

## 두경부 종양에서 DHPLC를 이용한 p53체세포 돌연변이 검출 연구

김광열 · 박상범 · 한상만 · 남윤형 · 장원철\*

단국대학교 자연과학대학 화학과

(2004. 1. 14 접수)

### Analysis of p53 Somatic Mutation in Head and Neck Cancer Using Denaturing High Performance Liquid Chromatography(DHPLC)

Kwang-Youl Kim, Sang-Bum Park, Sang-Man Han, Youn-Hyoung Nam, and Won-Cheoul Jang\*

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

(Received January 14, 2004)

**요 약.** 두경부 편평 세포암종(HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma)의 발생과 관련하여 p53 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)의 돌연변이는 높은 비율로 나타나는 것으로 보고 되고 있다. 단국대학교 병원에서 두경부 종양으로 진단 받고 수술 받은 환자의 조직 50개를 대상으로 p53 종양 억제 유전자의 exon 5-8 까지의 영역에서 DNA를 추출하여 PCR-SSCP(polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism) 방법과 DHPLC(denaturing high performance liquid chromatography) 방법으로 p53체세포 돌연변이(somatic mutation)를 비교 분석하였다. 그 결과 SSCP 분석 방법은 16개(32%)의, DHPLC 분석 방법은 17개(34%)를 검출하였고 그 중 SSCP와 DHPLC 분석 방법 모두 exon 8번에서 결실(deletion) 형태의 돌연변이를 확인하였으며 최종적으로 자동 염기 서열 분석기(automatic DNA sequencer)를 통하여 모든 돌연변이를 확인하였다. DHPLC 분석방법이 SSCP 방법보다 분석 시간이나 노력이 덜 소비되며 보다 더 정확한 돌연변이 검출 방법임을 확인하였다.

**주제어:** HNSCC, p53, DHPLC, PCR-SSCP

**ABSTRACT.** Mutation of p53 tumor suppressor gene in HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) has been proposed high rate. We extracted genomic DNA from 50 head and neck cancer. The DNA was amplified by PCR at exon 5-8 in p53 tumor suppressor gene. We have compared single strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) method for analysis of p53 somatic mutation. As a result, 16 deleted mutations (32%) were detected by SSCP analysis and 17 deleted mutations (34%) were detected by DHPLC analysis at exon 8. All of 17 mutations were proved by sequencing. We conclude that DHPLC is a fast and simple screening method rather than SSCP analysis.

**Keywords:** HNSCC, p53, DHPLC, PCR-SSCP

### 서 론

대표적인 종양억제 유전자중 하나인 p53의 돌연변이는 유방, 난소, 폐, 식도, 피부, 대장 등의 여러 인체암에서 나타나는 가장 흔한 유전자 변이이다. p53 유전자는 17번 염색체 단완(17p13)에 위치하고 약 20 kb 크기로 11개의 exon과 10개의 intron로 구성되었으며 세

포의 비정상적 분열과 증식을 억제하고, 세포 자연사를 유도하며 DNA가 손상 되었을 때에 이를 정상 복구하는 기능을 가진 종양 억제 유전자이다.<sup>1,2</sup> 이 종양 억제 유전자의 돌연변이는 393개의 아미노산 서열 중 DNA 결합 부위인 'Hot Spot'으로 불리는 130-290 사이인 exon 5-8에서 주로 관찰되며 점 돌연변이(point mutation)가 가장 흔하고, 삽입(insertion), 결실(deletion), 대

립 유전자의 부분적 또는 전체적 소실(L.OI: loss of heterozygosity) 등 다양한 형태를 통해서 p53의 기능을 억제한다.<sup>6-10</sup> 한편 두경부 편평 세포 암종에서도 p53 유전자의 돌연변이는 exon 5-8에서 약 40-60%로 보고되고 있다.<sup>11-13</sup>

p53 유전자의 돌연변이를 직접 염기 서열(direct sequencing) 분석법으로 모든 검체를 다 확인하기에는 많은 시간과 경비가 필요하기 때문에 아래와 같은 여러 분자 생물학적 방법을 통해서 돌연변이를 검출한다.

현재 RFLP(restriction fragment length polymorphism), ASO(allele specific oligonucleotide), DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis), PCR-SSCP(polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism), HA(heteroduplex analysis), CMC(chemical mismatch ceavage) 등의 여러 분자 생물학적 방법이 사용되고 있으나 일반적으로 자동화 시스템이 아니기 때문에 많은 시간과 노동력이 소모되며 실험의 재현성이나 정확도에서 많은 차이를 보여 왔다.<sup>13-18</sup> 이 중 SSCP 방법은 정제된 PCR 산물을 열변성 시킨 후 정상 DNA와 변이 DNA간의 서열차이로 인해서 생기는 구조적 차이를 전기영동을 통해서 확인하는 방법으로 비용 면에서 저렴한 편이고 민감도나 특이성도 비교적 높은 편이어서 지금까지 많이 사용되고 있다. 그러나 PCR 산물의 크기가 200bp 정도 될 때 70-95% 가량의 효율을 보이는 단점이 있다.<sup>16</sup> 반면 DHPLC 방법은 PCR 산물을 정제하지 않고도 분석이 가능하며 분석 시간이 5-7분 정도 걸리기 때문에 다량의 시료 분석에 매우 유용하다. 그리고 PCR 산물의 크기가 700bp 정도에서도 95-100% 가 가까운 정확도를 나타낸다.<sup>19,21</sup>

DHPLC에서 핵산이 분리되는 과정은 alkylated된 nonporous의 고정상에 TEAA(triethylammonium acetate)의 양이온이 DNA의 인산기와 결합하여 ion pairing 상태를 만들고 이것이 이동상에 의하여 고정상의 표면과 상호작용을 하여 분리가 된다.<sup>15-16</sup> 그리고 정상 DNA에서 변이 DNA의 분리는 증폭된 DNA 두 가닥을 부분적으로 열변성 시키면 두 내림 인자 중 하나의 내림 인자에서 염기의 치환 또는 삽입, 결실 등에 의한 불일치로 인해서 형성되는 heteroduplex와 상보적인 염기서열로 인해서 다시 원래의 DNA 가닥으로 재 생성되는 homoduplex가 만들어진다. 이 때 heteroduplex는 부분적으로 수소 결합이 붕괴된 형태의 버블(bubble) 구조를 띄게 되고 열적으로 더 불안정하기 때문에 적당한

컬럼 온도를 찾으면 homoduplex로부터 분리가 가능하다.<sup>22-25</sup> 그러므로 열변성을 한 후 형성되는 heteroduplex가 homoduplex로부터 column내의 상호 작용을 통해서 분리되는 피크 모양의 차이로 돌연변이를 확인할 수 있다.

본 연구에서는 두경부 종양에서 흔히 발생하는 편평 세포암종과 관련하여 p53 유전자의 돌연변이를 SSCP 방법과 DHPLC방법으로 비교 분석하고 최종적으로 자동 염기 서열 분석기를 통해 돌연변이 검출법의 효율성을 평가하고자 한다. 그리고 p53 유전자의 분자 생물학적인 진단을 위하여 DHPLC 방법을 이용한 빠르고 효과적인 자동화 검사 방법을 개발하여 질병 유전자 및 치료에 관한 연구에 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 실 험

### 시료

본 연구에서는 단국대학교 병원에서 두경부암으로 진단 받고 수술 받은 환자의 암 조직 50개와 정상 조직 30개를 대상으로 하였다.

### 시약 및 기기

#### 시약

조직에서 genomic DNA 추출시 사용한 AccuPrep™ Genomic Extraction kit, Taq. polymerase, PCR 산물 정제시 사용한 AccuPrep™ Purification kit, SSCP 분석할 때 silver stain을 하기 위해 사용한 Silverstar™ Staining kit는 Bioneer의 제품을 사용하였다. DHPLC의 이동상으로 사용한 triethylammonium acetate(TEAA)는 Transgenomic사에서, acetonitrile(ACN)은 Merck사에서 구입해 사용하였다.

#### 기기

DNA의 증폭은 GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer, U.S.A.)를 사용하였고, SSCP는 Thermo Flow Electrophoresis Temperature Control System(Novex, USA)를 사용하였다. DHPLC는 WAVE® SYSTEM (Transgenomic, U.S.A)를 사용해 돌연변이를 검출하였다. 염기서열 분석은 자동 서열 분석기 ABI 3700 (Biosystems) system을 이용하여 최종적으로 돌연변이를 검출하였다.

## 실험방법

PCR을 이용하여 DNA를 증폭한 후, SSCP와 DHPLC

방법에 의해 p53 유전자의 돌연변이를 검출하고 최종적으로 DNA 염기 서열 분석법으로 이를 확인하였다.

#### 조직에서 genomic DNA의 추출

AccuPrep™ Genomic Extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 추출한 DNA의 농도는 25 ng/μl로 일정하게 맞추어 PCR에 사용하고 장기간 보존하기 위해서 -20°C에 저장해 두었다.

#### 중합효소연쇄반응 (PCR)

PCR primer set(Tabk. 1)을 이용하고 10X reaction buffer(10 mM Tris-HCl: pH 8.3, 50 mM KCl), 10 mM dNTP mix(2.5 mM ea.), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase (1U/μl), template DNA (25ng/μl)를 20 μl의 PCR 반응 용액으로 사용하였다. DNA thermal cycler(Perkin-Elmer, GeneAmp® PCR System 2400, U.S.A)를 이용하여 주형 DNA를 94°C에서 5분 동안 변성시켜 완전히 단일가닥 DNA를 만든 후, 94°C에서 30초 동안 변성(denaturation)시키고 58°C에서 30초 동안 primer를 결합(annealing)시키고 72°C에서 50초 동안 신장(extension)시키는 cycle을 30회 반복한 후에, 마지막으로 72°C에서 5분 동안 신장시켜 DNA를 증폭하였다. PCR이 완전히 종료된 후에는 PCR 산물을 2% agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다.

#### PCR 산물의 정제

SSCP 방법과 자동 염기 서열 분석법에 사용할 PCR 산물을 AccuPrep™ Purification kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 정제하였다.

1.5 ml tube에 binding buffer 240 μl와 PCR 산물 80 μl를 섞은 후에 silica 40 μl를 첨가 후에 상온에서 20분 동안 반응시켰다. 12,000 rpm에서 2분 동안 원심분리 후에 상층액을 제거하였다. 이 후 70% 에탄올 1 ml을 첨가한 후에 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고, 이 과정을 3번 반복하였다. Elution buffer 60 μl를 첨가

한 후에 50°C에서 10분 동안 반응시킨 후에 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하여 여과액을 회수하였다.

#### SSCP 방법을 이용한 돌연변이 검출

Thermo Flow Electrophoresis Temperature Control System(Novex, U.S.A)에 Pre-cast 4-20% TBE gel(Novex, U.S.A)을 장착하고 1X TBE 완충용액을 채운 후에 온도를 10°C로 맞추고 PCR 산물 1 μl를 loading dye 5 μl와 혼합하여, 98°C에서 7분 동안 변성시킨 후 얼음에서 2분 동안 급속 냉각 시켰다. 이 후에 5 μl를 loading하고 200V에서 2시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동 한 gel을 fix-stop solution(acetic acid 100 ml + D.W 900 ml)에서 30분 동안 반응시키고, enhancing solution(enhancing solution 1 ml + D.W 999 ml)에서 30분 동안 반응시킨다. 이 후 증류수로 3분씩 두 번 세척하였고 staining solution(silver nitrate 1g+D.W 1000 ml + 37% formaldehyde 1.5 ml) 30분 동안 반응시키고 develop solution(sodium carbonate 30 g + D.W 1000 ml) 100 ml와 37% formaldehyde 150 μl, sodium thiosulfate 20 μl를 첨가한 후 5분 동안 반응 시켰다. 이 후 fix-stop solution으로 5분 동안 반응 시키고 증류수로 5분 동안 세척하였다. Silver stain에 사용되는 모든 solution은 Silverstar™ Staining kit(Bioneer, Korea)을 이용해 제조하였다.

#### DHPLC 방법을 이용한 돌연변이 검출

DIPLC의 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(styrene-divinylbenzene) 형태의 DNASep® Cartridge (Transgenomic, U.S.A)을 사용하였다. 95°C에서 10분 동안 변성시킨 후에 상온에서 45분 동안 천천

Table 1. Primer sequence used to amplify p53 tumor suppressor gene.

	Sequence of primer	Length(bp)	Position
exon5	5'-cttctctacagtaacctccctgc-3'	211	1543-1753
	5'-gccccagctgctcaccatcgcta-3'		
exon6	5'-gattgctcttaggtctggcccctc-3'	182	1808-1989
	5'-ggccaactgacaaccaacccttaacc-3'		
exon7	5'-gtgttatctcctaggttgctctg-3'	139	2487-2625
	5'-caagtgctcctgacctggagtc-3'		
exon8	5'-acctgatttcttactgcctctggc-3'	200	2906-3105
	5'-gtcctgcttcttacctgccttagt-3'		

히 식혀서 heteroduplex를 형성시켰다. Column oven의 온도를 61°C로 맞추고 0.9 ml/min로 5 µl를 주입하여 260 nm에서 돌연변이를 검출하였다.

**DNA 염기 서열 결정법에 의한 돌연변이 분석**

자동 서열 분석기 ABI 3700 (Biosystems) System을 이용하여 최종적으로 돌연변이를 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**SSCP방법에 의한 돌연변이 분석**

SSCP 방법은 현재 가장 많이 이용하고 있는 돌연변이 검출 방법 중 하나이다. 변이를 찾고자 하는 유전자를 PCR로 증폭하여 PCR산물을 알칼리나 열로 변성시킨으로써 이중 가닥 DNA를 단일 가닥 DNA로 만든 후 급속히 냉각시키면 단일 가닥 DNA는 각각의 염기 서열에 따라 고유한 형태로 변하게 된다. 하나의 염기가 변하더라도 전체적인 구조가 변하므로 전기영동을 하면 정상 DNA와 다른 이동 속도를 보이게 되므로 돌연변이를 확인 할 수 있다. SSCP방법은 크기가 약 200bp 정도 될 때 70-95%의 변이를 확인 할 수 있다. 그러나 이보다 크기가 클 경우에는 감지할 수 있는 변이에 대한 민감도가 크게 떨어진다. 또한 실험자의 숙련도에 따라서도 검출율이 많이 달라질 수 있다. 전기영동 과정 중 높은 전압에 의한 열이 발생하면 단일 가닥 DNA분자의 형태가 불안정해져 밴드를 관찰할 수 없기 때문에 gel의 온도를 일정하게 유지해 주는 냉각 시스템이 필요하다.

SSCP 방법으로 실험한 결과, 50개의 두경부암 조직에서 16개(32%)를 검출하였다. 그림에서와 같이 1-3, 5,

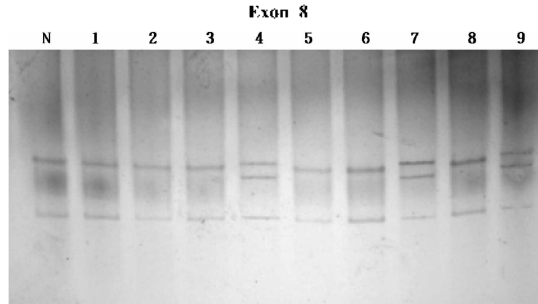


Fig. 1. SSCP analysis of fragments of the p53 gene. Three of the 10 band shifts recognized by PCR-SSCP are shown here. DNA samples of head and neck tumors and normal tissue were amplified using PCR primers for the exon 8. N; normal control tissue. Lanes 1-3, 5-6, 8 ; wild-type, lanes 4, 7, 9 ; mutant-type.

6, 8 번 시료는 정상 시료와 같은 형태를 보이는 반면 4, 7, 9번 시료에서는 밴드가 다른 형태로 이동된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

**DHPLC방법에 의한 돌연변이 분석**

DHPLC분석법은 돌연변이를 검출하는 새로운 방법으로 PCR 산물을 정제하지 않고 바로 분석할 수 있고 한 시료 당 10분 정도면 분석이 가능하기 때문에 노동력과 시간을 절약할 수 있다. 또한 모든 실험 과정이 자동화 되어있기 때문에 실험의 재현성이 뛰어나다.

DHPLC분석법은 PCR산물의 염기 서열을 WAVEMAKER™ 프리그립에 입력하면 column의 온도와 base position에 따른 helical fraction이 계산되고 이 데이터를 근거로 가장 적당한 column의 온도와 이동상의 gradient를 결정하게 된다. Helical fraction의 정도에 따라 돌연변이의 검출 여부가 결정되므로 검출하기에 가장 적합한 조건

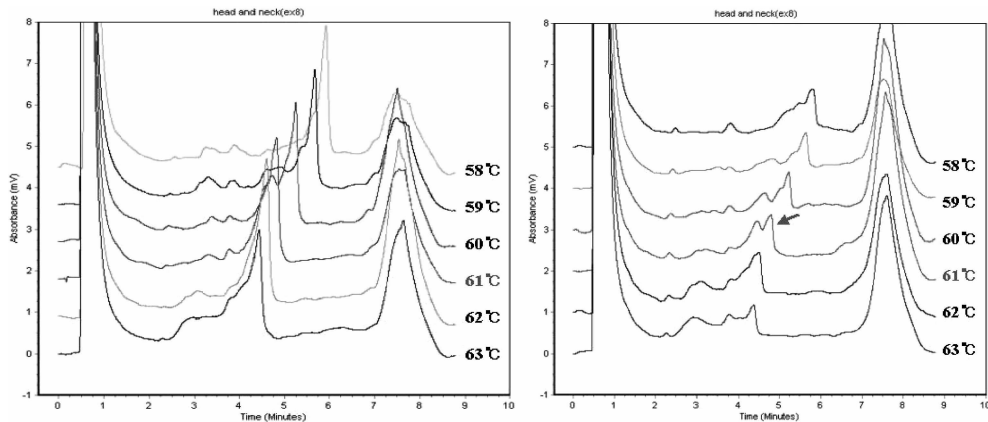


Fig. 2. Impact of column temperature on the resolution homoduplex(A), and heteroduplex(B) in HNSCC.

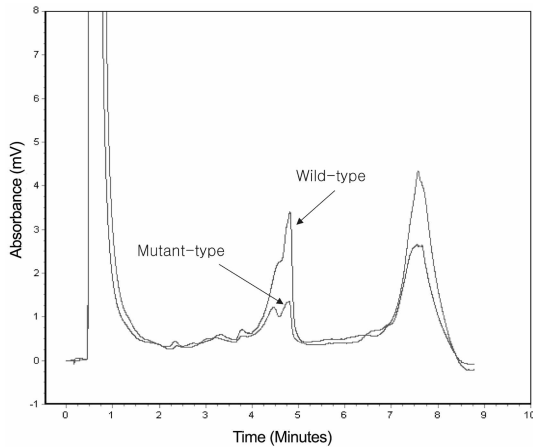


Fig. 3. Chromatograms produced DHPLC analysis of wild type and mutant type in HNSCC.

인 70-80% 사이가 되도록 primer를 제작하여 PCR 증폭을 하면 더욱 정확성을 높일 수 있다.

분석 결과 50개의 두경부암 조직 중 17개 (34%)의 돌연변이를 검출하였고 column의 온도가 61°C일 때 wild type과 mutation type의 크로마토그램의 형태를 확실히 구분할 수 있었다(Fig. 2, Fig. 3).

#### DNA 염기 서열 결정법에 의한 돌연변이 분석

SSCP와 DHPLC분석법으로 검출된 mutation type의 PCR 산물을 자동 염기 서열 분석기 ABI 3700(Biosystem) System 을 이용하여 exon 8번에서 14484del T형태의 돌연변이를 17개(34%)를 두경부암 조직에서 p53 유전자의 돌연변이를 검출하였고 이는 DHPLC분석법으로 검출한 결과와 동일함을 확인하였다(Fig. 4).

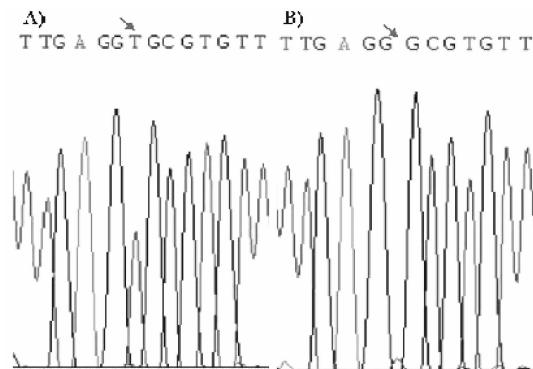


Fig. 4. Automatic sequencing analysis of exon 8 in HNSCC. A) wild type, B) mutant type (14484del T)

## 결론

50개의 두경부 편평 세포암종을 대상으로 조직에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용해 증폭하고, 그 산물을 SSCP분석 방법과 DHPLC분석 방법으로 p53 종양 억제 유전자의 exon5-8까지의 영역에서 돌연변이를 확인하였다. 그 결과 SSCP분석법으로 50개의 시료 중 16개 (32%)의 돌연변이를 관찰할 수 있었고, DHPLC분석법으로 17개 (34%)의 돌연변이를 관찰하였다. 그리고 염기 서열 분석법을 통해 DHPLC의 돌연변이 검출율이 100% 정확하다는 것을 확인하였다.

본 연구를 통하여 DHPLC는 SSCP보다 시간과 노동력을 절약할 수 있었으며 실험의 재현성과 정확성이 뛰어난 분석 방법임을 확인하였다. p53 종양 억제 유전자의 돌연변이는 여러 인체암에서 나타나기 때문에 환자의 예후 관찰과 임상적 진단에 있어서 보다 빠르고 정확한 돌연변이 검출법으로 DHPLC분석 방법이 상당히 유용할 것으로 생각된다.

이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음

## 인용 문헌

- Weinberg, R. A. *Science*, **1991**, *254*, 1138.
- Lane, D. P. *Nature*, **1992**, *358*, 15.
- Hoffstein, M.; Sidransky, D.; Volgelstein, B. and Harris, C. *Science*, **1991**, *253*, 49.
- Husgafvel-Pursiainen, K.; Boffetta, P.; Kannio, A.; Nyberg, E.; Pershagen, G.; Mukeria, A. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 2906.
- Frebourg, T.; Barbier, N.; Kassel, J.; Friend, S. H. *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 6976.
- Birch, J. M.; Blair, V.; Kelsey, A. M.; Evans, D. G.; Harris, M.; Tricker, K. J.; Varley, J. M. *Oncogene*, **1998**, *17*, 1061.
- Soussi, T. *Molecular Genetics of Cancer*, **1995**, *22*, 135.
- Soussi, T.; Legros, Y.; Lubin, R.; Ory, K.; Schlichtholz, B. *Int. J. Cancer*, **1994**, *57*, 1.
- El-Deiry, W. S.; Harper, J. W.; O'Connor, P. M.; Velculescu, V. F. *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 169.
- Ko, L. J.; Prives, C. *Genes Dev.*, **1996**, *10*, 1054.
- Geiser, A. G.; Stanbridge, E. J. *Crit. Rev. Oncogenesis*, **1989**, *1*, 261.
- Parkin, D. M.; Pisani, P. *Int. J. Cancer*, **1993**, *54*, 594.

13. Urban, T.; Ricci, S.; Grange, J. D. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1993**, *85*, 2008.
  14. Wallace, R. B.; Johnson, M. J.; Hirise, T. *Nucleic Acids Res.*, **1981**, *9*, 879.
  15. Fisher, S. G.; Lerman, L. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 1579.
  16. Scolz, R. B.; Milde, J. K.; Jung, R. *Hum. Mol. Genet.*, **1983**, *2*, 2155.
  17. Wite, M. B.; Carvalho, M.; Derso, D. *Genomics*, **1992**, *12*, 301.
  18. Myers, R. M.; Larin, Z.; Maniatis, T. *Science*, **1985**, *230*, 1242.
  19. Osborne, R. J.; Merlo, G. R.; Mitsudomi, T.; Venesio, T.; Liscia, D. S.; Cappa A. P. M.; Chiba, I.; Nau, M. M.; Callahan, R.; Minna, J. D. *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 6194.
  20. Kerns, B. J.; Jordan, P. A.; Moore, M. B.; Umphrey, P. A.; Berchuck, A.; Kohler, M. F. *Cytochem.*, **1991**, *40*, 1047.
  21. Jacquemier, J.; Moles, J. P.; Penault-Llorc, F.; Adelaide, J.; Torrente, M.; Viens, P. *Brit. J. Cancer.*, **1994**, *69*, 846.
  22. Oefner, P. J.; Underhill, P. A. *Am. J. Hum. Genet.*, **1995**, *57*, A266.
  23. Xiao, W.; Oefner, P. J. *Hum. Mutat.*, **2001**, *17*, 439.
  24. Skopek, T. R.; Glaab, W. E.; Monroe, J. J.; Kort, K. L.; Schaefer, W. *Mutat. Res.*, **1999**, *430*, 13.
  25. Oefner, P. J.; Bonn, G. K. *Amer. Lab.*, **1994**, *26*, 28C.
-