대한신장학회지 : 제11권 부록 6호 1992

□ 심포지움 □

유전분자 검색

한양대학교 의과대학 내과학교실

최 웅 환

Molecular Scan

Woong Hwan Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, Hanyang University, College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

역사적으로 의학의 발전사는 과학의 발전사에 비례되어 왔다. 초기의학은 환자의 질환별 증상 및 이에 따르는 이학적 소견을 종합하여 진단을 내렸으나 과학의 발전과 더불어 다양한 검사 방법의 개발됨에 따라 생화학적 검사들이 이학적 소견을 객관적으로 뒷받침 해 주게 되었다.

이러한 생화학 검사들은 대부분 우리 몸을 구성하고 있는 다양한 단백질의 변화를 정량분석하는 것이었으나 이러한 생화학적 검사조차도 완전한 질환의 병인을 규명하는데 불충분하게되어, 좀더 세분화된, 이러한 단백질의 전구물질인 세포내 수준에서의 DNA 염기순, DNA 복제, RNA복제, RNA전사 등의 분자 수준에서의 원인을 규명하기 위해 다양한 분자유전 기법이 이용되고 있는 현실이다. 그렇다면 의학분야의 분자유전학은, 무수한 인체의 단백질의 시초인 DNA의 염기 배열순이 규명됨에 따라 가능해졌고 이를 흔히 cDNA글로닝이라 불리운다. 따라서 단백질 합성의 초기 단계인 DNA의 염기의 원천적인 장애를(다형성, 변이, deletion등)특이한 질환마다 규명할 수 있게 되었다.

물론 분자유전학적 수준에서의 장애는 앞에서 기술한 대로 DNA, RNA복제 단계별로 장애를 규명할 수 있으며, 따라서 이를 규명하는데 필요한 여러가지 분자 유전하적 기법을 이용하게 되었다.

저자가 기술하려는 기법의 목적은 분자 유전학의 가장 근본적인 수준인 DNA 염기 배열 순을 규명함으로써 결과적으로 변이에 의한 아미노산구조의 변화에 따른 생물학적 효과의 장애가 일어날 가능성을 규명하려는 것으로, 과거 고전적인 개념에서 이용되어 왔던 plasmid c-DNA를 이용한 subcloning 및 sequencing 기법의 단점이었던 시간적, 경제적 손실을 보상할 수 있는 기법을 SSCP (single stranded conformational polymorphism)이라 불리운다. 이 기법의 원리는 최근 많이 사용되는 PCR 방법을 변화시킨 것으로 PCR에 직접적으로 ^{32}P를 incoorperation시켜 radiolabel된 PCR 부산물을 polyacryamide gel에 통과시키는 방법이다[1,2].

이때 PCR 부산물 DNA는 동일한 속도로 겔을 지나가야 하나 한개의 염기의 변화라도 있으면 그 속도가 다른 DNA와 차이가 생겨, 이러한 전기영동 이동변화를 ^{32}P가 autoradiography상 다른 띠로 감광되게 된다는 사실이다[3,4]. 이런 방법은 변이가 의심되는 환자의 sample을 모두 sequencing해야되는 복잡하고 시간적 경제적 노력을 감소시켜 이동변화를 보인 표본만을 PCR direct sequencing을 하여 변이를 밝힐 수 있는 장점이 있다. 즉 많은 수량의 표본을 대상으로 유전적 변이를 screen 할 수 있는 방법이다.

SSCP의 검사방법

염기순위를 밝히고자 하는 DNA 분절의 5′ 및 3′쪽에 primer쌍을 합성하여 PCR을 시작하게 된다. 이때 100 ng의 genomic DNA 또는 1 ng plasmid c-DNA가 필요하며 이런 DNA를 94°C에서 10분간 denaturing 시킨 후, 10×PCR 완충액, 70 uM dNTP, 0.5 μM의 5′ 및

3′ primer와 0.25 U Taq polymerase 및 ^{32}P-dCTP (3000 ci/mmol, 10 m ci/ml)을 혼합하여 최종양이 10 μl되게한다. 이때 PCR조건은 denaturation 온도는 94°C로 30초, annealing 온도는 58°C에 1분, extension은 72°C에 2분을 한주기로 전체 38주기를 시행하였다. PCR로 증폭된 DNA 중 1 μl만을 1.8% agarose mini 겔에 전기영동하여 정확한 분자량의 단일띠를 확인하여야 한다.

PCR부산물 1 μl과 95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue 혼합액 9 μl을 96 well microtiter plate에 혼합후 전기영동전 2분간 94°C에서 가열후 denature된 표본을 2 μl씩 38 cm×40 cm×0.4 mm, 5% polyacrylamide 겔에 loading시킨다. 이러한 겔은 두가지 조건으로 실온아래서 10% glycerol이 함유된 겔 전기영동은 25 watt의 지속적인 전류양으로 공급하고, 4°C cold room에서는 glycerol 없는 polyacrylamide 겔만을 50 watt로 전기영동한다. 전기영동이 끝난 겔은 whatman 3M 종이에 옮겨 진공건조아래 완전히 말린후 Kodak X-omat 필림에 −70°C에 7~10시간 노출시켜 autoradiography를 실시한다.

autoradiography 결과 전기영동 이동변화를 보인 표본의 띠는 즉 염기 배열 변이가 의심되는 표본은 대조표본에 비해 감광되는 부위가 다르게 된다. 이런 표본만을 선택적으로 PCR증폭하여 agarose 겔 및 electroelution을 통해 DNA를 다른 부산물로부터 정제하여 DNA 양을 정량한다. 이중 100~180 ng DNA만을 다시 한 번 alkaline denature 시키고 중화기켜 에타놀 침전과정을 통해 DNA template를 만든후 primer에 T_4 polynucleotide kinase를 이용하여 gamma ^{32}P-ATP를 label시켜 USB sequenase Kit을 이용하여 sequencing을 한다[5,6].

본 론

SSCP방법의 유용성을 논하기 이전에 이와같은 분자유전 기법이 발달하게 된 역사와 과거에 많이 이용되어 왔던 다양한 기법과 SSCP기법을 비교할 필요가 있다. 오늘날 수많은 단백질이 클로닝 되어 이러한 단백질의 DNA 염기순을 Gene bank를 통해 쉽게 얻을 수 있게 되어 여러질환으로부터 염기배열순의 이상을 찾는 것이 가능해졌다.

예를 들면 유전적 다형성(polymorphism)의 linkage 분석으로 부터 종양조직에서 DNA변이, 여러 유전질환의 candidate유전자등이 규명되고 있다. 이러한 작업을 규명하는데 도움이 되었던 유전기법으로는 염기배열 순위중 특이한 염기사이의 고리를 끊어주는 제한 효소(restriction enzyme)을 사용하여 환자의 DNA를 절편시킨 후 cDNA를 이용하여 절편된 환자의 DNA에 붙혀보아 절편된 DNA 크기를 비교하는 southern blotting 방법을 통해 유전자의 insertion, deletion 또는 염기의 변이를 확인하는 restriction fragment length polymorphism (RFLP)[7]가 있고, 농도에 따른 폴리아클리라마이드 겔에 DNA를 전기영동하여 특정한 농도의 겔에서 DNA분절이 변화하여 대조군과 비교하는 denaturing gradient 겔 전기영동법[8]과 cDNA 소식자와 잘못 연결된(mismach) oligonucleotide duplex가 불안정하게 결합한다는 원리를 이용한 oligonuceotide hybridization[9] 및 RNA 소식자와 표적 DNA를 RNase로 절편시키는 방법등이 이용되어 왔다[10].

그러나 이러한 분자유전 기법들은 각각의 장점은 있으나 DNA점변이(point mutation)을 찾아내는데 제한된 방법으로 그 특이도가 낮은 방법들로 여겨졌다. 그러나 PCR 방법의 발전과 더불어 우리가 찾고저하는 표적 DNA분절의 염기순을 sequencing 할 수 있는 방법이 개발된 후 다양한 유전적 질환이 가능한 단백질의 DNA 수준에서의 점변이를 찾는데 지대한 공헌을 하게 되었다.

이러한 작업은 선택적인 유전적 질환에서 시도 되었을 뿐, 많은 수의 환자를 대상으로 스크린되는 검사법은 아니었다. 이러한 단점을 보완하며 많은 표본을 분자 스크린 할 수 있는 방법이 연구되던중 1989년 Orita등이 SSCP기법을 발표하여 한 개의 염기 변이가 있는 DNA라도 nondenaturing 겔로 전기영동하면 변이가 없는 DNA와 서로 다른 이동속도(mobility shift)가 일어난다는 사실이다. 이후 Tay-sach disease[11], cystic fibrosis[12], neurofibromatosis[13], NIDDM[14,15,16] 환자등에서 여러 변이 유전자(mutant gene)이 보고되었다. 일명 single stranded conformational polymorphism (SSCP)의 기본 개념은 radioactive한 물질을 직접 PCR 과정에 혼합하여 방사선이 붙혀진 PCR부산물을 얻어 nondenaturing acrylamide 겔에 통과 시키면 각 DNA분절들은 독특한 형태로 접혀(folding)지고 변이

가 있는 DNA 분절은 2차 구조의 semistable한 형태로 변화되어 양자간의 전기영동상 이동상 차이가 나타나 결국 autoradiography상에 서로 다른 level의 띠(band)로 감광되게 된다. 이와 같이 많은 표본을 동시에 스크린하여 이동변화를 보인 표본만을 직접 sequencing하여 DNA 염기 변이를 쉽게 찾는다는 이론이다.

SSCP의 기술상 몇가지 요소로 첫째 전기영동중 겔의 온도이며 최적온도는 17~20°C이며 둘째 전기영동완충액의 농도, 세째 겔에 있는 denaturating agent에 의해 영향 받는다.

전기영동중 겔의 온도가 17°C가 유지되면 분명한 이동상의 변화를 볼 수 있으나 23°C로 증가되면 띠 모양이 분명히 분리되지 않는다. 즉, 고온에서 DNA의 semistable conformation이 파괴된다고 생각되며 겔의 running 완충액 역시 농도가 낮으면 이동상의 변화가 불분명하게 된다.

또한 겔에 10% glycerol을 추가하면 이동상의 속도가 상당히 느려져 띠분포에 영향을 미치는데 경우에 따라서 DNA polymorphism에 의한 이동변이가 더욱 분명해 지기도 한다.

결 론

이같은 SSCP 방법을 이용하면 human genetic linkage map study는 물론, 가장 큰 이점으로는 쉽게, point mutation을 많은 표본을 대상으로 molecular scan할 수 있다는 장점이다. 따라서 고전적인 분자 유전학 기법의 질환별 candidate mutant gene을 규명하는데 많은 수의 환자를 대상으로 쉽게 screen할 수 있는 방법으로 생각된다.

REFERENCES

1) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: *Analysis of enzymatically amplified β-globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotice probe. Nature **324**:163-166, 1986*

2) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: *Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA plymerase science **239**:487-491, 1988*

3) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: *Rapid and sensive detaction of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics **5**:874-879, 1989*

4) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2766-2770, 1989*

5) Moller DE, Flier JS: *Detectiion oif an alteration in insulin receptor C DNA sequence in pima indians with non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes **38**:1496-1500, 1989*

6) Moller DE, Flier JS: *Detectiion oif an alteration in insulin receptor gene in a patient with insulin resistance, acanthosis nigricans, and polycystic ovary syndrome (type A insulin resistance). N Engl J Med **319**:1526-1529, 1988*

7) Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW: *Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Amer J Hum Genet **69**:201-205, 1980*

8) Myers RM, Lumelsky N, Lerman L, Maniatis T: *Detection of single base substitutions in total genomic DNA Nature **313**:495-498, 1985*

9) Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB: *Detection of sickle cell beta-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA **80**:278-282, 1983*

10) Winter E, Yamamoeo F, Almoiguera C, Perucho M: *A method to detect and characterize point mutations in transcribed genes; Amlification and over expression of the mutant c-ki-ras allele in human tumor cells. Proc Natl Acad Sci USA **82**:7575-7579, 1985*

11) Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Mackie MB: *Diagnotic single strand conformational polymorphism; a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B_1 Variant. Nucleic Acid Research **19**:405-406, 1991*

12) Michael D, Marga BW, Jean A, BErnard G, Claudia S, Kon-Taik K, Mark L: *Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. Cell **61**:863-870, 1990*

13) Richard MC, Robert W, Gangfeng X, David V, Melanie C, Jeff S, Ray W: *Amajor segment of the meurofibromatosis type 1 gene: CPNA sequence, genomic structure, and point mutations. Cell **62**:193-201, 1990*

14) Stephen O, Woong HC, Patel P, Jeffrey SF, David EM: *Detection of mutations in insulin-receptor gene in NIIDDM patients by analysis of single stranded coformation polymorphisms. Diabetes **40**:777-782, 1991*

15) Woong-Hwan C, Stephen O, Alan R, Ruth M, Jeffrey SF, David EM: *Molecular Scanning of the insulin-responsive glucose transporter gene in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes (In press) 1991*

16) Kadowaki T, Kadowake H, Rechler MM, Serrano-Rio M, roth J, Goth J, Gorden P, Taylor SI: *Five patients with genetic forms of insulin resistance. J Clin Invest **86**:254-264, 1990*