

# ICAN법을 기초로 한 유전자 다형 Typing Kit

최근 유전자 다형과 체질과의 관계에 대한 연구가 급속히 진행되어 유전자 다형에서 유래하는 발병 위험도의 판정, 적절한 투약 선택이나 질병 예방법의 선택 기준으로서 유전자 다형을 판정할 필요성이 높아지고 있다. 특히, 간편하고 신속한 유전자 다형 typing법의 개발이 더욱 더 필요하다.

유전자 다형에는 1염기변이 다형 (SNP), 삽입변이 (insertion mutant), 결실변이 (deletion mutant) 등이 있으며 이미 다양한 유전자 다형 typing법이 개발되어 있다. 대부분은 다형이 존재하는 염기서열 정보를 어떠한 signal로 변환하는 단계와 그 signal을 검출하는 단계의 2 단계로 되어 있다. 당사가 개발한 ICAN법<sup>1-4)</sup>과 UCAN법<sup>5-7)</sup>도 유전자 다형을 DNA 신장 또는 DNA 증폭 signal로 변환하는 것이 가능하여 다양한 검출 단계와 조합하여 유전자 다형 typing에 이용할 수 있다.

본 고에서는 ICAN법을 이용한 결실변이 typing, UCAN법과 Cleave ICAN법에 의한 SNP typing에 관하여 당사 제품을 이용하여 소개한다.

## ICAN법을 이용한 결실 다형 typing

### 1) ICAN법의 원리와 결실 다형 typing에의 응용

유전자 다형은 다양한 결실변이나 삽입변이 및 SNP가 존재한다. 이 중 유전자의 결실다형 또는 삽입다형 typing은 등온 유전자 증폭법 (ICAN 법) (그림 1)이 유효하다. ICAN 법은 ICAN Primer (DNA-RNA chimera primer)와 RNase H, DNA polymerase를 이용하여 등온에서 유전자를 증폭하는 방법으로 반응 온도는 변화시키지 않고 일정한 온도에서 반응하는 것만으로 시료 중에 존재하는 DNA를 PCR법 이상의 감도로 검출할 수 있다. 즉, 결실다형, 삽입다형의 typing은 typing을 원하는 결실 또는 삽입 다형 영역의 일부에서 ICAN Primer를 설계하여 ICAN 반응으로 증폭 여부를 확인하는 것이다.

증폭 유무로 다형을 판정하는 경우 반응 실수, 증폭 저해, 잘못된 주형 DNA 준비 등에 의한 위음성 (false negative)은 제외하여야 한다. 이러한 위음성 (false negative)은  $\beta$ globin 유전자 등의 internal control을 multiplex ICAN<sup>®</sup>으로 동시 증폭하여 주형의 존재와 증폭 반응을 확인함으로써 판별할 수 있다.

### 2) TaKaRa ICAN<sup>®</sup> GSTM1 Typing Kit Ver. 1.0

TaKaRa ICAN<sup>®</sup> GSTM1 Typing Kit는 ICAN법을 이용하여 개발한 제품이다. Glutathione S-transferase (GST)는 생체의 이물과 glutathion과의 복합반응을 촉매하는 해독효소로 BP-dihydrodiol epoxide, 활성 산소, 지질 과산화물 등을 불활성화하는 효소이다. GST family의 하나인 GSTM1은 homo 결실변이가 보고되어 일본인의 거의 절반이 결실형이라고 알려져

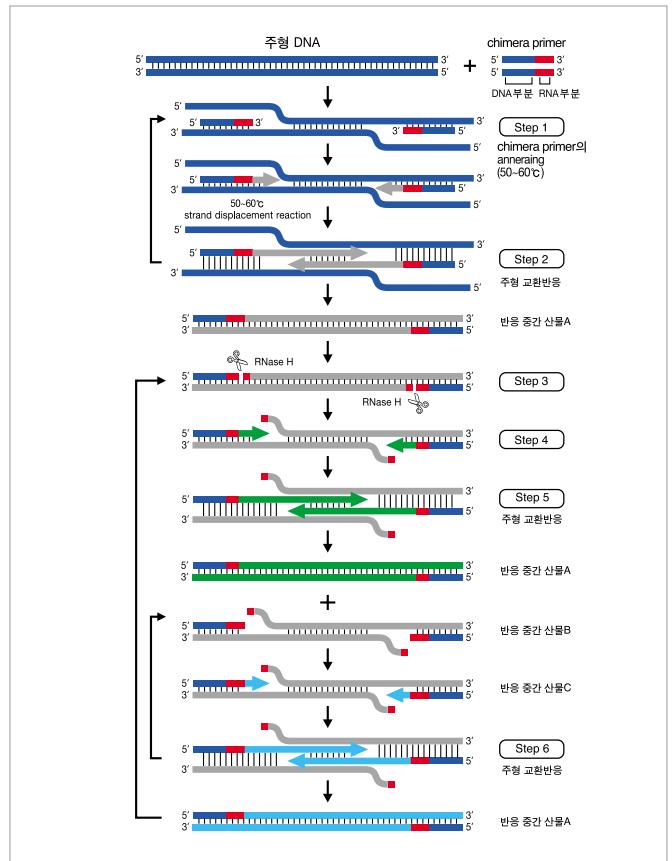


그림 1 ICAN법의 원리

있다. 게다가 GSTM1이 결실되어 있는 사람은 해독 기능이 결여되어 흡연에 의한 폐암 발병 가능성과 연관성이 있다고 보고되고 있다<sup>89)</sup>.

본 kit에 GSTM1 유전자를 ICAN 반응으로 증폭하기 위한 ICAN primer 및 biotin-labeled ICAN primer가 포함되어 있다. GSTM1 유전자가 결손되지 않은 경우는 ICAN primer가 GSTM1 유전자에 annealing하여 ICAN 반응에 의해 증폭이 일어나지만, GSTM1 유전자가 결손되어 있는 경우는 증폭이 일어나지 않는다.

본 kit은 ICAN 증폭 산물을 다음과 같은 방법으로 검출한다 (그림 2). 우선, biotin-labeled된 증폭 산물을 avidin 고정화 plate에 부착한다. 다음으로 부착된 증폭 산물을 single strand로 변성시킨 후 내부 서열에 상보적인 FITC-labeled probe를 hybridization시켜 POD-labeled anti-FITC Antibody 및 TMBZ 기질로 발색 반응하여 증폭 산물을 검출한다. GSTM1 유전자가 결손되어 있는 경우는 ICAN 증폭 산물이 존재하지 않기 때문에 발색 반응이 일어나지 않는다.

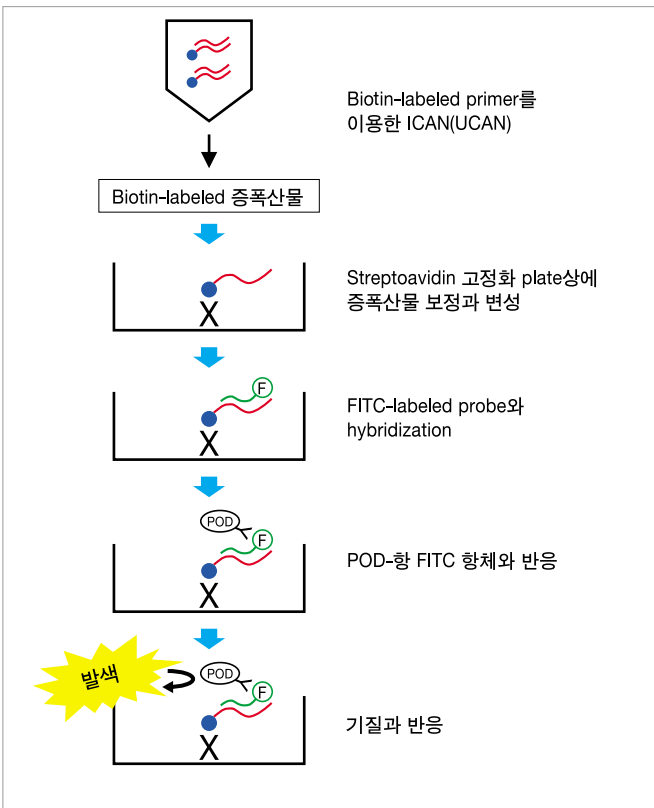


그림 2 Microtiter plate를 이용한 검출

또한, 본 kit은 human housekeeping gene의 하나인  $\beta$ -globin 유전자 (internal control)를 ICAN 법으로 동시에 증폭하기 위한 primer도 포함되어 있다. 따라서, GSTM1 결실다형의 typing 반응과 동시에  $\beta$ -globin 유전자의 증폭 반응도 일어난다. ICAN 증폭 후 GSTM1 검출과는 별도로 다른 well에서  $\beta$ -globin 유전자의 증폭 유무를 검출하므로써 위음성 (false negative)을 확인할 수 있다. 사람의 혈액으로부터 추출한 DNA 시료를 본 kit로 typing 한 결과 그림 3에서 보이는 것과 같이 정확하고 재현성 높은 SNP typing을 할 수 있었다. 본 고에서는 말초혈로부터 추출한 DNA를 시료로 한 경우 예를 나타내었지만, 구강 내 점막으로부터 추출한 DNA로도 동일한 typing이 가능한 것을 확인하였다.

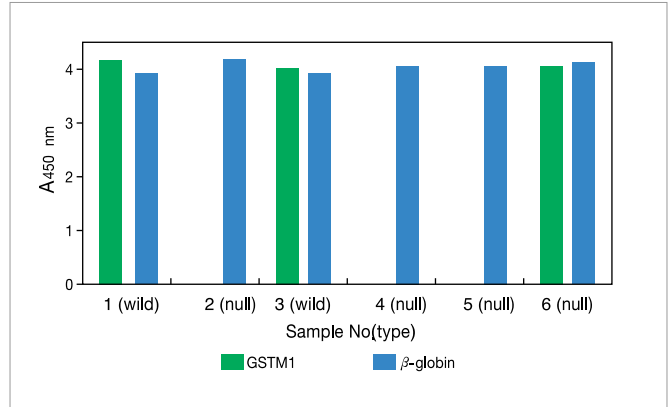


그림 3 TaKaRa ICAN® GSTM1 Typing Kit Ver. 1.0을 이용한 GSTM1의 결실다형 typing

### UCAN 법에 의한 SNP typing

#### 1) SNP 검출 signal의 변환과 UCAN법의 원리

UCAN 법은 ICAN 법을 응용한 SNP 검출법이다. 우선, UCAN 법의 원리부터 소개하면, 지금까지의 SNP signal 검출계로의 변환 방법을 구성 요소 중심으로 크게 분류하면 ① 합성 oligo DNA를 primer로 하여 DNA polymerase에 의한 신장 반응을 이용하는 계, ② oligo DNA와의 결합에 의해 형성되는 특수한 DNA 구조를 인식해 절단하는 효소를 이용하는 계, ③ single strand DNA와 DNA ligase를 이용하는 계 등으로 분류할 수 있으나 UCAN은 ①과 ②의 특징을 병합한 방법이다<sup>10)</sup>. 구체적으로 그림 4에서 나타낸 바와 같이 특수한 DNA-RNA-DNA oligonucleotide (DRD) primer 전구체를 설계한다. 즉, DRD의 3' 말단을 화학 수식하여 DNA polymerase에 의한 주형 DNA의 복제가 일어나지 않도록 한다. 또한 SNP site에 RNA 부분이 결합하도록 설계한다. 이 DRD primer 전구체와 RNase H, DNA polymerase 등을 포함한 반응액에 주형 DNA (검체)를 첨가하여 ICAN 반응의 경우와 동일하게 일정한 온도로 반응한다 (그림 4).

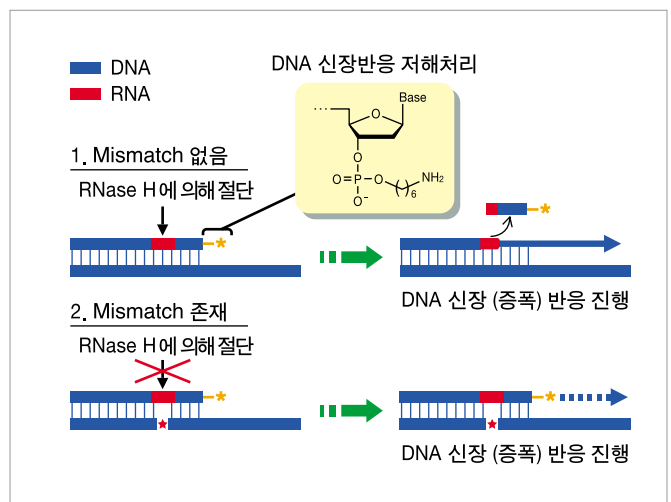


그림 4 UCAN 법의 원리

DRD primer와 주형이 SNP site에서 완전하게 match하는 경우에만 공존하는 RNase H에 의해 DRD primer의 RNA 부분이 절단된다. 이 절단에 의해 3' 말단이 새롭게 출현하기 때문에 DNA polymerase에 의한 신장 반응이 진행되어 주형 DNA가 증폭된다. 한편, DRD primer와 주형 DNA

가 SNP site에서 match하고 있지 않은 경우 RNase H는 DRD primer를 절단하지 못하기 때문에 DNA 증폭이 일어나지 않는다. 완전히 match한 DRD primer 전구체의 RNase H 절단 후 증폭 반응은 ICAN 반응 mechanism으로 진행된다 (덧붙여 ICAN 반응에서 5' 측은 DNA, 3' 측은 RNA의 chimera oligonucleotide가 primer로써 이용된다). 즉, UCAN 법은 DRD primer의 선택과 증폭의 유무로 SNP의 염기를 판정하는 방법으로 SNP의 염기 정보가 RNase H에 의한 절단으로 primer 전구체의 절단이 주형 증폭으로 변환되는 방법이며 그 반응은 등온으로 동시 진행된다.

2) TaKaRa UCAN™ ALDH2 Typing Kit Ver. 1.0

Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2)는 알코올의 중간 대사 물질인 Acetaldehyde를 분해하는 효소이다. ALDH2 유전자의 exon 12에는 487Glu (GAA) → Lys (AAA)의 SNP 가 존재하는 것으로 알려져 있다. 이 SNP는 음주에 관련한 체질의 개인차에 깊게 관여하고 있다고 보고되고 있다<sup>11,12</sup>.

본 kit은 exon 12의 SNP site가 RNA 부분이 되도록 설계한 DRD primer 전구체와 5' 말단을 biotin으로 표식한 DR primer를 이용하여 UCAN 반응을 수행한 후 biotin화 된 증폭 산물을 avidin plate에 결합시켜 ELISA법으로 증폭 산물을 검출한다. UCAN 반응은 wild type 검출용과 mutant type 검출용 2 종류의 primer 전구체를 이용하여 각각 반응을 수행한다. 검출 공정은 앞에서 서술한 ICAN 증폭 산물의 경우와 동일하다 (그림 2 참조).

혈액으로부터 추출한 DNA 시료를 본 kit를 이용하여 typing한 결과 그림 5에서와 같이 정확하면서도 재현성 높은 SNP typing을 할 수 있었다. 본 고에서는 말초혈로부터 추출한 DNA 시료로 한 경우의 예를 나타내었지만, 구강 내 점막으로부터 추출한 DNA에서도 동일한 typing이 가능하다는 것도 확인하였다.

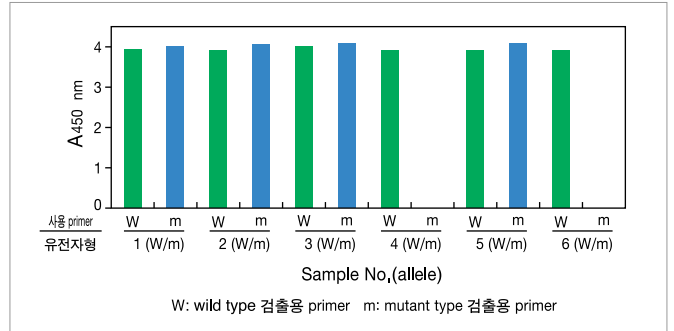


그림 5 TaKaRa UCAN™ ALDH2 Typing kit Ver. 1.0을 이용한 ALDH2의 SNP typing의 예

Cycleave ICAN®에 의한 SNP typing

1) Cycleave ICAN®에 의한 SNP typing의 원리

Cycleave ICAN®에 의한 유전자다형 typing은 SNP site를 포함한 target DNA를 ICAN 법 (그림 1)으로 증폭하여 그 증폭 단편상의 SNP를 cycling probe법\*으로 real time typing하는 방법이다 (그림 6).

Cycling probe법은 RNA와 DNA로 구성된 chimera probe (DRD probe)와 RNase H를 조합하여 증폭 중 또는 증폭 후 유전자 단편의 특정 서열을 고감도로 검출하는 방법이다. 본 방법에서 사용하는 DRD probe는 RNA 부분을 사이에 두고 5' 측은 형광 물질로, 3' 측은 형광을 소광하는 물질 (quencher)로 표식되어 있다. 이 probe는 intact한 상태에서는 quencher의 소광작용으로 강한 형광을 발하지 않지만, 증폭 산물중의 상보적인 서열과 hybrid를 형성한 다음 RNase H에 의해 RNA 부분이 절단됨으로써 quencher가 분리되어 강한 형광을 발하게 된다.

SNP typing의 경우 이 DRD probe를 SNP 부위만 RNA가 되도록 설계하여 ICAN 반응과 동시에 반응시킴으로써 typing을 수행한다. 즉, ICAN 반

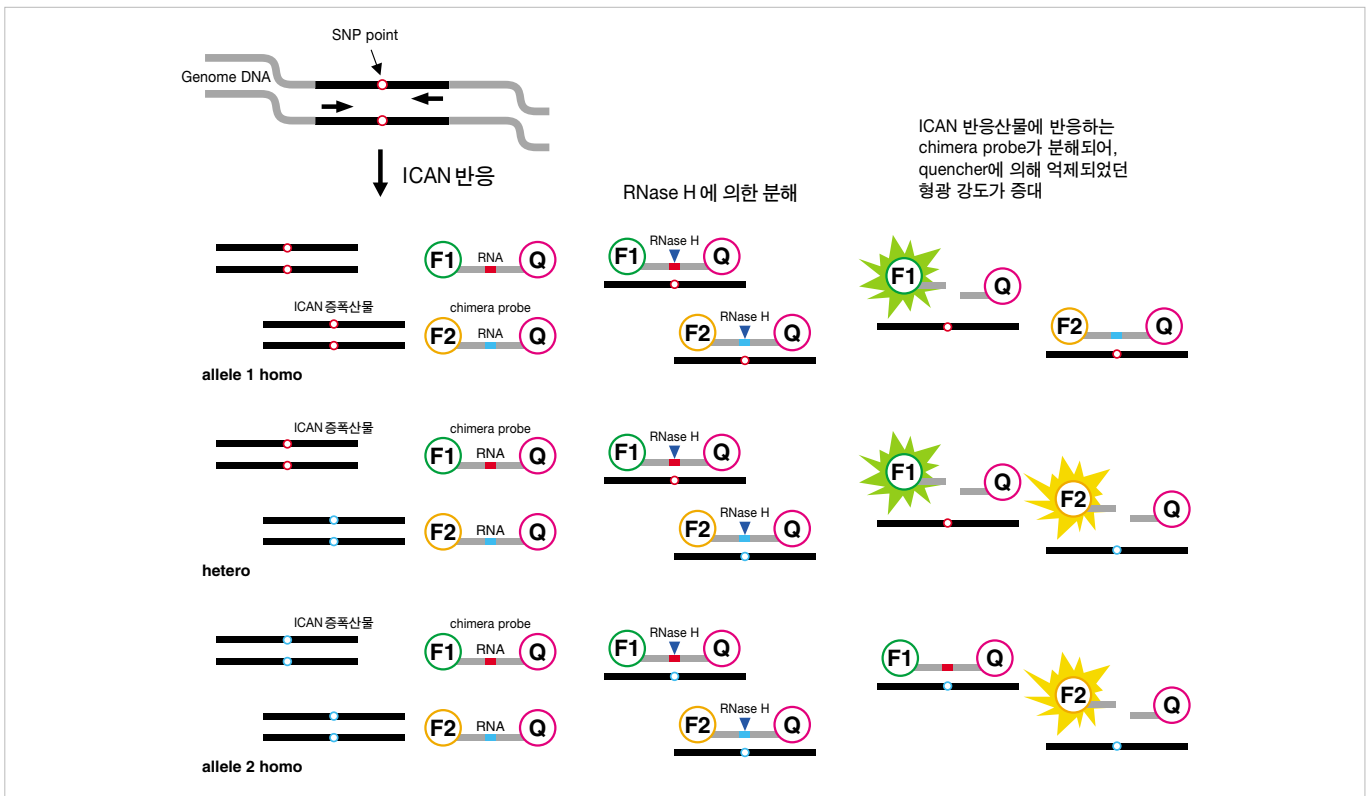


그림 6 Cycling probe법을 이용한 SNP typing 원리

응으로 증폭된 DNA 단편과 DRD probe가 완전하게 match할 때만 probe의 RNA 부분 (SNP site)이 RNase H에 의해 절단되어 형광을 발하게 된다. 이 형광 signal을 모니터링함으로써 typing을 수행한다. SNP의 type (allele)에 따라 probe 서열마다 형광색을 변화시키므로 각종 SNP type을 식별하는 것이 가능하게 된다.

\*ID Biomedical사에서 cycling probe법 및 DNA-RNA-DNA chimera 형태 핵산 기술의 license를 받고 있다.

### 2) Cycleave ICAN<sup>®</sup> human ALDH2 Typing Kit

Cycleave ICAN<sup>®</sup> human ALDH2 Typing Kit은 형광 표식이 다른 wild type 검출용 (ROX 표식)과 mutant type 검출용 (FAM 표식) 2 종의 probe를 이용하여 특이적인 allele를 검출한다.

ICAN 법에 의해 증폭된 ALDH2 fragment 중 wild type의 fragment는 wild type 검출용 probe가 hybrid를 형성하여 RNase H에 의해 RNA 부분이 절단되어 형광 표식 물질 (ROX)의 형광 강도가 증대된다. 또한, mutant type의 fragment는 mutant type 검출용의 probe가 hybrid를 형성하여 RNase H에 의해 RNA 부분이 절단되어 형광 표식 물질 (FAM)의 형광 강도가 증대된다. Smart Cycler<sup>®</sup> System (TaKaRa Code SC100) 등의 real time PCR 장치를 이용하여 이 두 가지 형광 강도의 변화를 모니터링함으로써 한 개의 tube에서 신속하게 typing을 수행할 수 있다. 혈액으로부터 추출한 DNA 시료를 이용하여 실제로 typing한 결과를 그림 7에서 나타낸 바와 같이 정확하고 재현성 높은 SNP typing을 할 수 있었다. 본 고에서는 말초혈로부터 추출한 DNA 시료로 한 경우의 예를 나타내었지만, 구강 내 점막으로부터 추출한 DNA에서도 동일한 typing이 가능하다는 것도 확인하였다.

### 맺음말

이상에서 소개한 유전자 다형 typing 방법은 등온유전자 증폭법 (ICAN 법)을 기초로 한 것으로 PCR처럼 온도 변화 조절이 필요 없어 typing에 필요한 시간도 매우 단축된다. 또한, 주형 시료 DNA로 구강 내 점막 등에서 추출한 DNA도 사용 가능하여 매우 간편하고 안전하다. 게다가 증폭 산물의 검출을 다양한 방법과 조합하여 수행할 수 있으므로 여러 가지 목적에 따라 사용이 가능하다.

### 참고 문헌

- 1) <http://www.takara.co.jp/news/2000/07-09/00-i-019.htm>
- 2) 田雅光 외, Bed-Side ICAN 법에 의한 chlamydia/*N. gonorrhoeae* 유전자 검출 시약의 개발 (2002) 제51회 일본감식과학기술학회 121.
- 3) 田雅光 외, 등온 유전자 증폭법 ICAN에 의한 chlamydia/*N. gonorrhoeae* 유전자 동시 검출 시약의 개발 (2002) 제49회 일본임상검사 학회 총회 요지집 203.
- 4) 向井博之, ICAN 법의 개발과 반응 (2002) 제14회 北海道輸血 심포지움 20.
- 5) <http://www.takara.co.jp/news/2001/10-12/01-i-033.htm>
- 6) 小林英二, 佐川裕章, 加藤郁之進, 새로운 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Typing 방법 (2001) 일본감식과학기술학회 73.
- 7) 小林英二, 佐川裕章, 加藤郁之進, 신규 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Typing 방법 (2001) 제60회 일본약학회 536.
- 8) Kenine, E. Comstock, *et al.* (1990) *Nucleic Acids Research* 18 (12), 3670.
- 9) 木原正博 (1998) 의학의 발자취 184 (9), 703-705.
- 10) 加藤郁之進, 佐川裕章, SNPs Typing 기술의 전개 (2001) Bio 벤처 1 (1), 45-52.
- 11) Yamamoto, K. *et al.* (1993) *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence* 281, 13-25.
- 12) 石井裕正 (1998) 의학의 발자취 184, 723.

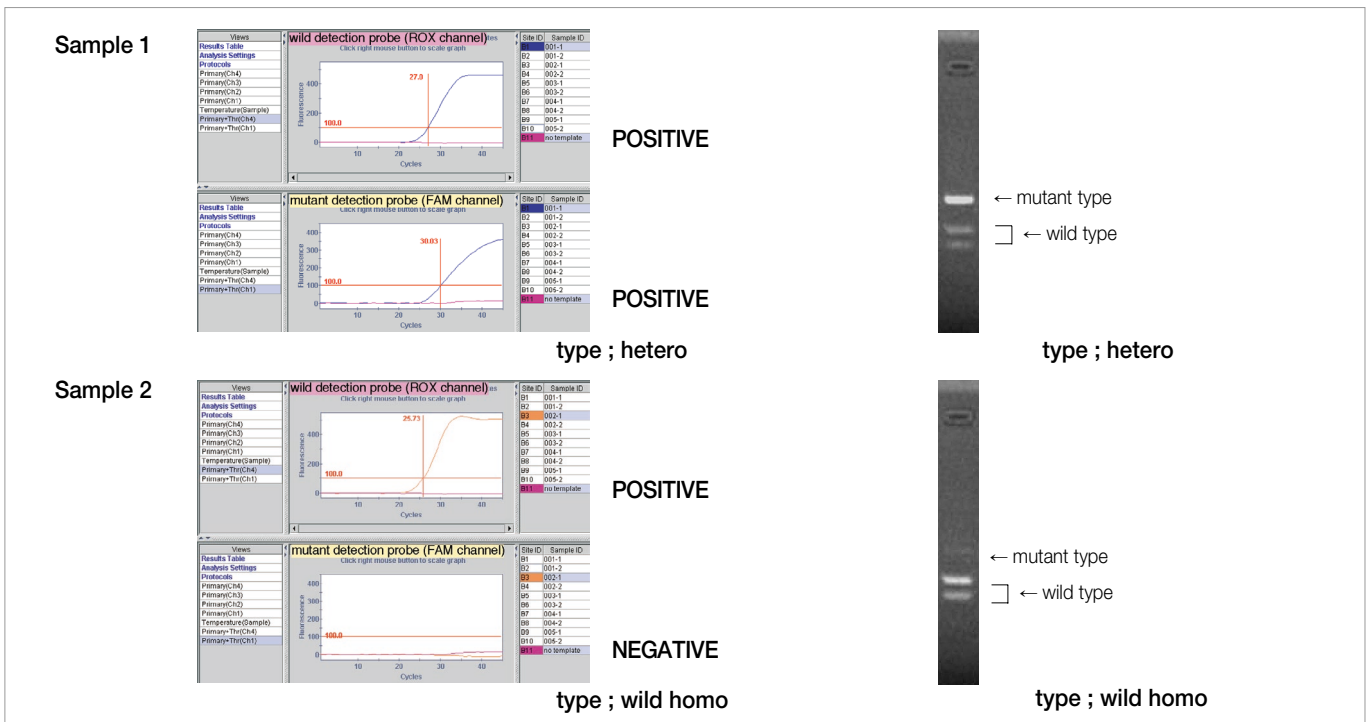


그림 7 Cycleave ICAN<sup>®</sup> human ALDH2 Typing Kit 를 이용한 ALDH2의 SNP typing  
본 kit에 의한 typing 결과의 대표적인 예를 좌측에 나타냈다. 같은 시료로 실험하였고, Eco57 I를 사용한 PCR-RFLP에 의한 typing 결과 (wild type: Eco57 I로 절단; mutant type: 절단 되지 않음)를 우측에 나타내었다. 두 결과가 일치하는 것을 확인하였다.