

DHPLC의 화학적 특성을 이용한 질병 유전자의 분석 시스템 개발

남윤형 · 박상범 · 이재식 · 강 원 · 김종규*
단국대학교 첨단과학대학 화학과 및 기초과학연구소
(2005. 12. 23 접수)

The Development of Analysis System for Genes Related Disease Using Chemical Properties of DHPLC

Youn-Hyoung Nam, Sang-Bum Park, Jae-Sik Lee, Won Kang, and Jong-Gyu Kim*
Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute,
Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Received December 23, 2005)

요 약. p53 종양억제유전자(tumor-suppressor gene)는 유방암종과 관련하여 높은 돌연변이 비율로 나타나고 있는 것으로 보고되어지고 있다. p53 유전자는 20kb의 크기를 갖는 유전자로써 인간 염색체의 17p13.1에 위치하고 있다. 본 실험에서는 유방암으로 진단 받고 수술한 환자의 조직 100개와 환자화 전혀 상관없는 정상 조직 103개를 대상으로 DNA를 추출하고 PCR-DHPLC(polymerase chain reaction - denaturing high performance liquid chromatography) 방법으로 단일 염기 다형성을 검출하였다. 또한 컬럼의 충전물질과 DNA의 결합에 의한 분리능을 확인하기 위해 충전물이 다른 컬럼의 단일 염기 다형성을 실험하였다. 그 결과 100개의 유방암 조직 중 exon 5에서 11개(11%)의 C/A, C/G genotype을, exon 8에서 42개(42%) T del genotype을 확인하였다. 103개의 정상 조직에서 exon 5에서 2개(2.9%), exon 8에서 9개(8.7%)의 polymorphism을 확인하였다. 컬럼의 분리능 실험에서는 PS-DVB(poly styrene - divinylbenzene)으로 충전된 컬럼이 C18으로 충전된 컬럼보다 더 좋은 분리능을 보였다.

주제어: p53 유전자, 유방암, PCR-DHPLC, 돌연변이

ABSTRACT. p53 tumor-suppressor gene has emerged that it is related of breast cancer with high sensitivity. p53 gene is located on chromosome 17p13.1 in human with 20 kb. In this study we extracted DNA from 100 tissues of breast cancer patients and 103 normals. Then we confirmed single-nucleotide polymorphism(SNP) using PCR-DHPLC(polymerase chain reaction-denaturing high performance liquid chromatography). Also, we studied SNP of samples using several columns to identify relation between packing materials of column and resolution. As a result, we identified 4 C/A, C/G genotypes(4%) in exon 5 and 37 T del genotypes(37%) in exon 8 among 100 breast cancer tissues and 2 in exon 5, 9 in exon 8 among 103 normal samples. In resolution test, we confirmed that PS-DVB(poly styrene-divinylbenzen) column is more efficient than C18 column.

Keywords: p53 Gene, Breast Cancer, PCR-DHPLC, Mutation

서 론

유방암은 미국 등 서구에서는 여성악성 종양 중 가장 많은 질환으로 심각한 문제가 되고 있고 한국에서도 자궁경부암, 위암에 이어 세 번째로 많은 여성 질환으로 최근 들어 유방암의 발생 빈도가 증가하는 추세이다. 유방암의 발생 원인으로는 선천적인 유전요인과 후천적 환경요인이 있다. 한국의 유방암의 발병 빈도 및 발병연령은 외국의 발병연령에 비해 약 10년 내지 15년 조기 발병한다고 보고 되었지만 적절한 원인분석이 없어 유전자 연구를 통하여 예후 인자의 하나인 p53 종양 억제 유전자의 변이 특성에 대한 연구가 필요하다.

대표적인 종양억제 유전자의 하나인 p53의 돌연변이는 유방, 난소, 폐, 식도, 피부, 대장 등의 여러 인체 암에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이이다. p53 유전자는 17번 염색체 단완(17p13.1)에 위치하고 약 20 kb 크기로 11개의 exon과 10개의 intron로 구성되었으며 세포의 비정상적 분열과 증식을 억제하고, 세포 자연사를 유도하며 DNA가 손상되었을 때에 이를 정상 복구하는 기능을 가진 종양억제 유전자이다. 이 종양억제 유전자의 돌연변이는 393개의 아미노산 서열 중 DNA 결합부위인 'Hot Spot'으로 불리는 codon 130~290번 사이인 exon 5~8에서 주로 관찰되며 점(point)돌연변이가 가장 흔하고, 삽입(addition), 결실(deletion), 대립인자의 부분적 또는 전체적 소실(LOH: Loss of heterozygosity) 등 다양한 형태를 통해서 p53 유전자의 양쪽대립인자를 불활성화 시킴으로서 p53의 기능을 억제한다.

또한 p53은 세포가 악성으로 전환되는 것을 보호하는 핵심적인 경로를 조절하고 있다. 그러나 많은 암에서 p53의 이러한 보호 작용은 작동하지 않게 된다. 이는 MDM2 단백질 과다 발현의 결과로서 MDM2 단백질은 p53의 전이활성(transactivation) 부위에 결합하여 이의 transcription을 활성화하는 능력을 차단하게 된다. 따라서 MDM2가 p53에 부착하는 것을 억제하는 것은 항암 치료의 한 접근법으로 제시되어왔으며, 최근 'Science'에서 MDM2-p53 상호작용에 대한 저분자량 길항제가 암세포에서 p53 신호경로를 활성화하여 생쥐에서 종양의 성장을 억제함을 보여주고 있다.

한편 유방암종에서도 p53 유전자의 돌연변이는 exon 5~8에서 약 40~60%로 보고되고 있다.¹⁻⁷

p53 유전자의 돌연변이를 직접염기서열(Direct sequencing)분석법으로 모든 검체를 다 확인하기에는 많은 시간과 경비가 필요하므로 여러 분자생물학적 진단을 통해서 돌연변이를 검출하는 방법을 사용한다.⁸⁻¹²

현재 RFLP(restriction fragment length polymorphism), ASO(allele specific oligonucleotide), DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis), PCR-SSCP(polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism), HA(heteroduplex analysis), CMC(chemical mismatch cleavage) 등의 여러 분자생물학적 방법이 사용되고 있으나 일반적으로 자동화 시스템이 아니기 때문에 많은 시간과 노동력이 소모되며 실험의 재현성이나 정확도에서 많은 차이를 보여 왔다.¹³⁻¹⁵

최근 단일 염기 다형성 연구에 많이 사용되어지고 있는 PCR-DHPLC(polymerase chain reaction - denaturing high performance liquid chromatography)는 1996년에 Underhill와 Oefner에 의해서 처음으로 보고되었으며 돌연변이를 검출할 부분적인 DHPLC 분석방법은 분석할 시료인 PCR 산물을 정제하지 않고도 분석이 가능하며 그리고 그 크기가 200~1000bp 정도에서도 95~100% 가까운 정확도를 나타낸다. 그리고 시료당 분석에 걸리는 시간이 5~7분 내외로 다량의 시료를 분석하는데 매우 유용한 방법이다.

최근에는 DHPLC 방법이 자궁경부암에서 p53 유전자의 돌연변이를 검출하는데 정확도 및 경제성 등이 뛰어나고, 많은 양의 샘플을 처리할 수 있는 우수한 방법으로 보고되고 있다.¹⁶⁻²¹

따라서 본 연구에서는 유방암에서 발생하는 p53 유전자의 돌연변이를 PCR-DHPLC방법으로 분석하고 최종적으로 자동염기서열분석기를 통해서 돌연변이 검출법의 효율성을 분석했다. 그리고 충전물이 다른 컬럼을 사용하여 충전물에 따른 분리능을 확인하였다. p53 유전자의 분자생물학적인 진단을 위하여 PCR-DHPLC방법을 이용하여 신속한 분석과 효과적인 자동화 검사방법을 개발 하여 질병 유전자 진단 및 치료에 관한 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

실험 및 방법

시료

본 연구에서는 단국대학교 병원에서 유방암으로 진

단 받고 수술 받은 환자의 조직 100개와 정상 조직 103개를 대상으로 하였다.

시약 및 기기

시약

조직에서 genomic DNA 추출에는 AccuPrep™ Genomic DNA Extraction Kit, PCR산물 정제에는 AccuPrep™ PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)을 사용하였고, *Taq*. polymerase (GeNet Bio, Korea)을 사용하였다. 전기영동의 agarose는 QA-Agarose™ (Q-bio gene, USA)을 이용하였다. DHPLC의 이동상으로 triethylammonium acetate (TEAA) (Transgenomic, USA)와 acetonitrile (ACN) (Merck, USA)을 사용하였다.

기기

DNA의 증폭은 GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)을 사용하였고, PCR 증폭물 확인은 Mupid-a (Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다. DHPLC는 WAVE® SYSTEM (Transgenomic, USA)를 사용해 돌연변이를 검출하였다.

실험방법

유방암 환자와 정상인 조직에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 원하는 부위를 증폭한 후 전기영동법과 돌연변이에 기초한 DHPLC법에 의해 p53 유전자 중 exon 5~8 일어나는 돌연변이를 검출하였다.

조직에서 genomic DNA의 추출

액체질소를 이용해 곱게 간 조직 25 mg을 1.5 mL 원심 분리 관에 proteinase K(20 mg/mL) 20 µL와 분해완충용액(lysis buffer - 0.5 M EDTA, 10% SDS, 1M Tris-HCl(pH 8.0))과 함께 넣고 56 °C에서 1~3 시간 반응시킨 후에 결합완충용액(binding buffer - 7 M Guanidine, 10% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)) 200 µL 넣고 72 °C에서 10분간 반응시켰다.

2 mL 시험관에 수집 컬럼(collection column)을 넣고 컬럼에 반응한 결합 완충용액을 옮긴 후 8000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 여과되어서 모아진 용액은 버리고 500 µL 세척완충용액(washing buffer - 70% Ethanol)으로 세척하였다. 이것을 다시 8000 rpm에서 1분간 원심 분리 후 여과되어서 모아진 용액을 버리는 작업을 두 번 하였다. 마지막으로 13,000 rpm에서 10초간 원심 분리하였다. 그리고 200 µL 용리완충용액(elution buffer- 1 M Tris-HCl, 0.5M EDTA, D.W)을 넣고 실온에서 1분간 반응하고 8000 rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 모아진 용액을 1.5 mL 마이크로 시험관에 옮긴 후 UV 분광광도계를 이용해 DNA의 농도를 측정하고 4 °C에 보관하거나, 장기간 보관하기 위해서는 -20 °C에 저장하였다.

중합효소연쇄반응 (PCR)

PCR primer set (Table 1)을 이용하여 25 µL의 PCR 반응 용액(reaction solution)을 0.2 mL PCR 반응 시험관에 넣은 후, DNA thermal cycler(Bioneer, MyGene 32 thermal block, Korea)를 이용해서 우선 94 °C에서 5분간 주형 DNA를 완전히 변성시킨 후(hot start) 다시 94 °C에서 45초간 변성(denaturation), 57 °C에서 45초간 결합(annealing), 72 °C에서 50초간 신장(extension) 단계를 35회 반복한 후 마지막으로 72 °C에서 5분간 신장(last extension)시켜 DNA를 증폭시켰다.

2 mL 마이크로 시험관에 결합 컬럼(binding column)을 장치한 후 PCR 산물과 PB(PCR buffer)을 1:5 비율로 섞어 결합 컬럼 시험관에 옮겨 1분간 원심 분리한다. 결합 컬럼을 분리하여 새로운 2 mL 시험관에 결합하고 세척 완충용액을 750 µL를 넣고 원심 분리한 후 다시 결합 컬럼을 분리하여 1.5 mL 시험관에 장치하고 용리완충용액 30 µL를 결합 컬럼 시험관에 넣어 1분간 상온에 방치 후 1분간 원심 분리하여 DNA를 회수한다.

Table 1. Primer sequence used to amplify p53 gene

Exon	Sequence of primers	Size of fragment (bp)	Location (bp)
	Sense (5'→3') Antisense (3'→5')		
5	CTCTTCCTACAGTACTCCCTGCGCCCCAGCTGCTCACCATCGCTA	211	13043~13253
6	GATTGCTCTTAGGTCTGGCCCCCTCGGCCACTGACAACCAACCCCTTAACC	182	13308~13489
7	GTGTTATCTCCTAGGTTGGCTCTG CAAGTGGCTCCTGACCTGGAGTC	139	13986~14124
8	ACCTGATTTCCTTACTGCCTCTGGC GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGT	200	14404~14603

PCR-DHPLC 방법에 의한 단일 염기 다형성 검출

PCR 산물을 정제 과정을 거치지 않고 곧바로 돌연변이에 기초한 DHPLC 방법으로 단일 염기 다형성을 검출하였다. 컬럼의 재현성과 완충용액 이동상의 상태를 확인하기 위해 mutant standard(Trangenomic, USA)를 5 μ L씩 3번 주입하여 분석하였다. 이 후 PCR 산물을 0.9 mL/min의 이동상의 속도로 하여 5 μ L 주입해 WAVEMAKER™ software에 의해 정해진 gradient 조건으로 분석하였고 UV 검출기로 260 nm에서 검출하였다.

컬럼 충전물질 의한 단일 염기 다형성 검출

PCR-DHPLC 방법에 따라 분석된 돌연변이 샘플을 C18 컬럼을 사용하여 다시 한번 분석하였다. 실험 방법은 PCR-DHPLC 방법과 동일하게 사용하였다.

결과 및 고찰**PS-DVB 컬럼과 C18 컬럼에 의한 단일 염기 다형성 검출**

DHPLC 분석방법은 IP-RPC(ion pair reversed phase chromatography) 방식을 이용한다. PCR방법에 의해 증폭된 이중가닥의 DNA를 완전히 변성시켰다가 다시 천천히 식혔을 때 형성되는 이형접합체(heteroduplex)가 동형접합체(homoduplex)보다 zolumn에서 머무름

시간이 더 짧아지는 점을 이용하여 단하나의 염기서열의 삽입, 제거 그리고 치환형태의 돌연변이까지 검출할 수 있다(Fig. 1).

PS-DVB(poly styrene - divinylbenzene) 컬럼은 양친매성으로 TEAA(triethylammonium acetate)가 컬럼 표면에 결합하여 양이온을 띄고 DNA의 인산기와 결합하여 ion pairing 상태를 만든다. 그런 다음 TEAA 보다 DNA와 결합력이 더 강한 유기용매인 ACN(acetonitrile)에 의해서 컬럼으로부터 분리된다. 또한 열에 강한 polymer 형태이기 때문에 높은 온도에서도 안정한 구조를 유지할 수 있다. 반면에 C18 컬럼은 높은 온도에서 불안정한 구조를 이루기 때문에 DNA와의 결합력이 약해져 효과적으로 돌연변이를 검출할 수 없다(Fig. 2).

PCR-DHPLC 의한 단일 염기 다형성 검출

DHPLC 분석법은 DNA 돌연변이를 검출하거나 정제하는 새로운 방법으로 PCR 산물이나 RFLP 산물을 정제하지 않고 바로 분석할 수 있으며 시료 하나당 10분이면 분석이 가능하고 분석 과정을 실시간으로 확인할 수 있기 때문에 노동력과 시간을 절약할 수 있다. 또한 모든 실험 과정이 자동화되어 있어 분석 결과의 재현성이 뛰어나다.

정제 과정을 거치지 않은 PCR 산물을 자동 시료 주입기(auto sampler)에 장착하면 syringe에 의해 컬럼

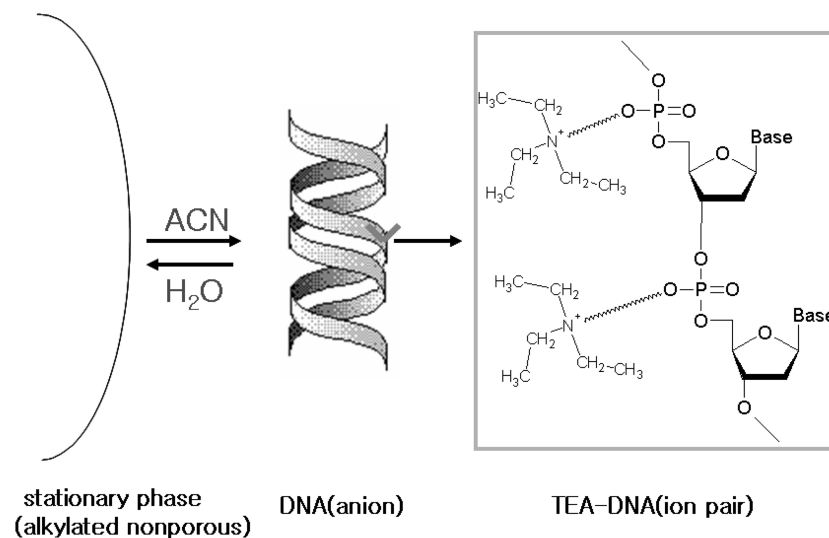


Fig. 1. Process of the separation of DNA by ion pair reversed-phase liquid chromatography on a special column.

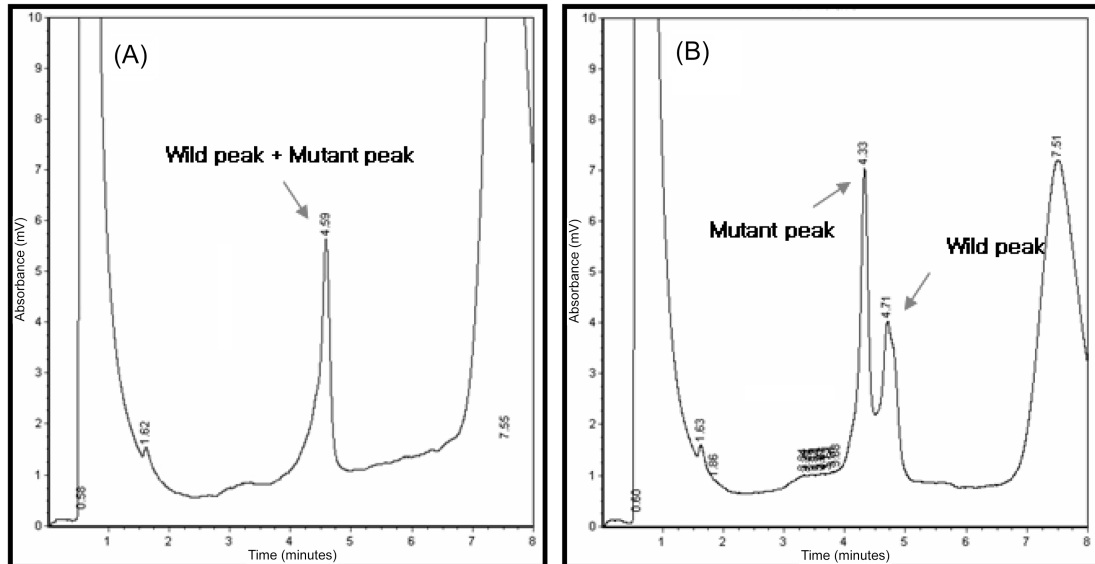


Fig. 2. Impact of column on the resolution of heteroduplex. (A) C18 column (B) PS-DVB column.

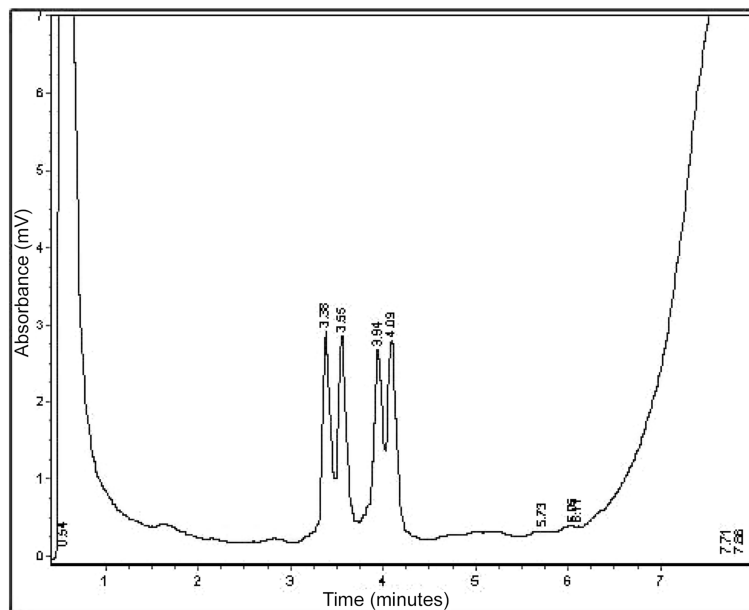


Fig. 3. Chromatograms produced by DHPLC analysis of wild mutant standard.

으로 주입되어 적절한 이동상의 gradient로 분리하면 DNA 단편의 돌연변이 유무에 의해 단일 염기 다형성을 검출할 수 있다.

우선 컬럼의 재현성과 이동상 완충용액의 상태를 확인하기 위해서 mutant standard를 5 μ L씩 3번 주입

하여 분석하였다(Fig. 3). 다음으로 PCR 산물을 5 μ L 주입하여 단일 피크와 돌연변이 피크로 나오는지 확인하였다(Fig. 4, 5). 100개의 유방암 PCR 산물을 5 μ L씩 주입하여 분석한 결과 exon 5에서 11개(11%), exon 8에서 42개(42%)를 확인하였다. 103개의 정상 조직에

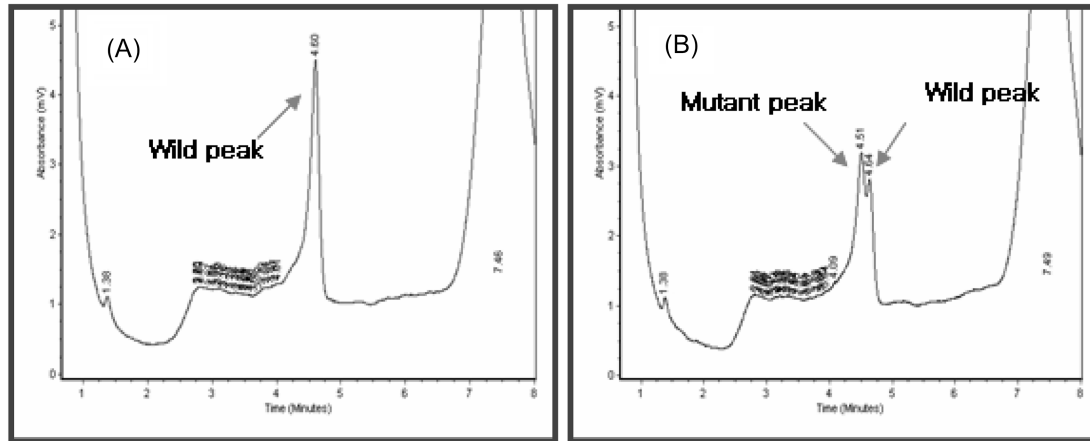


Fig. 4. Chromatograms produced DHPLC analysis of wild type (A) and mutant type (B) in breast cancer exon 5.

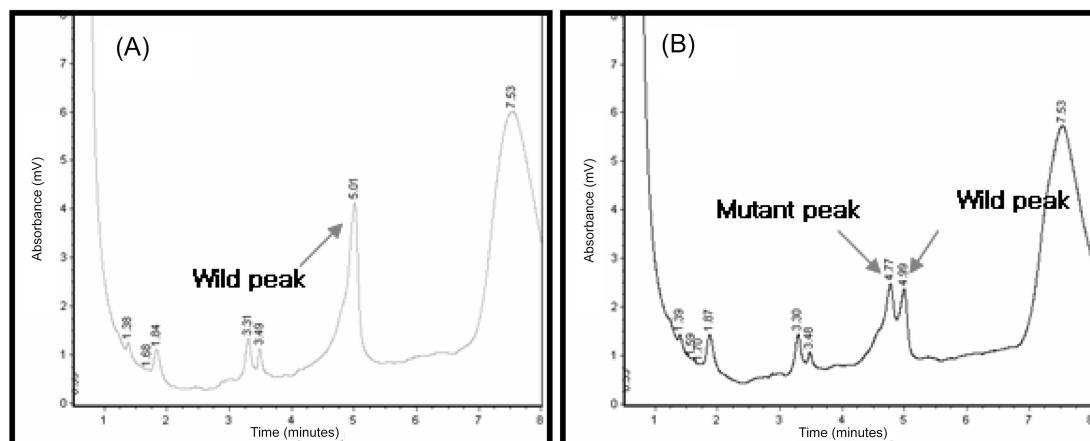


Fig. 5. Chromatograms produced DHPLC analysis of wild type (A) and mutant type (B) in breast cancer exon 8.

Table 2. Distribution of the two genotypes(C/A and T del) between healthy controls and cancer patients

Samples	Genotypes (%)	
	Exon 5(C/A)	Exon 8(T del)
Cancer patients (100)	11 (11%)	42 (42%)
Healthy controls (103)	2 (1.9%)	9 (8.7%)

서 exon 5에서 2개(2.9%), exon 8에서 9개(8.7%)의 polymorphism을 확인하였다(Table 2). 결과의 정확성을 판단하기 위해 direct sequencing을 통해 최종 확인하였다(Fig. 6, 7). 이와 같은 결과는 PCR-DHPLC로 분석한 결과와 동일함을 보였다.

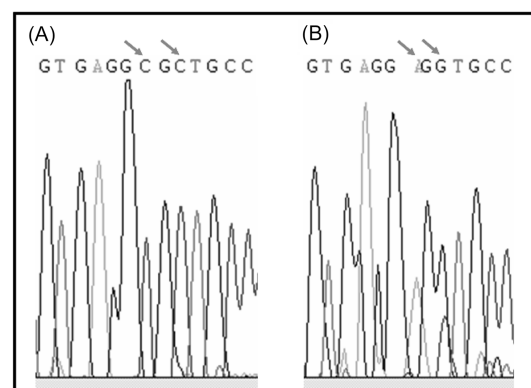


Fig. 6. Automatic sequencing analysis of exon 5 in breast cancer. (A) wild type, (B) mutant type (C13202>A, C13204>G).

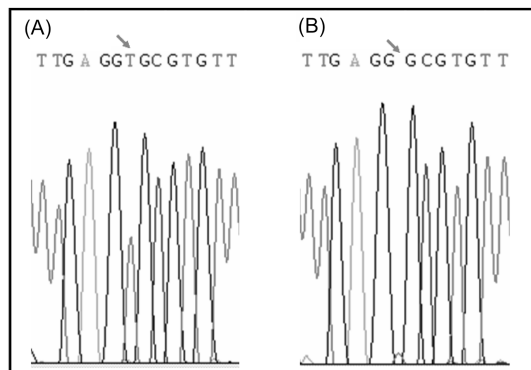


Fig. 7. Automatic sequencing analysis of exon 8 in breast cancer. (A) wild type, (B) mutant type (14484 del T).

결 론

100개의 유방암과 103개의 정상 조직을 대상으로 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용해 분석하고자 하는 부위의 DNA 단편을 증폭하고, 돌연변이에 기초한 PCR-DHPLC로 확인하는 방법으로 p53 유전자의 exon 5에서 exon 8까지 단일염기 다형성을 검출하였다. 그 결과 유방암조직에서는 exon 5에서 11개(11%)의 C/A, C/G의 C13202>A, C13204>G genotype을, exon 8에서 42개(42%)의 14484 del T genotype을 확인하였다. 103개의 정상 조직에서는 exon 5에서 2개(1.9%), exon 8에서 9개(8.7%)의 단일 염기 다형성을 검출하였다.

또한 컬럼의 충전물과 DNA와의 결합에 따라서 분리능이 다르게 나타날 수 있다는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 사용되는 C18 컬럼은 DNA분석에 적합하지 않다는 것이 실험을 통해 나타났다.

본 연구를 통하여 p53 유전자의 단일 염기 다형성은 유방암뿐만 아니라 여러 종류의 인체암에서 발생하기 때문에 환자의 예후 관찰에 있어서 보다 빠르고 정확한 단일 염기 다형성 검출 도구로 PCR-DHPLC 분석 방법이 상당히 유용할 것으로 생각되며 향후 size detection, primer extension과 같은 새로운 단일 염기 다형성 검출 방법에 DHPLC를 도입하여 겔 상에서 판단하기 힘든 하나의 염기 크기 차이도 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 방법을 모색해야 할 것이다.

이 연구는 2005년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

인 용 문 헌

- Borresen-Dale, A.; *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 292.
- Runnebaum, I. B.; Nagarajan, M.; Bowman, M.; Soto, D.; Sukumar, S.; *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10657.
- Xiao, W. and Oefner P. J. *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 439.
- Skopek, T. R.; Glaab, W. E.; Monroe, J. J.; Kort K. L.; Schaefer, W. *Mutat. Res.* **1999**, *430*, 13.
- Oefner, P. J.; Bonn, G. K. *Amer. Lab.* **1994**, *26*, 28C.
- Jones, A. C.; Austin, J.; Hansen, N.; Hoogendoorn, B.; Oefner, P. J. Cheadle, J. P.; O'Donovan, M. C. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1133.
- T. Wagner, D. Stoppa-Lyonnet, E. Fleischmann, D. Muhr, S. Pages, T. Sandberg, V. Caux, R. Moslinger, G. Langbauer, A. Borg and P. J. Oefner, *Genomics* **1999**, *62*, 369.
- Ellis, L. A.; Taylor, C. F.; Taylor, G. R. *Hum. Mutat.* **2000**, *15*, 556.
- Takahashi, T.; Nau, M.; Chiba, M.; Birrer, M. J.; Rosenberg, R. K.; Vinocour, M.; Levitt, M.; Pass, H.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; *Science* **1989**, *246*, 491.
- Kim, J.; Takahashi, T.; Chiba, I.; Park, J. G.; Birrer, M. J.; Roh, J. K.; Lee, H.; Kim, J. P.; Minna, J. D.; Gazda, A. F.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *83*, 938.
- Coles, C.; Condie, A.; Chetty, U.; Steel, C. M.; Evans, H. J.; Prosser, J.; *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5291.
- Suspitsin, E. N.; Buslov, K. G.; Grigoriev, M. Y.; Ishutkina, J. G.; Ulibina, J. M.; Gorodinskaya, V. M.; et al.; *Int. J. Cancer* **2003**, *103*, 431.
- Papadakis, E. N.; Dokianakis, D. N.; Spandidos, D. A.; *Mol. Cell Biol. Res. Com.* **2000**, *3*, 389.
- Langerod, A.; Bukholm, I. R. K.; Bregard, A.; Lonning, P. E.; Andersen, T. I.; Rognum T. O.; et al.; *Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2002**, *11*, 1684.
- Sjalander, A.; Birgander, R.; Hallmans, G.; Cajander, S.; Lenner, P.; Athlin, L.; Beckman, G. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1313.
- D. Xie; X. O. Shu; Z. Deng; K. E. Wen. *J. Natl Cancer inst.* **2000**, *92*, 412.
- Ameyaw, M. M.; Tayeb, M.; Thornton, N.; Folyan, G.; Tariq, M.; Mobarek, A.; et al.; *J. Hum. Genet.* **2002**, *47*, 172.
- Keshava, C.; McCanlies, E.; Keshava, N.; Wolff, M.; Weston, A.; *Cancer Lett.* **2001**, *173*, 37.
- Aridome, K.; Tsutsui, J.; Takao, S.; Kadomatsu, K.; Ozawa, M.; Aikou, T.; Muramatsu, T. *Jpn. J. Cancer Res.* **1995**, *86*, 655.
- Cross, M.; Dexter, T. M. *Cell* **1991**, *64*, 271.
- Garver, Jr.; R. I.; Chan, C. S.; Mimer P. G. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1993**, *9*, 463.