

한국인 인슐린 유전자의 클로닝 및 분석

김형민[#] · 한상수^{**} · 고건일^{**} · 손동환^{**} · 전창덕^{*} · 정헌택^{*} · 김재백^{**}

^{*}원광대학교 의과대학, ^{**}원광대학교 약학대학

(Received July 6, 1993)

Molecular Cloning and Analysis of Korean Insulin Gene

Hyung-Min Kim[#], Sang-Su Han^{**}, Kun-Il Ko^{**}, Dong-Hwan Son^{**}, Chang-Duk Jun^{*},
Hun-Taeg Chung^{*} and Jae-Baek Kim^{**}

^{*}Department of Microbiology & Immunology, School of Medicine,

^{**}College of Pharmacy, Wonkwang University, Iri 570-749, Korea

Abstract—Human insulin gene is consisted of the polymorphic region with the repeating units, the regulatory sequence, the structural gene including the intervening sequence, and 3'-flanking region. The polymerase chain reaction, which amplifies the target DNA between two specific primers, has been performed for the amplification of human insulin gene and simple one-step cloning of it into *Escherichia coli*. Out of 1727 nucleotides compared, only 4 sites were variable: 5'-regulatory region(G2101→AGG); IVS I(T2401→A); Exon II(C2411 deletion); IVS II(A2740 deletion). The variations at the G2101 and T2401 were the same as those found in one American allele. The other two variations were observed only in the specific Korean allele. And, the enzyme digestion patterns among normal, insulin dependent diabetes mellitus, and non-insulin dependent diabetes mellitus were the same. On the other hand, PCR method showed the possibility of the quick-access for the polymorphic region in terms of the restriction fragment length of polymorphism.

Keyword □ Insulin, insulin dependent diabetes mellitus(IDDM), non-insulin dependent diabetes mellitus(NIDDM), restriction fragment length of polymorphism (RFLP).

인슐린 유전자는 제11번 염색체의 short arm 상에 위치해^{1,2)} 있으며 DNA의 염기배열과 구조는 1980년 Bell등³⁾에 의해 밝혀졌다. 그 구조는 인슐린 유전자 DNA의 전사 개시점인 cap site 부터 전사 종료점인 poly A site 까지 1430염기(base pairs; bp)로 구성되어 있고 이 사이에 3개의 exon과 2개(179 bp, 786 bp)의 intervening sequence(IVS)가 존재한다. 이 IVS들의 정확한 기능은 밝혀져 있지 않으나 exon들에 대한 조절작용이 있으리라 생각되며 전이과정에서 splicing되어 떨어져 나간다. Exon은 proinsulin을 유도하는 24개의 아미노산 배열과 함께 B, C, A쇄 순으로 연결되어 있고 C쇄 사이에 786 bp의 IVS가 있다.

또한 전사 개시점 상부에 조절 유전자들⁴⁾이 있어서 이곳의 -25에서 -30 bp 부위에 TATA box가 있고 대개 -70에서 -80 bp 근처에 CAAT box라 불리는 DNA의 양적 발현을 제어하는 조절 유전자(quantifier promoter gene)가 있으며 이 보다 더 앞에 repressor가 있다.

이러한 인체 유전자의 특징중의 하나로서 Alu sequence^{5,6)}가 관찰되는 데 전체 인체 DNA의 3~10% 정도에서 반복 배열되는 염기들이 발견되어 이들을 총칭하는 말이다. 그러나 아직 이들의 기능과 역할은 정확히 밝혀지지 않고 있고 조절 유전자의 일종으로 추측하고 있다. 인슐린 유전자의 5' 부위에도 이와 같은 Alu sequence들이 있어 ACAGGGGTGTGGGG의 14 bp가 반복 되는 곳이 발견⁷⁾되는데 이들은 상

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

당히 불안정하여 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 일으킨다.^{8,9)} 그러나 3' 부위에도 이들 Alu sequence가 관찰되나 안정되어 있으므로 RFLP를 일으키지 않는 것으로 알려져 있다.⁷⁾

인슈린 유전자가 존재해 있는 제11번 염색체상의 다른 유전자들을 살펴보면¹⁰⁻¹³⁾ H-ras 1유전자(oncogene), insulin-like growth factor II(IGF II) 유전자, 부갑상선 홀몬 유전자, 카탈라제(catalase)유전자들이 인슈린 유전자 근처에 있으며 특히 short arm은 변형이 잘 일어나는 염색체이므로 유전자들 간의 상호작용에 대한 연구도 필요하리라 본다.

본 실험에서는 정상 한국인을 소재로 한 게놈 유전자의 클로닝과 이 유전자의 구조 및 염기서열을 비교 분석하였다. 또한 유전자 상부의 RFLP를 일으키는 부분의 크기를 Polymerase Chain Reaction (PCR) 기법으로 확인한 다음 정상인, IDDM환자, NIDDM환자들과 비교분석하였다.

실험 재료

균주—*Escherichia coli* 균주는 JM 109(*rec A1, end A1, Gyr A 96, thi, hsd R17, sup E44, rel A1, lac-pro AB, F' tra D 36, pro AB, Lac Iq ZM 15*)이다.

배지, 완충용액 및 화학물질—LB 배지는 1 liter당 bacto-trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g을 함유하며 고체 배지를 만들때는 1.5%(w/v)의 bacto-agar를 넣어 사용하였고 ampicillin배지는 ampicillin을 50 µg/ml 농도로 넣어 주었다. 인체 유전자 정제에 사용한 혈액 완충용액은 155 mM NH₄Cl 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA이고 SE완충용액은 75 mM NaCl, 25 mM EDTA이다. 5Xpolymerase-ligase 완충용액은 500 mM NaCl, 32.5 mM Tris-HCl(pH 7.5), 40 mM MgCl₂, 5 mM beta-mercaptoethanol이고, gel electrophoresis에 사용된 TBE buffer (5X)는 1 liter당 tris base 54 g, boric acid 27.5 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml를 혼합하여 만들었다. DTT 용액은 2.25 M DTT, 40 mM potassium acetate (pH 6.0)를 함유하여, 여과멸균한 후 -20°C에 보관 하였다. 제한효소, T4DNA ligase, Klenow Fragment, Bacterial Alkaline Phosphatase 등의 효소들은 Bethesda Research Laboratory(BRL), Biolabs, 그리고 KOSCO에서 구입하였고 Lysozyme, SDS, tris-base, acrylamide

등은 Sigma Chemical Co.로 부터 TEMED, ammonium persulfate는 BRL로 부터, N' N'-methylene-bis-acrylamide는 Fluka에서 구입하였다. 그의 사용된 chemicals는 모두 reagent grade이다.

실험방법

인체 유전자 정제—혈액으로 부터의 인체 유전자 정제는 Kunkel등¹⁴⁾의 방법을 변경하여 분리하였다. 간단히 기술하면, 10 ml의 혈액을 채취하여 헤파린으로 처리된 튜브에서 사용시 까지 냉장(4°C) 보관 하였다. 혈액 5 ml을 50 ml 용량의 Falcon 튜브에 넣고 여기에 32 M sucrose, 10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 5 mM MgCl₂ 그리고 1% Triton X-100 혼합용액 45 ml를 첨가하여 혈구들을 용혈시켰다. 핵 만을 분리하기 위하여 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 이때 tube 벽을 Kim-wipes로 한번 닦아 주었다. 침전된 핵층에 0.075 M NaCl과 0.024 M EDTA(pH 8.0) 혼합액 2.25 ml를 가하고 Pasteur pipet으로 완전히 혼합 시킨다. 여기에 5% SDS 0.5 ml와 proteinase K를 2 mg/ml 농도로 첨가하고 37°C에서 12시간 동안 1~2시간 마다 튜브를 거꾸로 하여 핵 덩어리가 생기지 않도록 하면서 반응 시킨다. 여기에 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)으로 포화된 phenol 5 ml를 가하여 조심스럽게 잘 혼합한 후, 다시 chloroform-isoamyl alcohol(24 : 1) 5 ml를 가하여 혼합하고, 1,000 g에서 15분간 원심분리 한다. DNA로 인하여 점성이 있는 상층액을 취하여 chloroform-isoamyl alcohol로 한번 추출하고 1,000 g에서 15분간 원심분리 한다. 다시 상층액을 취하고 DNA를 침전 시킨다.

올리고뉴클레오타이드의 합성과 정제—PCR primer와 sequencing에 사용할 올리고뉴클레오타이드들은 한국과학기술 연구원 유전공학연구소에 있는 Applied Biosystem DNA 합성기를 이용하여 Phosphite triester 합성법으로 합성하였고 polyacrylamide gel과 SEP-PAK을 사용하여 정제 하였다.

PCR-DNA 증폭에 이용된 조건은 다음과 같다 : DNA template, 약 1 µg ; 각각의 primer, 0.5~1.0 µg ; Tris-HCl, pH 8.3, 10 mM ; KCl, 50 mM ; MgCl₂, 1.5 mM ; gelatin, 0.01% ; dNTP, 각각 200 µM ; Taq DNA polymerase, 2.5~5.0 units. 이상의 DNA, 효소 등의 혼합물을 전체 용량이 100 µl가 되도록 잘 혼

합하고, 여기에 동 분량의 mineral oil을 첨가한다. 증폭 반응에 사용된 온도는 denaturation은 94°C 1.0분, annealing은 58°C 1.5분, 그리고 polymerization은 72°C에서 3분간 하였으며 이과정을 25회 반복하여 DNA를 증폭시켰다.

Phosphorylation 및 ligation—Maniatis 등의 Molecular Cloning책의 방법에 따라 phosphorylation과 ligation을 수행하였다. 간략히 기술하면, DNA fragment의 5' 끝이 약 4 pmole 되게 취하고 여기에 kinase buffer와 ATP가 각각 1X 그리고 Bovine Serum Albumin(BSA)을 넣고 실온(22°C)에서 하룻밤 동안 반응 시켰다.

E. coli의 형질 전환—Chung 등에 의하여 새로 개발된 E. coli의 형질전환 방법¹⁵⁾ 과 Hanahan 방법¹⁶⁾에 따라 수행하였다. 사용할 숙주 세포들은 하루 전에 접종하여 하룻밤 키운 후 LB 배지 50 ml에 0.1~1 ml 접종하여 37°C shaker에서 2~3시간 키워 OD(600 nm)=0.2가 되면 얼음에 10분간 방치 하였다. 4°C 4,000 g에서 5분간 원심분리하여 모든 세포에 transformation buffer를 넣은 후, DMSO 용액을 천천히 가하여 3.5%가 되게 하였다. 세포가 담긴 시험관을 얼음에 5분간 두었다가 DTT용액을 75 mM이 되도록 첨가하고 얼음에 다시 10분간 두었다가 앞에서와 같은 양의 DMSO를 천천히 넣고 얼음위에 5분간 더 방치한 후 이것을 200 µl씩 취하여 플라스미드 DNA와 섞고 얼음위에서 30분, 42°C에서 90초, 다시 얼음위에서 5분간 방치하였다. 여기에 80 µl의 SOC를 넣고 37°C에서 1시간 배양하고 배양액 300 µl씩을 ampicillin이 든 LB plate에 골고루 퍼서 말린 후 37°C에서 하룻밤 배양 하였다.

플라스미드 정제—위에서 배양한 단일집락을 1 liter LB 배양액에서 하룻밤 배양하여 pellet을 얻은 후 20 ml의 lysozyme 용액(50 mM glucose, 25 mM Tris HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 4 mg/ml lysozyme)에 현탁시켜 실온에서 5분간 방치해 두었다가 이것을 Beckman GS-3 rotor로 4°C에서 7500 rpm으로 30분간 원심분리한다. 상층액을 2배 부피의 ethanol과 잘 섞은 후 실온에 5분간 놓아둔다. 원심분리 하여 침전물을 70% ethanol로 씻어 말리고 8 ml의 TE용액에 녹인다. 1 ml당 1 g씩의 CsCl를 첨가하여 완전히 녹인 후 EtBr을 600 µg/ml이 되도록 섞어 주었다. 이것을 Beckman type 50.1 rotor로 20°C, 40,000 rpm에서 40

시간 동안 원심분리한 후 플라스미드 band를 주사기로 뽑아 내었다. DNA용액으로 부터 EtBr을 물로 포화된 n-butanol로 여러번 추출한 후 ethanol로 침전시켰다.

미량의 RNA는 DNase free RNase로 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 뒤 다시 phenol-chloroform으로 처리한 후 ethanol로 침전 시키고 말린 다음 적당량의 TE용액에 녹여 -20°C에 보관 하였다. DNA 농도는 260 nm에서 absorbance를 측정하여 알 수 있었다. 짧은 시간에 간단히 적은양의 플라스미드를 얻기 위하여 over night culture 1.5 ml을 원심분리하여 E. coli pellet를 얻고 앞에서와 같은 용액을 각각 100 µl, 150 µl, 200 µl씩 넣고 5분간씩 반응 시킨 후 상층액을 취하여 phenol-chloroform 처리한 후 ethanol로 침전 시키고 이를 0.5 µg/ml RNase 함유한 TE 용액에 녹여 사용하였다.

DNA 염기서열 결정—DNA의 염기서열을 결정하기 위하여 Sanger의 dideoxynucleotide chain termination sequencing method¹⁷⁾를 수정한 Chen and Seeburg의 방법¹⁸⁾을 이용하였다. supercoil plasmid DNA 1~2 µg을 NaOH로 변성시키고 ammonium acetate (pH 4.5)를 넣고 annealing 하였다. 여기에 Klenow fragment와 α-³²P-dATP를 넣고 섞은 후 G, A, T, C 네가지 반응을 위해 4개의 Eppendorf tube에 똑같은 양으로 나누었다. 여기에 각각 적당한 농도의 dATP/ddATP, dCTP/ddCTP, dGTP/ddGTP, dTTP/ddTTP 혼합물을 각각 넣고 반응 시킨 후 dNTP를 적당량 넣고 chase reaction 시킨 다음 stop solution을 섞어 반응을 중지 시켰다. 이 반응액을 2 µl 취해서 3분간 끓인 후 8% polyacrylamide-8M urea gel에 loading하여 1,500~2,100 volt로 여러시간 동안 전기 영동하였다. gel을 떼어 내어 비닐로 싸서 X-ray 필름에 8시간 동안 -70°C에서 노출한 후 현상 하였다.

염기서열 비교분석—KCTC(유전자 은행)의 Bioinformatics department의 지원을 받아KCTC network를 통한 Cray 2 super computer의 Ideas program을 사용하여 지금까지 입력된 인슈린 유전자의 염기서열과 비교분석 하였다.

실험결과

인체 인슈린 유전자 단편의 클로닝—한국인 인슈린

유전자를 클론하기 위하여 total human genome상의 적절한 부위에 PCR용 primer(Fig. 1)를 고안하여 합성하였고, 이를 이용하여 각각의 DNA 단편들을 특이적으로 증폭하였다(Table I). Table I의 증폭된 DNA 단편들은 벡터(pUC 19)의 SmaI 부위에 조립하여 클로닝하였다.

인슈린 유전자의 염기서열 결정 및 비교 분석—인체 인슈린 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 template로 이용하여 5' 비전사부위와 전사 시작 부위(CAP site) 그리고 IVS I, Pre-B-C-IVS II-C-A의 염기서열을 결정하고 Bell등에 의하여 Los Alamos data base에 입력된 인슈린 유전자 중에서 서양인의 인체 인슈린 유전자와 염기서열을 비교하였다(Fig. 2). 5' regulatory region 부터 시작하여 IVS II의 1500여개의 염기 중 네 곳이 차이가 있음을 알 수 있었고, 이 네곳은 모두 단백질을 code하지 않는 부위였다. 즉, 5' 비전사 부위의 G2101→AGG insertion, IVS I의 T2401→A치환, exon II의 C 2410 deletion, IVS II의 A2740 deletion이다.

Polymorphic region의 PCR—현재까지 인슈린 유전자의 type을 분류하고 그에 따른 질병과 연관성에 가장 중요한 기준이 되는 14-mer와 15-mer의 tandem repeat sequence(ACAGGG TATGGGG와 ACAGGG-GTCCTGGGG)를 포함하는 유전자의 증폭을 위하여 SIP 6(1221-GGC TGC TGT CCT AAG GCA GGG

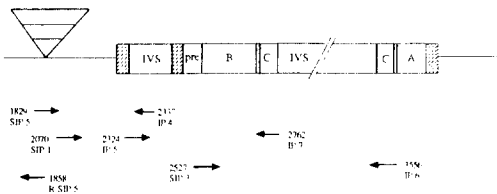


Fig. 1—Insulin gene structure and primers used for PCR.

Table I—Amplified fragments by PCR

DNA	Primer	Size(bp)	Type
M, L	SIP-IP4	509	normal
M, KH, L	IP5-IP7	439	normal
M, KH, L	SIP1-IP7	692	normal
M, KH, L	SIP3-IP6	1030	normal

American insulin gene	CTCAG	CCCCACCCA	TCCTCGACC	CCCCACCCC	2100		
Korean insulin gene	*						
G	CCCTAATGGCCAGGGGC	AGG	AGGATGAC	ACTTAGGGA	GATGGCTCT	GAGACTATAA	2160
AGC	CAGCGG	GCCCGACAG	CCCTCAGCC	TCGACGACAG	GCTGCATCAG	AAGAGGCAT	2220
CAAGCAGCTC	TGTRCAAGG	GCCCTTGGCT	CAGGTGGCT	CAGGCTTCCA	GCGTGGCTGG	2280	
ACCCACGGCC	CCAGCTTGC	AGCAGGAGG	ACTTGGTTGG	GCTCGTGAAG	CATTTGGGGG	2340	
TGAGCCGAGG	GCCCGAAGG	CAGGCAACT	GCCCTCAGC	CTGCTCAGC	CCTGCTTTC	2400	
TCCAGATCA	CTTCTTCT	GCCATGGCC	TGTTGATCG	CCTCTGCCC	CTGCTGGCG	2460	
A	del						
TGCTGGCCT	CTGGGACT	GACCCAGCG	CAGCCTTGT	GAACTAACAC	CTGTGGCT	2520	
CACACTGGT	GAAATCTC	TACCTAGTGT	GCTGGAGCG	AGGCTTCTC	TACAGACCA	2580	
AGACCCGCG	GAGCCAGAG	GACCTGCAGG	GTGACCAAC	CGCCATTGC	TGCCCTGGC	2640	
CGCCCCAGC	CACCCCTGC	TCTGGCCCT	CCCACCCAGC	ATAGCCAGAA	GCGCCGACGA	2700	
GCTGGCAC	CAGCAGGGG	TCAGGTGCAC	TTTTTAAAA	AGAAGTTC	TGTGCTCACT	2760	
						del one A	

Fig. 2—Sequences of human insulin gene(Korean) and homology with the corresponding region of American insulin gene. The sequence variations are marked as * at four different sites, and the homologous sequence is indicated with ... The starting region of IVS I, CAP site, pre, B, C, and IVS II are also indicated. The TATAAA sequence is underlined.

TGG GAA CTA)와 IP 4를 primer로 사용하여 여러 가지 반응 조건으로 시도 하였으나 충분한 양이 증폭되지 않았다. 그래서 tandem repeat가 끝나는 부분의 RSIP 5(1858-TGG CTA CAG GGC GGG GCT CTT TGG GCT)를 합성하여 IP 4 대신 사용한 결과 성공하였다(Fig. 3).

PCR products의 enzyme digestion—정상인, IDDM, 그리고 NIDDM간의 제한효소의 양상을 보기 위하여 Pvu II, Pst I, Hae II, Acc I 등으로 소화시켜 보았다. 흥미있는 부분인 regulatory region을 여러번 시도해 보았으나 모두 동일하였다(data not shown).

고 찰

정상 한국인의 genomic 인슈린 유전자를 분리하여 염기서열을 결정하므로써 현재까지 보고된 서양인과 비교 분석 한 결과 네곳에 변이가 있었다. Rat 인슈린 유전자 I의 경우 5' flanking 부위에 cell-specific exp-

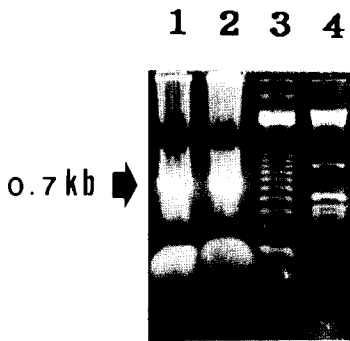


Fig. 3—PCR-amplified human insulin gene polymorphic region fragments: lane 1; KH DNA, lane 2; P DNA(from IDDM patient), lane 3; 123 bp ladder, lane 4; 1 kb ladder. The PCR products of ~0.7 kb were quite distinct.

ression과 cell-specific enhancer로서 작용하는 두 개의 sequence element들이 알려져 있는데, Hogness box를 포함하여 upstream쪽으로 -113까지와 -103부터 -333에 각각 존재한다고 알려져 있다. 인체 인슐린 유전자와 염기서열을 비교하여 보면 tandem repeating sequence가 인체와는 달리 rat에서는 거의 발견되지 않고 있으나, -360까지 만의 염기들에서는 TATAAA sequence를 포함한 -25에서 -30까지, 그리고 remote control sequence로 알려진 -75부터 -90 부위 이외에도 상당한 sequence homology가 유지되고 있다. 흥미있는 점은 G2101(-85) 위치에 rat의 경우에는 AGAG이나 한국인에서는 AGG로 대체 되었으며 이 부위의 염기서열 보존으로 보아 인체에서도 tissue specific expression에 관여할 것이라고 추측할 수 있으나 G→AGG 변화 자체가 인슐린 유전자 발현에 크게 영향을 미치지 않을 것이다. 각각의 IVS에서 일어난 T2401과 A2740의 변이는 intron 제거시 필수적이라고 알려진 exon-intron junction의 보존 염기나 또 branch target sequence에 속하지 않는 것으로 미루어 유전자 발현에는 영향을 미치지 않을 것으로 본다. Intron 그 자체는 단백질을 encode하지 않으므로 생명체가 진화함에 따라 돌연변이 축적이 가능할 것이나 현 단계로서 서양인과 한국인 인슐린 유전자중 어느것이 더 ancient type 인가에 대하여서는 더 많은 연구 후에 비교가 가능할 것이다. 두번째 exon의 5' 끝에 위치하는 C2411의 deletion은

preinsulin의 initiation codon 으로부터 13염기 5' upstream에 존재하는 염기로서 mRNA로 전사는 되나 전이는 되지 않는다. 이 변이는 상당히 흥미로운 결과를 보여줄 것으로 보이나, 이것에 의하여 실제 인슐린 유전자의 발현이 어떤 영향을 받을지에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

또한 본 연구를 통하여 전체 genomic DNA로부터 유전자를 무작위로 절단하여 Genomic library construction 후 원하는 클론을 적절한 probe를 사용하여 선택하는 기존의 방법대신에 PCR을 이용하여 원하는 부위만을 선택적으로 증폭시켜 증폭된 유전자를 직접 벡터의 원하는 부위에 클론하는 기본 기술을 확립하였고, 이를 응용하면 다른 유용 유전자의 one-step 클로닝도 가능할 것이다. 특히 PCR을 이용하여 polymorphic region을 증폭할 수 있음은 Bell¹⁹⁾, Owerbach²⁰⁾ 그리고 Elbein등²¹⁾의 제한효소의 소화에 의한 고전적인 방법보다 신속 정확한 RFLP의 결정으로 그동안 관심있어온 종족간, 환자간의 RFLP와 당뇨병과의 관련성²²⁻²⁴⁾을 연구하는 데 큰 도움이 될 수 있을 것이다.

이상과 같이 한국인 유전자의 염기서열 확정 및 이의 기술축적은 기초연구는 물론 HLA DNA typing 법, β -globin 유전자의 point mutation에 대한 PCR로 hemophilia(혈우병)에 대한 보인자 색출 및 유전상담, AIDS의 원인 바이러스인 HTLV type III에 대한 색출, B형 간염 바이러스, 자궁 경부암의 원인 바이러스로 생각되는 HPV의 typing, 각종 암 유전자와 선천성 대사 이상에서 결손부위의 유전자 확인, 또한 paraffin block으로 영구 고정된 조직에서 특정 유전자의 PCR 및 약 7000년 전의고대 미이라의 뇌조직에서 cytochrome 유전자의 증폭으로 표본의 연대를 추정하는 고고학에 응용할 수 있는 등 날로 발전을 거듭하고 있으며 더 나아가 전 세계적으로 추진되고 있는 인체 게놈 연구사업의 일환으로 이용되어져 이를 토대로 한 의학학 분야에 기여하리라 생각된다.

결 론

근원적인 인류 유전병 퇴치를 위하여는 인체유전자의 염기서열 및 구조 그리고 유전자의 발현 조절 기작에 대한 연구가 절실히 요구 되고 있다.

본 연구는 한국인을 소재로 그 기능과 조직 특이

성은 잘 알려져 있으나 발현 기작에 대해서는 알려져 있지않은 인체 인슈린 유전자의 구조 및 염기서열을 비교 분석 한 결과이다.

1. 서양인의 인슈린 유전자 염기서열과의 차이는 5' regulatory region(G2101→AGG), IVS I(T2401→A), Exon II(C2411 deletion), 그리고 IVS II(A 2740 deletion)에 있었고 그중에서 G2101과 T2401에서의 변이는 서양인의 다른 allele과 일치 하였으나 나머지 두 곳의 변이는 본 실험에서 소재로 한 한국인 allele에서만 발견 되었다.

2. RFLP의 크기를 PCR기술로 간단히 결정 하였다.

3. 정상인과 환자간의 5' regulatory region에 대한 제한효소의 소화 양상은 같았다.

감사의 말씀

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국 학술 진흥재단의 대학 부설 연구소 연구비에 의하여 이루어 졌기에 이에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Owerbach D., Bell G.I., Rutter W.J., Shows T.B., Insulin gene is located on chromosome II in humans. *Nature* **286**, 82 (1980).
- 2) Owerbach D., Bell G.I., Brown J.A., Shows T.B., The insulin gene is located on the short arm of chromosome II in humans. *Diabetes* **30**, 267 (1981).
- 3) Bell G.I., Wainscoat J.S., Old J.M., Chlouverakis C., Keen H., Turner R.C., Weatherall D.J., Maturity onset diabetes of the young is not linked to the insulin gene. *British Med J.* **286**, 590 (1983).
- 4) Laimins L., Holmgren-Konig M., Khoury G., Transcriptional "silencer" element in rat repetitive sequences associated with the rat insulin 1 gene locus. *Proc. Natl. Sci. USA.* **83**, 3151 (1986).
- 5) Schmid C.W., Jelinek W.R., The Alu Family of Dispersed Repetitive sequences. *Science* **216**, 1065 (1982).
- 6) Stumph W.E., Baez M., Beatie W.G., Tsai M., O'Malley B.W., Characterization of Deoxynucleic acid sequences at the 5' and 3' border of the 100 kilo base pair ovalbumin gene domain. *Biochemistry* **22**, 306 (1983).
- 7) Bell G.I., Selby M.J., Rutter W.J., The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature* **295**, 31 (1982).
- 8) Bell G.I., Karam J.H., Rutter W.J., Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 5759 (1981).
- 9) Rotwein P., Chirgwin J., Cordell B., Goodman H.M., Permutt M.A., Polymorphism in the 5'-flanking region of the human insulin gene and its possible relation to type 2 Diabetes. *Science* **213**, 1117 (1981).
- 10) White R., Leppert M., Bishop D.T., Barker D., Berkowitz J., Brown C., Callahan P., Holm T., Jerominski L., Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* **313**, 101 (1985).
- 11) Brissenden J.E., Ullrich A., Francke U., Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* **310**, 781 (1984).
- 12) Bell G.I., Gerhard D.S., Fong N.M., Sanchez-pescador R., Rall L.B., Isolation of the human insulin-like growth factor gene: Insulin-like growth factor II and insulin gene are contiguous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 6450 (1985).
- 13) Karathanasis S.K., Apolipoprotein multigene family: Tandem organization of human apolipoprotein A I, C III, and A IV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 6347 (1985). 11) Bell G.I., Horita S., Karam J. H., *Diabetes* **33**, 176 (1984).
- 14) Kunkel L.M., Smith K.D., Boyer S.H., Borgaonkar O.S., Wachtel S.S., Miller O.J., Breg W.R., Jones H.W., Rary J.M., Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 1245 (1977).
- 15) Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H., One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 2172 (1989).
- 16) Hanahan D., Heritable formation of pancreatic b-

- cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* **315**, 115 (1985).
- 17) Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 463 (1977).
- 18) Chen E.Y., and Seeburg P.H., in *New England Biolabs Manual* 20 (1983).
- 19) Bell G.I., Horita S., Karam J.H., A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes* **33**, 176 (1984).
- 20) Owerbach D., Aagaard L., Analysis of a 1963-bp polymorphic region flanking the human insulin gene. *Gene* **32**, 475 (1984).
- 21) Elbein S.C., Corsetti L., Permutt M.A., New polymorphisms at the insulin locus increase its usefulness as a genetic marker. *Diabetes* **34**, 1139 (1985).
- 22) Rotwein P.S., Chirgwin J., Province M., Knowler W.C., Pettitt D.J., Cordell B., Goodman H.M., Permutt M.A., Polymorphism in the 5' flanking region of the human insulin gene: A genetic marker for non-insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* **308**, 65 (1983).
- 23) Owerbach D., Nerup J., Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene in diabetes mellitus. *Diabetes* **31**, 275 (1982).
- 24) Yokohama S., Am. J. Hum. Polymorphism in the 5' Flanking Region of the Human Insulin Gene and the Incidence of Diabetes. *Genet.* **35**, 193 (1983).