

B세포 림프종 환자의 파라핀 조직에서 중합효소연쇄반응법을 이용한 면역글로블린 중쇄유전자 재배열 검출 및 염기서열 분석

아주대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ³병리학교실, ⁴소아과학교실, ⁵종양혈액내과학교실,
²텍사스대학 M.D. 앤더슨 암센터 혈액병리과

조성란¹ · 박일중¹ · 민성리² · 김은경¹ · 이위교¹ · 한재호³ · 박준은⁴ · 박준성⁵ · 김효철⁵

Polymerase Chain Reaction and Sequencing of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Rearrangement in Formalin Fixed, Paraffin-embedded Tissue of Patients with B Cell Lymphoma

Sung Ran Cho, M.D.¹, Il Joong Park, M.D.¹, Ming-Sheng Lee, M.D.², Eun-Kyoung Kim, M.D.¹,
Wee Gyo Lee, M.D.¹, Jae Ho Han, M.D.³, Jun Eun Park, M.D.⁴,
Joon Seong Park, M.D.⁵ and Hugh Chul Kim, M.D.⁵

Departments of ¹Laboratory Medicine, ³Patbology, ⁴Pediatrics and ⁵Hematology-Oncology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea,
²Department of Hematopathology, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

Background: Immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangement has been known to be a useful marker for determining the clonality as well as detecting minimal residual disease in B cell malignancies. This study was performed to establish single polymerase chain reaction (PCR) methods for the detection of IgH gene rearrangements in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of patients with B cell lymphoma and determine the type of JH segments used.

Methods: We obtained formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of 44 patients diagnosed with B cell lymphoma at Ajou University Hospital from January 2005 to January 2007 and reviewed medical records retrospectively. After the extraction of DNA, PCR was performed using VH3 and JHPST primers to detect the third complementarity determining region (CDR3) gene of IgH. Sequence analysis of the PCR products was also done in 23 patients.

Results: The CDR3 gene rearrangements were detected in 26 (59%) out of 44 patients with B cell lymphoma. Sequence analysis of the amplified CDR3 gene was successful in 16 (70%) of 23 patients. JH3, JH4, JH5, and JH6 segments were used for CDR3 gene rearrangements in 3 (25%), 4 (33%), 1 (8%), and 4 (33%) patients with diffuse large B cell lymphoma, respectively.

Conclusion: Although there are some limitations due to a low sensitivity less than 60%, single PCR using consensus primers could be an effective tool for the detection of CDR3 gene rearrangements in routine laboratory settings. Furthermore, sequence analysis of the CDR3 PCR products will provide basic information necessary for further studies. (*Korean J Hematol 2007;42:361-366.*)

Key Words: IgH, Gene rearrangement, Polymerase chain reaction, B cell lymphoma, CDR3, Sequence analysis

접수 : 2007년 6월 11일, 수정 : 2007년 9월 4일

승인 : 2007년 9월 15일

교신저자 : 김효철, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5

☎ 443-749, 아주대학교 의과대학 종양혈액내과
학교실

Tel: 031-219-5138, Fax: 031-219-5983

E-mail: hughkim@ajou.ac.kr

Correspondence to : Hugh Chul Kim, M.D.

Department of Hematology-Oncology, Ajou University School
of Medicine

San 5, Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-749, Korea

Tel: +82-31-219-5138, Fax: +82-31-219-5983

E-mail: hughkim@ajou.ac.kr

서 론

악성 림프계 질환의 98% 이상에서 면역글로불린 혹은 T세포 수용체 유전자의 클론성 재배열을 보인다.¹⁾ B세포 악성 종양은 한 가지 종류의 면역글로불린 유전자 재배열을 보이는 단클론성 B세포로 이루어져 있는데, 이와 달리 다클론성 B세포는 수십만 가지의 서로 다른 면역글로불린 유전자 재배열을 보인다. 각각의 면역글로불린 유전자 재배열은 variable (V), diversity (D), joining (J) 영역 유전자 분절의 재조합에 의해 일어난다.^{2,3)} 이러한 유전자 재배열의 다양성은 재조합 과정에서 불특정 염기가 추가되기도 하고 삭제되기도 하는 the third complementarity determining region (CDR3)에서 가장 뚜렷하다. 결과적으로 특유의 CDR3 염기서열은 각각의 악성 B세포 클론의 분자적 특성을 결정한다. 이 CDR3 염기서열의 검출은 B세포 악성 종양의 진단이나 치료 후 추적관찰에 사용될 수 있고, 특히 최소잔류질환(minimal residual disease)의 존재 여부에 대한 확증이 될 수 있다.⁴⁾

분자생물학적으로 클론성을 확인하기 위한 검사로는 Southern blot이 표준방법이지만 오랜 시간과 고도의 기술이 필요하고, 고품질의 DNA가 다량 필요하다는 단점 때문에 널리 사용되지 않는다.⁵⁾ 반면에 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)은 시간이 적게 들고 소량의 DNA를 필요로 하며 DNA의 질이 조금 떨어져도 검사가 가능하기 때문에 파라핀 조직처럼 보관된 검체를 사용할 수 있다는 장점이 있다.⁶⁾

저자들은 일반 검사실에서 쉽게 적용할 수 있도록 파라핀 조직에서 CDR3 유전자 재배열 검출 방법을 확립하고, B세포 림프종에서 최소잔류질환 검출을 위한 기초자료로 활용하기 위해 중합효소연쇄반응법을 이용하여 CDR3 유전자 재배열 양성률을 구하고자 하였다. 또한 각 환자의 CDR3 유전자 염기서열을 분석하여 JH 유전자형의 분포를 알아 보고, 클론 특이 시발체(clone specific primer)의 제작을 위한 기초자료로 사용하고 싶어 하였다.

대상 및 방법

1. 환자 및 DNA 추출

2005년 1월부터 2007년 1월까지 25개월 동안 아주대병원에서 B세포 림프종으로 진단된 환자 44명을 대

상으로 보관되어 있던 파라핀 조직을 4 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 붙여서 DNA를 추출하였다. 본 연구는 아주대병원 의학연구윤리심의위원회(institutional review board)의 승인을 받고 환자의 동의서를 받아 진행하였다. DNA 추출 부위는 림프종 세포가 90% 이상인 부위를 병리학 전문의 1인이 현미경으로 확인하여 선택하였고, 추출 방법은 다음과 같았다. 크실렌(xylene)을 슬라이드가 덮일 정도로 올려주고 5분간 방치한 후 75% 에탄올로 세척하여 공기 중에 건조시켰다. Proteinase K 용액(1 \times SSCE 90 μ L+10% SDS 10 μ L+2.5 μ g/ μ L proteinase K 0.8 μ L)을 조직 위에 올려놓고 yellow tip의 끝으로 조직을 끊어서 microcentrifuge tube로 옮기고 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 항온하였다. 이것을 다시 98 $^{\circ}$ C, 15분 항온하여 proteinase K를 불활성화시킨 후 얼음에 넣어 식히고, QIAquick PCR purification kit (QIAGEN sciences, Maryland, USA)를 사용하여 DNA를 정제하였다. 필요한 경우 proteinase K 처리 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다가 사용하였다.⁷⁾

2. 중합효소연쇄반응법

추출한 DNA에서 면역글로불린 중쇄유전자 재조합 부위 즉, CDR3 유전자를 증폭하기 위해 V 영역에 해당하는 VH3 시발체(5'-ACACGCCCGTATATTACTGT-3')와 J 영역에 해당하는 JHPST 시발체(5'-ACCTGC-AGGAGACGGTGACC-3')를 사용하여 중합효소연쇄반응법을 시행하였다. 반응액은 AccuPower[®] Hotstart PCR Premix solution (바이오니아, 대한민국)을 사용하였고, 최종 반응액의 부피는 20 μ L였다. 반응조건은 우선 hotstart Taq을 활성화하기 위해 95 $^{\circ}$ C 15분 항온한 후 94 $^{\circ}$ C 15초, 55 $^{\circ}$ C 15초, 72 $^{\circ}$ C 45초로 50회 반복하였다. 중합효소연쇄반응 장비는 MyGenie32 Thermal Block (바이오니아, 대한민국)을 사용하였고, 증폭 산물은 ethidium bromide가 첨가된 2% agarose gel로 100V, 25~30분 동안 전기영동한 후 UV 투과조명기(transilluminator)에서 띠(band) 유무를 관찰하였다. 70~150bp 크기의 뚜렷한 띠가 한 개 또는 두 개 보이는 경우를 양성으로 판정하였다. 양성 대조는 염기서열 분석으로 IgH 유전자 재배열 양성이 증명된 B세포 림프종 DNA를 사용하였고, 음성 대조는 정상 헌혈자의 말초혈액 단핵구 DNA를 사용하였다.

3. Sequencing

CDR3 유전자의 염기서열을 알기 위해 70~150bp 크기의 뚜렷한 띠 한 개를 보인 중합효소연쇄반응법의

산물 23개의 염기서열 분석을 외부 기관(마크로젠, 한국)에 의뢰하였고, 검사방법을 요약하면 다음과 같다. ABI PRISM BigDye™ terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA)와 VH3 시발체를 사용하여 PTC-225 Peltier thermal cycler (MJ Research Inc., Canada)로 중합효소연쇄반응법을 시행한 후 에탄올로 정제하였다. 정제된 중합효소연쇄반응 산물을 3차 증류수에 녹인 후 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 분석하였다.

결 과

1. 중합효소연쇄반응법을 이용한 CDR3 유전자 재배열 검출

44명의 환자 중 광범위B대세포림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 33명, 변연부B세포림프종(marginal zone B cell lymphoma, MZL) 6명, 여포림프종(follicular lymphoma, FL) 3명, 버킷림프종(Burkitt lymphoma) 2명이었고, 평균연령은 54±15.3세, 남녀비는 1.3 : 1이었다. 조직의 종류는 림프절 26예, 편도 3예, 대장 3예, 소장 2예, 연부조직 2예, 뇌 2예였고, 흉막, 위, 폐, 유방, 이하선, 갑상선이 각각 1예씩이었다.

증폭산물의 크기는 70~150bp였고, 44명의 환자 중 26명(59%)에서 CDR3 유전자 재배열이 검출되었다

Table 1. Results of single PCR for the detection of CDR3 gene rearrangement in patients with B cell lymphoma

Diagnosis	Positive	Negative	Detection rate (%)
DLBCL	20	13	61
MZL	3	3	50
FL	1	2	33
Burkitt lymphoma	2	0	100
Total	26	18	59

Abbreviations: DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; MZL, marginal zone B cell lymphoma; FL, follicular lymphoma.

(Table 1, Fig. 1). CDR3 유전자에 해당하는 한 개의 띠만 보인 경우는 25예, 두 개의 띠를 보인 경우는 1예였고, 넓은 띠를 보여 음성으로 판독된 경우는 18예였다. CDR3 유전자 재배열 양성인 26예 중 9예(35%)에서는 크기가 300bp 이상인 비특이 띠가 한 개 이상 추가로 관찰되었다.

2. CDR3 염기서열 분석

염기서열 분석을 시행한 23예 중 16예(70%)에서만 CDR3 영역의 염기서열 결과를 얻을 수 있었고, CDR3 유전자 재배열에 사용된 JH segment의 분포는 Table 2와 같았다.

고 찰

여포림프종 환자에서 자가 골수 이식 후 골수에서 bcl-2 재배열 중합효소연쇄반응 음성 여부는 환자의 예후를 예측하는 데 중요하다.⁸⁻¹⁰ 또한 비호지킨 림프종에서 면역글로불린 재배열이 중합효소연쇄반응법으로 음성이면 자가 골수 이식 후 재발을 줄일 수 있다고 알려져 있다.¹¹ 국내에서는 Park 등이 8종의 시발체를 사용하여 소아 급성림프구성백혈병 진단 시 30예 중 28예(93.3%)에서 IgH 유전자 재배열을 검출하였고, 완전관해 시 IgH 유전자 재배열이 검출된 환자의 26%가 재발하거나 사망하였으며, IgH 유전자 재배열이 검출되지 않은 환자에서는 7.1%만 재발하였다고 보고하였다.¹² 또한 Cho 등은 35명의 B세포 림프종 환자를 대상으로 FR3A-LJH/VLJH 시발체를 이용한 semi-nested PCR을

Table 2. Frequencies of JH segment used for CDR3 gene rearrangement in patients with B cell lymphoma

Diagnosis	JH3	JH4	JH5	JH6
DLBCL	3	4	1	4
MZL	1	2	0	0
FL	0	1	0	0

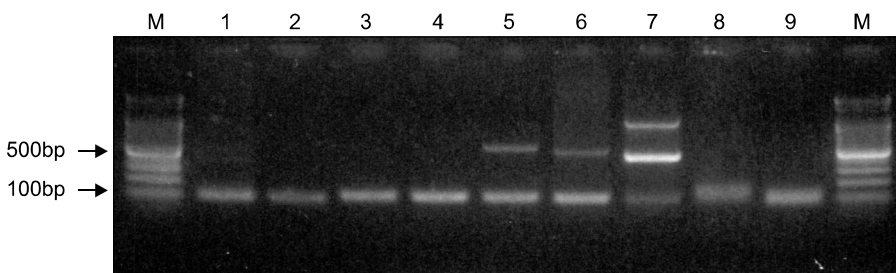


Fig. 1. 2% agarose gel electrophoresis of the PCR product amplified for CDR3 gene. M, size marker (100bp ladder); 1, positive control; 2~4, positive samples; 5~7, positive samples with one or more non-specific bands; 8, negative control; 9, negative sample.

시행하여 35명 전원(100%)에서 IgH 유전자 재배열을 검출하였다.¹³⁾

IgH 유전자 재배열은 CDR3 영역을 증폭시키는 여러 종류의 시발체를 이용하였을 때 예민도가 56~97%로 매우 다양한데, 이러한 차이는 중합효소연쇄반응의 결과가 림프종의 조직 유형과 시발체에 따라 예민도가 달라질 뿐 아니라 조직의 두께, 고정액의 종류, 조직 고정 시간, proteinase K 처리 시간, 조직의 분석전 보관 기간, 중합효소연쇄반응 억제인자의 존재 등에 따라 영향을 받기 때문이다.^{6,13,14)} 또한 파라핀 블록의 보관 기간이 2년 미만인 경우 가장 좋은 결과를 얻을 수 있으므로,¹⁵⁾ 본 연구에서도 보관 기간 2년 내외의 조직만 사용하였다.

VH 공통 시발체와 JH 공통 시발체를 사용한 CDR3 중합효소연쇄반응 산물의 크기는 일반적으로 80~120bp이다.¹¹⁾ 비호지킨 림프종 검체에서 추출한 DNA는 단클론성인 암세포 DNA뿐만 아니라 다클론성 정상 B세포 DNA도 포함하고 있는 경우가 많고, 공통 시발체를 사용할 경우 동시에 증폭될 수 있다. 이렇게 오염된 정상 B세포의 중합효소연쇄반응 산물은 염기서열 분석을 할 때 중대한 영향을 줄 수 있다.¹⁶⁾ 정확한 염기서열을 아는 것이 클론 특이 시발체와 탐색자(probe)를 디자인하는 데 필수적이지만, 단클론성 CDR3 DNA와 오염되어 있는 다클론성 CDR3 DNA를 분리하는 것이 어려운 경우가 많다.¹⁷⁾ 본 연구에서도 2예에서 단클론성 띠 외에 다클론성 띠가 함께 관찰되었다. 또한 뚜렷한 한 개의 띠가 관찰되어 외부 검사기관으로 염기서열 분석을 의뢰한 23예 중 16예만 성공적으로 염기서열을 확인할 수 있었던 것으로 보아 다클론성 띠의 존재는 더 빈번한 것으로 추측할 수 있다.

T세포 림프종에서 면역글로블린 유전자 재배열이 있거나 B세포 림프종에서 T세포 수용체 유전자 재배열이 있는 것을 lineage infidelity 또는 lineage promiscuity라고 한다. T세포 림프종이나 백혈병에서 면역글로블린 유전자 재배열 양성률은 Southern blot으로 검사했을 때 약 30%, 중합효소연쇄반응법으로 검사했을 때 약 40%에 달한다. 저자들도 T세포 림프종/백혈병 환자 5명 중 3명(60%), 만성골수증식성질환 환자 2명 중 1명(50%)에서 IgH 유전자 재배열을 검출할 수 있었으나, 정상 현혈자 5명은 모두 음성이었다(미제시 자료). 즉, IgH 유전자 재배열 유무는 질환의 clonality를 결정하는 데 도움을 줄 수 있지만, lineage를 결정하는 데는 오히려 혼란을 줄 수 있음을 명심해야 한다.

또한, 조직에 B세포가 너무 적게 포함되어 있는 경

우 이 세포의 유전자가 중합효소연쇄반응에 의해 증폭되어 하나 혹은 소수의 띠로 관찰될 수 있는데 이를 pseudoclonality 혹은 oligoclonality라 부르고, 위양성의 원인이 될 수 있다.^{6,18)} 본 연구에서는 B세포 림프종 진단 당시의 조직으로 90% 이상의 림프종 세포가 관찰되는 부위에서 DNA를 추출하였기 때문에 pseudoclonality의 가능성은 배제할 수 있으리라 생각한다. 그러나, T세포 림프종이나 T세포 백혈병처럼 B세포가 감소되어 있는 경우는 결과 해석 시 주의가 필요하다.

비특이 띠는 시발체가 비특이적인 부위에 가서 부착하여 생기거나 germline fragment가 증폭되어 생길 수 있다. 본 연구에서도 9예에서 비특이 띠가 관찰되었지만 띠 크기의 범위가 CDR3 특이 띠와 완전히 달라서 결과를 해석하는 데 영향을 주지는 않았다.

위음성의 원인으로서는 공통 시발체(consensus primer)의 사용이나 somatic hypermutation으로 인한 시발체의 부착 오류, 정상 다클론성 B세포의 오염으로 인한 예민도 저하 등이 있다. 세 종류의 FR 유전자에 해당하는 표준화된 시발체를 복합하여 multiplex PCR을 하면 시발체 부착 부위의 somatic hypermutation으로 인한 위음성률을 크게 낮출 수 있다. 유럽의 BIOMED-II는 표준화된 중합효소연쇄반응법의 프로토콜을 제안하였는데, 총 21종의 시발체를 이용한 multiplex PCR을 시행함에 있어 최종 부피를 50 μ L, template DNA의 양을 100ng 사용할 것을 권장하였고 중합효소연쇄반응 용액의 조성, 반응조건에 대해서도 상세히 기술하였다.⁶⁾

면역글로블린 재조합에 사용되는 JH segment는 정상 B세포에서는 JH4가 가장 흔하고, FL에서는 JH6가 가장 흔한 것으로 알려져 있는데,¹⁹⁾ JH4 : JH5 : JH6 비율이 정상 B세포에서는 41 : 7 : 38%,²⁰⁾ 외투세포림프종(mantle cell lymphoma, MCL)에서는 25 : 19 : 39%,²¹⁾ FL에서는 15 : 8 : 70%²²⁾였다. 본 연구에서는 DLBCL에서 JH4 : JH5 : JH6 비율이 33 : 8 : 33%로 정상 B세포나 MCL과 유사하였고, MZL, FL, Burkitt lymphoma는 증례 수가 너무 적어 알 수 없었다. 흥미로운 것은 DLBCL에서 JH3 비율이 25%로 높아서 림프종 분류 혹은 인종 간에 차이가 있을 가능성을 시사하였으나, 본 연구의 대상 환자 수가 적어서 단정지어 말할 수 없다. 그러므로, 여러 기관이 참여하여 증례 수를 늘리고, JH segment 분포에 따른 혈액병리적 특징, 임상적 특징, 예후 등의 차이가 있는지에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론적으로, 공통 시발체를 사용한 단일 중합효소연쇄반응법을 이용하여 B세포 림프종 환자의 파라핀 조

직에서 면역글로블린 중쇄 유전자 재배열(CDR3)을 쉽게 검출할 수 있었고, 그 산물의 염기서열을 분석하여 각 환자의 특징적인 CDR3 염기서열 및 재배열에 사용된 JH segment의 종류를 알 수 있었다. 그러나, 약 60%의 환자에서만 중합효소연쇄반응 양성으로 나오는 제한점이 있으므로 BIOMED-II의 권장안처럼 시발체의 종류를 늘리면 검출률을 높일 수 있으리라 생각한다.

요 약

배경: 면역글로블린 중쇄 유전자 재배열은 림프종, 백혈병, 다발성 골수종과 같은 악성 B세포 질환에서 최소잔류질환을 검출하는 데 뿐만 아니라 질환의 클론성을 결정할 때 유용하다. 본 연구에서는 B세포 림프종 환자의 파라핀 조직에서 면역글로블린 중쇄 유전자 재배열 검출을 위한 단일 중합효소연쇄반응법을 확립하고, CDR3 유전자 염기서열을 분석하여 재배열에 사용된 JH segment의 종류를 알아보려고 하였다.

방법: 2005년 1월부터 2007년 1월까지 아주대병원에서 B세포 림프종으로 진단된 환자 44명으로부터 얻은 파라핀 조직을 대상으로 하였고, 각 환자의 의무기록은 후향적으로 검토되었다. 조직 절편으로부터 DNA를 추출한 후 면역글로블린 중쇄 유전자의 CDR3 영역을 증폭할 수 있는 VH3 및 JHPST 시발체를 사용하여 단일 중합효소연쇄반응법을 시행하였다. 또한 23명의 환자에 대해서는 중합효소연쇄반응 산물의 염기서열 분석을 실시하였다.

결과: B세포 림프종 환자 44명 중 26명(59%)에서 면역글로블린 중쇄 유전자(CDR3) 재배열을 검출하였다. 염기서열 분석을 실시한 23명 중 16명(70%)에서만 증폭된 CDR3 유전자 염기서열을 알 수 있었고, 재배열에 사용된 JH segment의 종류를 분류할 수 있었다. DLBCL 환자에서 JH3, JH4, JH5, JH6가 각각 3명(25%), 4명(33%), 1명(8%), 4명(33%)에서 나왔다.

결론: 60% 이하의 양성률을 보이는 낮은 예민도 때문에 제한점이 있기는 하지만 공통 시발체를 사용한 단일 중합효소연쇄반응법은 일반적인 임상검사에서 CDR3 유전자 재배열 검출을 위한 검사로서 유용하게 쓰일 수 있다. 또한 CDR3 유전자의 염기서열 분석을 함으로써 추후 연구의 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clin Chim Acta* 1991;198:93-174.
- 2) Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 1980;19:981-92.
- 3) Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-81.
- 4) Yamada M, Hudson S, Tournay O, et al. Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-III)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5123-7.
- 5) van Dongen JJ, Wolvers-Tettero IL. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991;198:1-91.
- 6) van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-317.
- 7) Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 2001;25:409-18.
- 8) Apostolidis J, Gupta RK, Grenzeliak D, et al. High-dose therapy with autologous bone marrow support as consolidation of remission in follicular lymphoma: long-term clinical and molecular follow-up. *J Clin Oncol* 2000;18:527-36.
- 9) Gribben JG, Neuberger D, Freedman AS, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993;81:3449-57.
- 10) Moos M, Schulz R, Martin S, Benner A, Haas R. The remission status before and the PCR status after high-dose therapy with peripheral blood stem cell support are prognostic factors for relapse-free survival in patients with follicular non-Hodgkin's lym-

- phoma. *Leukemia* 1998;12:1971-6.
- 11) Zwicky CS, Maddocks AB, Andersen N, Gribben JG. Eradication of polymerase chain reaction detectable immunoglobulin gene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma is associated with decreased relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1996;88:3314-22.
 - 12) Park CJ, Kim MC, Moon AR, et al. Detection of minimal residual disease by IgH gene rearrangement-PCR in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Clin Pathol* 1999;19:163-71.
 - 13) Cho EY, Ko YH, Kim DS, Han JJ, Ree HJ. Diagnostic utility of polymerase chain reaction-based clonality analysis for immunoglobulin heavy chain gene and T-cell receptor gamma chain gene rearrangement in lymphoid neoplasms. *Korean J Pathol* 2001;35:461-9.
 - 14) Bagg A, Brazier RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *J Mol Diagn* 2002;4:81-9.
 - 15) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:118-26.
 - 16) Tierens A, Lozano MD, Wickert R, Chan WC, Greiner TC. High-resolution analysis of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements using denaturing gradient gel electrophoresis. *Diagn Mol Pathol* 1996;5:159-65.
 - 17) Wu G, Greiner TC, Chang WC. Obtaining clone-specific primer and probe for the immunoglobulin heavy-chain gene from paraffin-embedded tissue of B-cell lymphoma: technical considerations. *Diagn Mol Pathol* 1997;6:147-53.
 - 18) Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Mitchell RS, Brown MS, Robetorye RS. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn* 2000;2:92-6.
 - 19) Buchonnet G, Jardin F, Jean N, et al. Distribution of BCL2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease? *Leukemia* 2002;16:1852-6.
 - 20) Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE. Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* 1995;155:190-202.
 - 21) Welzel N, Le T, Marculescu R, et al. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2001;61:1629-36.
 - 22) Jager U, Bocskor S, Le T, et al. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 2000;95:3520-9.