

RFLP법을 이용한 사상체질의 유전적 분석 연구

趙東郁·趙晁晟*

I. 서론

사상의학에서는 선천적으로 결정되어지는 체질에 따라서 동일한 질병, 동일한 증상이라도 그 치료나 예방법이 차동적으로 적용되어야 함을 주장하고 있다(1~2). 선천적으로 체질이 결정된다고 하는 것은 이러한 체질의 차이가 유전적 소인에 기인하는 것으로 말할 수 있으며 따라서 사상의학에서 제시하는 체질적 속성 역시 유전자가 지닌 형질에 내재되어 있는 속성이라 할 수 있다. 한편 사상의학에서 사용하는 체질진단의 방법은 거시적인 방법으로서 다양한 방법이 제시되어 있으나 체질판별에 따른 절대적인 객관성 및 정확성이 부족하여 이를 보완하기 위한 새로운 개념의 판별지표가 개발되어야 할 필요가 있다.

본 연구는 사상체질판별에 필요한 객관성 및 정확성을 보완하기 위한 연구의 일환으로 DNA 수준에서 DNA의 다형성을 연구하는 RFLP(Restriction fragment length polymorphism)법(3~5)을 이용하여 사상체질진단에 의해 분류된 태음·소양·소음인 그룹을 대상으로 각 체질 별로 유의성 있는 유전적 차이가 나타나는지를 조사

하고 검증하여 사상의학의 과학화를 확립하는데 기여하기 위하여 시도되었다.

II. 재료 및 방법

실험재료

DNA를 표지하기 위하여 Boehringer Mannheim의 DIG DNA Labeling and Detection Kit를 구입하여 probe제조에 사용하였다. 전기 영동시 필요한 bromophenol blue·xylene cyanol·ethidium bromide는 Sigma제품을, agarose는 TaKaRa제품을 사용하였다. Genomic DNA를 절단하기위한 restriction enzyme으로는 Hae III를 TaKaRa에서 구입하여 사용하였다. Probe로는 human DNA의 VNTR probe 중에서 Promega사 제품인 GenePrint probe YNH24(6~7)를 사용하였다.

사상체질의 판별 및 혈액 샘플의 채취

사상체질의 판별은 경희의료원 동서종합

* 한국한의학연구원 임상연구부

건강진단센터에 1996년 4월부터 7월까지 내원한 남·여를 대상으로 한국한의학연구원 임상연구부와 경희대학교 한의과대학의 사상의학교실이 공동으로 수행하였다. 유전적 분석 연구에 사용된 혈액샘플은 한국한의학연구원의 임상연구부와 경희대학교 한의과대학의 사상의학교실에서 실시한 체질 판별이 일치한 경우의 개인들로 부터 각 2ml씩 채취하여 사용하였다.

혈액으로부터 제놈 DNA의 분리

혈액으로부터 제놈 DNA의 분리는 Blin과 Stafford(8)의 방법을 변형하여 실시하였다. 혈액 2ml에 4ml의 RBCL 완충용액 (Red blood cell lysis buffer ; 10mM Tris-Cl(pH 8.0), 10mM NaCl, 10mM MgCl₂)을 넣고 잘 섞은 다음 3,000 rpm에서 원심분리하여 적혈구를 제거하고 침전물인 백혈구를 취하였다. 백혈구 침전물에 lysis buffer(10mM Tris-Cl(pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS, 200µg/ml proteinase K)1ml를 넣고 56°C에서 2-3 시간 배양하였다. 1ml의 phenol을 첨가하여 잘 흔들어 준 다음 8,000rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하고, 여기에 phenol 대신 phenol-chloroform을 첨가하고 위의 방법을 반복하였다. 그 결과 얻어진 상층액에 2ml의 cold ethanol을 넣고 섞은 다음 DNA의 침전물이 생기는 것을 확인하였다. DNA 침전물을 유리 막대로 잘 걸어 eppendorf tube에 옮긴 다음 건조시켜서 100-200 µl의 3차 증류수에 용해시켰다. 추출된 DNA는 Minifluorometer(Hoefer Inc., TK0100 model)를 사용하여 정량하였다.

Probe 준비

VNTR probe인 YNH24를 표지하기 위하여 DIG DNA Labeling & Detection kit를 사용하였다. 우선 100°C water bath에서 YNH24 probe DNA를 10분 동안 denaturation 시킨 후에 ice bath에서 hexanucleotide mixture(random primer), dNTP labeling mixture, klenow enzyme, reaction buffer가 들어있는 DIG-High Prime 4µl를 첨가하여 37°C에서 16시간 배양하였다. 여기에 0.2M EDTA(pH8.0)을 2µl 첨가하여 반응을 정지 시킨 후, 4M LiCl 2.5µl, 100 % ethanol 75µl를 첨가하여 DIG-labeled probe를 침전시켰다. -70°C에서 20분간 침전시킨후 원심분리를 이용해 DNA만을 얻어 TE buffer 50µl에 용해시켜서 DIG-labeled probe를 준비하였다.

Genomic DNA 제한 효소 절단

3µg의 genomic DNA에 Hae III를 3 units 첨가하여 37°C에서 16시간 배양한 후에 전기영동을 실시하여 절단된 것을 확인하였다.

Gel electrophoresis

전기영동장치는 Hoefer electrophoresis apparatus model No. HE99X를 사용하였다. Hae III로 절단된 DNA를 1% agarose gel(14cm x 21cm)을 사용하여 100V에서 4시간 전기영동해서 DNA를 separation하고, 이를 EtBr용액(0.5µg/ml)에서 staining

하여 DNA band를 확인하였다.

Southern transfer(DNA transfer)

Agarose gel에 있는 DNA 단편들을 nylon membrane으로 옮기기 위해서 gel 을 denaturation 용액(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에 1시간 담구었다가 같은 용액으로 Trans Vac Vacuum Transfer Unit (Pharmacia Model : 80-6212-43)을 사용하여 2시간 vacuum transfer를 실시하였다. Transfer가 끝난 membrane을 neutralization 용액 (1.5M NaCl, 1M Tris(pH7.5)) 에 10분간 담고, 30분간 상온에서 건조시킨 후에 80°C dry oven 에서 2시간 동안 DNA를 membrane에 fixation시켰다.

Hybridization

Mini-Hybridization Incubator(Robbins Model 1000)를 사용하여 DNA가 고정되어 있는 nylon membrane을 hybridization tube에 넣고, DIG-Easy Hyb solution(20 ml/100cm²) 으로 68°C에서 30분간 pre-hybridization시킨 다음 pre-hybridization용액을 버리고, probe(25ng/ml)를 넣은 hybridization용액 10ml로 50°C에서 16시간 hybridization하였다. 그 후 2xSSC, 0.1% SDS용액으로 2번 washing(5분)하고 0.1xSSC, 0.1% SDS용액으로 2번 washing(15분) 하였다.

Immunological detection

Genomic DNA와 DIG-labeled probe가 hybridization되어있는 nylon membrane을 우선 washing buffer(maleic acid buffer with Tween 20, 3%)에서 5분간 washing 한 후, blocking solution으로 1시간 동안 blocking시켰다. 그 후 anti-DIG-Ap conjugate를 1:5000으로 block solution에 dilution하여 이 용액 20ml에서 nylon membrane을 30분간 배양하였다. 그 후 washing solution으로 washing하여 unbound antibody-conjugate를 제거하고, 10ml의 color substrate solution에 membrane을 넣어 암실에서 16시간 동안 배양하여 원하는 band가 detection되는지 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

RFLP법은 유전적 특성에 따라 DNA 상의 특정한 염기서열을 인식하여 절단하는 제한효소로 DNA를 절단한 후 전기영동으로 분획하고 특이적으로 결합하는 probe를 이용하여 DNA단편 길이의 변이성을 검색하는 방법이다. 본 연구의 RFLP에서 사용한 YNH24 probe는 유전분석 연구에서 널리 사용되는 인체의 VNTR부위의 single locus인 YNH24(2번 염색체에 위치: 2p12)를 탐색할 수 있는 probe로서 인체의 genomic DNA를 Hinf I 또는 Hae III로 절단한 다음에 probe로서 사용된다. 따라서 본 연구에서는 사상체질의 유전적분석을 위하여 사상체질 판별에 의하여 분류된 태음·소양·소음인 각 12인의 genomic DNA를 제한효소 Hae III로 절단한 후에 YNH24를 DNA probe로 사용하여 RFLP

를 실시해서 체질별 DNA polymorphism을 조사하였다.

YNH24를 probe로 사용하여 태음·소양 및 소음인으로 분류된 12명의 genomic DNA에 대한 RFLP 결과를 figure 1, 2, 3에 나타내었다. 본 실험에서 사용한 YNH24 probe가 single locus인 YNH24를 탐색하는 single locus probe이기 때문에 각 lane에서는 대부분 2개의 밴드가 관찰되었고(YNH24의 heterozygosity는 97%로 밝혀져 있음), 1개의 밴드가 관찰된 경우는 homozygous한 경우로 사료되었다.

각 figure의 lane 1-12까지에 나타난 밴드는 YNH24의 allele size를 나타내는 것으로 sample lane 1에 나타난 밴드의 크기를 M lane에 표시한 size marker로 사용한 밴드의 크기와 비교하여 예시로 표기하였다. 체질별로 검출된 밴드의 크기를 산출한 결과, figure 1에 나타난 태음인그룹의 경우는 YNH24 allele size가 1.3 kb 이상에서 3.8 kb 이하의 분포를 보였고, figure 2의 소양인그룹에서는 1.5 kb~3.9 kb, 그리고 figure 3의 소음인그룹에서는 1.3 kb~4.6 kb의 분포를 보였다.

본 실험결과, 전반적으로 나타난 YNH24의 allele size 분포가 다양하여 본 실험의 결과만으로는 YNH24의 allele size 분포가 각각의 체질에 따라서 유의적으로 다른 분포양상을 보였다고 결론을 내리기는 어려울 것으로 사료되었다. 그리고 나타난 밴드의 검출정도가 강하지 못한 경우가 있었는데 이는 southern transfer 과정을 거

친 후에 실제 hybridization에 사용된 DNA의 농도가 single locus의 detection에서 강한 signal을 나타내기에는 부족했던 것 때문으로 사료되었다.

위와 같이 RFLP법을 사용하여 VNTR probe인 YNH24를 probe로 사용하여 태음·소양·소음인에 대한 RFLP pattern을 조사하였다. 연구 결과 RFLP법은 전기영동·southern transfer·probe labelling·detection 과정 등을 거쳐야 하므로 Polymerase Chain Reaction(PCR) 및 전기영동등으로 결과를 얻을 수 있는 DNA fingerprinting(유전자지문법)에서 흔히 사용되는 Amp-FLP(Amplified-fragment length polymorphism)법 및 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 등의 기타 유전분석 방법에 비하여 그 절차가 복잡하고 까다로우며, 시간이 많이 소요되고, 특히 실험에 필요한 DNA 요구량이 많아서 사상체질 판별 후 대상자의 혈액을 취해서 genomic DNA를 분리하여 유전적 분석을 해야만 하는 본 연구를 위한 연구방법으로는 효율적이지 못한것으로 사료되었으나, structural gene 중에서 그 염기서열이 밝혀지고 체질감별에 유용한 판별지표가 될 수 있는 유전자를 선정하여 RFLP를 실시할 경우 이러한 제한요소들을 극복할 수 있는 유용한 결과를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

색인어 : 사상체질, RFLP, YNH24, 유전적 다형성

태 음

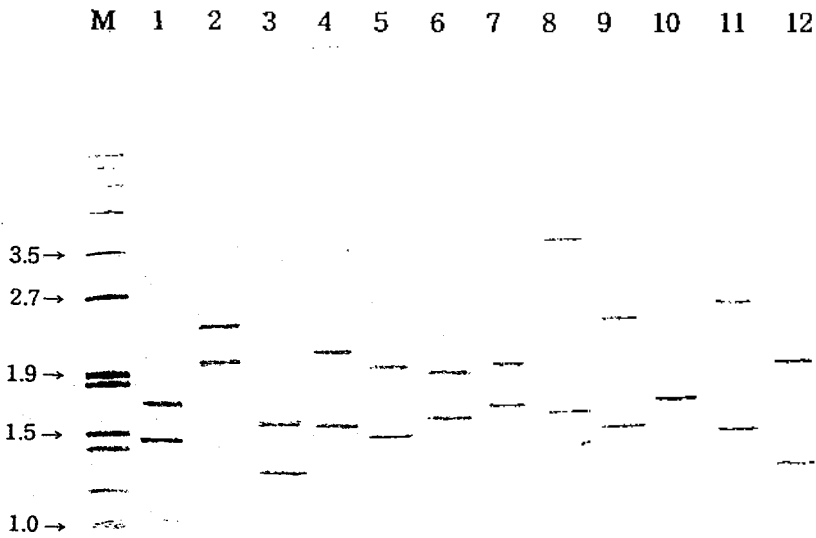


Figure 1. RFLP pattern of Taeum group genomic DNA digested with Hae III and hybridized with DIG-labeled YNH24 probe.

Lane identification : from left to right, M : size marker in kb, sample lane 1 - 12

(example) band size of lane 1 : 1.45 kb, 1.7 kb

소 양

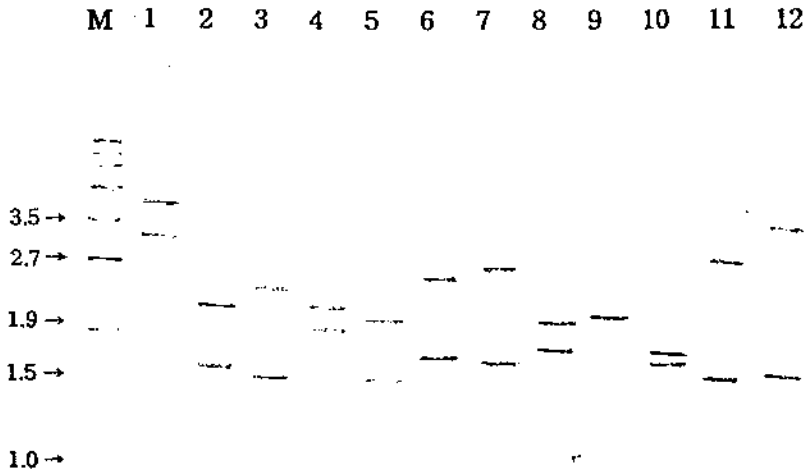


Figure 2. RFLP pattern of Soyang group genomic DNA digested with Hae III and hybridized with DIG-labeled YNH24 probe.

Lane identification : from left to right, M : size marker in kb, sample lane 1 - 12

(example) band size of lane 1 : 3.2 kb, 3.9 kb

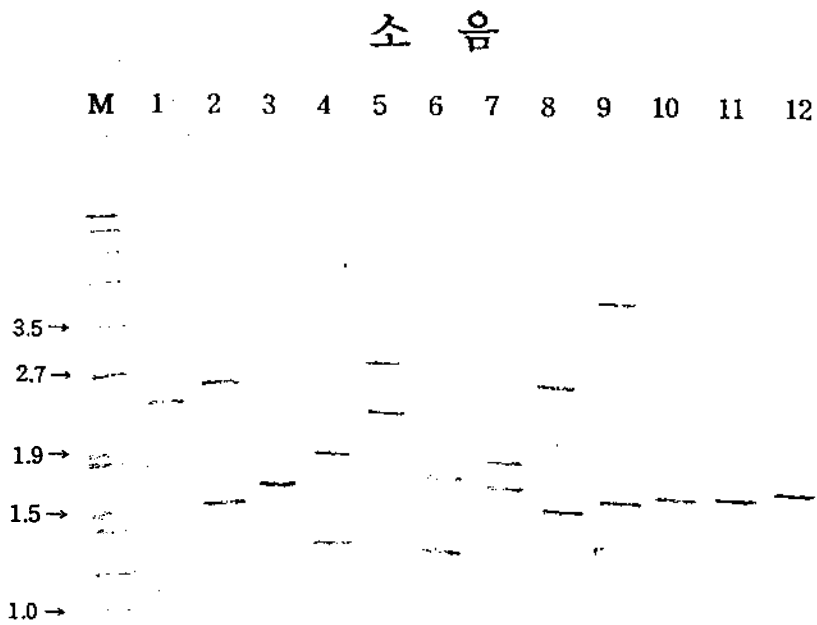


Figure 3. RFLP pattern of Soum group genomic DNA digested with Hae III and hybridized with DIG-labeled YNH24 probe.

Lane identification : from left to right, M : size marker in kb, sample lane 1 - 12

(example) band size of lane 1 : 2.6 kb

참고문헌

1. 조황성 「동양의학의 새로운 가능성, 한국의 사상체질의학 연구」, 『제 1차 한의학과 중의학 학술 세미나 초록집』, 1996: 1-40.
2. 송일병외 15인. 『사상의학』, 서울: 집문당, 1997: 119-128
3. Botstein D., White R. L., Skolnick M. and Davis R. W. 「Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms」, 『Am J Hum Genet』, 1980: 32: 314-331.
4. Krawetz S. A., Bricker R. A., Connor R. B. and Dixon G. H. 「Restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis of bovine nuclear protein genes」, 『Theor Appl Genet』, 1988: 75: 402-409.
5. Rocha J. L., Baker J. F., Wornack J. E., Sanders J. O. and Taylor J. F. 「Statistical associations between Restriction

- Fragment Length Polymorphisms and quantitative traits in beef cattles」, 『J Anim Sci』, 1992: 70: 3360-3370.
6. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M. Martin C., Fujimoto E., Hoff M. and Kumlin E. 「Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping」, 『Science』, 1987: 235: 1616-1622.
7. Nakamura Y., Gillilan S., O'Connell P., Leppert M., Lathrop G. M., Lalouel J. M. and White R. 「Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence pYNH24 on chromosome 2(D2S44)」, 『Nucleic Acids Res』, 1987: 15: 10073.
8. Blin N. and Stafford D. W. 「A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes」, 『Nucleic Acids Res』, 1976: 3: 2303-2308.

Abstract

Genetic Analysis study of Sasang Constitution Classification by RFLP

Dong-wuk, Cho Hwang-sung, Cho*

In Sasang medicine, humen are classified into four constitutions which are Taeyang, Soyang, Taeum and Soum. Depending on each different constitution, the

* Korea Institute of Oriental Medicine

clinical and pharmacological application for the same disease might be different. In this study, genomic DNA of different constitutions(Taeum, Soyang and Soum) were analyzed by Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) to provide scientific and objective references for Sasang classification. The DNA polymorphism for each constitution detected as differences in the length of DNA fragments, after digestion with restriction enzyme Hae III, was investigated using YNH24 as DNA probe.

The allele size of Taeum, Soyang and Soum group detected by YNH24 ranged from 1.3 to 3.8 kb, 1.5 to 3.9 kb and 1.3 to 4.6 kb, respectively. However, the allele size distribution of YNH24 loci of different constitutions was shown to be too variable to be classified as 3 different constitution groups investigated. For further study, it is suggested that the number of each constitution samples for RFLP analysis should be increased and statistical analysis of the allele size distribution should be carried out.

Key Words : Sasang constitution, RFLP, YNH24, polymorphisms