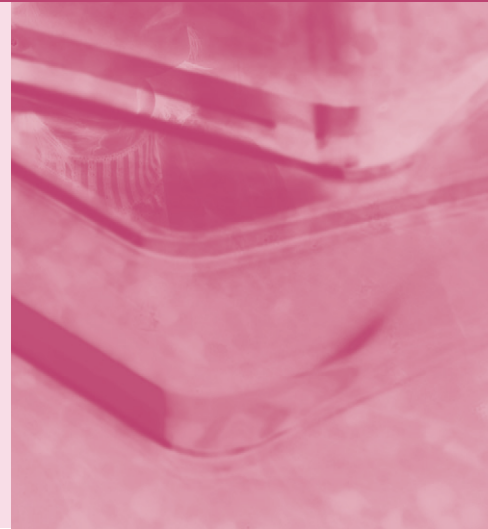


MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification Kit를 이용한 대장암환자 말초혈중 유리 DNA의 methylation 검출

Kawakami kazuyuki assistant Professor
 Department of General and Cardiothoracic Surgery, Kanazawa University Graduate School of Medicine



■서론

유전자 promoter 영역의 methylation은 암 억제 유전자의 비활성화 메커니즘으로 잘 알려져 있고, 이는 암일 경우에 높은 빈도로 관찰되는 epigenetic의 이상현상이다. P16, hMLH1과 같이 암에서는 유전자 promoter 영역의 CpG island가 methylation 되어 있지만, 정상 조직에서는 통상적으로 methylation 되어 있지 않다. 따라서 이와 같은 유전자에서의 DNA methylation은 암 특이적인 marker로서 이용할 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다. 최근 암을 진단할 목적으로 혈액, 객담, 뇨, 배변을 통해 promoter 영역의 methylation을 검출하는 시도를 하고 있다. MethylLight법¹⁾을 이용한 초기 검증에서는 식도암 환자의 말초혈중 유리 DNA에서 APC(Adenomatous Polyposis Coli)의 methylation을 검출하여 그 임상적 의의를 보고한 바 있다²⁾. 그러나 같은 방법을 이용하여 대장암 환자의 말초혈을 검토했으나 methylation 검출률이 낮아 만족할 만한 결과를 얻지 못했다. 식도암은 암 진행이 빠르고 악성도도 높지만, 대장암은 비교적 국한적으로 발육하며 말초혈중에 유리되는 암 조직 유래의 DNA가 미량이라는 점이 검출을 저하의 한 요인으로 보인다. 따라서, 대장암에 있어서 말초혈중 유리 DNA의 methylation 검출에는 고감도 해석방법이 필요하다.

MethylLight법은 bisulphite 처리에 의해 DNA methylation의 유무를 핵산 서열의 차이로 전환하는 과정과 그 서열의 차이를 검출하는 Real Time PCR 과정으로 나누어져 있다. 따라서 검출 감도를 개선하기 위해 두 가지 과정을 최적화해야 한다. 경험상으로 bisulphite 처리 과정에서 기존의 방법으로는 DNA 손실이 많고, 미량의 DNA 검체를 해석했을 경우에는 결과에 큰 영향을 미칠 수 있다. 최근 고효율 bisulphite 처리가 특징인 MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification Kit(TaKaRa Code ME001, 이하 MethylEasy Kit)를 사용할 기회가 있어, MethylEasy Kit 및 *Premix Ex Taq™*(Perfect Real Time)(TaKaRa Code RR039A)를 이용한 대장암 환자 말초혈중 유리 DNA의 methylation 검출을 시도했다.

■대상과 방법

원발소(Primary Focus)에 hMLH1 methylation을 확인한 4개의 사례와 methylation이 확인되지 않은 4개 사례의 대장암 환자에서 수술 전에 채취한 혈장 8검체를 실험 대상으로 이용했다. 모든 과정에서 혈액 채취와 유전자 해석에 대한 동의를 문서를 통해 받았으며, 대학에 설치된 윤리위원회의 승인을 받아 연구를 시작했다. 혈장 300 μ l에 1% SDS 300 μ l, 20

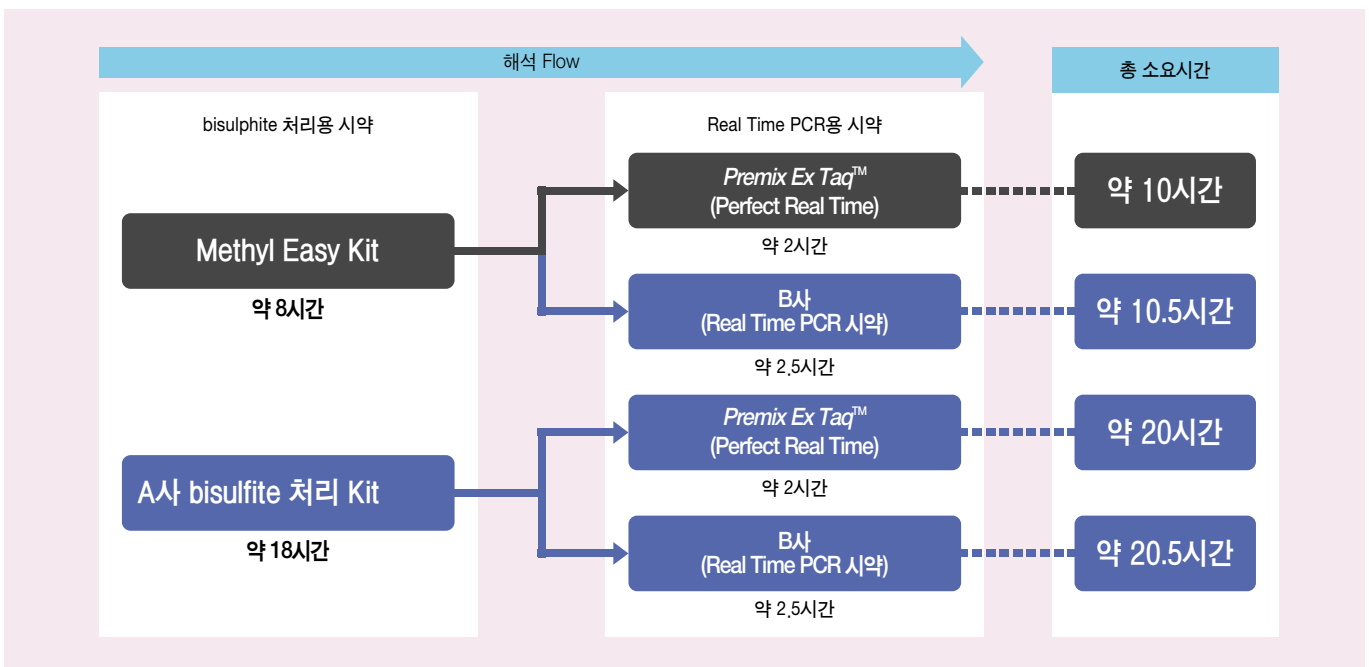


그림 1 MethylLight법으로 검출에 소요되는 시간

mg/ml Proteinase K 20 μ l를 첨가하여, 50°C에서 3시간 동안 반응시켜 단백질을 분해시켰다. 반응액과 동량의 phenol-chloroform 용액으로 DNA를 추출하고, 5 mg/ml glycogen 5 μ l를 첨가한 다음 에탄올 침전을 하였다. DNA pellet을 50 μ l 5 mM Tris buffer에 용해시켜 bisulphite 처리에 사용했다. 추출한 DNA 용액을 각각 20 μ l씩 MethylEasy Kit 및 A사의 제품인 bisulphite 처리 kit로 실험했다. 실험 방법은 각 kit에서 권장하는 방법을 따랐다. 각 kit에 의한 bisulphite 처리 후의 용액은 5 mM Tris buffer에서 50 μ l로 조제하여 용액량을 일정하게 하였다. Bisulphite 처리를 끝낸 검체 2 μ l를 주형으로 *Premix Ex Taq™*(Perfect Real Time) 및 B사의 제품인 Real-Time PCR 시약을 가지고 TaqMan® probe법에 따라 hMLH1 methylation을 검출했다. 사용한 primer, probe 서열은 표 1과 같다. Real-Time PCR에는 ABI PRISM® 7700을 사용하고 50 cycles까지 PCR로 증폭시켰다. 각각의 분석은 duplicate로 했다.

표 1 hMLH1 methylation 해석용 primer, probe 서열

Forward primer	CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT
Reverse primer	CTATCGCCGCCTCATCGT
Probe	FAM-CGCGACGTCAAACGCCACTACG-TAMRA

■ 결과

Bisulphite 처리, Real-Time PCR의 각 과정에서 2 가지 방법, 총 4 가지 검출 방법을 비교했다(그림 1). 검출에 소요되는 시간은 MethylEasy Kit와 *Premix Ex Taq™*(Perfect Real Time) 조합이 가장 짧은 것으로 나타났다. 또한 이 조합에서 원발소(Primary Focus)에 hMLH1 methylation을 검증한 4가지 사례 중 2가지 사례에서 말초혈중에서도 methylation을 검출할 수 있었다(그림 2). 원발소(Primary Focus)에 hMLH1 methylation이 검증되지 않은 4가지 사례에서는 말초혈중에 methylation은 관찰되지 않았다(그림 3). MethylEasy Kit와 B사의 제품인 Real-Time PCR 시약의 조합에서도 동등한 검출이 가능했지만 Real-Time PCR 스텝에서 약 30분이 더 소요되었다. 한편 A사의 제품인 bisulphite 처리 Kit를 사용한 경우에는 Real-Time PCR 스텝 방법에 관계 없이 말초혈중의 hMLH1 methylation은 검출할 수 없었다.

■ 고찰

암 환자의 혈중 유리 DNA를 이용한 암 진단에서는 고감도 검출 방법이 필요하다. 혈중 유리 DNA의 methylation을 검출하는 경우에는 bisulphite 처리 과정에서 DNA 손실을 최대한으로 억제하는 것이 중요하다. 이번 검증에서는 MethylEasy Kit를 이용한 bisulphite 처리와 *Premix Ex Taq™*(Perfect Real Time)을 이용한 MethylLight법에서 대장암환자 말초혈중의 유리 DNA의 hMLH1 methylation을 검출할 수 있었다. MethylEasy Kit는 고효율의 bisulphite 처리를 필요로 하는 해석에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

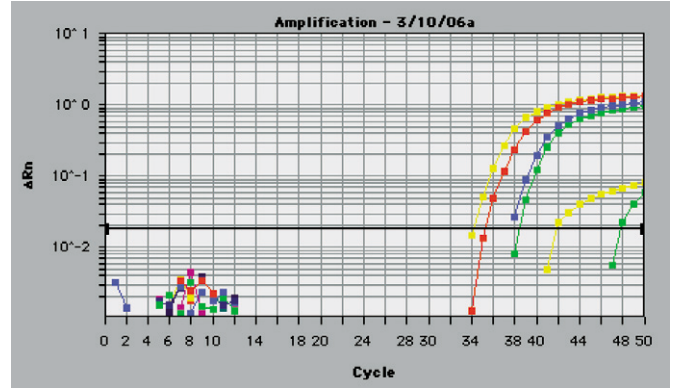


그림 2 원발소(Primary Focus)에 hMLH1 methylation을 인식하는 4사례에서의 Real-Time PCR 결과

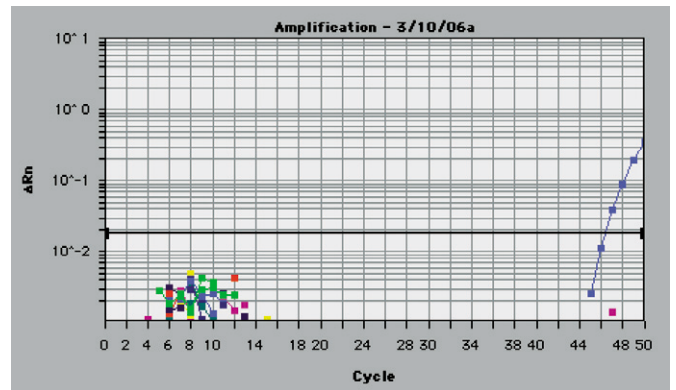


그림 3 원발소(Primary Focus)에 hMLH1 methylation을 인식하지 않는 4사례에서의 Real-Time PCR 결과

[참고문헌]

- 1) Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., and Laird, P. W.: MethylLight: a highthroughput assay to measure DNA methylation. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, E32.
- 2) Kawakami, K., Brabender, J., Lord, R. V., Groshen, S., Greenwald, B. D., Krasna, M. J., Yin, J., Fleisher, A. S., Abraham, J. M., Beer, D. G., Sidransky, D., Huss, H. T., Demeester, T. R., Eads, C., Laird, P. W., Ilson, D. H., Kelsen, D. P., Harpole, D., Moore, M. B., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., and Meltzer, S. J.: Hypermethylated APC DNA in Plasma and Prognosis of Patients with Esophageal Adenocarcinoma. (2000) *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 1805-1811.

DNA중의 methylation화 cytosine의 고감도 검출

▶ Epigenetics 연구용 시약

MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification Kit

Genomic DNA의 methylation화는 histone modification과 함께 유전자 발현 메커니즘의 최상위에 위치하고 전사를 제어함으로써 발생과 다양한 기능을 조절할 수 있다.

본 제품은 DNA 분자 중의 methylation화 상태를 해석하기 위한 kit로서 개량된 Bisulphite법을 이용하여 cytosine 잔기를 uracil로 변환한다. Methylation화된 cytosine은 반응하지 않으므로 methylation화 DNA와 비 methylation화 DNA에서는 서로 다른 염기 서열을 가지게 되어 PCR 증폭 후에 sequencing과 제한효소 처리 등으로 DNA methylation화 해석으로 사용할 수 있다.

본 제품은 배발생, 유전자 발현, chromatin 기능, genome imprinting, 암 등의 질병 연구에서 DNA methylation화 해석에 도움이 된다.



특징

- 100 pg의 genomic DNA 처리 가능.
- 높은 치환효율.
- 높은 DNA 회수율.
- 신속 · 간편. One-Tube 수식반응.
번거로운 column 정제가 필요 없음.
- 처리 후 DNA의 안정성이 뛰어남(1개월 이상 안정).
- 수식 반응 확인용 control DNA 및 primer 첨부.
- High Throughput 96 well 타입도 있음.

제품 내용

Component Name	Contents
Reagent 1	1×5,2 mL
Reagent 2	1×2 g
Reagent 3	1×3,0 mL
Reagent 4	1×25 mL
Control Sample 1	1×40 mL
Control Sample 2	1×20 mL
Control Sample 3A & 3B	2×40 mL
Microcentrifuge tubes	25×2 mL tubes

* 그 밖에 필요한 시약 : 3 M NaOH 용액, 100% isopropanol, 70% ethanol, mineral oil, Glycogen 용액

[Protocol]

DNA 20 ul(0.1~50 ng)
↓
← 3 M NaOH
37°C, 15분
↓
← Reagent 1 + Reagent 2
← Mineral oil
37°C, 4~16 시간
↓
← Glycogen
← Reagent 4
← 100% isopropanol
4°C, 60분
↓
원심분리 15분, 15,000 rpm, 4°C
↓
pellet
↓
← 70% ethanol 세정
← Reagent 3
95°C, 30분,
→ PCR 반응에 사용

높은 회수율

2 μg DNA를 사용하여 본 제품과 기존의 방법으로 수식처리 후 수식 DNA의 회수율을 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

[결과]

본 제품으로 높은 회수율을 확인하였다.

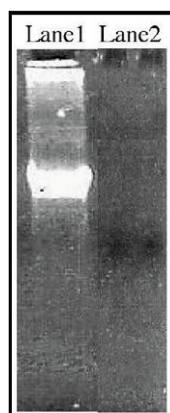


그림 2 수식 DNA 전기영동 결과
Lane 1 : 본 제품으로 수식처리 후 회수한 DNA
Lane 2 : 기존법으로 수식처리 후 회수한 DNA

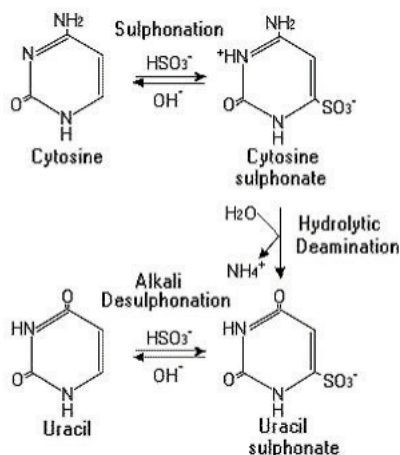


그림 1 Bisulphite법의 원리

미량의 DNA로 해석 가능

3개의 서로 다른 유전자에 대해 각각 다른 양의 DNA를 가지고 본 제품과 타사제품 및 기존의 방법으로 처리를 한 후 PCR 증폭을 하여 그 감도를 확인하였다.

【결과】

본 제품은 100 pg부터 해석이 가능하였다.

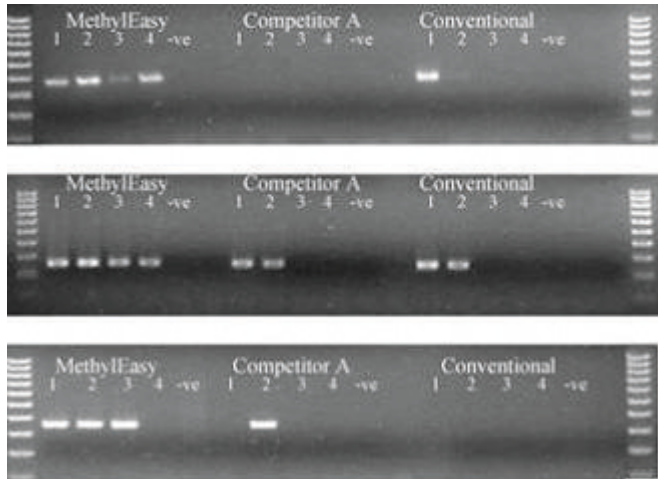


그림 3 DNA량에 따른 PCR 증폭 결과
Lane 1: 100 ng의 DNA로부터 start
Lane 2: 10 ng의 DNA로부터 start
Lane 3: 1 ng의 DNA로부터 start
Lane 4: 100 ng의 DNA로부터 start
-ve : DNA 없음

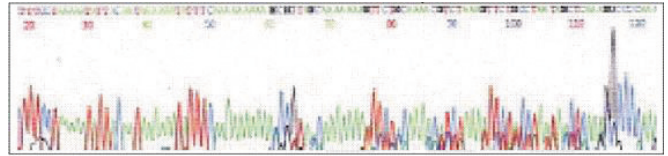
높은 치환효율

본 제품과 기존의 방법으로 처리한 후 PCR 증폭을 하고 sequencing을 하였다.

【결과】

본 제품에서는 높은 확률로 C→U 치환이 일어난다는 사실을 알았다.

본 제품 사용



기존의 방법

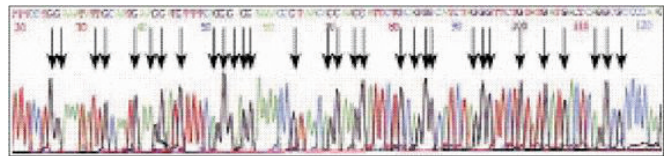


그림 4 Sequencing data
화살표는 blocking 된 cytosine 부위를 나타낸다.

【제품리스트】

제품명	Size	TaKaRa Code
MethylEasy™ DNA Bisulphite Modification Kit	25회	GE001
MethylEasy™ High Throughput DNA Bisulphite Modification Kit for Centrifugation	96 well plate	GE002
MethylEasy™ High Throughput DNA Bisulphite Modification Kit for Vacuum Manifold	96 well plate	GE003

*본제품은 Human Genetic signatures사 제품입니다.

World Largest Pioneer of Protein!!

Recombinant Protein and monoclonal & polyclonal Antibody Bank

- 3,000개 이상의 Full-length Proteins
- 5,000개 이상의 Partial Proteins
- 10,000개의 Human Genes에 대한 Monoclonal Antibody

Abnova
Corporation
www.abnova.com.tw/