

종 설

유전체 역학 연구를 위한 시료의 보관과 분석

홍윤철, 이관희

인하대학교 의과대학 사회의학교실

Specimen Storage and Analysis for Genomic Epidemiology

Yun-Chul Hong, Kwan-Hee Lee

Department of Social and Preventive Medicine, Inha University College of Medicine

Because of advances of technologies in the field of genomic epidemiology in the recent years, specimen collection, storage and analysis became an essential part of research methodologies. DNA is now being used in epidemiologic studies to evaluate genetic risk factors and specimens other than the fresh whole blood can be used for PCR. Therefore, All nucleated cells, such as buccal swabs and urine specimens, are suitable for DNA analysis. For an unlimited source of genomic DNA, EBV transformation of lymphocytes can be used for immortalization. However, the type of

specimen collected in genomic epidemiologic studies will depend on the study where the epidemiologist play a leading role for the design. We also briefly described various kinds of analysis for SNP that is an essential part of the genomic epidemiology.

Korean J Prev Med 2003;36(3):209-212

Key Words: Genome, Molecular epidemiology, Biological specimen bank, Single nucleotide polymorphism

서 론

DNA 등 유전체 연구를 위한 시료의 확보 및 보관은 유전적 위험인자를 연구하는 유전체역학연구에 있어서 필수적이다. 유전적 위험인자는 유방암 위험성을 증가시키는 것으로 알려진 BRCA1 변이와 같은 드물게 생기는 유전자 변이도 있지만 발암물질 대사 등 발암과정과 관련된 여러 가지 단백질의 유전자 다형성과 같이 인구집단에서 비교적 흔히 발견되는 유전자 변이도 매우 중요한 유전적 위험인자이다 [1,2]. 따라서 인구집단에서 유전자의 변이와 질병 발생과의 관련성에 대한 역학연구는 유전체연구에 있어서 매우 중요한 한 축을 형성하고 있다. 실제로 유전체 역학연구의 성패는 임상 정보, 생활습관 및 환경요인 정보 등을 갖춘 대규모 양질의 유전체 시료 (DNA, cell, tissue, blood, serum, urine 등)를 수집하여 안전하게 보관하는데 있다고도 할 수 있다.

최근 들어 유전체 역학연구의 기반이

되는 분자역학적인 방법론의 발전과 더불어 혈액 또는 DNA와 같은 생체시료의 확보 및 보관이 점차 중요해지고 있다. 특히 PCR과 같은 기술의 적용으로 혈액 이외의 다양한 시료로부터 DNA를 확보할 수 있게 됨으로써 구강세포, 모낭, 소변 등의 시료도 유전체 역학연구에 있어서 중요한 의미를 가지게 되었다 [3-7].

이 글에서는 역학연구자들이 유전체 역학연구를 수행하는 데 있어서 알아야 할 유전자정보를 갖고 있는 시료의 채취, 처리 및 보관에 대하여 기술하고자 하며 더불어서 유전체 역학연구에 있어서 가장 중요한 유전자분석방법인 단일유전자 다형성 (SNP)의 분석 방법에 대하여 간략히 기술하고자 한다.

1. 시료의 채취, 처리 및 보관

1) 전혈

항응고처리된 전혈은 실험실로 옮겨져서 전혈로부터 직접 DNA를 추출하거나 저속원심분리후에 buffy coat를 분리한 후 이로부터 DNA를 추출하여 저장한다.

이때 혈액은 채혈한 후 즉시 처리하는 것을 원칙으로 하나 여건에 따라 혈장, buffy coat, DNA 분리와 cell 시료 제작 시 48시간까지 냉장 (+4°C) 보관할 수 있다. DNA의 추출을 위한 전혈의 최적 보관 조건에 대해서는 분명한 결론이 없지만 대부분의 연구자들이 전혈을 상온에서 48시간정도 두었다가 DNA 추출을 하였을 때 특별한 문제점이 없다고 보고하고 있다 [8]. 혈액은 시료의 향후 사용 목적에 따라 전혈을 1.5ml tube에 2개씩 분주하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하기도 하고, 전혈을 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 분리한 후 각각 1.5ml tube에 분주하여 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하기도 한다. 주의할 점은 혈액을 냉동보관할 때 유리로 된 용기는 깨질 수가 있기 때문에 사용해서는 안된다는 것이다. DNA는 응고된 혈액에서도 추출할 수 있지만 DNA 회수율이 떨어지기 때문에 항응고처리하는 것이 바람직하며 항응고제로서는 헤파린, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 또는 acid citrate dextrose (ACD) 등을 쓸 수 있다.

2) 임파구 불멸화 (Lymphocyte immortalization)

Genomic DNA를 제한없이 쓰거나 분자생물학적 또는 생화학적 연구를 하려고 할 때는 B-임파구를 배양가능한 세포로 만들어서 사용할 수 있다. 즉 ACD 튜브에 채취된 혈액으로부터 Histopaque 1077 등을 이용하여 B-임파구를 분리한 뒤 Epstein-Barr(EB) virus를 이용하여 불멸화시켜서 stable cell line으로 제작한다. 세포는 EB virus 감염여부를 확인한 후 액화질소탱크(-196℃)에 보관한다. 그러나 이러한 불멸화를 위한 변이세포형성(transformation)은 혈액을 채취한 후 세포주를 만들 수 있는 실험실로 48시간 이내에 보내야 하므로 상당한 노력이 필요하다. 또 다른 방법으로 혈액시료를 우선적으로 냉동보관한 다음 필요한 시료를 선정하여 나중에 변이세포를 형성시키는 것도 시도해볼 수 있다 [9].

3) 구강점막세포 (Buccal cells)

구강점막세포도 DNA를 추출하는데 사용될 수 있으며 이미 몇몇 대규모 역학 연구에서 이러한 방법으로 유전자원을 확보하거나 전혈시료의 보완으로 이용되고 있다. 앞으로는 점차 전혈 또는 EB virus 변형임파구 등의 유전자원에서 구강점막세포를 이용하는 추세가 될 것이다 [10]. 세균억제작용을 위하여 일반적으로 알코올이 함유된 구강세척제를 사용하여 구강점막세포를 얻는다.

4) 기타 시료

혈청은 혈액을 SST tube에 채혈한 후 상온에서 30분간 방치하여 혈액을 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 분리한 후 1.5ml tube에 2개씩 분주하여 초저온 냉동고(-80℃)에 보관한다. 소변은 소변컵을 이용하여 채취한 뒤 15ml centrifuge tube에 분주하여 냉동고(-20℃)에 보관한다. 조직은 연구방법에 맞게 전처리 후 cryo-vial에 넣어 초저온 냉동고(-80℃)나 액화질소탱크(-196℃)에 보관한다.

5) DNA 추출

Genomic DNA는 채혈된 혈액 또는 냉동 보관된 혈액이나 buffy coat로부터 추출한다. 전통적인 phenol/chloroform 추

출법은 경제적이긴 하나 노동력과 시간이 많이 드는 단점이 있어 medium-throughput DNA 추출에는 상품화되어진 DNA extraction kit을 사용한다. 또한 자동화된 DNA 추출기를 이용하기도 하는데 장비의 가격이 고가이긴 하나 DNA bank 구축 등의 high-throughput 연구에는 유용하다. 추출된 DNA는 UV spectrophotometer로 DNA의 순도 측정과 정량을 한 후 2개씩의 tube나 96-well plate에 분주하여 냉동고(-20℃)에 보관한다.

2. 시료 은행의 환경 및 질관리

유전체 시료 보관은 안전한 곳에 다른 연구 시료 등과 공간을 분리하여 보관하며 시료 보관용 장비는 alarm이 부착되어진 장비를 사용하여 정전이나 기기 오작동시 빠른 조치를 할 수 있도록 한다. 시료 보관 순서와 세심한 기술을 습득한 인원을 배치하여 bank를 유지하며 각 시료는 최소 두 군데 이상으로 분주하여 보관하고 보관된 시료는 일정한 시기마다 이상 유무를 확인한다. 모든 보관시료에 대해서 시료식별번호와 시료위치에 대한 기록이 잘 관리되어야 한다. 또한 시료 보관중에 예기치 않게 해동이 된 경우에는 반드시 날짜와 온도 등을 기록하여야 한다.

3. 자료의 정리 및 보관

유전체 시료 제공자의 기본정보, 가족력, 생활습관, 환경요인 및 임상정보는 Access 등의 프로그램을 이용하여 데이터베이스화하여 보관한다. 데이터베이스용 컴퓨터는 정보 입력 인원만이 접근할 수 있도록 암호화하여 관리한다. 입력된 정보는 일정기간 단위로 백업을 하여 보관하며 입력 완료된 설문지와 동의서는 철을 하여 잠금장치가 되어 있는 보관함에 별도로 보관한다.

4. 단일유전자다형성 (SNP)의 분석

SNP를 분석하는 방법은 알려지지 않은 새로운 변이를 찾아내는 scanning 방법으로 nucleotide sequencing, single strand conformation polymorphism

(SSCP), denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), mismatch cleavage 등이 사용되고 있으며, 이미 알려진 특정 변이를 찾는 screening 방법으로는 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), allele-specific PCR (AS-PCR), TaqMan / Molecular beacons assay, dynamic allele-specific hybridization (DASH), single base extension, pyrosequencing, oligonucleotide ligation assay (OLA), matrix assisted laser desorption / ionization time-of-flight (MALDI-TOF)-mass spectrometry 등이 있다.

1) Nucleotide sequencing

Nucleotide sequencing은 DNA상의 염기서열 변이를 정확하게 찾아낼 수 있기 때문에 SNP를 scanning 하거나 screening 할 수 있는 방법으로 가장 정확한 방법이라 할 수 있지만 고가의 장비를 사용하며 비용이 많이 드는 단점이 있다.

2) SSCP

SNP scanning에 더 많이 이용되는 방법이지만 screening 방법으로도 사용된다. PCR로 SNP를 포함하는 부위를 증폭한 후 변성시킨 뒤 ployacrylamide gel에서 전기영동하여 단일나선 DNA의 구조 차이에 의해 나타나는 전기영동상의 이동도 차이를 검출하는 방법이다. 유전자에 따라 정확도가 떨어지는 단점이 있다.

3) DHPLC

SNP가 있을 것으로 의심되는 부위를 PCR로 증폭한 후 column을 통과시켜 이동도의 차이를 UV detector를 이용하여 DNA 조각의 변이를 정확하게 검출하는 방법이다. 미지의 SNP를 찾는 가장 좋은 방법 중의 하나이며 자동화가 가능한 반면 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다.

4) DGGE

DNA 조각에 변이가 있으면 gradient가 있는 gel에서 전기영동 되어 내려갈 때 최저 melting domain과 melting 온도가 같은 denaturant 농도에 도달하면

branch 구조를 형성하여 gel 상에서 이동도가 감소하는 차이를 검출하는 방법으로 비용이 적게 들며 정확도가 높은 방법이다.

5) Mismatch Cleavage

PCR 증폭 후 DNA 조각을 denaturation과 renaturation시켜 변이가 있는 allele을 포함하는 DNA에 heteroduplex를 형성시키는데 mismatch된 염기부분에는 bubble을 갖게 되어 gel 상에서 이동도의 차이를 나타내는데 이를 검출하는 방법이다. 적절한 효소 (enzyme mismatch cleavage)나 chemical (chemical mismatch cleavage)을 이용하여 heteroduplex가 있는 부분을 잘라내어 정확도를 증가시키는 방법을 함께 사용한다. 큰 DNA 조각에서 변이를 검출할 수 있지만 노동력을 상당히 필요로 한다는 단점이 있다.

6) PCR-RFLP

PCR을 통해 증폭된 DNA 조각을 제한 효소 (restriction endonuclease)로 처리하여 agarose gel 전기영동상의 길이 차이를 확인하여 SNP를 검출하는 방법으로, 현재 많은 종류의 제한효소가 시판되고 있고 고가의 장비도 필요치 않아 가장 손쉽게 이용할 수 있는 방법이다. 그러나 SNP의 약 40% 정도는 restriction site를 가지고 있지 않아 적용에 제약이 있지만 primer상에 restriction site를 인위적으로 만들어 주어 PCR-RFLP를 이용하는 방법도 사용할 수 있다.

7) AS-PCR

Primer의 3' end를 각각의 SNP allele에 specific하게 제작하여 증폭시키면 각각의 primer와 상보적인 DNA만이 증폭되어 전기영동상에서 SNP를 검출할 수 있는 방법이다. 또한 유사한 방법으로 하나의 allele specific primer에 GC-tail을 붙여 증폭하게 되면 GC-tail이 붙은 allele은 그렇지 않은 allele에 비해 높은 Tm 값을 가지게 되는데 이를 이용하여 SNP를 검출하는 것이 Tm-shift genotyping 방법이다.

8) TaqMan / Molecular Beacons Realtime PCR을 이용하여 SNP를 검

출하는 방법으로는 TaqMan probe를 이용하는 방법과 molecular beacons을 이용한 방법이 있다. SNP를 포함하는 부위를 증폭할 수 있는 primer set와 allele에 따라 각기 다른 fluorescent dye와 quencher가 붙어 있는 TaqMan probe를 이용하여 DNA를 증폭하여 mismatch와 match sequence의 형광의 차이를 realtime PCR machine으로 감지한다. Molecular beacons 방법은 TaqMan 5'-nuclease assay와 유사하며 reporter fluorescent dye와 quencher가 붙어있는 hairpin 모양의 probe를 사용하여 mismatch와 match sequence의 형광의 차이를 realtime PCR machine으로 감지한다.

9) DASH

SNP가 포함된 부위를 증폭한 뒤 well에 immobilization 시키고 단일나선으로 만든 후 allele specific probe를 hybridization 시킨 후 SYBR Green I을 첨가한 뒤 1℃ 간격으로 95℃까지 천천히 열을 가하여 match와 mismatch 사이의 Tm 값의 차이를 이용하여 SNP를 검출하는 방법이다.

10) Single base extension

SNP를 포함하는 부위를 PCR로 증폭시켜 정제한 후 SNP 부위 바로 전까지 합성된 primer와 fluorescent dye가 붙은 ddNTP를 넣어 single base extension 반응을 일으켜 product를 automatic sequencer로 분석한다. 고가의 장비를 필요로 하지만 대량의 인구집단에서 대량의 SNP를 screening 할 수 있는 방법이다.

11) Pyrosequencing

DNA가 합성되는 동안 방출되는 dNTP에 label된 inorganic pyrophosphate의 light 발현을 검출하는 방법이다.

12) OLA

PCR로 해당 부위를 증폭한 뒤 thermostable rTth ligase를 이용하는 방법으로 여러 종류의 dye와 multiplex analysis를 통해 다량의 SNP 분석이 가능하다.

13) MALDI-TOF Mass Spectrometry

SNP가 포함된 부위를 증폭하여 primer와 ddNTP를 사용하여 single base

extension시켜 SNP에 의한 각 fragment의 질량 차이를 mass spectrometry를 통해 분석한다. 고가의 장비가 필요하지만 multiplex genotyping analysis를 통해 대량의 SNP 분석이 가능한 방법이다.

결론

인간유전체에 대한 여러 가지 기초의학 및 임상의학의 연구와 더불어서 역학 분야에서도 유전체를 이용한 인구집단에서의 유전자변이, 유전자발현의 차이, 그리고 질병발생과의 관련성등의 연구들이 활발해질 전망이다. 한 걸음 더 나아가 이러한 유전자의 정보는 앞으로 질병검사 및 질병예방에 활용될 것이다. 이러한 유전체역학연구를 위하여 반드시 필요한 것이 DNA 등 유전자를 갖고 있는 시료의 확보와 보관이며, 필요로 하는 시료의 종류들은 연구의 형태에 따라서 다를 수 있다. 따라서 유전체시료의 확보와 보관은 유전체역학연구를 설계하고 수행하는데 있어서 필수적인 요소이며 연구를 수행하는 역학연구자 역시 유전체시료의 확보 및 보관에 대한 지식을 갖고 있는 것이 바람직하다. 또한 SNP의 분석은 유전체역학연구에 있어서 기본적인 방법론이라 할 수 있으므로 연구설계시에 적절한 분석방법의 설정역시 역학자의 역할이다.

참고문헌

1. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71
2. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15: 273-280
3. Decorte R, Cassiman JJ. Detection of amplified VNTR alleles by direct chemiluminescence: application to the genetic identification of biological samples in forensic cases. *EXS* 1991; 58: 371-390
4. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature* 1988; 332: 543-546

5. Thomson DM, Brown NN, Clague AE. Routine use of hair root or buccal swab specimens for PCR analysis: advantages over using blood. *Clin Chim Acta* 1992; 207: 169-174
6. Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, Dorkin HL, Parad RB, Witt D, Klinger KW. Multiplex PCR amplification from the CRTR gene using DNA prepared from buccal brushes swabs. *Hum Mol Gen* 1993; 2: 159-163
7. Hayney MS, Poland GA, Lipsky JJ. A noninvasive "swish and spit" method for collecting nucleated cells for HLA typing by PCR in population studies. *Hum Hered* 1996; 46: 108-111
8. Steinberg KK, Sanderlin KC, Ou CY, Hannon WH, McQuillan GM, Sampson EJ. DNA banking in epidemiologic studies. *Epidemiol Rev* 1997; 19: 156-162
9. Kleeberger CA, Lyles RH, Margolick JB, Rinaldo CR, Phair JP, Giorgi JV. Viability and recovery of peripheral blood mononuclear cells cryopreserved for up to 12 years in a multicenter study. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 14-19
10. Steinberg K, Beck J, Nickerson D, Garcia-Closas M, Gallagher M, Caggana M, Reid Y, Cosentino M, Ji J, Johnson D, Hayes RB, Earley M, Lorey F, Hannon H, Khoury MJ, Sampson E. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. *Epidemiology* 2002; 13: 246-254