

PCR-SSCP법에 의한 암 유전자 해석

1. AP-PCR-SSCP법에 의한 암 DNA 해석

Akira Okano/Takeo Sekiya

암에서는 기저 유전자좌의 LOH나 염기치환 등 DNA 이상이 확인되어 있으나 발암 기작을 해명하기에는 불충분하여 암세포 genome의 미지영역에서 DNA의 이상 유무를 광범위하게 검사할 필요가 있다.

본 고에서는 AP-PCR로 생성된 DNA 단편을 SSCP법으로 해석하는 AP-PCR-SSCP법을 이용한 DNA 이상 검사법에 대하여 소개한다. AP-PCR-SSCP법은 해석대상의 염기서열에 대한 정보없이 genome상에 존재하는, 다수의 미지영역의 LOH를 비롯한 암부위 특이적인 변화를 검출하는 광범위한 DNA 이상 검사법이다.

머리말

발암 기작을 연구하는 한 방법으로서 흔히 암 세포 genome상에 존재하는 DNA의 결실 유무를 검사하며, 현재까지 많은 암 관련 유전자 특히 암 억제 유전자의 동정에 매우 중요한 역할을 하였다. 대표적인 암 억제유전자로 p53 유전자와 RB 유전자가 있으나 암세포의 이상 출현빈도는 종양의 종류 및 암 진행도에 따라 큰 차이가 있으며, 여러 종류의 세포에서 발암 기작을 공통적으로 설명하기에는 부족하다.

Human 간암세포(hepatocellular carcinoma: HCC)의 예를 들면 진행중인 암은 일정 빈도의 loss of heterozygosity(LOH) 및 유전자 내의 염기치환 등 DNA 이상¹⁻⁴⁾이 확인되지만, 조기암인 경우 일부 LOH의 보고를 제외하고 이상은 검출되지 않는다¹⁾. 이 기저 유전자좌에서 암부위 특이적 이상의 검출은 기존의 많은 검사법으로 쉽게 검출하고 있으나 기저유전자의 해석에서 얻을 수 있는 정보는 극히 제한적이다. 이러한 견지에서 암세포 genome 미지영역에서 DNA 이상의 광범위한 검색은 매우 중요하다.

Welsh 팀에서 개발한 arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR)⁶⁾법은 검색 대상인 DNA 영역 염기서열 정보의 필요 없이 human cancer DNA 해석에 이용할 수 있다. 즉 DNA mismatch 수복 기작의 이상(replication error: RER)으로 미지영역에 있어서의 단순 반복서열 수의 변화 검출⁷⁾, genome상의 염기서열 결실이나 증폭 등 이상의 검출^{8,9)}에 이용된다.

본 고에서는 AP-PCR로 생성된 DNA단편의 single-strand conformation polymorphism(SSCP)을 해석^{10, 11)}하는 AP-PCR-SSCP법에 의한 DNA 이상 검사에 대하여 소개한다.

I. AP-PCR 원리

그림 1에 AP-PCR의 원리를 나타내었다. 한개의 primer를 이용하여 낮은 온도·장시간의 annealing 조건에서 PCR하면 primer와 주형 DNA의 염기서열간에 다소 mismatch가 존재하여도

annealing이 형성되어 DNA 합성이 시작된다. 이 조건에서 1~수 cycle의 PCR(low stringency PCR)을 한다. 이렇게 생성된 DNA단편을 주형으로 같은 primer를 사용하여 높은 온도·단시간 annealing 조건에서 PCR(high stringency PCR)을 30~40 cycle한다. 이 결과 같은 primer 염기서열로 좁혀진 수 십개의 DNA 단편을 genome상의 다양한 위치에서 증폭할 수 있다.

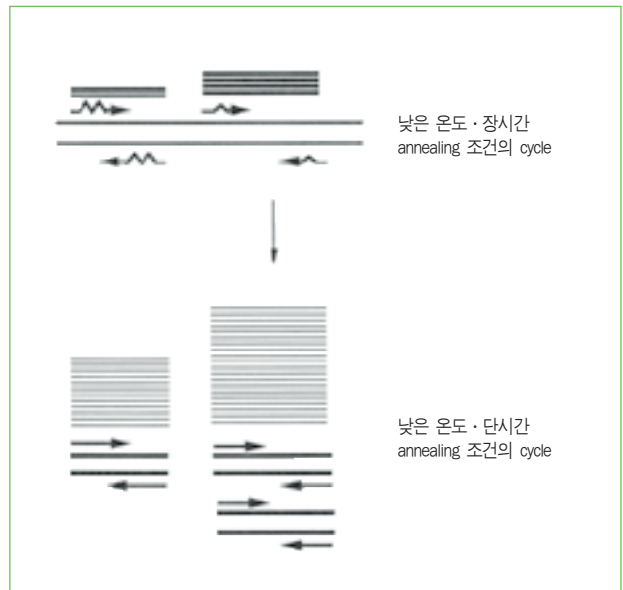


그림 1 AP-PCR 원리

Arbitrarily primer를 사용하여 low stringency annealing 조건에서 genome DNA에 hybridization 하면 mismatch를 포함한 hybrid가 형성된다. 이 조건으로 PCR을 여러번 하면 mismatch primer 상태로 DNA합성을 한다. 합성 후 보통의 annealing 조건으로 PCR 하면 이미 합성된 DNA를 주형으로 완전하게 match된 primer로 PCR산물을 얻을 수 있다. 이런 조건에서 합성한 주된 DNA단편은 재현성이 높으므로 최종적으로 얻은 DNA 단편도 높은 재현성을 나타낸다.

II. AP-PCR

Human 암 조직 및 정상조직에서 DNA를 proteinase K-phenol chloroform 법¹²⁾으로 추출하여 주형으로 사용한다.

주형 DNA	50 ng
[γ - ³² P] ATP 표식 primer(18~27 nucleotides)	2 μ M
4 dNTP	각 125 μ M
Taq DNA polymerase	0.5 unit
PCR 완충액	
(최종농도: Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, MgCl ₂ 5 mM)	
[α - ³² P] dCTP	1 μ Ci

[γ - 32 P]ATP표식 primer에 첨가하여 [α - 32 P]dCTP로 DNA 단편 내부를 표식하여 길이가 긴 DNA 단편을 쉽게 검출할 수 있다. PCR은 3분간 denaturation 후 low stringency annealing 조건에서 PCR(94°C 1분, 50°C 1분, 72°C 2분) 5 cycle, high stringency annealing 조건에서 PCR(94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분)반응 30 cycles 실시 후 8분간 final extension 한다.

III. 전기영동

PCR 반응액과 동량의 formamide loading dye(95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% xyleneecyanol, 0.05% bromophenol blue)를 첨가하고 90°C 3분간 denaturation 후 각 2 μ l를 두 종류의 전기영동법으로 해석한다.

DNA 단편을 서열길이에 따라 분리하는 AP-PCR법으로 해석하는 경우 전기영동 조건은 8 M 요소를 함유하는 5% polyacrylamide 변성 겔(30 cm×40 cm×0.3 mm)을 이용하여 gel 온도를 55°C로 설정, 55 W로 3시간 전기영동한다. AP-PCR 산물을 AP-PCR-SSCP법으로 해석하는 경우 5% glycerol을 함유하고 요소를 함유하지 않는 5% polyacrylamide 비변성 겔(30 cm×40 cm×0.3 mm)을 이용하여 15°C, 40W로 4시간 전기영동한다. 이 조건을 이용하면 두 가지 방법에서 거의 같은 DNA영역을 검출할 수 있다. 전기영동 후 겔을 가열 진공 건조시켜 고감도 X-ray 필름(Kodak XAR5™)에 14~24시간 노출시킨다.

AP-PCR법 및 AP-PCR-SSCP법으로 얻은 autoradiograph를 그림 2에 나타내었다. Human p53 암 억제 유전자의 염기서열 일부를 primer로 18명의 환자에 유래하는 간암세포 및 비 간암조직 DNA에서 얻은 fingerprint이다. 두가닥 DNA 단편과 그 조직의 대응하는 부분을 선으로 표시하였다. 두가닥 DNA의 대부분이 상보가닥으로 분리되어 AP-PCR-SSCP법에서 band수는 AP-PCR법의 약 2배가 된다.

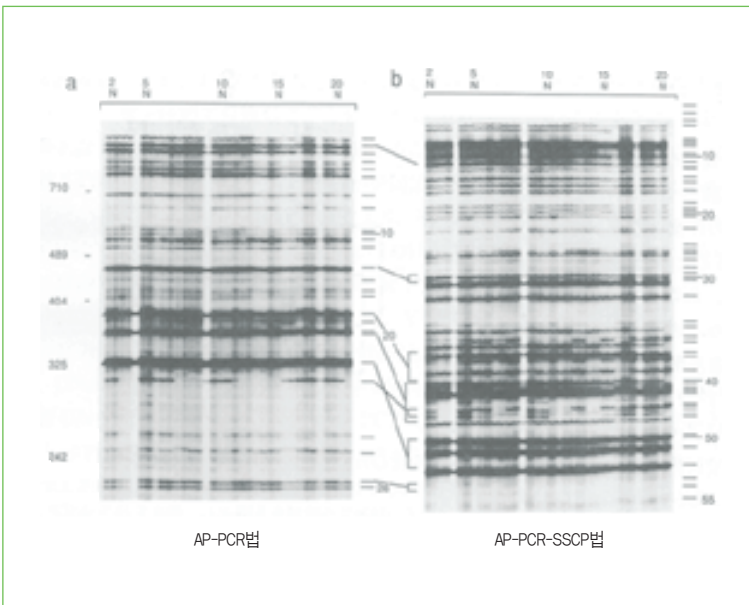


그림 2 AP-PCR법과 AP-PCR-SSCP법
AP-PCR (a) AP-PCR-SSCP법 (b)에 의한 해석에 p53 유전자의 염기서열에서 20염기를 사용한 한 개의 primer AP3에 의한 결과이다. AP-PCR해석 겔에서 각 band에 대응하는 DNA를 용출하여 재 증폭한 후 SSCP해석하여 DNA단편과 상보가닥의 대응관계를 나타내었다.

IV. AP-PCR-SSCP법에 의한 DNA 결실 검출

AP-PCR-SSCP법으로 검출한 DNA 결실예를 그림 3에 나타내었다. AP-PCR-SSCP법에서 증폭 DNA 단편중에 다형이 존재하는 경우, hetero 접합체는 통상 네 개의 밴드를 나타내지만, LOH는 그 중 두 개의 결실로 검출된다. LOH를 band signal의 미묘한 농도 차로 추정해야 하는 AP-PCR법과는 달리 AP-PCR-SSCP법에서는 다형의 존재로 분리된 DNA 단편의 signal 소실을 관찰하므로 LOH의 판정이 쉽다.

실제 screening에 있어서 다수 band의 밀집으로 hetero 접합성을 나타내는 DNA 단편의 동정이 곤란한 경우가 많다. 그러나 어느 하나의 band에서 signal이 없으면 LOH를 의심할 수 있다. 즉 소실된 signal에 대응하는 band를 포함하는 gel에서 DNA를 추출, 그 염기서열을 결정하고 다시 2개의 특이적 primer를 사용하여 PCR-SSCP 해석을 하면 대부분의 경우 LOH의 존재를 확인할 수 있다. 이렇게 band signal의 소실은 대부분 LOH로 추정되지만 Y 염색체 및 남성 X 염색체상의 DNA 결실도 포함되어 있다.

V. AP-PCR 산물의 염기서열 결정

AP-PCR-SSCP법으로 종양 특이적 이상이 관찰된 경우, 그 이상의 확인 및 해당하는 DNA 단편 유래의 염색체 동정, DNA 단편의 염기서열을 결정해야 한다.

AP-PCR에서 얻어진 DNA 단편은 양 말단에 primer에서 유래하는 동일 염기서열을 갖고 있으므로 보통 cloning 한 후 vector 내 primer를 이용하여 염기서열을 결정한다. DNA 단편을 상보적으로 분리한 후 얻어진 single strand DNA를 주형으로 AP-PCR에서 사용한 primer를 이용하여 직접 염기서열을 결정하였다. 이상 밴드에 대응하는 DNA를 용출한 후 이 용출액의 일부분(10 μ l)을 PCR(3분간 denaturation 후, 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분 30 cycle)로 다시 증폭하여 polyacrylamide 비변성 겔 (30 cm×40 cm×0.3 mm)에서 전기영동하여 single strand로 분

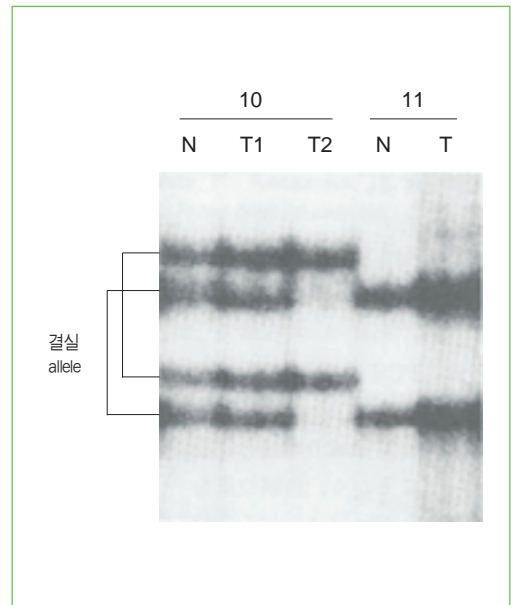


그림 3 AP-PCR-SSCP법에 의한 LOH 검출
그림 2 (b)에 해당하는 fingerprint를 별도의 primer를 제작하여 그 중에서 검출된 암 특이적 이상영역을 확대하여 나타내었다.

리한다. Single strand DNA를 포함하는 겔 단편을 20~30 ml의 증류수에 넣어 42°C에서 1분간 가열하여 DNA를 용출한다. Butanol로 DNA를 농축한 후, ethanol 침전으로 회수하여 주형으로 사용하여 그 염기서열을 결정하였다.

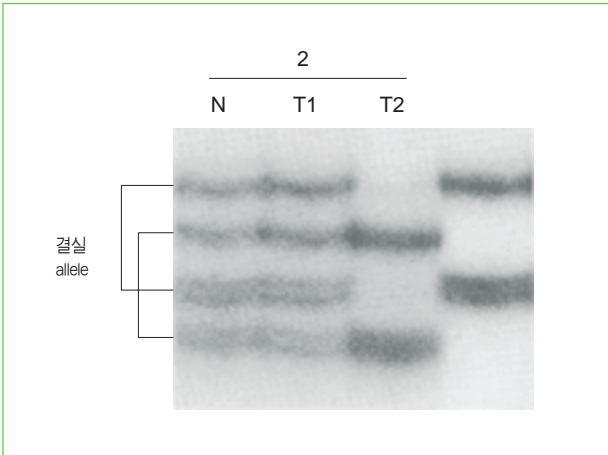


그림 4 STS화한 DNA단편의 LOH확인 예
AP-PCR-SSCP법에서 이상을 나타낸 DNA단편의 염기서열 결정으로 해당하는 영역을 STS화하고 결실을 PCR-SSCP법으로 확인하였다.

표 1 AP-PCR 및 AP-PCR-SSCP법으로 얻어진 band수

Primer	Band수		추정해석영역 (kbp)	다형 표시 band수	
	AP-PCR	AP-PCR-SSCP		AP-PCR	AP-PCR-SSCP
AP1	23	52	11	1	12
AP2	32	61	17	3	10
AP3	26	55	14	2	7
AP4	27	48	16	3	6
AP5	19	48	11	0	6
AP6	27	57	15	2	6
AP7	19	52	11	4	16
AP8	28	54	16	2	10
AP9	38	72	20	1	14
AP10	33	50	18	0	7
AP11	30	66	17	2	12
AP12	37	56	19	3	8
AP13	34	58	20	4	8
AP14	34	58	17	3	9
AP15	38	62	20	1	8
MCG1	31	52	18	3	7
K3US	24	52	14	2	10
TK1	46	62	25	3	8
LH2	45	74	22	2	12
MUTSQ6	26	44	15	2	10
MUTSQ7	21	46	12	2	18
MUTSQ8	31	50	18	4	6
MUTSQ11	27	42	16	1	6
평균	30	55	17	2	9

VI. DNA 단편의 염색체 동정과 이상 확인

AP-PCR 산물의 염기 서열 결정은 두 개의 primer를 사용하여 특정 영역의 증폭을 가능하게 하며, 해당 위치를 STS(sequence-tagged site)로 사용할 수 있다. 이 두 개의 primer를 사용하여 이상 DNA단편의 염색체를 동정할 수 있다. Human 염색체 한 개만을 갖고 있는 NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panel #1 and #2의 DNA(각 50 ng)를 주형으로 PCR한 후 증폭산물을 전기영동으로 분리하여 어느 panel에서 human 특이적 DNA 단편이 얻어지는가로 해당 STS가 어느 염색체 상에 존재하는지 동정할 수 있다.

증폭한 STS의 PCR-SSCP법으로, AP-PCR-SSCP법으로 검출된 signal의 결실이 LOH임을 확인할 수 있다(그림 4). 또 AP-PCR-SSCP해석으로 signal의 소실을 나타낸 DNA 단편이 Y 염색체 또는 남성 X 염색체에서 유래함이 판명된 경우 DNA 결실의 확인은 같은 반응액에 내인성 대조 DNA 단편을 증폭하는 duplex PCR로 한다. PCR산물이 직선적으로 증폭되는 24 cycles 조건을 사용하여 대조 DNA 단편과 목적 X, Y 유래의 DNA단편이 증폭되고 그 PCR 산물양을 비교하여 결실을 확인한다.

맺음말 : AP-PCR-SSCP해석의 이점

23종류의 primer를 이용한 AP-PCR법 및 AP-PCR-SSCP법의 해석결과를 표 1에 정리하였다. AP-PCR에서는 한 개의 primer에서 평균 30개의 주요 밴드로 나타내는 DNA 단편이 전체 genome에서 증폭되었다. 이것을 SSCP로 해석하면 상보가닥으로 나뉘어 약 2배인 평균 55개의 band가 관찰되었다. 증폭된 DNA 단편은 한 개 primer당 약 17 kbp이다. AP-PCR-SSCP법은 DNA단편 내의 염기치환으로 생기는 single strand DNA 고차 구조 다형으로 같은 길이의 DNA 단편을 다른 위치에 영동할 수 있으며 DNA 다형을 나타내는 밴드 수가 AP-PCR 해석에 비해 약 5배로 DNA결실 검출 확률이 그만큼 높아지는 이점을 갖고 있다. AP-PCR에서 증폭된 DNA 단편을 클로닝하지 않고 염기서열을 직접 결정하는 방법으로 해당 DNA 단편을 STS화 할 수 있으며 DNA 결실 확인, 유래한 염색체의 동정도 아주 간단하다. STS는 해당하는 유전자 탐색의 중요한 기점이 된다.

AP-PCR-SSCP법은 해석대상의 염기 서열 정보 없이 높은 DNA 다형을 검출하는 능력이 있으므로 LOH를 시작으로 하는 genome상의 다수 미지영역에서 암 부위 특이적인 변화를 검출하는 광범위한 DNA 이상 유무 검출법으로 유용하다.

2. 비방사성 표식 PCR-SSCP에 의한 암 DNA의 임상검사

Kokichi Sugano

점 돌연변이나 염색체 결실의 검출은 각종 암 유전자나 암 억제유전자의 이상 유무를 진단하는데 매우 중요하다. 기존의 유전자해석기술은 많은 노력과 방사성 동위원소(RI) 등을 이용하기 위한 특수 설비와 시설이 필요하여 일반 임상연구실에는 부적합하다. Minigel을 사용하여 silver stain이나 형광 sequencer를 사용한 비방사성표식 PCR-SSCP(non-RI SSCP)법은 점 돌연변이, 염색체 결실, 유전자 다형 등의 해석에 적합하다. 또한 온도 기울기 SSCP(TG-SSCP)법은 non-RI SSCP법의 해석조건을 최적화하여 미지의 점 돌연변이를 높은 효율로 screening할 수 있다.

머리말

암에 대한 지속적인 연구로 암 발생에 많은 암 유전자 또는 암 억제 유전자의 이상이 관련되어 있다고 밝혀지고 있다. 점 돌연변이 또는 염색체 결실 등 유전자 이상 검출은 각종 암 유전자나 암 억제유전자 등의 이상을 진단하는데 중요한 기술이다. 그러나 기존의 분자생물학적 방법은 복잡하고 방사성 동위원소 등 특수한 설비와 시설이 필요하여 일반적인 임상검사로 사용하기에는 부적합하였다.

유전자 진단을 일반적인 검사로 실용화하기 위한 시스템으로 minigel을 사용한 silver stain이나 형광 sequencer 등을 이용한 non-isotope PCR-SSCP법이 도입되어 점 돌연변이, 각종 유전자 다형, 염색체 결실 등을 검출하고 있다. 비방사성표식 PCR-

SSCP(non-RI SSCP)법은 PCR종료 후 수 시간 이내에 결과를 볼 수 있으며 일단 적절한 전기영동 조건을 설정하면 매우 간편하고 재현성이 뛰어나다. 본 고에서는 non-RI SSCP법을 이용한 암 유전자해석에 대하여 소개한다.

I. 비방사성표식 PCR-SSCP(non-RI SSCP)법으로 암 DNA의 임상검사

1. Non-RI SSCP법의 원리

PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism analysis)법은 PCR산물을 formamide 등의 변성제를 첨가하여 ssDNA(single strand DNA)로 변성시켜 비변성 polyacrylamide 겔에서 전기영동하는 방법이다. ssDNA는 전기영동 중에 그 염기서열에 특유의 고차구조를 가지며 전기영동시에 고유한 이동도를 나타낸다(그림 1)¹³⁾. 그러나 하나의 염기치환 또는 짧은 염기서열의 결실, 삽입 등의 구조이상이 존재하면 ssDNA의 이동도가 변화하여 다른 밴드 패턴을 나타내는 성질로 검출할 수 있다.

종래에는 primer 5' 말단을 ³²P 등으로 표식하여 PCR하거나 PCR 반응액중에 ³²P 표식 dNTP 등을 첨가하여 ³²P 표식 DNA 단편을 얻어 이것을 sequencing용 대형 겔로 전기영동하여 autoradiograph한 후 DNA 이상을 검사하였다. Non-RI SSCP법은 RI를 사용하지 않고 SSCP하는 방법으로, 소형 minigel을 사용하여 전기영동한 후 silver stain으로 직접 겔 속의 ssDNA를

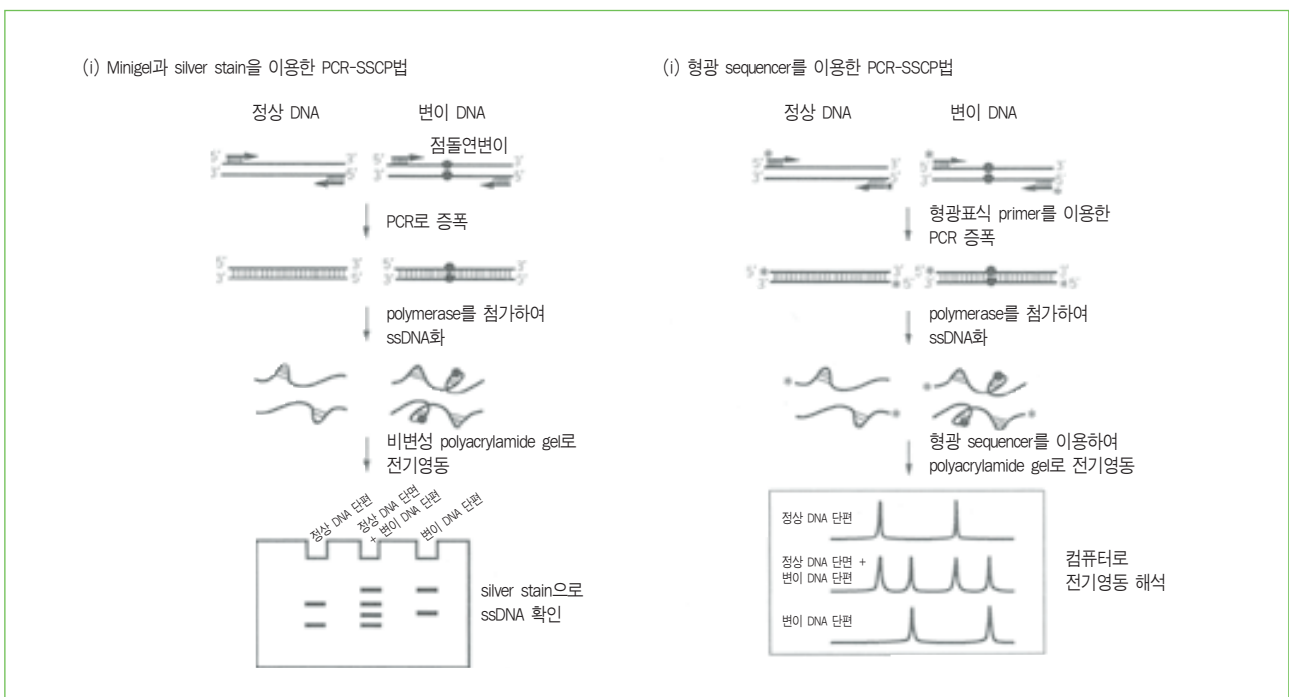


그림 1 비방사성표식 PCR-SSCP(non-RI SSCP) 법의 원리

확인하거나¹⁴⁻¹⁸⁾ 형광표식 primer를 사용하여 PCR 후 형광 sequencer 등으로 signal을 검출하는 방법이 있다(그림 1).

2. Minigel과 silver stain을 이용한 PCR-SSCP법

Minigel과 silver stain을 이용한 PCR-SSCP법은 다음과 같은 이점이 있다. ① 겔이 소형이므로 취급이 용이하며 통상 PCR산물 그대로 염색할 수 있다. ② 고농도 polyacrylamide gel을 사용하므로 분리능이 뛰어나고 선명한 single strand DNA band를 얻을 수 있다. ③ PCR종료 후 2시간 30분이면 결과를 얻을 수 있다(최적 전기영동 시간은 증폭하는 DNA 단편의 분자량 등에 따라 다르다). 그러나 해석 가능한 DNA 단편의 길이가 기존의 방법에 비하여 짧은 단점이 있다.

방사성 동위원소와 sequencing gel을 사용한 SSCP법의 경우, 약 300 bp 정도까지 분석할 수 있으나 minigel을 사용한 non-RI SSCP법은 150 bp 정도의 비교적 짧은 DNA 단편의 해석에 유용하다. 따라서 목적 유전자를 PCR로 증폭할 경우 100 bp에서 130 bp 전후의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 primer를 설계해야 한다.

Non-RI SSCP법에 이용하는 전기영동 장치는 소형 mini slab gel 전기영동조로, 해석시에는 영동조의 겔 온도조절이 매우 중요하다. 본 고에서는 시판되고 있는 전기영동조를 개량하여 사용하였다. 즉 상부전극조가 깊고 겔판의 전면이 닿을 수 있는 전기영동 장치를 이용하였으며, 상부전극조 내에 glass pipe를 냉각장치로 넣어 이 속을 water chiller를 이용하여 냉매(실제로는 물)를 순환시켜 영동중의 온도변화를 항상 조절할 수 있도록 하고 있다. 이 때 상부전극조 내에 설치한 온도계로 전기영동중의 겔 온도를 모니터 한다.

분리 최적 조건은 목적 DNA 단편에 따라 다르나 일반적으로 18~23°C 정도가 가장 많다. 그러나 적절하게 분리되지 않을 경우는 4~26°C 전후까지 여러 온도를 검토하여 조건을 설정해야 한다. 전기영동 종료 후 목적 ssDNA를 확인하기 위하여 silver stain을 이용한다. Non-RI SSCP법으로 K-ras 암 유전자 codon 12의 각 점 돌연변이를 검출한 예를 나타내었다(그림 2). Non-RI SSCP법의 주의사항을 표 1에 정리하였다.

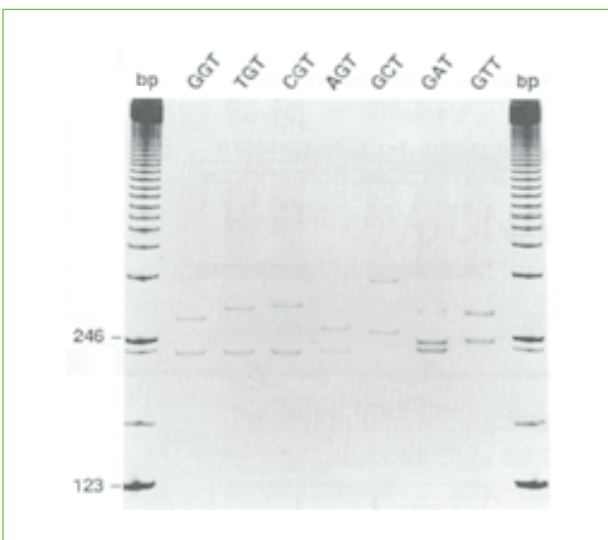


그림 2 non-RI SSCP법으로 K-ras 암 유전자 codon 12의 점 돌연변이 검출
정상형 K-ras plasmid(GGT) 및 codon 12의 각종 변이형 plasmid를 주형으로 PCR 반응 후 non-RI SSCP법을 하였다.

표 1 Minigel과 silver stain을 사용한 non-RI SSCP법의 주의사항

- (i) 영동용 겔
 - Polyacrylamide gel(acrylamide와 bis의 비율은 30:1로 한다.)
 - Gel 온도는 목적 PCR산물의 분자량에 따라 다르다.
 - 10% 250~350 bp 정도
 - 12% 100~200 bp
 - 15% 100~150 bp
 - 완충액은 Tris-glycin buffer(25 mM Tris, 192 mM Glycin)을 이용한다.
- (ii) Formamide 용액
 - 탈이온 처리한 90% formamide 용액에 20 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xyleneecyanol을 함유하는 용액을 이용한다. 위 formamide 용액 10 μl에 PCR산물을 2 μl 첨가하고 80°C, 5분 가열 후 10 μl를 각 lane에 loading한다.
- (iii) 전기영동 조건
 - 전기영동은 보통 200 V 또는 300 V 정도에서 실시한다. 전기영동 시간은 목적하는 single strand DNA의 분리 상태에 따라 다르지만 보통 1시간 30분에서 3시간 정도가 대부분이다.
- (iv) 전기영동 중의 온도조절
 - 18~23°C가 자주 사용된다.
 - 저온(4°C 정도까지) 또는 고온(30°C 정도까지)에서 검토 후 조건을 설정한다.
- (v) Gel 보존
 - Silver stain 후 겔은 gel drying frame 또는 gel dryer를 사용하여 건조한다. SSCP용 겔은 농도가 높고 bis 비율이 높아 찢어지기 쉬운 결점이 있다. 따라서 기록보존용으로는 silver stain 종료 후 건조시키기 전에 겔 사진을 찍어 두는 것이 좋다.

3. 온도 기울기 SSCP법(TG-SSCP법)으로 영동조건 최적화 및 유전자 이상 검출

Non-RI SSCP법으로 변이 DNA를 검출할 때 목적 ssDNA의 분리가 최적조건에서 이루어지지 않는 문제점이 있다. Non-RI SSCP법의 최적 전기영동 조건은 대부분 경험적으로 설정되며 ssDNA의 고차구조는 전기영동중의 온도변화에 많은 영향을 받으므로 변이를 깨끗하게 분리하기 위하여 전기영동 조건, 특히 온도를 바꿔가며 반복적으로 전기영동 하는 것이 중요하다.

이 문제점을 해결하기 위하여 전기영동중인 겔 온도를 단계적으로 변화시켜 전기영동 방향에 직각으로 온도 기울기를 형성시키며 SSCP할 수 있는 전기영동장치를 개발하였다(그림 3)¹⁹⁾.

본 장치를 이용하여 K-ras 암 유전자 codon 12에 점 돌연변이를 갖지 않는 정상형 K-ras와 codon 12에 glycine(GGT)에서 arginine(GGT) 또는 asparagine(GAT) 점 돌연변이된 K-ras PCR산물을 혼합하여 전기영동한 것을 나타내었다(그림 4a, b, c). 정상형 K-ras(GGT)의 두 개의 ssDNA는 저온에서 고온으로 감에 따라 넓게 분리되게 된다(그림 4a).

한편 화살로 표시된 변이형 DNA(GAT)는 저온(16°C)에서는 정상형의 이동도가 낮은 밴드와 거의 같은 이동도를 보이고 온도가 올라감에 따라 조금씩 정상형의 두 개의 ssDNA band 사이 위치에서 분리되었다. 20°C 전후까지는 변이형 DNA(GAT)의 두 개의 ssDNA 중 한 개는 정상형 K-ras의 이동도가 낮은 band와 함께 영동되므로 변이형 band는 한 개 밖에 검출되지 않지만 22°C 이상의 고온에서는 두 개로 분리되고 정상형과 합쳐져 네 개의 ssDNA band가 검출된다(그림 4b). 따라서 non-RI SSCP법으로 K-ras codon 12의 GGT→GAT의 점 돌연변이를 검출할 경우 온도설정을 22°C 이상의 고온으로 하는 것이 좋다.

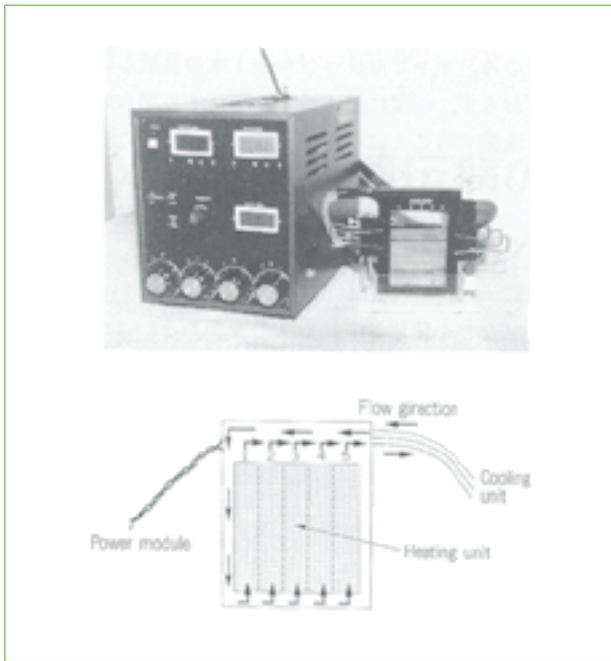


그림 3 온도기울기 SSCP(TG-SSCP)법에 사용하는 온도기울기 plate (Kitazato supply사)와 그 구조도

Plate 안쪽에 냉각수를 순환시켜 plate를 냉각하면서 plate 표면에 정착되어 금속박막에 전기를 통하게 하여 발열시키므로 gel 표면의 온도를 조절하는 구조로 되어 있다.

Glycine(GGT)에서 asparagine(CGT) 점 돌연변이(화살로 표시한 변이형 K-ras)는 저온에서는 정상형 K-ras 보다 빠른 이동도를 나타내지만 온도가 18°C 전후까지 상승하면서 두 개의 변이형 ssDNA 이동도가 역전하여 저온에서 이동도가 큰 밴드가 고온에서는 정상형 K-ras의 두 개의 ssDNA의 중간 이동도를 나타내었다(그림 4c).

이와 같이 온도변화가 ssDNA의 고차구조에 미치는 영향은 그 염기서열에 따라 크게 다르다. TG-SSCP법은 목적 염기서열의 분리조건을 최적화하는데 유용하며 p53 암 유전자와 같이 random하게 점 돌연변이가 생기는 경우 광범위한 온도조건을 한번에 검사할 수 있어 미지의 점 돌연변이의 screening에도 응용할 수 있다³⁰⁾.

4. 형광 sequencer를 이용한 PCR-SSCP법

형광 색소로 표식한 primer를 이용하여 PCR한 후 형광 sequencer를 이용하여 signal을 검출하는 것으로 non-RI 조건에서 SSCP할 수 있다. 이 경우 형광 primer의 합성과 고가의 형광 sequencer가 필요하다.

기초연구실의 형광 sequencer는 plasmid 등의 염기서열 결정에 사용되어 빈 시간이 거의 없고, 임상실험실에서 SSCP 또는 단편 해석 전용으로 형광 sequencer를 갖추기엔 상당히 고가이다. 그러나 형광 sequencer를 사용할 경우 결과가 컴퓨터 화면으로 표시되어 바로 알 수 있으며 겔의 해독을 기본으로 하는 기존 SSCP법이 정성적인데 반해 컴퓨터 처리로 정량적인 해석이 가능한 이점이 있다. 형광 sequencer의 정량성을 이용하여 각 염색체 서열에 존재하는 다형 부위를 PCR-SSCP 해석으로 각 형질 signal 강도를 비교하여 LOH(loss of heterozygosity)의 검출에 응용할 수 있다(그림 5)³⁰⁾.

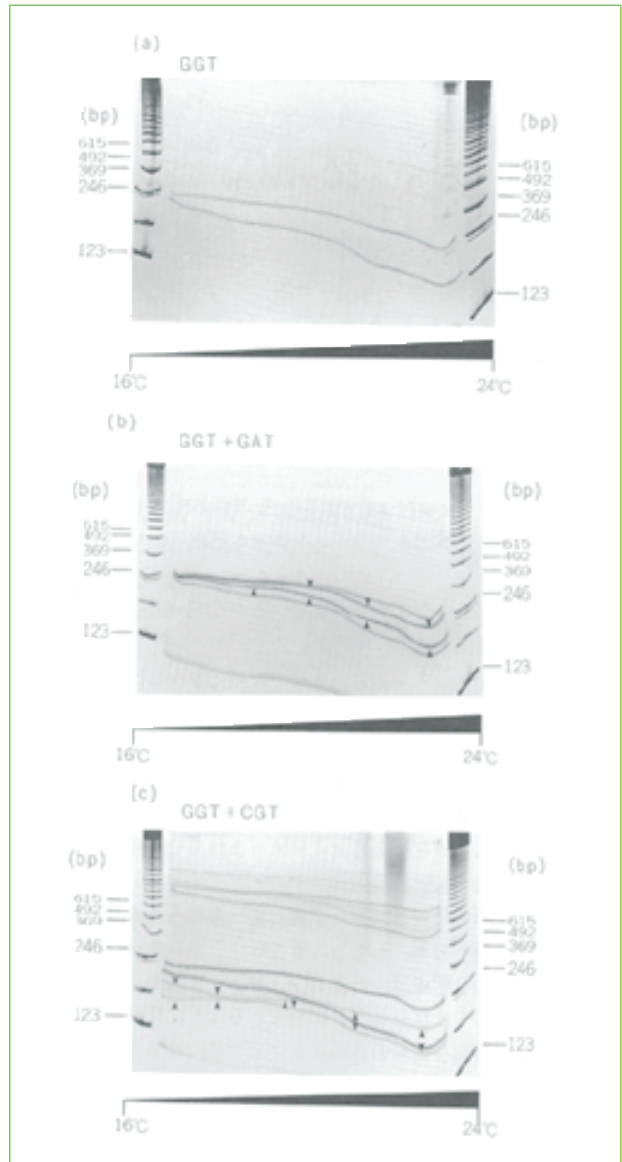


그림 4 온도기울기 SSCP(TG-SSCP)법에 의한 해석

겔의 왼쪽은 16°C 오른쪽은 24°C로 설정되어 있으며 오른쪽을 향해 2°C씩 단계적으로 겔 표면 온도가 상승하는 구조로 되어 있다.

변이형 K-ras에 유래하는 두 개의 ssDNA band를 화살표로 나타내었다.

(a) 정상형 K-ras 암유전자 exon 1의 PCR산물(108 bp) TG-SSCP 해석 (b) 정상형 K-ras 암유전자와 변이형 K-ras 암유전자 [codon 120에 GGT→GAT(Asp)의 점 돌연변이]을 혼합한 TG-SSCP 해석 (c) 정상형 K-ras 암유전자와 변이형 K-ras 암유전자 [codon 120에 GGT(Ciy)→CGT(Arg)의 점 돌연변이]를 혼합한 TG-SSCP 해석

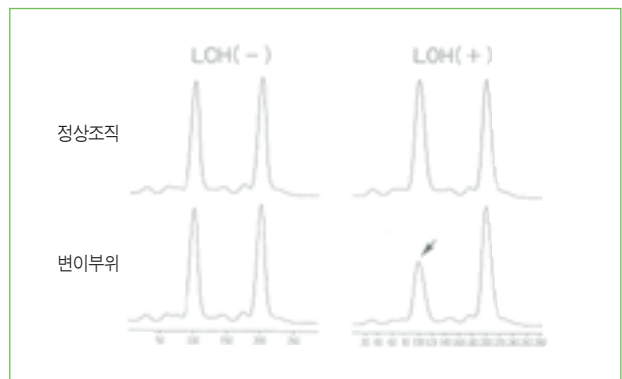


그림 5 형광 sequencer를 이용한 SSCP해석으로 p53 암 억제유전자 intron 1의 LOH 검출

화살표로 표시한 변성부위의 signal의 감소는 LOH를 나타낸다.

5. 그 밖의 방법

차세대 방식으로 capillary gel 전기영동 등을 이용한 PCR-SSCP 법이 보고되어 있다. 겔의 제작, 시료의 첨가 등이 자동화되어 있어 재현성이 높은 이점이 있으나 한번에 수십 검체를 해석할 경우는 반복적으로 전기영동을 하여야 하는 번거로움이 있으며 시간이 많이 소요된다.

맺음말

Non-RI SSCP법은 특수한 설비 또는 RI를 사용하지 않고 점 돌연변이와 유전자 다형 등 임상연구에서 각종질환을 대상으로 유전자를 해석할 수 있어 유용하다. 그러나 300 bp 전후의 비교적 긴 DNA 단편 해석에는 현재 sequencing gel과 RI를 사용한 기존방법이 효율적이라고 판단되며 보다 많은 개량이 필요하다. ssDNA의 이동도는 전기영동중의 겔 온도에 크게 의존하고 있어 TG-SSCP법을 이용하면 기지 점 돌연변이와 유전자 다형의 분리조건 빨리 최적화할 수 있다. 형광 sequencer를 사용한 SSCP 해석은 date처리의 자동화와 정량 해석이 가능하여 앞으로 기기 보급과 함께 널리 이용될 것이다.

참고문헌

- 1) Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S., Sekiya, T.: *Cancer Res.*, **51**, 5520-5525 (1991)
- 2) Zhang, X., Xu, H.-J., Murakami, Y., Sachse, R., Yashima, K., Hirohashi, S., Hu, S.-X., Benedict, W.F., Sekiya, T.: *Cancer Res.*, **54**, 4177-4182 (1994)
- 3) Bressac, B., Kew, M., Wands, J., Oztuga, M.: *Nature*, **350**, 429-431 (1991)
- 4) Hsu, I.C., Metcalf, R.A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J., Harris, C.C.: *Nature*, **350**, 427-428 (1991)
- 5) Kuroki, T., Fujiwara, Y., Tsuchiya, E., Nakamori, S., Imaoka, S., Kanematsu, T., Nakamura, Y.: *Genes Chrom. Cancer*, **13**, 163-167 (1995)
- 6) Welsh, J., McClelland, M.: *Nucl. Acids Res.*, **18**, 7213-7218 (1990)
- 7) Ionv, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho, M.: *Nature*, **363**, 558-561 (1993)
- 8) Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Velazquez, A., Perucho, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10065-10069 (1992)
- 9) Kohno, T., Morishita, K., Takano, H., Shapiro, D. N., Yokota, J.: *Oncogene*, **9**, 103-108 (1994)
- 10) Orita, M., Iwahara, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766-2770 (1989)
- 11) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: *Genomics*, **5**, 874-879 (1989)
- 12) Blin, N., Stafford, D. M.: *Nucl. Acid Res.*, **3**, 2303-2308 (1976)
- 13) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: *Genomics*, **5**, 874-879 (1989)
- 14) Sugano, K., Kyogoku, A., Fukayama, N., Ohkura, H., Shimosato, Y., Sekiya, T., Hayashi, K.: *Lab. Invest.*, **68**, 361-366 (1993)
- 15) Tokue, Y., Sugano, K.: *Chemotherapy*, **42**, 283-289 (1994)
- 16) Sugano, K.: *Oncologia*, **27**, 458-461 (1994)
- 17) Kondo, H., Sugano, K., Fukayama, N., Kyogoku, A., Nose, H., Shimada, K., Ohkura, H., Ohtsu, A., Yoshida, S., Shimosato, Y.: *Cancer*, **73**, 1590-1594 (1994)
- 18) Tokue, Y., Sugano, K., Saito, D., Noda, T., Ohkura, H., Shimosato, Y., Sekiya, T.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 428-431 (1994)
- 19) Sugano, K., Fukayama, N., Ohkura, H., Shimosato, Y., Yamada, Y., Inoue, T., Sekiya, T., hayashi, K.: *Electrophoresis*, **16**, 8-10 (1995)
- 20) Sugano, K., Nakashima, Y., Yamaguchi, K., Fukayama, N., Yamaguchi, M., Ohkura, H., Kakizoe, T., Sekiya, T.: *Genes Chromosome Cancer*, (1996)

Bio21 회원만의 특별한 혜택

- 인터넷으로 제품을 구매할 수 있으며 총 구매액의 2% 마일리지 포인트 적립
 - Homepage을 이용한 다양한 기술정보 검색
 - Bio21 Club 운영 및 E-mail 정보제공 서비스
 - 기술정보지(Life Science & Biotechnology) 연 4회 무료 발송
 - 기술지원서비스 (전화, FAX, 우편, E-mail, Homepage)
 - Takara Symposium 개최
 - Technical Workshop 개최
 - 기술자료 및 판촉자료 제작 보급
 - 학회 학술 활동 지원
- * 당사 홈페이지 www.takara.co.kr에서 회원에 가입할 수 있습니다.

마일리지 포인트별 사은품

- 20,000 - 헤어드라이기, 미니전화기 등
 - 50,000 - 커피메이커, 미니 청소기, 폴라로이드 카메라 등
 - 100,000 - 포터블 카세트 플레이어, 상품권
 - 200,000 - 자동카메라, 청소기, 워크맨, 휴대용 CD-Player, 식기건조기, 전자레인지, MP3 Player, 20만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
 - 300,000 - 오디오, TV, 소형냉장고, Sony VTR, 자동응답전화기(900Mz), 30만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
 - 500,000 - (2001년 7월 새롭게 추가된 사은품) - DVD Player, Laser Printer, 디지털 카메라, 팩시밀리, TV, 50만원 상당의 TaKaRa 제품교환권
- * 1월, 7월(연중 2회) 사은품을 신청할 수 있습니다.