

치주질환자의 면역글로블린 이종형에 따른 제한절편장 다변화 영상에 대한 PCR 기법의 개발

최점일* · 김성조* · 김인후**

* 부산대학교 치과병원 치주과

** 동아대학교 의과대학 생화학교실

1. 서론

치주세균에 대한 IgG 반응에 있어서 인종적인 차이는^{1,2)}, 치주질환의 유전적인 요소를 시사하므로써 어떤 특수한 치주질환에 대한 개체의 취약성을 내포하고 있다. IgG 반응은 면역글로블린 이종형과 세균의 항원 결정인자와 밀접하게 관련된 것으로 알려지고 있다³⁻⁶⁾. 여러 면역글로블린의 이종형중에서도 특히 중쇄(heavy chain) 이종형 지표인 Gm과 연쇄(light chain)의 이종형 지표인 Km이 중요하다^{7,8)}. 이 이종형은 멘델의 공동우세형 유전법칙에 따라 유전되고, 각 개인마다 독특한 haplotype 특이성을 지닌다. Gm과 Km 이종형 지표는 인종적 차이를 보인다^{7,9)}. 혈청내의 정상적인 IgG subclass 수준^{5,10-14)}, 세균성 항원에 대한 항체의 역가^{3,15,16)}, 그리고 면역 후의 IgG subclass¹⁷⁻²⁰⁾ 등은 모두 Gm이나 Km 이종형에 의해 영향을 받는다. 본 저자들의 연구에 따르면 이 면역글로블린 이종형은 조기발병형 치주염환자에 있어서 치주세균 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 및 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 IgG subclass의 반응에 영향을 결정적으로 영향을 미치는 요소임을 밝혀낸 바 있다²¹⁾.

실험실적으로 면역글로블린 이종형을 검사함에

있어 전통적으로 혈청학적인 기법을 이용해 왔다^{6,17,22)}. 그러나, 이 방법은 간편하지 못하고, 혈액응집 반응 여부에 의해 결과를 판정하기 때문에, 가끔 판정이 모호한 경우가 있다. 많은 표본을 재현성 있게 처리하기 위해서는 분자생물학적인 분석기법을 개발할 필요가 있다. 따라서 인체의 말초혈액에서 채취한 적은 양의 임파구로부터 채득한 유전자를 PCR로 증폭하여, 사용한 표지자를 이용하여 Gm 이종형을 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 양상을 판정하는 기법을 개발하고자 본 연구를 시도하였다.

2. 연구재료 및 방법

1. 대상환자의 선정

전에 발표한 연구논문에서²¹⁾ 면역글로블린 이종형이 판정된 환자 10명의 혈액을 채 취하여 DNA를 추출하였다. 이 환자의 이종형들은 ag 2명, axg 2명, agfnb 2명, axgfnb 1명, agb3st 1명, abg 1명, afnb 1명들로 도합 10명으로 구성되어 있다.

2. DNA의 추출

본 연구는 1996년 부산대학교 병원 지정진료연구비의 지원에 의해 시행되었음

섭씨 -70도에 보관된 혈액을 상온에서 녹인 후 약 10배의 1 X PBS를 첨가한다. 이를 섭씨 4도에서 2,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 세척한다. 상층액을 제거한 후 20ml의 소화성 버퍼용액(10mM Tris, pH8.0, 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % sodium dodecyl sulfate, 1 mg/ml의 proteinase K)에 용해시킨 후, 섭씨 55도에서 12시간 흔들면서 분해시킨다. 그 후 phenol 20 ml을 단백질이 분해된 용액에 첨가하여 1-2시간 흔들어 난용시킨 후 섭씨 4도에서 8,000 rpm으로 20분간 원심분리하고 상층액을 모은다.

이과정을 2-3회 반복한 후, PCIA(25:24:1, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 혼합용액)를 동량 첨가하여 반응시킨 후에 같은 조건하에 원심분리하여 상층액을 얻는다. 추출된 용액의 십분의 일 양의 3 M sodium acetate(pH 5.5)를 넣고 두배의 냉각된 100 % 에탄올을 첨가하여 DNA를 침전시킨 다음, 이를 70 % 에탄올로 세척하였다. 이를 적당량의 멸균된 TE 버퍼에 녹인 다음, 분광광도계로 DNA의 농도를 측정하였다.

3. PCR 증폭

PCR 반응 혼합액은 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 3.5mM MgCl₂, 0.01 % gelatin, 0.2 uM의 각 시발체(primer), 250 uM의 각 dinucleotide triphosphate 및 2.5 units의 Taq 중합효소(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)를 섞은 후, 여기에 분리된 DNA 1 ug을 가하여 총 용적이 100 ul되게 한다. PCR 반응은 각 표본에 대하여 30 주기를 반복하며, 각 주기는 섭씨 94도의 변성반응(denaturation) 0.5분, 섭씨 55도의 결합반응(annealing) 0.25분, 섭씨 72도의 연장반응(extension) 0.5분으로 시행하며, 첫 주기의 변성반응은 5분으로 마지막 주기의 연장반응은 7분으로 연장하여 반응시켰다. 중합효소 연쇄반응은 Thermal Cycler(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)를 사용하였다.

PCR Primer

KpnX(5'-CTTGCGCGCATACGCACAAC-3')

MCG1(5'-AACCCCTACCCCTAACCCCAA-3')

4. 제한효소에 의한 DNA 절단과 겔 전기영동

PCR 산물 10 ul에 적절한 제한 효소 5 units를 첨가하여 총 용적이 12 ul이 되게 한 후 제한 효소 제작회사(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)의 지시된 조건하에 4시간 동안 분해시켰다. 이 분해산물을 1-2 % 한천 겔에서 전기영동시켜 ethidium bromide로 염색한 후 자외선을 조사하여 관찰하였다.

5. Souther blot analysis

표지자는 plasmid HG015(Heavy Chain mu Probe C, HSRRB, Osaka, Japan) 에 클론된 유전자를 제한 효소 HindIII와 BglII로 절단한 750 bp 크기의 유전자 절편을 nick translation으로 [32P-aCTP]에 의해 표지시켜 사용하였다. Southern blot의 경우 추출한 DNA를 제한효소 HindIII로 절단한 다음 1 % agarose gel에서 전기영동하여 charged nylon membrane에 capillary transfer를 시행하였다. Transfer 후 UV-crosslink한 후 probe와 hybridize하였고, X-ray film에 섭씨 -70도에서 16시간 동안 감광시켜 관찰하였다.

III. 연구결과

Figure 1에서 보는 바와 같이 혈청학적으로 판정된 면역글로블린 이종형과 본 연구방법에서 판정된 southern blot hybridization 결과 나타난 restriction fragment length polymorphism(RFLP)와 의 상호연관성을 나타내고 있다. 구체적으로 살펴보면, ag, axg, agfnb, axgfnb, agb3st, abg, afnb 등의 이종형에 따른 DNA fragment length polymorphism은 각각 DNA band size가 ag의 경우 12.5 kb, 2.7 kb, axg의 경우 10.1 kb, 2.7 kb, agfnb의 경우 7.0 kb, axgfnb의 경우 12.5 kb, 8.0 kb, afnb의 경우 10.0 kb, agb3st의 경우 5.1 k, abg의 경우 12.5 kb로 각각 나타났다 (Figure 1).

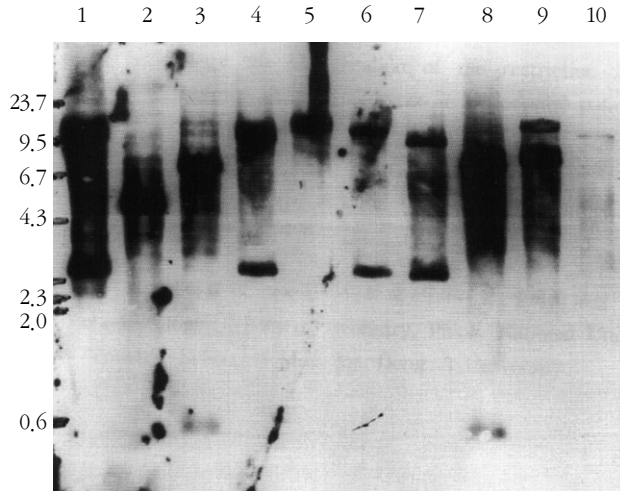


Figure 1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of genomic DNA from 10 patients whose immunoglobulin(Ig) allotypes have been predetermined. Ig allotype of Lane 1 and 4 is ag, Lane 2 is agb3st, Lane 3 and 8 is agfb, Lane 5 is abg, Lane 6 and 7 is axg, Lane 9 is axgfnb, Lane 10 is afnb.

IV. 총괄 및 고안

본 연구를 통해 환자의 혈액에서 소량 채득한 DNA를 본 연구에서 사용한 primer를 이용한 PCR 기법으로 증폭하여, 사용된 표지자로 Southern hybridization을 실시한 결과 ag, axg, agfnb, axgfnb, agb3st, abg, afnb의 7가지 유형으로 구성된 면역글로블린의 이종형에 따른 절편장 다변화를 관찰할 수 있었다. 이는 재래의 혈청학적인 방법에 의해 판정하던 이종형 분석법이 적절한 표지자를 사용한 유전자 지문법에 의해 판정할 수 있는 가능성을 시사해 준 연구라고 볼 수 있다. 향후 이러한 기법을 바탕으로 다량의 환자에서 면역글로블린 이종형을 판정하고, 가족내의 양상과 조기발병형 치주질환의 상호관계를 파악하는 집단유전학(population genetics)에의 응용을 가능하게 하는 기초연구로서의 의미를 가진다.

V. 참고문헌

1. Gunsolley, J.C., Tew, J.G., Gooss, C.M., Burmeister, J.A., and Schenkein, H.A. "Effect

of race and periodontal status on antibody reactive with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain Y4", *J. Periodont. Res.*, 23:303-307, 1988.

2. Lu, H., Wang, M., Gunsolley, J.C., Schenkein, H.A., and Tew, J.G. "Serum immunoglobulin G subclass concentrations in periodontally healthy and diseased individuals", *Infect. Immun.*, 62:1677-1682, 1994.
3. Hammarstrom, L., and Smith, C.I.E. "IgG subclass in abcterial infections", *Monogr. Allergy* 19:122-133, 1986.
4. Shur, P.H. "IgG subclasses- a review", *Ann. Allergy* 58:89-96, 1987.
5. Schaeklford, P.G., Granoff, D., Nahm, M.H., Scott, M.G., Suarez, B., Pandey, J.P. and Nelson, S.J. "Relation of age, race, and allotype to immunoglobulin subclass concentrations", *Pediatr. Res.*, 19:846-849, 1985.
6. Van Loghem, E. "The immunoglobulin genes: genetics, biological and clinical significance", *Clin. Immunol. Allerg.* 4:607-622, 1984.

7. Schanfieldl, M.S. "Forensic application of immunoglobulin allotypes", p.160-213. In Lee, C.J., and Gaensslen, R.E.(ed)., DNA and other polymorphism in forensic science. Year Book Publishers, Inc., St. Loois.
8. van Loghem, E. "Allotype markers", *Monogr. Allerg.* 19:41-50, 1986.
9. Matsumoto, H. "Characteristics of mongoloid populations and immunogenetics of various diseases based on the genetic markers of human immunoglobulins", *Exp. Clin. Immunogenet.* 6:68-87, 1989.
10. Morell, A., Skvaril, F., Steinberg, A.G., van Loghem, E., and Terry, W.D. "Correlations between the concentrations of the four subclasses of IgG and Gm allotypes in normal human sera", *J. Immunol.* 108:195-205, 1972.
11. Slack, J.H. "Strain-dependent IgG subclass response patterns", *J. Immunol.* 139:3734-3738, 1987.
12. van der Giessen, M., Freyee, W., Rossouw, E., and van Loghem, E. "Qualitative and quantitative studies on IgG2 globulins in individual human sera with an antiserum capable of differentiating between Gm(n+) and Gm(n-) proteins", *Clin. Exp. Immunol.*, 14:127-139, 1973.
13. van der Giessen, M., Rossouw, E., Algra-van Veen, T., and van Loghem, E. "Quantatification of IgG subclass in sera of normal adults and healthy children between 4 and 12 years of age", *Clin. Exp. Immunol.* 21:501-509, 1975.
14. Yount, E., Dormer, M.M., Kunkel, H.G., and Kabat, E.A. "Studies on human antibodies. VI. Selective variations in subgroup composition and genetic markers", *J. Exp. Med.* 127:633-646, 1986.
15. Choi, J.I., Kim, J.H., Ha, M.H., and Kim, S.J. "Immunogenic studies on the IgG subclass responses in the phenotypic subsets of early-onset periodontitis. Submitted for publication, 1999.
16. van Steenberg, T.J.M., van Winkelhodd, A.J., and de Graff, J. "Black-pigmented oral anaerobic rods: classification and role in periodontal disease", p. 41-52. In Hamada, S., Holt, S., and McGhee, J.R.(ed), *Periodontal Disease:Pathogens and host responses.* Quintessence Publishing Co., Tokyo.
17. Ambrosino, D. M., Schiffman, G., Gotschlich, E.C., Schur, P.H., Rosenberg, G.A., De Lange, G.G., van Loghem, E., and Siber, G.R. "Correlationship between G2m(n) immunoglobulin allotype and human antibody response and susceptibility to polysaccharide encapsulated bacteria", *J. Clin. Invest.* 75:1935-1942, 1995.
18. Granoff, D. M., Pandey, J.P., Boies, E., Squires, J., Munson, R.S., Suarez, B. "Response to immunization with Haemophilus influenza type b polysaccharide-pertussis vaccine and risk of Haemophilus meningitis in children with the Km(1) immunoglobulin allotype. *J. Infect. Dis.* 154:257-263, 1986.
19. Granoff, D.M., Suarez, B.K., Pandey, J.P. and Shackelford, P.G. "Genes associated with the G2m(23) immunoglobulin allotype regulate the IgG subclass responses to Haemophilus influenza type b polysaccharide vaccine", *J. Infect. Dis.* 157:1142-1149, 1988.
20. Granoff, D.M., Shackelford, P.G., Pandey, J.P., and Boies, E.G. "Antibody responses to Haemophilus influenza type b polysaccharide vaccine in relation to Km(1) and G2m(23) immunoglobulin allotypes", *J. Infect. Dis.* 154:257-263, 1986.
21. Choi, J.I., Ha, M.H., Kim, J.H., and Kim, S.J. "Immunoglobulin allotypes and immunoglob-

ulin G subclass responses to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in early-onset periodontitis.", *Infect. Immun.* 64:4226-4230, 1996.

22. Nakao, Y., Matsumoto, H., Miyazaki, T., Mizuno, N., Arima, N., Wakisaka, A.,

Okimoto, K., Akazawa, Y., Tsuji, K., and Fujita, T. "IgG heavy chain(Gm) allotypes and immune responses to insulin-requiring diabetes mellitus", *N. Engl. J. Med.* 304:407-409, 1981.

Development of PCR Technology for Identification of the Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) of the Immunoglobulin Allotypes in Periodontal Patients

Jeom-Il Choi*, Sung-Jo Kim*, In-Hoo Kim**

* Department of Periodontology, School of Dentistry, Pusan National University

** Department of Biochemistry, School of Medicine, Dong-A University

The present study has been performed to develop a PCR technology to identify human immunoglobulin(Ig) allotypes with restriction fragment length polymorphism(RFLP) using a probe. Genomic DNA were amplified with PCR technology using primers from peripheral blood lymphocytes of 10 periodontal patients, whose Ig allotypes have been pre-determined by serological technique using heagglutination technique. The result indicated that the RFLP patterns could successfully differentiate the Ig allotypes, which suggests that this technology can be developed as a tool useful for population genetics studies.

Key Word: Immunoglobulin Allotype, Restriction Fragment Length Polymorphism, Polymerase Chain Reaction

