

직접염기서열분석법을 이용한 한국인 Lewis 혈액형군의 유전자분석

강원대학교 의과대학 내과학교실, ¹진단검사의학교실, ²경원대학교 가천 바이오나노 연구원,
³고려대학교 의과대학 진단검사의학교실, ⁴(주)대한임상의학센터, ⁵강원대학교 의학연구소

송서영 · 안성수² · 유숙원^{1,4,5} · 김장수³ · 서인범^{1,4,5}

Evaluation of the Genotypes of the Lewis Blood Group in a Korean Population Using Direct Sequencing

Seo Young Song, M.D., Seong Soo An, M.D., Ph.D.², Sook Won Ryu, M.D.^{1,4,5},
Jang Soo Kim, M.D.³ and In Bum Suh, M.D.^{1,4,5}

Departments of Internal Medicine and ¹Laboratory Medicine, College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon,
²Gachon Bionano Research Institute, Kyungwon University, Seongnam, ³Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,
Korea University, Seoul, ⁴Korea Clinical Medicine Center, ⁵Institute of Medical Science, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

Background: The *FUT2* and *FUT3* genes determine the Lewis phenotype of red blood cells (RBCs). Recently, the Lewis genes, the secretor genes, and several mutations that cause Lewis negative and non-secretor phenotypes have been identified. The purpose of this study was to analyze the gene frequency of *FUT2* and *FUT3* in a Korean population by comparing the use of the direct sequencing method to the use of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for mutation detection in the *FUT2* and *FUT3* genes.

Methods: RBCs and peripheral blood leukocytes were obtained from 225 apparently healthy volunteers to determine the phenotype and genotype of the *FUT2* and *FUT3* genes. Lewis phenotypes were determined on K₃EDTA-stabilized fresh blood samples using the column agglutination method. Lewis blood group genotyping was performed by use of the direct sequencing method. For the detection of T59G, C357T, and A385T mutations, the PCR-RFLP method was performed.

Results: The frequencies of the Lewis blood group phenotype were 12.4% for Le(a+b-), 70.7% for Le(a-b+), 11.1% for Le(a-b-) and 5.8% for Le(a+b+), respectively. Direct Sequencing of the *FUT2* gene identified 92.2% C357T, 56.9% A385T, 0.4% G244A mutations and 1.8% del396. Direct Sequencing of the *FUT3* gene identified 46.9% T59G, 30.4% G508A, 1.1% T202C, 1.1% C314T, 0.7% A1029G, 3.0% T1067A and 13.3% G1242A mutations. The PCR-RFLP method results were discordant in nine cases (1 case for C357T, 4 cases for A385T and 2 cases for T59G) as compared to the direct sequencing method results.

Conclusion: We have determined the frequencies of *FUT2* and *FUT3* gene mutations in a Korean population. The use of the direct sequencing method was more accurate than the use of the PCR-RFLP method for the determination of the genotype of the *FUT2* and *FUT3* genes. (*Korean J Hematol* 2008;43:34-42.)

Key Words: *FUT2* gene, *FUT3* gene, Lewis blood group, Phenotype, Genotype, Direct sequencing, PCR-RFLP

접수 : 2007년 10월 24일, 수정 : 2008년 2월 28일

승인 : 2008년 3월 5일

교신저자 : 서인범, 강원도 춘천시 효자2동 192-1

☎ 200-701, 강원대학교 의과대학 진단검사의학
교실

Tel: 033-258-2446, Fax: 033-242-1329

E-mail: bloodmd@kangwon.ac.kr

이 논문은 2003년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조
성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었
음(KRF-2003-042-E00119).

Correspondence to : In Bum Suh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,
Kangwon National University

192-1, Hyoja 2-dong, Chuncheon 200-701, Korea

Tel: +82-33-258-2446, Fax: +82-33-242-1329

E-mail: bloodmd@kangwon.ac.kr

서 론

Lewis 혈액형군은 Le^a 와 Le^b 항원을 갖고 있으며 타액과 혈장에도 존재하고 혈장으로부터 항원을 흡수하여 그 표현형을 획득하며 적혈구 외의 조직에도 발현하는 특징을 갖고 있다.¹⁾ Lewis 항원은 19p13.31 염색체에 존재하는 *FUT2*와 *FUT3* 유전자에 의해 형성된 $\alpha(1,3/1,4)$ fucosyltransferase (Lewis 효소)와 $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase (Secretory 효소)의 작용에 의해 생성된다.²⁾

Lewis 혈액형군의 표현형은 *FUT2*와 *FUT3* 유전자의 조합에 의해 결정되는데, Le^b 항원은 *FUT2* 유전자에 암호화된 Secretory 효소와 *FUT3* 유전자에 암호화된 Lewis 효소의 작용에 의해 생성되며, Le^a 항원은 단지 Lewis 효소의 작용에 의해서만 생성된다. Secretory 효소는 ABO(H) 혈액형군 및 Lewis 혈액형군의 항원을 타액, 혈장 및 체액 등에 분비하는 역할을 한다.^{3,4)} *FUT2* 유전자와 *FUT3* 유전자가 모두 발현되는 경우에는 Le^a 항원과 Le^b 항원을 모두 생성하지만 Le^a 항원보다 Le^b 항원이 적혈구 표면에 더 선택적으로 흡착되기 때문에 $Le(a-b+)$ 로 표현되고, *FUT3* 유전자만 발현되고 *FUT2* 유전자의 발현이 없는 경우에는 Le^a 항원만이 생성되어 $Le(a+b-)$ 의 적혈구 표현형을 갖게 된다. *FUT3* 유전자가 발현되지 않으면 *FUT2* 유전자에 관계없이 $Le(a-b-)$ 의 표현형이 된다.²⁾

최근 *FUT2*와 *FUT3* 유전자의 염기서열이 알려지고 추가적 변이부위가 밝혀지면서⁵⁻⁸⁾ 중합효소연쇄반응-제한효소절편다형성분석법(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)을 이용한 Lewis 혈액형군의 유전형 검사방법이 이용되고 있다. 유전자 변이를 검출하기 위한 방법으로 직접염기서열 분석법 및 PCR-RFLP법 외에 single strand conformation polymorphism (SSCP),⁹⁾ heteroduplex analysis (HA),¹⁰⁾ protein truncation [A1] test (PTT),¹¹⁾ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 등¹²⁾이 소개되고 있는데, SSCP법과 HA는 민감도가 떨어지며 RFLP법은 해당하는 제한효소가 존재해야 하며, PTT, DGGE법 등은 민감도가 높지만 비용이 많이 들고 시간 및 노동력이 많이 소모되는 단점을 가지고 있다.

서구 및 동양인에서 *FUT2* 유전자는 C302T, C357T, C379T, A385T, G428T, C480T 변이 그리고 *FUT3* 유전자는 T59G, T202C, C314T, G484A, G508A 변이 등⁵⁻⁷⁾ 다양하게 알려져 있으나 국내에서는 일부 유전자에 대

한 결과만 보고되고 있다.¹³⁾

본 연구에서는 Lewis 혈액형의 표현형을 검사하고, Lewis 혈액형을 결정짓는 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자 전체를 직접 염기서열 분석법을 이용하여 각 유전자형의 분포 및 빈도를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상검체

건강검진 환자 중 직접 항글로불린 검사가 음성인 225명(남자 124명, 여자 101명)을 대상으로 하였고, 평균연령은 44.6 ± 13.7 세였다. 대상군의 ABO 혈액형 분포는 A, B, O, AB형이 각각 67명(36.4%), 48명(26.0%), 53명(28.8%), 16명(8.7%)이었다.

2. 방 법

1) Lewis 혈액형의 표현형 검사

대상군 225명에 대하여 적혈구 Lewis 혈액형의 표현형 검사는 단클론성 항체를 이용한 젤카드법(DiaMed[®]-ID card, Diamed AG, Swiss)을 이용하여 검사하였다. EDTA가 포함되어 있는 시험관에 채혈한 전혈을 이용하여 냉장 보관 후 2일 이내에 검사를 시행하였고 각 검사 시마다 양성 및 음성 대조군을 같이 검사하였다. 표현형이 $Le(a+b+)$ 로 나온 경우에는 직접 항글로불린검사를 시행하여 면역글로불린에 의한 위양성 여부를 확인하였다. 검사방법은 브로멜린 용액(DiaMed[®]-ID diluent 1, Diamed AG, Swiss) 0.5mL에 전혈 50 μ L를 혼합하고 실온에서 10분간 배양하여 만든 5% 적혈구 부유액 10 μ L를 각각 항- Le^a [A3] 혈청과 항- Le^b [A4] 혈청이 들어있는 미세관(DiaMed[®]-ID card, Diamed AG, Swiss)에 첨가한 후, 10분간 ID-Centrifuge[®] (Diamed AG, Swiss)를 이용하여 원심하고 결과를 판정하였다.

2) Lewis 혈액형의 유전자형 검사

(1) 중합효소연쇄반응 및 직접염기서열분석: DNA 분리를 위해 K₃EDTA 시험관에 들어있는 말초혈액에서 단핵구 세포층을 분리하여 -70°C 에 보관 후 사용하였다. DNA 추출분리는 QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, USA)를 이용하였다. 시발체(primer)는 tk1/tk2 (*FUT2*) 및 sn1/sn2 (*FUT3*)로 PCR을 시행하였다(Table 1). *FUT2* 유전자에 대한 PCR 반응은 94°C 1분, 65°C 2분, 72°C 2분의 조건을 30회 반복 시행하였으며 반응액은 분리한 DNA 1 μ L, 시발체 0.2 μ M, dNTP 200 μ M, Tris-HCl 10mM (pH 8.8), KCl 50mM, MgCl₂

2.5mM, gelatin 0.1mg/mL, *Taq* polymerase 5U를 첨가하여 최종반응액이 50 μ L가 되게 하였다.

FUT3 유전자에 대한 PCR 반응은 Gene Amp PCR System 9600 thermal cycler (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 처음 1회는 94°C 3분, 62°C 2분, 72°C 3분 실시 후, 94°C 60초, 62°C 90초, 72°C 90초의 조건을 30회 반복 시행하였으며 반응액은 분리한 DNA 1 μ L, 시발체 0.2 μ M, dNTP 200 μ M, Tris-HCl 10mM (pH 8.3), KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, gelatin 0.1mg/mL, *Taq* polymerase 5U를 첨가하여 전체 양을 50 μ L로 하였다.

직접염기서열분석은 PCR 산물(*FUT2* 1,153bp, *FUT3* 1,615bp)과 새로 고안한 시발체 11개 및 ABI PRISM^R

BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, USA)와 ABI Prism 3100 Sequencer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 직접염기서열분석을 시행하였다(Table 2). 직접염기서열분석은 PCR 산물(20ng/ μ L) 3 μ L, 시발체(3.2pmo/ μ L) 1 μ L, dNTP (10mM/ μ L) 1 μ L, BigDyeTM Terminator (Applied Biosystems, USA) 3 μ L 및 증류수 2 μ L로 총 반응액 10 μ L를 95°C 3분과 95°C 2분, 50°C 15초, 72°C 1분의 조건을 25회 반복 시행하였다.

(2) 제한효소 절편 다형성 분석법: 직접염기서열분석을 시행한 후, *FUT2* 및 *FUT3* 유전자 중 단일염기변이가 높게 나타나는 부위를 대상으로 제한효소를 탐색

Table 1. Primers and PCR conditions in *FUT2* and *FUT3* gene

Gene	Name	Primers (5'~3')	Annealing temperature (°C)	Fragment sizes (bp)
<i>FUT2</i>	tk1	GGGCCTCCATCTCCCAGCTAAC	65	1,153
	tk2	TGCTTCTCATGCCCGGGCACTC		
<i>FUT3</i>	sn1	TAAGCAGGAGATTGTCATCAATGACC	60	1,615
	sn2	GTGCAGAGAGATCATCACGGCACG		

Table 2. Primers for nested PCR and direct sequencing in *FUT2* and *FUT3* gene

Gene	Name	Primers (5'~3')	Locations (U17894, AY870341)	Locations (Sec2, Le)
<i>FUT2</i>	f	GGGCCTCCATCTCCCAGCTAAC	15~36	-81~-60
	1f	CCTTCATCCCGGCCAGAT	341~360	245~264
	2r	AACGACTGGATGGAGGAGGAA	451~471	355~375
	3f	CGCTACAGCTCCCTCATCTT	760~780	664~684
	r	TGCTTCTCATGCCCGGGCACTC	1,146~1,167	1,050~1,071
<i>FUT3</i>	f	TAAGCAGGAGATTGTCATCAATGACC	8,382~8,407	-63~-38
	1f	ACTGCCGACCGCAAGGTGTACC	8,725~8,746	280~301
	1r	GCAGCGCTGGATCTGGTTCAA	8,832~8,852	387~407
	2f	TGGTGCCTGGGCTGCCGGGA	9,542~9,561	1,097~1,116
	2r	TCTCTTTACCTGGGACCTCACACGCTGGG	9,619~9,639	1,174~1,194
	r	GTGCAGAGAGATCATCACGGCACG	9,973~9,996	1,518~1,551

Table 3. PCR primers of the nested PCR reaction for the RFLP analysis of *FUT2* and *FUT3* gene

Gene	Primer name	Primer sequences (5'~3')	Annealing temperature (°C)	Product sizes (bp)
<i>FUT2</i>	tk3	CAGGATCCCCTGGCAGAACTACCACA*TT*AA	65	98
	tk4	AGCAGGGGTAGCCGGTGAAGCGGACGTACT		
	tk5	AACGACTGGATGGAGGAGGAATACCGCA*G*C	65	80
	tk6	AGGTCCAGGAGCAGGGGTAGCCGGTGAAG		
<i>FUT3</i>	sn3	CCATGGCGCCGCTGTCTGGCCGCC*C	65	93
	sn4	AGTGGCATCGTCTCGGGACACACG		

*Artificially changed bases to create restriction enzyme site.

하여 선정하고, RFLP 분석을 위한 시발체를 고안하여 2차 PCR 반응을 시행한 후, 제한효소 처리 후 전기영동하여 판독하였다. *FUT2* 유전자의 C357T, A385T 변이와 *FUT3* 유전자의 T59G 변이에 대하여 PCR RFLP를 시행하였다. 2차 PCR 반응은 1차 PCR 산물 1 μ L, 결합 반응온도 및 시발체 외에 나머지는 1차 PCR과 동일하게 30회씩 반응시켰다(Table 3). 각각의 PCR을 시행한 후 특이 증폭띠를 확인하고 PCR 산물 5 μ L를 *MspI*, *AseI*, *AluI* 2.5단위와 제조사가 제공한 반응 완충액으로 37°C에서 2시간 소화시킨 후, 그 중 일부를 4% Metaphor[®] agarose gel (FMC Bioproducts, USA)에 전기영동한 후 결과를 판독하였다(Table 4).

결 과

1. Lewis 혈액형의 표현형 검사

총 225명에 대한 Lewis 표현형 검사 결과, Le(a-b+) 70.7%, Le(a+b-) 12.4%, Le(a-b-) 11.1%, Le(a+b+) 5.8%였다. 그리고 Le(a+b+) 13명 중 11명이 O형이었고 Le(a+b-)는 대부분이 A형과 B형이었으며, Le(a-b+)와 Le(a-b-)는 ABO 혈액형과 관련이 없었다(Table 5).

2. Lewis 혈액형의 유전자형 검사

1) 직접염기서열분석

직접염기서열분석결과, *FUT2* 유전자에서는 네 개의 변이, 즉 C357T (92.2%), A385T (56.9%), G244A (0.4%) 및 del396 (1.8%) 변이를 발견하였다. 이 중 G244A와 del396변이는 현재까지 보고되지 않은 변이이다. 그리고 *FUT3* 유전자에서는 7개의 변이를, 즉 T59G (46.9%), G508A (30.4%), T202C (1.1%), C314T (1.1%), A1029G (0.7%), T1067A (3.0%) 및 G1242A (13.3%) 변이를 발견하였다(Table 6). T202C와 C314T 변이는 동양인에게서는 발견되지 않고 주로 구미인에게서 발견되는 변이이며, A1029G와 G1242A 변이는 현재까지 알려져 있지 않은 단일염기변이이다. Lewis 표현형 및 유전자형 검사 결과는 98.2% (221/225) 일치하였고, 유전자 분석으로 Le(a+b+)와 Le(a+b-) 형은 구별할 수 없었다(Fig. 1, 2).

2) 제한효소 절편 다형성 분석

제한효소 절편 다형성 분석결과(Fig. 3, 4), *FUT2* 유전자에서 C357T 및 A385T의 분포는 각각 93.6% 및 58.7% 그리고 *FUT3* 유전자에서 T59G의 분포는 47.2%를 보였으며, 직접염기서열분석 결과와 비교하면 C357T 3예(wild type → C357T homozygote), A385T 4예(A385T heterozygote → A385T homozygote), T59G 2예(wild

Table 4. Restriction enzymes for the detection of *FUT2* and *FUT3* gene mutations

Gene	Primer pairs	Mutations	Restriction enzyme	Restriction site	Reaction buffer	Fragment sizes (bp)	
						Wild-type	Mutated
<i>FUT2</i>	tk3/4	C357T	<i>AseI</i>	AT/TAAT	M	98	70+28
	tk5/6	A385T	<i>AluI</i>	AG/CT	L	80	51+29
<i>FUT3</i>	sn3/4	T59G	<i>MspI</i>	C/CGG	M	93	68+25

Abbreviations: M, medium concentrated reaction buffer included Tris-HCl 10mM (pH 7.5), MgCl₂ 10mM, Dithiothreitol 1mM and NaCl 50mM; L, low concentrated reaction buffer included Tris-HCl 10mM (pH 7.5), MgCl₂ 10mM and Dithiothreitol 1mM.

Table 5. The distribution of ABO blood group and Lewis phenotype

Blood group	Le(a+b+)	Le(a-b+)	Le(a+b-)	Le(a-b-)	Total
A	1	48	12	7	68 (30.2%)
B	1	43	10	6	60 (26.7%)
O	11	54	3	7	75 (33.3%)
AB	0	14	3	5	22 (9.8%)
Total (%)	13 (5.8%)	159 (70.7%)	28 (12.4%)	25 (11.1%)	225 (100%)

Table 6. The frequencies of *FUT2* and *FUT3* base substitutions in Korean

Gene name	Nucleotide substitution	Allele frequency (%) [*]	Type	Frequency (%) [†]
<i>FUT2</i>	C357T	415 (92.2)	W	7 (3.1)
			H	21 (9.3)
			M	197 (87.6)
	A385T	256 (56.9)	W	58 (25.8)
			H	78 (34.7)
			M	89 (39.6)
	G244A	2 (0.4)	W	223 (99.1)
			H	2 (0.9)
			M	0 (0)
<i>FUT3</i>	del396	4 (1.8)	W	69 (30.7)
			H	101 (44.9)
			M	55 (24.4)
	T59G	211 (46.9)	W	113 (50.2)
			H	87 (38.7)
			M	25 (11.1)
	G508A	137 (30.4)	W	220 (97.8)
			H	5 (2.2)
			M	0 (0)
	T202C	5 (1.1)	W	220 (97.8)
			H	5 (2.2)
			M	0 (0)
	C314T	5 (1.1)	W	220 (97.8)
			H	5 (2.2)
			M	0 (0)
	T1067A	14 (3.1)	W	211 (93.8)
			H	12 (5.3)
			M	1 (0.4)
	A1029G	3 (0.7)	W	222 (98.7)
			H	3 (1.3)
			M	0 (0)
	G1242A	60 (13.3)	W	167 (74.2)
			H	56 (24.9)
			M	2 (0.9)

*Total number is 450 alleles, [†]Total number is 225 cases.

Abbreviations: W, wild-type; H, mutant heterozygotes; M, mutant homozygotes.

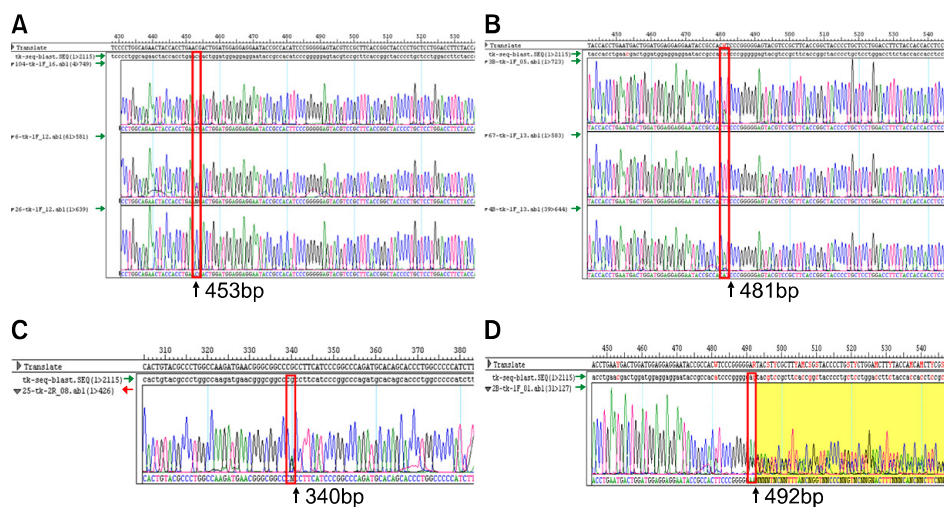


Fig. 1. Chromatograms of direct sequencing for *FUT2* gene mutations. (A) C357T heterozygote mutant. (B) G385A heterozygote mutant. (C) G244A wild type. (D) del396 mutant.

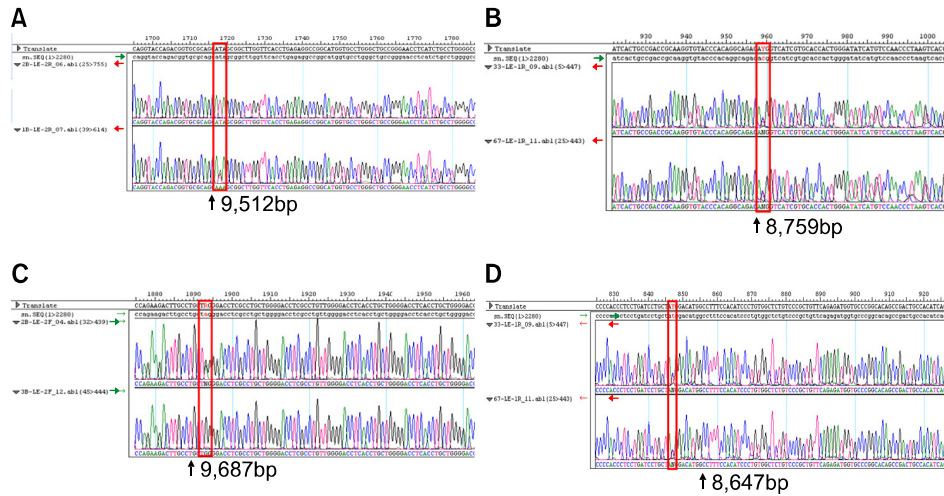


Fig. 2. Chromatograms of direct sequencing for *FUT3* gene mutations. (A) T1067A heterozygote mutant. (B) T202C heterozygote mutant. (C) G1242A heterozygote mutant. (D) C314T heterozygote mutant.

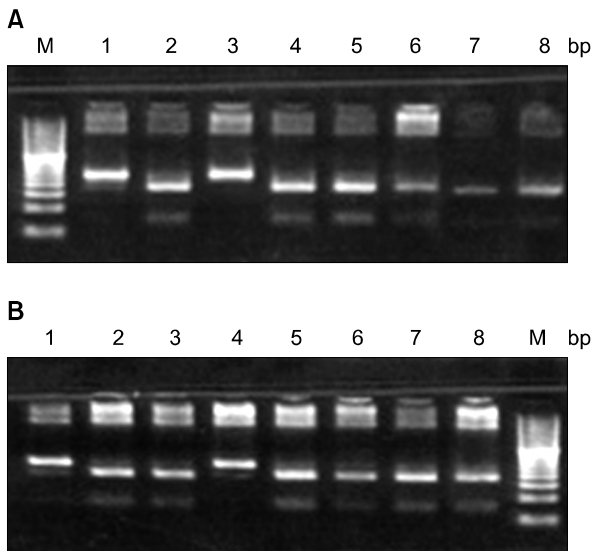


Fig. 3. (A) Electrophoresis pattern for the detection of *FUT2* gene mutation (C357T) using *Asel* restriction enzyme. Lane M-20bp DNA ladder; lane 1,3-wild type; lane 2,4,5,6,7,8-heterozygote mutants. (B) Electrophoresis pattern for the detection of *FUT2* gene mutation (A385T) using *Alul* restriction enzyme. Lane M-20bp DNA ladder; lane 1,4-wild type; lane 2,3,5,6,7,8-heterozygote mutants.

type → T59G homozygote, T59G heterozygote → wild type)에서 위양성 결과를 보였다(Table 7).

고 찰

Lewis 항원은 19p13.3에 위치하는 *FUT2(Se)*와 *FUT3(Le)* 유전자에 의해 발현되며 *FUT2* 유전자는 α (1,2)-

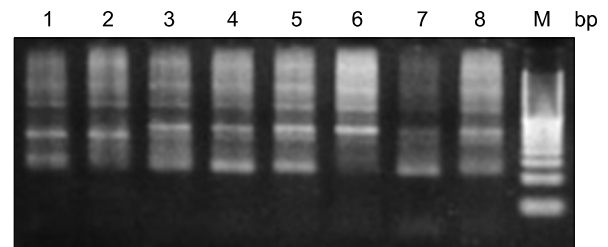


Fig. 4. Electrophoresis pattern for the detection of *FUT3* gene mutation (T59G) using *MspI* restriction enzyme. Lane M-20bp DNA ladder; lane 6-wild type; lane 1,3,4,5,8-heterozygote mutants; lane 7-homozygotic mutants.

Table 7. Comparison of direct sequencing and PCR-RFLP for the detection of *FUT2* and *FUT3* gene mutation

	<i>FUT2</i>		<i>FUT3</i>
	C357T	A385T	T59G
Direct sequencing	92.2% (415/450)	56.9% (256/450)	46.9% (211/450)
PCR-RFLP	93.6% (421/450)	57.8% (260/450)	47.2% (212/450)

fucosyltransferase를, 그리고 *FUT3* 유전자는 당전이효소 α (1,3/1,4)-fucosyltransferase를 생성한다. Le^b 항원은 *FUT2*와 *FUT3*에 의해 생성된 당 전이효소의 작용에 의해 만들어지며 Le^a 항원은 단지 *FUT3*에 의해 생성된 당 전이효소의 작용에 의해 만들어진다.²⁾ 일반적으로 Lewis 혈액형군의 표현형 검사는 단클론성 항체

를 이용한 혈구응집반응을 이용하는데, 적혈구의 Lewis 표현형은 나이, 임신,³⁾ 알코올성 췌장염, 간 질환 등⁴⁾ 여러 생리적인 조건에 따라 변화하는 것으로 알려져 있으며 검사에 이용한 시약의 종류 및 비특이적인 항-Lewis 항체 등에 의해 잘못 검사될 수 있다.¹⁴⁻¹⁸⁾ 특히 임신 중 Le(a-b+)인 산모들에서 Le^b가 소실되어 Le(a-b-)처럼 나타나는데 이는 임신 중 증가되는 지단백에 Le^b가 결합되기 때문으로 생각되며 이때 항-Le^b가 나타나기도 한다.³⁾ 항-Lewis 항체는 대부분 실온에서 잘 반응하나 그 중 37°C에서도 응집이 관찰되는 경우도 있고, 보체를 부착시킴으로써 항글로불린검사에 양성을 보이기도 하며 용혈성수혈부작용⁸⁾을 일으키기도 하므로 Lewis 혈액형군을 정확하게 검사할 수 있는 검사법이 필요할 것으로 생각한다. Ameno 등¹⁹⁾은 몇 종류의 상품화된 항-Lewis 항체를 이용한 검사에서 같은 환자에서 다른 표현형으로 검사될 수 있으므로 혈청학적 검사로는 Lewis 혈액형을 정확히 결정하기 어렵다고 보고한 바 있다. 1987년부터 Lewis 혈액형군의 표현형에 단클론성 항체를 이용하면서 적혈구 Lewis 표현형 검사의 예민도와 특이도가 증가하였으며 유세포분석기(flowcytometry), 효소면역측정법, 면역형광법 등을 이용한 표현형 검사도 소개되고 있다.^{4,6)} 최근 *FUT2*와 *FUT3* 유전자의 염기서열이 알려지고 추가적 변이부위가 밝혀지면서 PCR-RFLP를 이용한 Lewis 혈액형군의 유전형 검사방법에 대하여 논의되고 있다.^{20,21)}

FUT2 유전자와 *FUT3* 유전자는 최근 Kukowska-Latallo 등,²²⁾ Rouquier 등²⁾과 Kelly 등²³⁾에 의해 분리되었으며 이들은 α (1,3/1,4)fucosyltransferase와 α (1,2) fucosyltransferase를 비활성화시키는 G428A 변이와 T59G 변이를 보고하였다. Kudo 등²⁴⁾은 일본인의 *FUT2* 유전자 중 A385T 변이와 C357T 변이를 추가로 발견하였고 PCR-RFLP법을 이용하여 *FUT2* 유전자에서 세 가지의 대립유전자를 발견하고 각각을 *Se1*, *Se2* 그리고 *sej*로 명명하였다. 이들은 일본인에서 *FUT2* 유전자의 비활성화를 일으키는 A385T 변이는 C357T 변이와 항상 같이 일어난다고 하였다.

서구 및 동양인에서 *FUT2* 유전자는 C302T, C357T, C379T, A385T, G428T, C480T 변이 그리고 *FUT3* 유전자는 T59G, T202C, C314T, G484A, G508A 변이 등 다양하게 알려져 있으나^{5-7,25)} 국내에서는 일부 유전자에 대한 결과만 보고되고 있다.¹³⁾

본 연구에서는 직접염기서열분석 결과, *FUT2* 유전자에서 C357T (92.2%), A385T (56.9%)와 추가로

G244A (0.4%) 및 del396 (1.8%) 변이를 발견하였고, *FUT3* 유전자에서 T59G (46.9%), G508A (30.4%)와 T1067A (3.1%) 변이 그리고 구미인에만 알려진 T202C (1.0%), C314T (1.0%)와 추가로 현재까지 보고가 안된 A1029G (0.7%)와 G1242A (13.3%) 변이를 발견하였다. Lewis 표현형 및 유전자형 검사 결과는 98.2% (221/225) 일치하였고, 유전자 분석으로 Lewis(a+b+)와 Lewis(a+b-)형은 구별할 수 없었다.

PCR-RFLP법으로 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자 중, T59G, C357T 및 A385T 변이에 대하여 분석한 결과, PCR-RFLP법은 직접염기서열분석법과 비교하여 C357T 3예, A385T 4예, T59G 2예에서 차이를 보였다. PCR-RFLP법에서 차이를 보인 것은 제한효소의 작용이 불완전하거나 잘라진 산물의 전기영동 시 판독의 실수인 것으로 생각한다.

본 연구결과 한국인에서 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자에서의 단일염기변화의 분포를 알 수 있었으며, Lewis 혈액형과 관련된 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자 분석 결과, 현재까지 알려져 있지 않은 단일염기변이 4개와 추가로 동양인에서 알려져 있지 않은 단일염기변이 2개를 발견하였다. 본 연구 결과는 Lewis 혈액형군의 표현형 및 유전자에 관한 분석 및 Lewis 혈액형군 관련 질환의 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

배경: Lewis 혈액형군의 표현형은 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자에 의해 결정된다. 본 연구에서는 직접염기서열분석(direct sequencing)을 시행하여 Lewis 혈액형을 결정짓는 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자의 분포를 분석하고 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)법과 비교하고자 하였다.

방법: 정상인 225명을 대상으로 적혈구에서 Lewis 혈액형군의 표현형을 검사하였고, 단핵구층을 이용하여 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자를 분석하였다. Lewis 혈액형군의 표현형 검사는 젤카드법을 이용하여 검사하였고, 유전자 검사는 직접염기서열분석을 시행하였으며, *FUT2* 유전자의 C357T, A385T 변이와 *FUT3* 유전자의 T59G 변이에 대하여 PCR-RFLP를 시행하였다.

결과: Lewis 표현형 검사 결과, Le(a-b+) 70.7%, Le(a+b-) 12.4%, Le(a-b-) 11.1%, Le(a+b+) 5.8%였고, 직접염기서열분석 결과, *FUT2* 유전자에서 C357T (92.2%), A385T (56.9%)와 현재까지 보고되지 않은 새로운 G244A (0.4%) 및 del396 (1.8%) 변이를 발견하였

고, *FUT3* 유전자에서 T59G (46.9%), G508A (30.4%), T1067A (3.0%)와 구미인에만 알려진 T202C (1.1%), C314T (1.1%)와 현재까지 보고되지 않은 A1029G (0.7%) 및 G1242A (13.3%) 변이를 발견하였다. PCR-RFLP 및 직접염기서열분석법을 비교한 결과, PCR-RFLP법은 C357T 1예, A385T 4예, T59G 2예에서 불일치하였으며 그 외에는 직접염기서열분석 결과와 일치하였다.

결론: 한국인에서 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자에서의 단일염기변화의 분포를 알 수 있었다. 또한 *FUT2* 및 *FUT3* 유전자분석법 중에서 직접염기서열분석법이 기존의 PCR-RFLP법에 비해 정확함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) McCurley RS, Recinos A 3rd, Olsen AS, et al. Physical maps of human alpha(1,3)fucosyltransferase genes *FUT3-FUT6* on chromosomes 19p13.3 and 11q21. *Genomics* 1995;26:142-6.
- 2) Rouquier S, Lowe JB, Kelly RJ, Fertitta AL, Lennon GG, Giorgi D. Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus. *J Biol Chem* 1995;270:4632-9.
- 3) Hammer L, Månsson S, Rohr T, et al. lewis phenotype of erythrocytes and Le^b-active actine glycolipid in serum of pregnant women. *Vox Sang* 1981;40:27-33.
- 4) Stigendal L, Olsson R, Rydberg L, Samuelsson BE. Blood group Lewis phenotype on erythrocytes and in saliva in alcoholic pancreatitis and chronic liver disease. *J Clin Pathol* 1984;37:778-82.
- 5) Liu TC, Chang JG, Lin SF, et al. Lewis (*FUT3*) genotypes in Taiwanese, Thai, and Filipino populations. *Ann Hematol* 2000;79:599-603.
- 6) Larson G, Svensson L, Hynsjö L, Elmgren A, Rydberg L. Typing for the human lewis blood group system by quantitative fluorescence-activated flow cytometry: large differences in antigen presentation on erythrocytes between A(1), A(2), B, O phenotypes. *Vox Sang* 1999;77:227-36.
- 7) Chang JG, Yang TY, Liu TC, et al. Molecular analysis of secretor type alpha(1,2)-fucosyltransferase gene mutations in the Chinese and Thai populations. *Transfusion* 1999;39:1013-7.
- 8) Costache M, Cailleau A, Fernandez-Mateos P, Oriol R, Mollicone R. Advances in molecular genetics of alpha-2- and alpha-3/4-fucosyltransferases. *Transfus Clin Biol* 1997;4:367-82.
- 9) Serpa J, Almeida R, Oliveira C, et al. Lewis enzyme (alpha1-3/4 fucosyltransferase) polymorphisms do not explain the Lewis phenotype in the gastric mucosa of a Portuguese population. *J Hum Genet* 2003;48:183-9.
- 10) Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, et al. The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* 2003;48:3202-6.
- 11) Buono P, Pasanisi F, Nardelli C, et al. Six novel mutations in the proopiomelanocortin and melanocortin receptor 4 genes in severely obese adults living in southern Italy. *Clin Chem* 2005;51:1358-64.
- 12) Andersson B, Ying JH, Lewis DE, Gibbs RA. Rapid characterization of HIV-1 sequence diversity using denaturing gradient gel electrophoresis and direct automated DNA sequencing of PCR products. *PCR Methods Appl* 1993;2:293-300.
- 13) Suh IB, Kim YK. Relationship of *Helicobacter pylori* IgG seroprevalence with Lewis (a,b) blood group phenotype/genotype. *Korean J Blood Transfus* 2001;12:35-45.
- 14) Napierala D, Garcia-Rojas X, Sam K, et al. Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Mol Genet Metab* 2005;86:257-68.
- 15) Cowles JW, Cox A, McMicen A, Blumberg N. Comparison of monoclonal antisera with conventional antisera for Lewis blood group antigen determination. *Vox Sang* 1987;52:83-4.
- 16) Young WW Jr, Johnson HS, Tamura Y, et al. Characterization of monoclonal antibodies specific for the Lewis a human blood group determinant. *J Biol Chem* 1983;258:4890-4.
- 17) Rouger P, Noizat-Pienne F, Le Pennec PY. Advances in the use of monoclonal antibodies for blood group testing. *Transfus Clin Biol* 1997;4:345-9.
- 18) Good AH, Yau O, Lamontagne LR, Oriol R. Serological and chemical specificities of twelve monoclonal anti-Le^a and anti-Le^b antibodies. *Vox Sang* 1992;62:180-9.
- 19) Ameno S, Ameno K, Kinoshita H, Tanaka N, Ijiri I. Lewis genotyping by the PCR-RFLP method in a Japanese population and its evaluation in forensic analysis. *Int J Legal Med* 1997;110:232-4.

- 20) Nishihara S, Narimatsu H, Iwaski H, et al. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. *J Biol Chem* 1994;269:29271-8.
 - 21) Yazawa S, Oh-kawara H, Nakajima T, Hosomi O, Akamatsu S, Kishi K. Histo-blood group Lewis genotyping from human hairs and blood. *Jpn J Hum Genet* 1996;41:177-88.
 - 22) Kukowska-Latallo JF, Larsen RD, Nair RP, Lowe JB. A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase. *Genes Dev* 1990;4:1288-303.
 - 23) Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. Sequence and expression of a candidate for the human secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (*FUT2*). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J Biol Chem* 1995;270:4640-9.
 - 24) Kudo T, Iwasaki H, Nishihara S, et al. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. II. Secretor gene inactivation by a novel single missense mutation A385T in Japanese non-secretor individuals. *J Biol Chem* 1996;271:9830-7.
 - 25) Liu Y, Koda Y, Soejima M, Uchida N, Kimura H. PCR analysis of Lewis-negative gene mutations and the distribution of Lewis alleles in a Japanese population. *J Forensic Sci* 1996;41:1018-21.
-