사구체 질환에서 경쟁적 중합요소 연쇄반응 (Competitive-PCR)의 임상적 응용

고려대학교 의과대학 내과학교실

차 대 룡

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)은 DNA 중합효소(polymerase)의 연속적인 반응을 이용하여 소량의 DNA를 대량으로 증폭시키는 방법으로 검체내에 존재하는 특정 DNA를 수십만배로 증량시킴으로써 극소량의 검체로도 분석이 가능한 장점이 있다. 이 기법은 소량의 세포로부터 특정 유전자의 존재유무를 검색하는 과정, 특정 유전자의 결함(deletion)이나 돌연변이(point mutation)의 확인과 유전자의 클로닝 및 특정 유전자의 발현 정도를 평가하는데 사용되고 있다. 현재까지 유전자의 발현정도를 관찰하는 방법으로는 in situ hybridization, northern blot analysis, nuclease protection assay 및 PCR 기법등이 있으며 전자의 3가지 방법은 검체내에 관찰하고자 하는 유전자의 발현이 아주 강하거나 혹은 다량의 조직을 필요로 하는 단점이 있으며 일반적인 PCR 기법은 검사 자체가 상당히 예민하고 소량의 세포로 부터도 유전자 발현을 관찰할 수 있는 장점은 있으나 정량분석이 정확치 않다는 문제가 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하고 소량의 조직으로부터 유전자 발현을 측정하는 새로운 분자생물학적 기법의 발달은 관찰하고자 하는 검체가 아주 소량인 경우 필수적 요건으로 1980년대 말에 새롭게 소개된 경쟁적 중합효소 연쇄반응(competitive PCR)은 이러한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 기법으로 대두되고 있다. 특히 사구체성 신질환의 발병기전을 이해하기 위해서는 사구체내에서의 특정 유전자의 변화에 대한 관찰이 필요한데 신조직에서 사구체가 차지하는 비율은 신피질의 5%에 불과하며 따라서 현재까지 일반적으로 사용된 northern blot 기법을 사용한 유전자 발현의 분석은 실제의 유전자 발현을 희석시킬 가능성이 있으며 Yang등은 당뇨병성 신증의 동물 모델에서 양기법을 사용할 경우 서로 다른 결과를 얻었음을 보고한 바 있다. 따라서 사구체내에서의 변화를 관찰하기 위해서는 신조직으로 부터 사구체만을 따로 분리한 후에 mRNA의 발현정도를 평가하는 것이 보다 정확한 방법이라 할수 있다. 그러나 mRNA의 특성상 사구체내에서의 발현양은 극히 미미하고 사구체 분리후 빨리 조직을 처리하지 않을 경우 RNA가 파괴될 수 있다는 문제점이 있으므로 일반적인 northern analysis로는 사구체 내에서의 유전자 변화를 측정하는데 제한이 있다. 결국 이러한 경우에 PCR 기법은 가장 적절한 방법이라 할수 있으며 정량분석이 가능한 competitive PCR은 이러한 측면에서 상당히 유용하게 사용될 수 있다.

경쟁적 중합효소 연쇄반응 (Competitive PCR)은 일반적인 PCR과는 달리 한 실험관 내에 이미 알고 있는 농도의 mutant template를 넣어 검체내의 DNA와 같이 동시에 증폭시킴으로써 상호 경쟁적으로 DNA를 증량시키는 것으로 검체내의 DNA의 정량분석은 mutant template 와 검체의 DNA가 동시에 equimolar amplification 된다는 특성을 통하여 분석이 가능하다. 따라서 이러한 competitive PCR을 시행하기 위해서는 mutant template가 필수적으로 현재 널리 쓰이는 mutant template는 크게 3종류로 genomic DNA, cDNA mutant, c RNA mutant 등이 있다. Genomic DNA는 특정 유전자의 증폭을 위해 양 primer를 제작하는 과정에서 100~200 bp 크기의 intron을 포함하게 2개의 exon부위에서 각각의 5′ primer와 3′ primer를 설정함으로써 DNA의 증폭이 끝난후에 검체내의 DNA가 genomic DNA에 비해 100~200 bp 정도의 작은 band를 보임으로써 두 개의 band를 구분할 수 있다. 그러나 이방법은 DNA 증폭의 효율성(efficiency)이 genomic DNA와 검체내 DNA간에 차이가 날 수 있다는 단점이 있으

므로 널리 사용되지는 않고 있다. 현재 가장 많이 쓰이는 방법은 cDNA mutant를 사용하는 것인데 이는 site directed mutagenesis를 일으켜서 검사하고자 하는 특정 DNA와 같은 핵산의 배열을 보이나 크기를 보다 길거나 짧게 만들어 DNA 증폭이 끝난후 젤 전기영동상 band의 크기로 구별을 하거나 혹은 검체내 DNA의 특정 뉴클레오타이드를 다른 뉴클레오타이드로 바꾸어서 새로운 제한효소(restriction enzyme)가 작용하는 부위를 발생시켜 DNA 증폭이 끝난 후 제한효소 처리를 함으로써 검체 DNA와 mutant DNA를 구분할수 있게 하는 방법이다. 그러나 이방법은 mutagenesis를 일으켜야 한다는 기술상의 문제점이 있고 각 유전자에 대한 primer 설정시에 여러번의 재시도 (trial and error)를 요구하는 단점이 있으나 현재로선 가장 유용한 방법으로 사용되고 있다. 한편 최근들어 cRNA mutant를 사용한 방법이 보고되어 있고 이는 인위적으로 RNA를 제작한 후 reverse transcription 과정부터 mutant RNA와 검체내 RNA를 경쟁시켜 PCR을 시행하는 것인데 본 방법은 RT의 효율성을 따로 측정할 필요가 없이 mutant 와 검체내 RNA가 같은 효율로 RT된다는 장점은 있으나 RNA mutant의 정량분석이 힘들다는 문제가 있다. 결국 현재 사용되고 있는 competitive PCR에서는 mutant cDNA가 보편화된 방법으로 널리 사용되고 있는 실정이다. Competitive PCR은 전술한 바와 같이 mutant DNA와 검체내 DNA가 동시에 증폭된다는 특성을 사용하는 것으로 총 6개의 시험관에 동량의 검체 DNA를 넣고 이미 농도를 알고 있는 mutant DNA를 서로 다른 농도로 각 시험관 내에 추가하여 PCR을 시행하게 된다. PCR이 끝난 검체는 겔 정기영동을 시행하여 크기가 다른 2개의 band를 얻게 되며 (즉 mutant DNA band와 검체내 DNA band) 두 band의 강도를 densitometer로 정량분석하여 서로 유사한 band 강도를 보이는 mutant DNA 양을 결정함으로써 검체내 DNA의 양을 결정하게 된다. 현재 이 기법은 mouse, rat 뿐 아니라 검체의 양이 제한된 인체 내에서의 여러 유전자 발현 정도를 관찰하는데 사용되고 있으며 이는 향후 각종 사구체 질환의 병태 생리학적 연구뿐만 아니라 세뇨관, 간질성 신질환의 분자 생물학적 연구에도 유용하게 사용될수 있으리라 생각된다.

REFERENCES

1) Highuchi R, In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications(ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Srinsky, and T. J. White), pp 177-183. Academic Press, Inc., San Diego., 1990*
2) Peten EP, Garcia A, Terada Y, Woodrow D, Martin BM, Striker GE, Striker LJ: *Age related change in α1 and α2 chain type IV collagen mRNA in adult mouse glomeruli: Competitive PCR. Am J Physiol 263:F951, 1992*
3) Peten EP, Striker LJ, Garcia A, Striker GE: *Studies by competitive PCR of glomerulosclerosis in growth hormone transgenic mice. Kidney Int 43:S55, 1993*
4) Moriyama T, Murphy HR, Martin BM, Garcia A: *Detection of specific mRNA in single nephron segments by use of polymerase chain reaction. Am J Physiol 258:F1470, 1990*
5) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: *Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 87:2725, 1990*
6) Peten EP, Striker LJ, Carome MA, Elliot ST, Yang CW, Striker GE: *The contribution of increased collagen synthesis to human glomerulosclerosis: A quantitative analysis of α2 IV collagen mRNA expression by competitive polymerase chain reaction J Exp Med 176:1571, 1992*
7) Wang AM, Doyle MV, Mark DF: *Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction Proc Natl Acad Sci USA 86:9717, 1989*
8) He CJ, Yang CW, Peten EP, Liu ZH, Patel A, Striker LJ, Striker GE: *Collagen and collagenase mRNA in normal and sclerotic glomeruli: Predictors of progression and response to therapy. Kidney Int 47:S39, 1995*
9) Yang CW, Vlassara H, Striker GE, Striker LJ: *Administration of AGEs in vivo induces genes implicated in diabetic glomerulosclerosis. Kidney Int 47:S55, 1995*