

In-House PCR법을 이용한 HLA-B27 형별 검사의 유용성 검토; PCR 검사 키트와 In-House PCR의 일치율 비교

조선영 · 이광길 · 박수연 · 이희주

경희의료원 진단검사의학과

Utility of In-House PCR for HLA-B27 Typing: Comparison of Concordance Rate between PCR Kit and In-House PCR

Sun Young Cho, M.D., Kwang Gil Lee, M.T., Su Yon Park, M.D., and Hee Joo Lee, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Kyung-Hee Medical Center, School of Medicine, Kyoung-Hee University, Seoul, Korea

Background : Commercial kits of PCR method are widely used in HLA-B27 typing; however, their cost is relatively high. In this study, we evaluated the utility of an in-house PCR method by comparing it with that of a commercial kit.

Methods : HLA-B27 typing was done in 188 patients by using two PCR methods, Absolute™ HLA-B27 PCR kit (Biosewom, Korea) and an in-house PCR method. The primers used in the in-house method were prepared by Bioneer (Korea). Both PCR tests were done by Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., USA).

Results : The commercial kit and in-house PCR showed 100% concordance rate with each other in HLA-B27 typing. Of 188 patients tested 72 (38.3%) were positive and 116 (61.7%) were negative by the both tests. Of 62 patients with ankylosing spondylitis, 50 were positive (80.7%).

Conclusions : The in-house PCR is a reliable and cost-effective method and can replace or supplement commercial kits for HLA-B27 typing. (*Korean J Lab Med* 2008;28:239-43)

Key Words : HLA-B27, In-house PCR, DNA typing

서론

사람 백혈구 항원(HLA)은 주 조직적합 복합체(MHC) 유전자의 산물로서 인체의 면역계에서 자기와 비자기를 구별하고 세포 간 의사소통을 하는 데 필수적인 물질로 알려져 있다[1]. HLA는

이식분야에서 그 역할이 가장 잘 규명되어 있지만 일부 HLA는 특정 질환과의 높은 연관성을 가지고 있음이 알려져 있다[2]. 대표적으로 HLA-B27은 강직성척추염에서 높은 연관성을 보이며 그 외에도 포도막염, 건선, 아밀로이드증, 대동맥염, 혈액암 등과 연관되어 있다[2]. 강직성척추염은 척추와 천장골 관절을 침범하는 전신성 염증성 질환이며 일부에서는 심장과 장, 피부의 침범을 보이기도 한다[1]. 일반적으로 남성에서 우위를 보이거나 남녀에게서 공히 나타날 수 있는 질환이며 늦은 10대나 빠른 20대에 척추관절병증(spondyloarthropathy)이 시작된다. 또한 HLA-B27이 양성인 사람이 일등친(first degree relative) 중에 강직성 척추염 환자가 있다면 그 환자에서 강직성척추염

접 수 : 2008년 1월 30일 접수번호 : KJLM2113
수정본접수 : 2008년 4월 16일
게재승인일 : 2008년 4월 17일
교신저자 : 이희주
우 130-701 서울시 동대문구 회기동 1
경희대학교 의과대학 진단검사의학과
전화 : 02-958-8672, Fax : 02-958-8609
E-mail : leehejo@khmc.or.kr

이 발병할 위험도가 세 배정도 증가한다[1].

고식적 HLA-B27 typing은 전통적인 도움체 의존 세포독성 (complement-dependent cytotoxicity)법을 이용하여 세포표면에 존재하는 HLA 항원을 검사하는 방법에 기초하였다. 최근에는 유세포 분석을 이용한 HLA-B27 항원 검출법도 이용되고 있다. 이러한 세포표면의 항원을 이용한 HLA-B27 형별 검사법은 분석을 위해 살아있는 세포가 요구된다는 단점을 가지며 HLA-B27에 대한 항체는 B7이나 B40과 같은 항원에 교차 반응성을 가지므로 위양성이 유발될 수도 있다[1]. HLA-B27 항원을 암호화하는 유전자를 분석하는 방법은 이러한 위양성을 줄일 수 있으며 PCR with specific oligonucleotide probe (PCR-SSO)와 PCR with sequence-specific primer (PCR-SSP) 등의 방법이 있다[3].

HLA-B27 검사는 오래전부터 혈청학적 방법을 이용하여 검사되어 왔으나 제품 공급이 중단되면서 PCR법에 기반한 제품들로 대부분 대체되었다. 경희의료원에서는 HLA-B27 형별 검사에 상품화된 Absolute™ HLA-B27 키트(바이오세움, 서울, 대한민국)를 사용하여 왔다. 그러나 PCR법은 혈청학적 방법에 비해 매우 비싸다는 문제점이 있어 in-house PCR을 개발하여 비용을 절감하고자 하였으며 또한 상품화된 키트와 in-house PCR법의 비교를 통해 in-house PCR에 대한 유용성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

경희의료원에서 2004년 6월부터 8월까지 HLA B27 검사가 의뢰된 환자 70명과 2006년 7월부터 2007년 4월까지 HLA B27 검사가 의뢰된 환자 117명의 환자의 총 188개의 EDTA 혈액 검체에 대해 2가지 방법으로 DNA 형별 검사를 시행하였다. HLA-B27 DNA 형별 검사는 PCR법을 이용한 상품화된 Absolute™ HLA-B27 PCR 키트(바이오세움)를 이용한 방법과 Bunce 등과 Zino 등이 기술한 시발체를 제작하여 PCR을 시행하였다[4, 5]. 매 검사 시 양성과 음성 대조군을 포함하여 시행하였다.

1. 키트를 이용한 HLA-B27 형별 검사

검사에 사용된 DNA 추출용 시약과 PCR 혼합제, Taq 중합효소는 모두 검사 키트 내에 포함된 것을 사용하였다. 전반적인 검사과정(DNA 추출, 유전자 증폭, 전기영동, 결과확인)은 모두 검사키트 제공 시 동봉된 검사지침서에 따라 수행하였다.

1) DNA의 추출

환자의 EDTA 혈액 100 μ L와 증류수 1,000 μ L를 상온에서 소용돌이 혼합기(vortex mixer)로 잘 혼합한 후 13,000 rpm으로 1분간 원침하여 상층액을 제거한 후 다시 위의 과정을 두 번 더 반복하였다. DNA 추출 용액 50 μ L를 첨가하고 소용돌이 혼합기로 잘 혼합하여 56°C에서 15분간 방치한 후 다시 잘 혼합하였다. 100°C로 8분간 가열한 후 13,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 PCR 검사에 이용하였다.

2) 유전자 증폭

PCR 혼합제와 PCR 중합효소를 3:1의 비율로 혼합한 후 이 혼합액 15.5 μ L와 검체에서 추출된 상층액 4.5 μ L를 PCR 시험관에 분주하고 94°C에서 5분 초기 변성과정을 거친 후, 세 cycle 즉 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 30회 반복 시행한 후 72°C에서 5분간 연장처리하였다.

3) 결과의 판정

증폭된 DNA 산물 6 μ L를 1.5% agarose gel을 이용하여 120 volt에서 30분간 전기 영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 투과조명기에서 HLA-B27 및 internal control (베타 글로빈, 268 bp) 밴드를 확인하였다. Internal control 밴드를 관찰할 수 있는 결과에서 HLA-B27 결과를 확인할 수 있을 때 HLA-B27 양성으로 판정하고 internal control 밴드만 확인 가능하였을 때는 음성으로 판정하였다.

2. In-house PCR을 이용한 HLA-B27 형별 검사

1) DNA의 추출

DNA의 추출은 키트를 이용한 HLA-B27 형별 검사에서와 동일한 방법을 사용하였고 분리한 DNA 추출물은 두 방법에 동시에 사용되었다.

2) 시발체(HLA B27 280)

Bunce 등[4]과 Zino 등[5]이 기술한 시발체들을 바이오니아사(대전, 대한민국)에 합성 의뢰하여 사용하였다(Table 1). Internal control로는 암억제 유전자로 알려진 p53 유전자에 특이적인 시발체를 제작하여 사용하였다.

3) 유전자 증폭

Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, CT, USA)을 이용하여 PCR을 시행하였다. 각

각의 dNTP (코아바이오시스템, 서울, 대한민국, 각각 200 μ M)와 internal control용 시발체(0.2 μ M), HLA-B27에 대한 시발체(1 μ M)로 혼합물을 만들고 여기에 1)에서 추출된 상층액(약 2.0 μ L)과 중합효소(이노메디텍, 오산, 대한민국, 약 0.5 U)를 첨가하여 최종적으로 20 μ L가 되게 하였다. 이를 PCR용 시험관에 분주하고 키트를 이용한 HLA-B27 형별 검사에서와 동일하게 PCR을 시행하였다.

4) 결과의 판정

키트를 이용한 HLA-B27 형별 검사에서와 동일하게 시행하였다.

결 과

1. 대상 환자군

환자 188명의 평균 나이는 37.0세이며 남녀 비율은 2.1:1이었다. 이 중 강직성척추염으로 이미 진단받은 환자가 60명으로 가장 많았고 홍채모양체염이 28명, 척추관협착증이 11명으로

Table 1. Patient characteristics and HLA-B27 typing results

Diseases	N. of patients	HLA- B27 positive cases N (%)	Mean age yr	Sex ratio M/F
Ankylosing spondylitis	62	50 (80.7)	35.9	48/14
Iridocyclitis	28	6 (21.4)	38.9	17/11
Rheumatism	16	5 (31.3)	32.1	11/5
Arthrosis	16	1 (6.3)	32.9	12/4
Spinal stenosis	11	2 (18.2)	36.2	6/5
Joint pain/myalgia	11	2 (18.2)	27.6	11/0
Optic neuritis	7	0 (0)	55.9	0/7
Other articular diseases*	8	4 (50.0)	34.8	5/3
Other diseases [†]	29	2 (6.7)	42.3	17/12
Total	188	72 (38.3)	37.0	127/61

*, HLA-B27 positive in synovitis, osteochondrosis and pyogenic arthritis; [†], HLA-B27 positive in diabetes and cerebral infarct.

Abbreviations: F, female; M, male; N, number.

Table 2. Characteristics of primers used in the in-house PCR

Primer name	Primer sequence	Locus	Primer length (bp)	Product length (bp)
B27 280	Sense	B*2701-2709	19	149/150
	Antisense		19	
			20	
Internal control	Sense	P53 exon 8	25	236
	Antisense		25	

Abbreviation: bp, base pair.

뒤를 이었다(Table 2). 질환별 양성률을 살펴보면 강직성척추염에서 가장 높아 80.7%를 차지하였고 류마티즘이 31.3%, 홍채섬모염이 21.4%를 나타내었다. 188개의 환자 검체 중 양성을 보인 72명 중에서 강직성척추염이 차지하는 비율은 68.1%였다.

2. PCR 결과

양성을 보인 72예에서는 키트와 in-house PCR (시발체 B27 280)의 두 방법에서 모두 양성을 나타냈으며(38.3%) 음성을 보인 116예에서는 두 방법에서 모두 음성을 보여 100%의 일치율을 나타내었다(Table 3). 2004년에 수집된 70개의 환자 검체에 대하여는 in-house PCR을 시행한 각각에 대한 결과를 살펴보았다. 70개의 환자 검체 중 20예에서는 키트와 in-house PCR에서 모두 양성을 나타냈으며 52예에서는 모두 음성을 보여 세 결과 간에 100%의 일치율을 보였다.

또한 in-house PCR의 경우, 상품화된 키트에 비해 90% 정도의 재료비 절감 효과가 있었다(Fig. 1).

고 찰

PCR법은 환자의 유전자에 HLA-B27의 존재유무를 확인하는데 있어서 정확하고 간편한 방법이다[2]. Lucotte와 Burekel은 유세포 분석법을 뛰어넘는 PCR법의 몇 가지 장점에 대해 언급한 바 있다. 첫째, 하루에 수백 건에 달하는 검사를 수행할 수 있는 용량을 가지며 둘째, 수시간 내에 결과를 낼 수 있으며 셋

Table 3. Comparison of the test results in 188 patients by PCR kit and in-house PCR

		In-house PCR		Total
		Positive	Negative	
Commercial Kit (Biosewoom)	Positive	72	0	72
	_negative	0	116	116
Total		72	116	188

Concordance rate=100%.

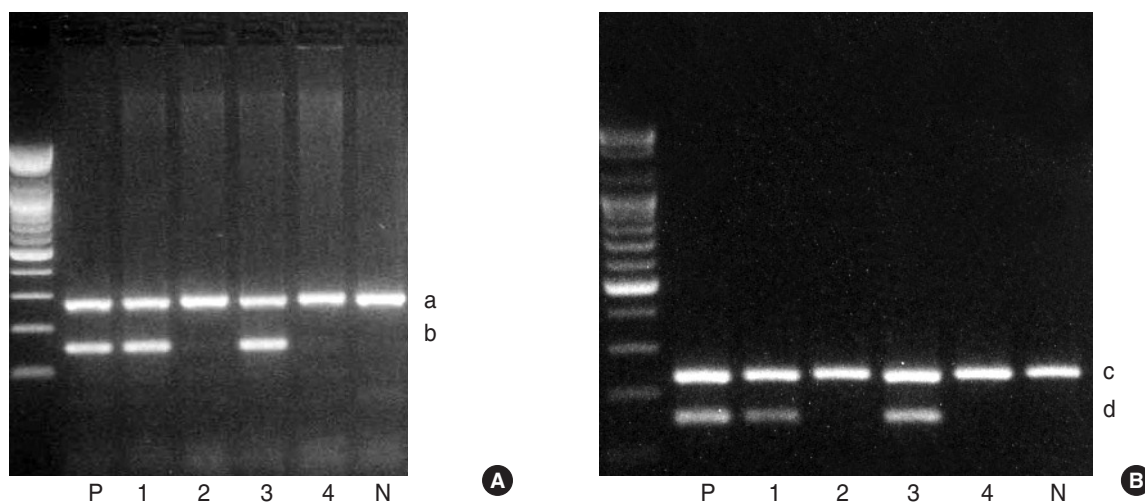


Fig. 1. Results of HLA-B27 typing. (A) Absolute™ HLA-B27 PCR kit (Biosewom), (B) In-house PCR with B27 280 primer. Lanes 1-4, patient 1-4; P, positive control; N, negative control; a, internal control (beta-globin); c, internal control (P53 exon 8); b and d, HLA B27 band.

째, DNA 형태로 검체를 보존할 수 있고 넷째, 유세포 분석법에 비해 한 검사당 저렴한 가격을 가지며 다섯째, 항체가 갖는 교차 반응성에 의한 위양성을 피할 수 있다는 점이다[6]. 또한 유세포 분석 시 경계치(cut-off) 부근의 결과 등 판정이 어려울 때에도 도움이 될 수 있다[7]. 그러나 PCR 법은 고유의 단점인 검체 간 오염에 의한 위양성의 가능성을 염두에 두고 검사 시 검체 간 오염을 줄이기 위해 주의를 기울여야 한다[8].

이러한 PCR법은 키트로 보급되어 많은 검사실에서 사용되고 있고 특히 대형 검사실에서 HLA-B27 형별 검사에 폭넓게 쓰이고 있는 방법이다. 그러나 검사 비용이 비싸 소규모의 검사실에서는 적용하기 어려울 수 있다. 저자들은 이번 연구를 통해 키트를 이용한 PCR법과 in-house PCR의 일치율의 검토를 통해 in-house PCR의 유용성을 확인해 보고자 하였다. 상품화된 키트와 in-house PCR은 모든 검체에서 동일한 결과를 나타내었고 in-house PCR은 편의성은 조금 떨어지나 재료비 면에서 상품화된 키트에 비해 약 1:10 정도로 저렴하므로 저자들이 개발한 in-house PCR은 정확할 뿐만 아니라 비용-효율적이라 판단된다. 그러므로 in-house PCR로서 상품화된 키트를 대체하거나 상호 보완적으로 사용이 가능하다고 사료되었다.

HLA-B27 검사는 일반인에게는 8% 정도만 양성으로 나타나나 강직성척추염 환자에서는 90% 정도에서 양성을 나타낸다고 알려져 있다[1, 2]. 본 연구에서는 강직성척추염에서 양성률 80.7%를 나타내었고(남자; 83.3%, 여자; 71.4%), 일반질환 군에서는 6.7%를 나타내었다. 이 등[9]은 한국인 412명의 강직성척추염 환자를 대상으로 한 연구에서 93%의 환자가 미세립프구독성 검사를 통한 HLA-B27 형별검사에서 양성을 나타냈다고

보고하였다. PCR법만으로 진행된 본 연구에서는 이보다 낮은 양성률을 보여 위음성의 존재 가능성도 배제할 수 없었으나 미세립프구독성검사와 PCR법의 양성률이 약간 다르게 보고된 보고들을 고려해 볼 때 강직성척추염 환자를 대상으로 한 검사 방법 간의 비교도 필요할 것이라 생각되었다[3, 10].

Inaoui 등[11]은 53명의 미분화성 만성단일관절염(undifferentiated chronic monoarthritis) 외래환자들을 대상으로 한 후향적 연구에서 8명의 HLA-B27 양성환자 중 5명이 후에 척추관절증으로 진행하여 그 빈도가 HLA-B27 음성인 미분화성 만성단일관절염 환자들보다 통계적으로 유의하게 높았다고 보고하였다. 본 연구에서 HLA-B27 형별 검사가 의뢰된 환자 중 강직성척추염 외의 관절계 질환자는 총 62명이었으며 이 중 14명(22.6%)이 HLA-B27 양성으로 확인되었다. 이 환자들에 있어서 기존의 질환 치료 후에도 지속적인 추적을 통해 척추관절증의 발병을 감시하고 이러한 추적 조사를 통한 강직성척추염에 대한 HLA-B27의 예측능에 대한 연구도 필요할 것으로 사료되었다.

요 약

배경 : PCR 키트를 통한 HLA-B27 검사는 최근 많이 사용되고 있는 방법이나 그 비용을 무시할 수 없다. 본 연구에서는 상품화된 키트와 in-house PCR법의 비교 검토를 통해 in-house PCR에 대한 유용성을 검토하고자 하였다.

방법 : 총 188명의 환자에서 두 가지 PCR법을 이용하여 HLA-B27 형별 검사를 시행하였다. 하나는 상품화된 Abso-

lute™ HLA-B27 PCR 키트(바이오세움, 대한민국)을 이용한 방법이며, 다른 하나는 시발체(바이오니아, 대한민국)를 제작하여 시행한 in-house PCR법이었다. 두 방법 모두 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Centus Corp., USA)을 통해 증폭이 이루어졌다.

결과 : HLA-B27 형별 검사에 있어서 키트와 in-house PCR의 두 방법은 100%의 일치율을 나타내었다. 양성을 보인 72예에서는 키트와 in-house PCR의 두 방법에서 모두 양성을 나타냈으며(38.3%) 음성을 보인 116예에서는 두 방법에서 모두 음성을 보였다. 62명의 강직성척추염 환자에서의 양성률은 80.7%로 나타났다.

결론 : In-house PCR의 검사결과는 높은 신뢰도를 보여 주었고 비용면도 상품화된 키트에 비해 저렴하므로 in-house PCR로서 상품화된 키트를 대체하거나 상호 보완적으로 사용이 가능하다고 사료되었다.

참고문헌

- Seipp MT, Erali M, Wies RL, Wittwer C. HLA-B27 typing: evaluation of an allele-specific PCR melting assay and two flow cytometric antigen assay. *Cytometry B Clin Cytom* 2005;63:10-5.
- Downing J, Coates E, Street J, Hammond L, Rees TJ, Pepperall J, et al. A high-resolution polymerase chain reaction-sequence-specific primer HLA-B*27 typing set and its application in routine HLA-B27 testing. *Genet Test* 2006;10:98-103.
- Nathalang O, Tantimavanich S, Nillakupt K, Arnutti P, Jaruchaimontree C. HLA-B27 testing in Thai patients using the PCR-SSP technique. *Tissue Antigens* 2006;67:233-6.
- Bunce M, O' Neill CM, Barnardo MC, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;46:355-67.
- Zino E, Di Terlizzi S, Carugo C, Baggi L, Galli A, Bonini C, et al. Rapid detection of all HLA-B*27 alleles (B*2701-B*2725) by group-specific polymerase chain reaction. *Tissue Antigens* 2004;63:88-92.
- Lucotte G and Burckel A. DNA typing of HLA-B27 by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1997;11:313-5.
- Bonnaud G, Aupetit C, Preux PM, Cogne M, Drouet M. Optimisation of HLA-B27 testing by association of flow cytometry and DNA typing. *Clin Rheumatol* 1999;18:23-7.
- Lee KW and Kim JY. HLA-B27 typing using PCR-SSP. *Korean J Clin Pathol* 1996;16:744-50. (이경화 및 김진영. PCR-SSP법을 이용한 HLA-B27 검사. *대한임상병리학회지* 1996;16:744-50.)
- Lee JH, Jun JB, Jung S, Bae SC, Yoo DH, Kim TW, et al. Higher prevalence of peripheral arthritis among ankylosing spondylitis patients. *J Korean Med Sci* 2002;17:669-73.
- Bae JS, Kim YR, Choi HI, Cho YJ. Comparison of HLA-B27 typing methods- PCR-SSP, microlymphocytotoxicity, and flow cytometry-. *Korean J Clin Pathol* 2000;20:198-203. (배준수, 김영리, 최현일, 조윤정. HLA-B27 검사법의 비교- PCR-SSP법, 미량 독성 림프구법, 유세포분석법 비교. *대한임상병리학회지* 2000;20:198-203.)
- Inaoui R, Bertin P, Preux PM, Treves R. Outcome of patients with undifferentiated chronic monoarthritis: retrospective study of 46 cases. *Joint Bone Spine* 2004;71:209-13.