

HLA Class I DNA 검사용 시약 BioSewoom™ HLA-A, -B, -C PCR/SSP의 평가

차충환 · 김명희 · 정희정 · 최성은 · 오홍범

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과

Evaluation of BioSewoom™ HLA-A, -B, -C PCR/SSP Kit

Choong-Hwan Cha, M.D., Myeong Hee Kim, M.D., Hee-Jung Chung, M.D., Sung-Eun Choi, M.S., and Heung-Bum Oh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine, and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background : Human leukocyte antigen (HLA) typing based on polymerase chain reaction (PCR) is rapidly replacing the conventional serological method. This study was intended to evaluate BioSewoom™ HLA-A, -B, -C PCR/SSP kit (BioSewoom SSP) which had recently been developed in Korea.

Methods : A total of 158 samples from domestic (21) and international (137) HLA proficiency testing (PT) were genotyped with BioSewoom SSP, and its results were compared to consensus results. For comparison with INNO-LiPA HLA-A, -B, -C Typing Kit (INNO-LiPA, Innogenetics, Belgium), 20 samples of Koreans were genotyped with both kits for each HLA-A, -B, -C locus.

Results : Among the 21 samples of domestic PT, BioSewoom SSP showed ambiguities as follows: 4 samples (19.0%) in HLA-A, 6 (28.6%) in HLA-B, and 1 (4.8%) in HLA-C. The ambiguities could be resolved by considering the allele distribution of Koreans. Among the 137 samples from international PT, BioSewoom SSP also showed ambiguities as follows: 12 samples (8.8%) in HLA-A, 26 (19.0%) in HLA-B and 6 (4.4%) in HLA-C. Considering the allele distribution of Koreans, the serologic equivalents obtained from BioSewoom SSP showed a full agreement with those of INNO-LiPA in all the loci tested. Twelve (0.007%) among 1,760 PCR reactions from the 21 samples of domestic PT and 20 patient samples produced faint nonspecific bands, but it was negligible. PCR failure of internal control just barely occurred (15 PCR reactions, 0.009%), but it had no bearing on allele assignment.

Conclusions : The performance of BioSewoom SSP was comparable to that of INNO-LiPA. All the ambiguities could be resolved by considering the allele distribution of Koreans. It is concluded that BioSewoom SSP has good performance to be used in routine HLA laboratories. (*Korean J Lab Med* 2007;27:360-8)

Key Words : HLA, SSP, DNA typing

접 수 : 2007년 5월 8일 접수번호 : KJLM2040
수정본접수 : 2007년 8월 7일
게재승인일 : 2007년 8월 10일
교 신 저 자 : 오 홍 범
우 138-736 서울시 송파구 풍납2동 388-1
서울아산병원 진단검사의학과
전화 : 02-3010-4505, Fax : 02-478-0884
E-mail : hboh@amc.seoul.kr

서 론

인간 주조직적합성 항원(human histocompatibility complex)은 면역계에서 자기와 비자기를 구분하는 중요한 기능 때문에 장기 및 조혈모세포이식에 있어 공여자와 수여자 간의 적합성을 확

인하기 위한 필수적인 검사로 시행되고 있다. HLA-A, -B, -C 형별검사를 위해 90년대 이전에는 혈청학적 방법을 주로 이용하였으나 1990년 이후 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 기반을 둔 DNA 검사들이 개발되면서 혈청학적 검사의 여러 가지 단점을 보완할 수 있는 DNA 검사법의 이용이 점차 증가하고 있다[1, 2]. DNA 검사법은 혈청학적 검사법에서 흔히 보이는 교차반응 및 약한 반응성 등으로 인해 모호한 결과를 보이는 예들이 매우 적어 판독이 다소 용이하다는 장점이 있다[3, 4].

현재 일선 검사실에 많이 사용되고 있는 PCR 기반 DNA 검사법은 reverse-sequence specific oligonucleotide probe (SSOP) 기법과 sequence specific primer (SSP) 기법 등이다[2]. Reverse-SSOP 기법은 PCR 증폭 이후에 스트립에 고정된 탐식자와의 보합반응 양상을 토대로 결과를 판정하는 방법으로, 많은 양의 검체를 동시에 처리할 수 있는 장점이 있는 반면 PCR 이후에 보합과정을 거치므로 시간이 다소 연장되는 점과 양성 밴드 판정에 있어 애매한 경우가 간혹 발생한다는 단점이 있다. 반면 PCR-SSP 기법은 PCR 시발체의 염기서열 차이를 이용하여 유전자를 선택적으로 증폭하며, PCR 시발체 세트수를 조절하여 원하는 수준의 형별을 판정하는 기법이다[5]. PCR-SSP 기법은 PCR 과정에서 특정 대립유전자군만 증폭하여 그 결과를 판정하기 때문에 PCR 이후 전기영동을 통해 바로 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있는 반면 다수의 검체를 동시에 검사하기가 어렵다는 단점이 있다[1, 6-9]. 본 연구에서는 최근 국내에서 개발된 PCR-SSP 방법의 DNA 형별검사 키트인 BioSewoom™ HLA-A, -B, -C PCR/SSP Kit (BioSewoom SSP)를 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

총 218검체를 이용하여 BioSewoom SSP 성능을 평가하였다. 이 중 158검체는 외부정도관리 성적을 분석한 것으로 국내 HLA 신빙도 조사(11-18차, 2003-2006년)에 사용된 21검체와(Table 1) UCLA International Cell Exchange Program (ICEP) 및 American Society for Histocompatibility & Immunogenetics (ASHI) proficiency survey 137검체로(Table 2) 대립유전자(4 digit) 수준의 HLA-A, -B, -C 형별을 알고 있는 검체였다. 나머지 60검체는 환자 검체로 HLA-A, -B, -C 각 유전자좌당 20 검체씩으로 한국인 대립유전자 빈도[10]가 1.0% 이상인 형별이 최소한 한 예 이상 포함되도록 선정한 것이었다. 이들 검체에 대해서는 INNO-LiPA HLA-A Update, INNO-LiPA HLA-B Update Plus, INNO-LiPA HLA-C (Innogenetics, Ghent, Belgium) (이하 INNO-LiPA)로 검사하여 INNO-LiPA 형별판

정 결과와 BioSewoom SSP 결과를 비교하였다. 유전자좌별 각 20검체는 모두 이형접합체였다. 모든 검체에서 Wizard Genomic DNA purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA)로 DNA를 추출하여 검사에 사용하였다.

2. BioSewoom SSP를 이용한 HLA-A, -B, -C DNA 형별 검사

DNA의 순도(A260/A280)가 1.6-2.0, 농도가 30-40 ng/ μ L 이 되도록 조절하여 사용하였다. Genomic DNA (HLA-A, -B, -C 각 30 μ L, 60 μ L, 20 μ L씩)와 증류수(HLA-A, -B, -C 각 70 μ L, 140 μ L, 40 μ L씩)를 키트 내의 mixture A (HLA-A, -B, -C 각 150 μ L, 300 μ L, 110 μ L씩)에 혼합하였다. SSP plate (HLA-A, -B, -C 각 24 웰, 48 웰, 16 웰)의 각 웰에 혼합액을 10 μ L씩 분주하고 뚜껑을 덮은 후 HLA 유전자를 증폭시켰다. PCR은 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하였다. HLA-A와 -B 유전자좌 PCR은 95°C에서 2분 처리한 후 94°C 20초, 61°C 50초, 72°C 40초의 과정을 30회 반복하고 마지막에 72°C에서 2분간 반응시켰다. HLA-C 유전자좌 PCR은 95°C에서 5분 처리한 후 94°C 15초, 61°C 50초, 72°C 30초의 과정을 30회 반복하고 마지막에 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR 산물을 2% agarose gel에 5 μ L씩 분주하여 200 volt로 25분간 전기영동한 후 0.375 μ g/mL ethidium bromide 용액으로 염색하고 UV transilluminator에서 PCR 산물을 확인하였다(Fig. 1). 양성밴드가 나타난 lane을 BioSewoom™ HLA SSP INT 소프트웨어

Table 1. HLA genotypes of 21 samples from the HLA typing proficiency survey (2003-2006) in Korea

ID	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-C	HLA-C
C03-1	2402	2402	0702	5101	0702	1402
C03-2, C04-2, C05-5	0206	2601	2705	5401	0102	0304
C03-3	1101	2402	4403	5502	1203	1403
C03-4	2402	3101	0702	4801	0303	0702
C03-5, 05-1	0201	3001	1302	2705	0102	0602
C03-6	0101	3303	0801	5801	0302	0702
C04-1	0206	3303	5101	5801	0302	1402
C04-3	0206	0206	5101	5502	0102	1402
C04-4	2610	3303	0702	5101	0302	0702
C04-5	2402	3303	0702	5801	0302	0702
C04-6	0201	0205	5001	5101	0602	0704
C05-2	2601	2602	1301	4002	0102	0304
C05-3	0203	3004	1401	3802	0702	0802
C05-4	0201	2601	3501	5401	0304	1402
C05-6	1101	2602	0801	3901	0702	0702
C06-1	2402	2402	5101	5901	0102	1402
C06-2	0201	2402	3901	1501	0401	0702
C06-3	0201	0201	4001	1518	0304	0704
C06-4	0206	1101	1501	5101	0401	1402
C06-5	1102	2402	3501	4001	0303	0304
C06-6	0206	1101	1302	4001	0401	0401

(BioSewoom Inc., Seoul, Korea)에 입력하여 HLA-A, -B, -C의 형별을 판정하였다(Fig. 2).

3. INNO-LiPA를 이용한 HLA-A, -B, -C DNA 형별검사

DNA 농도가 50-120 ng/ μ L이 되도록 한 후 키트 내의 primer mix와 Taq polymerase를 사용하여 검체의 HLA 유전자를 증폭시켰다. PCR은 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal을 사용하여 96°C에서 5분 처리한 후 96°C 30초, 64°C 50초, 72°C 50초의 과정을 5회, 96°C 30초, 62°C 50초, 72°C 50초의 과정을 5회,

96°C 30초, 60°C 50초, 72°C 50초의 과정을 10회, 96°C 30초, 55°C 50초, 72°C 50초의 과정을 15회 반복하고 마지막에 72°C에서 10분간 반응시켰다. 역보합반응(reverse hybridization)은 SSOP (HLA-A, -B, -C 유전자좌당 각 43개, 66개, 28개)가 부착되어 있는 nitrocellulose strip (검체 1개당 HLA-A와 -B 각 2개, -C 1개)을 사용하여 시행하였다. 보합반응은 변성액(denaturation solution)으로 실온에서 5분간 DNA를 변성시킨 후, 보합액(hybridization solution)으로 56°C 교반 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 stringent wash 용액으로 세척하였다. 발색반응은 20-25°C, 회전혼합기에서 시행하였고 형별판정은 Innogenetics사에서 제공하는 소프트웨어 프로그램(LiPAS™ for LiPA HLA V5.00)을 사용하였다.

Table 2. HLA-A, -B, -C allele frequencies of 137 samples from UCLA International Cell Exchange Program and ASHI proficiency survey (2n=274)

HLA-A	AF (%)	HLA-B	AF (%)	HLA-B	AF (%)	HLA-C	AF (%)
0101	9.5	0702	5.1	3905	0.7	0102	6.6
0201	18.3	0706	0.4	3906	0.7	0202	4.7
0202	0.4	0801	4.7	3908	0.4	0210	0.4
0205	0.4	1301	1.1	3915	0.4	0302	2.6
0206	4.7	1302	0.7	3920	0.4	0303	6.2
0207	2.6	1401	2.2	4001	3.3	0304	4.7
0210	0.4	1402	3.3	4002	4.4	0306	0.4
0217	0.4	1501	2.2	4006	1.5	0316	0.4
0301	6.9	1502	0.7	4010	0.4	0401	11.7
0302	0.7	1503	1.8	4102	0.4	0403	0.4
1101	9.5	1508	0.4	4402	4.0	0413	0.4
2301	1.8	1510	0.7	4403	3.7	0501	5.5
2401	0.4	1511	0.4	4427	0.4	0602	3.3
2402	9.1	1512	0.4	4501	1.1	0701	9.9
2433	0.7	1515	0.4	4601	2.2	0702	10.2
2501	1.1	1516	0.4	4801	1.5	0704	1.5
2601	2.9	1517	0.7	4803	0.4	0706	0.7
2602	0.7	1518	0.4	4901	2.6	0718	0.4
2603	0.7	1525	0.4	5001	0.4	0801	4.4
2902	2.2	1530	0.4	5101	6.6	0802	5.5
3001	0.7	1535	0.4	5106	0.7	0804	1.1
3002	1.8	1801	2.9	5201	2.2	1202	2.6
3004	0.4	1803	0.4	5301	2.9	1203	3.3
3101	1.8	2703	0.4	5310	0.4	1204	0.7
3201	4.4	2704	0.4	5401	0.7	1402	1.8
3301	0.7	2705	2.6	5501	2.6	1403	0.4
3303	4.4	3501	0.7	5502	0.7	1502	3.3
3401	1.5	3502	0.7	5601	1.1	1504	0.4
3402	0.4	3503	1.5	5701	0.7	1505	0.4
3601	0.4	3505	0.4	5702	0.4	1601	4.0
6601	1.8	3508	0.4	5703	0.7	1604	0.4
6602	0.4	3512	1.5	5801	3.7	1703	0.4
6801	1.8	3516	0.4	5802	1.1	1801	1.1
6802	3.3	3517	1.1	5901	0.4	1802	0.7
6803	0.7	3526	0.4	7801	0.4		
7401	1.5	3801	1.5	8101	1.8		
8001	0.7	3901	1.5	8102	0.4		
		3902	0.7				

Abbreviations: UCLA, University of California, Los Angeles; ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; AF, allele frequency.

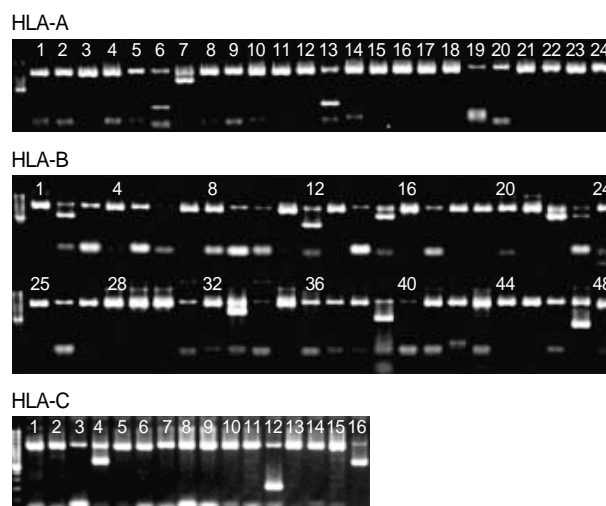


Fig. 1. Examples of BioSewoom SSP band pattern. HLA-A: positive on A6, A7 and A13 lanes; HLA-B: positive on B2, B12, B15, B22, B23, B33, B39 and B47 lanes; HLA-C: positive on C4, C12 and C16 lanes.

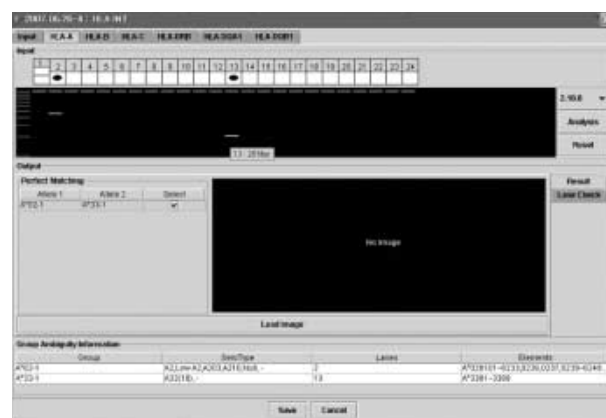


Fig. 2. Analysis window of BioSewoom™ HLA SSP INT software. Input of positive band information (A2, A13) generated output of perfect matching genotype combination (A*02-1/A*33-1).

결 과

1. BioSewoom SSP 형별검사 결과 및 국내의 신빙도조사 결과와의 비교

BioSewoom SSP로 국내 신빙도조사 21개 검체에 대하여 HLA 형별검사를 시행한 결과 HLA-A 4예(19.0%), HLA-B 6예(28.6%), HLA-C 1예(4.8%)가 두 개 이상의 결과 즉 미확정(ambiguity) 결과를 보였다(Table 3). 그러나 한국인의 HLA 대립유전자 분포를 고려하여 전혀 보고된 바 없는 대립유전자 조합을 제외하면 모든 예에서 단일 결과로 HLA-A, -B, -C 형별판정이 가능하였다. 국외 신빙도조사 137검체에서는 HLA-A 12예(8.8%), HLA-B 26예(19.0%), HLA-C 6예(4.4%)가 미확정 결과를 보였다(Table 4). 그러나 미확정 결과를 보인 모든 예에서 국외 신빙도조사 결과의 고해상도 형별이 BioSewoom SSP가 제시한 미확정 결과 중 하나에 부합하였다.

2. BioSewoom SSP 형별검사 결과 및 INNO-LiPA 결과 비교

HLA-A, -B, -C 각각 20환자 검체에 대한 BioSewoom SSP와 INNO-LiPA 검사 결과 HLA-A 9예 (BioSewoom SSP 8예, BioSewoom SSP & INNO-LiPA 1예), HLA-B 8예 (BioSewoom SSP 2예, INNO-LiPA 3예, BioSewoom SSP & INNO-LiPA 3예), HLA-C 1예 (INNO-LiPA 1예)에서 미확정 결과를 보였는데 (Table 5), 한국인에서 보고되지 않는 대립유전자 조합들을 제외하면 모든 예에서 두 검사법의 형별판정은 일치된 결과를 보였다.

3. BioSewoom SSP 키트의 비특이밴드 및 PCR 증폭 실패율

국내 신빙도조사 21검체, INNO-LiPA와 비교에 사용되었던 유전자좌별 20검체에 대한 BioSewoom SSP 검사 결과, 총 123 검사(41×3 유전자좌) 중 6검사(4.9%), 총 1,760개의 PCR 반응 중 12개의 PCR 반응(0.007%)에서 internal control 밴드보다 약하게 보이는 1-4개의 비특이밴드가 관찰되었다(Table 6). 비특이밴드는 internal control 밴드보다 훨씬 약하여 판독 시 무시해도 무방한 수준이었다. 또한 13개(10.6%) 유전자좌 검사, 총 1,760개의 PCR 반응 중 15개의 PCR 반응(0.009%)에서 1-2개의 웰에서 internal control이 증폭되지 않았다(Table 7). Internal control에 대한 PCR 증폭이 일어나지 않았던 15개의 PCR 반응은 재검시 모두 internal control의 증폭이 이루어졌으며 양성밴드는 관찰되지 않았다.

고 찰

혈청학적 형별검사를 위해서는 양질의 항혈청으로 만들어진 상업용 키트와 생존도가 높은 림프구의 확보 및 결과판독을 위한 숙련된 경험 등이 지속적으로 요구된다. 특히 항혈청은 로트간 반응도 및 교차반응 양상에 차이가 있을 수 있고, 동일 로트 내에서도 개체간 반응 양상이 다소 다르기 때문에 이를 적절히 해석하기 위해서는 전문적인 지식과 다수의 검체에 대한 판독경험을 필요로 한다. 따라서 소수의 검체를 다루는 검사기관에서는 경험 부족으로 인한 오류의 가능성이 있을 수 있다. 반면 DNA 검사법은 분자생물학적 수련과정을 거치면 HLA 판독 경험이 다소 적더라도 비교적 정확한 결과를 낼 수 있는 장점이 있다. 국내 HLA 신빙도조사 결과를 보더라도 혈청학적 형별검사는 2005년의 경우 HLA-A, B, C 각각 평균 98.8, 99.0, 95.9%, 2006년에는 각각

Table 3. Ambiguous patterns by BioSewoom SSP kit for 21 samples of the HLA proficiency survey in Korea

	ID	Consensus (high resolution)		BioSewoom SSP typing results		
HLA-A	C03-4	A*2402, A*3101	A*24, A*31	A*24, A*2914	A*2619, A*66	
	C05-6	A*1101, A*2602	A*11, A*26	A*26, A*2619		
	C06-4	A*0206, A*1101	A*02, A*11	A*0238, A*0278		
	C06-6	A*0206, A*1101	A*02, A*11	A*0238, A*0278		
HLA-B	C03-1	B*0702, B*5101	B*07, B*51	B*4205, B*51	B*0736, B*78	
	C03-4	B*0702, B*4801	B*07, B*48	B*48, B*48*	B*07, B*07 [†]	
	C04-3	B*5101, B*5502	B*51, B*55	B*5121, B*56	B*0736, B*78	
	C04-4	B*0702, B*5101	B*07, B*51	B*4205, B*51		
	C05-3	B*1401, B*3802	B*14, B*38	B*38, B*3932		
	C06-1	B*5101, B*5901	B*51, B*59	B*5115, B*5121	Cw*4, Cw*1606 Cw*4, Cw*0810	
	C06-6	Cw*0401, Cw*0401	Cw*4, Cw*4	Cw*4, Cw*12 [‡]		

*B*48-1, B*48-2/B*4802/08/12/13; B*48-2, B*48-2/B*4802/04/08/12/13; B*4804, B*4808/12; B*4808, B*4812/13; B*4812, B*4813 (B*48-1 is the primer set for detecting B*4801, 4803, 4807, 4811; B*48-2 is the primer set for detecting B*4805, 4809, 4810); [†]B*0703/16, B*07-2/B*0740 (B*07-2 is the primer set for detecting B*0705, 0706, 0734, 0735, 0737); [‡]Cw*04-1, Cw*12-2 (Cw*04-1 is the primer set for detecting Cw*04010101, 04010102, 040102, 040103, 040401, 040402, 0405, 0407, 0408, 0409N, 0410, 0411, 0412, 0413, 0414, 0415, 0416, 0417; Cw*12-2 is the primer set for detecting Cw*120302, 120303, 1209, 1214).

Table 4. Ambiguous patterns by BioSewoom SSP for 139 samples of UCLA International Cell Exchange Program and ASHI proficiency survey

	Consensus (high resolution)		BioSewoom SSP typing results	
HLA-A	A*010101, A*030101	A*01, A*03	A*01, A*0113	
	A*010101, A*680102	A*01, A*68	A*01, A*0250	
	A*010101, A*680301	A*01, A*68	A*01, A*0250	
	A*020101, A*2301	A*02, A*23	A*02, A*2424	
	A*020101, A*6802	A*02, A*68	A*02, A*0312	
	A*020601, A*310102	A*02, A*31	A*02, A*2914	
	A*020601, A*6802	A*02, A*68	A*0273, A*0312	
	A*030101, A*2301	A*03, A*23	A*03, A*2424	
	A*6601, A*680201	A*66, A*68	A*0250, A*66	
	A*6602, A*6802	A*66, A*68	A*0250, A*66	
HLA-B	B*070201, B*1402	B*07, B*14	B*14, B*4205	
	B*070201, B*390602	B*07, B*3906	B*3906, B*4205	B*3906, B*4812
	B*070201, B*400201	B*07, B*40	B*40, B*4808	
	B*070201, B*5802	B*07, B*58	B*23, B*2424	
	B*0706, B*5101	B*07, B*51	B*4205, B*51	B*0736, B*78
	B*080101, B*510101	B*08, B*51	B*08, B*78	
	B*080101, B*510101	B*08, B*51	B*8021, B*78	
	B*080101, B*510101	B*08, B*51	B*08, B*7804	B*08, B*3537
	B*1302, B*390101	B*13, B*39	B*1309, B*38	
	B*1401, B*140201	B*1401, B*14	B*1401, B*5504	B*14, B*3930
	B*1401, B*180101	B*1401, B*18	B*18, B*3930	
	B*140201, B*530101	B*14, B*53	B*14, B*5104	B*3526, B*5104
	B*1502, B*1515	B*75, B*62	B*0719, B*15	
	B*180101, B*180101	B*18, B*18	B*18, B*4802	B*0719, B*18
	B*350101, B*4427	B*35, B*44	B*4409, B*53	
	B*3512, B*3512	B*3512, B*3512	B*35, B*42	
	B*3512, B*5310	B*35, B*53	B*42, B*53	
	B*3801, B*5601	B*38, B*5601	B*39, B*5607	
	B*3908, B*530101	B*39, B*53	B*35, B*38	
	B*400102, B*400201	B*40, B*40	B*2712, B*40	
	B*400201, B*400201	B*40, B*40	B*2726, B*40	
	B*4801, B*5702	B*48, B*57	B*0703, B*57	
	B*510101, B*5601	B*51, B*5601	B*51, B*5509	B*5607, B*78
	B*550201, B*5901	B*55, B*5901	B*5610, B*5901	
HLA-C	Cw*0316, Cw*0802	Cw*0316, Cw*8	Cw*0403, Cw*8	
	Cw*040101, Cw*040101	Cw*4, Cw*4	Cw*4, Cw*1203	Cw*4, Cw*1606
	Cw*0403, Cw*120301	Cw*4, Cw*12	Cw*0316, Cw*12	
	Cw*050101, Cw*050101	Cw*5, Cw*5	Cw*5, Cw*0810	Cw*5, Cw*1203
	Cw*0802, Cw*0802	Cw*8, Cw*8	Cw*8, Cw*1203	
	Cw*160101, Cw*160401	Cw*16, Cw*16	Cw*12, Cw*16	Cw*0810, Cw*16

Abbreviations: See Table 2.

평균 100, 97.8, 98.8%의 정답률을 나타낸 반면, DNA 형별검사의 정답률은 2005년 HLA-A, B, C 각각 평균 99.5, 100, 100%, 2006년 각각 평균 100, 99.8, 100%로 DNA 검사법의 정답률이 다소 높음을 알 수 있다[11, 12].

HLA class I의 혈청학적 형별검사의 오류는 여러 연구보고에서 지적되어 왔다. HLA-A는 4.2-18.5%[13-16], HLA-B는 6.1-25.4%[15-19], HLA-C는 22.4-37.0%[10, 20-22] 정도로 일반적으로 반응도가 약한 HLA-C의 판정오류가 가장 흔하고, HLA-A와 -B 중에서는 다형성이 심한 HLA-B에서 오류의 정도가 다소 높은 편으로 알려져 있다. 오류의 수준은 인종에 따라 서로 차이가 나는 것으로 보고된 바 있다. 1997년 Mytilineos 등

[15]은 백인 426명에 대해 HLA-A, -B의 혈청학적 검사와 DNA 검사(PCR-SSP 및 PCR-SSOP)를 비교하였는데 HLA-A에서 18명(4.2%), HLA-B에서 26명(6.1%), HLA-A 혹은 B에서 36명(8.5%)의 불일치를 보고하였다. 혈청학적 검사의 오류는 혈청학적 검사의 무반응이 HLA-A 2.1%, HLA-B 2.8%이었고, DNA 동형접합체임에도 혈청학적 검사에서 이형접합체로 반응이 나타난 경우가 HLA-A 0.9%, HLA-B 0.0%이었다. 또한 결과 해석상의 모호함으로 인한 잘못된 판정이 HLA-A 2.1%, HLA-B 4.0%였다. 반면 1998년[16] 동일 연구자가 흑인 421명에 대해 HLA-A, -B 비교연구를 시행한 결과에서는 HLA-A에서 78명(18.5%), HLA-B에서 107명(25.4%), HLA-A 혹은 B에서 153

Table 5. Ambiguous genotypes shown in BioSewoom SSP and/or INNO-LiPA when the 20 samples of Koreans were tested

BioSewoom SSP typing results	INNO-LiPA typing results	Serologic Equivalent*
HLA-A		
A*01, A*31 A*01, A*2914	A*01, A*31 A*3105, A*3604	A1, A31
A*02, A*03 A*02, A*02 [†]	A*02, A*03	A2, A3
A*02, A*11 A*0238, A*0278	A*02, A*11	A2, A11
A*02, A*31 A*02, A*2914	A*02, A*31	A2, A31
A*11, A*31 A*11, A*2914	A*11, A*31	A11, A31
A*24, A*31 A*24, A*2914	A*24, A*31	A24, A31
A*26, A*31 A*26, A*2914	A*26, A*31	A26, A31
A*31, A*33 A*2914, A*33	A*31, A*33	A31, A33
HLA-B		
B*07, B*14 B*1401, B*4205 B*14, B*4812	B*07, B*14	B7, B14
B*15, B*40	B*15, B*40 B*40, B*95	B62, B61
B*15, B*46 B*15, B*1557	B*15, B*46 B*46, B*95	B62, B46
B*15, B*51	B*15, B*51 B*1508, B*520102 B*1524, B*780202	B62, B51
	B*3543, B*5202 B*51, B*95	
B*15, B*55	B*15, B*55 B*15, B*56 [†] B*55, B*95	B62, B55
B*35, B*51 B*53, B*78 B*5104, B*78 B*4406, B*78	B*35, B*51 B*53, B*78	B35, B51
B*48, B*51 B*07, B*51 [‡] B*0738, B*78	B*48, B*51 B*48, B*520102	B48, B51
B*51, B*52 B*52, B*5307	B*51, B*52	B51, B52
HLA-C		
Cw*3, Cw*15	Cw*3, Cw*15 Cw*0307, Cw*0308	Cw3, Cw*15

*B60, B61, B62 could be assigned according to the primer sets designed for discrimination. [†]A*02-1, A*02-2; A*02-2, A*02-2 (A*02-1 is the primer set for detecting A*020101-0233, 0236, 0237, 0239-0249, 0251-0255, 0257-0261, 0263-0272, 027401-0277, 0279-0286; A*02-2 is the primer set for detecting A*0234, 023501, 023502, 0256, 0262); [‡]B*1504, B*5610; B*1550, B*5601. [§]B*0703/16, B*51-1; B*0708, B*51-1; B*0708, B*5107/22; B*0732, B*51-1; B*0732, B*5107/22; B*0732, B*5114/37 (B*51-1 is the primer set for detecting B*510101, 510102, 510103, 510104, 510105, 510106, 510107, 5103, 5108, 5109, 5111N, 5112, 511301, 511302, 5117, 5118, 5119, 5120, 5124, 5126, 5127N, 5128, 5129, 5130, 5132, 5133, 5135, 5138).

Table 6. Cases showing nonspecific bands among a total of 123 tests by BioSewoom SSP

Typing results	Well No. of nonspecific band	Well No. of positive band		
		HLA -A	HLA -B	HLA -C
A*02, A*24	2, 6, 7	22		
A*24, A*30	6, 7, 10	19		
B*51, B*52	2, 9, 14, 15, 27, 31, 32, 33, 34, 41, 47		23	
B*35, B*44	2, 12, 14, 15, 22, 30, 33, 34, 47, 48		13, 23	
B*35, B*58	2, 12, 14, 15, 33, 34, 39, 47, 48		13, 23, 24	
B*40, B*51	1, 2, 8, 9, 14, 15, 19, 27, 30, 31, 33, 34, 41, 47, 48		6, 10, 13, 23	

명(36.3%)이 불일치 결과를 보여 백인에 비해 매우 높은 오류율을 보고하였다. 유형별로는 혈청학적 검사의 무반응이 HLA-A 4.8%, HLA-B 10.5%이었고, DNA 동형접합체임에도 혈청학적 검사에서 이형접합체로 반응이 나타난 경우가 HLA-A 1.9%, HLA-B 2.6%이었다. 결과해석의 모호함으로 인한 판정오류 또한 HLA-A 13.1%, HLA-B 15.7%이었다. 이렇게 인종에 따라 DNA 검사와 혈청학적 검사간 불일치율에 차이가 나는 것은 인종간 대립유전자 분포에 차이가 있어서 제한된 수의 항형청으로 판정할 때 해당 인종에서 흔히 검출되는 대립유전자 조합을 정확

Table 7. Cases with no internal control band among a total of 123 tests by BioSewoom SSP

Typing results	Well No. of nonspecific band	Well No. of internal control not amplified		
		HLA -A	HLA -B	HLA -C
A*01, A*31	1, 11	6, 21		
A*02, A*24	2, 6, 7	23		
A*02, A*33	2, 13	6		
A*11, A*24	4, 6, 7, 18, 20	23		
A*24, A*33	6, 7, 13	9		
B*07, B*48	1, 2, 8, 26, 27, 48		45	
B*15, B*40	1, 7, 8, 19, 21, 30, 33, 48		43	
B*15, B*40	2, 4, 7, 8, 10, 16, 19, 26, 30, 33, 48		39	
B*50, B*51	2, 9, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 40, 41, 47, 48		26	
B*54, B*59	14, 27, 34, 35, 36, 40, 41, 45, 47, 48		15	
Cw*3, Cw*12	3, 9, 15, 16			1
Cw*04, Cw*14	4, 10, 16			1
Cw*6, Cw*7	6, 7			1, 9

히 형별판정하는 능력에 차이가 있을 수 밖에 없기 때문이다.

한국인을 대상으로 한 연구로는 2004년 본 연구의 저자들이 한국인 49명의 HLA-A, -B, -C에 대한 혈청학적 검사결과와 고해

상도 DNA 검사결과를 비교한 예가 있다[10]. 당시에는 HLA-A 및 B에서는 혈청학적 동정에 오류가 발견되지 않았으나 HLA-C의 경우 11명(22.4%)에서 혈청학적 동정에 오류가 발견되었는데 10예는 blank로 잘못 보고한 경우였고, 1예는 다른 항원으로 동정한 경우이었다. 1999년 이용화 등[22]도 150예를 대상으로 HLA-C에 대해서만 혈청학적 검사결과와 DNA 검사(PCR-SSP) 결과를 비교하였는데, 36명(24.0%)에서 불일치가 관찰되었다고 보고하였다.

이처럼 혈청학적 검사법은 고도의 숙련과 경험을 요구하는 반면 DNA 검사법들은 점차 소규모 검사실에서도 쉽게 수행할 수 있도록 발전하면서 기존의 혈청학적 검사방법을 급속히 대체하고 있다[1, 2]. 국내의 경우에도 HLA class I DNA 검사는 제6차(2000년 10월) HLA검사 신빙도조사부터 포함하였는데 당시에는 8기관(15%)만이 회신하였으나, 점차 증가하여 제10차(2002년 10월)에 이르면 26기관(48%)[23]이나 회신하였고, 제18차(2006년 10월)에는 HLA-A와 -B는 45기관(75%), HLA-C는 32기관(53%)이 회신하여 DNA 검사법이 급속도로 확산되고 있음을 알 수 있다[12]. 반면 혈청학적 검사는 점차 감소하여 제10차 조사에서는 39기관(72%)[23], 제18차 조사에는 29기관(48%)만이 회신하였다. 특히 신규기관의 경우는 대부분 DNA 검사법만을 도입하는 것으로 여겨진다[12]. 현재 일선 검사실에서 많이 사용되고 있는 혈청학적 해상도 수준의 DNA 검사법으로는 reverse-SSOP와 PCR-SSP 기법이 있다[2]. De Vreese 등[24]은 INNO-LiPA 키트의 HLA-A, -B 형별검사 결과와 다른 DNA 검사법(PCR-SSOP, PCR-SSP, sequencing)의 결과를 비교한 연구에서 형별검사 결과가 100% 일치하며 INNO-LiPA 키트의 미확정 결과는 HLA-A 0.6%, HLA-B 7.6%에 불과한 것으로 보고하였다. 국내의 사용 현황을 보더라도 제10차 신빙도조사에서는 26기관 중 SSOP 사용 기관이 20기관(77%, INNO-LiPA 11기관), SSP 7기관(27%, Biotest 4기관)[23], 제14차에서는 41기관 중 SSOP 31기관(76%, INNO-LiPA 17기관), SSP 7기관(17%, Biotest 4기관)[25], 제18차에서는 52기관 중 SSOP 32기관(62%, INNO-LiPA 19기관), SSP 10기관(19%, Biotest 5기관)의 분포를 보이고 있으며[12], PCR-SSOP 기법에서는 INNO-LiPA 키트가, PCR-SSP 기법에서는 Biotest 키트가 가장 많이 사용되고 있다.

일반적으로 PCR-SSOP 방법에 비해 PCR-SSP 방법은 형별 판정에서 2개 이상의 genotype의 결과가 나오는 빈도가 적은 것으로 알려져 있다[9]. 그러나 본 연구에서는 유전자좌별로 미확정 정도에 큰 차이를 보여주었는데 HLA-A의 경우 BioSewoom SSP, INNO-LiPA 각각 45% (9예), 5% (1예), HLA-B는 각각 25% (5예), 30% (6예), HLA-C는 각각 0%, 5% (1예)의 분포를 보였다. HLA-A에서 BioSewoom SSP가 높은 수준(45%)의 미확정 결과를 보였던 이유는 A*31에 특이적인 set 11이 A*2914와도 반응하기 때문이다. 그래서 A*31의 대립유전자를 가지는 검체는 A*2914와 항상 미확정 결과를 가지게 되므로 이

에 대한 보완이 필요할 것으로 여겨진다. 이 부분이 보완된다면 미확정 정도는 약 15%로 줄어들게 된다. 그러나 한국인의 대립유전자 빈도를 고려하여 형별판정을 한 경우 INNO-LiPA 시약과 모두 일치된 결과를 보였기 때문에 검사실에서 일상적으로 사용하는 데 있어 성능상의 차이는 없는 것으로 판단된다. 또한 국내 신빙도조사에 사용되었던 21검체에 대해서도 BioSewoom SSP는 HLA-A 4예(19.0%), HLA-B 6예(28.6%), HLA-C 1예(4.8%)에서 미확정 결과를 보였으나 한국인의 대립유전자 빈도를 고려할 경우 모두 정답과 일치하였던 점도 일선 검사실에서 사용하기에 거의 문제가 없음을 보여주는 소견이라 하겠다.

그러나 대립유전자 빈도를 고려할 수 없는 국외 신빙도조사의 경우에는 BioSewoom SSP의 경우 137검체 중 HLA-A 12예(8.8%), HLA-B 26예(19.0%), HLA-C 6예(4.4%)에서 미확정 결과 판정이 불가피하였다. 일반적으로 보고되는 대립유전자 수가 많아질수록 형별판정의 애매모호성도 더 많아질 수 밖에 없다. 2007년 1월 1일 현재까지 보고된 대립유전자수는 HLA-A 506개, HLA-B 851개, HLA-C 276개이며[26], 2004년의 보고[27]와 비교할 때 HLA-A 79개, HLA-B 112개, HLA-C 47개나 늘어난 것이다. 따라서 미확정 결과를 줄이기 위해서는 primer set의 보완 및 추가가 지속되어야 할 것이고 그에 따라 판독 프로그램의 업그레이드도 이루어져야 할 것이다.

한국인에서 보고되는 HLA-A, -B, -C 고해상도 수준의 대립유전자수는 저자에 따라 약간 다르나 황 등[10]은 각각 22, 41, 21개, 이 등[28]은 각각 20, 43, 21개를 보고하였다. 특히 1.0% 이상으로 흔히 발견되는 것은 황 등[10]의 경우 각각 13, 22, 14개, 이 등[28]의 경우 각각 14, 24, 15개를 보고하여 거의 유사한 수준이다. 현재의 BioSewoom SSP는 이러한 한국인의 흔한 대립유전자들은 거의 대부분 구분할 수 있도록 만들어졌다. 따라서 한국인을 대상으로 하는 검사의 경우 대립유전자 빈도를 고려하여 판정한다면 유전자형 결과의 오류는 없을 것으로 판단된다. 또한 국외 정도관리 검체에 대해서도 미확정 결과가 있었지만 그 결과 중에는 모두 consensus 결과가 포함되어 있었으므로 대립유전자 빈도를 고려할 수 있는 경우에는 저해상도 수준의 HLA 형별검사로써 일상적인 사용에 부족함이 없다고 여겨진다.

PCR-SSP 키트에서는 간혹 일부 웰의 PCR 실패로 internal control 밴드가 나오지 않는 경우가 있는데 본 연구에서 평가한 BioSewoom SSP도 총 123검사 중 13검사(10.6%)에서 1-2개 웰의 internal control 밴드가 관찰되지 않았다. 재검하여 internal control 밴드를 확인하고 판독한 결과는 증폭되지 않은 internal control 밴드결과를 무시하고 판독한 재검 전 결과와 모두 동일하였다. 그러나 모든 검체, 모든 웰에서 internal control이 나올 수 있도록 지속적인 기술적 보완이 필요할 것으로 여겨진다.

결론적으로 BioSewoom SSP는 한국인의 대립유전자 분포를 고려한 경우 혈청학적수준의 형별판정에는 아무런 문제가 없었다. BioSewoom SSP는 reverse-SSOP 기법을 사용하는 INNO-LiPA와 달리 PCR 증폭 후 교잡반응을 거치지 않고 바로 전기영

동을 통해 결과를 판독할 수 있기 때문에 빨리 보고할 수 있다는 장점이 있다. BioSewoom SSP는 HLA-A, -B, -C 형별판정에 있어 INNO-LiPA와 동일한 수준의 성능을 가지고 있어 일선 검사실에서 사용하기에 손색이 없다고 판단된다.

요 약

배경 : HLA 형별판정을 위해 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 기반을 둔 DNA 검사법들이 기존의 혈청학적 검사법을 빠르게 대체하고 있다. 본 연구에서는 최근 국내에서 개발된 PCR-SSP 기법의 BioSewoom™ HLA-A, -B, -C PCR/SSP Kit (BioSewoom SSP)를 평가하였다.

방법 : 국내외 정도관리 프로그램에 사용된 158검체로 BioSewoom SSP를 이용하여 형별검사를 시행하고 그 결과를 일치결과(consensus)와 비교한 후 일치율 및 미확정(ambiguity) 정도를 파악하였다. 또한, 유전자좌별로 각각 20개의 한국인 검체에 대해 reverse-SSOP 방법인 INNO-LiPA HLA-A, -B, -C Typing Kit (INNO-LiPA, Innogenetics, Belgium)와 BioSewoom SSP로 검사를 시행한 후 그 결과를 비교하였다.

결과 : 21개의 국내 신빙도조사 검체는 HLA-A 4예(19.0%), HLA-B 6예(28.6%), HLA-C 1예(4.8%)에서 두 개 이상의 결과를 보였으나 한국인의 대립유전자 빈도를 고려한 경우 모두 정확한 형별판정이 가능하였다. 137예의 국외 정도관리 검체는 HLA-A 12예(8.8%), HLA-B 26예(19.0%), HLA-C 6예(4.4%)에서 2개 이상의 결과를 보였다. HLA-A, -B, -C 각각 20검체씩에 대한 BioSewoom SSP와 INNO-LiPA 비교에서 한국인의 대립유전자 빈도를 고려한 경우 모두 일치된 형별판정 결과를 보여주었다. 국내 신빙도조사 21검체, INNO-LiPA와 비교에 사용되었던 유전자좌별 20검체에 대한 BioSewoom SSP 검사 결과, 총 1,760개의 PCR 반응 중 12개(0.007%)에서 매우 약한 비특이밴드가 관찰되었으나 무시할 수 있는 정도이었다. 또한 소수(15개 PCR 반응, 0.009%)에서 internal control이 증폭되지 않았으나 형별판정에 영향을 미치지 않았다.

결론 : BioSewoom SSP 키트는 한국인의 대립유전자 분포를 고려한 경우 혈청학적 수준의 형별판정에는 아무런 문제가 없었다. BioSewoom SSP kit는 HLA-A, -B, -C 형별판정에 있어 INNO-LiPA와 동일한 수준의 성능을 가지고 있으며 일선 검사실에서 사용하기에 적합하다고 여겨진다.

참고문헌

- Middleton D and Williams F. A history of DNA typing for HLA. In: Terasaki PI and Gjertson DW, eds. HLA 1997. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1997:61-84.
- Hurley CK, Cao K, Tang T, Steiner N, Lazaro AM, Howard A, et al. Molecular methods: HLA alleles. In: Detrick B, Hamilton RG, et al., eds. Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 7th ed. Washington, DC: ASM Press, 2006:1198-214.
- Yang YS and Kim DW. Evaluation of a commercial kit "INNO-LiPA HLA DRB" for HLA-DR genotyping. Korean J Clin Pathol 1996;16:228-37. (양윤선 및 김대원. HLA-DR Genotyping 키트 "INNO-LiPA HLA DRB"의 평가. 대한임상병리학회지 1996;16:228-37.)
- Bunce M and Welsh K. PCR-SSP typing of HLA class I and class II alleles. In: Hahn AB, Land GA, et al., eds. ASHI laboratory manual. 4th ed: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2000:V.C.1.
- Lee KW, Jeon H, Park JY, Cho HC. Establishment of HLA-B*15 supplementary DNA typing for Korean samples. Korean J Clin Pathol 2000;20:576-82. (이경화, 전현배, 박지영, 조현찬. HLA-B*15 대립유전자 구별용 보조 DNA 검사법 확립: 한국인 검체용. 대한임상병리학회지 2000;20:576-82.)
- Olerup O and Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens 1992;39:225-35.
- Oh J and Kim T. Rapid HLA-DR DNA typing using the Biotest HLA-DRB SSP kit. Korean J Clin Pathol 1996;16:751-9. (오지하 및 김신규. PCR-SSP법에 의한 HLA-DR DNA typing. 대한임상병리학회지 1996;16:751-9.)
- Choi SJ, Won CY, Oh HB. HLA-DR typing with PEL-FREEZ DR4 TEST-SSP UNITRAY. J Lab Med Qual Assur 1999;21:237-42. (최수진, 원진연, 오홍범. PEL-FREEZ DR4 TEST-SSP UNITRAY를 이용한 HLA-DR 검사. 임상검사와 정도관리 1999;21:237-42.)
- Song EY, Park H, Park MH. Evaluation of the NeoDin SSP™ HLA-DR Typing Kit. Korean J Lab Med 2003;23:345-51. (송은영, 박혜진, 박명희. HLA-DR DNA 검사용 시약 NeoDin SSP™ HLA-DR Typing Kit의 평가. 대한진단검사의학회지 2003;23:345-51.)
- Hwang SH, Oh HB, Yang JH, Kwon OJ, Shin ES. Distribution of HLA-A, B, C allele and haplotype frequencies in Koreans. Korean J Lab Med 2004;24:396-404. (황상현, 오홍범, 양진혁, 권오중, 신은순. 한국인의 HLA-A, -B, -C 대립유전자와 일배체형 분포. 대한진단검사의학회지 2004;24:396-404.)
- QC Committee KSLM. Results of the 17th HLA typing proficiency survey in Korea: Korean Society for Laboratory Medicine 2006:1-29. (대한진단검사의학회 정도관리위원회. 제 17차 HLA 검사 신빙도조사 분석결과: 대한진단검사의학회 2006:1-29.)
- QC Committee K. Results of the 18th HLA typing proficiency survey in Korea: Korean Society for Laboratory Medicine, 2006:1-30.

- (대한진단검사의학회 정도관리위원회. 제 18차 HLA 검사 신빙도조사 분석결과:대한진단검사의학회 2006;1:30.)
13. Bozon MV, Delgado JC, Turbay D, Salazar M, Granja CB, Alosco SM, et al. Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. *Tissue Antigens* 1996;47:512-8.
 14. Yu N, Ohashi M, Alosco S, Granja C, Salazar M, Hegland J, et al. Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies. *Tissue Antigens* 1997;50:380-6.
 15. Mytilineos J, Lempert M, Middleton D, Williams F, Cullen C, Scherer S, et al. HLA class I DNA typing of 215 "HLA-A, -B, -DR zero mismatched" kidney transplants. *Tissue Antigens* 1997;50:355-8.
 16. Mytilineos J, Lempert M, Scherer S, Schwarz V, Opelz G. Comparison of serological and DNA PCR-SSP typing results for HLA-A and HLA-B in 421 Black individuals: a Collaborative Transplant Study report. *Hum Immunol* 1998;59:512-7.
 17. Bunce M, Fanning GC, Welsh KI. Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995;45:81-90.
 18. Lorentzen DF, Iwanaga KK, Meuer KJ, Moritz TL, Watkins DI. A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes. *Tissue Antigens* 1997;50:359-65.
 19. Bozon MV, Delgado JC, Selvakumar A, Clavijo OP, Salazar M, Ohashi M, et al. Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based methods. *Tissue Antigens* 1997;50:387-94.
 20. Bunce M, Barnardo MC, Procter J, Marsh SG, Vilches C, Welsh KI. High resolution HLA-C typing by PCR-SSP: identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens* 1997;50:100-11.
 21. Mytilineos J, Christ U, Lempert M, Opelz G. Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens* 1997;50:395-400.
 22. Lee YW and Yang YS. Comparison of HLA-Cw typing by serology and PCR-SSP in the Korean population. *Korean J Clin Pathol* 1999;19:239-45. (이용화 및 양윤선. 한국인에서 혈청학적 방법과 PCR-SSP로 실시한 HLA-Cw 형별검사의 비교. *대한임상병리학회지* 1999;19:239-45.)
 23. Park MH, Kim BC, Han BY. Results of the HLA typing proficiency survey in Korea, 2000-2002. *Korean J Lab Med* 2005;25:329-39. (박명희, 김병철, 한복연. HLA 검사 신빙도조사 결과(2000-2002년). *대한진단검사의학회지* 2005;25:329-39.)
 24. De Vreese K, Baryliski R, Pughe F, Blaser M, Evans C, Norton J, et al. Performance characteristics of updated INNO-LiPA assays for molecular typing of human leukocyte antigen A (HLA-A), HLA-B, and HLA-DQB1 alleles. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:430-2.
 25. Lim JH, Hwang SH, Oh HB. HLA Typing Proficiency Survey in Korea, 2003-2004. *Korean J Lab Med* 2005;25:434-41. (임지훈, 황상현, 오홍범. HLA 검사 신빙도조사 결과(2003-2004년). *대한진단검사의학회지* 2005;25:434-41.)
 26. The Anthony Nolan Research Institute. <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG> (Updated on Jan 2007).
 27. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens* 2005;65:301-69.
 28. Lee KW, Oh DH, Lee C, Yang SY. Allelic and haplotypic diversity of HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 genes in the Korean population. *Tissue Antigens* 2005;65:437-47.