

DHPLC를 이용한 β_2 -교감신경수용체 유전자에서의 돌연변이 분석

박상범 · 오충훈* · 김종완** · 장원철*

단국대학교 자연과학대학 화학과, *단국대학교 의학레이저연구센터,

**단국대학교 의과대학 임상병리과

(2002. 1. 18 접수)

Mutation Analysis in β_2 -Adrenergic Receptor Gene by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Sang-Bum Park, Chung-Hun Oh*, Jong-Wan Kim**, Won-Cheoul Jang*

Dept. of Chemistry, College of Natural Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

*Medical Laser Research Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

**Dept. of Clinical Pathology, Dankook University Medical College,

Cheonan 330-714, Korea

(Received Jan. 18, 2002)

요 약 : 본 연구에서는 ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC) 방식을 이용한 denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) 방법을 사용하여 기관지 천식을 조절하는 β_2 -교감신경수용체 유전자의 돌연변이를 검출하였다. 50명의 천식 환자의 혈액에서 genomic DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용해 증폭하고, 그 산물을 DHPLC로 분석한 결과, 50개의 시료 가운데 15개 (30%)의 돌연변이를 검출하였다. 최종적으로 유전자 염기서열결정법을 통해 DHPLC의 돌연변이 검출률이 정확함을 확인하였다.

Abstract : We analysed mutation of β_2 -adrenergic receptor gene that controls bronchial asthma by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) according to ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC). We extracted genomic DNA from 50 asthma patients, amplified DNA using PCR, and analysed PCR product by DHPLC. As a result, we obtained that mutation frequency was 15 (30%) among 50 cases. Consequently DHPLC mutation detection was confirmed that the result of direct sequencing was coincide exactly.

Key words : DHPLC, IP-RP-HPLC, PCR, mutation

1. 서 론

최근 Human Genome Project (HGP)가 완성되면서 인간의 유전체에 대한 정확한 정보가 밝혀지고 있다. 그리고 이것을 바탕으로 한 유전적 분석에서 정확하고

효과적인 돌연변이 검출법의 필요성이 대두되고 있다.

현재 가장 일반적으로 사용되는 돌연변이 검출법에는 single strand conformation polymorphism (SSCP), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), conformation sensitive gel electrophoresis (CSGE), allele-specific oligonucleotide hybridization (ASO) 등이 있다.¹⁻³ 그러나 이러한 방법들은 검출감도나 실험의 재현성에서 한계를 보이고 있으며 많은 비용 및 시간,

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)41-550-3433 Fax : +82+(0)41-551-9229

E-mail : wcjang@dankook.ac.kr

그리고 노동력이 소모된다는 단점을 가지고 있다. 최근에 이러한 단점들을 보완하고 충족시킬 수 있는 새로운 돌연변이 검출방법으로써 DHPLC가 개발되었다.⁴⁶ 이 분석기술은 IP-RP-HPLC 방식을 이용한다.⁷⁻⁹ PCR 방법에 의해 증폭된 이중가닥의 DNA를 완전히 변성시켰다가 다시 천천히 식혔을 때 형성되는 이형접합체 (heteroduplex)가 동형접합체 (homoduplex)보다 column에서의 머무름 시간이 더 짧아지는 점을 이용하여 단 하나의 염기서열의 삽입, 제거 그리고 치환 형태의 돌연변이까지 검출할 수 있다.¹⁰⁻¹² DHPLC는 정제하지 않은 PCR 산물을 바로 분석하여 보통 하나의 시료 당 6-10분 정도의 시간밖에 걸리지 않기 때문에 많은 노동력과 시간의 소모를 줄일 수 있고, 또한 다양한 유전자의 돌연변이를 92.5%에서 100%까지 정확하게 검출할 수 있다.¹³

기관지 천식은 성인 (5%) 및 어린이 (7-10%) 모두에서 비교적 높은 발병빈도를 보이는 질환으로서 발병원인으로는 유전적 요인이 가장 빈번하고 그밖에 알레르기 물질, 호흡기 감염 그리고 대기오염 등의 환경적인 요인에 의해 발생한다. 또한 천식은 인간의 생산성을 감소시키고 활동장애를 초래한다. 오늘날 공업화와 산업화에 따른 대기의 오염으로 천식의 발병률이 날로 증가하고 있는 추세이다. 최근 국외에서는 기관지 천식을 조절하는 유전자로서 중요한 역할을 하는 β_2 -교감신경수용체의 구조가 밝혀지면서 많은 연구가 되어지고 있는 반면에 국내에서는 아직 유전적인 분석이 이루어지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 β_2 -교감신경수용체 유전자의 돌연변이를 DHPLC방법으로 분석하고, 유전자 염기서열결정법과 비교하여 DHPLC의 높은 감도와 정확성을 확인하며 더 나아가 DHPLC를 이용하여 기관지 천식의 발병과 유전적인 변이와의 상관관계를 밝힘으로써 질병 유전자 진단 및 치료에 관한 연구에 기초자료를 제공하고자 한다.

2. 실험 및 방법

2.1 시료

본 연구에서는 단국대학병원 이비인후과에서 기관지 천식환자로 진단 받은 성인 50명의 혈액과, 10명의 정상 건강 대조군을 대상으로 하였다.

2.2 시약 및 기기

2.2.1 시약

혈액에서 genomic DNA를 추출하기 위한 AccuPrep™ Genomic Extraction Kit와 PCR에 사용된 Taq. polymerase, 그리고 PCR 산물의 정제에 사용된 AccuPrep™ PCR Purification Kit와 DNA PrepMate™ Kit는 Bioneer의 제품을 구입해 사용하였다. DHPLC의 이동상으로 사용된 triethylammonium acetate (TEAA)는 Transgenomic사에서, acetonitrile은 Merck사에서 구입해 사용하였다. 염기서열결정법에 사용된 T7 Sequenase Ver. 2.0 Kit (USB, 70170, U.S.A.)는 Amersham Life Science의 시약을 사용하였다.

2.2.2 기기

DNA의 증폭은 GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer, U.S.A.)를 사용하였고, DHPLC는 WAVE® SYSTEM (Transgenomic, U.S.A.)를 사용해 돌연변이를 검출하였다. 염기서열분석은 Econo Sequencer I & II™ (Bioneer, Korea) 전기영동장치를 사용하였다.

2.3 실험 방법

PCR 방법을 이용하여 DNA를 증폭한 후, DHPLC법에 의해 β_2 -교감신경수용체 유전자의 점 돌연변이를 검출하고 최종적으로 DNA 염기서열결정법으로 이를 확인하였다.

2.3.1 혈액에서 genomic DNA의 추출

AccuPrep™ Genomic Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 분리한 DNA의 농도는 25 ng/ μ l로 일정하게 맞추어 PCR에 사용하고 장기간 보존하기 위해서는 -20 °C에 저장해 두었다.

2.3.2 중합효소연쇄반응 (PCR)

다음과 같은 PCR primer를 이용하여 200 bp의 크기의 PCR 산물을 얻었다.

Forward : 5' CATGTCCTCATCGTCCTGGC 3'

Reverse : 5' TGGACTTTTAGCAACTTCTGGT 3'

10× reaction buffer (10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl), 10 mM dNTP mix (2.5 mM ea.), 25 mM MgCl₂, Taq. polymerase (1 U/ μ l), template DNA (25 ng/ μ l)를 20 μ l의 PCR 반응용액으로 사용하였다. DNA thermal cycler (Perkin-Elmer, GeneAmp® PCR System

2400, U.S.A.)에서 주형 DNA를 94 °C에서 5분 동안 변성시켜 완전히 단일가닥 DNA를 만든 후, 94 °C에서 30초 동안 변성 (denaturation)시키고 57 °C에서 30초 동안 primer를 결합 (annealing)시키고 72 °C에서 50초 동안 중합효소를 이용하여 새로운 DNA를 합성 (extension)시키는 3단계를 30회 반복한 후에, 마지막으로 72 °C에서 5분간 온도를 유지하였다. 그리고 PCR이 완전히 종료된 후에는 PCR 산물을 2% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다.

2.3.3 Silica binding method를 이용한 PCR 산물의 정제

1.5 ml tube에 binding buffer 240 μ l와 PCR 산물 80 μ l를 섞은 후에 silica 40 μ l를 첨가 후에 상온에서 20분 동안 반응시켰다. 12,000 rpm에서 2분 동안 원심분리 후에 상층액을 제거하였다. 그런 다음 70% 에탄올 1 ml을 첨가한 후에 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고, 이 과정을 3번 반복하였다. Elution buffer 60 μ l를 첨가한 후에 50 °C에서 10분 동안 반응시킨 후에 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하여 여과액을 회수하였다.

2.3.4 DHPLC 방법을 이용한 돌연변이 검출

(1) 정지상과 이동상

DHPLC의 gradient solution으로 0.1M TEAA (pH 7.0)와 0.1M TEAA, 25% acetonitrile을 사용하였고, washing solution으로 8% acetonitrile (syringe washing solution), 75% acetonitrile (DNASep[®] Cartridge UltraClean and Storage Solution)을 사용하였다. Column은 alkylated nonporous poly(styren-divinylbenzene) 형태의 DNASep[®] Cartridge (Transgenomic, U.S.A.)을 사용하였다.

(2) DHPLC 작동조건

Column oven의 온도를 60 °C로 맞추고 buffer D (75% acetonitrile)를 0.9 ml/min으로 30분 동안 흘려주어서 column을 세척한 후에 buffer A (0.1M, TEAA)와 buffer B (0.1M TEAA+25% acetonitrile)를 50%대 50%로 하여 0.9 ml/min로 60분 동안 흘려주어서 안정화 시켜주었다. 그런 후에 변성시키지 않은 시료를 50 °C에서 0.9 ml/min로 0.5 μ l 주입하여 PCR 산물의 상태를 확인하였다.

(3) DHPLC 분석

95 °C에서 10분 동안 변성시킨 후에 상온에서 45분

동안 천천히 식혀서 이형접합체를 형성 시켰다. Column oven의 온도를 63 °C로 맞추고 0.9 ml/min로 0.5 μ l 주입하여 260 nm에서 돌연변이를 검출하였다.

2.3.5 DNA 염기서열결정법에 의한 돌연변이 분석

(1) 주형 DNA와 primer 준비과정

Annealing mixture (template DNA 3 μ l, sterile water 4 μ l, sequenase buffer 2 μ l, labeled primer 1 μ l)의 최종 부피가 10 μ l가 되게 준비한 다음 65 °C에서 2분간 가열하여 primer를 결합시킨 후, 35 °C가 될 때까지 상온에서 서서히 식혔다. 10초 동안 원심분리 시킨 다음 얼음 상에서 labeling reaction 단계까지 보관했다. Annealing mixture가 식는 동안에 0.5 ml tube에 termination mixture (A, C, G, T)를 각각 2.5 μ l씩 분취하여 37 °C에서 반응시켰다. 그런 후에 5× labeling mixture (dGTP)를 0.5 ml tube에서 1:4로 희석하여 잘 섞은 후, 얼음 위에 보관했다.

(2) Labeling reaction 과정

Annealed DNA mixture (10 μ l)와 DTT (0.1M, 1 μ l), diluted labeling mixture (2 μ l) 그리고 [³⁵S] dATP (0.5 μ l), diluted sequenase (2 μ l)를 순서대로 넣어 잘 혼합한 다음, 상온에서 4분 반응 시켰다.

(3) Termination reaction 과정

준비된 ddNTP가 담긴 4개의 tube를 꺼내어 랙 (rack)에 올려놓고, labeling mixture 3.5 μ l씩을 각기 분취하여 혼합하였다. 그런 다음 10초 동안 원심분리 하고, 37 °C에서 5분 동안 보관하였다. 4 μ l의 stop solution을 첨가하여 반응을 정지 시켰다. Micropipette을 사용하여 잘 혼합하고, 10초 동안 원심분리 후 얼음상에서 보관했다. 그런 후에, 겔의 콤 (comb) 속을 주사기로 기포를 제거하고, 세척하여 loading할 준비를 마쳤다. 75 °C에서 시료를 2분 동안 반응시켰다. 그런 후에 곧바로 얼음 속에 보관한 다음, 2-3 μ l를 6% sequencing gel (acrylamide 5.7 g, N,N'-methylenebisacrylamide 0.3 g, urea 42 g, 10× TBE buffer 10 ml)에 loading 하였다. 상온에서 75 watt로 약 3시간 동안 전기영동 시킨 후에 겔을 건조시켜 암실에서 X-ray film (Kodak XAR)으로 겔 위를 덮은 다음 카세트 (cassette)로 밀봉하여 약 40시간 정도 감광시켰다. 필름을 현상한 후, DNA 염기서열을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

DHPLC분석법은 돌연변이를 검출하는 가장 강력한 방법으로 SSCP나 DGGE보다 감지할 수 있는 변이에 대한 민감도가 더 큰 새로운 검출법이다. PCR 산물을 정제하지 않고 바로 분석할 수 있고 한 시료 당 10분이면 분석이 가능하기 때문에 노동력과 시간을 절약할 수 있다. 또한 모든 실험과정이 자동화되어 있어서 실험의 오차율이 상대적으로 낮다.

Ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC) 방식을 이용하고 poly(styren-divinylbenzene)으로 채워진 DNASep[®] Cartridge (Transgenomic, U.S.A.)을 고정상으로 사용하였다. 두가닥의 DNA를 95 °C에서 변성시키고 천천히 식히면 heteroduplex와 homoduplex가 형성된다. 양친매성 이온을 가지고 있는 이온쌍 시약인 TEAA가 먼저 소수성 고정상에 흡착되어 양전하를 고정상 표면에 형성시키게 된다. 이것은 phosphate ion을 가지고 있는 DNA와 결합하고 더 큰 양전하를 가진 acetonitrile에 의해 column을 빠져나온다. 따라서 부분적으로 변성된 heteroduplex가 고정상과의 결합력이 약해 homoduplex보다 column을 빨리 빠져나오고 이 원리를 이용해 돌연변이를 검출할 수 있다. 또한 DNA 가닥의 크기가 작을수록, column의 온도가 높을수록 retention time이 빠르다.

PCR 산물의 염기서열을 입력하면 WAVEMAKER[™] 프로그램에 의해 column의 온도와 base position에 따른 helical fraction이 계산되고 이 데이터를 근거로 하여 가장 적당한 column의 온도와 buffer의 gradient를 결정하게 된다. 돌연변이가 존재하더라도 helical fraction의 정도에 따라 돌연변이의 검출 여부가 결정되므로 helical fraction이 70-80% 사이가 되도록 온도와 gradient를 잡아주는 것이 중요하다.

온도에 따른 크로마토그램의 분리도를 보기 위해 56-66 °C까지 column의 온도를 변화시키면서 분석한 결과, 온도가 높을수록 retention time이 짧은 것을 관찰할 수 있었고, column의 온도가 63 °C일 때 wild type (Fig. 1)과 mutant type (Fig. 2)의 크로마토그램의 형태를 확실히 구분할 수 있었다.

온도 1 °C차이에도 크로마토그램의 모양이 완전히 바뀌기 때문에 column oven의 온도에 대한 안정성이 뛰어나야 한다. Fig. 3 에서와 같이 wild type은 4.9 분

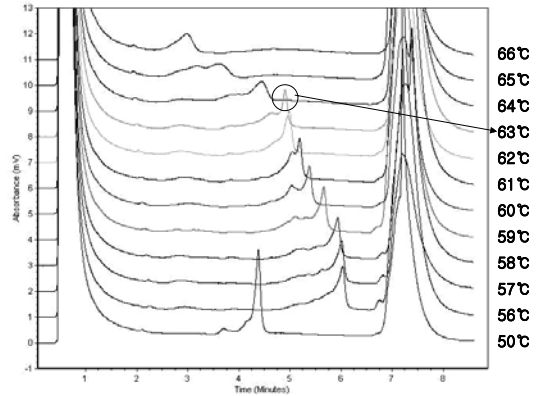


Fig. 1. Effect of column temperature on the resolution of homoduplex.

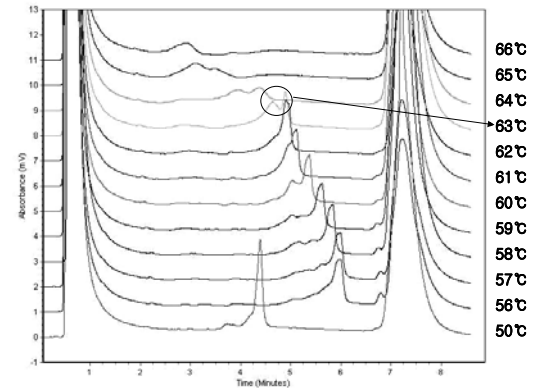


Fig. 2. Effect of column temperature on the resolution of heteroduplex.

에 단일 피크의 모양으로 검출되었고, mutant type은 4.63분과 4.89분에 두 개의 피크 모양으로 검출되었다. 시료를 분석하기 전에 50 °C에서 변성시키지 않은 PCR 산물을 분석함으로써 PCR이 잘 되었는지의 여부를 전기영동을 하지 않고도 확인할 수 있었고, SSCP나 DGGE같은 일반적인 분자 생물학적인 돌연변이 검출법에서는 분석을 하기 전에 정제 과정을 거쳐야 하지만 DHPLC는 정제를 하지 않고 PCR 산물을 곧바로 분석해도 같은 형태의 크로마토그램을 얻을 수 있었다. DHPLC의 시료의 부피에 따른 감도를 알아보기 위해서 1-10 μ l까지 분석해본 결과 2 μ l 까지도 heteroduplex와 homoduplex를 구분할 수 있었고, β_2 -교감신경수용체 유전자에서 돌연변이를 분석한 결과, 50개의 시료 중 15개 (30%)의 돌연변이를 검출하였다.

DHPLC로 검출한 돌연변이를 T7 Sequenase Ver. 2.0 Kit (USB, 70170, U.S.A.)를 이용한 chain termination 방법으로 염기서열을 분석한 결과, β_2 -교감신경수용체 유전자의 G1839A로 치환된 점 돌연변이를 확인하였다 (Fig. 4).

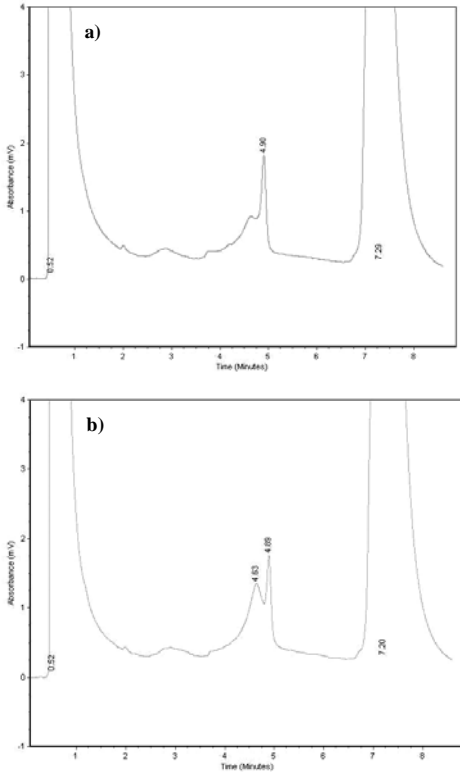


Fig. 3. Chromatograms produced by DHPLC analysis. a) wild type b) mutant type.

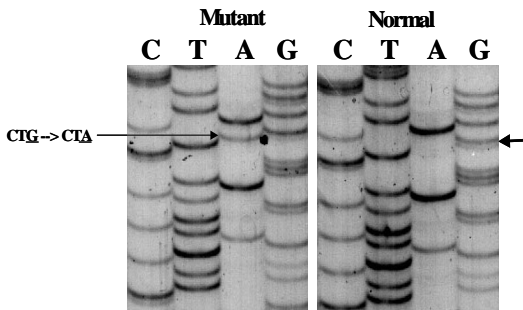


Fig. 4. Sequencing gel autoradiograph of mutant (left) and normal (right). CTG-->CTA, G to A transition change.

4. 결 론

50명의 천식 환자의 혈액에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용해 증폭하고, 그 산물을 DHPLC로 분석하였다. 그 결과, β_2 -교감신경수용체 유전자에서 50개의 시료 가운데 15개 (30%)의 돌연변이를 관찰하였다. 그리고 유전자 염기서열결정법을 통해 DHPLC의 돌연변이 검출률의 정확함을 확인하였다.

본 연구를 통하여 DHPLC는 새로운 돌연변이 검출 방법으로써 지금까지 사용해오던 방법들과 비교해 많은 시간과 노동력, 비용을 절약할 수 있었으며 실험의 오차율이 낮고 검출률이 정확한 강력한 방법임을 확인하였다. 그러나 모든 시료들이 단 하나의 염기만이 치환되는 형태의 돌연변이로 크로마토그램의 형태가 한가지로 일정하였다. 따라서 치환뿐만 아니라, 삽입, 제거와 같은 다양한 형태의 돌연변이의 따라 크로마토그램이 어떻게 변하는지와 poly(styren-divinylbenzene)으로 충전된 column이 아니라 일반 silica column으로 분석했을 때의 차이점에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. W. Xiao and P. J. Oefner, *Hum. Mutat.*, **17**, 439-474 (2001)
2. T. R. Skopek, W. E. Glaab, J. J. Monroe, K. L. Kort and W. Schaefer, *Mutat. Res.*, **430**, 13-21 (1999)
3. P. J. Oefner and G. K. Bonn, *Amer. Lab.*, **26**, 28C - 28J (1994)
4. A. C. Jones, J. Austin, N. Hansen, B. Hoogendoorn, P. J. Oefner, J. P. Cheadle and M. C. O'Donovan, *Clin. Chem.*, **45**, 1133-1140 (1999)
5. T. R. Skopek, W. E. Glaab, J. J. Monroe, K. L. Kort and W. Schaefer, *Mutat. Res.*, **430**, 13-21 (1999)
6. T. Wagner, D. Stoppa-Lyonnet, E. Fleischmann, D. Muhr, S. Pages, T. Sandberg, V. Caux, R. Moslinger, G. Langbauer, A. Borg and P. J. Oefner, *Genomics*, **62**, 369-376 (1999)
7. L. A. Ellis, C. F. Taylor and G. R. Taylor, *Hum. Mutat.*, **15**, 556-64 (2000)
8. E. Gross, N. Arnold, K. Pfeifer, K. Bandick and M. Kiechle, *Hum. Mutat.*, **16**, 345-353 (2000)

9. M. L. Nickerson, G. Weirich, B. Zbar and L. S. Schmidt, *Hum. Mutat.*, **16**, 68-76 (2000)
10. P. Benit, A. Kara-Mosterfa, M. Berthelon, K. Sengmany, A. Munnich and J. P. Bonnefont, *Hum. Mutat.*, **16**, 417-421 (2000)
11. C. G. Huber and N. Berti, *Anal. Chem.*, **68**, 2959-2965 (1996)
12. P. J. Oefner and P. A. Underhill, *U.S. Patent* 5795976 (1998)
13. N. F. Hansen and P. J. Oefner, *U.S. Patent* 5795976 (1997)