

모세관 젤 전기영동을 이용한 안드로젠 수용체 유전자 분석

백승권 · 강충무 · 강대천 · 이수만[†] · 최병욱[‡] · 정기화[#] · 최규성 · 김용성^{*}

경남대학교 자연과학부

[†]포천중문의과대학교 의학부

[‡]이화여자대학교 의학부

[#]공주대학교 생명과학부

(2005. 9. 6 접수)

Analysis of Androgen Receptor Gene by Capillary Gel Electrophoresis

Seungkwan Back, Chungmu Kang, Daechun Kang, Suman Lee[†], Byungok Choi[‡],
Kiwha Chung[#], Kyuseong Choi and Yongseong Kim^{*}

Division of Natural Science, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

[†]CHA research Institute, Department of Urology, Department of Medicine CHA General Hospital,

Collage of Medicine, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea

[‡]Department of Neurology and Ewha Medical Research Center and ³Department of Pharmacology
and Ewha Institute of Neuroscience, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul 110-783, Korea

[#]Department of Biological Science, Kongju National University, 182 Kongju, Chungnam 314-701, Korea

(Received September 6, 2005)

요 약. 본 연구에서는 모세관 젤 전기 영동에서 분자체 역할을 하는 poly(ethylene oxide)를 이용하여 남성불임 (Androgen receptor) 유전자의 정확한 CAG 반복 배열의 길이를 측정하였다. 표준물질인 ϕ X174 RF/Hae III, 100bp step ladder를 이용하여 non-linear regression analysis를 통한 81명의 한국의 불임 남성과 89명의 정상적인 한국 남성을 대조군으로 하여, 남성 불임과 관련된 AR gene의 exon 1의 CAG 반복 수를 측정하였다. 불임 남성의 CAG 반복 길이는 24.97 ± 2.6 range, 17-29)이고, 정상인 남성은 23.99 ± 2.4 (range, 18-29)이다. P 값은 0.018로써(<0.05) 두 그룹의 결과는 통계학적으로 주목 할 수 있는 차이를 나타내었다.

주제어: 모세관, 전기 영동, CAG 반복, 불임

ABSTRACT. Capillary gel electrophoresis (CGE) with poly(ethylene oxide) has been applied to the measurement of CAG repeat number in Androgen receptor (AR) gene related to male infertility. Non-linear regression analysis was performed using the standard ϕ X174 RF/Hae III, 100bp step ladder DNA in order to investigate the exact number of CAG repeat. For 79 Korean infertile males and 89 controls, CAG repeats at exon 1 in AR gene was compared and analyzed by CGE. It turned out that CAG repeat numbers were 24.97 ± 2.6 range, 17-29) for the infertile male, and 23.99 ± 2.4 range, 18-29) for the control, respectively. P value (0.018) was less than 0.05, meaning that the result was statistically meaningful.

Keywords: Capillary, Electrophoresis, CAG Repeat, Infertile

서 론

안드로젠(Androgen)은 정상적인 정자 생산에 필수적이며, 고환내부의 안드로젠의 감소는 결함 있는 정자생산을 가져온다.¹ 생리학적으로 안드로젠, 테스토스테론(testosterone) 그리고 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone)은 남성의 내부와 외부의 생식 기관의 발달 원인이 된다.²

안드로젠 부족을 유도하는 생식선 자극 호르몬의 분비 그리고 활동에 영향을 미치는 Y 염색체 및 유전자 질환, 정자 형성의 미세결실(microdeletions)을 포함하는 것으로 묘사된 유전적 결함은 남성 불임에 관련되어 있다.³

모든 안드로젠은 안드로젠 수용체(androgen receptor; AR)를 통해서 활동하며, 이것은 X 염색체의 single-copy gene에 암호화 되어 있다. 다른 경우의 유전적 돌연변이로 AR이 붕괴된 결과 완벽한 androgen insensitivity syndrome(AIS)는 건강한 46XY 사람의 성의 반전을 가져온다.⁴ 완전한 AIS 환자들은 정상적인 남성 단계의 테스토스테론을 가지나 외부는 완전히 여성이 나타난다.

AR은 X염색체의 긴 쪽의 Xq11-12 부분에 위치하며 스테로이드 수용체 superfamily와 같은 일원이며 3개의 주 기능 영역으로 되어있다; transactivation domain, DNA-binding domain, ligand-binding domain.⁴ N-terminal transactivation domain에는 2개의 다형의 삼핵산 반복 순서인 CAG와 CGG를 포함한다.⁴ CAG 반복 길이의 변화(CAG)_n는 AR의 활동의 감소, 발현 또는 기능적인 변화와 관계 있다.⁵ CAG 반복 영역은 polyglutamine tract로 암호화 되었으며 n의 정상적인 범위는 11에서 31사이 이다.⁶ 이 CAG 반복 확장이 40 반복의 범위를 넘어서면 치명적인 근신경계 질환인 척수 연수 근육 위축증(spinal bulbar muscular atrophy; SBMA)을 유발한다.⁷ 이와 반대로 짧은 CAG 반복은 AR의 androgenicity를 증가시키고, 그 결과로 이래적으로 전립선 조직에 높은 자극을 주며 이른 나이에 전립선 암이 발병하게 되고, 종양의 위험성 등급이 증가하며, 전립선 이외의 전이가 증가하게 된다.⁷

Trinucleotide repeat expansion(TRE)는 현재 많은 근신경계 질환과 관계가 되는데, 프래자일엑스 증후군(fragile X syndrome)을 포함하여, 헌팅턴 병(Huntington disease)⁸, 척수 소뇌성 운동 실조증 제1형(spinocerebellar

ataxia type 1), 미카도-조셉병(Machado-Joseph disease(spinocerebellar ataxia type 3))⁹, 근간대성간질이 동반된 무도병아테토시스(dentatorubral-pallidoluysian atrophy)¹⁰ 등이 있다. 삼핵산 반복 확장 검출법은 TRE질병에 대해 유전자인 DNA 진단을 위한 방법으로 많이 사용되어 왔다.

이전의 연구에서, AR gene 안의 CAG 반복 길이 확장은 신경 활동의 퇴화, 말단의 약해짐, 낮은 남성화, 무정자 또는 정자 과소증, 고환세약 및 불임을 유발함이 보였다.¹¹ 게다가, 몇몇의 아시아 인구의 연구에서 남성 불임에 긴 CAG 반복 배열이 관련되었을 가능성을 제안하였다.^{12,13} 그러나 남성 불임의 CAG 반복 수의 길이에 관하여, 인종과 인구에 따라 다름이 몇몇에 보고되었다.¹⁴

일반적으로는 AR gene의 CAG 반복 길이를 슬랩 젤 전기영동(slab gel electrophoresis; SGE)를 이용하여 분석하였다.^{13,15} 하지만 SGE는 분석의 특성상 감도가 낮고 Joule 열의 발생으로 인하여 온도 기울기의 변화와 Gel 찌그러짐 현상으로 분리능이 떨어진다.¹⁶ 그리고 SGE는 제한된 전기장 세기(50 V/cm 이하)로 인하여 분리 시간이 오래 걸린다.¹⁶ 이런 SGE를 이용한 DNA 길이 측정은 항상 10%이상의 편차를 보여주었다.¹⁷

모세관 젤 전기영동(Capillary gel electrophoresis; CGE)은 비교적 최근에 개발되었으며 DNA분석에 있어서 뛰어난 효과가 증명된 방법이다.¹⁸ 모세관은 큰 표면적을 가짐으로 Joule 열을 효율적으로 분산시킬 수 있으므로 높은 전기장(500 V/cm 이상)에서도 안정적이며 그로 인해 SGE 보다 빠른 분리와 높은 분리능을 얻을 수 있다.¹⁶ 그리고 기기가 자동화 되어있으며 on-line 검출기로서 Laser Induced Fluorescence(LIF)를 이용한 검출한계는 10^{-14} - 10^{-16} mole에 이른다.¹⁸ CGE는 DNA sequencing,¹⁹ 제한 절편의 분리,²⁰ Forensic 분석,²¹ polymerase chain reaction(PCR) product의 분리²² 등 광범위한 DNA분석에 응용되고 있다. CGE는 DNA 절편들을 빠른 속도로 분석이 가능하고 감도가 좋으며 분리능이 우수하다는 장점이 있다.²³

선형 고분자 물질인 poly(ethylene oxide)(PEO)는 모세관 내벽과 강력한 상호작용을 하여 표면의 동적 불활성 코팅을 형성한다.¹⁶ 이런 PEO를 이용한 동적 코팅은 쉽게 재생 가능하며 3주 동안 30번 이상 반복 실험에서 $\pm 2\%$ 대의 이동시간 변화로 좋은 재현성을 나타냈다.¹⁶ 또한 분리용 젤로서 PEO는 균일한 분자

체의 구조와 높은 전기장 하에서도 기포의 형성이 적고 균일한 용액을 쉽게 만들고 있으며, 좋은 분리능을 제공한다.²⁰

본 연구에서는 한국 남성들의 남성 불임 관련 유전자(AR gene)를 CGE를 이용하여 분석하였다. 내부 표준 DNA 절편들의 고유 이동도에 대해 non-linear regression analysis를 수행하여 검정 곡선을 작성하였으며 이를 토대로 CAG 반복 수를 구하여 불임 관련성에 대해 비교 하였다.

실험방법

시약. 본 실험에 사용된 용융 실리카 모세관은 내경이 75 μm , 외경이 375 μm 으로 polymicro Technologies (phoenix, AZ, USA)에서 구입하였다. 검출 window는 microtorch로 폴리이미드 코팅을 벗겨내어 준비하였다. 모세관의 전체 길이는 30 cm이며 유효 길이는 22 cm이다. 완충 용액 저장 용기에 들어가는 전극으로는 0.5 mm(ϕ) 백금 전극(Aldrich Chemical Co.)을 사용하였다.

1XTBE(89 mM Tris, 89 mM borate, 2 mM EDTA) 완충 용액을 준비하기 위한 시약으로는 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(TRIZMA Base), Boric acid, ethylenediaminetetraacetate(EDTA), poly(ethylene oxide)(PEO, Mw=8,000,000), (Sigma-Aldrich. Co., MO, USA)가 사용되었다. Monomeric intercalating dye인 ethidium bromide (EB)(Sigma-Aldrich. Co., MO, USA)는 완충 용액 속에 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 녹여 사용하였다. 표준 DNA 절편 시료로는 $\Phi\text{X174}/\text{DNA}$ Hae III, 100 bp step ladder (all from takara Bio Inc. Co., Japan)를 사용하였다. 시료 주입은 계면 동전기적(electro kinetically)방법을 사용하였다. 모든 실험에 사용된 시약은 순수한 고차 증류수(milli-Q reagent water system. USA)에 녹여 사용하였다.

모세관 젤 전기영동 레이저 유발 형광 검출법. 1XTBE 버퍼 용액은 0.20 μm membrane(Advantec MFS, Inc. Japan) 실린지 필터를 이용하여 필터 링 한 후 사용하였다. PEO 젤은 40 mL의 1XTBE 버퍼에 PEO(Mw 8,000,000)를 천천히 더하면서 만들었다. PEO 젤의 높은 점성으로 인하여 12시간 이상 교반 시키고 난 후 진공에서 가스를 제거 하였다.

PEO를 이용하여 모세관 내벽을 동적 불활성화 시

켜주기 전에 모세관을 5.0 mM HCl(Sigma-Aldrich. Co., MO, USA)로 30분 정도 전 처리를 해준 후 균일하게 녹아있는 PEO 고분자 수용액을 진공 펌프 및 실린지를 이용하여 20-40분 동안 모세관 안으로 넣어주었다.

두 개의 유리 vials에 1XTBE buffer를 각각 채우고 모세관 양끝을 담근다. 모세관을 전기 영동적으로 평형을 이루기 위해 10분 후에 시료를 주입하였다. DNA 시료 주입은 electrokinetically 방법으로 4kV에서 4초간 이루어졌다. 실험 후에 각각 모세관을 증류수를 이용하여 15-30분간 세척한 후 새로운 고분자 gel을 높은 압력으로 채워서 사용한다.

전기영동에서의 electric field strength가 180 V/cm로 High-voltage power supply(-30 kV, Spellman, NY, USA)가 사용되었다. DNA labeling dye인 ethidium bromide를 excitation 하기 위하여 543.6 nm의 파장을 가진 5 mW의 He-Ne laser(Edmund Scientific Co., NJ, USA)가 사용되었다. laser 빛의 산란을 막기 위해 두 개의 RG610 optical filter를 사용하였다. 형광 신호는 10X microscope objective(Nikon, Japan)을 통하여 수집되어 Photomultiplier module(H5784-02, Hamamatsu, Shinzuka, Japan)를 거쳐 바로 low-pass filter를 통해 A/D interface board(LabView, National instruments Co., TX, USA)로 전송되었다. High-voltage power supply의 제어와 data collection은 7 Hz로 LabView 프로그램과 IBM 호환 컴퓨터로 수행되었다.

슬랩 젤 전기영동. 표준 시료끼리 크기 측정값을 비교를 하기 위해 2% agarose gel과 0.5 X TBE buffer를 이용하여 Mupid- α gel electrophoresis(Advance, Japan)으로 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 표준시료인 $\Phi\text{X174}/\text{DNA}$ Hae III(64 ng/ μl) 와 100bp step ladder(65 ng/ μl)를 각각 2 μl 씩 주입하고 100 Volt에서 40분 동안 실시 하였고, gel과 buffer에는 ethidium-bromide를 함유 시켜 전기영동을 하였다. 영동 된 gel을 UV Transilluminator(320 nm 파장)와 CCD 카메라로 촬영하였다. 전기영동 된 단편의 크기는 Genescan 프로그램(Genotyper 2.1, ABI, Foster city, CA, USA)를 이용하여 결정하였다.

환자와 대조군. 81명의 불임 남성과 89의 정상인 남성의 AR gene PCR product는 모두 CHA 종합병원, Pochon CHA University(Seoul, Korea)에서 동의 하에 제공받았다.

2002년 12월부터 2003년 8월까지 20에서 50세 사

이의 나이 대(mean \pm SD: 32.7 \pm 3.2 years)의 불임 남성을 상대로 비폐쇄적으로 실시 하였다. 81명의 불임 남성은 같은 병원의 유전학 실험실에서 세포유전학적 Y 염색체 미세결실을 분석하였다. 통계적 분석에서, 81명의 불임 남성은 WHO 분류법(1999)에 따라 5개의 아류형(subtype)으로 분류하였다; 무정자증(azoospermia), 심한 희소정자증(severe oligozoospermia), OAT 증후군(oligoasthenoteratozoospermia), 심한 OAT 증후군(severe OAT)와 기형정자증(teratozoospermia). 무정자증은 비폐쇄적으로 역사적이고 물리적인 시험법인, 정액 분석(including assessment of sperm volume, PH and evaluation of fructose concentration), 초음파로 고환의 부피와 소낭의 정액 평가로 측정되었다. 89명의 정상적인 남성은 26세에서 71세 사이의 나이 대(mean \pm SD: 43.5 \pm 8.7 years)를 가지며 한 명 이상의 자식을 가진 대조군 그룹이다.

정자 분석. 정자 분석은 World Health Organization (WHO 1999)와 Kruger *et al.*(Kruger *et al.*, 1896)의 지침에 따라 엄격하게 수행되었으며, 비폐쇄성 불임 남성들을 5가지의 아류형으로 분류하였다. 60명의 무정자증과 17명의 심한 OAT 증후군(a sperm count of $< 5 \times 10^6$ /mL, a progressive motility of $< 10\%$ and a proportion of $< 4\%$ with normal morphology), 1명의 OAT증후군(OAT; a disturbance of all the three variables), 1명의 심한 희소정자증($< 1 \times 10^6$ /mL), 그리고 2명의 기형정자증($< 14\%$ spermatozoa with normal morphology)으로 분류되었다. 이 실험들은 모두 한국 CHA General Hospital에서 수행하였다.

세포유전학적 Y 염색체 미세 결실 분석. 세포 유전학적 분석은 배양된 림프구 세포의 유사분열을 펼쳐서 수행되었다. 81명의 불임 남성 중, 65명은 정상적인 핵형(karyotype)(46, XY)을 가졌다. 비정상적인 염색체를 가지는 27명의 남성 중에는 18명의 46XY 무결실과 Yq 결실, 8명의 47XXY, 그리고 1명의 47XY를 포함한다. Yq 결실 연구에서, 말초 혈액에서 DNA를 추출 하여서 multi-PCR방법으로 하나의 SRY와 12 sequence-tagged site(STSs)를 포함하는 Y 염색체의 13 loci를 primers로서 증폭하였다.

Androgen 수용체 유전자의 CAG 반복 길이 분석. PCR 반응 혼합물의 구성분인 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 5 mM Tris-HCl, 1U의 Taq polymerase는 Takara로부터 구입하여 사용하였다. AR의 분석 하

고자 하는 유전자 영역인 CAG 반복 부분을 primer forward(5'-TCCAGAATCTGTTCAGAGCGTGC)와 reverse(5'-GCTGTGAAGGTTG-CTGTTCTCAT)를 이용하여 증폭하였다. PCR 프로그램은 일반적으로 95 °C denaturation 40초, 67 °C annealing 40초이며, 72 °C extension 2분씩 35회 수행하였다. Running sample의 크기 측정을 위하여 2.5 μ l의 PCR product와 50 ng/ml 농도의 표준 시료인 Φ X174/HaeIII 2.5 μ l를 혼합하여 준비하였다. 자체 제작한 CGE system을 이용하여 혼합한 시료를 크기 별로 분리 하였으며, 형광 검출을 이용하여 신호를 검출하였다. DNA의 크기를 계산하기 위해서 origin 7.5 software(origin lab CO., Northampton, MA, USA)를 사용하였다.

AR CAG 대립유전자 크기는 표준 시료를 참조 하여 검정 곡선을 완성하여 계산하였다.

통계 분석. 불임 남성과 정상인 남성 사이의 CAG 반복의 평균 수를 two-sample independent t-test 비교 하였다. 그 후에 불임 남성의 아류형을 two-sample independent t-test 또는 Mann-Whitney U test를 통하여 비교 하였다. 통계적 분석에는 SPSS software, version 12(SPSS Corp., Chicago, IL)가 사용 되었으며, 모든 결과는 means \pm SD로서 나타내었다. 두 그룹 사이의 data 결과의 계산에서는 T-test를 이용하여 CAG 반복 수의 평균을 비교하였다. P값 < 0.05 일 때 통계적으로 유의 하다고 판단한다.

결과 및 고찰

Fig. 1에서 0.5%~2%의 다양한 농도의 PEO를 사용하여 표준 시료인 Φ X174 RF/Hae III와 PCR 시료를 분리 하였다(Fig. 1). 높은 PEO 농도에서 보다 나은 분리능을 보였으나, 이동시간도 더 길어졌다(Fig. 1). PCR 시료는 281bp와 310bp사이의 길이를 가지며, 분리를 위한 최적의 PEO 농도는 1.5%(w/v)이고 20분 이내에 모든 분리가 이루어 졌다.

CGE를 이용한 DNA 크기 측정의 정확성을 알아보기 위하여 표준시료인 100 bp step ladder에서 각각 200 bp, 300 bp, 600 bp를 추출하여, 표준 시료인 Φ X174 RF/Hae III와 함께 분리 하여 길이를 측정 하였다.

Fig. 2에서는 300 bp의 표준 시료의 크기를 측정 하기 위해 electropherogram으로부터 표준 시료인 Φ X174 RF/Hae III의 electrophoretic 이동도를 이용하여 non-

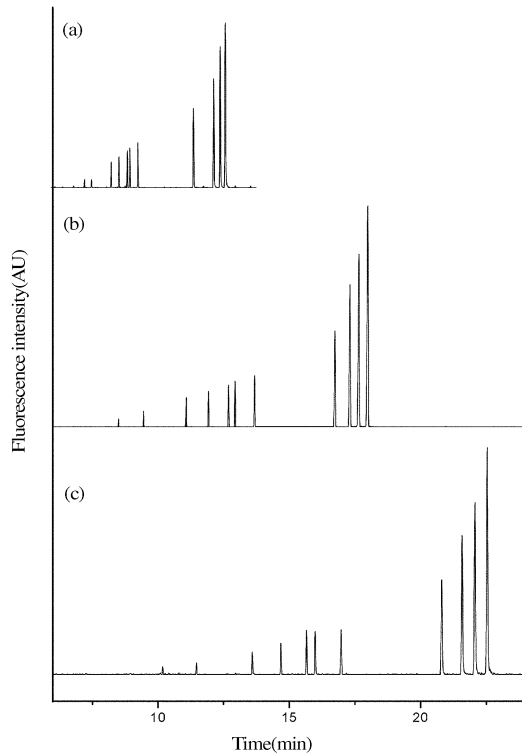


Fig. 1. Influence of PEO concentration on the separation efficiency of a Φ X174 RF/Hae III. PEO concentration: a) 0.5%; b) 1.5%; c) 2.0%. Conditions: run buffer, 3 μ g/nL ethidium bromide in IXTBE; Electric field strength, 180 V/cm; Sample injection, 4 kV for 4s; Capillary, PEO coated capillary, 30 cm \times 75 μ m ID(22 cm to the detection).

linear regression analysis를 통하여 검정 곡선의 함수식을 찾았다. 검정 곡선의 regression 함수식은 $y=0.00017e^{(-\infty/203.76976)}+0.00011$ (coefficient of determination, $R^2=0.9985$)이며, y는 PCR 시료의 전기 영동적 이동도이고 x는 표준 시료 300 bp의 크기를 측정할 염기 쌍의 수이다. 위의 식에 의한 300 bp의 크기를 측정할 값은 299 bp인 것으로 나타났다.

Fig. 3는 CGE와 SGE간의 크기 측정 값을 비교하기 위하여 SGE를 이용하여 표준 시료인 100 bp step ladder, Φ X174 RF/Hae III을 전기영동을 실시 하였다. Genescan 프로그램을 이용하여 Φ X174 RF/Hae III를 표준 시료로 하여 100 bp step ladder의 200 bp, 300 bp, 600 bp의 크기 측정을 수행하였다.

Table 1에서 CGE와 SGE를 이용하여 200 bp, 300 bp, 600 bp 각각을 크기 측정을 하여 계산한 값을 나타내

었다. 200 bp의 표준 시료를 CGE로 분석한 결과 200 bp로 정확하게 나왔으나, SGE로 분석한 결과 208 bp로 8 bp의 차이를 가지는 것으로 나타났다. SGE에서는 600 bp에서는 보다 많은 19 bp의 차이를 보여주고 있다. 결과적으로 CGE가 SGE보다 빠른 분리를 보였으며, 정확성 면에서도 훨씬 우수한 것으로 나타났다. TRE 관련 질병은 3개의 핵산이 반복하여 증가하여 생기는 질병이기 때문에 진단하기 위해서는 정확한 크기 측정값의 계산이 필요로 한다. 이 실험에서는 CGE가 남성 불임 관련 AR gene의 CAG 반복 길이 측정에 유용하다는 것을 알 수 있다.

81명의 불임 남성과 89명의 정상인 남성들의 AR gene의 CAG 반복 길이를 CGE를 통해 DNA 크기를 측정 하였다. AR gene 에서 남성불임 관련부분인 CAG 반복 구간을 PCR을 이용하여 증폭한 후 표준 시료인 Φ X174 RF/Hae III 50 ng/ μ l를 각각 1대 1로 혼합하여 모세관 젤 전기영동을 실시 하였다.

Fig. 4의 electropherogram으로부터 CAG 반복 길이의 계산을 위해 각각의 DNA 절편들의 염기 쌍에 대한 전기 영동적 이동도를 구하여 검정 곡선을 만든다. 표준 시료인 Φ X174 RF/Hae III의 전기 영동적 이동도를 이용하여 non-linear regression analysis를 통하여 검정 곡선의 함수식을 찾았다. 검정 곡선의 regression 함수식은 $y=0.00017e^{(-\infty/200.46854)}+0.0001$ (coefficient of determination, $R^2=0.9989$)이며, y는 PCR 시료의 전기 영동적 이동도이고 x는 표준 시료 300 bp의 크기를 측정할 염기 쌍의 수이다. 위의 계산식에 의해서 Fig. 4의 PCR 시료의 염기쌍 수는 297 bp이다. 따라서 PCR primer forward와 reverse와 CAG 반복구간 이외의 부분(222 bp)을 빼준 후 3으로 나누면 반복 수를 구할 수 있다. 그 결과 PCR 시료의 CAG 반복 수는 25라는 것을 알 수 있다.

81명의 불임 남성과 89의 정상인 남성과의 AR gene의 CAG 반복의 길이를 평균적으로 비교하였다. 평균적인 CAG 반복 길이는 24.91 ± 2.4 (range, 18-29)의 불임남성과 23.99 ± 2.6 (range, 29)의 정상인 남성으로 나타났다. 두 그룹 사이의($P=0.018<0.05$) 통계학적으로 주목할 수 있는 차이를 나타내었다(Table 2).

그리고 불임남성과 정상인 남성을 각각 아류형의 CAG 반복 수의 평균값을 비교 하였다(Table 2). CAG 반복 수의 평균값의 통계적 중요성 오로지 한국 불임 남성의 무정자증(Azoospermai) 그룹(24.88 ± 2.4 (range,

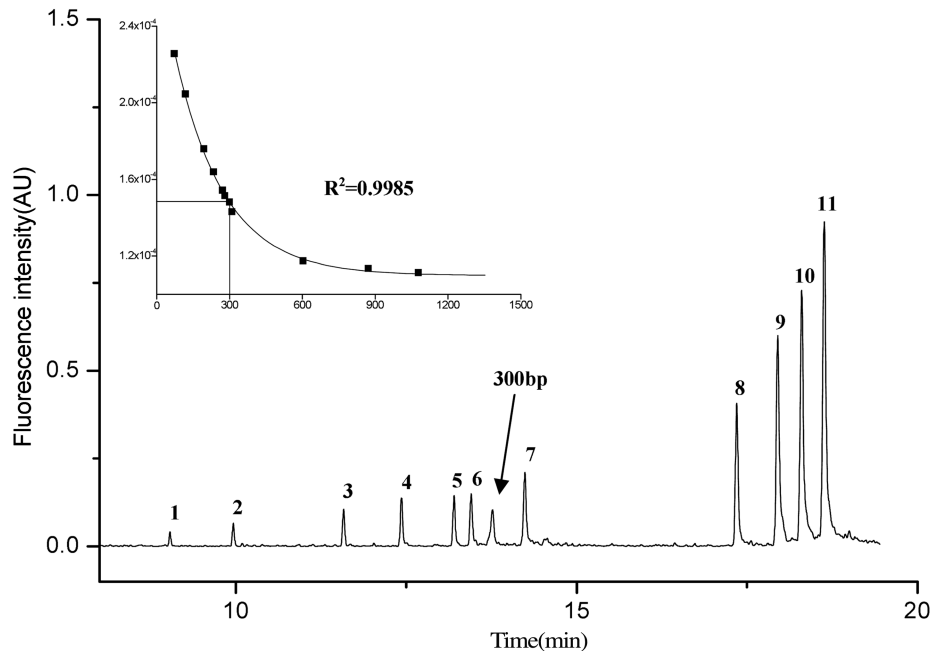


Fig. 2. Electrophoretic separation of standard sample (300 bp). Condition: DNA Marker and sample, DNA standard marker (Φ X174 RF/Hae III, 25 ng/ μ l) plus the 300bp; run buffer, 3 μ g/nL ethidium bromide in 1XTBE; Electric field strength, 180 V/cm; Sample injection, 4 kV for 4s; Capillary, PEO coated capillary, 30 cm \times 75 μ m ID(22 cm to the detection); sieving matrix, 1.5% PEO(Mw 8,000,000). Peak assignments, 1=72 bp. 2=118 bp. 3=194 bp. 4=234 bp. 5=271 bp. 6=281 bp. 7=310 bp. 8=603 bp. 9=872 bp. 10=1078 bp. 11=1353 bp.

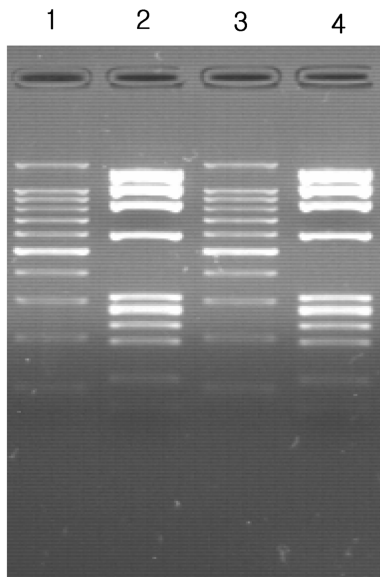


Fig. 3. Slab gel electrophoresis. standard marker 1,3=100 bp step ladder, 2,4= Φ X174 RF/Hae III. Conditions: 0.5 X TBE, 2.0% agarose gel, running voltage: 100 V, concentration; Φ X174 RF/Hae III 64 ng/ μ l, 100 bp step ladder 65 ng/ μ l, loading volume; 2 μ l, gel image instrument; Mupid+ α .

18-29), $P=0.038<0.05$)에만 보였으며, 다른 아류형 그룹은 없었다. 심한 OAT증후군(severe OAT) 그룹(25.00 ± 2.5 (range, 20-28), $P=0.132>0.05$)은 통계적인 유의성이 나타나지 않았다. 심한 희소정자증(severe oligozoospermia) 그룹은 다른 그룹에 비해 반복 횟수가 길었다.

세계적으로 결혼한 부부의 약 2~12%정도가 저하된 생식력을 보이며 이중 절반 정도가 불임남성에 의해 이루어지는데 이는 대부분이 충분한 정자를 만들지 못하는 희소정자증 이거나 혹은 정자를 전혀 만들지 못하는 무정자증이기 때문이다.²⁴ 한국의 불임남성 그룹을 조사한 결과 무정자증과 심한 OAT증후군이 대부분을 차지하였다(Table 2).

지금까지 많은 in-vitro 연구에서 CAG 반복 길이와 AR 기능 사이에 반비례적 관계를 증명되었다. 이는 AR gene의 점진적인 CAG 반복 확장이 전이활성 기능의 직선적인 감소의 원인이 되기 때문이다.²⁵

혼합 아시아계인 싱가포르 인구 내의, AR gene의 28 반복 이상의 CAG영역을 가지는 환자는 정자 형성의 감소 위험이 4배 보다 더 증가한다.¹² 이 경향은 또한 Australian²⁶, Japanese¹³, American² 그리고 French¹⁵인

Table 1. CGE와 SGE의 크기 측정 차이.

bp	Capillary Gel Electrophoresis (CGE)		Slab Gel Electrophoresis (SGE)	
	Sizing(bp)	Difference(bp)	Sizing(bp)	Difference(bp)
200	200	0	208	8
300	299	1	307	7
600	601	1	619	19

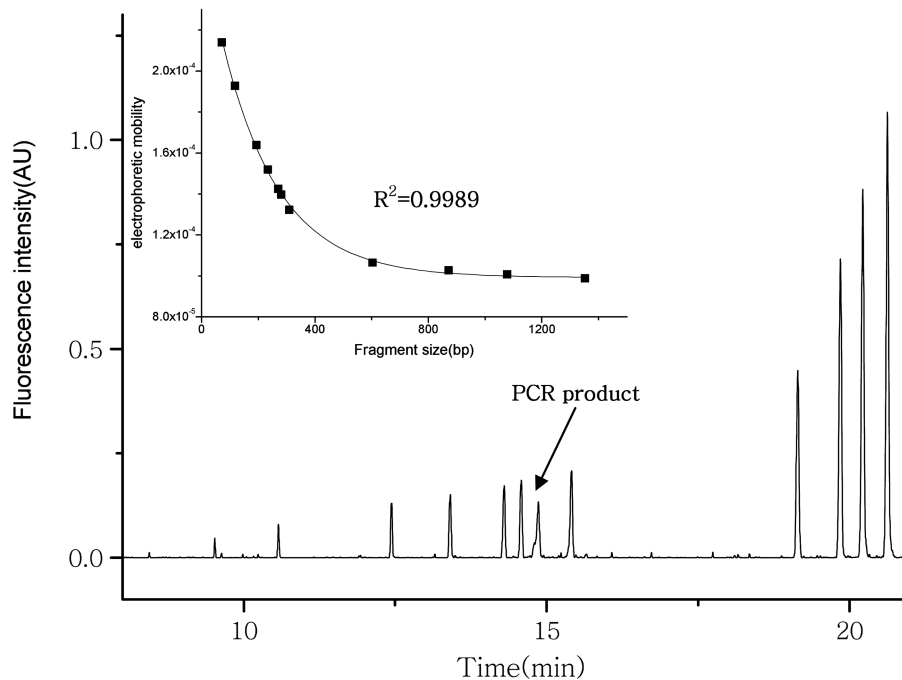


Fig. 4. Electrophoretic separation of PCR product associated with Idiopathic Male Infertility. Condition: DNA Marker and sample, DNA standard marker (Φ X174/Hae III, 25 ng/ μ l) plus the PCR product; run buffer, 3 μ g/nL ethidium bromide in IX-TBE; Electric field strength, 180 V/cm; Sample injection, 4 kV for 4s; Capillary, PEO coated capillary, 30 cm \times 75 μ m ID (22 cm to the detection); sieving matrix, 1.5% PEO (Mw 8,000,000).

구에서 관찰되었으며, 그 점에서 불임 남성의 특발성 무정자증 또는 희소 정자증은 통계학적으로 정상인 남성보다 긴 CAG 반복 영역을 가진다. 그런 점에서 우리는 긴 CAG 영역은 고유의 AR의 활동성을 감소시키고, 정자 형성의 감소와 남성불임을 유발 관련이 있다는 것을 주장할 수 있다.²⁷

다른 인종들의 연구에서의 각각의 차이의 원인은 불분명하지만, 민족성 의해 영향을 가지는 것으로 나타났다.

Fig. 5는 한국인의 정상인인 대조군과 불임 남성 간의 CAG 반복 길이를 비교한 것이다.

전체적으로 불임 남성이 정상인 남성보다 CAG 반

복 길이가 긴 영역에서 많이 관찰되는 경향을 보였다. 정상인인 남성 그룹은 보다 짧은 영역에서 많이 나타나는 경향을 보였다.

이 연구에서 우리는 한국의 81명의 불임 남성과 89의 대조군 평균적으로 비교하였으며, 통계학적인 중요한 차이($P=0.018$, Table 2)를 보았다. 그리고 불임 남성의 아류형 그룹인 무정자증의 CAG 반복 길이에서도 통계적으로 중요한 차이를 보였다($P=0.038$, Table 2).

본 연구에서 측정된 한국인의 AR gene의 CAG 반복 길이를 다른 인종과 비교하면 Singapore Chinese (Mean(range); 25.40(14-31))¹², UK(Mean(range); 25.00 (23-26))²⁸와 비슷한 크기의 CAG 반복 길이를 보였고

Table 2. The CAG repeat numbers of the AR gene in infertile males with five different subtypes(mean±SD).

	No. of person	Mean of CAG Repeat (mean±SD)	range	P
Fertile males	89	23.99±2.6	17-29	
Infertile males	81	24.91±2.4	18-29	0.018 ^a
Subtype of Infertile Males				
Azoospermia	60	24.88±2.4	18-29	0.038 ^a
OAT	1	24.33		
Severe OAT	17	25.00±2.5	20-28	0.132 ^b
Teratozoospermia	2	24.00	22-25	
Severe Oligozoospermia	1	27.33		

^aThe CAG repeat number between the fertile and infertile males by T-test.

^bThe CAG repeat number of the five different subtypes of the infertile males with the fertile males as tested for by T-test and Mann-Whitney U test.

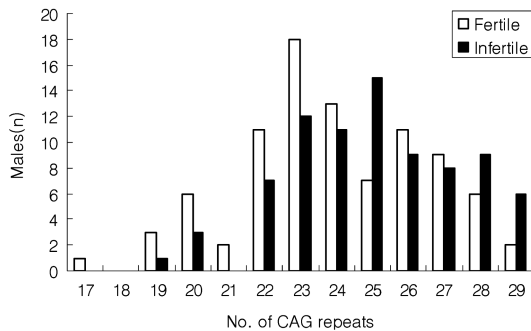


Fig. 5. Androgen receptor CAG allele distribution in normal fertile and infertile man.

Australian(Mean(range); 23.20(15-34))²⁶, American (Mean(range); 23.50(18-39), 21.95(14-31))², French (Mean(range); 23.91(13-28))¹⁵에 비해 보다 큰 차이를 보였다. 한국 불임 남성의 아류형 그룹인 무정자증 (Mean(range); 24.88(18-29))는 일본의 무정자증(Mean (range); 26.50(20-34))¹³보다 짧은 CAG 반복 길이를 보였다.

결론

SGE와 CGE를 정확한 크기의 측정을 위하여 각각 200 bp, 300 bp, 600 bp와 표준 시료인 ΦX174 RF/Hae III를 이용하여 비교하였다. 크기 측정값을 비교한 결과 CGE가 SGE보다 더 정확한 값을 나타내었다. 그러므로 남성불임 관련 AR gene의 CAG 반복 길이의 정확한 크기 측정으로 CGE가 적합함을 알 수 있었다.

본 연구에서는 81명의 한국의 불임 남성과 89명의

정상적인 한국 남성을 대조군으로 하여, AR gene의 CAG 반복 길이를 CGE를 이용하여 크기 측정을 하였으며 T-test를 이용하여 통계적 유의성을 구하였다. 한국 남성들의 AR gene의 CAG 반복 길이는 불임 남성과 정상적인 남성 사이에 통계적인 차이를 나타냈다. 인종적 특성에 의해 한국인의 CAG 길이는 Singapore Chinese와 UK와 비슷한 것으로 나타났다.

본 연구실에서는 소형화, 자동화가 가능한 고분자 microchip을 이용한 AR gene의 CAG 반복 길이증가에 의한 남성불임의 진단에 관한 연구가 진행되고 있다.

본 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-042-E00105).

인용문헌

1. Zirkin, B.R.; Santulli, R.; Awoniyi, C.A.; Ewing, L.L. *Endocrinol.* **1989**, *124*, 3043.
2. Mifsud, A.; Sim, C.K.; Boettger-Tong, H.; Moreira, S.; Lamb, D.J.; Lipshultz, L.I.; Yong, E.L. *Fertil. Steril.* **2001**, *75*, 275.
3. Bhasin, S.; Mallidis, C.; Ma, k. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *14*, 363.
4. Quigley, C.A.; De B.A.; Marschke, K.B.; EI, A.M.; Wilson, E.M.; French, F.S. *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 271.
5. Choong, C.S.; Kempainen, J.A.; Zhou, Z.X.; Wilson, E.M. *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 1527.
6. Edwards, A.; Hammond, H.A.; Jin, L.; Caskey, C.T.; Chakraborty, R. *Genomics* **1992**, *12*, 241.
7. La, S. A.R.; Wilson, E.M.; Lubahn, D.B.; Harding, A.E.; Fischbeck, K.H. *Nature* **1991**, *352*, 77.
8. Huntington's Disease Collaborative Research Group.

- Cell* **1993**, 72, 971.
9. Orr, H.T.; Chung, M.Y.; Banfi, S.; et al. *Nat. Genet.* **1993**, 4, 221.
10. Kawauchi, Y.; Okamoto, T.; Taniwaki, M.; et al. *Nat. Genet.* **1994**, 8, 221.
11. Arbizu, T.; Santamaria, J.; Gomez, J.M.; Quilez, A.; Serra, J.P. *J. Neurol. Sci.* **1983**, 59, 371.
12. Tut, T.G.; Ghadessy, F.J.; Trifiro, M.A.; Pinsky, L.; Yong, E.L. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, 82, 3777.
13. Yoshida, K.I.; Yano, M.; Chiba, K.; Honda, M.; Kitahara, S. *Urology* **1999**, 54, 1078.
14. Lund, A.; Tapanainen, J.S.; Lahdetie, J.; Savontaus, M.L.; Aittomaki, K. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* **2003**, 82, 162.
15. Wallerand, H.; Remy-Martin, A.; Chabannes, E.; Ber-mont, L.; Adessi, G.L.; Bittard, H. *Fertil. Steri.* **2001**, 76, 769.
16. Fung, E.N.; Yeung, E.S. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1913.
17. Mueller, O.; Hahnenberger, K.; Dittmann M.; Yee H.; Dubrow R.; Nagle R.; Ilsley D. *Electrophoresis* **2000**, 21, 128.
18. Chen, H.S.; Chang, H.T. *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2033.
19. Lieberwirth, U.; Arden-Jacob, J.; Drexhage, K.H.; Herten, D.P.; Muller, R.; Neumann, M.; Schulz, A.; Schulz, A.; Sievert, S.; Sagner, G.; Klingel, S.; Sauer, M.; Wolfrum, J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4771.
20. Kim, Y.; Yeung, E.S. *J. Chromatog. A* **1997**, 781, 315.
21. McCord, B.R.; McClure, D.L.; Jung, J.M. *J. Chromo-tog. A* **1993**, 652, 75.
22. Peck, K.; Wung, S.L.; Chang, G.S.; Yen, Y.J.J.; Hsieh, Y.Z. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1380.
23. Benedek, K.; Guttman, A. *J. Chromatogr. A* **1994**, 680, 375.
24. Kim, Y.J.; You, S.A.; Paik, S.G. *Korean J. Genetics* **1998**, 20, 141.
25. Chamberlain, N.L.; Driver, E.D.; Miesfeld, R.L. *Nucleic. Acids Res.* **1994**, 22, 3181.
26. Dowsing, A.T.; Yong, E.L.; Clark, M.; McLachlan, R.I.; de Kretser, D.M.; Trounson, A.O. *Lancet.* **1999**, 354, 640.
27. Yong, E.L.; Loy, C.J.; Sim, K.S. *Hum. Reproduc. Upd.* **2003**, 9, 1.
28. Lim, H.N.; Chen, H.; McBride, S.; Dunning, A.M.; Nixon, R.M.; Hughes, I.A.; Hawkins, J.R. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, 9, 829.
-