

# 암의 분자유전진단

전남대학교 의과대학 임상병리학교실

서 순 팔

## Molecular Diagnosis in Cancer

Soon Pal Suh, M.D., Ph.D.

*Department of Clinical Pathology, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea*

다양한 분자유전기법이 의학을 포함한 생명 과학 연구와 환자진료 등에 강력한 수단으로 이용될 수 있음은 주지의 사실이지만, 현재 이들을 임상병리 검사실에서 'routine'화하여 환자 진료에 실제로 적용하는 것은 상당히 어렵다. '가장 보편적인 것이 가장 소중하다'라는 말도 있지만, 날로 발전하는 의료수준을 감안할 때 임상 의사들도 현재의 진단검사 수준에만 만족하기 보다 날로 새롭게 소개되는 분자의학(molecular medicine)의 최신 지견을 이해하는 것이 필요하며, 이를 통하여 질병의 병인과 병태생리 등을 새롭게 이해할 수 있다.

국내에서도 1990년대초부터 중합효소연쇄반응(PCR)과 형광동소보합법(FISH)을 비롯한 몇몇 분자유전기법을 실제 임상진단에 적용하여 오고 있지만, 최근에 다양하게 소개되고 있는 새로운 기법에 대한 이론적 접근과 실제적 적용에 있어서는 아직 활발한 토론이 미미한 편이다.

따라서 본 고에서는 분자의학에서 소개되고 있는 최신 기법 및 특히 암의 진단에 적용되고

있는 검사기법을 중심으로 검토하고, 분자의학의 발전과정, 최근의 진전, 장래 등에 관하여 기술하고자 한다.

### I. 분자의학의 역사

1860년대 후반 Miescher가 핵단백(nucleoprotein)을 분리하여 그 성상이 산성물질임을 밝히고 'nuclein'으로 명명한 이래 핵산(nucleic acid)란 용어가 널리 사용되게 되었다. Avery등은 1940년대에 연쇄구균을 대상으로 연구한 결과 유전정보는 이 세균의 DNA속에 있음을 알아냈다. 1950년대에는 Franklin, Wilkins, Watson 및 Crick 등에 의해 핵산의 이중나선 구조가 규명되고, Kornberg에 의해 DNA polymerase가 발견되었다. 1960년대에는 mRNA가, 1970년에는 Temin과 Baltimore등에 의해 역전사효소(reverse transcriptase)가 각각 발견되고, Smith 등에 의한 세균에서의 제한효소(restriction endonuclease)의 발견 및 DNA ligase개념도 이

시기에 이루어졌다. 그리고 재조합 DNA 제조 및 염기서열 분석, 암유전자(oncogene), 암억제 유전자(tumor suppressor gene), RNA 및 ribozyme 등에 대한 연구 등에 큰 진전이 이루어졌다.

한편 1960년대에 방사성 표지된 DNA probe에 의한 hybridization 기법이, 그리고 1975년에는 Southern blot이 각각 개발되었다. 1970년대 중반에 유전자 공학(genetic engineering)의 위험성이 제기되었고, 1976년 최초의 engineering 회사인 Genetech가 설립되었다. 이 무렵에 DNA 다형성(polymorphism)에 의해  $\alpha$ -thalassemia (1976)와 겸상적혈구빈혈(1978)이 각각 진단되었다.

1980년대에 transgenic mice에 의해 'super-mouse'가 탄생하였고, 유전질환의 이해에 있어 이상단백질의 동정에 의한 수준에서 탈피하여 재조합 DNA 기법에 의한 특정 단백질에 상응하는 유전자의 clone을 통해 새로운 정보를 얻게 되는 'functional cloning' 시대가 열렸다. 이어 유전질환의 병인을 이해하기 위한 시도로서 유전자의 염색체내 위치(location) 및 'gene-like' DNA 조각 등에서 직접적인 유전자 추출에 의한 'positional cloning'이 가능하게 되어, 1987년 X 염색체에서 Duchenne 근이영양증 유전자를 동정한 것이 그 첫 예이다. 'Positional cloning' 기법이 소개된 결과, 게놈(genome)에서 actual distances를 보다 쉽게 측정할 수 있게 되었는데, 이를 'physical mapping'이라 하며, 이어 pulsed field gel electrophoresis (PFGE), yeast artificial chromosomes (YAC) 및 FISH 등의 주요 mapping 기법이 개발되었다.

시험관내 핵산증폭기법인 PCR이 1985년 Mullis 등에 의해 소개되고, 이어 많은 변법이 개발되었다. 이 무렵 인체 DNA 다형성(DNA서열의 변이)이 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 및 VNTR (variable number of tandem repeats) 등을 이용하여 많이 보고되면서, DNA 다형성은 유전적 장애의 주요 인자로 간주되기 시작하였다. 역시 1980년대 후반

및 1990년대 초반에 재조합 DNA vaccine이 시도되고, 이어 유전자치료(gene therapy)의 시대가 열리게 되었으며, 자동화된 DNA 염기서열 분석장치와 DNA 합성기 등이 소개되었다. 1988년에 기획되어 2005년 완료목표로 국제간 및 다자간에 시도되고 있는 인체 유전자 및 몇몇 model organism에 대한 Human Genome Project (HGP)가 주목받고 있다.

## II. 인체 암종에서 발생하는 돌연변이

과거 30여년간의 연구결과로 암은 유전적 기초에서 다단계의 과정을 거쳐 발생하며, 일부 암종에서는 유전적 변이가 발생 및 진행의 조직병리학적 병기와 밀접한 관련이 있음이 밝혀졌다. 따라서 유전적 변이는 암의 병기결정과 진단에 중요한 표지자로 간주되고 있으며, 장래에는 종양학에 있어 조기진단 뿐 아니라 발생의 위험군을 알아내고, 진행 및 치료결과를 평가하며 유전자치료 등 여러 효과적인 치료법을 제시할 수 있을 것으로 전망된다.

### 1. 다단계 유전질환으로서 암

암은 유전질환의 특이한 형태로서, 다종의 체세포 돌연변이가 축적되면 암으로 전환된다. 암의 발생과 진행에 유전자 증폭, 결손, 재배열 및 점돌연변이 등 다양한 유전적 변이가 관련되고, 임상적으로 진단 가능한 암의 발생에는 3-8 개의 돌연변이가 내재한다고 알려져 있다. 이렇듯 암의 진행은 기저된 유전적 변이에 따라 계속되며, 그 대표적인 예가 대장암이다 (Fig. 1).

이와 같은 암발생 모델을 이용하여 조기에 유전적 변이를 알아낼 수 있다면, 암발생의 위험인자를 가진 사람에서 예방적 화학요법(chemopreventative regimens) 등 다양한 방법을 시도할 수 있다.

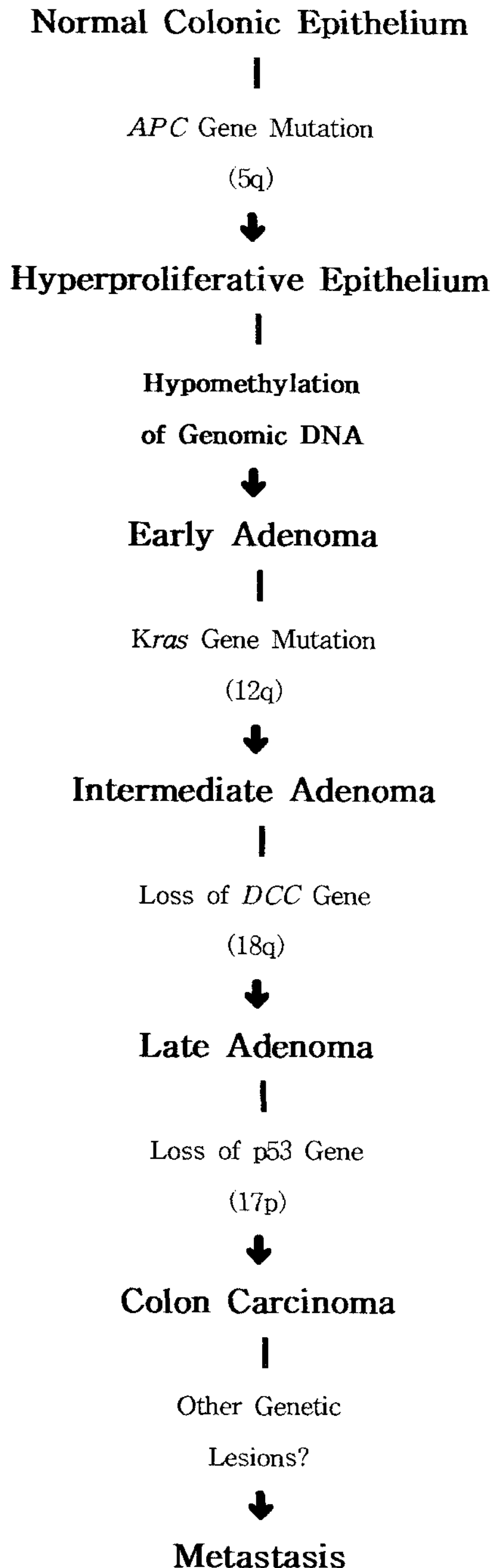


Fig. 1. Colorectal carcinogenesis: the paradigm for mutation driven multistage tumor development.

## 2. 발암에 있어 분자표적(molecular target)과 돌연변이의 기전

인체 암의 발생에는 많은 수의 유전적 target이 관련되는데, 암유전자와 암억제유전자 등이 대표적이다. 암유전자는 정상적인 세포분열에 관여하는 proto-oncogene이 활성화된 형태로, 정상적인 세포분열 및 성장조절 기능이 상실된다. 이와는 달리 anti-oncogene이라고 알려진 암억제유전자의 기능은 정상적인 세포분열 및 분화의 음성 조절인데, 이 기능이 상실되면 이러한 조절기능이 파괴되어 제한되지 않는 세포분열이 지속된다. Proto-oncogene의 활성화 및 암억제유전자의 기능 상실은 이들 유전자의 다양한 형태의 돌연변이에 의해 발생한다(Fig. 2). 암발생의 감수성은 암독성 발암원(genotoxic carcinogen)의 대사능력과 손상된 DNA의 복구 능력 등에 달려 있다. 이러한 기능들의 유지에 연관되어 있는 효소들 중에 한 개 이상이 후천적이나 유전적으로 부족할 경우 proto-oncogene 및 암억제유전자의 유전적 변이의 축적을 가져와 암이 발생한다.

## 3. 대장암: 인체 암발생 및 진행의 유전적 모델

암의 발생 및 진행에 있어 다단계 모델로서 일반적으로 예시되는 것이 대장암이다. 그 유전적 기전은, 1) 대장암은 proto-oncogene의 돌연변이적 활성화와 암억제유전자의 돌연변이적 불활성화에 기인하며, 2) 최소한 4-5개의 유전자 변이가 발암과정에 관여되며, 3) 유전적 변이의 총화가 암발생의 생물학적 특성을 결정하지만, 그 발현의 상대적인 순서는 무관하다는 점 등이다.

대장암의 발생에서 K-ras proto-oncogene과 APC유전자의 돌연변이가 초기에 나타나며, p53과 DCC억제유전자의 변이는 비교적 늦게 나타난다. 대략적으로 대장암의 50%와 1cm이상의 대장 선종(adenoma)에서 ras유전자 돌연변이가

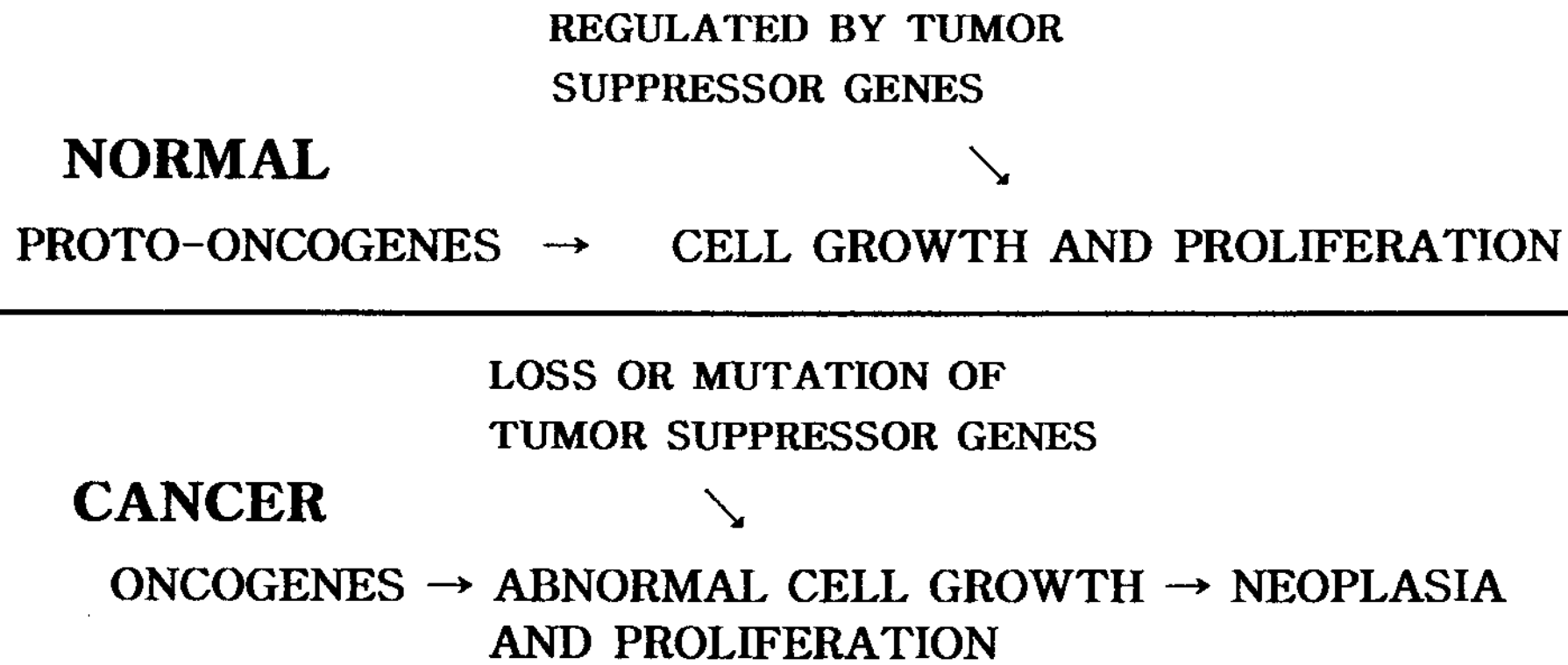


Fig. 2. Interactions between cellular proto-oncogenes and tumor suppressor genes in normal and neoplastic cells.

관찰된다. 즉 대장암 초기에 보이는 *ras* 돌연변이로 미루어 보아 이 유전자의 변이가 대부분의 대장암 발생에 주도적으로 관여한다고 믿어진다. 반면에 70-80%의 대장암에서 17p 및 18q의 allelic loss를 보이며, 대부분의 암에서 17p 염색체 결손에 더하여 p53유전자의 돌연변이가 나타난다.

#### 4. 가족성 암

가족성 암유전자로 판명할 수 있는 조건을 요약하면 다음과 같다. 1) 돌연변이는 암조직 DNA에서 뿐만 아니라 동일한 환자의 구조 DNA (constitutional DNA)에서도 발견되어야 한다. 2) 돌연변이 유전자의 germline 전달은 부모, 자식 및 다른 1세대 친족 중의 구조 유전자 검사상에서도 발견되어야 하고, 상염색체 우성 유전이다. 3) 가족내의 돌연변이 유전자는 발암의 감수성과 연관되어야 한다. 4) 검사기술적인 오류를 배제해야 한다. 5) 돌연변이는 여러 세대에 걸쳐 관찰되고, 대조군에서는 관찰되지 않아야 한다. 6) 동일한 유전자의 돌연변이가 종종 발생하는 다른 종양에서도 나타나야 한다.

가족성 암증후군은 몇몇 가계에서 관찰 보고되었는데, 동일한 암종이거나 아니면 다양한 암종에 의해 발생할 수 있으며, 비교적 어린 나이에, 그리고 선천성인 특징으로 나타난다. 한편 암억제유전자와 연관되어 발생하는 가족성 암은 Table 1과 같다. 이들 유전자의 변이가 발생하면 그 개체에서는 암발생의 가능성이 매우 높아진다. 가족성 암증후군에 이환된 환자 숫자가 적어도, 이들 암 감수성 유전자는 산발성 암의 발생, 그리고 germline돌연변이와 무관한 암의 발생에도 중요한 역할을 한다.

##### 1) 망막아세포종

망막아세포종은 신생아 망막에 발생하는 매우 드문 암으로 RB 억제유전자의 돌연변이에 의한 것이다. 약 40%는 가족성으로서 이 경우 RB유전자의 한 돌연변이 allele이 유전되고, 다른 RB유전자에서 이차적 체세포 돌연변이가 발생하는 이른바 'two-hit' 기전에 의한 것이다. 가족성 망막아세포종은 다발성이며 또한 양측성이다. 전체의 60%는 비가족성, 혹은 산발성인데, 양측 RB allele의 체세포 돌연변이에 기인되고, 이 경우 단안에만 발생된다.

2) Li-Fraumeni 증후군

1969년 Li 와 Fraumeni는 형제나 사촌에서 횡문근육종에 이환된 4가족에 대한 가계연구를 통하여 암발생에 있어 선천성 유인이 있음을 밝혔으며, 이들에게서 높은 빈도로 발생하는 암종은 유방암, 연부조직육종, 뇌종양 및 백혈병 등이었다. 계속된 추적 조사에서 이전에 이환되지

않은 개체에서 새로운 암종이 발생되고, 또한 한 개인에서도 이차적인 암종을 보였다. 특히 2예에서는 발생하는 암종의 종류나 특성이 처음 발생한 암종의 경우와 거의 유사하여 유전적 감수성이 있음을 강력히 암시하였다. 이렇듯 Li-Fraumeni증후군에서 관여되는 암의 감수성 유전자는 주로 p53으로 추측되고 있다.

Table 1. Tumor suppressor genes associated with familial cancers

Gene	Location	Tumor predisposition	Protein function
APC	5q21	Adenomatous polyposis coli	Cytoplasmic protein, function unknown
ATM	11q22-23	Ataxia telangiectasia	Mitogenic signal transduction, mediator of response to DNA damage
BRCA1	17q21	Breast carcinoma, ovarian carcinoma	Function unknown
BRCA2	13q12-13	Breast carcinoma (female and male)	Function unknown
hMLH1	3p21-23	HNPCC	DNA mismatch repair
hPMS1	2q31-33	HNPCC	DNA mismatch repair
hPMS2	7q22	HNPCC	DNA mismatch repair
MSH2	2p22	HNPCC, sporadic colorectal carcinoma	DNA mismatch repair
NF1	17q11	Neurofibrosarcoma, schwannoma, glioma, pheochromocytoma	Protein with anti- <i>ras</i> activity
NF2	22q12	Vestibular schwannoma, meningioma	Cytoskeleton binding protein
p15 <sup>INK4B</sup>	9p21	Melanoma?	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor
p16 <sup>INK4</sup>	9p21	Melanoma?	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor
P53	17p13	Rhabdomyosarcoma, breast carcinoma	Nuclear transcription factor, mediator of cell cycle arrest and DNA repair responses
RB1	13q14	Retinoblastoma, osteosarcoma	Nuclear protein, negative regulator of cell-cycle progression
WT1	11p13	WAGR syndrome, nephroblastoma	Nuclear transcription factor
WT2	11p15.5	Wilms' tumor, rhabdomyosarcoma	Function unknown
VHL	3p25	Von-Hippel-Lindau syndrome, hemangioblastoma, renal cell carcinoma	Membrane protein, function unknown

### 3) 선천성 대장암

대장암의 유전적 감수성은 FAP (familial adenomatous polyposis coli)와 연관되거나, Lynch 증후군이라고도 불리는 HNPCC (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)에서 FAP와 무관하여 나타날 수 있다. 이들 각 조건과 연관된 유전자들은 이미 잘 알려져 있고, 산발적인 대장암의 발생에 중요한 역할을 한다. APC유전자는 염색체 5q21에 위치하며, FAP와, 산발적 대장암의 발생에 관여하는데, 이의 돌연변이에 의해 유전자산물이 비활성화된다.

HNPCC는 전체 대장암의 10%를 이루며, 비교적 어린 나이에 주로 우측 대장에 발생하고, 자궁내막, 위, 비뇨기계 및 유방 등의 대장이외의 장기에 암발생 위험성이 높은 특징을 보인다. 그러나 HNPCC는 그 임상상에서 이질성을 보이므로 검색하기가 쉽지 않으며, 이와 관련된 암종에서는 RER (replication error phenotype)이라는 유전적 불안정성을 특징으로 한다.

### 4) 가족성 유방암 및 난소암

유방암에 대한 선천성 소인은 전체 환자의 5-10%에서 관련된다. 최근에 BRCA1 및 BRCA2 유전자가 가족성 유방암의 원인이 되고, 이외에 제 3의 감수성 유전자도 존재한다. BRCA1 유전자는 난소암 발생에도 역시 관여하며, 유방암에 유전적 감수성을 갖는 가계의 50%와 유방암 및 난소암을 동시에 보이는 가계의 80-90%에서 BRCA1 유전자 돌연변이를 나타낸다. 이들 돌연변이는 노년기 유방암이나 난소암 환자의 약 90%에서 보이지만, 역학조사에 의하면 가계마다 각각의 빈도는 서로 다르다. 제1형 유방암/난소암 증후군에서 유방암의 발생 위험도는 80-90%나 되지만 난소암에 대한 위험도는 30%에 불과하다. 제2형 유방암/난소암 증후군

의 경우는 유방암의 위험도는 70%이지만, 난소암은 85%의 위험도를 보인다.

BRCA2 유전자 역시 어린 나이에 발생하는 가족성 유방암과 밀접하지만, BRCA1와는 달리 남성 유방암과 드물게 관련되고, 선천성 난소암과는 관련이 적다.

### 5) 가족성 흑색종

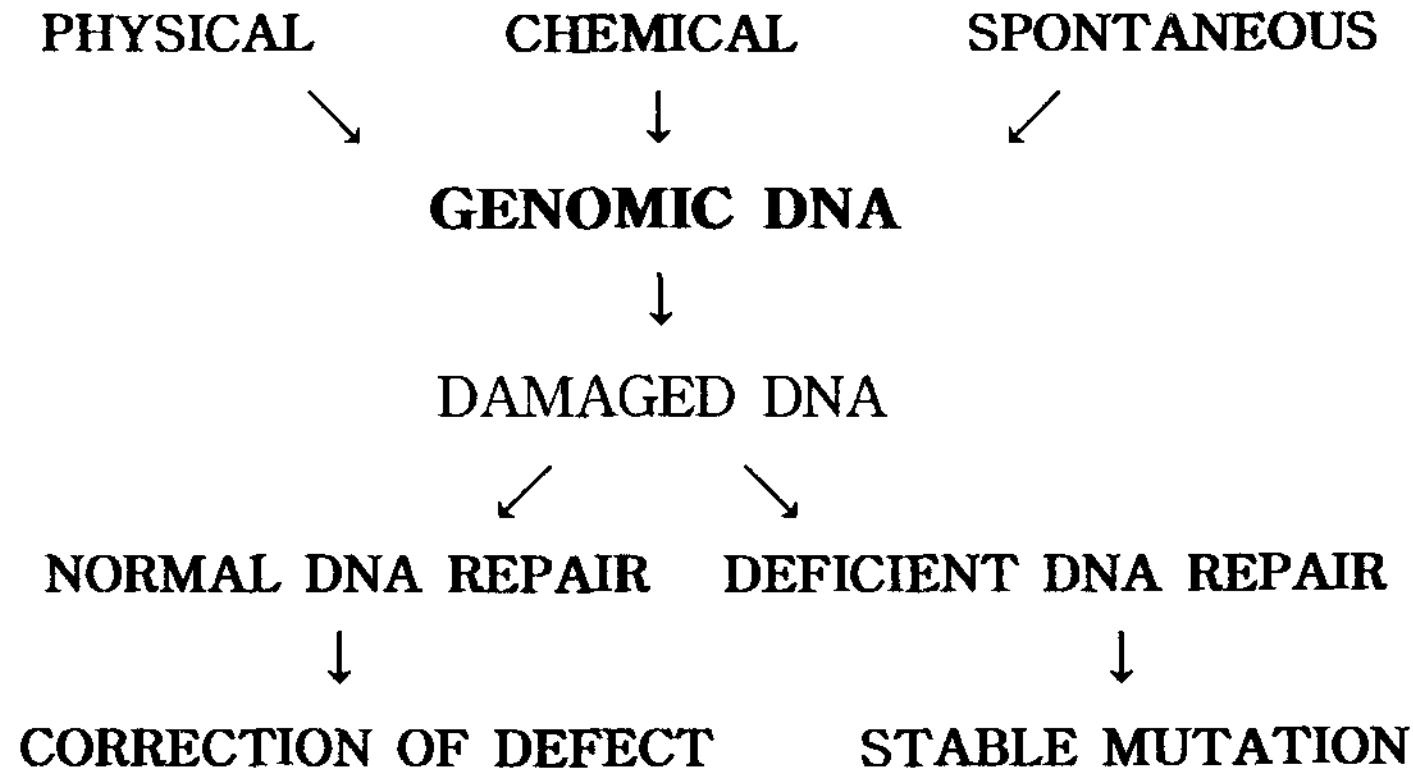
피부에 발생하는 흑색종의 8-12%에서 선천성 유인을 나타내며, 관련 유전자는 주로 염색체 1, 6, 7, 9 및 10 등에 존재한다. 9p21유전자는 MTS1 (CDKN 2, 혹은 CDK 4I)억제 유전자인데, 전체의 75%에서 변이되어 나타난다.

### 6) 선천성 DNA 수복결핍 증후군(repair deficiency syndrome)

DNA수복기전에 장애를 보이는 유전 질환은 xeroderma pigmentosum, Cockayne증후군, trichothiodystrophy, ataxia telangiectasia, Bloom 증후군 및 Fanconi빈혈 등이다.

### 7) 높은 암발생 위험성을 보이는 기타 유전적 증후군

다양한 표현형과 특정의 암 발생 위험성이 높은 선천성 이상질환 증후군에는 von Recklinghausen neurofibromatosis 혹은 제1형 neurofibromatosis (NF 1), 제2형 multiple endocrine neoplasia (MEN 2), WAGR증후군 (Wilms종양, aniridia, genitourinary malformation 및 mental retardation이 특징), Denys-Drash증후군(intersexual disorders, nephropathy 및 Wilms종양이 특징), Beckwith-Weidemann증후군(macroglossia, organomerally, hemihypertrophy, neonatal hypoglycemia 및 다양한 embryonal tumors가 특징)이 있다.



**Fig. 3.** DNA damage, mutation, and repair in cancer development. The DNA of the cellular genome is subject to endogenous and environmentally induced structural damage that can lead to errors in replication and the generation of stable DNA mutations. The proper functioning of DNA repair processes ensures that damaged sites in the genome are repaired prior to DNA replication, whereas, faulty DNA repair mechanisms promote the generation of stable DNA mutations.

### III. 돌연변이 검출법

기쌍이 다른 경우

#### 1. 용어

##### 1) 돌연변이

DNA 염기서열에 어떠한 변화가 일어나는 것을 의미한다. 가장 일반적인 변화는 염기치환, 염기부가, 염기재배열 및 염기결실이다. 가장 빈번한 것은 염기치환이다.

##### 2) 돌연변이의 분류

변화의 성질, 즉 변화된 염기의 수에 의한 방법

###### (1) 점돌연변이(point mutation)

단 한개의 변화된 염기쌍이 존재하는 경우

###### (2) 다중 돌연변이(multiple mutation)

야생형 염기서열과는 두개 혹은 그 이상 염

##### 3) 야생형(wild type)

정상적인 생물체를 구성하는 특성의 총체(표현형, phenotype)를 말한다.

#### 2. 점돌연변이 검출법

##### 1) 선별법 (알려지지 않은 돌연변이[unknown mutation] 검출)

- (1) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)

<원리> 변성제(denaturant: urea, formamide)의 농도나 온도를 높이면 DNA내의 특정 domain들은 특정 melting temperature (T<sub>m</sub>)에서 해리된다. 1 bp의 차이는 T<sub>m</sub>을 1℃ 이상 변화시킨다. 따라서 이 원리를 이용하면 전기영동상에서



분리된 DNA 가닥의 이동상의 차이에 의해 돌연변이와 야생형을 구분할 수 있다.

<변형> 분석하고자 하는 melting domain 수를 증가시키기 위해서는 GC-rich sequence를 PCR primer중에 부착시켜야 한다 (GC clamp). 위와 같은 GC clamp를 이용하면 보다 많은 돌연변이를 DGGE에 의해 검출할 수 있다.

<분절 크기> DGGE에 적합한 핵산 분절의 최대 크기는 1,000 bp까지이다. 분석시간은 핵산 분절의 크기 및 melting domain수에 따라 달라지지만 50-1,000 bp의 경우 7.5-10시간이다.

<검출 돌연변이> sense strand 및 antisense strand로 부터 만들어진 heteroduplexes 및 GC clamp를 부착했을 때 100%에 근접하게 점 돌연변이를 검출할 수 있다.

<검출법> 방사성 표지된 DNA fragments, ethidium bromide (EtBr), silver염색

<Q.C.> DGGE나 TGGE 분석전에 적절한 조건을 확립해야 한다. 상품화된 장비가 있다.

## (2) Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

<원리> 일정한 조건하에서 single-stranded (ss) 핵산은 용액내에서 2차구조를 형성하며, 이는 염기조성, single nucleotide의 변화에 의해 바뀌어진다. 이러한 변화를 전기영동상에서 알아내어 돌연변이와 야생형을 구분한다.

<변형> 초기에 SSCP는 DNA분석에 사용되었으나 현재 RNA 분석에도 사용된다. 특징적인 2차 구조는 DNA보다 RNA에 의해서 보다 빈번히 형성된다. RNA-SSCP는 DNA-SSCP와 비교시 *in vitro* transcription이라는 부가적인 단계가 필요하다.

<분절 크기> 적절한 결과를 얻기 위한 핵산 분절의 크기는 150-200 bp이며, 보다 큰 핵산 조각을 위해서는 RNA-SSCP를 시행해야 한다.

<검출 돌연변이> 핵산 분절의 크기가 200 bp내의 최적의 조건에서 잠재된 염기서열의 변

화 (돌연변이)의 80-90%까지 SSCP에 의해 검출할 수 있다.

<검출한계> 10개 정상세포의 존재하에서 1개의 돌연변이 세포를 검출할 수 있다.

<검출법> 방사성 표지된 DNA fragments, EtBr, silver염색

<Q.C.> 표준화가 극히 제한적이다. Polyacrylamide 농도, fragment size, gel내 glycerol 존재 등에 의해 분석시간(3-6시간)이 변한다.

## (3) Heteroduplex analysis (HET)

<원리> Heteroduplexes는 야생형과 변이 핵산분자의 혼합을 열변성 및 reannealing시켜서 만들고, 이것이 homoduplexes와 전기영동 이동상에 차이가 나는 점을 이용하여 돌연변이를 검출하는 방법이다.

<변형> 전기영동상의 높은 해상도를 얻기 위해서는 polyacrylamide gel 대신 special gel matrices (MDE)를 사용해야 한다. 15% urea의 존재하에서 보다 명확한 밴드를 얻을 수 있다.

<분절 크기> 돌연변이의 검출을 위한 적절한 핵산조각의 크기는 200-600 bp이고, PCR fragments에서 돌연변이의 검출은 900 bp까지이다.

<검출 돌연변이> 돌연변이 검출을 위한 방법 중 선별목적으로 널리 이용된다. 그러나 체계적인 연구 및 문헌이 부족한 실정이다. HET에 의한 점돌연변이의 검출은 80%까지 이다.

<검출한계> 체계적인 연구가 부족하다. 돌연변이 세포:야생형 세포 비가 1:5 이하이면 검출할 수 없다.

<검출법> EtBr, silver염색

<Q.C.> 핵산 조각의 크기에 따라 전기영동 시간이 14시간에서 30시간 까지 변화가 있다.

## (4) RNase A cleavage 법

<원리> 어떤 지정된 조건하에서 RNA:RNA



나 RNA:DNA heteroduplices내의 mismatch는 RNase에 의해 분리된다. 분리후 표지된 핵산 조각을 denaturing gel electrophoresis에 의해 분석한다.

<검출 돌연변이> purine bases의 돌연변이는 비분리 상태로 남기 쉽다. 따라서 RNA:DNA heteroduplices에서는 30-40%의 돌연변이만이 검출가능하다. DNA sense 및 antisense strands을 분석한 경우 검출율은 70%까지이다.

<검출한계> 상세한 정보가 보고되어 있지 않다.

<조각 크기> 분석할 수 있는 RNA의 최대 크기는 1,000 bp까지이다. 이보다 큰 핵산 조각의 분석은 완전한 염기쌍이 위치한 곳에서 비 특이적인 분리에 의한 'high background' 및 RNA:DNA duplices의 불완전한 분리가 발생하여 전체적으로 결과 판독의 어려움이 따라 분석이 어렵다.

<추가> 이 방법은 다른 방법과 비교시 선별 방법으로 적합하지 않다.

#### (5) Chemical cleavage method (CCM)

<원리> heteroduplices내의 mispaired nucleotides는 Maxam-Gilbert sequencing에서 사용된 화학물질에 의해 변형된다. Hydroxylamine은 mispaired cytosine residues와 osmium tetroxide는 mispaired thymine residue와 반응한다. DNA:DNA, DNA:RNA heteroduplices는 화학적 변형 위치 (chemical modification site)에서 piperidine에 의해 분리된다. 만일 sense와 antisense strands가 분석되어 지면 모든 점돌연변이가 검출되어 진다.

<변형> 원래 이 방법은 DNA:DNA heteroduplices의 분석을 위해 고안되었으나 DNA:RNA heteroduplices의 분석을 위해서도 적용되었다. 소량의 돌연변이 alleles를 다량의 야생형 DNA로 부터 검출하기 위해서는 민감도를 분리법 및 fluorescence-labelled fragments에 의해 검출에 의해 향상시킬 수 있다.

<검출 돌연변이> 이론적으로 모든 가능한 돌연변이를 검출할 수 있다. 일부 T:G mismatches는 osmium tetroxide에 의해 변형되지 않는다. 그러나 sense와 antisense strands를 분석하면 모든 종류의 점 돌연변이를 검출할 수 있다.

<검출한계> Fluorescence labelling을 이용하여 10개의 비돌연변이 세포 background에서 1개이하의 돌연변이 세포를 검출할 수 있다.

<분절 크기> 2 kb까지 CCM에 의해 분석할 수 있다.

<검출법> <sup>32</sup>P-end-labeled fragment, <sup>35</sup>S, silver 염색, fluorescence-labeled

<Q.C.> CCM의 가장 큰 단점은 독성물질의 사용이다. 따라서 검사중 몇 단계는 fume hood 내에서 시행해야 한다. 한편 자동화에 제한점이 있다는 것도 단점이다. 장점은 모든 가능한 돌연변이를 검출할 수 있고, 반응산물의 객관적인 측정이 가능하다는 것이다.

#### (6) Enzyme mismatch cleavage (EMC)

<원리> Polymorphic DNA나 야생형 및 돌연변이 alleles의 PCR산물들은 renaturation 및 열변성 과정에 의해 heteroduplices가 생성되는데, 이는 bacteriophage T4 endonuclease VII 혹은 T7 endonuclease I (bacteriophage resolvases) 등에 의해 분해된다. 여기서 얻어진 핵산 조각을 전기영동한다.

<분절 크기> 돌연변이는 1.5 kb까지의 PCR산물에서 검출 가능하다.

<검출 돌연변이> 상기 효소 모두 사용하면 염기결실의 모두와 14개의 점돌연변이중 13개를 검출할 수 있다. 한편 한 개의 효소를 사용하면 검출율이 약간 떨어지는데 11/14 점돌연변이가 검출된다.

<검출 한계> Bacteriophage resolvases가 heterozygous 상태에 적용되어야 한다. 한편 검출할 수 있는 돌연변이 세포와 야생형 세포수

의 비 등에 대한 체계적인 연구가 없다.

<검출법> PCR에 <sup>32</sup>P-labeled primer를 사용하며, PCR산물을 resolvases처리하고 이를 다시 비변성이나 변성조건 polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 자기방사법으로 판독한다. silver 염색도 가능하다.

<Q.C.> 고순도 효소를 사용하여 비특이적인 분해 등의 문제 해결을 해결해야 한다. Homozygous 돌연변이 검체는 특정 신호(signal)를 내지 않을 수 있으므로 이러한 검체에서 돌연변이를 검출하려면 야생형 DNA를 첨가해 주어야 한다. 한편 일부 돌연변이는 resolvase에 의해 인식되기 어려워 DNA의 일부 분획만 분리된다. 이의 기전으로는 돌연변이 resolvase가 만들어져 DNA의 절단을 방해하기 때문이다. Resolvase 사용에 대한 경험도 중요하다.

#### (7) cleavage fragment length polymorphism (CFLP)

<원리> 최근에 소개된 방법으로, 단일 가닥의 DNA가 변성된 후 다시 접힐 때(refolding), 구부러지고(folded), hairpin 모양의 2차구조가 형성된다. Cleavase I endonuclease는 hairpin loop의 5'를 절단한다. 점 돌연변이가 있으면 2차구조물이 변화되어 다른 CFLP 양상을 보인다.

<분절 크기> 2 kb까지 분석이 가능하다.

<검출 돌연변이, 검출 한계> 아직까지 체계적인 연구가 없다.

<검출법> 핵산분절의 검출은 <sup>32</sup>P나 biotin을 부착시켜 알아내고, 변성조건 polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 CFLP양상을 판독한다.

<Q.C.> Capillary electrophoresis 및 fluorescein 부착 primer의 사용할 때 자동화가 가능하다. 대조물질로 야생형 alleles를 본 검사와 동일하게 시행해야 한다.

#### (8) Mutation detection by mismatch binding proteins

<원리> *E. coli* DNA mismatch 수선계(repair system)의 하나인 MutS 단백질이 mismatch된 핵산염기를 포함하는 DNA 분자에 부착하는 성질을 이용하여 돌연변이를 검출한다.

<변형> 야생형과 돌연변이 주의 alleles을 PCR로 증폭한 후 reannealing 및 열변성하여 생성된 heteroduplexes DNA를 MutS 단백질과 반응시켜 전기영동상의 핵산 조각의 이동상의 차이에 의해 돌연변이를 알아내는 방법으로 이는 MutS 단백질이 부착된 heteroduplex DNA는 exonuclease 분해가 되지 않는다는 점을 이용한 것이다. 따라서 고정된 MutS 단백질이 mismatch된 핵산 염기에 부착하면 이 방법은 solid-phase 분석이 가능하다.

<검출 돌연변이> MutS 단백질은 mismatch마다 서로 다른 부착 친화성(affinity)을 나타내며, A:C와 같은 mismatch에는 잘 부착하지 않는다. 또한 MutS 단백질은  $\Delta F_{508}$  3-bp 염기 결실을 포함하는 CFTR유전자 heteroduplexes에 단일 염기 결실을 갖는 heteroduplexes보다 더 강하게 부착한다. 이와 같은 MutS 분석에 의해 CFTR 유전자의 G542X 및 G551D 돌연변이를 성공적으로 검출할 수 있다. 상기 방법의 변형인 MutS 방어분석법(MutS protection assay)을 이용하여 G-A 및 C-T 염기변화를 검출할 수 있다.

<검출 한계> 지금까지 오로지 heterozygous 상황에서만 연구 검토되어졌다. 체계적인 연구는 아직 미진하다.

<검출법> <sup>32</sup>P부착 PCR 산물의 gel mobility shift 분석에 의해 돌연변이를 검출한다. MutS 방어분석법의 경우 핵산에 부착된 형광물질을 이용하여 결과판독을 한다.

<Q.C.> 이 검사법의 정확성은 기본적으로 homoduplexes에 부착하는 배경(background)과 heteroduplexes에 반응하는 MutS의 결과의 구분에 있다. 이들간에 현격한 반응 신호의 차이가 관찰되면 정확하고 깨끗한 검사결과를 얻을 수 있다. 따라서 검사전에 검사실내에서 검사방

법의 표준화 및 재현성 유지에 노력해야 한다.

(9) Protein truncation test (PTT)

<원리> 이 방법은 PCR, 전사(transcription) 및 전환(translation)의 조합으로 이루어진다. PCR산물을 전사 및 전환반응의 주형(template)으로 사용한다. 전환 산물을 전기영동후 분석하여 궁극적으로 점돌연변이를 검출한다. 즉 점돌연변이 혹은 frameshift 돌연변이에 의해 형성된 stop codon은 전환의 미성숙 정지(pre-mature stop)를 야기하여 결국 전환된 단백질의 크기가 작아진다.

<변형> 상기 방법은 mRNA의 역전사로 부터 시작된다. RT-PCR에 의해 만들어진 cDNA 산물을 분석하여 육안적인 재배열이나 돌연변이를 검출해 낸다. 이와는 달리 mutational hotspot regions을 genomic DNA로 부터 증폭시켜 검사에 이용할 수 있다. Chain-terminating mutations은 핵산분절의 cloning에 의해 알아낼 수 있다.

<분절 크기> 4-5 kb 핵산분절은 전사 및 전환이 가능한 PCR산물을 생성한다.

<검출 돌연변이> APC 유전자, BRCA 1 암억제유전자 및 NF1 유전자의 검출에 적합하다. 검출율은 전술한 두 유전자의 경우 80% 이상 그리고 NF1의 경우 대략 70% 정도이다.

<검출 한계> 체계적인 보고가 없다.

<검출법> 생체의 전사는 방사선 물질이 부착된 아미노산의 존재에 의해 알 수 있으며, 전기영동후에 단백질 조각들은 자기방사법에 의해 검출된다.

<Q.C.> 검사 수행을 위한 특별한 장치는 필요없다. Truncated 단백질과 nontruncated 단백질의 전기영동상에서 이동의 차이는 육안으로 판독해야한다. 그러나 크로마토그래피나 capillary electrophoresis를 이용하면 쉽게 이들 단백질을 구분할 수 있다. 또한 이 검사법은 복잡한 단계를 거치므로 검사시 내부 양성대조군을 사용해

야한다.

(10) Allele-specific oligonucleotide (ASO) hybridization on DNA chips

<원리> 상기 방법은 고밀도(high-density)의 oligonucleotide arrays를 만들어 가능해졌다. 염기서열을 알고 있는 oligonucleotide를 적절한 표면위에 고정시키면, target내의 각 nucleotide에 4개의 probe가 선택되어진다. 따라서 1,000 nucleotides의 돌연변이나 다형성을 선별하기 위해서는 4,000개의 probe가 필요하다. 검체의 nucleotide는 고정된 oligonucleotide에 hybridization된다. 이렇게 분석하고자 하는 검체의 nucleotide가 array에 hybridization되면 이 결과를 epifluorescence confocal scanning microscopy에 의해 판독한다. 현재 상품화(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 되어 있다

<변형> 지지체로 surface-modified glass, polypropylene 또는 glass with small patches of polyacrylamide 등이 소개되어 있다. HIV-1 clade B protease (*pr*) gene의 다형성 선별검사 에서 HIV-1 DNA나 RNA는 T3와 T7 RNA promoter sequence를 포함하고 있는 ds DNA amplicon으로 전환된다. 이 PCR 산물은 형광물질이 부착된 RUTP존재하에서 T7 또는 T3 RNA polymerase와 같이 전사된다. 형광물질이 부착된 RNA는 열에 의해 변성되어 조각이 되고 이를 chip에 hybridization 시켜 돌연변이 유무를 분석한다.

<분절 크기> 검사할 DNA나 RNA 분절의 크기는 array위의 probe의 수, 크기 및 염기서열에 달려 있다.

<검출 돌연변이> 앞에서 언급한 *pr* chip의 경우 4주 HIV-1의 sense 및 antisense strands를 각각 98.1% 및 99% 수준에서 돌연변이를 검출할 수 있다.

<검출 한계> 문헌상 검출한계에 대한 구체적인 보고는 없으나 이 방법은 이미 상품화되어 있으므로 이에 대한 구체적인 보고가 뒤따

를 것으로 여겨진다.

<검출법> 이 방법에서는 명확히 구분되는 밴드 양상을 얻기 위해 형광물질을 이용한다. 다양한 종류의 색을 얻을 수 있다는 점도 이 방법의 장점중의 하나이다.

<Q.C.> 실제 대부분 검사실에서 많은 경험이 없으므로 본 검사의 Q.C.에 언급할 구체적인 사항은 일반적인 검사실 Q.C. 조건에 따른다. GeneChip-Scanner (Affymetrix)를 사용하여 결과 판독을 하면 편리하다.

(11) 요약 및 결론

상기에서 설명한 돌연변이 검출을 위한 선별 검사법들에 대한 요약 및 정리는 Table 2와 같

다. SSCP 및 HET가 선별법 중에서 가장 단순하다. HET의 주 장점은 다른 방법과 비교시 반응조건의 최적화가 필요치 않다는 점이다. 그러나 전술한 두 방법의 주 단점은 모든 돌연변이를 검출할 수 없고, 분석할 수 있는 핵산분절의 크기가 제한적이라는 것이다. TGGE나 DGGE를 이용하면 100%에 근접하게 점돌연변이를 검출할 수 있다. 따라서 완벽하게 돌연변이를 검출하려면 TGGE나 DGGE를 사용해야 한다. 그러나 이들 방법의 단점은 분석전에 각각의 PCR 산물마다 최적의 반응조건을 결정해야 한다는 점이다. 현재 대부분의 검사법에서 검출법으로 전기영동을 이용하는데 이는 표준화의 어려움이 뒤따른다. 장래에는 보다 객관적인 측정을 할 수 있는 capillary electrophoresis

Table 2. Methods for detection of unknown point mutations

Method	Maximum fragment size (kb)	Detectable mutations	Detection limit (minimal ratio of mutant to wild-type cells)	Detection methods	Potential for standardization & automation*	Position of mutation defined
DGGE, TGGE	1	Close to 100%	?	Strand labeling; ethidium bromide or silver stains	Limited	No
SSCP	0.2	80-90%	0.1	Strand labeling; silver stain	Limited	No
HET	1	80%	0.2	Strand labeling; ethidium bromide or silver stains	Limited	No
OCM	2	100%	0.1	Strand labeling; ethidium bromide or silver stains	Limited	Yes
PTT	Depends on electrophoretic resolution of proteins	Mutations generating stop codons	?	Radioactive labeling of translated proteins; protein stains	Limited	Yes
DNA chips	Depends on array	Close to 100%	?	Fluorescence stains; epifluorescence confocal scanning microscopy	High	Yes

RNAse A cleavage is not suited for screening purposes because the rate of detectable mutations is too low; the application of enzyme mismatch cleavage of mismatch binding proteins requires additional experience.

\* Standardization and automation may be improved by capillary electrophoresis.

법이 보편화 될 것이다. 상기에서 설명한 방법들은 각기 장단점을 모두 가지고 있는 바 DNA chip기술의 도입으로 이러한 단점들의 대부분이 해소될 전망이다.

## 2) 알려진 돌연변이(known mutation) 검출

### (1) Naturally occurring or primer mediated restriction fragment analysis

<원리> DNA내의 제한효소 인식부위는 제한효소에 의해 선택적으로 잘려지면 다양한 핵산 조각을 전기영동상에서 확인할 수 있다 (RFLP). 그러나 제한효소 작용 부위가 돌연변이에 의해 바뀌어지지 않는 경우 단순한 RFLP에 의해서는 돌연변이를 검출이 불가능하여, mismatched primer를 적용하여 인위적인 제한효소 작용부위를 만들어 다시 제한효소를 처리하여 돌연변이를 검출한다.

<변형> 이 방법에서 'mutant-enriched PCR'은 매우 중요하다. 염기치환의 결과로 비분해 제한효소 인식부위(uncleavable restriction site)가 돌연변이에 의해 만들어 진다. 첫 번째 핵산 증폭후에 야생형 DNA는 제한효소에 의해 분해된다. 동일한 mismatch primer를 이용한 두 번째 핵산 증폭은 이론적으로 돌연변이 alleles에 해당되는 PCR 산물만 증폭된다. 제한효소 분해 산물을 microtiter plate에서 horizontal gel로 이동시켜 결과 판독을 하는 방법을 'microtiter array diagonal gel electrophoresis (MADGE)'라고 한다.

<검출 돌연변이> 모든 종류의 돌연변이의 검출이 가능하다.

<검출 한계> 반복적인 제한효소 분해와 돌연변이 alleles에 대한 PCR을 시행하면  $10^6$ 개의 정상 alleles에서 한 개의 돌연변이 ras alleles를 검출할 수 있다. Mutant-enriched PCR은 대장 및 직장암 환자의 대변에서 돌연변이 K-ras alleles를 선별하는데 적합하다.

<검출법> 일반적으로 agarose gel 전기영동

과 이에 대한 EtBr 염색이 주로 이용된다.

<Q.C.> 위양성을 방지하기 위하여 분석조건을 최적 조건으로 조정해야 하며, 결과가 의심스러울 때는 반복실험과 염기서열 분석에 의해 이를 해결한다.

### (2) ASO

<원리> 20 bp hybrid내 단일 nucleotide의 mispairing은  $T_m$ 을  $-5^\circ\text{C} \sim 7.5^\circ\text{C}$  감소시킨다. 이러한  $T_m$ 의 차이는 oligonucleotide에 의한 DNA내의 단일 nucleotide변화를 특이적으로 검출하는데 충분하다.

<변형> 진보한 방법이 reverse dot-blot법인데, 이는 동일 막위에 서로 다른 oligonucleotides를 고정시켜 놓아 한 번의 반응으로 다양한 다형성이나 돌연변이를 검출할 수 있는 방법이다. 일반적인 전기영동에 의해 구분되지 않은 돌연변이(electrophoretic variant)를 검출하기 위해서는 target sequence와 표지자가 부착된 oligonucleotide의 hybrid를 만들어 온도 구배가 있는 20% polyacrylamide gel을 이용해서 수평적으로 전기영동을 시행한다. 이렇게 하면 적절한  $T_m$ 에서 oligonucleotide는 분해되고, 결합되지 않은 자유 oligonucleotide가 나타난다. 위와 같은 방법을 'profiling of oligonucleotide dissociation gel electrophoresis (PODGE)'라 한다. 예를 들어 Z-mutation을 포함하고 있다고 가정되는  $\alpha_1$ -antitrypsin gene의 조각을 biotinylated primers를 이용하여 증폭한다. Eu-labeled matching primer나 mismatch primer가 존재하는 용액내에서 hybridization를 수행한다. Streptavidin-coated well에 고정화 후에 돌연변이는 세척에 의해 검출되어 진다. ASO hybridization은 DNA chip의 기본 원리이다.

<검출 한계> dot-blot법으로 10개의 야생형 세포에서 한 개의 돌연변이 ras 유전자를 검출할 수 있다. 민감도를 증가시키기 위해서는 PCR 산물의 cloning 및 각각의 돌연변이에 상보적인 probe를 이용하여 각각의 clones을



screening해야 한다.

<검출법> 원래는  $^{32}\text{P}$ 부착 primer를 이용하였다. Direct 혹은 reverse dot blot에서는 avidin-peroxidase conjugate가 biotinylated oligonucleotide (probe)와 함께 사용된다.

<Q.C.> ASO검사의 특이성은 hybridization 조건의 정확한 조절에 달려 있다. Solid-phase 에서  $T_m$ 에 따른 염기조성의 영향은 hybridization 동안에 tetramethylammonium chloride를 첨가하여 극소화시킬 수 있다. Direct 혹은 reverse dot blot에서 signal intensity의 제한이나 간섭을 배제하려면 고정된 oligonucleotide의 농도를 적절히 조절해야 한다. 각 검사마다 양성 및 음성 대조군을 포함시켜 검사의 오류 유무를 점검해야 한다.

### (3) Allele-specific amplification (ASA)

<원리> PCR을 두가지 반응으로 각각 시행해야 하는데, 첫 번째 반응에서는 야생형 염기서열에 상보적인 5' primer를 사용하고, 두 번째 반응에서는 돌연변이나 다형성에 대해 상보적인 5' primer를 사용한다. PCR산물은 당연히 target 염기서열과 primer사이의 일치에 있을 때 생성된다. 따라서 돌연변이 DNA나 야생형 DNA중의 하나만이 증폭되게 된다. 이와 같은 원리를 기초로 서로 다른 2가지의 방법이 개발되어 있다. 하나는 primer의 5' 끝에서 mismatch로 인한 primer elongation이 없는 것에 기초한 방법인데 이를 'amplification refractory mutation system (ARMS)', 'allele-specific PCR (ASPCR)', 'PCR amplification of specific alleles (PASA)' 또는 ASA법 등이라 한다. 다른 방법은 mismatch가 primer내에 위치하여 mispair가 발생시 primer annealing을 방해 한다는 점에 기초한 것으로, 이를 'competitive oligonucleotide priming (COP)' 또는 'color complementation assay (CCA)' 라고 한다.

<변형> Tetra-primed PCR을 사용하는 ASA법, 즉 2개의 annealing 온도와 4개의

primers를 사용하는 방법으로 한 번의 PCR로 서로 다른 몇 개의 alleles를 구분할 수 있다. PCR amplification of multiple specific alleles (PAMSA)법은 한 개 혹은 다른 하나의 alleles를 증폭할 수의 쌍을 한 번의 반응에 적용하는 방법도 있다. 다른 방법으로 '이중 ARMS법'도 있다.

<검출 돌연변이> 적절한 분석조건이 확립되면 모든 종류의 mismatches를 검출할 수 있다.

<검출 한계> Homozygous나 heterozygous 상태의 분석에 유연성 있고 정확한 방법이다. 돌연변이 세포수와 야생형 세포수의 비가 낮거나, 돌연변이 allele의 실제적인 분획을 모를 경우 검사의 특이성에 치명적이다.

<검출법> 다른 분석법과 비슷하다.

<Q.C.> 위양성 및 위음성 가능성이 주요 단점이다. 위양성 결과는 오염이나 불완전한 extension에서 기인한다. 위와 같은 단점을 극복하기 위해서는 검사법의 표준화 및 target DNA양을 정확히 조절해야 한다. 한편 대조군의 사용은 필수적이다.

### (4) Single nucleotide primer extension

<원리> 이 방법의 원리는 ASA법과 유사하다. 이는 표지자가 부착된 단일 nucleotide에 의해 primer의 3' 끝의 확장(extension)에 그 기초를 두고 있다. 이와 같은 확장은 primer 3' 끝에 인접한 target DNA의 nucleotide가 표지된 단일 nucleotide와 서로 상보적일 때 일어난다. 이 방법은 일명 'minisequencing'으로 알려져 있다.

<변형> Dideoxy sequencing법에 기초한 하나의 변형된 방법이 있다. Primer 3' 끝은 돌연변이 nucleotide의 upstream에 위치하고 있다. 돌연변이 nucleotide에 상보적인 dideoxy nucleotide를 사용하여 primer extension이 야생형 allele에서 보다 돌연변이 allele에서 조기에 종결된다.

<검출 돌연변이 및 검출 한계> 상기 방법으



로 모든 가능한 형의 nucleotide의 변화를 검출할 수 있다. 검출 한계에 대한 체계적인 보고는 없다.

<검출법>  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$  및 digoxigenin을 nucleotide의 표지자로 사용한다.

<Q.C.> 이 방법은 양성신호의 정량화가 전기영동 과정없이 가능하므로 자동화에 적합하다. 비방사성 자동화 solid-phase 분석법(nonradio-

active automated solid-phase assay)이 소개되고 있다.

(5) Oligonucleotide ligation assay (OLA)

<원리> 2개의 primers가 가능한 다형성 및 돌연변이 위치의 DNA염기서열에 상보적으로 hybridize 된다. 첫 번째 primer 3' 끝은 target

Table 3. Methods for detection of known point mutations

Method	Detectable mutations	Detection limit (minimal ratio of mutant to wild-type cells)	Detection methods	Performance and quality assessment
Restriction fragment analysis	All base exchanges that destroy recognition sequences for restriction enzymes	Without enrichment: 0.05 Mutant enriched: $10^{-4}$ - $10^{-5}$	Electrophoresis; ethidium bromide staining of fragments; solid-phase formats possible	Robust technique; Taq polymerase errors may create false-positives in mutant-enriched PCR
ASO	All base exchanges	Without cloning: 0.1 Screening of cloned PCR products: $10^{-4}$ - $10^{-5}$	Direct and reverse dot blot, other solid-phase formats(DNA chips); electrophoresis; radioactive labels; nonradioactive labels (e.g.,biotin, fluorochromes)	Depeds on particular technical modifications; Taq polymerase may create false positives in ASO with cloned fragments
ASA	All base exchanges	$10^{-4}$ - $10^{-5}$	Electrophoresis; solution phase; radioactive labels, nonradioactive labels (e.g.,fluorochromes)	Ratio of mutant to wild-type alleles must be in a defined range to avoid false results; automation feasible
Single nucleotide primer extension	All base exchanged	?	Solid-phase assays; radioactive labels; nonradioactive labels (e.g., digoxigenin)	Ratio of mutant to wild-type alleles must be in a defined range to avoid false results; automation feasible
OLA	All base exchanges	?	Electrophoresis; capture of biotinylated oligonucleotide in solid-phase formats; radioactive labels; nonradioactive labels (e.g., fluorochromes)	Salt and enzyme concentrations critical; automation feasible

DNA와 완벽히 결합한다. 바로 근접해서 두 번째 primer 5' 끝이 위치한다. 이때 2개의 primer는 DNA ligase에 의해 부착된다. 만일 첫 번째 primer 3' 끝에서 mismatch가 일어나면 ligation은 일어나지 않는다.

<변형> 첫 번째 primer의 5' 끝에 biotinylation 시키고, 두 번째 primer는 3' 끝에 <sup>32</sup>P나 fluorochrome을 표지시켜 상기 검사를 시행하는 변형된 방법이 소개되었다.

<검출 한계> 실제적으로 민감도 및 특이도에 대한 연구보고는 없다.

<Q.C.> Ligation은 salt농도와 ligase와 DNA 사이의 농도비에 의존한다. 위음성의 결과는 고농도 salt와 저농도 ligase가 적용되었을 때 발생한다. DNA 추출의 표준화는 필수적이며, 양성 및 음성 대조군을 매 분석마다 사용해야 한다. OLA의 자동화가 소개되었다.

(6) 요약 및 결론

이상에서 설명한 알려진 돌연변이, 작은 염기

결손이나 삽입을 검출하는 방법은 Table 3에 요약되어 있다. 많은 수의 서로 다른 돌연변이나 다형성을 검출하기 위해서는 DNA chip기술이 가장 좋은 방법이다. 현재는 mutant-enriched PCR과 관련있는 primer-mediated restriction fragment analysis가 많은 야생형 alleles에서 소수의 돌연변이 alleles을 검출하는데 가장 적합하다. 한편 이 방법은 비교적 기술적으로 비교적 간단하고 충분한 민감도를 가지고 있다.

IV. 혈액종양의 분자유전진단

1. 림프계 종양: 비호지킨림프종, 급성 및 만성 임프구성 백혈병

림프계 종양의 분자유전학적 진단은 B 및 T 세포의 clonality 증명, B 및 T 세포계 결정, 염색체전좌(chromosomal translocation) 및 미세잔류병(minimal residual disease) 검출에 초점이 맞추어 진다.

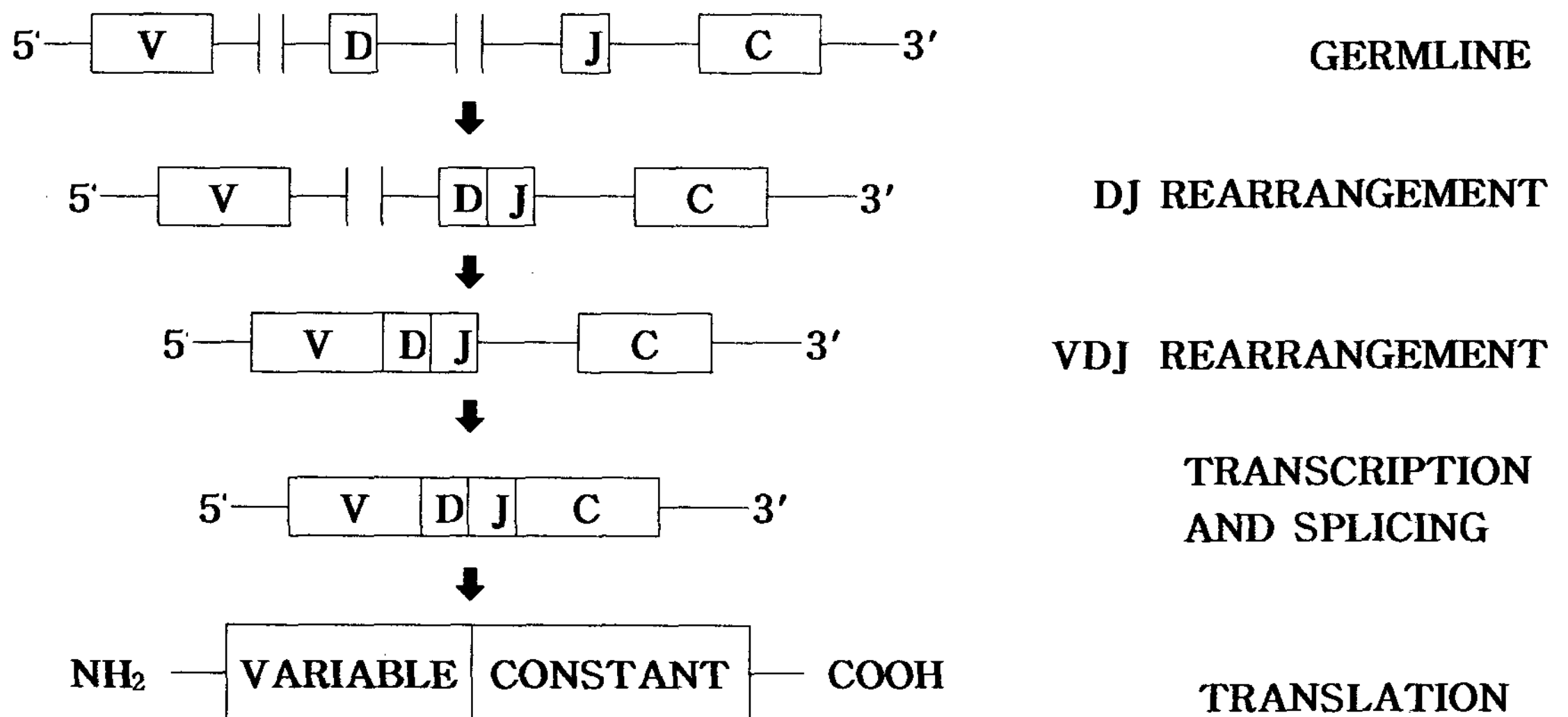


Fig. 4. Schematic diagram illustrating the sequential steps involved in immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements.

1) B세포 면역글로부린 및 T세포 수용체유전자(receptor gene) 재배열

B세포 면역글로부린 및 T세포 수용체는 정상 림프구에서 항원 인지과정에 관여한다. 이들은 variable (V) 및 constant (C) 부위로 구성된다. 이중 V부위가 항원 인지에 연관되어 있다. 정상에서 이들이 기능적인 수용체 단백질이 되려면 일련의 DNA 재배열 과정을 거친다. 이를 간략히 살펴보면 다음과 같다. DNA 재배열이 일어나지 않는 germline 상태에는 V부위를 암호화하는 exon에는 V, diversity (D) 및 junctional (J) 분절이 있고 C부위를 암호화하는 C 분절이 있다. 첫 번째 재배열은 D와 J분절 사이의 DNA분절의 결실이 발생하여 D와 J가 불

어있는 DJ 재배열이 일어난다. 한편 이와 같은 비슷한 재배열로 5'끝에 위치한 V분절이 DJ 분절과 합해져 VDJ 재배열이 발생한다. 계속해서 비암호화 염기서열의 결실을 유도하는 mRNA의 splicing에 의해 VDJC 재배열이 완성되고 이에 따른 VDJC mRNA를 생성하여 면역글로불린 및 T세포 수용체를 만든다. 많은 수의 V, D, J 및 C는 이상과 같은 재배열에 의한 수많은 조합을 만들어 각기 다른 항원에 대한 서로 다른 항원수용체를 만든다. 면역글로불린 중쇄 유전자는 V, D, J 및 C 분절의 수가 각각 100, 30, 6 및 9개가 있다. 한편 T세포수용체  $\beta$  유전자는 75-100개의 V 분절 및 2개 직렬로 늘어선 DJC 복합체가 있다(Fig. 4, 5).

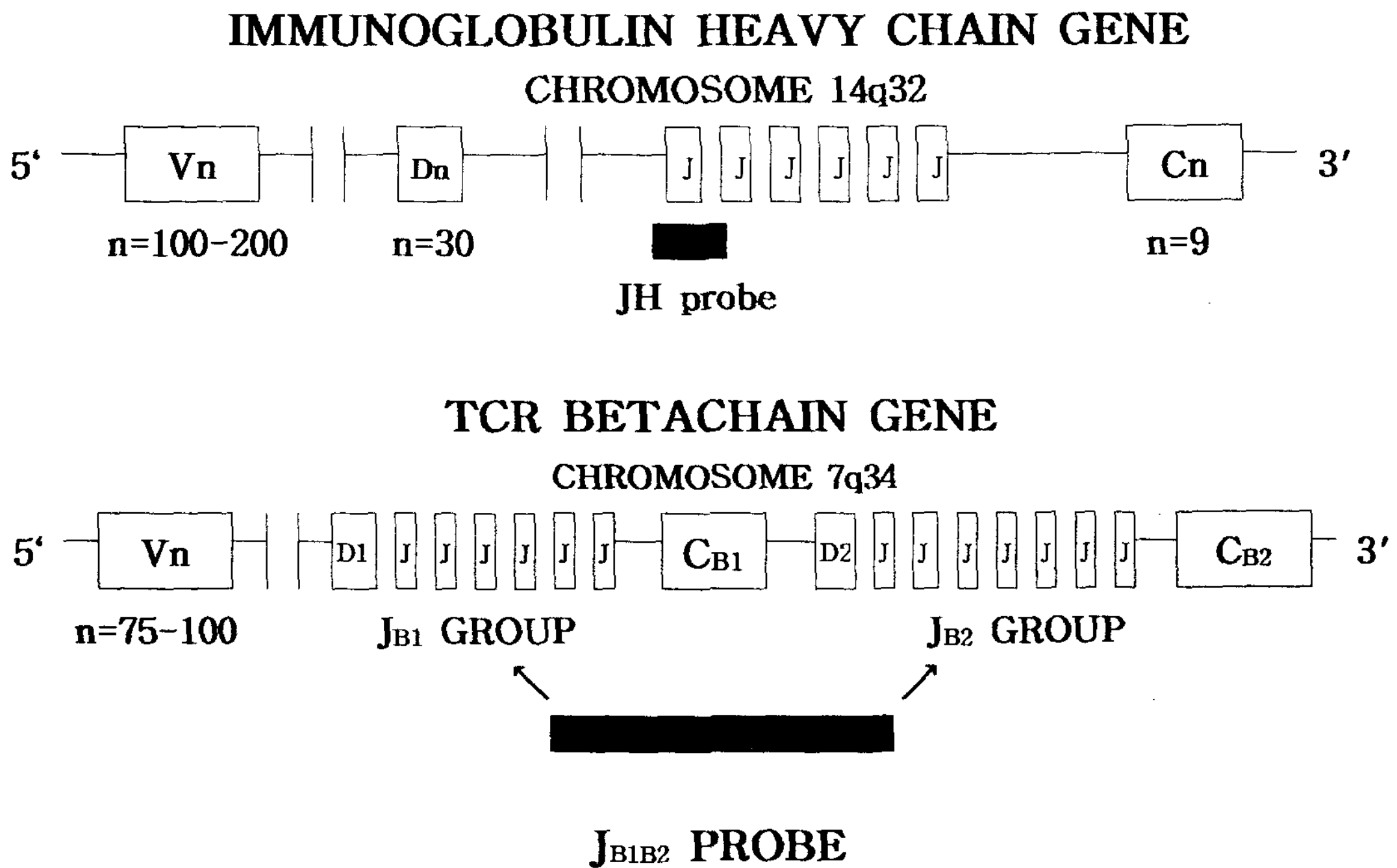


Fig. 5. Schematic diagram of the immunoglobulin heavy chain and the T-cell receptor  $\beta$  chain supergene families. To detect B-cell heavy-chain gene arrangements by Southern blot analysis, a J<sub>H</sub> probe, which recognizes heavy chain J segments is used. To detect T-cell receptor  $\beta$  gene rearrangements, a J<sub>B1B2</sub> probe, which recognizes J segments in both the J<sub>B1</sub> and J<sub>B2</sub> groups, is used.

2) Southern blot와 B/T 세포 clonality 결정

Southern blot은 clonality결정에 매우 민감하고 특이적이다. 그 순서는 DNA추출, 제한효소 처리, nylon막으로 DNA분절들을 이동시킨 후 DNA probe를 이용한 hybridization 및 판독 등의 순으로 진행된다. 검체는 말초혈액, 골수천

자액 및 체액 등 신선 검체나 동결 검체 모두 가능하다. 제한효소로는 *EcoRI*, *HindIII* 및 *BamHI* 등이 흔히 이용된다. B세포 clonality를 검사하기 위한 probe로는 heavy chain J분절을 인식하는 J<sub>H</sub>와  $\kappa$  light chain의 J분절을 인식하는 J<sub>K</sub>가 사용된다. T세포 clonality를 검사하기 위한 probe로는 J<sub>B1B2</sub> 및 CT<sub>B</sub>가 있는데 이들은

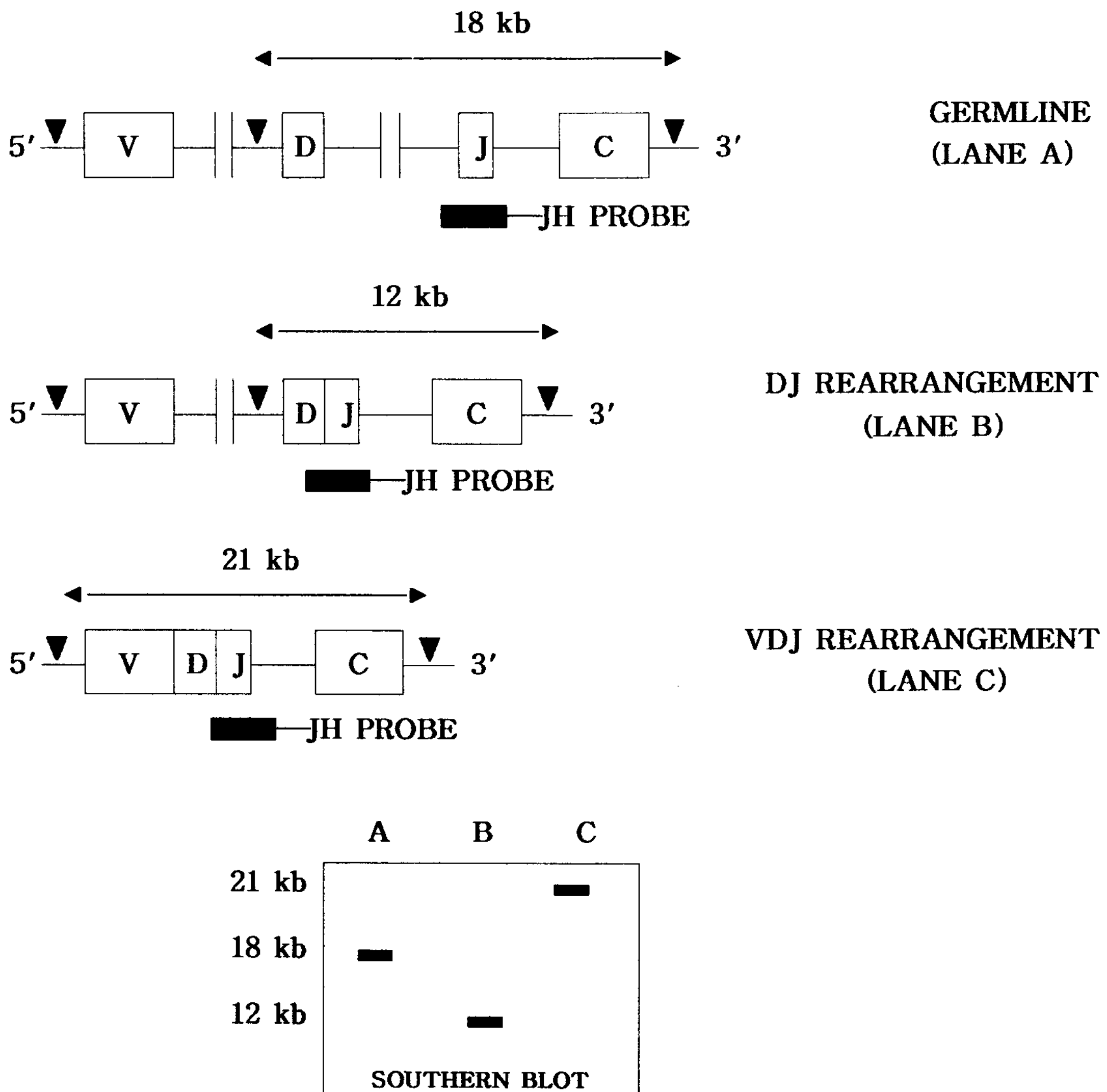


Fig. 6. Schematic diagram illustrating the Southern blot approach for detecting B-cell gene rearrangements. Arrowheads identify restriction enzyme cleavage sites.

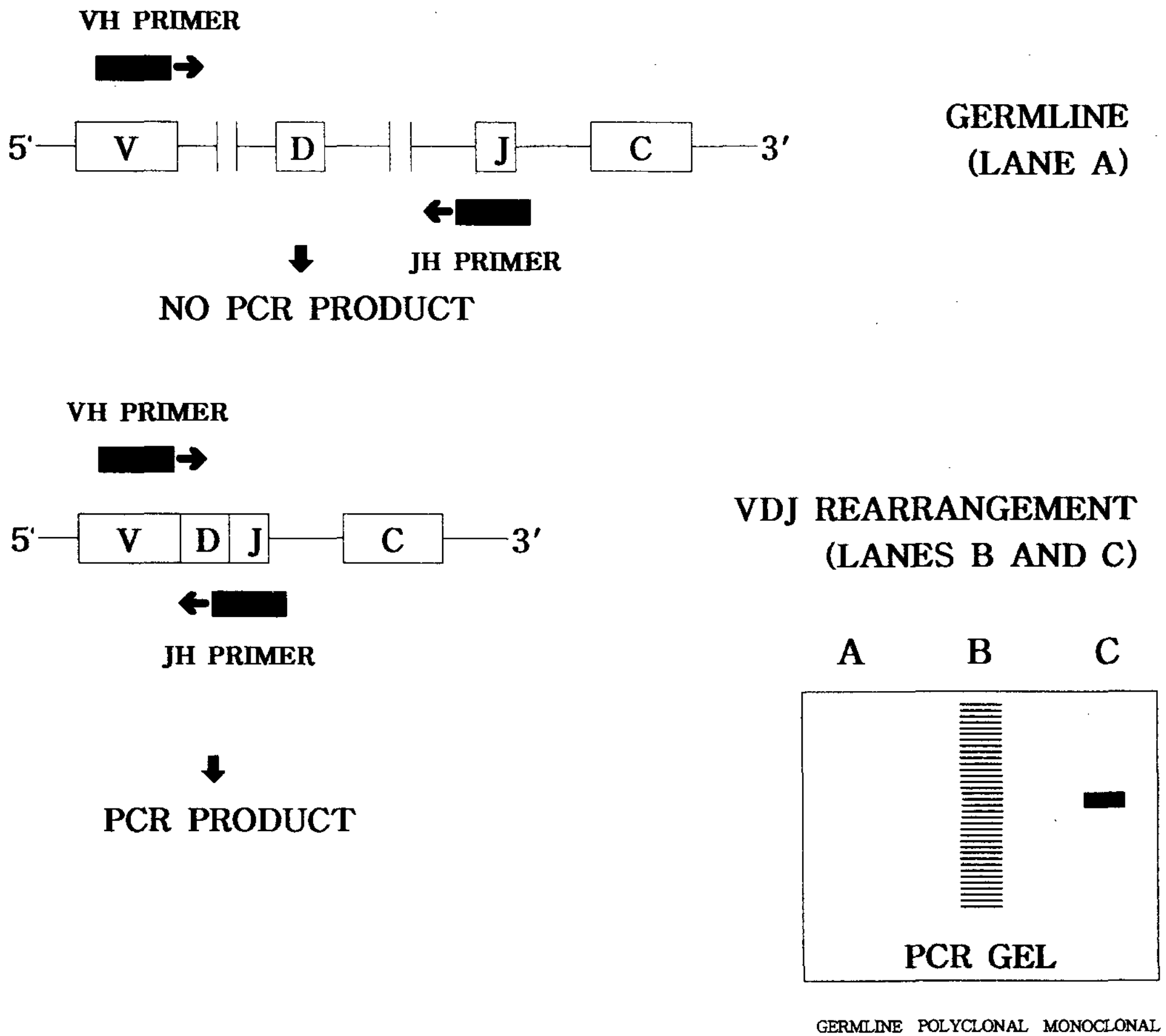


Fig. 7. Schematic diagram illustrating the PCR approach for detecting B-cell gene rearrangements.

각각 두  $\beta$  chain의 J 및 C분절을 인식한다. Fig. 6은 Southern blot를 이용한 B세포 유전자 재배열을 보여주고 있다.

### 3) PCR과 B/T세포 clonality

면역글로블린과 T세포 수용체의 V부위를 암호화하는 DNA의 염기는 다양성을 가져 각각의 면역글로블린과 T세포 수용체 항원 인식부위에 따라 특이한 염기서열을 가진다.

Fig. 7은 PCR을 이용한 B세포 clonality 분석의 개념을 도식화 한 것으로 germline상태에서

는 V와 J분절 사이가 크게 떨어져 있어 PCR 산물이 생기지 않으나 VDJ 재배열이 발생한 경우  $V_H$ 와  $J_H$  consensus primer에 의해 PCR 산물이 생김을 도식화하여 보여준 것으로 이를 통하여 clonality를 검사한다. 이와 같이 PCR을 이용한 clonality 검사가 Southern blot보다 좋은 이유는, 소량의 DNA로도 검사가 가능하고 추출된 핵산의 질이 낮아도 되어 파라핀포매 조직을 이용한 검사도 가능하다는 점이다. 그리고 민감도가 뛰어나 0.1% clonal 림프계 세포군을 검출해 낼 수 있다. 그러나 이 방법은 Southern blot과 비교시 부분적 재배열 (DJ 재

배열), 염색체 전좌 및 항원 수용체 유전자 부위를 침범하는 체세포돌연변이가 있는 경우 상기에서 언급한 V와 J primer가 이를 인식하지 못해 위음성 결과를 초래할 수 있다는 단점이 있다.

#### 4) 비호지킨림프종에서 염색체 전좌

백혈병과 림프종에서 염색체 전좌는 염색체

에서 다른 염색체로의 proto-oncogene의 전이와 관련되어 있다. Proto-oncogene은 정상적인 세포 유전자로 세포의 성장과 분화를 조절한다. 이는 세포의 성장과 분화를 촉진하는 category I, 암억제유전자와 같이 세포성장 및 분화를 억제하는 category II와 세포 사망이나 apoptosis를 조절하는 category III 등으로 구분된다.

다음은 림프종 발생에 관계되는 proto-oncogenes의 예이다. 1) c-myc, 이는 category

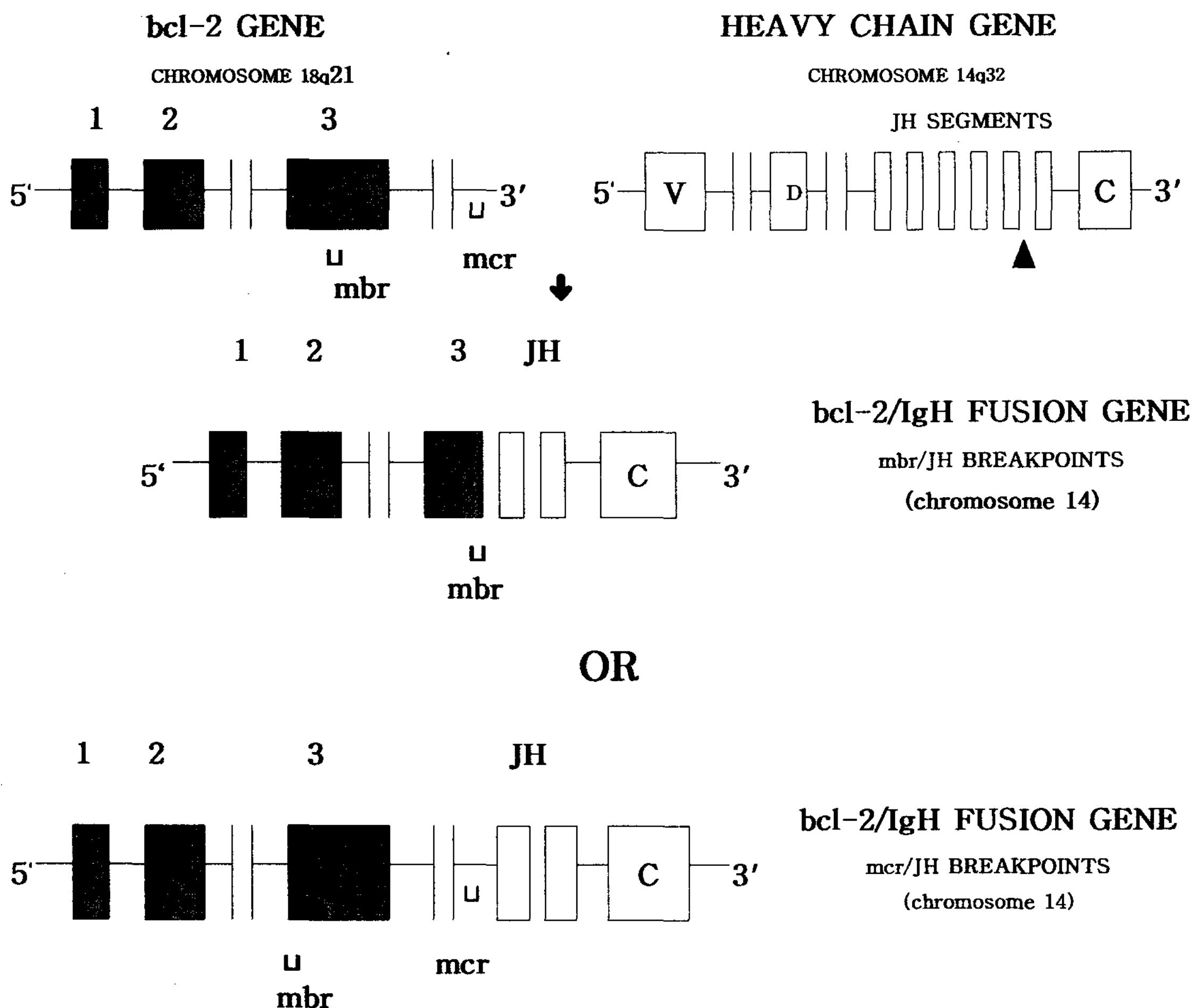


Fig. 8. Schematic diagram showing the translocation of *bcl-2* from chromosome 18 (shaded boxes) to the heavy-chain gene (IgH) on chromosome 14 (open boxes) resulting in a *bcl-2*/IgH fusion gene. For *bcl-2*, most breaks occur in either the mbr or mcr regions. Breakpoints in the heavy-chain gene involve JH segments (arrowhead). The translocation may involve mbr and JH breakpoints (middle panel) or mcr and JH breakpoints (lower panel).



I에 속하고 정상적으로 8번 염색체에 위치하고 있다. Burkitt 림프종의 발병에 관련있는데 *c-myc* 유전자가 8번 염색체에서 14번, 2번 이나 22번 염색체의 heavy chain 이나 light chain 유전자 위치로 이동할 경우 조절불능의 상태의 유전자가 된다. 2) *bcl-1* 역시 category I에 속하고 11번 염색체에 정상적으로 존재하는 PRAD-1 cyclin 유전자를 포함하고 있어 이는 세포주기를 조절한다. Mantle cell 림프종에서는 t(11;14)가 관찰되는데 11번 염색체에 있던 PRAD-1 유전자가 14번 염색체로 이동할 경우 PRAD-1의 비조절에 빠진다. 3) *bcl-2*는 category III에 속하고 정상적으로 18번 염색체에 위치한다. 이 유전자가 14번 염색체의 heavy chain으로 이동할 경우 세포고사(apoptosis)를 조절하는 기능

을 상실하여 여포성 림프종(follicular lymphoma)이 발생한다.

Fig. 8은 *bcl-2* 유전자의 전좌를 설명하고 있는 그림으로 18번 염색체에서 전좌시 염색체 절단은 major breakpoint cluster region (mbr)에서 50-75% 발생하고 minor breakpoint region에서 20-40% 발생한다. Fig. 9는 PCR을 이용하여 *bcl-2* 유전자의 재배열을 설명한 그림이다.

## 2. 호지킨 병

면역학적으로 Reed-Sternberg (RS) 세포가 B 및 T 세포 기원으로 밝혀졌음에도 불구하고 PCR이나 Southern blot에 의해 이의 clonality

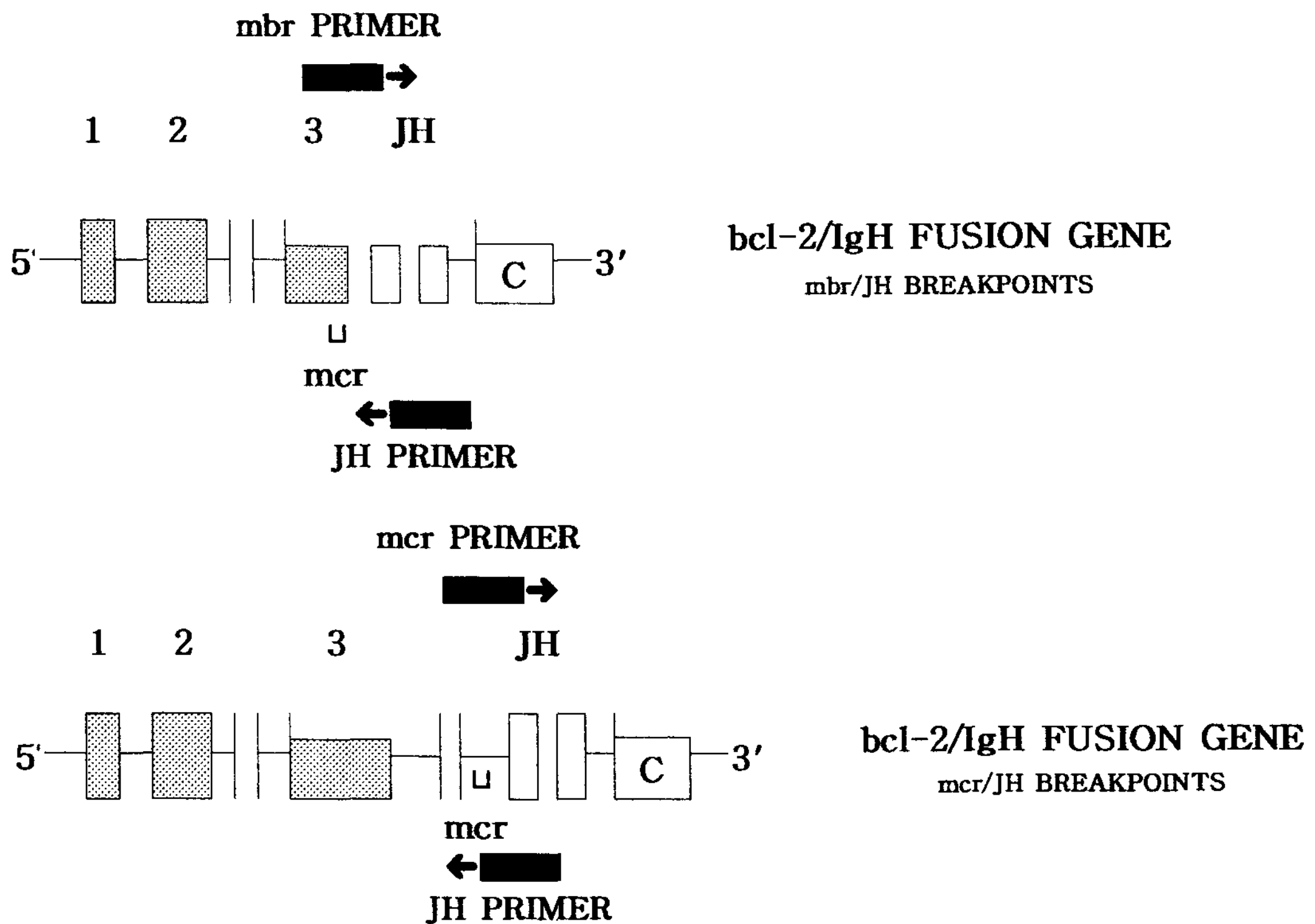


Fig. 9. Analysis for *bcl-2*/IgH gene rearrangements by PCR involves two separate primer combination—mbr and JH primers (top) and mcr and JH primer (bottom).

를 확인하기는 대단히 어렵다고 알려져 있다. 일부 보고에서 clonality를 확인한 바 있으나 이들은 조직내에 RS비율이 대단히 많은 경우이었다. 어떤 경우에 이러한 RS세포는 monoclonal 이지만 어떤 경우는 polyclonal 이어서 이의 clonality의 진단이 쉽지만은 않다. 최근에는 B 세포 양성 RS세포를 현미경하에서 획득하여 이를 배양해서 면역글로불린 V부위의 재배열을

PCR법을 이용하여 확인하였다는 보고도 있다.

3. 골수구성 종양: 급성골수구성 백혈병, 골수증식성질환 및 골수이형성 증후군

이 질환군의 진단을 위해 지금까지 언급했던 Southern blot, PCR 및 FISH 등이 주로 사용된다. 여기에서는 c-abl 및 BCR proto-oncogene

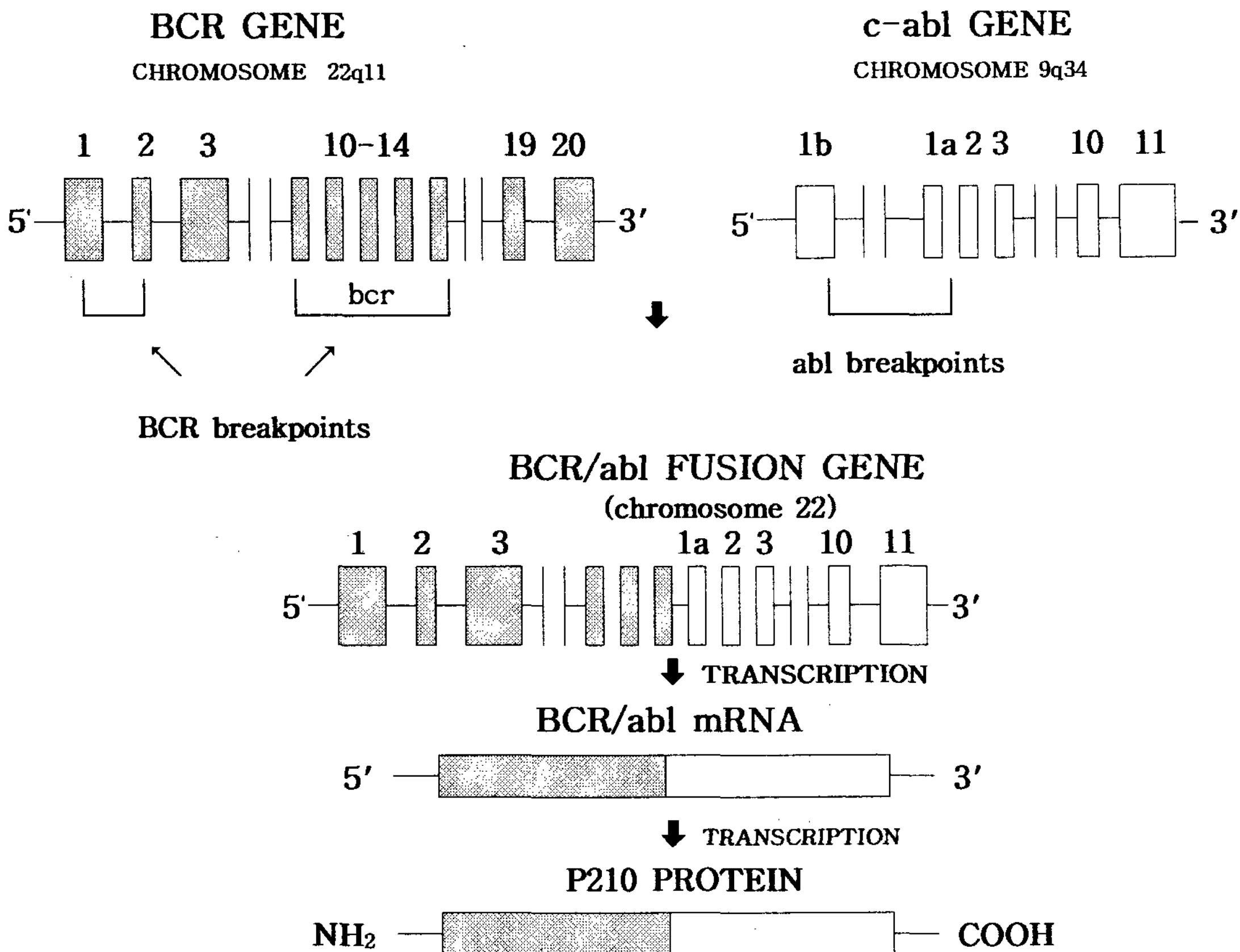


Fig. 10. Schematic diagram showing the translocation of the c-abl gene from chromosome 9 (open boxes) to the BCR gene on chromosome 22 (shaded boxes) resulting in a BCR/abl fusion gene. For c-abl, most breaks occur between exon 1b and exon 2. The majority of breaks in the BCR gene occur in the breakpoint cluster region (ber), and a smaller number occur between exon 1 and exon 2. A t(9;22), which involves the bcr region, results in a BCR/abl fusion gene, which is transcribed to a chimeric BCR/abl mRNA and translated to a chimeric P210 protein.

을 주로 언급하겠다.

**1) 만성골수성백혈병과 Philadelphia 염색체(Ph<sup>1</sup>)**

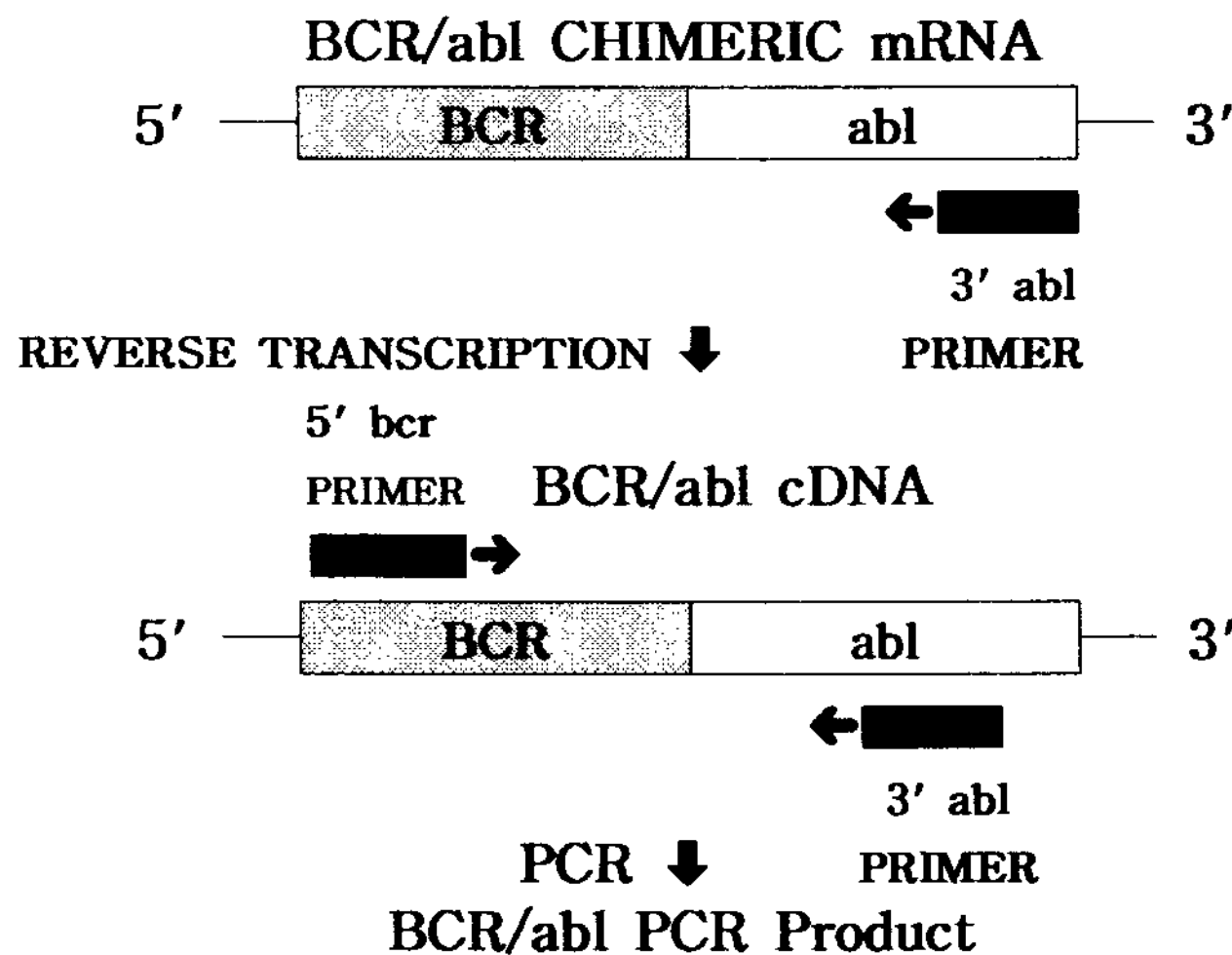
만성골수성백혈병(CML)의 만성기의 진단에 Ph<sup>1</sup>을 염색체 검사나 다른 분자유전학적 검사로 확인했을 경우 확정 진단이 된다. 그러나 이러한 Ph<sup>1</sup>는 성인 ALL의 30%와 소아 ALL의 5%에서도 발견된다. 이는 정상적으로 9q34 염색체에 위치하는 c-abl proto-oncogene과 22q11 염색체에 위치하는 BCR 유전자의 결합이 22번 염색체상에 형성되어 이 염색체는 정상보다 짧아진다. c-abl proto-oncogene은 P145 단백을 암호화 하는 11개의 exon으로 구성되어 있다. P145는 tyrosine kinase계에 속하며 이는 세포성장을 조절한다. BCR 유전자는 20개의 exon으로 구성되어 있고 central breakpoint cluster region (bcr)을 포함한다. BCR/abl 유전

자는 BCR/abl mRNA를 전사시켜 P210단백을 생성한다. 이는 tyrosine kinase 활성도를 증가시켜 종양을 발생시킨다.

Fig. 10은 지금까지 설명한 BCR/abl 유전자의 생성을 설명한 것이다. 이러한 BCR/abl 유전자를 검사하는 방법으로 RT-PCR이 최선의 방법인데 BCR/abl 유전자가 큰 DNA 분절이므로 bcl-2 유전자 재배열검사처럼 PCR을 이용한 직접검사가 불가능하다. 따라서 이를 극복하기 위하여 BCR/abl mRNA를 이용하여 RT-PCR하여 이를 검사한다. 이를 도식화하여 그리면 Fig. 11과 같다.

**4. FISH**

형광물질이 부착된 DNA probe을 말초혈액, 골수, 포르말린이나 파라핀 포매조직에 직접 가하여 염색체이상 유무를 현미경하에서 검출하는 방법이다. 전통적인 염색체 검사법에 비하여



**Fig. 11.** Analysis for BCR/abl gene rearrangements by PCR using chimeric Bcr/abl mRNA as a template. Using reverse transcriptase and a 3'-abl primer, a BCR/abl primer, a BCR/abl complementary DNA (cDNA) strand is produced. The cDNA can then be directly analyzed by PCR with 5'-bcr and 3'-abl primers, resulting in a BCR/abl PCR product.

장점으로 신선한 조직이 필요하지 않고, 간기(interphase) 세포를 이용할 수 있으며 많은 수의 세포 분석이 가능하다는 점 등이다. 혈액종양의 진단에 흔히 FISH를 이용하는 예는 다음과 같다. 1) t(15;17)을 이용한 AML-M3의 진단 및 다른 AML subtype과의 감별진단, 2) t(9;22) 그리고 3) trisomy 8의 검출을 통한 골수이형성증후군의 진단 및 예측 등에 이용된다.

### 5. 미세잔류병의 검출

미세잔류병(MRD)은 종양세포의 잔류 clone이 존재하는 경우를 의미하며, 일반적인 병리검사, 방사선검사 등에 의해 검출되지 않고 결국 재발한다. 예를 들어 백혈병에서 백혈병세포가  $10^{12}$ 개 정도이면 골수검사를 시행한 후 현미경 하에서 관찰되지만, 치료 후 임상적인 관해상태(골수에서 백혈병 세포가 5% 미만인 경우)에서도 백혈병세포는  $10^8$ 이나  $10^9$  개 정도 존재하는 경우, 통상적인 방법으로 검출해 내기 어렵다. 이러한 MRD를 검출하는 방법으로 유세포분석기에 의한 면역표지자 분석, 세포배양, 염색체 분석 및 분자유전학적 방법(FISH, Southern blot 및 PCR) 등이 이용되고 있다. 이들은 각각 장단점을 가지고 있으나 PCR을 제외하고 암세포 검출에 있어 민감도가 낮다. PCR은 매우 민감한 방법으로  $10^5$ - $10^6$  정상세포 중에서 한 개의 암세포를 검출할 정도로 검출능이 뛰어나다. MRD 측정에 이상적인 경우는 여포성 림프종이나 비호지킨 림프종에서의 t(14;18)(q32;q21), ALL과 CML에서 t(9;22)(q34;q11) 등이 좋은 예이다. 이상과 같이 MRD를 검출함으로써 암환자에 대한 보다 적극적인 치료를 시도할 수 있게 된다.

## V. 분자유전검사의 정도관리

### 1. 검사기기

분자유전검사를 시행하는 검사실은 임상병리

과의 여타 부서와 마찬가지로 적절한 기기관리, 검량(calibration) 및 기록 등을 해야한다. 이를 구체적으로 살펴보면, 기기를 사용할 때 마다 검사자 이름, 검사항목, 검사시간 및 검사 중 기기 이상 유무 등에 대한 사항을 기록해야 한다. 한편 일, 주, 월 및 연간 예방정비를 계획에 의해 수행해야 하며 이의 시행 유무를 기록해야 하고 이상과 같은 사항은 검사실 책임자가 주기적으로 점검해야한다. College of American Pathologists (CAP)이 제안한 점검항목에는 분광광도계, 신호검출장치(signal detection instruments), 사진현상장치 및 사진기, fume hoods, 생물학적 안전상자(biological safety cabinet), 전기영동장치, 수소이온 측정기(pH meters), 원심분리기, 시간측정기, 천칭(balances), 용량측정 초자기구(volumetric glassware), 자동피펫, 온도계 및 thermal cycler 등이다.

분광광도계는 분자유전검사실의 기본 장비이며 추출된 핵산의 정량 측정에 매우 중요하다. 분광광도계의 정도관리에서 중요한 것은 표준 DNA용액을 만들거나 상품화된 용액을 이용하여 주기적으로 흡광도를 점검해야하고 중요한 것은 흡광도의 linear range를 정하여 이 범주에 벗어난다고 판단되는 검체의 흡광도 측정시는 반드시 검체를 희석하여 linear range내에서 희석된 검체의 흡광도를 측정하여 정확한 흡광도치를 구하여야 한다. 전기영동장치는 전류공급 장치를 주기적으로 점검하여 정확한 전압이 제공되는지 점검하여야 한다. Thermal cycler의 경우 각 반응 well의 정확한 온도가 필수적이므로 이를 주안점으로 예방점검표에 의한 점검을 실시하여 정확한 온도 유지가 되는지 살펴보아야 한다.

### 2. 결과 보고

분자유전검사는 다단계 검사이므로 결과보고 전에 검사실 책임자에 의해 검사의 신빙성에 대한 판정을 받아야 한다. 검사자는 검체처리 대장을 만들어 검사 시작일, 각각 검사의 진행

사항을 기재하여 검사실 책임자에 의해 점검되어야 한다. 이렇게 하면 대부분의 사무적 오차를 줄일 수 있고, 또한 검출할 수 있다. 양성 및 음성 결과의 백분율을 주기적으로 구하여 이들의 결과를 비교하여 검사오류를 방지할 수 있다. 한편 CAP에서 제정한 분자유전검사에 대한 점검사항외에 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; Villanova, PA. 610-525-2435)에서 정한 지침을 이용하여 이를 참고로 각 검사실마다 실정에 맞게 점검항목을 정하여 일상화해야 한다.

### 3. 정도관리

대부분의 분자유전검사는 다단계 검사이므로 검사에 양성 및 음성 대조물질을 사용해야 한다. B/T 세포 유전자 재배열검사를 Southern blot을 이용하여 검사할 때 재배열 음성대조(보통 태반 DNA사용), hybridization 양성대조(보통 태반 DNA사용), 재배열 양성대조, 민감도 측정용 대조물군 및 분자량 표지자들을 사용해야 한다. PCR을 기본으로 한 검사는 핵산추출 대조군, 증폭반응 자체를 점검하기 위한 외부 대조군(amplification of DNA known to contain and generate the amplicon of interest) 및 내부 대조군(amplification of second target within the extracted DNA to control for the actual existence of amplifiable DNA in the sample), 제한효소 대조군, 검출단계 점검을 위해 필요한 양성 및 음성 대조군 등이다. 한편 Southern blot을 이용한 검사에서는 상기에서와 같은 대조군의 사용외에 제한효소처리된 DNA를 미리 겔 위에 전기영동하여 겔 및 전기영동 전반에 걸친 점검을 실시한다. 이렇게 완벽한 대조군을 사용해서 검사를 하기에는 현실적으로 어려움이 있지만 분자유전검사의 중요성, 정확성, 소중한 검체의 낭비 방지 및 시간을 절약하기 위해서도 이러한 대조군의 사용은 추천되고 있다.

### 4. Amplicon carryover

PCR 및 다른 증폭기술들은 대단히 예민한 검사로 검체간 carryover에 의한 위양성 반응의 위험이 항상 상존하고 있다. 따라서 이러한 carryover를 방지하기 위한 방법들을 살펴보면 다음과 같다. 시약 조제와 검사 수행하는 장소를 구별한다. 이러한 장소는 공기의 흐름이 밖으로 빠져나가게 되어 있어야 한다. 이것이 불가능하면 UV 광원이 설치된 laminar flow hood나 생물학적 안전상자를 이용한다. pre-PCR workstation과 post-PCR workstation을 구분하는 것은 기본이다. 검사전에 실험실 책상 및 pipeters는 10% 표백제 (bleach)와 70% ethanol을 이용하여 깨끗이 닦아 예상되는 DNA 오염을 방지해야 한다. 매우 기본적인 일이지만 PCR 반응용기는 thermal cycler로 가져오기전에 마개를 막아야한다. 만약에 반응용기의 마개를 열고 닫을 때 거즈나 패드의 사용은 신중을 기해야하고 장갑을 이용할 경우 자주 갈아끼고 aerosol에 의한 검체오염의 가능성을 항상 염두에 두고 조심히 반응용기를 다룬다. 가능한한 각 과정에 사용되는 pipetting 단계를 최소화한다. 증폭과정에 사용될 oligonucleotide (primer)는 PCR산물에 노출되지 않는 곳에서 합성 및 정제되고 또한 보관되도록 한다. Positive displacement pipeters을 사용한다. DNA검체를 가장 나중에 첨가하고 나서 마개를 한다. PCR검체는 방사선이 표지된 검체나 세포배양 검체처럼 주의 깊게 다룬다.

## VI. 분자진단검사의 장래

### 1. 수련, 자격 및 질관리

현재 분자진단은 다음과 같은 영역으로 구분되어 진다. 첫째 유전질환을 위한 분자유전진단 (molecular genetics), 둘째 핵산에 근거한 진단법인 DNA diagnostics로 이는 법의학, 천자감

별, 감염질환, 장기이식 등을 포함한다. 그리고 마지막은 조직에 근거해서 종양학을 포함하는 분자병리(molecular pathology) 분야이다.

검사실 책임자를 위한 자격요건으로 현재 미국에서는 American Board of Medical Genetics 에서 분자유전진단에 대한 일정의 자격을 부여하고 있다. 한편 American Board of Pathology 에서도 분자병리에 대한 전문가 자격을 주는 제도를 검토하고 있다. 그렇지만 분자유전진단에 사용되는 다양한 검사기술은 급속도로 발전하고 의학의 여러 분야에서 보편화되면 이러한 자격증에 대한 범주가 불분명해질 것이다. 따라서 분자유전진단은 검사의학의 한 분야로 확고히 자리잡을 것이고 이를 다루는 자격요건의 유무에 관계없이 검사실 책임자에 의해 분자유전검사의 대부분은 이루어지고 유지될 것으로 예측되고 있다. 국내의 경우 앞으로 이러한 분자유전진단에 대한 지견 및 술기를 충분히 익힌 분자유전진단의 전문가가 많이 배출되어야 하겠다.

분자유전진단에 대한 수련 및 정도관리는 상지에서 언급한 자격요건보다 더욱 중요하다. 수련내용은 검사실마다 상이하고 검사의 정도관리 측면은 이 검사가 임상병리과 이외의 임상과에서 수행하는 경우 뒷전에 밀리는 경우가 많다. 현재 미국에서는 College of American Pathologists (CAP)와 American College of Medical Genetics에서 공동으로 실시하는 분자유전진단에 대한 수련프로그램이 마련되어 있고, CAP는 검사실에서 예측될 수 있는 분자병리에 대한 점검사항 (checklist)을 포함하고 있다.

## 2. 분자유전진단의 사회윤리적 및 법적 문제들

현재 구미에서 환자의 조직 및 검체를 이용하여 연구 및 개발활동을 하는 경우 일반적인 환자의 동의를 얻어 시행하는데, 윤리학자들에게 의해 이같은 동의가 형식적이고 구체적이지 못

하다는 지적을 받고 있어, 상기와 같은 재료를 대상으로 새로운 연구를 시작할 때마다 그에 해당하는 특수한 동의를 요구하고 있는 실정이다.

## 3. 자동화 및 신기술

분자유전진단 검사의 주요 단점은 쉽게 검사할 수 있는 kit 및 자동화 장비가 드물다는 점이다. 그러나 FDA에서 공인한 Roche Molecular Systems Amplicor chlamydia와 HLA kit 등이 소개되었고, C형간염바이러스 kit도 사용되고 있다. Reverse dot blots나 slot blots 등을 이용한 돌연변이 검출법 역시 Roche Molecular Systems (Alameda, CA)에 의해 개발되었다. 이 방법의 주요 특징은 분석하고자 하는 유전자 염기순서에 특이적인 oligonucleotide가 막에 부착되어 있다는 것이며, CFTR 유전자 돌연변이 분석 및 HLA-DQA1 유전자 분석 등에 주로 이용되고 있다.

### 1) Protein truncation assay (PTA)

PTA는 종양억제활동성을 갖는 단백질들의 미성숙 절단(pre-mature truncation)을 유도하는 돌연변이를 선별하는 방법으로, dystrophin, NF1, APC 및 BRCA1 등의 검색에 이용되고 있다. 검출율은 유전자에 따라 다르지만 대략 70-80%로 다른 어떤 단일 분자유전학적 검사법보다 높으나, starting material로 RNA를 이용하는 것이 주된 단점이다. 이 방법을 이용하여 유방암과 난소암에서 BRCA1 및 BRCA2 단백질에 대한 보고가 증가하고 있다. 아울러 자동화 및 표준화된 kit 개발에 많은 노력이 경주되고 있다.

### 2) 분자표지자와 단백질분석의 조합

가까운 장래에 일련의 검사군(tiered-testing format)에 여러 분자표지자를 조합한 진단법이



암 환자의 조기발견 및 예방에 매우 중요한 역할을 할 것이다. 유방암의 경우 BRCA1, p53 및 ataxia telangectasia (AT) 유전자들을 조합해서 검사하면 종양의 조기진단 뿐 아니라 예후를 보다 정확히 예측할 수 있다. 따라서 다음과 같은 시나리오가 가능해진다. 1) 유방암이나 난소암의 조기발병의 가족력이 있는 경우 BRCA1 및 BRCA2의 돌연변이를 genomic DNA와 RNA의 선별을 통해 알 수 있고, 2) RNA 선별을 통한 AT유전자의 돌연변이를 검출하여 방사선과 같은 환경적 위험인자에 감수성이 높은 예비환자를 찾아낼 수 있으며, 3) 조직검사를 통한 p53 돌연변이를 검출하여 예후를 결정할 수 있고, 4) 조직에서 BRCA1 단백질의 위치(localization)를 알 수 있다.

### 3) 혈액형 균 불일치의 분자유전진단

신생아에서 1/1,000 빈도로 혈액형 균의 불일치에 의한 감각(sensitization)이 발생하는데, 현재까지 이의 산전진단에는 fetoscopy를 통하여 태아혈액을 채취하여 전통적인 혈청학적 방법을 이용하고 있지만, 이 경우 태아에 위험도가 높아 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 그러나 amniocyte배양후 DNA를 증폭하여 Rh genotype을 시행하면 상기에서 언급된 위험도를 훨씬 낮출 수 있을 뿐만 아니라 태아혈액 채취시 흔히 발생하는 산모혈액의 혼합에 의한 검사오류를 방지할 수 있다.

### 4) "DNA on a Chip"

서로 다른 염기서열을 가진 많은 수(예를 들어 1,028x1,028 arrays)의 oligonucleotide를 chip 속에 고밀적시켜 극소량의 검체를 이용하여 한번에 효율적으로 돌연변이를 검출하는 방법이다.

## 4. 결론

지금까지 언급된 여러 검사기법은 가까운 장

래에 우리 곁에서 보다 편리하고 쉽게 이용될 수 있는 모습으로 다가올 것이다. 과거 10여년간의 분자유전진단법의 눈부신 발전을 통하여 우리는 이를 경험할 수 있었다. 지금 이 순간도 또 다른 시작의 한 순간이며, 모든 것이 동적인 상태에서 보다 발전된 방향으로 가는 진행형임을 우리는 인식해야 하겠다. 따라서 우리는 검사의학 분야에서 최신택견중 하나인 분자유전학에 대한 이론을 익히고 각종 검사기법을 숙지하기 위해 보다 더 노력해야 할 것이다.

## 참 고 문 헌

1. Coleman WB and Tsongalis GJ (eds) : *Molecular diagnosis: for the clinical laboratorian. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1997.*
2. Cox TM and Sinclair J (eds) : *Molecular biology in medicine. Oxford: Blackwell Science, 1997.*
3. Farkas DH (ed) : *Molecular biology and pathology: a guidebook for quality control. San Diego: Academic Press, 1993.*
4. Narayanan S : *Precanalytical and analytical pitfalls in molecular biology techniques. J. Clin. Ligand Assay 1997;20:200-5.*
5. Neumair M, Braun A, Wagener C : *Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. Clin. Chem. 1998;44:12-26.*
6. Nollau P and Wagener C : *Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clin. Chem. 1997; 43:1114-28.*
7. Trent RJ (ed) : *Molecular medicine: an introductory text for students. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993.*