

폐암 억제유전자 RRM1의 단일염기다형성 검사를 위한 PCR-RFLP법과 Real-Time PCR법의 유용성 비교

¹전남대학교 의과대학 의과학 연구소, ²내과학교실

정주연¹, 김미란¹, 손준광², 정종필², 오인재², 김규식², 김영철²

Comparison of PCR-RFLP and Real-Time PCR for Allelotyping of Single Nucleotide Polymorphisms of RRM1, a Lung Cancer Suppressor Gene

Ju-Yeon Jeong, M.S.¹, Mi-Ran Kim, M.S.¹, Jun-Gwang Son, M.D.², Jong-Pil Jung, M.D.², In-Jae Oh, M.D.², Kyu-Sik Kim, M.D.², Young-Chul Kim, M.D.²

¹Medical Science Laboratory, ²Department of Internal Medicine, Chonnam National University Medical School, Hwasun, Korea

Background: Single nucleotide polymorphisms (SNPs), which consist of a substitution of a single nucleotide pair, are the most abundant form of genetic variations occurring with a frequency of approximately 1 per 1000 base pairs. SNPs by themselves do not cause disease but can predispose humans to disease, modify the extent or severity of the disease or influence the drug response and treatment efficacy. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), particularly those within the regulatory regions of the genes often influence the expression levels and can modify the disease. Studies examining the associations between SNP and the disease outcome have provided valuable insight into the disease etiology and potential therapeutic intervention. Traditionally, the genotyping of SNPs has been carried out using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP), which is a low throughput technique not amenable for use in large-scale SNP studies. Recently, TaqMan real-time PCR chemistry was adapted for use in allelic discrimination assays. This study validated the accuracy and utility of real-time PCR technology for SNPs genotyping

Methods: The SNPs in promoter sequence (-37 and -524) of lung cancer suppressor gene, RRM1 (ribonucleotide reductase M1 subunit) with the genomic DNA samples of 89 subjects were genotyped using both real-time PCR and PCR-RFLP.

Results: The discordance rates were 2.2% (2 mismatches) in -37 and 16.3% (15 mismatches) in -524. Auto-direct sequencing of all the mismatched samples(17 cases) were in accord with the genotypes read by real-time PCR. In addition, 138 genomic DNAs were genotyped using real-time PCR in a duplicate manner (two separated assays). Ninety-eight percent of the samples showed concordance between the two assays.

Conclusion: Real-time PCR allelic discrimination assays are amenable to high-throughput genotyping and overcome many of the problematic features associated with PCR-RFLP. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 62: 406-416)

Key word : SNP, PCR-RFLP, Real-time PCR, RRM1.

서 론

단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)은 염색체가 갖고 있는 염기서열 중 개인편차를 나타내는 염기변이를 말한다¹. SNP는 일반적으로 한

염기쌍(single base-pair variation)의 차이로 관찰되고, DNA에 존재하는 다형성 중에서 가장 흔하게 존재한다. 사람의 유전자는 대략 1,000개의 염기마다 1개의 염기다형성이 나타나는데 질병에 대한 감수성과 치료제에 대한 효과가 달라지는 등의 개인편차가 있는 것은 SNP의 차이 때문이라고 추정된다²⁻⁴. SNP는 암⁵, 심장병⁶, 고혈압⁷ 등과 같은 다양한 질병과도 관련되며, 이는 아미노산을 생성하는 3개의 염기 중의 하나가 달라져 결국 기능이 다른 단백질이 생성됨으로써 치명적인 질병으로까지 연결되는 것이다. 이러한 이유 때문에 최근 질병과 관련된 SNP 연구도 활발하게 진행되고 있다⁸.

Address for correspondence: Young-Chul Kim, M.D.
Lung and Esophageal Cancer Clinic, Chonnam National University Medical School and Hwasun Hospital, 160 Ilsim-ri, Hwasun-gun, Jeonnam, 519-809, Korea.
Phone: 82-61-379-7614, FAX: 82-61-379-7628
E-mail: kyc0923@jnu.ac.kr
Received: Feb. 21. 2007
Accepted: May. 4. 2007

SNP 연구는 큰 집단을 대상으로 수행되므로 적은 비용으로 정확하게, 그리고 대용량(high throughput)으로 할 수 있는 시스템이 요구 된다. SNP를 검색하기 위한 일반적인 방법으로서 기존에는 제한효소 절단 양상으로 SNP 형태를 추정하는 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)⁹⁻¹¹방법이 많이 시행되어 왔으나 이는 시간적 소비와 비 특이적 PCR산물의 오염 가능성이 있는 단점이 있다. 이에 반해 real-time PCR(RT-PCR, TaqMan probe assay)¹²⁻¹⁴방법은 유전자 증폭을 시행한 후 모니터에 보여지는 형광물질 곡선을 통해 바로 유전자 다형성 조합을 예측할 수 있고 1회 유전자 증폭반응으로 72-96개 샘플의 결과를 한번에 확인할 수 있어 보다 빠르고 정확하게 SNP를 검색할 수 있는 방법이라 할 수 있겠다. 그러나 이는 고가의 장비와 특수하게 고안한 oligonucleotide를 사용해야 한다는 부담감으로 아직까지는 고전적인 방법인 PCR-RFLP법이 보통 사용되고 있다.

따라서 저자들은 본 연구를 통해 폐암 환자 227명의 말초혈액 백혈구로부터 얻은 genomic DNA를 대상으로 하여, promotor부위에 다형성이 존재하는 것으로 알려져 있는 RRM1(ribonucleotide reductase M1)¹⁵ 유전자의 -37, -524부위의 SNP 양상을 PCR-RFLP법과 RT-PCR법을 동시에 시행, 결과를 비교 분석해 봄으로써 유전자 다형성을 보다 쉽고 정확하게 검사할 수 있는 방법으로서 RT-PCR 방법의 효용성을 검증하여 보고자 하였다

연구재료 및 방법

1. 연구 재료

전남대학교 병원 호흡기내과에 내원한 폐암 환자들로부터 동의 하에 채취된 227명의 말초혈액을 이용하여 연구를 수행하였다.

2. 연구 방법

1) 말초 혈액에서 Genomic DNA 추출

말초 혈액 4 ml를 7.5% EDTA가 포함된 vacutainer(Becton Dickinson, Plymouth, UK)에 채취하여 15 ml polypropylen tube에 옮겨 담고 RBC lysis buffer(150 mM NH₄Cl, 20 mM Tris pH 8.0)를 넣은 후 37°C 진탕수조에서 20분간 반응시켰다. 이후 상온 3,500 rpm에서 20분간 원심분리 하여 침전물만 취하는 과정을 2회 반복하였다. 이렇게 얻은 침전물에 TEN buffer(10mM Tris, 10mM EDTA, 150mM NaCl) 1 ml를 가하여 잘 혼합한 다음, 3500 rpm에서 10분간 원심분리하고, 침전물만 다시 얻어 TEN buffer 375 μ l, 10% SDS 25 μ l, proteinase-K 10 mg/mL 10 μ l를 넣고 37°C 진탕수조에서 16시간 이상 반응시켰다. Eppendorf tube에 반응물을 옮기고 5M NaCl 160 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 다음 13,000 rpm으로 15 분간 원심분리 시켰다. 다음으로 상층액을 취하여 다른 eppendorf tube에 옮겨 담고 2배 부피의 100% alcohol을 넣어 잘 흔든 후, DNA 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 다른 eppendorf tube에 옮겨 담고, 70% ethanol 400 μ l를 가한 후 가볍게 흔들어 준 다음 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 버리고 37°C heat block에서 5분간 건조시킨 후 TE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA) 300 μ l를 첨가하여 37°C에서 16시간 이상 용해시켰다. NanoDrop으로 DNA 농도를 측정하고 PCR용으로 5 ng/ μ l 농도를 만들어 냉동 보관한 후 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 시행하였다.

2) PCR - RFLP

(1) 중합효소 연쇄반응에 의한 유전자와 증폭(PCR)

Promoter 부위에 다형성염기가 존재한다고 보고되어져 있는 RRM1 유전자의 염기서열을 GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)로부터 얻은 후, 다형성을 보이는 염기서열 위치 -37(Genebank accession number AF107045의 1038 위치)부위를 포함하는 primer와 -524(Genebank accession number AF107045의 551 위치)부위를 포함하는 primer를 primer-3 프로그램으로 각각 디자인하여 주문 제작하고 중합효소 연쇄반응(PCR)에 이용하였다. Primer의 염기서열은 Table 1과 같다. 유전자 증폭은 Perkin Elmer 2400

Table 1. Primer sequences for PCR-RFLP of -37 and -524 SNP* of RRM1† gene

SNP	Primer Sequence
- 37	F : 5'— GGTCT TGCCC AGACT CAACA — 3' R : 5'— CTGCT CAGGG GAAAG AACTG — 3'
- 524	F : 5' — ATACC CTGTC TCTGC CACCA — 3' R : 5' — CTTT AGATC GGCCA GAGGA — 3'

F: Forward; R: Reverse.

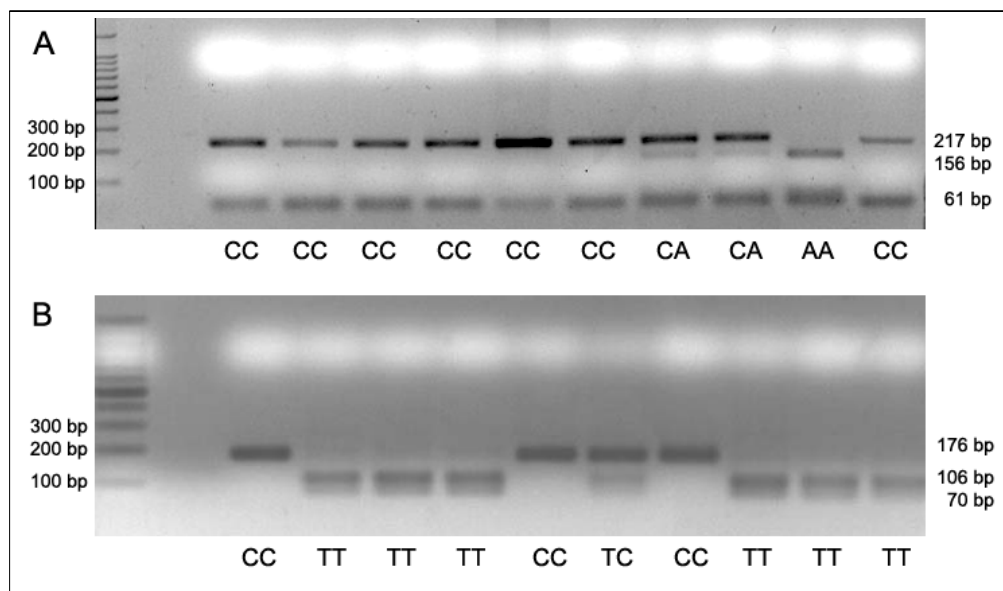
*SNP: single nucleotide polymorphism, † RRM1: ribonucleotide reductase M1.

thermal cycler(Norwalk, CT)를 이용해 시행하였으며, 반응성분은 1U의 Taq DNA polymerase(Super BIO Co. Ltd)와 함께 40 ng의 genomic DNA, 800 uM의 dNTP, 200 nM 각각의 primer, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl로 하여 총 반응액을 20 μ l로 하였다. 두 쌍의 primer 모두 각각 94°C에서 5분간 denature 시킨 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 간 반응하는 온도 순환을 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분간 유지 후 4°C로 냉각시켰다. PCR 과정이

끝난 후, 증폭산물은 2% agarose gel 내에서 전기영동을 시행하여 증폭 여부를 확인하였다.

(2) 제한효소 처리(Enzyme digestion)

중합효소 연쇄반응에 의해 증폭되는 염기구조를 www.neb.com의 제한효소 search program에 입력한 후 -37과 -524부위를 한번씩만 절단하는 제한효소를 찾았다. RRM1 -37번째 염기는 C/A 다형성을 보이는 위치로써 이는 제한효소 Bbs I 으로 구분될 수 있는데 이 효소는 GAAGACNN(NNNN) 염기배열을 읽어서 절단한다. 또한 -524의 경우는 T/C 다형성을 보이는 위치로써 이는 제한효소 Apo I 으로 구분될 수 있는데, 이 효소는 (A or G) + AATTY + (C or T) 염기배열을 읽어서 절단한다. RRM1 -37유전자는 10 μ l의 PCR 증폭산물에 10U Bbs I 제한효소를 첨가하여 37°C에서 16시간 이상 반응시켰으며, -524유전자는 10U Apo I 제한효소를 10 μ l의 PCR 증폭산물에 첨가하여 50°C에서 2시간 이상 반응시켰다. 제한효소 반응 후 2% agarose gel 내에서 전기영동을 시행하여 제한 효소에 의해 분절된 DNA의 크기를 확인함으로써 다

**Figure 1.** Allelotyping of RRM1 by restriction enzyme digestion.

(A) RRM1-37 C/A polymorphism. Restriction enzyme Bbs I cuts when -37 base is A. Homozygous A allele type (lane 3 from left shows complete digestion into 156 bp bands. Homozygous C allele type (lane 4 and 7) have original 217 bp bands only without digestion. The primer dimers are seen in all the lanes that are barely distinguishable from 61 bp bands in lanes with CA or AA. (B) RRM1 -524 T/C polymorphism. Restriction enzyme Apo I cuts when -524 base is T. Homozygous T allelotype (lane 2, 5 and 6 from left) shows complete digestion into 70 bp bands. Homozygous C allele type (lane 3 and 4) have original 176 bp bands only without digestion.

Table 2. Primer and probe sequences for real-time PCR of -37 and -524 SNP of RRM1 gene

SNP	Substitution	Oligo	Sequence 5'→3' (fluorophore/quencher)
-37	C→A	Probe- C	(6-FAM)-TGTGAAGCCTACCCCG-(3BHQ)*
		Probe- A	(HEX)-TCTGTGAAGACTACCCC-(3BHQ)
		Primer- F	CTTGCCAGACTCAACAT
		Primer- R	CCAGACAGCACTTTCTTCAG
-524	T→C	Probe- T	(6-FAM)-AGAGAATTTTAAGCAGG-(3BHQ)
		Probe- C	(HEX)-AGAGGATTTTAAGCAGG-(3BHQ)
		Primer- F	TCCATCCTACCTCCACAAGG
		Primer- R	CGATGGCGTTTGGATTTTAT

*BHQ: black hole quencher.

형성의 종류에 의한 유전자형을 결정하였다(Figure 1).

3) 실시간 유전자 증폭(Real-time PCR)

Gene bank(<http://ncbi.nih.gov/>)로부터 얻은 -37, -524의 염기서열을 proligo(Paris, France)에 의뢰해, 유전자 증폭(RT-PCR)에 필요한 primer와 각각의 allele를 인식할 수 있는 primer사이의 SNP를 포함한 TaqMan probes를 디자인, 제작하고 RT-PCR에 의해 각각의 polymorphism을 확인하였다. RT-PCR에 이용한 primer와 probe는 Table 2와 같다. 유전자 증폭 반응액의 조성은 genomic DNA 10 ng에 0.5U Taq polymerase와 10x buffer 1 μ l, dNTP 200 μ M, 5pM Primer 각각 0.5 μ l씩, 2pM probe 0.1 μ l씩 첨가, 총 반응액을 10 μ l로 하였다. 95°C에서 5분간 denature시킨 후 95°C에서 10초, 64°C에서 30초간 반응하는 온도 순환조건을 40회 반복하였고, Roter-Gene 3000TM multiplex system(Corbett Research)를 이용해 수행하였으며, 결과 분석은 이에 상응하는 분석 프로그램(Roter-Gene software 6.0)으로 자동분석 하였다(Figure 2).

4) 염기서열 분석(Auto-direct sequencing)

증폭된 PCR 증폭산물을 Gene All PCR Purification kit(General Biosystem, Seoul, Korea)를 사용하여 정제한 다음 염기서열 분석에 이용하였다. Forward primer 1.6 pmol/ μ l 1 μ l, Big Dye Terminator

(ABI-version 3.1) 1 μ l, 정제된 PCR 증폭산물 1 μ l, 5x sequencing buffer 2 μ l, 멸균수 5 μ l로 총 반응액 10 μ l가 되도록 한 후 95°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분으로 구성된 순환조건을 25회 반응시킨 후 에탄올 침전과정을 통하여 반응물만을 정제하였다. 정제된 반응물을 건조시키고 formamide에 녹인 후 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer(PE Biosystems, Foster City, CA, USA)로 염기서열을 분석하였다(Figure 3).

5) 통계

RRM1 유전자의 다형성은 각각의 위치에서 allele들의 빈도가 Hardy-Weinberg equilibrium¹⁶을 따르는지 chi-square 검증으로 확인하였다.

결 과

1. PCR-RFLP

89예의 genomic DNA를 이용 RRM1 -37과 -524 유전자를 각각 PCR 증폭하였다. -37의 증폭산물 크기는 217 bp, -524의 크기는 176 bp이었다.

RRM1 -37번째 염기는 C/A 다형성을 보이는 위치이다. 전기영동에 의해 원하는 크기로 증폭되었는지 확인한 후, 남은 PCR 증폭산물에 10 U Bbs I을 처리하고 반응시킨 결과, -37위치에 C를 가지고 있는 검체는 절단되지 않고 217 bp가 그대로 관찰되었으며, A를 가지고 있는 검체는 156 + 61 bp로 절단된 형태

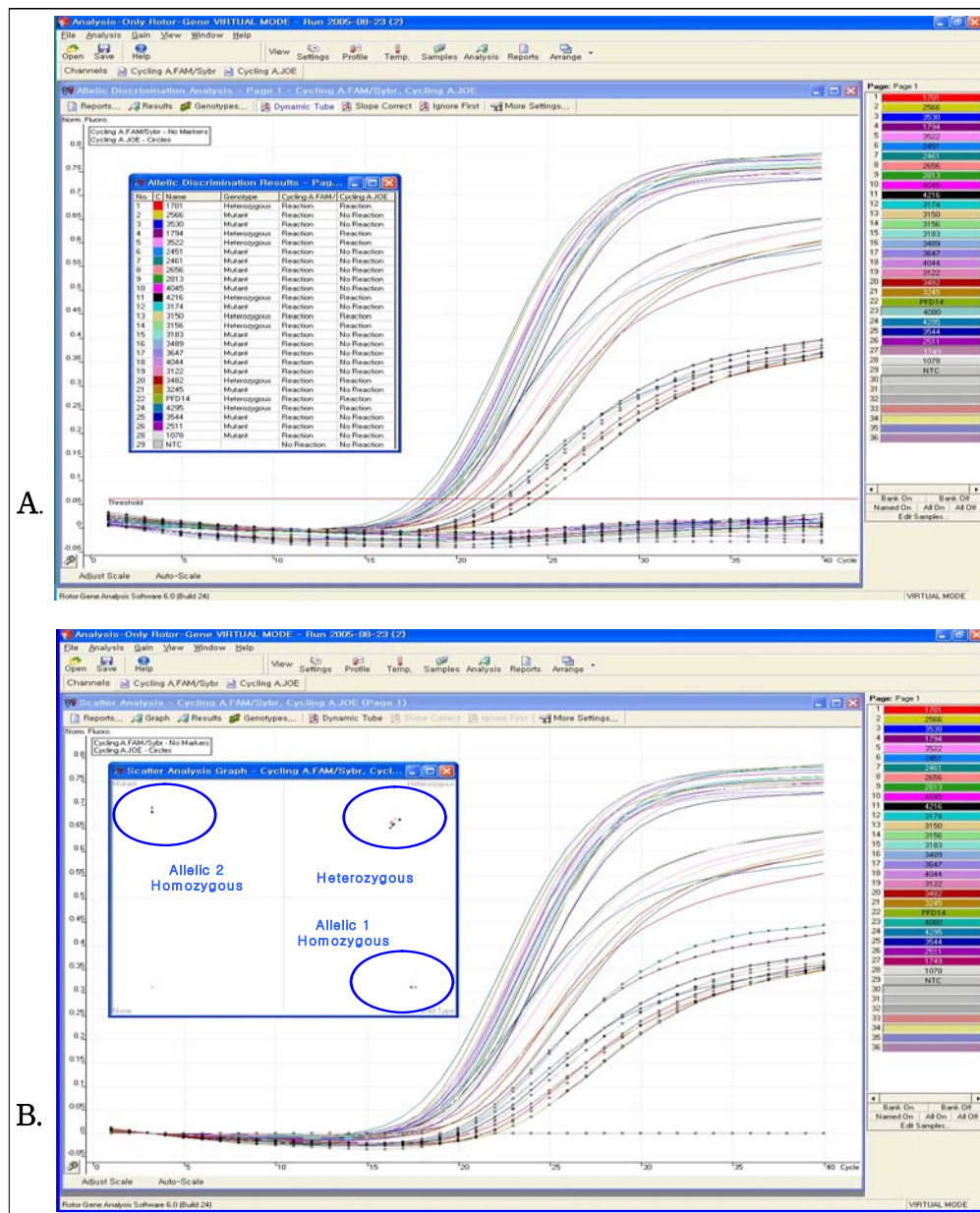


Figure 2. Allelotyping of RRM1 by real-time PCR (TaqMan probe assay) Allelic discrimination of genotyping by auto analysis software 6.0 program of Roter-Gene after RRM1 amplification. (A) genotype analysis result (B) scatter graph analysis result.

의 증폭산물이 2% agarose gel상에서 확인되었다 (Figure 1A). 또한 -524의 경우는 T/C 다형성을 보이는 위치로써 PCR 증폭산물에 10U Apo I을 처리한 후 반응시킨 결과 T를 가지고 있는 검체는 176 bp가 효소에 의해 절단되어 70 bp + 106 bp 크기 단편이 관찰되었고 C를 가지고 있는 검체는 절단되지 않은 176

bp band가 2% agarose gel상에서 확인되었다(Figure 1B). 대상 환자 89명에 대하여 RRM1의 유전자 다형성을 PCR-RFLP 방법으로 검색하여 본 결과 -37번째 염기는 CC (42), CA (39), AA (8) 이었고, -524번째 염기는 TT (45), TC (28), CC (16)이었다.

2. Real-time PCR

SNP를 확인하는데 있어 PCR-RFLP 방법으로 확인한 결과와 RT-PCR 방법을 통해 확인한 결과가 어느 정도 일치도를 보이는지 비교 분석해 보기위해 앞서 PCR-RFLP를 시행했던 동일 DNA 샘플 89예를 대상으로 RT-PCR을 시행하였다. 이는 유전자 증폭이 끝남과 동시에 별도의 처리과정 없이 모니터 상에서 바로 결과를 확인할 수 있었다. 샘플이 가지고 있는

Table 3. Comparison of allele frequency at -37 and -524 region of RRM1 gene between PCR-RFLP and RT-PCR. The results from RT-PCR were validated using Hardy-Weinberg equilibrium.

SNP	PCR-RFLP (n=89)	Real-time PCR (n=89)	Expected frequency
- 37			
CC	42	42	42.5
CA	39	39	38
AA	8	8	8.5
Error rate* = $2^{\dagger} / 89$ (2.24%) $\chi^2 = 0.03$, $p > 0.05$			
- 524			
TT	45	42	41.1
TC	28	37	38.7
CC	16	10	9.1
Error rate = $15 / 89$ (16.85%) $\chi^2 = 0.09$, $p > 0.05$			

*Errors / Total genotypes, \dagger Mismatched results of two samples were changed to CC→CA, CA→CC.

SNP조합형이 homo wild type이라면 FAM 형광곡선만 관찰되어지고 homo mutant type이라면 HEX 형광곡선만, hetero type 경우에는 FAM, HEX 형광곡선이 모두 관찰되었다. 각각의 샘플에 대한 형광물질이 나타내는 곡선의 양상을 통해 자동 분석프로그램의 genotype analysis 또는 scatter graph analysis로 SNP 조합형을 확인하고 PCR-RFLP 결과와 비교 분석하였다(Table 3)(Figure 2). 89예를 대상으로 RT-PCR을 통해 유전자 다형성을 조사하여 본 결과 -37염기위치에서는 CC (42), CA (39), AA (8) 이었고, -524는 TT (42), TC (37), CC (10)이었다.

3. PCR-RFLP: RT-PCR의 결과 비교

단일염기다형성을 확인하는데 있어 PCR-RFLP법을 통해 확인한 결과와 RT-PCR법을 통해 확인한 결과가 동일한 결과를 보이는지 살펴보기 위해 동일대상 89예를 대상으로 PCR-RFLP와 RT-PCR을 각각 시행한 후 확인된 결과를 비교해 보았다. 대상 DNA 89예 중 RRM1 -37에서는 2예(2.17%), -524에서는 15예(16.26%)가 다른 양상을 보였다(Table 3). -37에서 보였던 불일치 양상은 CA가 CC로, CC가 CA로 관찰되었고, -524에서는 CC→CA가 8예, CA→AA 5예,

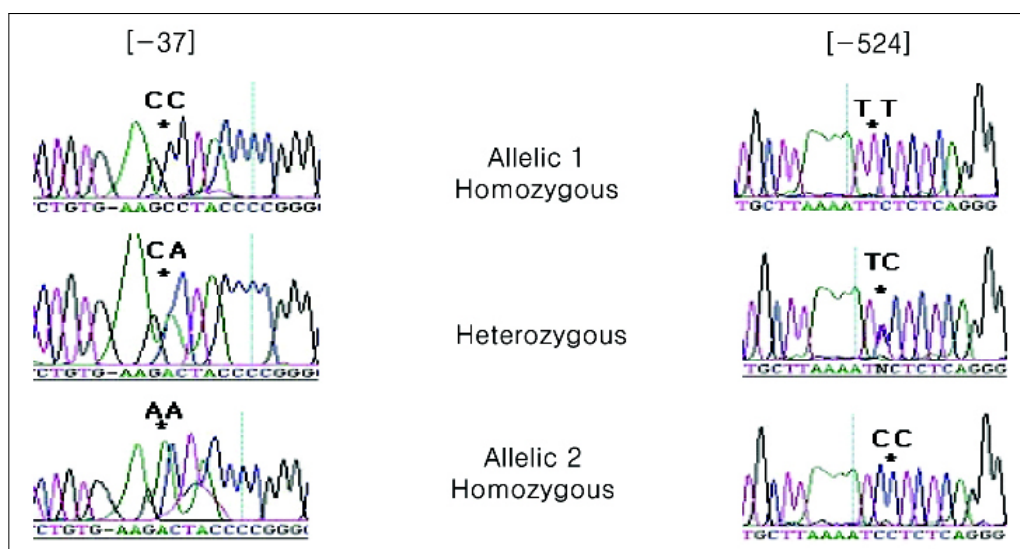


Figure 3. Allelotyping of RRM1 gene by auto-direct sequencing.

CC→AA, AA→CC가 각각 1예씩 확인되었다.

4. 염기서열 분석 결과

PCR-RFLP법에 의한 결과와 RT-PCR법에 의한 결과가 일치하지 않은 17예를 대상으로 정확한 유전자형 확인을 위해 자동 염기서열 분석을 시행하였다 (Figure 3). 결과 -37에서 불일치했었던 2예와 -524에서의 15예 모두 RT-PCR법에서 확인되었던 allele type과 일치하였다. PCR-RFLP법에서 보인 불일치 결과들은 많은 경우가 제한효소의 불완전한 절단에 의해서 생긴 결과였고 일부 샘플들은 template의 부분적인 오염이 있었던 것으로 사료되어 진다. 이로써 SNP양상을 확인하는 방법으로써, PCR-RFLP 결과 보다는 RT-PCR 결과가 보다 신뢰성 있음을 확인할 수 있었다.

5. 반복된 RT-PCR의 일치율

앞선 실험에서 RT-PCR법이 거의 100%에 가까운 정확도를 보였던 결과를 기반으로 해서 추가샘플 138예는 RT-PCR에 의해 allele type을 확인하였다. 1차, 대상 DNA 138예에 대한 결과를 확인하고 동일샘플을 대상으로 RT-PCR법을 재 반복 시행하여 결과를 비교하여 본 결과, 138예 중 -37은 2예에서, -524는 3

예에서만 다른 양상을 보여 98% 이상의 높은 일치율이 관찰 되었다(Table 4). -37에서 보였던 불일치 결과는 CC→CA, CA→CC 로 관찰되었으며, -524에서는 TC→TT 1예와 TT→TC 2예가 관찰되었다. 정확도를 한 번 더 검증하기 위해 불일치 결과를 보였던 샘플 5예와 일치 결과를 보였던 10예를 무작위로 선정하여 직접 염기서열을 실시하여 보았다. 결과 불일치 샘플들의 경우는 두 번째 시행한 결과와 모두 일치하였고 일치샘플들은 모두 이전 검사와 동일한 결과를 확인할 수 있었다(10/10=100%). RT-PCR에서 보인 오차율의 원인은 유전자 증폭과정에서의 차이는 없었으나 영상 분석과정에서 생긴 오류였음을 확인할 수 있었다. 따라서 증폭 곡선을 이용한 판독이 명확하지 않는 경우는 추가적인 검증이 필요하다 하겠다.

6. 통계

PCR-RFLP와 RT-PCR에 의해 확인되었던 결과를 Hardy-Weinberg 법칙에 적용시켜 보니 -37, -524 모두 $p>0.05$ 이상의 값을 보여 예상되는 allele의 빈도와 검사결과가 일치함을 알 수 있었다(Table 3, 4).

고 찰

Single nucleotide polymorphism(SNP)이란 우리말로 단일염기변이 또는 단일염기다형성이라고 표현할 수 있는데¹, 최근 이를 이용한 질병 유전체 접근방법이 큰 관심의 대상이 되고 있다. 이는 mutation과는 다른 의미를 가지는 것으로 1000 염기마다 한번 꼴로 일어나는 가장 일반적인 형태의 염기서열 변이의 유형을 말한다. SNP의 유전학적 정의로는 집단 내에서 가장 적은 빈도를 보이는 single base allele의 빈도가 최소 1% 이상 관찰되는 염기 다형성(polymorphism)이라고 할 수 있다. 인간의 유전체에는 수백만 개의 SNP가 존재한다. 즉, 각 개인이 갖고 있는 유전자 전체는 약 30억 개의 염기로 구성되어 있는데 이 중에서 매 1000개 염기마다 하나의 단일염기다형성을 보이고 있다. 같은 질병이라고 해도 질병방생의 감수성이나 치료에 대한 효과 등 개인편차가 있는 것은 모두 이러

Table 4. Comparison of allele frequency at -37 and -524 region of RRM1 gene in duplicated RT-PCR experiments. The results from RT-PCR were validated using hardy-weinberg equilibrium.

SNP	RT-PCR-1st (n=138)	RT-PCR-2nd (n=138)	Expected frequency
- 37			
CC	85	85	86.1
CA	48	48	41.8
AA	5	5	6.1
Error rate* = $2\ddagger / 138$ (1.4%) $\chi^2 = 0.17$, $p > 0.05$			
- 524			
TT	87	86	86.8
TC	46	47	45.2
CC	5	5	5.8
Error rate = $3\ddagger / 138$ (2.1%) $\chi^2 = 0.09$, $p > 0.05$			

*Errors / Total genotypes, † Mismatched results of two samples were CC→CA and CA→CC, ‡ Mismatched results of three samples were TC→ TT, TT→ TC and TT→TC.

한 SNP 차이 때문이다^{2-4,17-19}. SNP는 2, 3, 4개의 대립인자를 가질 수 있다. 하지만 사람의 경우 거의 모든 SNP는 {C,T} 혹은 {C,G}와 같은 bi-allelic polymorphism만을 보이고 있어서 bi-allelic polymorphism의 하나로 간주 되고 있다. 3개의 염기는 한 개의 아미노산을 만들고 몇 개의 아미노산이 결합해 단백질을 만들게 되는데, 염기에 변이가 생기게 되면, 변이된 염기가 변형된 아미노산을 만들게 되므로 단백질 기능의 변화가 생기며, 질병에 쉽게 노출될 수가 있다.

이와 같이 SNP가 특정 질병에 대한 개인적 특이성이나, 약물에 대한 의학적 반응도에 있어서 개인적 차이를 나타내는 것과 관련하여, 유전적 변이를 찾아내는 중요한 자료가 될 수 있다. SNP로 인하여, 가까운 장래에 암⁵이나, 심혈관질환⁶, 자가면역증²⁰, 천식²¹, 고혈압⁷ 등과 같은 복합적인 질병에 대한 유전적인 기전을 확인할 수 있게 될 가능성도 크다. 또한, 최근에는 약물 투여에 대한 부작용이나 효과가 유전자의 조절과 밀접한 관계가 있다는 것이 알려지면서, DNA 염기서열 정보를 이용하여 특정 의약품이 환자에게 효과가 있는지, 아니면 부작용으로 고통을 받을지, 심지어는 적절한 투여량을 결정할 수 있는지에 대하여 알 수 있을 것이라는 가능성 또한 많은 연구자들에게 새로운 관심을 불러일으키고 있다¹⁷⁻¹⁹.

이러한 것이 가능하기 위해서는 SNP 분석을 적은 비용으로 정확하게 그리고 대용량으로 분석할 수 있는 방법이 필요하다. 주요 SNP 연구를 위한 방법으로 기존에는 PCR-RFLP⁹⁻¹¹법을 많이 시행해 왔었다. 그러나 최근에는 대량의 검체를 신속하게 검사하기 위해 OLA genotyping²²방법, Mass spectrometry²³를 이용하는 방법, DNA microarray genotyping²⁴, DASH 방법²⁵, pyrosequencing²⁶방법, RT-PCR¹²⁻¹⁴방법 등 여러 가지 새로운 기술들이 많이 개발되어 시행되어지고 있다. 이들 중, 본 연구에서는 기존부터 여러 실험실에서 많이 수행해 왔던 PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)법과 최근에 사용 증가추세를 보이고 있는 RT-PCR(TaqMan probe assay)법을 비교하였다. 동일 샘플을 대상으로 두 방법을 각각 시행한 후 확인되

어진 결과를 비교해 봄으로써 정확성과 유용성을 살펴보고자 하였다. 염기서열분석은 직접 해독하는 direct sequencing 방법이 가장 정확하지만 이는 다소 복잡하고 시간이 많이 걸리는 방법이기에 최종확인을 위한 방법으로만 사용을 하였다.

PCR-RFLP방법은 개체마다 차이를 보일 수 있는 polymorphic한 restriction site를 특정 제한효소로 절단한 후 전기영동 상에서 관찰되어지는 절편의 양상으로 allele type을 확인하는 방법이다. 반면 RT-PCR법은 5' nuclease assays 원리를 이용하여 형광물질이 나타내는 곡선을 통해 별도의 전기영동 과정을 거치지 않고 한번에 정확한 genotyping을 하는 방법이다.

RT-PCR은 mRNA을 볼 수 있을 뿐만 아니라 DNA를 증폭하면서 실시간으로 SNP 양상을 확인할 수 있는 방법도 제공한다. SNP에 따라 각기 다른 색을 발광하도록 제작된 TaqMan probe는 SNP를 포함한 target의 고유 염기서열이므로 allele type에 따라 specific하게 결합한다. 각각의 샘플이 가지고 있는 SNP 조합양상에 따라 특정 probe만이 PCR에 반응을 하고, 이후 형성된 고유의 형광값을 정량하여 allele type을 구별하게 된다. 하나의 SNP를 genotyping하기 위해서는 각기 다른 fluorescent dye을 가지고 있는 두 종류의 probe가 필요하다. 각 probe의 5'끝에는 reporter fluorescent dye가 있고 다른 한끝에는 quencher dye가 있어 PCR 반응이 없으면 quencher dye에 의해 형광이 억제되고 PCR이 진행될 때에만 reporter fluorescent dye가 probe로부터 분리되면서, quencher dye로부터 멀어지게 됨으로써 고유의 형광값을 내게 되어, 이를 정량하여 allele type을 구별하게 된다.

환자 말초혈액으로부터 얻은 genomic DNA 89예를 대상으로 폐암 억제유전자인 RRMI(ribonucleotide reductase M1)의 -37, -524부위에 존재하는 SNP 양상을 PCR-RFLP와 RT-PCR을 동시에 시행하여 결과를 비교 분석하여 본 결과 19.1% 다른 결과 값을 얻었고 이를 대상으로 직접 염기서열 분석을 통해 확인한 결과 서로 상이한 결과를 보였던 검체들은 모두 RT-PCR법에 의해 확인되었던 유전자형인 것을 확인할 수 있었다. PCR-RFLP법의 오차율이 다소 높게

관찰되어진 이유는 아마도 제한효소 처리단계에서 enzyme의 첨가량 부족, 또는 반응시간이 충분치 않았거나 온도조건의 부적합, 보관과정에서의 enzyme의 activity감소 등의 원인으로 PCR 증폭산물이 불완전하게 절단되어 allele type이 잘못 판단되어진 것으로 사료되어 진다. 또한 제한효소 절단에 의해 생성된 100 bp이하 크기의 작은 단편들은 primer dimer와 비슷한 위치에 존재하고 있어서 명확하게 구별하기가 어려웠다. 본 연구에서는 RT-PCR법이 비교적 정확성을 보인 결과를 근거로 해서 추가대상 138예를 RT-PCR법을 통해 2회 반복 시행한 후 결과를 비교해 본 결과 역시 98%이상의 높은 정확도를 확인할 수 있었다.

이와 같은 결과를 고려해 볼 때, SNP(단일염기다형성)를 확인하는데 있어 RT-PCR법은 98%이상의 높은 정확도를 확인할 수 있었으며, in-tube assay 방식으로 샘플의 오염을 최소화 할 수 있었고 72well based system(Corbett Research)을 이용함으로 다량의 SNP분석을 정확하고 빠르게 진행할 수 있었다. 게다가 결과가 연구자가 보기 쉬운 그래프 형식으로 출력되므로 쉽게 분석이 가능한 장점도 있었다.

RT-PCR법은 빠르고 간편하고 정확하게 판독이 가능한 장점이 있지만, 제작된 probe를 이용하여 실험조건을 맞추는 초기에 세밀한 조절이 필요하다. Primer의 annealing temperature만 잘 잡아주면 되는 PCR과 달리 RT-PCR은 primer와 probe 모두가 만족할 수 있는 온도 조건을 잡아 주어야 하는 점과 두 형광의 신호가 중복되지 않게 농도를 잘 조절해서 PCR 조건을 결정해야 하는 까다로움도 있다. 만약 제작된 probe로 적절한 조건이 잘 잡히지 않아 다시 probe 제작을 요하는 상황이 된다면 probe 제작 비용의 중복 투자를 감수해야 한다는 부담도 있다.

여러 SNP를 동시에 검사하는 복합검사는 많게는 6개의 SNP까지 한번 반응으로 확인할 수 있다고 한다. 그러나 현실적으로는 모두 만족할 만한 annealing temperature를 설정하는 것이 쉽지 않으므로 보통 2개 정도의 SNP까지는 동시에 검색할 수 있다고 판단된다.

비용효과면에서 두 가지 방법을 비교할 필요도 있

겠는데, RT-PCR과 PCR-RFLP를 업체에 의뢰하지 않고, 본교실의 실험실에서 시행한 것이므로 정확한 비용의 비교는 어려웠다. 또한 단순한 시약 및 probe 제작비 뿐만 아니라 실험자의 노동력, 투자해야 하는 시간을 모두 감안하여야 하므로 비용효과를 비교하기는 어려웠다.

그러나 검체의 수가 많아질수록 RT-PCR이 더 유리할 것임은 알 수 있었다. RT-PCR은 probe를 필요한 양만큼 제작하여 실험조건을 잡은 후에는 추가적으로 필요한 시약이나 투자해야 하는 시간과 노동력이 적은 반면에 PCR-RFLP는 초기 투자비용은 낮지만 검체의 수가 많아질수록 막대한 시간과 노동력 그리고 제한효소 등의 비용이 지속적으로 발생되기 때문이다. 따라서 연구용으로 소수의 검체만을 검사하는 경우에는 PCR-RFLP가 비용효과 면에서 유리하지만 많은 임상 검체들의 검사에 사용되게 된다면 RT-PCR이 비용 효과 면에서 유리하다고 판단된다.

요 약

연구배경: 단일염기다형성(Single nucleotide polymorphism, SNP)은 인간의 유전자 서열 1000염기에 1개 빈도로 발견되어 인간은 대략 300만개의 유전자 다형성을 가지고 있다. 이 유전자 다형성의 조합결과로 인간의 개체 간 특성들이 결정되는 것으로 이해되고 있다. 이러한 다형성들의 조합양상에 따라 특이 질환에 대한 유전자 감수성 또한 달라지게 되므로 최근에는 많은 질환들과 유전자 다형성들과의 상관관계를 보는 연구들도 활발하게 진행되고 있다. 이러한 SNP 분석은 큰 집단을 대상으로 진행되어 지므로 적은 비용으로 정확하게 그리고 대용량으로 분석할 수 있는 방법이 필요하다.

방 법: 대상 환자 89명의 genomic DNA를 가지고서 promotor상에 위치한 -37과 -524 염기부위에서 유전자 다형성을 보이는 것으로 보고되어져 있는 RRMI(ribonucleotide reductase M1) 유전자를 대상으로 PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)와 real-time PCR(RT-PCR, TaqMan probe assay)을 동시에 시행한 후 각

각의 결과를 비교 분석하였다.

결 과: 대상 DNA 89예 중 -37에서는 2예(2.17%), -524에서는 15예(16.26%)가 서로 다른 양상을 보였다. 결과 차이를 보인 샘플 17예를 대상으로 직접 염기서열 분석을 시행하여 본 결과, 17예 모두 RT-PCR에서 확인되었던 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 추가 샘플 138예를 대상으로 RT-PCR을 2회 연속 실행하여 genotyping을 해 본 결과 98%이상의 높은 일치율을 보였으며, 그중 10예를 무작위로 골라 직접 염기서열 분석을 시행하여 본 결과, 역시 100%일치, 높은 정확도를 보였고 이는 in-tube assay 방식으로 샘플의 오염을 최소화 할 수 있었으며 72 well based system(Corbett Research)을 이용함으로 1회 유전자 증폭반응을 통해 많은 검체를 한 번에 확인할 수 있어 매우 빠른 검사방법 이었다.

결 론: 큰 집단을 대상으로 다량의 SNP를 분석하기 위한 실험 방법으로는 RT-PCR이 신속하면서도 정확한 결과를 얻을 수 있는 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet* 2002;47:561-6.
- Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2001;12:930-42.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234:177-86.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998;8:1229-31.
- Knudson AG. Hereditary predisposition to cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1997;833:58-67.
- Ohnishi Y, Tanaka T, Yamada R, Suematsu K, Minami M, Fujii K, et al. Identification of 187 single nucleotide polymorphisms(SNPs)among 41 candidate genes for ischemic heart disease in the Japanese population. *Hum Genet* 2000;106:288-92.
- Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Matayoshi T, Inamoto N, Takiuchi S, et al. Association of genetic polymorphisms of ACADSB and COMT with human hypertension. *J Hypertens* 2006;25:103-10.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-7.
- Sousa MC, Morais JB, Machado JE, Piores-DA-Silva J. Genotyping of *Giardia lamblia* Human Isolates from Portugal by PCR-RFLP and Sequencing. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53:174-6.
- Hatzaki A, Razi E, Anagnostopoulou K, Iliadis K, Kodaxis A, Papaioannou D, et al. A modified mutagenic PCR-RFLP method for K-ras codon 12 and 13 mutations detection in NSCLC patients. *Mol Cell Probes* 2001;15:243-7.
- Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Baya A, Horiuchi R. A novel intronic mutation that may affect genotyping result of CYP2C8 by PCR-RFLP is strongly associated with CYP2C8*3 in a South American population. *J Hum Genet* 2006;52:195-9.
- Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Barros F. Duplication and deletion analysis by fluorescent real-time PCR-based genotyping. *Clin Chim Acta* 2006;363:138-46.
- Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta* 2006;363:32-47.
- Joneson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology. *Cytokine* 2004;27:135-41.
- Bepler G, Zheng Z, Gautam A, Sharma S, Cantor A, Sharma A, et al. Ribonucleotide reductase M1 gene promoter activity, polymorphisms, population frequencies, and clinical relevance. *Lung cancer* 2005;47: 183-92.
- Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Shibata Y, Murakami S, Shimada S. Identification of coding single nucleotide polymorphisms in human taste receptor genes involving bitter tasting. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:147-51.
- Shi MM. Technologies for individual genotyping: detection of genetic polymorphisms in drug targets and disease genes. *Am J Pharmacogenomics* 2002; 2:197-205.
- Abraham J, Earl HM, Pharoah PD, Caldas C. Pharmacogenetics of cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:168-83.
- Shi MM, Bleavins MR, de la Iglesia FA. Technologies for detecting genetic polymorphisms in pharmacogenomics. *Mol Diagn* 1999;4:343-51.
- Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, et al. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. *Immunol Rev* 2002;190:9-25.
- Palmer LJ, Cookson WO. Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma. *Respir Res* 2001;2:102-12.
- Iannone MA, Taylor JD, Chen J, Li MS, Rivers P,

- Slentz-Kesler KA, et al. Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* 2000;39:131-40.
23. Blievernicht JK, Schaeffeler E, Klein K, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of CYP2B6 single nucleotide polymorphisms. *Clin Chem* 2007;53: 24-33.
24. Podder M, Welch WJ, Zamar RH, Tebbutt SJ. Dynamic variable selection in SNP genotype auto-calling from APEX microarray data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:521.
25. Jobs M, Howell WM, Stromqvist L, Mayr T, Brookes AJ. DASH-2: flexible, low-cost, and high throughput SNP genotyping by dynamic allele-specific hybridization on membrane arrays. *Genome Res* 2003;13: 916-24.
26. Shen GO, Luo A, Wang OK. High-throughput single nucleotide polymorphisms genotyping: TaqMan assay and pyrosequencing assay. *Methods Mol Med* 2006;128:209-24.
-