

重合酵素連鎖反應(PCR)法에 의한 DNA의 增幅

—動物感染病 診斷의 日常的應用을 期待하며—

金 宇 鎬*

序 言

1975년 Southern blot技法³³⁾의 도입 이래 特定 核酸斷片의 檢索方法에 있어 상당한 진전이 이루어졌다. 核酸鹽基配列決定法^{29,30)}의 진전과 더불어 핵산단편의 同定 및 特性化가 대부분의 分子 生物學實驗의 중심과제로 되어 왔다. 그러나 검정과정 그 자체는 아직도 높은 수준의 特異性과 銳敏性을 얻기 위한 상당한 기술을 요구하는 거추장스러운 과정을 남겨놓고 있는 것이다.

새로운 核酸增幅技術인 PCR(polymerase chain reaction)법^{23,28)}의 등장으로 pg량의 DNA sample로부터 μ g량의 목적하는 DNA가 단시간내에 간단하게 얻어질 수 있게 되었다. cloning된 DNA, genome DNA를 막론하고 PCR법에 의하면 *In vitro*에서 신속히 대량으로 增幅될 수 있다. 종래의 cloning법에 의한 DNA의 증폭이 수일 내지 수주일이라는 많은 시간과 努力을 요하는데 반하여 자동화장치(Cetus社의 DNA thermal cycler 등)를 사용하는 PCR법은 신속하며 그 조작이 간편하고 신뢰성이 높은 기술인 것이다. 세련된 PCR에서는 목적하는 DNA단편의 熱變性(denaturation), primer의 annealing, primer의 伸張(extension)에 의한 相補鎖(complementary strand) 合成의 각 단계(step)의 최적

온도가 신속정확하게 조절되며 다음 단계로 이행하는 time-lag가 해소된다. 1 cycle이 약 6분으로 25 cycle을 反復하여 약 3시간이 소요되며 이와 같은 단시간내에 목적하는 DNA단편을 적어도 100,000배로 增幅할 수 있게 된다.

증폭한 DNA의 螢光分析 및 agarose gel電氣泳動에 의해서 목적하는 DNA단편만이 효율 좋게 증폭되었는가를 확인할 수 있다. DNA증폭장치(DNA amplification system)를 사용한 自動PCR法에 의하면 cloning이 간단하게 이루어지며 소요시간이 대폭 단축되고 또한 screening할 clone 數도 대폭으로 감소되며 완전한 genome library를 지닐 필요가 없게 된다는 것이다. 더구나 cloning을 전연 할 필요가 없게 되는 경우도 있어, 종래의 cloning법의 단점을 뛰어 넘을 것으로 기대되고 있다.

이와같이 PCR법의 응용에는 genome配列의 高效率的 cloning³¹⁾, mitochondria^{10,34,35,36)} 및 genome DNA^{10,34,35)}의 직접적 sequencing, nucleotide배열의 變異分析등¹²⁾이 보고되고 있다. 한편 사람의 感染病診斷을 위한 病原體의 檢索에 있어서의 PCR법의 응용^{25,32)}은 기초적연구에 비해 아직 활발한 편은 못되지만 가까운 장래에 강력한 검색 및 진단기술로 등장하게 될 것이다. 마찬가지로 獸醫診斷學分野에 있어서도 PCR법의 응용이 가까운 장래에 실용화될 것으로 기대되는 것이다.

* 江原大學校 獸醫學科

본고에서는 현재의 분자생물학적방법으로 응용되고 있는 PCR기법의 유용성과 편리함에 관해서 기술하고 기초적 및 응용연구에 관해서도 첨언하고자 한다.

1. PCR(polymerase chain reaction) 技法

PCR기법은 개념적으로 核酸을 增幅시키기 위한 가장 단순한 방법이다. 그것은 主體內에서의 DNA複製와 유사한 方途에서 매 cycle마다 PCR에 의해서 발생하는 DNA分子數가 倍加되는 것으로 어떤 점에서 자연적인 DNA복제과정을 흉내내는 것이나 다름없다. 이 방법은 DNA증폭장치(DNA amplification system) 등을 이용하여 약간 상이하게 조절된 온도조건하에서 지속적으로 진행되는 一連의 3단계 반복과정에 근거하고 있다(Fig. 1~4). 즉 PCR기법은 증폭될 DNA斷片에 隣接한 두 oligonucleotide primer와 DNA의 熱變性, 그들의 相補의 配列에의 primer*의 annealing** 및 DNA polymerase(重合酵素)인 *t-aq*로 annealing된 primer의 伸張의 反復cycle課程이 포함된다.

1). 熱變性(denaturation) : 鑄型(template)으로 인용되는 겹가닥DNA(dsDNA)는 高温處理에 의해서 變性된다. 즉, 겹가닥이 서로 갈라져서 annealing을 許容할 정도로 온도가 충분히 낮아질 때까지 溶液속에서 자유로히 남아있게 된다(Fig. 2, step 1).

* 高分子物質의 合成反應등에서 反應開始의 契機를 만들어 반응을 促進하는 物質(反應開始促進物質)을 뜻하며 일반적으로 反應生成物과 같거나 또는 생성물의 일부로서 微量으로 작용을 발휘한다.

** 겹가닥(復鎖)DNA斷片의 水溶液을 50~70℃로 加熱하면 가닥사이의 H結合이 떨어져서 單鎖(單鎖)으로 된다. 이것을 趁차히 冷却시키면 鹽基配列이 相補의 配列이 되어 있는 겹가닥중 한쪽 가닥이 서로의 鹽基間에 H結合을 형성하므로 再結合하여 겹가닥DNA로 되 돌아온다.

이 加熱-冷却操作 또는 그것에 의해서 생겨나는 겹가닥핵산의 解離再結合을 annealing라고 한다.

2). Extension primer의 annealing(加熱-冷却에 의한 核酸가닥의 再結合) : Extension primer란 增幅될 領域에 隣接한 부위에 annealing될 合成oligonucleotide의 雙을 말한다. 쌍으로된 각 primer는 DNA가닥의 다만 한쪽에 annealing한다. Primer의 배열은 증폭될 영역의 경계에서 DNA sample의 배열에 의해서 결정된다. primer들은 반대쪽 가닥에 annealing되기 때문에 그들은 서로 면하고 있는 3'末端을 갖는 것으로 볼 수 있다(Fig. 2, step 2). 전형적으로 primer들은 상이한 배열을 갖고 있으며 서로 相補의이지 못한다. primer가 DNA형상에 過量으로 존재하기 때문에 primer-鑄型複合體의 形成은 온도가 낮아졌을 때 primer의 annealing부위에서 두DNA가닥의 再結合에 더 좋을 것이다.

3). Primer extension(增幅段階로서의 相補鎖의 合成) : 제3단계는 primer 주형복합체의 DNA polymerase매개(5'→3')伸張이다. 신장단계가 유도되는 조건은 사용되는 DNA polymerase의 type에 직접 의존한다. 이 과정을 통해서 extension primer는 증폭되는 산물속으로 취입되게 될 것이다(Fig. 2, step 3).

초기에 PCR기법은 37℃에서 행해지는 extension단계와 더불어 대장균의 DNA polymerase I의 Klenow fragment를 사용하였다.²⁸⁾ 그러나 Klenow fragment의 易熱性은 每 熱變性段階後에 새로운 酵素의 添加를 요구하게 되는데 그것은 그 전과정을 매우 지루하게 하며 또한 sample중에 열변성된 효소를 급속히 축적시키는 결과를 초래하였던 것이다. 好熱性細菌의 일종인 *Thermus aquaticus*로 부터 추출하여 순화시킨 耐熱性DNA重合酵素인 *Taq*²⁷⁾를 사용하여 전과정을 크게 단순화시키게 되었다. 즉, 대장균의 polymerase I의 Klenow fragment가 사용되던 때에는 달리 *Taq* polymerase는 DNA의 열변성후에도 그 활성이 그대로 유지되므로 매 cycle마다 새로운 효소를 더이상 첨가할 필요가 없게 된 것이다.

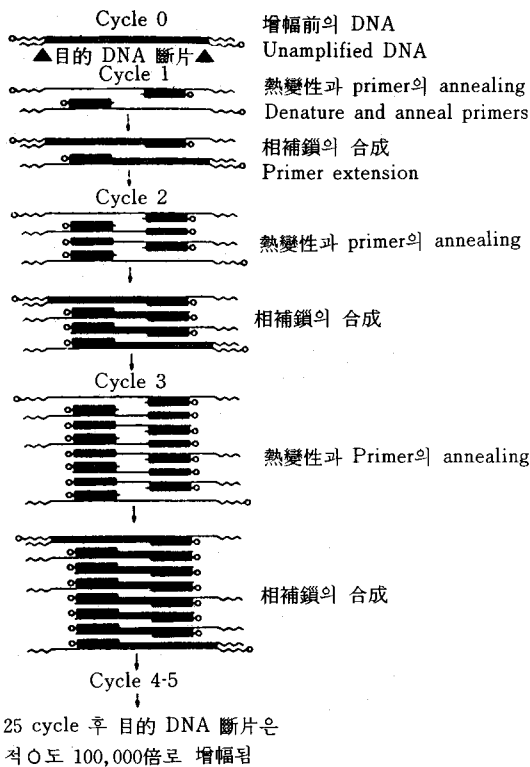


Fig.1. 목적하는 겹가닥DNA斷片을 熱變性하여 외가닥으로 하고, 각 외가닥鑄型에 primer를 annealing한 다음 DNA polymerase(Tap)를 사용하여 相補鎖를 合成함. 이 일련의 반응을 1cycle로 하여 예컨대 25cycle을 반복하므로써 목적하는 DNA를 적어도 100,000배로 增幅하는 것이 가능함.

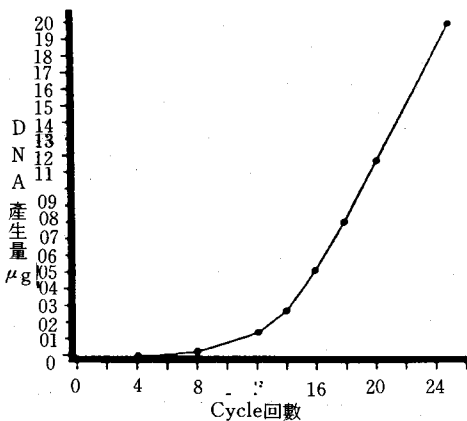


Fig.3. PCR法에 의한 DCR法에 의한 DNA 增幅速度 Kit(GeneAmp)의 control template(DNA) 1ng을 kit에 指示된 條件(sample量 100 μl, Taq polymerase 2.5 units, polymerase 反應72 에서 3分)으로 增幅. 25 cycle까지 반복하고, 각 cycle 후의 sample을 回收하여 增幅 DNA(500bp)량을 光分析에 의해서 測定.

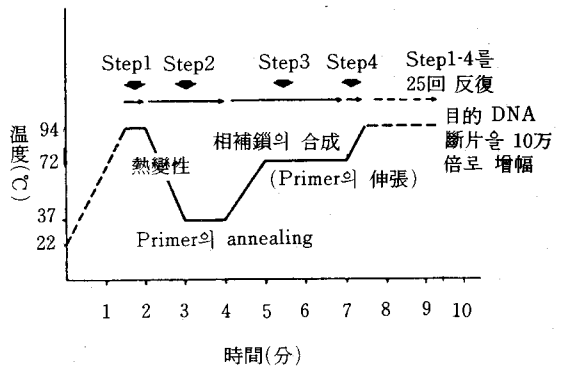


Fig.2. PCR法에 의한 DCR法에 의한 DNA增幅의 工程
 Step 1: 全試藥(primer, dNTPs, 酵素反應液, Taq polymerase)의 존재하에서 목적하는 겹가닥 DNA斷片을 熱變性시킴 (94 C, 3分)
 Step 2: 熱變性에 의해서 생긴 외가닥鑄型DNA에 primer를 annealing시킴 (37 C, 2分)
 Step 3: DNA polymerase(Taq)를 사용하여 相補鎖DNA를 合成함(72 C, 3分)
 Step 4: 增幅產物로서의 겹가닥DNA를 재차 熱變性시켜 외가닥으로 만드는 step 1으로 되돌아와, step1-3를 반복함.
 Step 1-4을 1cycle로 하여 25cycle을 反復함. 단, 目的DNA斷片에 따라 增幅의 最大效率을 얻는 條件이 상이하므로 目的DNA단편에 따라 設定條件을 變更하여야 함.

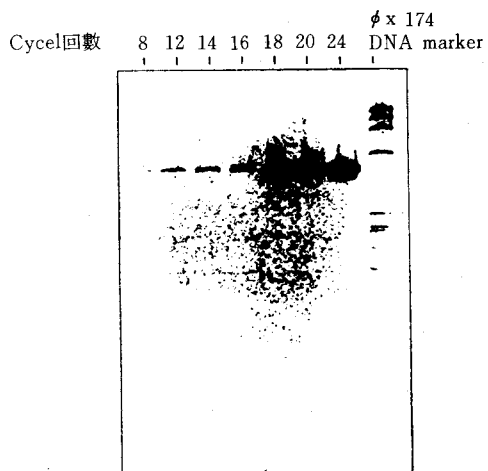


Fig.4. 增幅DNA의 agarose gel 電氣泳動. 위의 조건에서 증폭된 DNA sample을 각 Cycle후 10 μl씩 회수하여 ethidium bromide 존재하, Tris-borate 緩衝液중 3% Nusieve/1% agarose gel로 電氣泳動.(DNA分子量 marker로서 φ x174 Hae III 分解產物 100ng을 使用.

PCR기법에서 열변성, annealing, primer extension에 의한 相補鎖의 합성의 전형적 3단계 set가 한 cycle이 된다. Fig. 1~4에서 보는 바와 같이 목적하는 증폭산물이 적어도 3 cycle후에야 蓄積이 시작된다. "short product"²⁸⁾라고도 하는 목적산물은 또한 합성된 상보쇄(extension primer)의 5'末端사이에 구성되어 있는 영역이라고 정의되어 있다. primer는 명백히 된 배열이므로 그 "short product"는 primer의 배열에 일치하는 별개의 말단을 가질 것이다. cycle數가 증가함으로써 "short product"는 신속히 extension primer가 annealing할 수 있는 主鑄型이 될 것이다. 이론상으로 "short product"의 量은 매 cycle마다 배가 될 것이며 指數的蓄積으로 되어갈 것이다. 실험적으로 관찰된 실제적 增幅效率는 각가지 因子 특히 enzyme kinetics에 상관되는 인자들에 의해서 약간 낮아질 것이다.

다른 산물들은 매 cycle마다 직접 鑄型分子로부터 유래된 "long product"와 같은 cycle의 지속 동안에 또한 합성된다. 그러나 "long product"의 量은 증폭과정을 통해서 算數的으로 증가하며 그것은 원래의 주형량이 일정하게 유지되기 때문인 것이다. "short product"와 "long product"간의 주요차이는 "short product"에 반해서 "long product"의 3'말단은 변화적이라는 점이다. 결국 과정의 끝무렵에서 "short product"는 "long product"에 비해서 매우 압도적으로 많기 때문에 "short product"의 純化는 증폭된 산물이 사용될 실험의 type에 따라 절대적으로 요구되지 않는 것이다.

요컨대 PCR에서는 DNA배열이 수시간내에 10萬倍이상으로 증폭되는 것이다. 목적하는 DNA斷片의 특정영역에 인접한 배열에 상보적인 oligonucleotide primer의 한쌍은 반대쪽 및 겹치는 방향에서 DNA합성을 指命하는데 이용하는 것이다. 외가닥 primer는 열변성된 DNA sample에 annealing함으로써 DNA합성은 dNTPs(deoxyribonucleotide triphosphate)의 附加후 Tag에 의

해서 5'→3'의 방향으로 진행된다. 열변성후 원래의 DNA와 더불어 새로 합성된 분자는 앞으로의 DNA합성 cycle에 있어 주형으로 작용하는 primer와 연관할 수 있다. 즉, 이론적으로 증폭은 $2n$ (n 은 cycle數)으로 指數的으로 증가한다. 증폭은 보통 100萬倍이상으로 얻어질 수 있는 것으로, Taq polymerase는 열변성온도에서도 별 영향이 없으므로 매 cycle마다 보충할 필요가 없게 된다⁸⁾. 이 효소를 사용하는 PCR기법은 自動化課程으로 sample의 診斷은 1일이내에 이루어지게끔 된 것이다. 增幅된 配列은 nitrocellulose나 nylon paper에 transfer시킨후 특정probe로 hybridization시키므로써 확인할 수 있게 된다.

2. 應 用

현재 PCR기법응용의 기초연구에는 DNA의 cloning³¹⁾과 sequencing^{21, 35, 36)}이 있으며 일반적 응용으로는 질병의 診斷法연구^{6, 14, 15)}, 法醫學的연구²⁾ 및 遺傳病的 counseling 등이 있다.

A.基礎的研究에의 應用

1) Cloning (clone化) : Cloning에 있어서 PCR기법의 응용은 subcloning의 고전적방법과 관련하여 DNA斷片을 조제함에 있어서의 구차함과 지루함을 상당히 경감시키는데 극히 유용하다.

원하는 어떤 vector속으로의 단일방향적 cloning은 PCR을 이용하여 훨씬 쉽게 이루어질 수 있다. 鑄型에 대해서 특이적으로 annealing하는 능력에 영향을 미치지 않고 extension primer의 5'말단을 修飾하는 것이 가능하다. 예컨대 주형에 相補的이 아닌 附加配列은 합성동안에 extension primer의 5'말단에 부착하도록 한다. 이들 배열은 제한효소인식부위를 포함한다. PCR 과정을 통해서 이들 부가적배열은 증폭된 산물에 취입되게 될 것이다. 다음 증폭된 "short produ-

ct"는 과분의 primer 및 dNTP로부터 분리될 수 있으며 subcloning을 위해서 필요한 적절한 말단을 만들어내기 위해서 각각의 제한효소로 소화시킬 수 있다. 명백히 extension primer의 5' 말단에 첨가될 부가배열(소위, 제한효소의 인식부위)을 선택하기전 증폭될 표적배열은 subcloning용 단편을 조제하는데 사용될 제한효소부위를 함유하고 있지 않다는 것을 확인해줄 필요가 있다. Linker-primer법이라고 하는 이 방법은 사람의 β -globin 및 phage M13에 있어서의 HLA-DQ α 배열 clone을 생성시키기 위해서 Scharf 등³¹⁾이 성공적으로 이용하였다.

PCR기법이 cloning과정을 매우 단순화한다는 것이 명백하나 DNA단편의 생물학적(예 : plasmid, phage)증폭을 위한 현행방법은 그자체가 부분적으로 쓸모없게 될 가능성을 지닌다. 예컨대 전체 genome DNA의 1 μ g 으로부터 시작하여 실제로 pg 수준량으로 존재하는 표적배열을 증폭시키는 것이 가능하기 때문이다.

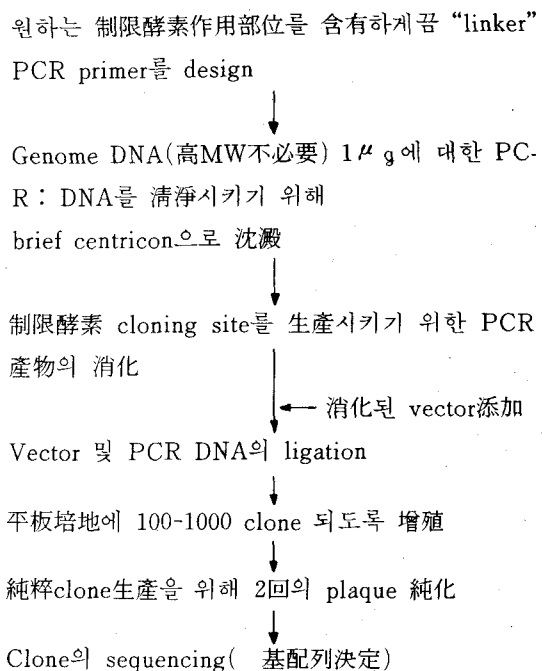
分子cloning 및 DNA분석에 있어서 PCR증폭법은 다음과 같은 일을 수행하는데 이용하고 있다. 1) Probe로 사용하기 위해서 cloning된 접가닥DNA의 특정배열의 생성, 2) 특정 cDNA단편의 선택적증폭에 의해서 cloning되지 않은 유전자에 대한 특이적인 probe의 생성, 3) 소량의 mRNA로부터의 cDNA library의 생성, 4) sequencing을 위한 대량의 DNA의 생성, 5) 突然變異의 분석등이다. 앞으로 수년동안 이 기법은 분자cloning의 여러 관점에서 그 응용이 증기될 것이다.^{8, 19, 24)}

특히 Tag polymerase의 특이성 때문에 標的配列의 pg水準으로 부터 시작하여 100 μ g 反應量에서 μ g 量의 "short product"를 통상적으로 산생시킬 수 있다는 것이다. 현재 Tag polymerase를 사용하여 성공적으로 증폭된 가장 긴 DNA단편은 3.2kb에 걸치고 있다. PCR는 또한 cDNA의 調製 및 分析에 있어 매우 유용하다는 것이 입증된다는 것이다. 한번 첫 cDNA가닥이 합성되

면 Tag polymerase는 두번째가닥의 합성을 증진시키기 위해서 附加될 수 있다. 특이적 extension primer의 한쌍의 부가와 PCR과정의 시작은, 만약 동일한 messenger가 시초의 poly A(+) fraction에 존재한다면 특이적 cDNA는 증폭될 것이다. 일본의 화학연구소의 연구팀은 최근 A型 肝炎virus의 genome RNA를 sample로하여 cDNA의 합성, linker의 附加, PCR의 일련의 작업을, column chromatography나 전기영동 등 sample loss를 일으킬 가능성이 있는 조작을 하지 않고 한개의 tube내에서 행하였으며 그 결과를 Southern blot hybridization으로 본바 예측한바와 같이 均一한 유전자가 증폭되고 있음을 확인하였다는 것이며 금후 더욱 상세히 검토하고자 한다는 것이다.

다음에 참고로 PCR법을 사용한 cloning에의 순서를 기술해 본다.

PCR法을 사용한 cloning의 例(所要時間 : 總4週間)³¹⁾



2) Sequencing(鹽基配列決定) : PCR는 또한 염기배열결정실험의 첫단계로서 유용할 것으로

로 보인다. PCR기법을 사용하여 한가지 또는 몇 가지 sequencing실험을 수행하기 위해서 충분한 sample량을 얻게하는 것이 가능하다. 증폭된 산물의 純化를 위한 요구는 최소로 유지할 수 있다는 증거도 있다. 즉, extension primer와 dNTP가 반응혼합물에서 제거되어야 하는 것으로 보인다. 증폭된 물질^{21, 35, 36)}의 한쪽가닥에 상보적인 제3의 primer를 가하므로서 증폭후에 뒤이은 배열결정반응을 수행하는 것이 가능하다. 이 sequencing방법을 tripleprimer법이라고 하는데 사람의 mitochondria DNA에 있어서의 길이의 변이에 대한 분석³⁶⁾과 β -thalassemia(地中海貧血症)변이³⁸⁾의 특성화의 분석에 이용되었다.

전통적으로 dideoxy sequencing은 DNA polymerase Klenow단편을 사용하여 수행된다. 닭의 骨髓芽球症virus(AMV) 逆轉寫酵素 및 修飾된 T7 DNA polymerase인 "Sequenase" 또한 목적으로 사용되어왔다. 현재 sequencing될 DNA 단편을 증폭시키거나 sequencing 그 자체를 위해서 Taq polymerase를 사용하여 실험들이 진행되고 있다는 것이다. PCR와 sequencing과의 組合의 유용성은 매우 확실하며 여러 예에서 두가지 방법의 조합은 개인의 유전형의 확인과 同定 등에서 행해졌다. 同質接合子(정상적인 β -globin 유전자) 혹은 β^s -globin 유전자(sickle cell anemia; 鎌狀赤血球貧血)로 알려진 개체들은 β -globin座位의 증폭후에 sequencing되었다. 異質性個體에서 두 allele은 증폭된 genome DNA sample의 실제적 sequencing은 sequencing ladder에서 같은 수준으로 두 분리된 명확한 band의 존재로 나타났다는 것이다.

3) 기타 應用: 개발중에 있는 몇가지 응용에 있다.

位置指定突然變異生成(site-directed mutagenesis)은 PCR법과 조합하므로서 실행될 수 있다는 것이다. 點突然變異는 extension primer에 단일염기의 변경을 통해서 증폭된 산물에 야기시킬 수 있으며 하나 또는 그이상의 잘못된 對稱을 지

니는 primer-鑄型複合體는 해당하는 완전한 잡종보다도 낮은 용해온도를 지닐 것이라고 한다. 이와같은 방법의 돌연변이생성은 DNA-단백질 상호작용의 연구에 있어 매우 희망적인 것으로 보인다. 또한 개체의 유전형특성을 결정지를 목적으로 몇몇 응용에가 개발되고 있다. 특히 증폭된 DNA를 검색하기 위한 두가지 방법이 개발되었는데 첫째것은 oligomer restriction(OR)^{6, 14, 15, 26, 28)}이라고 하는 것으로 이 방법은 증폭된 DNA에 대해서 특정적으로 design된 oligonucleotide probe의 잠재적잡종형성에 근거하고 있다. 또다른 더욱 단순하고 일반적인 것은 allele specific oligonucleotide (ASO)는 증폭물질에 대한 probe의 잡종형성에 근거하는 방법이다²⁹⁾. 합성된 oligonucleotide probe는 nitrocellulose 혹은 nylon paper와 같은 固定支持膜에 spot된 증폭DNA를 분석하는데 사용된다.

B. 診斷的應用

분자생물학적 연구는 사람이나 기타동물의 질병에 있어서의 여러가지 관점을 혁신시켰다. 핵산수준에서의 질병의 분석이라고 할 수 있는 DNA診斷法은 遺傳的疾病^{7, 35)}, 惡性腫瘤 및 癌과 관련된 oncogene에서의 돌연변이의 분석,^{3, 9)} 感染病^{15, 25)} 및 法醫學的檢索等^{1, 11, 18)}과 관련한 DNA 혹은 RNA配列을 위한 자동적이며 신속하고 비용이 싼 분석법을 제공해줄 것이다. DNA진단법은 또한 出生에 있어서의 병적유전자를 밝혀내므로서 豫防醫學의 새로운 기회를 만들어내게 할 것이다. 더구나 적절한 분석기법과 연계하여 PCR법에 의한 DNA의 증폭은 자동화장치에 의해서 정확하고 민감한 검정법으로 등장하게 되었다.

사실 PCR법은 장차 세균, 진균, virus 등과 같은 병원체의 검색방법을 혁신시킬 것으로 기대된다. 標的核酸配列의 증폭은 검색하고자 하는 copy數를 극적으로 증가시킬뿐만 아니라 probe로 될 핵산의 복잡성도 마찬가지로 감소시킬 것

이다. DNA 혹은 RNA(RT를 이용하여 cDNA로 만든후)은 증폭을 위한 鑄型으로 사용될 수 있는 것이다. 병원체의 *In vitro* 증식방법과 결부되어 單一種의 병원체 혹은 virus입자를 쉽사리 검색할 수 있게 될 것이다. 그러나 PCR의 指數的增幅은 생화학적으로 觸媒되는 단순한 cycle과정이 수분밖에 요구되지 않기 때문에 때로 수일에서 수주일씩 걸리는 소요시간이 요구되는 병원체의 배양문제를 代置시킬 수 있을 것이다. 더구나 어떤 virus가 특정의 숙주세포에서도 배양되지 못하는 경우 이 접근방법을 이용함으로써 검색될 수 있을 것이다.

이미 PCR진단법은 AIDS항체양성자의 末梢血 單核細胞(PBMCs)의 DNA중에 있는 HIV-1 provirus DNA배열의 검색²⁵⁾, AIDS환자의 혈액 및 각종 腫瘍患者의 세포로부터의 B lymph球親和性virus(HBLB; HHV-6)특이배열의 검색²⁾, 乳頭腫virus(HPV)배열의 검색³²⁾, 치료중의 濾包性 lymph腫환자에 있어서의 t를 지니는 殘留細胞의 검색¹⁷⁾, 胃內 lymph腫의 검색⁵⁾, 鎌狀赤血球貧血症과 같은 유전병의 진단^{14,28)}에 응용되고 있으며, 숙주세포의 핵산이 過量으로 존재할 때에도 virus의 검색을 가능케 하고 있다. 또한 Mitsuda 등²²⁾은 HBsAg (B형간염virus표면항원) 보유모친으로 부터의 臍帶血, 血清, 初乳재료를 PCR기

법으로 검색하였던바 HBV특이 DNA를 검출함으로써 HBV의 모체로부터 영아로의 傳播를 확인하였다고 보고하고 있다. PCR분석은 이 반응이 고분자차량의 DNA에 의존하지 않기 때문에 formalin固定 paraffin包埋組織片으로 수행될 수 있다는 것이다¹³⁾.

참고로 PCR과 다른 분석기법과의 조합에 의한 DNA진단기법의 보고에¹⁶⁾를 표 1에 묶어본다.

PCR기법의 利點의 한가지는, 非放財線同位元素system(酵素)이 사용될 수 있으므로 제3세계 저개발국가에서 이용되기 쉬운 방법일 것이다. 만약 충분한 genome DNA가 이용된다면 전기영동된 gel속의 증폭된 배열을 ethidium bromide로 염색하여 직접 눈으로 보면서 진단할 수 있다¹⁴⁾. PCR법의 고도의 민감성의 관점에서 이 기법은 머리카락 한오리에도 응용되고 있다²⁾. 입가식液에서 可檢材料를 얻는 방법과 같은 응용에는 cystic fibrosis와 같은 유전자결함을 집단적으로 screening 하는데로 막대한 잠재력을 지닐 것이다.

이와같은 PCR기법이 특히 臨牀檢査 등에 더 많이 이용될 것으로 기대되지만 primer의 오염에 의한 잘못된 陽性判定(false-positive)의 가능성이 존재한다^{24,27)}는 것을 명심해야 한다. Taq DNA polymerase는 편집기능을 결여하고 있어 PCR에

표 1. PCR法과 組合되어 사용된 DNA診斷技法

病名 또는 應用分野	配列檢索의 type	診斷技法
Lesch Nyhan病	單一-nucleotide의 代置	PCR, 그리고 DNA sequencing.
Duchenne筋萎縮	커다란 削除	多數exon에 대한 PCR, 다음 ASO.
Insulin依存糖尿病	多數配列變種	PCR 그리고 DNA sequencing 혹은 ASO.
膽臟의 肉腫	單一-nucleotide의 代置	PCR, 그리고 ASO
慢性骨髓性白血病	染色體轉位	PCR, 그리고 DNA probe.
AIDS	HIV genome의 存在	轉寫 그리고 PCR,DNA probe.
法醫學	各種 多形性	單一 毛髮로의 PCR, 그리고 ASO.

PCR: polymerase chain reaction. ASO: allele-specific oligonucleotide.

있어 *E. coli* DNA polymerase I의 Klenow fragment를 사용했을때 보다 4배나 높은 비율로 매 cycle당 2×10^{-4} 나 되는 비율로 부정확한 nucleotide를 취입한다. 잘못 취입(misincorporation)되는 이와같은 비율은 30 cycle의 증폭에 있어 0.25%의 誤謬頻度로 번역된다는 것이다²⁷⁾. 오류빈도는 고농도의 dNTP와 Mg++의 존재하에 증가되는 것으로 보인다. 이와같이 잘못 취입되는 것은 증폭된 산물의 길이를 통해서 일어나며 transition 및 transversion의 두가지로 나타난다(커다란 削除, 挿入 또는 mosaic는 일어나지 않음). 이와같이 경우에 따른 오류는 전체증폭반응산물이 잡종형성probe로 혹은 직접적인 DNA sequencing를 위한 鑄型으로 사용될 때에는 문제되지 않는다. 그러나 증폭된 pool로부터 cloning된 개개 DNA 분자의 배열은 信賴하기 어렵다. 이와같은 방법으로 얻어진 배열은 적어도 두 분리된 증폭반응에서 생겨난 얼마간의 독립된 재조합 clone을 sequencing 혹은 100~200의 재조합clone으로부터 유래된 외가닥DNA pool를 sequencing함으로써 확인해야 한다. 이렇게 함으로써 초기증폭 cycle 동안에 야기되는 잘못 취입되는 것이 특정증폭반응으로부터 유래된 每 clone에서 나타날 가능성을 배제한다.

참고로 다음에 virus검색에 이용되는 PCR증폭의 利點과 不利點을 들어본다.

利點: 1) 극도로 민감한 기법임. 2) 증폭된 배열의 특이성이 sequencing에 의해서 확인 될 수 있음. 3) 매우 적은 量의 혈액이나 소수의 세포(50개 세포정도, DNA $1ng \sim 1\mu g$ 사이)로도 시행될 수 있음. 4) 비교적 신속히 시행됨. 5) 증폭된 일정한 領域에 있어서의 變異의 검색에 이용될 수 있음. 6) virus분리 또는 분자cloning을 필요로 하지 않음. 7) 때로 埋藏되거나 퇴화된 DNA 즉, paraffin包埋組織標本에도 응용될 수 있음.

不利點: 1) 지나치게 민감한 반응을 하는 기법이므로 오염방지에 철저를 기해야 함. 2) 증폭목적으로 하는 領域의 배열을 알고 있어야 함. 3)

분석결과 sample에는 virus DNA가 반드시 함유되어 있음이 밝혀져야 함. 4) 陰性豫測值가 높지 않음. 5) 陽性豫測值는 목적하는 領域의 특이성에 의존함. 6) 陽性結果로 판정함에 있어서 매우 조심스러워야 함.

3. DNA增幅의 自動化

PCR기법의 特許權을 갖고 있는 미국의 Perkin Elmer Cetus증폭을 자동화하는 DNA증폭 system (DNA amplification system; "DNA Thermal Cycler")(Fig. 5)을 개발하였다. 목적하는 DNA斷片의 *In vitro*에서의 증폭을 간단히 효율 좋게 행하는 system으로서, DNA amplification reagent kit(GeneAmp)와의 조합으로 약 3시간만에 목적하는 DNA단편만을 적어도 100,000배로 증폭시킬 수 있다는 것이다. 현재는 Cetus사외에 여러 회사에서 DNA증폭장치를 개발하여 시판하고 있다.

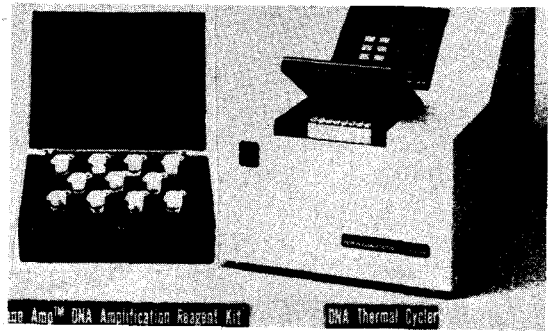


Fig. 5. DNA增幅裝置.

(Cetus社製의 DNA Thermal Cycler 및 DNA Amplification Reagent Kit)

結 言

DNA再組合技術의 진전은 사람의 유전적결함의 분자분석과 출생전의 豫測診斷 및 感染病의 진단을 가능하게 해주었다. 이 방법은 Southern blotting법과 방사선동위원소 probe에 의존하는 표준기법이다. PCR이라고 하는 새로운 기술은 위의 방법들을 더욱 민감하고 신속하게 행하도록

만들었다. 즉, PCR기법은 DNA단편을 增幅시키기 위해서 사용되는 전통적인 방법을 혁신시켜 주었다. 특정 DNA단편을 대량으로 얻기 위해서 세균의 발육, plasmid의 순화와 같은 지루하고 시간소모적인 단계를 거쳐야 하는 일이 필요하지 않게 된 것이다. 더구나 어떤 경우에는 증폭과정으로 얻어진 增幅物質은 subcloning 또는 sequencing과 같은 해야할 操作들을 시작하기 전에 더이상 純化할 필요가 없게 된 것이다. Site-directed mutagenesis와 같은 PCR방법론의 또다른 응용이 각종 연구분야에서 개발되고 있으며 의심의 여지 없이 PCR기법은 더욱더 응용의 폭이 넓어지게 될 것이다. 각가지 질병 특히 감염병병원체에 대한 DNA진단법의 응용도 더욱 가속화될 것으로 믿어진다. Australia에서의 이 기법을 이미 牛白血病진단에 응용하고 있다고 들린다. 국내에서도 쓰쓰가무시(蠱)병원체에 대한 이와같은 시도가 행해지고 있는 것으로 알고 있다. 사람뿐만 아니라 동물감염병의 진단에 있어서도 국내에서 하루속히 이 첨단기법의 응용이 이루어지기를 기대하는 것이다.

참 고 문 헌

1. Almoguera, C.D. *et al.*: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-Kras genes. *Cell*(1988), 53: 549.
2. Beroldingen, C.H. *et al.*: Analysis of enzymatically HLA-DQ α DNA from single human hairs. *Am. J. Gen.*(1987), 41: 735.
3. Bos, J.R. *et al.*: Prevalence of ras gene mutations on human colorectal cancers. *Nature*(1987), 327: 293.
4. Buchbinder, A. *et al.*: Polymerase chain reaction amplification and in situ hybridization for the detection of human B-lymphotropic virus. *J. Virol. Meth.*(1988) 239: 491.
5. Cunningham, D. *et al.*: Polymerase chain reaction for detection of dissemination in gastric lymphoma. *Lancet* I 8641(1889), 695.
6. Embury, S.H. *et al.*: Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. *New Eng. J. Med.*(1987), 316: 656.
7. Engelke, D.R. *et al.*: Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1988), 85: 544.
8. Erlich, H.A. *et al.*: Specific DNA amplification. *Nature*(1988), 331: 461.
9. Farr, C.J. *et al.*: Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1988), 85: 1629.
10. Gyllensten, U.B. & Erlich, H.A.: Generation of single-stranded DNA by polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1988), 85: 7652.
11. Higuchi, R. *et al.*: DNA typing from single hairs. *Nature*(1988), 332: 543.
12. Horn, G.T. *et al.*: Unpublished observation.(1988). (See No. 27).
13. Impraim, C.C. *et al.*: Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Com*(1987), 142: 170.
14. Kogan, S.C. *et al.*: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences: Applications to hemophilia A. *New Eng. J. Med.*(1987, 317: 985).
15. Kwok, S. *et al.*: Identification of human immunodeficiency virus sequences by in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. *J. Virol.*(1987), 61: 1690.
16. Landegren, U. *et al.*: DNA diagnostics-Molecular techniques and automation. *Science*(1988), 242: 229.
17. Lee, M.S. *et al.*: Detection of minimal residual bcr/abl transcripts by a modified polymerase chain reaction. *Blood*(1987), 72: 893.
18. Li, H. *et al.*: Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*(1988), 335: 414.
19. Marx, J.L.: Multiplying genes by leaps and bounds. *Science*(1988), 240: 1408.
20. Maxim, A.M. & Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1977), 74: 560.
21. McMahon, G. *et al.*: Characterization of c-Ki-ras oncogene alleles by direct sequencing and enzymatically amplified DNA from carcinogeninduced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(1987), 84: 4974.
22. Mitsuda, T. *et al.*: Demonstration of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus by means of polymerase chain reaction. *Lancet* II 8669(1989), p.869.
23. Mullis, K.B. & Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.*(1987), 155: 335.
24. Oste, C.: Polymerase chain reaction. *BioTechniques*(1988), 6: 162.
25. Ou, C.Y. *et al.*: DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*(1988), 239: 295.
26. Saiki, R.K. *et al.*: A novel method for the detection of polymorphic restriction sites by cleavage of oli-

- gonucleotide probes: Application to sickle-cell anemia. *Bio/Technology*(1985), 3:1008.
27. Saiki, R.K. *et al.*: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*(1988), 239: 487.
 28. Saiki, R.K. *et al.*: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*(1985), 230: 1350.
 29. Saiki, R.K. *et al.*: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*(1986), 324: 163.
 30. Sanger, F. & Coulson, A.R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*(1975), 94: 441.
 31. Scharf, S.J. *et al.*: Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*(1986), 233: 1076.
 32. Shibata, D.K. *et al.*: Detection of human papilloma virus in paraffin embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*(1988), 167: 225.
 33. Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*(1975), 98: 503.
 34. Stofflet, E.S. *et al.*: Genomic amplification with transcript sequencing. *Science*(1988), 239: 491.
 35. Wong, D. *et al.*: Direct genomic sequencing of amplified single copy DNA: Rapid characterization of unknown β -thalassemia mutations. *Nature*(1987), 330: 384.
 36. Wrischnik, L.A. *et al.*: Length mutations in human mitochondrial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucl. Acids Res.*(1987), 15: 529.

소화기질병 전문예방 치료제

스티뮤렉스®

STIMULEX

스티뮤렉스는 Denmark의 BIOFAC 회사가 특수한 공법으로 개발한 순수한 제 1 위 내용물 추출제입니다.

송아지 설사의 예방과 성장촉진효과

어린 송아지에 스티뮤렉스를 투여하면 설사 발생율을 96%나 감소시키며 제 1 위가 발달하게 되어 영양소의 소화흡수율을 증가시키므로 증체량이 20%이상 증가됩니다.

농후사료 과량급여로 인한 소화기 질병의 예방, 치료

농후사료 과량급여로 인한 식체, 소화불량, 고창증, 과산증, 식욕부진 등의 소화기질환을 탁월하게 예방, 치료하며 유량을 10%나 증가시킵니다.

소의 질병치료시 보조요법 및 도입우에서 효과

질병치료시 치료약품과 병용하여 투여하면 제 1 위의 기능이 활발해져 회복이 빨라지고 도입우에서도 이동, 사양환경의 변화로 인한 스트레스를 예방하여 식욕이 좋아지고 빨리 환경에 적응하게 됩니다.

스티뮤렉스의 놀라운 효능은 결코 모방할 수 없습니다



한풍산업주식회사

HAN POONG INDUSTRY CO., LTD

서울특별시 영등포구 신길동 1351-3 (천록빌딩 7층)

TEL 845-1171/4

* 본사 학술부로 연락주시면 스티뮤렉스에 관한 기술자료를 보내드립니다.