

유전학 연구 기법

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과

진 동 규

Southern hybridization

Southern hybridization은 DNA(genomic DNA 혹은 cloned cDNA)에 특정 염기서열이 존재하는 지, 유전적 변이가 일어났는 지를 확인하기 위해 사용된다.

1. 개념 및 원리

1975년 써던(Ed Southern)에 의해 고안된 유전자

연구기법으로 사람이나 쥐 등의 유전자를 제한효소로 잘라 이들 단편을 한천 겔(agarose gel)에 전기영동하여 각각을 분리한 다음 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)이나 나일론 막(nylon membrane)에 이전(transfer)한 다음, 이에 찾기자 하는 특별한 염기서열을 지닌 프로브(probe)를 hybridization하여 특정 유전자를 찾는 방법이다.

DNA가 나일론 막이나 나이트로셀룰로스 막에 옮겨질 때를 써던 블라팅(southern blotting)이라 하고, RNA가 옮겨질 때를 노던 블라팅(Northern blotting),

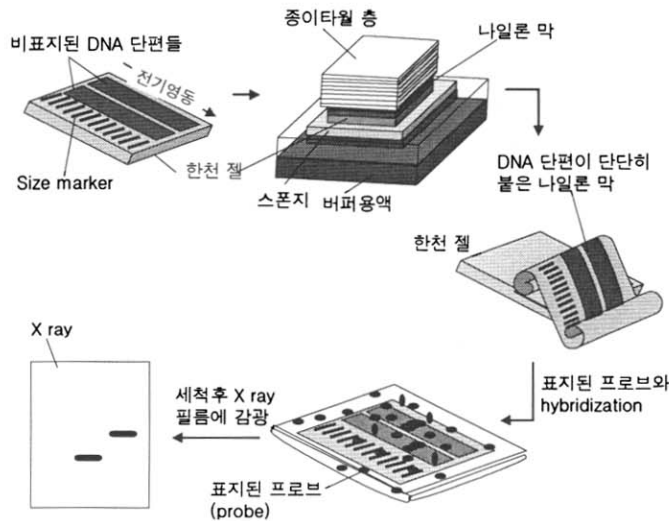


Fig. 1-1. 전기영동과 블로팅 (blotting)에 의한 DNA 분석
 제한효소에 의해 절단된 DNA나 세포로부터 분리된 RNA는 한천 겔에 점적되고 크기에 따라 전기영동으로 분리된다. 겔에서 핵산은 나일론 여과지막에 옮겨져 겔과 동일한 레플리카를 만든다. 이것은 완충용액이 있는 접시에 놓인 스폰지위에 겔을 놓고 막을 겔 위에 놓고 빨아올리기 위해 종이타월 더미를 올려 완충용액을 끌어올린다. 겔로부터 DNA는 막에 강하게 결합하게 되고 여기에 방사선 등으로 표지된 프로브와 잡종화(hybridization)한다. 프로브와 결합한 부위의 프로브만이 실험의 최종으로 남게되어 X ray 필름에 노출시킴으로써 프로브와 상보적인 DNA 절편부위를 필름상에서 밴드로 확인할 수 있다.

SDS-polyacrylamide 겔로부터 단백질이 옮겨질 때를 웨스턴 블랏팅(Western blotting)이라 한다. Western blot의 경우 관심있는 단백질은 다른 세포성 단백질의 배경에서 그 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 사용하여 찾는 방법이다.

1) 제한효소 분절길이 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

써던 블랏팅을 응용한 유전자 진단법의 일종으로 RFLP의 원리는 DNA를 제한효소로 절단시키면 절단된 유전자 길이(DNA fragment length)는 개인간에 다양(polymorphic)하게 나타난다는 원리를 이용한 유전자 분석법이다.

RFLP가 생기는 원리는 유전자의 염기에 이상이 생긴 경우, 이 부위가 제한효소가 인식하는 부위(recognition site)라면 효소에 의해 잘리게 되나, 제한효소가 인식을 하지 못하면 다른 형태의 유전자 단편이 생기는 다양성(polymorphism)이나 제한효소가 인식하는 절단되는 유전자 단편부위내에 반복 염기서열(tandem repeated sequence)가 존재하여 이의 수에 따라서 유전자의 길이가 다양해질 수 있다(Fig. 2-1).

2. 용도

Southern blotting은 DNA(genomic DNA 혹은 cloned cDNA)에 특정 염기서열이 존재하는지, 유전적 변이가 일어났는지를 확인하기 위해 사용되어 다양한 인간의 질병에서 발견되는 중요한 유전자의 재배열이나 결실을 찾는데 유용하다.

동일 종에서 구조적으로 관련이 있는 유전자나 다른 종에서 상동유전자를 식별하고 진화의 정도를 파악하는 데에도 사용되며, RNA 접속과 항체와 T세포 수용체를 형성하기 위한 게놈 재배열 그리고 재배열된 종양유전자의 검출과 같은 다양한 생물학적 과정의 이해에 중요한 기여를 하고 있다.

구체적인 써던 블랏팅의 임상적응용은 다음과 같다.

1) 유전 질환의 진단.

변이가 생긴 환자의 DNA는 정상인의 DNA와 달라 제한효소 인식부위의 차이를 보여 다른 양상의 DNA 분절이 생긴다.

2) HLA 항원의 결정

혈청학적으로 동일한 항원으로 판정이 되었어도

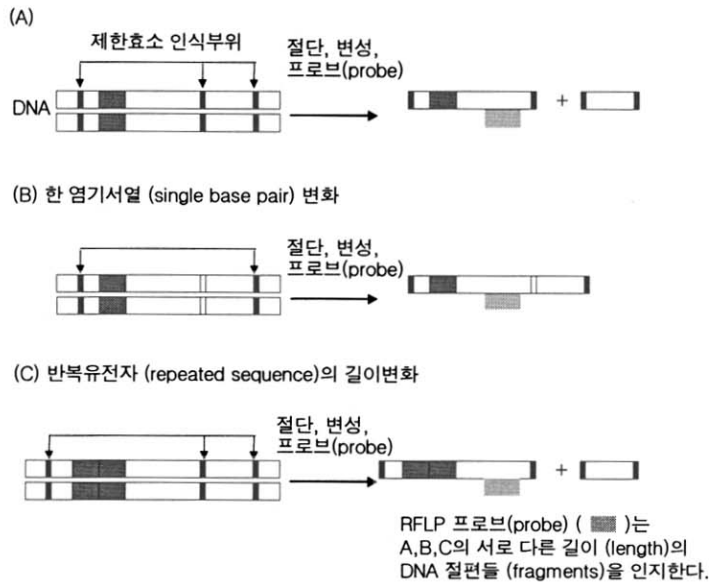


Fig. 2-1. 제한효소 분절길이 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP)을 만드는 DNA 염기서열의 변화 (A) 대다수의 사람들에서 나타나는 분포(population), (B) 한 염기서열의 변화로 짧은 염기서열을 인식하는 제한효소인식부위 소 실, (C) 반복 염기서열(repeated sequence)의 반복수에 따라서 유전자의 길이의 변화.

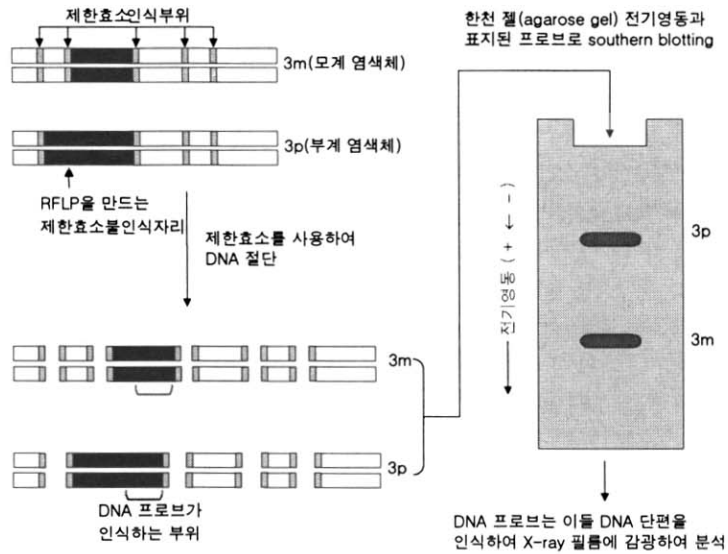


Fig. 3. RFLP의 원리.

DNA상으로 여러 가지 형태로 세분되어 HLA 유전자의 개인적 특이성을 보이며, 혈청학적으로 발견이 안된 미세한 차이까지 발견할 수 있으며, 질병발생의 예견자로도 이용할 수 있다.

3) 질병의 발병기전

인슐린 유전자(insulin gene), 인슐린 수용체 유전자(insulin receptor gene), 당수송체 유전자(glucose transporter gene), LDL 수용체 유전자(LDL receptor gene) 등의 RFLP분석을 통해 질병의 원인 및 발병기전을 연구하는 데 사용되고 있다.

4) 성별 결정

Y 염색체만 있는 특이한 프로브를 사용하여 썬던 블러팅을 할 수 있고 전체 DNA와 프로브를 직접 반응시켜 DNA 진단을 실시할 수도 있다.

5) 미생물 감염 진단

미생물의 일부분을 프로브로 하여 미생물 감염을 진단할 수 있고, 균주간의 제한효소로 절단한 DNA 분절을 분석하여 생긴 다형성을 관찰하여 역학조사에 이용할 수 있다.

6) 종양의 진단 및 성상판정

정상 세포와 다른 유전자 정보를 지니게 되는 종양 세포는 DNA 진단법을 통해 조기에 발견될 수 있고, 백혈병 등의 조기진단에 응용되고 있다.

3. 실험 과정

1) DNA 추출 및 제한효소에 의한 절단

2) 한천 겔 전기영동

3) 전이(transfer)

(1) 전이(transfer)의 다양한 방법: 모세관흡수식 블라팅(capillary blotting), 전기이동식 블라팅(electrophoretic transfer), 압력차 블라팅(vacuum blotting, positive pressure blotting)

4) 프로브와의 잡종화(hybridization)

(1) 프로브제작의 다양한 방법: 방사선 동위원소인(³²P, ³⁵S, ³³P)나 비방사선인 hapaten, enzyme 등으로 표지할 수 있다. 틸 해독형(nick translation), 무작위표지(random labeling) 등의 방법을 사용할 수 있다.

5) 세척 및 X ray 감광으로 결과해석

참고 문헌

- 1) Laboratory manual of Biotechnology 서울대학교 병원, 임상의학 연구소 편저
- 2) 임상분자생물학 기법 최영길 편저
- 3) Recombinant DNA(second edition), Waston 외
- 4) Molecular biology of The Cell(Third editin), Alberts외
- 5) Gene cloning(second edition)

SSCP(Single strand conformation polymorphism) :

하나의 염기치환의 간편한 검출법

유전자의 특정부위의 돌연변이를 찾아내기 위한 실험법으로 간단한 기법을 통하여 염기서열분석(sequence analysis)을 하지 않더라도 PCR로 증폭한 DNA band에서 염기서열의 차이를 알아낼 수 있다.

1. 서론

생식세포에 발생한 유전체 상의 염기서열의 변화는 발생, 분화, 세포의 증식 등에 영향을 주지 않는 경우에는 자손에게 전달되고, 이는 각 염색체 독자의 다형(polymorphism)으로써 개인의 식별이 가능하며, 이 다형이 세포의 기능에 영향을 주는 경우에는 각종 유전병이나 가족성 암의 원인이 된다. 특히 체세포에서의 DNA염기서열의 변화는 그 세포의 암화의 원인이 된다.

인간의 DNA에서 일어나는 변화에는 유전자의 증폭, 재조합(recombination), 결실(deletion) 등의 큰 변화와 염기 치환(substitution)이나 짧은 염기배열의 삽입(insertion), 결손 등의 작은 변화가 있다. DNA의 변화가 큰 경우에는 southern blot 방법으로 알아낼 수 있으나, 점돌연변이(point mutation)를 비롯한 DNA상의 작은 변화의 검출에는 몇 가지 특별한 방법을 사용할 필요가 있다.

여러 방법이 있으나 SSCP(single-strand conformation polymorphism)은 비교적 간단하고 효용성이 높아 많이 시행되고 있다. Orita et al.(1989)가 발표한 PCR-SSCP법은 DNA 한 가닥이 이루는 형태구조의 차이에 의한 전기영동상의 이동거리의 차이를 찾는 방법으로 특정유전자의 일부를 PCR로 증폭한 후 이를 non-denaturing 겔에 전기 영동하여 차이를 보게 된다. 증폭된 유전자 배열에 돌연변이가 있을 때 그 wild type과 다른 형태구조를 갖게 되어 이동 거리 상에 차이를 보이게 된다(aberrant band). 이 때 band를 보기 위하여 PCR을 시행할 때 방사성 동위원소를 함께 넣어 증폭한 뒤 자가방사법(autoradiography)으로 검출하거나 방사성 동위원소를 사용하지 않고 PCR한 뒤 은 염색(silver staining) 등으로 결과를 확인한다.

Aberrant band가 보일 때에는 1) 증폭된 DNA에 돌연변이가 있거나 2) 증폭된 DNA가 다형성이 있거나 3) 같은 DNA라도 두 가지 또는 그 이상의 다른 형태구조를 갖는 경우의 가능성이 있다고 볼 수 있다.

SSCP의 효과는 single strand DNA가 염기서열의 차이에 따라 삼차원적인 구조의 차이를 보여 전기 영동상 차이가 나타날 수 있는 적절한 실험조건을 확인하는 것이 중요한 과제가 된다. 따라서 이 방법의 성공률을 현재 35-100%까지 다양하게 보고되고 있으며, 글리세롤(glycerol) 등의 첨가물을 사용하여 SSCP의 예민성을 증가시키기 위한 노력이 계속되고 있다.

2. 실험 방법

1) 조건

① PCR 산물크기가 400bp 이하일 때 변이가 80% 이상 찾아지며, 통상 150-250bp 정도일 때 가장 적합하다. PCR 산물크기가 400bp 이상일 경우 제한효소를 처리하여 시행한다.

② 전기영동 온도가 상승하게 되면 band 분리의 재현성이 떨어진다. 4-10℃와 실온에서 전기영동하여 최적의 조건을 맞춘다.

③ 전기영동 시간은 자신의 PCR산물의 크기에 따라 결정한다.

④ 겔에 5-10%의 글리세롤을 첨가하면 삼차구조 형성이 잘 이루어져 SSCP가 좀더 잘 되게 한다.

2) 과정

(1) 특정 유전자 부위 PCR

(2) 겔 만들기 : polyacrylamide, MDE(mutation detection enhancement 겔)

(3) 전기영동

(4) 검출법(detection)

방사선동위원소를 사용하는 경우 : 자가방사법 (autoradiography)

방사선동위원소를 사용하지 않는 경우 : 은염색 (silver staining)

3. 결과 분석

일반적으로 wild-type의 경우 두 개의 band를 보일 수 있으며, 두 개의 대립인자 모두 유전자 이상이 있는 동형 이합체의 경우라면 정상과는 다른 이동도를 보이는 두 개의 band를 예상할 수 있다. aberrant

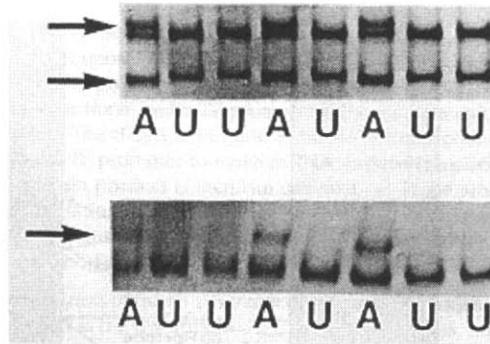


Fig. 3. Exon2 of the NF2 gene was PCR amplified from genomic DNA of eight members of a family in which a C→T base change mutation was segregating. U: Unaffected individuals A: Affected individuals.

d/ddNTP in 'G' tube	dG dA dT dC
	ddG
Original sequence	ATTAGACGTCCG
Dideoxy sequencing products	ATTAddG
	ATTAdGACddG
	ATTAdGACdGTCCddG

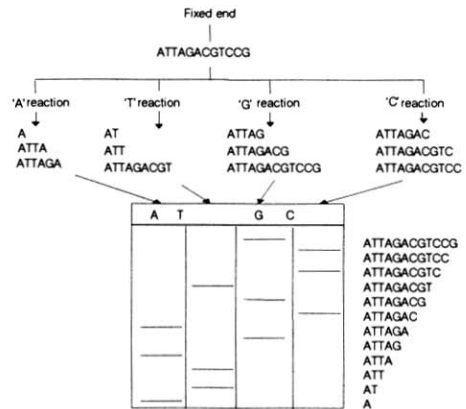
band가 관찰 되면 젤에서 band(한개의 대립유전자를 가지는 DNA band)를 잘라내어 DNA를 추출한 후 처음 사용한 PCR primer로 다시 증폭하여 염기서열 분석(sequencing)을 하면 돌연변이를 확인할 수 있다 (Fig. 3).

DNA sequencing

1. By dideoxynucleotide chain termination method

1990년 전에 염기서열 분석법(sequencing)은 클로닝된 DNA 조각을 sequenase 등의 효소로 염기서열 분석을 하는 것이었다. 1990년대 초반에 들어 PCR이 보편화되면서 PCR 산물을 직접 sequencing 할 수 있는 kit가 시판되었고, 그 후 더욱 개선된 kit들이 개발되어 사용되고 있다. 따라서 근래에는 일반적으로 sequencing이라고 하면 PCR 산물의 직접 염기서열 분석법(direct sequencing)을 의미한다.

Sequencing을 하는 이유는 1) 돌연변이 등의 유전자 이상의 분석, 2) 다형성의 확인, 3) PCR산물의 진위여부 확인, 4) 모르는 DNA조각의 염기서열분석을



하기 위함이다.

Sequencing은 denatured-template DNA strand에 DNA polymerase가 dNTP(deoxynucleotide: dATP, dTTP, dCTP, dGTP)를 채워 넣는 과정 중에 ddNTP (dideoxynucleotide)가 끼어 들게 되면 polymerization이 중단되는 것을 원리로 하여 이렇게 생긴 product의 길이의 차이를 고해상도 polyacrylamide gel에 전기 영동한 후 자가방사법으로 결과를 확인한다. manual sequencing이란 위와 같이 sequencing 반응을 하고 젤을 만들고 autoradiography하는 방법을 말한다. 최근에는 자동 염기서열분석법(automated sequencing)을 많이 이용하는데, ABI sequencer(Perkin Elmer) 같은 기기를 사용한다. ddNTP에 서로 다른 색의 형광 물질이 붙어있어 전기영동하는 동안 laser가 형광색을 인식하여 자동으로 sequence를 읽게 된다.