 17]. 검체로부터 DNA분리는 Chaotropic-agent silica법[18]에 준하였으며, 적절한 DNA분리 유무를 확인하기 위하여  $\beta$ -globin 유전자의 PCR은 다음과 같은 조건으로 실시하였다[19]. PCR에 사용한 장비는 hot-air thermocycler인 FTC-2000(대한메디칼(주), 한국)을 이용하였으며, 반응용기는 모세관(10  $\mu$ L volume at 2 inch, Idaho사, 미국)을 사용하였다[20]. 반응혼합물은 1  $\mu$ L의 피검자 DNA를 가하여 10  $\mu$ L가 되도록 하여 각각 0.5  $\mu$ M의 시발체 PC04 및 GH20, 0.5 units의 Taq polymerase(Promega사, 미국), 500 mM Tris-HCl(pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ g/mL 우혈청알부민(Sigma사, 미국)과 각각 0.2 mM의 dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)가 함유되도록 하였다. 반응혼합물을 모세관에 주입하여 불꽃으로 양기를 봉한 다음, 94 °C에서 10초간 pre-denaturation을 실시하고 denaturation(94°C, 1초)-annealing(55°C, 1초)-elongation(72°C, 20초) 과정을 40회 반복한 다음 post-elongation을 72°C에서 20초간 실시하였다. 증폭산물 10  $\mu$ L를 취하여 전기영동을 실시한 후 268 bp DNA의 증폭 유무를 확인하였다. 이때 DNA size marker로는 100 bp DNA ladder(Gibco사, 미국)를 사용하였다.

제8혈액용고인자 유전자의 *BcII* 부위의 PCR은 각각 0.5  $\mu$ M의 시발체 8.1(5'-TAA AAG CTT TAA ATG GTC TAG GC-3')과 8.2(5'-TTC GAA TTC TGA AAT TAT CTT GTT C-3')를 사용하여  $\beta$ -globin 유전자의 PCR과 동일한 조건에서 실시하여 142 bp의 DNA 증폭유무를 확인하였다[21]. *BcII* RFLP를 분석하기 위하여 반응혼합물은 5  $\mu$ L의 증폭산물을 가하여 30  $\mu$ L가 되도록 하여 각각 5 mM의 NaCl, 1 mM Tris-HCl(pH 7.9), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT(Gibco사, 미국)와

1 unit의 *BcII* 제한효소(Kosco사, 한국)가 함유되도록 하여 55°C에서 2시간 반응시킨 후 전기영동하여 *BcII* RFLP를 관찰하였다.

제8혈액용고인자 유전자의 intron 22 영역의 *XbaI* 부위의 PCR은 각각 0.5  $\mu$ M의 시발체 7.1(5'-CAC GAG CTC TCC ATC TGA ACA TG-3')과 7.10(5'-GGG CTG CAG GGG GGG GGG ACA ACA G-3')을 사용하여, 47.5°C에서 1초간 실시하는 annealing 과정을 제외한 기타의 과정은 *BcII* 유전자의 PCR과 동일한 조건에서 실시하고, 96 bp 크기의 *XbaI* 부위의 PCR 증폭산물을 확인하였다. *XbaI* RFLP를 분석은 반응혼합물이 5  $\mu$ L의 증폭산물을 가하여 30  $\mu$ L가 되도록 하여 각각 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl(pH 7.9), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT와 5 units의 *XbaI* 제한효소를 가하여 37.5 °C에서 12시간 반응시켰으며, 전기영동하여 *XbaI* RFLP를 관찰하였다.

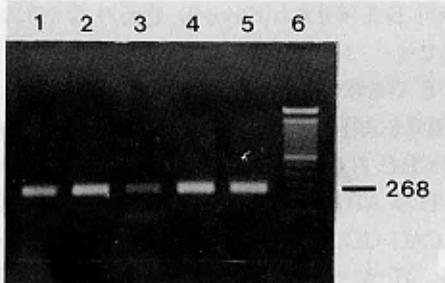
태아의 성감별을 위한 염색체검사는 Rooney등[22]의 방법에 준하였으며, 이 등[23]의 방법으로 표본슬라이드를 제작하여 김 등[24]의 방법으로 trypsin 처리없이 Wright 염색액으로 G-분열을 실시하였다. 결과의 판독은 염색체 명명 국제위원회(international committee for chromosomal nomenclature, ISCN)의 기준에 따라 20개 이상의 중기세포를 관찰하여 3개 이상의 동일한 수적 이상이나 2개 이상의 구조적 이상이 있는 경우 클론성 변화로 인정하였다. 또한 Y-specific repeat의 PCR은 각각 0.5  $\mu$ M의 시발체 Y1.1(5'-TOC ACT TTA TTC CAG GGC TGT CC-3')과 Y1.2(5'-TTG AAT GGA ATG GGA ACG AAT GG-3')를 사용하여, *BcII* 유전자의 PCR과 동일한 조건에서 실시하여 154 bp 크기의 PCR 증폭물을 확인하였다.

### 결 과

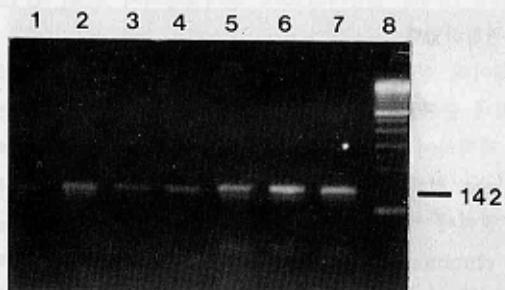
Chaotropic agent-silica법에 의한 DNA 분리효율을 확인하기 위하여  $\beta$ -globin 유전자의 PCR을 실시한 결과, 말초혈액 120예와 양수 및 유산태아 36예 모두에서 268 bp의 DNA 띠를 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

*BcII* RFLP 분석 결과 142 bp의 절단점이 없는 대립인자(negative allele, 이하 *BcII*(-))와 99 bp와 43 bp로 절단된 대립인자(positive allele, 이하 *BcII*(+))가 관찰되었다(Fig. 2, 3). 두 대립인자의 발현빈도를 보면 혈우병

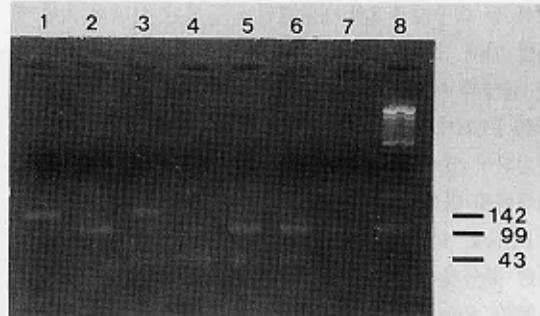
— 천호진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 종합효소연쇄반응의 응용 —



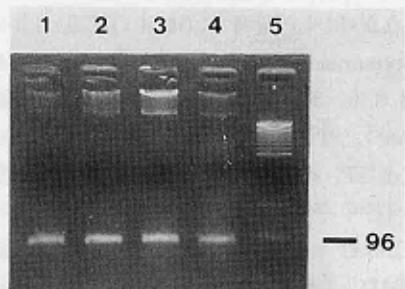
**Fig. 1.** Gel electrophoresis of the PCR products of  $\beta$ -globin gene. Lane 1 to 5: 268 bp PCR products from various hemophiliac blood, lane 6: DNA size marker (repeats of a 100 bp DNA).



**Fig. 2.** Gel electrophoresis of the PCR products of  $BclI$  site in intron 18 of factor VIII gene. Lane 1 to 7: 142 bp PCR products from various hemophiliac blood, lane 8: DNA size marker(repeats of a 100 bp DNA).



**Fig. 3.** Gel electrophoresis of the digested PCR products with  $BclI$ . Lane 1: 142 bp DNA from male with  $BclI$  negative allele, lane 2: 99 and 43 bp DNAs from male with  $BclI$  positive allele, lane 3: 142, 99 and 43 bp DNAs from female heterozygote with both  $BclI$  alleles, 4. lane 4-7: 142 bp DNA from female homozygote with  $BclI$  negative alleles, lane 8: DNA size marker(repeats of a 100bp DNA).



**Fig. 4.** Gel electrophoresis of the PCR products of  $XbaI$  site in intron 22 of factor VIII gene. Lane 1 to 4: 96 bp PCR products from various hemophiliac blood, lane 5: DNA size marker(repeats of a 100bp DNA).

**Table 1.** Allele frequency of  $BclI$  RFLP

No. of chromosomes	No. of alleles		Heterozygosity
	Positive	Negative	
194	159(82.0)	35(18.0)	27/74(36.5)

\* Numbers in parenthesis are percentage.

가계 구성원 120명(남자 46명, 여자 74명)의 총 194개의 X-염색체중  $BclI(+)$ 은 159개(82.0%)였고  $BclI(-)$ 은 35개(18.0%)였다. 74명의 여자중 이형접합체를 보유한 예는 27명(36.5%)이었다(Table 1).

$XbaI$  RFLP 분석 결과 96 bp의 절단점이 없는 대립

인자(negative allele, 이하  $XbaI(-)$ )와 68 bp와 28 bp로 절단된 대립인자(positive allele, 이하  $XbaI(+)$ )가 판찰되었다(Fig. 4, 5).  $XbaI$  RFLP 분석을 시도한 120명의 피검자중 PCR에서 약한 증폭을 보였던 3예(남자 1명, 여자 2명)는 결과의 판독이 불가능하여 조사대상에서 제외시켰으며, 조사가 가능하였던 117명의 피검자(남자 45

— 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용 —

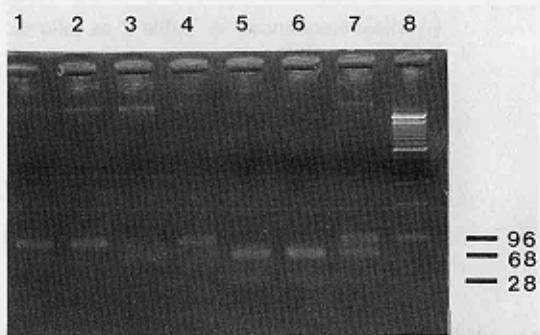
명, 여자 72명)에 대한 대립인자의 발현빈도를 보면 총 189개의 X-염색체중 *Xba*I(+)은 69개 (36.5%)였고 *Bcl*I(-)은 120개 (63.5%)였으며, 72명의 여자중 이형접합체를 보유한 예는 44명 (61.1%)이었다 (Table 2).

*Bcl*I 및 *Xba*I RFLP의 각 haplotype들의 빈도를 보면 *Bcl*I(+)/*Xba*I(+)의 빈도는 혈우병가족 구성원을 대상으로 조사가 가능하였던 107명의 과검자(남자 42명, 여자 65명)의 총 172개의 X-염색체중 57개 (33.1%)였으며, Table 1과 2에서 계산된 수치는 30.0%였다. *Bcl*I(+)/*Xba*I(-)의 빈도는 86개 (50.0%), 계산된 수치는 52.0%였다. *Bcl*I(-)/*Xba*I(+)의 빈도는 5개 (2.9%), 계산된 수치는 6.6%였다. *Bcl*I(-)/*Xba*I(-)의 빈도는 24개

(33.1%), 계산된 수치는 11.4%였다 (Table 3).

Y-specific repeat에 대한 PCR을 실시한 결과, 36예의 양수 및 유산태아중 염색체검사 결과 Y-염색체가 발견된 18예 모두에서 양성반응을 보였으며, Y-염색체를 발견할 수 없었던 2예의 유산태아에서 154 bp의 DNA의 증폭이 관찰되었다 (Fig. 6., Table 4).

*Bcl*I RFLP 및 *Xba*I RFLP를 분석한 결과 여성이 이형접합체인 경우 즉 다형성분석에 의한 진단제공율(diagnostic yield)을 보면 (A형 혈우병 보인자인 여성이 조사하고자하는 RFLP에 대해 이형접합체일 경우에 유전적 관련성 분석에 의한 혈우병의 보인자검색 및 산전진단이 가능하므로, 각 RFLP의 여성의 이형접합체 보유빈도는 각 RFLP의 진단제공율과 동일함) *Bcl*I RFLP 분석만을 실시한 경우 Table 1에서 계산된 수치는 31.3%였으며 실측치는 37.0%였으며, *Xba*I RFLP 분석만을 실시한



**Fig. 5.** Gel electrophoresis of the digested PCR products with *Xba*I. Lane 1 and 2: 96 bp DNA from male with *Xba*I negative allele, lane 4: 96 bp DNA from female homozygote with *Xba*I negative alleles, lane 5: 68 and 28 bp DNAs from male with *Xba*I positive allele, lane 6: 68 and 28 bp DNAs from female homozygote with *Xba*I positive alleles, lane 7: 96, 68 and 28 bp DNAs from female heterozygote with both *Xba*I alleles, lane 8: DNA size marker (repeats of a 100bp DNA).

**Table 2.** Allele frequency of *Xba*I RFLP

No. of chromosomes	No. of alleles		Heterozygosity
	Positive	Negative	
189	69(36.5)	120(63.5)	44/72(61.1)

\* Numbers in parenthesis are percentage

**Table 3.** Distribution of the *Bcl*I and *Xba*I RFLP haplotypes

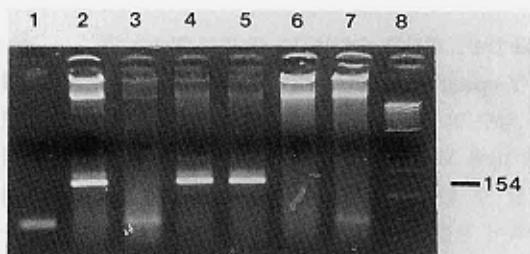
Haplotype	Number	%	Calculated %@
<i>Bcl</i> I(+)/ <i>Xba</i> I(+)	57	33.1	30.0
<i>Bcl</i> I(+)/ <i>Xba</i> I(-)	86	50.0	52.0
<i>Bcl</i> I(-)/ <i>Xba</i> I(+)	5	2.9	6.6
<i>Bcl</i> I(-)/ <i>Xba</i> I(-)	24	14.0	11.4
Total	172	100.0	100.0

@Calculated from frequency of each *Bcl*I and *Xba*I allele in Table 1 and 2 as  $2pq \times 100$  e.g. for the *Bcl*I(+)/*Xba*I(+) the rate was  $2 \times 0.820 \times 0.365 = 30.0\%$ . These represent the distribution expected in the absence of linkage disequilibrium.

**Table 4.** Comparison of fetal sexing by PCR of Y-specific sequences with cytogenetic study

Results of cytogenetic study	No. of alleles		Total
	Positive	Negative	
46, XY	17	0	17
47, XY, +18	1	0	1
46, XX	2	15	17
47, XX, +22	0	1	1
Total	30	12	42

— 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 종합효소연쇄반응의 응용 —



**Fig. 6.** Gel electrophoresis of the PCR products of Y-specific repeat. Lane 1: 154 bp PCR products from normal male blood, lane 2: absence of 154 bp PCR products from normal female blood, lane 3 and 4: 154 bp PCR products from amniotic fluid that has been confirmed as male by cytogenetic study, lane 5 and 6: absence of 154 bp PCR products from amniotic fluid that has been confirmed as female by cytogenetic study, lane 8: DNA size marker(repeats of a 100 bp DNA).

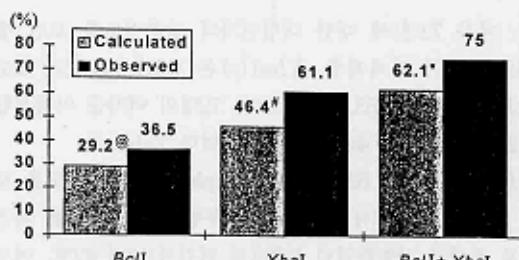
**Table 5.** Ethnic variation in female heterozygosity of *BclI* and *XbaI* RFLPs

Ethnic group	<i>BclI</i>	<i>XbaI</i>	<i>BclI+XbaI</i>
White	42	49	62.75
American black	29-32	-	-
Asian/Indian	42-44	-	-
Chinese	29-38	49	-
Japanese	42	48	-
Malay	33	-	-
Polynesian	49	50	-
Maori	44	49	-
Our data(Korean)	37.0	58.9	68.8

경우 Table 2에서 계산된 수치는 47.4%였으며 실측치는 58.9였고, *BclI* RFLP와 *XbaI*를 동시에 분석한 경우 Table 3에서 계산된 수치는 62.1%였으며 실측치는 68.8%였다(Fig. 7).

## 고찰

A형 혈우병은 우리나라에서도 비교적 흔한 유전질환증의 하나로서 대구와 경북지역의 종합병원에 등록된 환자



**Fig. 7.** Histogram showing expected and observed diagnostic yield from indicated permutations of *BclI* and *XbaI* RFLPs.  
@, Calculated from *BclI*(+) and *BclI*(-) and *BclI*(-) allele frequencies in Table 1 as follows:  $2pq \times 100 = 2 \times 0.820 \times 0.180 = 29.2\%$ . #, Calculated from *XbaI*(+) and *XbaI*(-) allele frequencies in Table 2 as follows:  $2pq \times 100 = 2 \times 0.365 \times 0.635 = 46.4\%$ . \*, Calculated from *BclI* and *XbaI* RFLP haplotypes in Table 3 as follows:  $2 \times (0.30 \times (0.520 + 0.066 + 0.114) + 0.520 \times (0.066 + 0.114)) + 0.066 \times 0.114 \times 100 = 62.1\%$ . These represent the distribution expected in the absence of linkage disequilibrium.

수는 100여명에 달한다. 제8혈액응고인자를 투여하여 혈액응고인자의 부족을 교정함으로써 혈우병 환자도 정상인과 동일한 수명을 유지할 수 있게 되었으나, 수많은 공여자로 부터 제공받아 제조된 제8혈액응고인자는 후천성면역결핍증 등의 바이러스 질환을 전염시킬 위험이 있고, 장기간 제8혈액응고인자를 투여할 경우 제8혈액응고인자에 대한 억제인자의 생성됨으로 말미암아 치료 효과가 상실될 수 있으며, 제8혈액응고인자로 치료한 경우에도 A형 혈우병환자의 주요 사인인 뇌출혈이 근절되지는 않는다. 따라서 보인자검색 및 혈우병 태아의 산전진단을 통한 혈우병의 예방이 중요시된다.

A형 혈우병 보인자검색 및 산전진단의 방법에는 제8혈액응고인자 활성도, 제8혈액응고인자 항원 및 폰밀레브란드인자 항원 검사 등을 통한 고전적인 표현형 분석[3,4]과 제8혈액응고인자 유전자내의 DNA 혹은 유전자의 인접한 DNA에 대한 유전형 분석으로 대별할 수 있다[5-15, 25-36]. 표현형 분석에 의한 혈우병의 보인자검색은 6-20% 정도의 오진율이 있어서, 최근에 문자생물학적 방법에 의한 유전형 분석이 시도되고 있다. 제8혈액응고인

## — 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용 —

자 유전자는 X-염색체 장완의 말단에 위치하고 있는 186 kb의 거대한 유전자로서 X-염색체 길이의 0.1%를 차지 한다(7-15). 제8혈액응고인자 유전자는 26개의 exon과 25개의 intron으로 구성되며 exon의 총 연장은 9 kb 정도이며 intron의 총 연장은 177 kb 정도이다(2). A형 혈우병을 야기하는 유전자의 돌연변이는 특이한 양상이 없고 환자에 따라 매우 다양하며 제8혈액응고인자의 활성도 또한 환자에 따른 개인차이가 심하다. 현재까지 밝혀진 돌연변이의 종류를 보면 80예의 점상돌연변이, 6예의 DNA 삽입, 7예의 작은 DNA의 결실 및 60예의 큰 DNA의 결실등 매우 다양하며, 점상돌연변이중 과오돌연변이(missense mutation)는 제8혈액응고인자의 활성도가 부분적이나마 존재하여 경한 증상을 보이는 반면, 난센스돌연변이(nonsense mutation)는 제8혈액응고인자의 활성도가 없어 중증의 증상을 보이는 것으로 보고되어 있다(12).

유전형 분석은 다시 직접적 분석방법(25-28)과 간접적 분석방법(7-13)으로 구분할 수 있다. 직접분석법은 염기쌍내의 점상돌연변이 및 DNA의 결실등의 유전자 손상부위를 제한효소와 탐침을 이용하여 직접 검사할 수 있는 방법으로서 A형 혈우병의 진단에 가장 확실한 진단방법이다. 그러나 A형 혈우병을 야기하는 특이의 돌연변이가 없고, 제8혈액응고인자 유전자는 거대 유전자므로 원인이 되는 돌연변이를 규명하기란 용이한 일이 아니므로 간접분석법이 임상적인 유용성이 높다. 간접분석법은 제8혈액응고인자 유전자내의 혹은 유전자외의 DNA의 다형성을 조사하는 소위 유전자 관련성 분석으로서 12 종류의 RFLP와 2 종류의 VNTR이 알려져 있다(7-13). 이러한 DNA 다형성 분석방법의 임상적인 활용도를 높이기 위해서는 각 DNA 다형성간의 연쇄불평형, 대립인자 보유빈도의 차이에 따른 정보제공을 및 DNA 재결합 등을 고려해서 3-4 종류의 다형성이 적절히 선택되어져야 할은 물론 보다 효과적이고 신뢰도가 높은 검사 방법이 모색되어져야 한다. 상기 14종류의 DNA 다형성중 임상적으로 이용빈도가 높았던 것은 제8혈액응고인자 유전자내의 *BclI*, *XbaI*, *BamHIII* 및 *BglII* RFLP등과 intron 13 영역의 VNTR인 (CA)<sub>n</sub> repeat, 그리고 제8혈액응고인자 유전자외의 DDXS52 VNTR, DDXS15 RFLP등을 들 수 있다. 유전자외의 DNA 다형성인 DDXS52 VNTR과 DDXS15 RFLP등은 DNA 재결합에 의한 5% 정도의 오진은 불가피하다(6). A형 혈우병의 진단에 이용되는

RFLP는 주로 두대립인자 다형성(diallelic polymorphism)이므로 한종류의 RFLP를 분석할 경우 여성의 이형접합체 보유빈도는 이론적으로는 50%를 넘지 못하며, 진단적 정보제공율을 높이기 위해서는 RFLP 상호간에 연쇄불평형의 현상이 적은 몇종류의 RFLP를 동시에 분석하는 것이 바람직하다(5, 8). 이러한 DNA 재결합 및 연쇄불평형에 의한 문제가 적은 RFLP로는 유전자내의 *BclI* RFLP와 *XbaI* RFLP등을 들 수 있으며 이 두 종류를 동시에 분석하는 것이 진단적 가치가 높을 것으로 기대된다. DNA 다형성 분석의 가장 일반적인 검사방법은 DNA 제한 효소와 DNA 탐침을 이용하는 서던블로트이나 이 방법은 기술적인 어려움이 많고 검사시간이 길기 때문에 임상검사로 이용하기에는 용이하지 않아서 최근에는 PCR에 의한 DNA 다형성 분석이 시도되고 있다(7-15). PCR을 이용한 *BclI* RFLP와 *XbaI* RFLP를 동시에 분석은 다음과 같은 임상적 효과 및 활용이 예상된다. 첫째, 두 다형성간에는 연쇄불평형이 없으므로 A형 혈우병 보인자검색에 있어 높은 정보를 제공할 수 있으며 검사경비 및 시간이 절감되리라 예상된다. 둘째, PCR을 이용한 검사이므로 소량의 가검물로써 의뢰당일에 결과를 얻을 수 있어서 조기(임신 제1기 삼개월간)에 산전진단이 가능하며 혈우병 태아에 대한 치료적 유산을 계획할 경우 산모에게 초래되는 위험을 최소화 할 수 있으리라 기대된다.

본 연구의 *BclI* RFLP의 분석결과, *BclI*(+) 대립인자의 빈도가 82.0%였고 *BclI*(-) 대립인자의 빈도는 18.0%로서 유럽 및 북구 백인(18)에 비해 *BclI*(+) 대립인자의 빈도가 높았다. 본 연구에서 여성의 이형접합체 보유빈도를 보면 36.5%로서, 두대립인자가 이상적인 분포를 보인다는 가정하에서 Table 1에서 산정된 29.2%와 비교해보았을 때 여성의 제8혈액응고인자 유전자의 *BclI* RFLP 부위는 이형접합체인 경우가 동형접합체 보다 선호됨을 알 수 있었다(Fig. 8). 또한 인종에 따른 여성의 이형접합체 보유빈도 보유율의 차이를 관찰할 수 있었는데 중국인(30)의 29-38% 백인(13, 31)과 일본인(32)의 42% 및 말레이인(33)의 33%와는 유사한 경향을 보였으나 미국흑인(34, 35)의 29-32% 보다는 높았고 폴리네시아인(36)의 49% 및 마오리인(33)의 44%에 비해서는 낮은 경향을 보였다.

본 연구의 *XbaI* RFLP 분석 결과, *XbaI*(+) 대립인자의 빈도가 36.5%였고 *XbaI*(-) 대립인자의 빈도는

### — 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용 —

63.5%로서 유럽 및 북구 백인에[13] 비해 *Xba*I(-) 대립 인자의 빈도가 높았다. 본 연구에서 여성의 이형접합체 보유빈도를 보면 61.1%로서, 두대립인자가 이상적인 분포를 보인다는 가정하에서 Table 2를 기준으로 계산된 46.4%와 비교해 보았을 때 여성의 제8혈액응고인자 유전자의 *Xba*I RFLP에는 이형접합체인 경우가 동형접합체 보다 높은 빈도로 발생됨을 알 수 있었다. 중국인, 백인, 일본인, 폴리네시아인 및 마오리인 등을 대상으로 *Xba*I RFLP에 대한 여성의 이형접합체 보유빈도를 조사한 것을 보면(30-36) 48-50%으로서 *Bcl*II RFLP에 비해 인종 간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았는데, 본 연구의 61.1%는 이에 비해 높은 경향을 보였다.

본 연구에서 *Bcl*II/*Xba*I haplotype의 빈도를 보면 *Bcl*II(+)/*Xba*I(-)가 50.0% *Bcl*II(+)/*Xba*I(+)가 33.1% *Bcl*II(-)/*Xba*I(+)가 2.9% *Bcl*II(-)/*Xba*I(+)가 14.0%였으며, 이를 각 대립인자가 이상적인 분포를 보인다는 가정 하에서 Table 1과 2의 각 대립인자를 이용하여 계산된 haplotype들의 빈도와 비교해 보았을 때 큰 차이가 없었으므로 *Bcl*II RFLP와 *Xba*I RFLP 사이에는 연쇄불평형이 없는 것으로 생각되며 이는 Moodie 등[8]의 보고와 일치하였다. 또한 여성에 있어서 *Bcl*II RFLP 혹은 *Xba*I RFLP중 어느 하나 이상의 다형성에 대한 여성의 이형접합체 보유율은 75.0%로서 백인을 대상으로 한 Wadelius 등[11]의 62%보다 높았으므로 한국인에 있어서 *Bcl*II RFLP와 *Xba*I RFLP 분석의 조합이 A형 혈우병의 진단에 매우 유용한 것으로 생각된다.

A형 혈우병은 남자에서 발생되는 반성열성유전질환이므로 정확한 산전진단을 위해서는 남성태아의 감별이 중요시 되는데 본 연구에서는 Y-specific repeat에 대한 PCR을 실시하였다[21]. 36예의 양수 및 유산태아를 대상으로 Y-specific repeat에 대한 PCR을 실시하고 이를 염색체 검사로 확인해 본 결과 2예를 제외하고는 모두 일치된 소견을 보였으며, 불일치를 보였던 2예는 유산된 태아의 것으로 염색체검사상 밝히기 힘든 Y-염색체 유래의 유전물질이 보유하여 유산이 되었을 가능성이 를 것으로 사료되므로 PCR의 위양성으로 보기는 힘들다.

이상의 결과로서 PCR을 이용한 제 8 혈액응고인자 유전자의 *Bcl*II RFLP, *Xba*I RFLP 분석과 Y-specific repeat에 의한 태아 성감별검사는 A형 혈우병의 산전진단 및 보인자검색에 유용할 것으로 사료되며, 이의 임상적 응용에 대한 방법을 Fig. 8에서 보면 다음과 같다.

Part A에서 예시한 A형 혈우병가계는 PCR에 의한 *Xba*I RFLP 분석(Part B)과 태아 성감별(Part C)로써 A형 혈우병의 보인자검색 및 산전진단이 가능한 예로서 혈우병환자(6 번 가계구성원)는 *Xba*I(+) 대립인자를 보유하고 있고 A형 혈우병 보인자인 혈우병환자의 어머니(2 번)는 *Xba*I 다형성의 이형접합체이며 혈우병환자의 아버지(1 번)는 *Xba*I(-) 대립인자를 보유하고 있으므로, 번이에 의해 손상된 제8혈액응고인자 유전자에는 *Xba*I (+) 대립인자가, 정상 유전자에는 *Xba*I(-) 대립인자가 각각 존재함을 알 수 있다. 따라서 *Xba*I 다형성의 이형접합체였던 혈우병환자의 자매들(3번과 5번)은 A형 혈우병 보인자로 진단이 가능하며, 또한 현재 임신중인 태아(7 번)의 *Xba*I RFLP 분석 결과 *Xba*I(-) 대립인자를 보유하고 있으며 Y-specific repeat의 PCR 결과가 양성이었으므로 이 태아는 혈우병이 없는 건강한 남성태아임을 알 수 있다.

그러나 *Bcl*II RFLP 및 *Xba*I RFLP는 두대립인자 다형성이므로 이 두가지 RFLP 분석 만으로는 높은 진단적 효과를 기대하기는 힘들기 때문에 단일 분석만으로도 정보제공율이 매우 높은 다대립인자 다형성(multiallelic polymorphism)에 대한 연구가 필요하다. 제8혈액응고인자 유전자의 intron 13 영역의 VNTR인 (CA)<sub>n</sub> repeat가 PCR을 이용해 분석이 용이하고 여성의 이형접합체 보유빈도가 90% 이상인 것으로 보고[14, 15]되어 있으므로 앞으로 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 경우에 따라서는 직접분석법에 의한 혈우병의 진단이 불가피한데[6], 간접분석법은 Fig. 8에서와 같이 혈우병 가계내에 한명 이상의 혈우병 환자가 있어야 하고 혈우병 환자의 어머니는 이형접합체인 경우에 분석이 가능하며, 또한 germline mosaicism 혹은 mutation에 의한 산발적인 혈우병(sporadic case)의 진단은 불가능하기 때문이다. Nayler 등[26]은 PCR을 이용하여 밀초혈액 임파구의 제8혈액응고인자 유전자의 m-RNA를 증폭하고 amplification mismatch detection(AMD) 방법에 의해 돌연변이 부위를 검사를 시도하여 거대 유전자인 제8 혈액응고인자 유전자의 거의 모든 돌연변이 부위를 비교적 쉽게 분석을 할 수 방법을 고안하였으므로 앞으로 이 방법에 의한 A형 혈우병의 진단이 기대된다.

— 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 종합효소연쇄반응의 응용 —

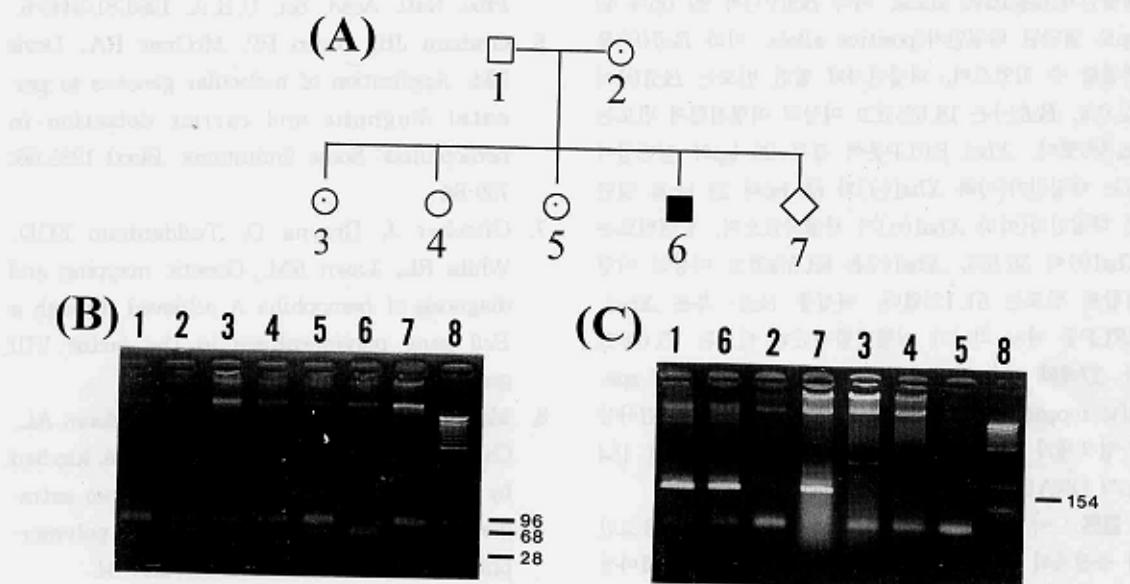


Fig. 8. Genetic prediction of hemophilia A by PCR-based format.

- A. Pedigree of hemophilia A : Symbols denote as follows; □, normal male; ■, hemophiliac male; ○, normal female; ◎, female carrier; △, fetus.
- B. *Xba*I RFLP : The amplified DNAs of the *Xba*I region by using primer 7.1 and 7.10 were digested with *Xba*I. The 96 bp fragment corresponds to *Xba*I negative allele, and 68 and 28 bp fragments corresponds to *Xba*I positive allele.
- C. Fetal sex determination by amplification of Y-specific repeat ; The blood DNA(lane 1-6) and fetal DNA(lane 7) were amplified with primer Y.1 and Y.2. The 154 fragment corresponds to Y-specific sequence.

The amplified and digested DNAs in Part B and C were run on agarose gel and has been stained with ethidium bromide. The lane 1-7 in Part B and C corespond to the pedigree numbers in Part A, and lane 8 in Part B and C DNA size marker(repeats of a 100 bp DNA). For explanation of the logics of carrier detection and prenatal diagnosis see discussion.

## 요약

배경 : A형 혈우병의 보인자 검색 및 산전진단에 있어서 정확하고 신속한 검사방법으로서 DNA 분석을 통한 유전형 분석(genotypic analysis)이 시도되고 있는데, PCR을 이용한 제8혈액응고인자의 *Bcl*I 및 *Xba*I 제한효소 절편길이 다양성(restriction fragment length polymorphism, 이하 RFLP)분석과 태아성감별이 임상적인 유용성이 높은 것으로 평가되고 있으므로 이를 대립형질의 빈도를 조사하여 한국인의 A형 혈우병의 산전진단 및

보인자검색의 기초자료로 이용하고자 하였다.

방법 : *Bcl*I 및 *Xba*I 분석은 41예의 A형 혈우병가계의 구성원 120명(41명의 혈우병환자를 포함한 남자 46명과 여자 74명)을 대상으로 제8혈액응고인자 유전자의 intron 18영역의 *Bcl*I부위를 시발체 8.1 및 8.2로서, intron 22 영역의 *Xba*I의 시발체 7.1 및 7.10으로서 각각 PCR을 실시하고 제한효소 *Bcl*I과 *Xba*I으로 각각 처리하였다. 태아 성감별검사를 위하여 27예의 양수 및 9예의 유산태아를 대상으로 Y-specific repeat에 대한 PCR과 염색체검사를 실시하였다.

결과 : *Bcl*I RFLP 분석 결과 절단점이 없는 142 bp의

### — 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용 —

대립인자(negative allele, 이하 *BcII*(-))와 99 bp와 43 bp로 절단된 대립인자(positive allele, 이하 *BcII*(+))를 관찰할 수 있었으며, 대립인자의 발현 빈도는 *BcII*(+)이 82.0%, *BcII*(-)은 18.0%였고 여성의 이형접합체 빈도는 36.5%였다. *Xba*I RFLP분석 결과 96 bp의 절단점이 없는 대립인자(이하 *Xba*I(-))와 68 bp와 28 bp로 절단된 대립인자(이하 *Xba*I(+))가 관찰되었으며, 발현빈도는 *Xba*I(+)이 36.5%, *Xba*I(-)은 63.5%였고 여성의 이형접합체 빈도는 61.1%였다. 여성중 *BcII*- 혹은 *Xba*I-RFLP중 어느 하나가 이형접합체였던 빈도는 75.0%였다. 27예의 양수 및 9예의 유산태아를 대상으로 Y-specific repeat에 대한 PCR을 실시한 결과, 염색체검사상 Y-염색체가 발견된 18예 모두에서 전기영동상에서 154 bp의 DNA를 관찰할 수 있었다.

**결론 :** 이상의 결과에서 PCR을 이용한 제8혈액응고인자 유전자의 *BcII*-RFLP 및 *Xba*I-RFLP 분석과 태아성 감별은 A형 혈우병의 보인자검색에 일상적 유용성이 높을 것으로 기대된다.

### 참 고 문 헌

- White GC, Shoemaker CB. Factor VIII gene and hemophilia A. Blood 1989;73:1-12.
- Sadler JE, Davie EW. Hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H, ed. The molecular basis of blood disease, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, U.S.A. 1994:657-700.
- Graham JB, Rizza CR, Chediak J, Mannucci PM, Briet E, Ljung R, et al. Carrier detection in hemophilia A: A cooperative international study (I. The carrier phenotype). Blood 1986;67:1554-9.
- Green PP, Mannucci PM, Briet E, Ljung R, Kasper CK, Essien EM, et al. Carrier detection in hemophilia A: A cooperative international study (II. the efficacy of a universal discriminant). Blood 1986;67:1560-7.
- Latherop GM, Lalouel JM, Julier LC, Ott J. Strategies for multilocus analysis in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984;81:3443-6.
- Graham JB, Green PP, McGraw RA, Davis LM. Application of molecular genetics to prenatal diagnosis and carrier detection in hemophiliacs: Some limitations. Blood 1985;66:759-64.
- Gitscher J, Drayna D, Tuddenham EGD, White RL, Lawn RM. Genetic mapping and diagnosis of hemophilia A achieved through a *BcII* gene polymorphism in the factor VIII gene. Nature 1985;314:738-40.
- Moodie P, Liddell MB, Peakee IR, Bloom AL. Carrier detection in 50 haemophilia A kindred by means of three intragenic and two extragenic restriction fragment length polymorphisms. Br J Haematol. 1988;70:77-84.
- 정성노, 이노범, 문형, 이춘근. 혈우병 A 가족에 대한 분자유전학적 연구. 대한산부인과학회지 1992; 35:1038-44.
- Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences: Application to hemophilia A. N Engl J Med 1987;317:985-90.
- Wadelius C, Blomback M, Goonewardena P, Anvret M, Lindstedt M, Gustavson KH, et al. Evaluation of DNA-based diagnosis for haemophilia A. Scand J Clin Lab. Invest 1991;51:625-33.
- Tuddenham EGD, Cooper DN, Gitschier J, Higuchi M, Hoyer LW, Yoshioka A, et al. Haemophilia A: Database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. Nucleic Acids Res 1991;19:4821-33.
- Peake I. Registry of DNA polymorphisms within or close to the human factor VIII and factor IX genes. Thromb Haemost 1992;67:277-80.
- Lalloz MR, Mcvey JH, Pattinson JK, Tuddenham E. Haemophilia A diagnosis by

— 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 중합효소연쇄반응의 응용 —

- analysis of a hypervariable dinucleotide repeat within the factor VIII gene. *Lancet* 1991;338: 207-11.
15. Wang XD. Intronogenic variable number tandem repeats in coagulation factor VIII gene of disease origin. *Chung-Hua I-Hsueh-Tsa-Chih* 1993;73:206-8.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;139: 487-91.
17. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: Innis, M. A., Gelfond, D. H. and Sninsky, J. J., eds. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press Inc. 1990;1 46-52.
18. Boom R, Sol CJA, Heijtink R, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J. Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. *J Clin Microbiol* 1991;29:1804-11.
19. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
20. 전효진, 박현찬, 전동석, 김재룡: 결핵균 검출을 위한 모세관중합효소연쇄반응의 적정조건. *계명의대논문집* 1993;12:520-30.
21. Kogan SC, Gitschier J. Genetic prediction of hemophilia A. In: Innis MA, Gelfond DH, Sninsky JJ, ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego Academic Press Inc. 1990;288-99.
22. Rooney DE, Czepulkowski BH. Prenatal diagnosis and tissue culture. In: Rooney DE, Czepulkowski BH, ed. *Human cytogenetics: A practical approach*, 2nd. ed. Oxford IRL Press 1992; 55-90.
23. 이문화, 전효진, 전동석, 김재룡. 만성골수성백혈병의 세포유전학적 분석. *대한임상병리학회지* 1993; 13:689-98.
24. 김영재, 전효진, 전동석, 김재룡, 하경임. 염색체이상 107예에 대한 분석. *대한임상병리학회지*, 1993; 12:513-22.
25. Millar DS, Zoll B, Martinowitz U, Kakkar VV, Cooper DN. The molecular genetics of a hemophilia A: Screening for point mutations in the factor VIII gene using the restriction enzyme TaqI. *Hum Genet* 1991;87:607-12.
26. Naylor JA, Green PM, Montandon AJ, Rizza CR, Giannelli F. Detection of three novel mutations in two haemophilia A patients by rapid screening of whole essential region of factor VIII gene. *Lancet* 1991;337:635-9.
27. Pieneman WC, Reitsma PH, Briet E. Double strand conformation polymorphism(DSCP) detects two point mutations at codon 280(AAC-ATC) and at codon 431(TAC-AAC) of the blood coagulation factor VIII gene. *Thromb Haemost* 1993;69:473-5.
28. Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, Oldenburg J, Economou-Petersen E, Olek K, et al. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991;88:8307-11.
29. Higuchi M, Kazazian HH Jr, Kasch L, Warren TC, McGinnis MJ, Phillips JA, 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 U.S.A.* 1991;88:7405-10.
30. Chan V, Chan TK, Lui VWS, Wong ACK. Restriction fragment length polymorphisms associated with factor VIII:C gene in Chinese. *Hum Genet* 1988;79:128-31.
31. Gitschier J, Drayna D, Tuddenheim EGD, White RL, Lawn RL. A BclI polymorphism in

— 전효진 외 7인 : A형 혈우병에 있어서 종합효소연쇄반응의 응용 —

- the factor VIII gene enables genetic mapping diagnosis of haemophilia A. Nature 1985;314: 730-4.
32. Suehiro K, Tanimoto M, Hamaguchi M, Kojima T, Takamatsu J, Ogata K, et al. Carrier detection in Japanese hemophilia A by use of three intragenic and two extragenic factor VIII DNA probes: A study of 24 kindreds. J Lab Clin Med 1988;112:314-8.
33. Graham JB, Kunkel GR, Fowlkes DN, Lord ST. The utility of a *Hind*III polymorphism of factor VIII examined by rapid DNA analysis. Br J Haematol 1990;76:75-9.
34. Wion KL, Tuddenham EGD, Lawn RM. A new polymorphism in the factor VIII gene for the prenatal diagnosis of haemophilia A. Nucleic Acids Res 1986;14:4535-42.
35. Antonarakis SE, Waber PG, Kittur SD, Patel AS, Kazazian HH, Mellis MA, et al. Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. N Engl J Med 1985;313:842-8.
36. Van der Water NS, Ridgway D, Ockelford PA. Restriction fragment length polymorphisms associated with the factor VIII and factor IX in Polynesians. J Med Genet 1991;28:171-6.