

## 이종 조직에서 사람 유전자 검출을 위한 디지털 중합효소연쇄반응의 적용

### Application of Digital Polymerase Chain Reaction for Human Gene Detection in Heterologous Tissues

김진희

청주대학교 보건의료과학대학

Jin-Hee Kim

College of Health Science Cheongju University

#### 요약

디지털 중합효소연쇄반응(Digital PCR)은 3세대 PCR로 명명하며, 1세대인 일반 PCR과 2세대인 정량 PCR(Real-time PCR)의 단점을 보완하여 개발된 방법이다.

Digital PCR System은 소량의 PCR 반응을 10만개 이상의 반응통(wall)에 적재하는 방식의 나노유체칩에서 쪼개어 증폭시킨 후, target DNA를 계수한다. Target DNA의 증폭 여부에 따라 positive(1)와 negative(0)로 digital signal처럼 받아들여 계수하고, 포아송 분포를 통해 target DNA의 copy를 계산해 최종적으로 샘플 microlitr당 Copy수로 결과 값을 확인할 수 있다.

본 연구에서는 종(種)이 다른 동물의 조직이 서로 섞여있을 때 사람의 조직을 탐색하는 방법으로 유전자 증폭을 할 경우, digital PCR의 유효성에 대해 증명하였다.

## I. 서론

### 1. 디지털 PCR의 정의 및 원리

1세대 PCR 방식은 유전자 증폭 후 아가로스 젤을 이용한 전기영동을 통해 결과를 확인하였으며, 형광물질을 이용하여 검출목표 유전자의 증폭을 실시간 확인 할 수 있는 real-time PCR 방식인 2세대 PCR 방법으로 발전하였다. 반면 3세대 PCR 방식인 digital PCR 방법(이하 dPCR)은 표준물질 없이도 검출목표 유전자의 실시간 절대정량이 가능한 새로운 접근 방식의 PCR 방식이다[1-3].

검출 민감도가 높은 dPCR의 장점을 이용하여 다양한 범위에 응용이 가능하다. 첫째, 종양유전자 및 변이 유전자의 검출을 위한 rare allele 검출, 둘째, low level virus 정량, 셋째, 병원성 미생물 검출, 넷째, 유전자변형생물체(GMO, Genetically Modified Organism) 존재유무 검출, 다섯째, 특정 유전자 copy number 계산 (정량화), 여섯째, 차세대 염기서열 분석법(NGS, Next Generation Sequencing) library 정량 확인, 일곱째, 단일세포(single cell) 분석, 여덟째, 융합유전자(fusion gene) 분석 등이 있다[4].

## II. 본론

### 1. 실험방법

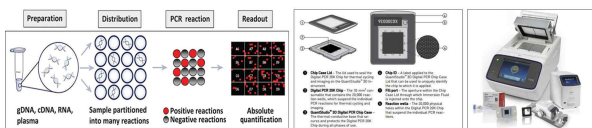
#### 1.1 핵산추출

핵산 추출은 핵산 추출 키트(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, cat. # 69506)를 이용하여 추출하였다. 실험 방법은 제조사의 매뉴얼을 따랐다.

#### 1.2 시발체 제작

시발체 제작은 동물조직 중 사람유래 특이적 DNA sequence의 검출과 정량을 위하여 제작되었다 (Applied Biosystems에서 제작). YB8-ALU-S68: 5'-GTCAGAGATCGACCACTCT-3' (position 68-90), YB8-ALU-AS244: 5'-AGTGGCGCAATCTCGGC-3' (position 244-227), YB8-ALU-167: 5'-FAM-AGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGA-TAMRA-3' (position 167-192)

a new and alternative platform to conventional quantitative-PCR (qPCR) for the quantitation of DNA templates



▶▶ 그림 1. dPCR 원리 모식도

dPCR은 소량의 PCR 반응을 10만개 이상의 반응통(wall)에 적재하는 방식의 나노유체칩에서 쪼개어 증폭시킨 후, target DNA를 계수한다. Target DNA의 증폭 여부에 따라 positive(1)과 negative(0)로 디지털 신호처럼 받아들여 계수하고, 포아송 분포를 통해 목표 copy를 계산해 최종적으로 샘플 microlitr당 copy수로 결과 값을 확인할 수 있다.

### 2. dPCR의 응용

### 1.3 dPCR 반응조건 확립

시약사의 권고 안에 맞춰 반응조건을 확립하였다.

- Target DNA (10 ng)
- Primer (1 pmol) each
- Probe (0.5 pmol) each
- QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2, GeneAmp™ PCR System 9700 PCR
- Sterile, nuclease-free water

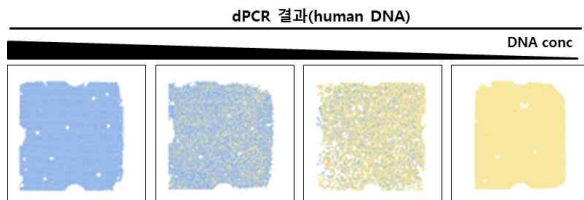
### 1.4 PCR 반응조건 확립[GeneAmp™ PCR System 9700 PCR Method]

- 1 cycle 96°C for 10 minutes (holding stage)
- 39 cycles (PCR stage): 60°C for 2 minutes, 95°C for 30 seconds
- 1 cycles 60°C for 2 minutes, 95°C for 99:59

## 2. 실험결과

### 2.1 dPCR를 이용한 농도에 따른 유전자 증폭도 확인

농도를 알고 있는 동물 DNA에 농도를 알고 있는 사람 DNA에 넣은 다음 (spiking), dPCR 기법으로 증폭하여, 사람 DNA의 증폭 여부에 따라 positive (1, 파랑색)와 negative (0, 노란색)로 digital signal처럼 받아들이는 형태로 계수하였다. 이때 동일한 농도의 동물 DNA 내 사람 DNA 농도를 10배씩 희석하여 사람 DNA 농도에 따른 DNA 증폭 정도를 확인할 수 있었다.



▶▶ 그림 2. 사람과 쥐의 DNA 혼합 후 사람의 DNA 증폭을 확인한 칩 전면

### 2.2 dPCR를 이용한 농도에 따른 유전자 증폭도 확인

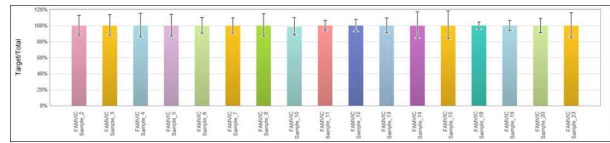
증폭된 DNA의 수를 정량하고자 히스토그램(histogram)의 형태로 확인하기 위해, 비증폭 또는 증폭된 DNA의 형광 값을 x축으로 두고 증폭된 DNA well의 개수를 y축으로 두고 계측하였다.



▶▶ 그림 3. 사람과 쥐의 DNA 혼합 후 사람의 DNA 증폭을 확인한 히스토그램의 예

### 2.3 dPCR의 정확도 측정

dPCR chip은 약 2만개의 well을 가지고 있으며, 각각의 well내로 분주된 PCR산물의 증폭여부를 분석하여 정량적인 분석을 시행했는데, 17개의 샘플을 이용하여 dPCR의 정확도를 검증하였고, 그 결과 95% 이상의 정확도를 확인하였다.



▶▶ 그림 4. 17종의 사람 샘플을 이용한 dPCR의 정확도 검증

## III. 결론

dPCR 기법을 이용하여 소량의 사람 DNA가 이종 동물과 섞여 있어도 검증이 가능함을 검증하였고, 더불어 소량의 DNA의 값을 정량할 수 있음을 함께 검증하였다. 본 차세대 분자진단 기법으로써 dPCR 기법은 중간 혼합된 유전정보 속에서 사람 유전자 검출이 가능하며, 차세대 분자진단 기법으로써 세균이나 바이러스 감염검사나 법의학적 측면의 유전자 검사를 가능케 하여 신속진단을 통한 환자의 생명 뿐 아니라 경제적 손실을 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

## ■ 참고 문헌 ■

- [1] Monya Baker., "Digital PCR hits its stride", Nat Methods., Vol. 9, No. 6, pp. 541-544, 2012.
- [2] Day E, Dear PH, McCaughan F, "Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine" Methods., Vol. 59, No. 1, pp. 101-107, 2013.
- [3] Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, Le Corre D, Mazutis L, Salem CB, Millot F, El Harrak A, Hutchison JB, Larson JW, Link DR, Laurent-Puig P, Griffiths AD, Taly V., "Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics.", Lab Chip., Vol. 11, No. 13, pp.2156-66, 2011.
- [4] Tadmor AD, Ottesen EA, Leadbetter JR, Phillips R., "Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR.", Science., Vol. 333, No. 6038, pp. 58-62, 2011.

## 사 사

본 연구는 보건복지부 암정복추진연구개발사업 지원으로 이루어진 것임 (과제고유번호 : 1631070)