

인간비만 관련 유전자의 분석을 위한 단일가닥구조다형성/ 모세관전기영동법

강성호* · 장상민 · 이호근†

전북대학교 화학과

†전북대학교 치과대학

(2005. 7. 15 접수)

Capillary Electrophoresis Using Single Strand Conformation Polymorphism for the Analysis of Human Obesity DNA

Seong Ho Kang*, Sangmin Jang and Ho-Keun Yi†

Department of Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

†Department of Biochemistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

(Received July 15, 2005)

요 약. 단일가닥구조다형성(single strand conformation polymorphism, SSCP)과 모세관전기영동법(capillary electrophoresis, CE)을 응용하여 인간의 비만관련 유전자를 빠르고 간단히 검출할 수 있는 SSCP-CE 방법을 개발하였다. 소아비만의 관련변이로 예측되고 있는 Leu72Met 변이유전자를 중합효소연쇄반응을 통해 증폭을 하였다. 증폭된 207-bp 비만유전자의 이중나선-유전자(ds-DNA)를 95 °C에서 단일가닥-유전자(ss-DNA)로 변성시킨 뒤, 1 °C의 얼음중탕에서 단일가닥-유전자가 초기의 이중나선-유전자와 다른 구조의 조각들을 생성하였다. 생성된 다른 형태의 유전자 절편들은 5%(w/v) 글리세롤, 1.5%(w/v) PVP(M_r 1 300 000)와 1.0%(w/v) PEO M_r (600 000)의 혼합 충전젤이 포함된 용융-실리카 모세관(50 μ m I.D. \times 365 mm O.D. \times 60 cm total length; 30 cm effective length)에서 전기영동적으로 분리를 하였다. 375 V/cm의 전기장으로 인간의 비만유전자를 9분 안에 분석을 할 수 있었다. 본 SSCP-CE법은 기존의 전통적인 슬랩젤전기영동법보다 최소 10배 이상의 빠른 분석시간을 보여주었다.

주제어: 인간비만유전자, 중합효소연쇄반응, 점돌연변이, 단일가닥구조다형성/모세관전기영동법

ABSTRACT. We have investigated a capillary electrophoresis (CE) method using single strand conformation polymorphism (SSCP) for the rapid detection of human obesity DNA. Using polymerase chain reaction (PCR) we amplified human obesity DNA. Leu72Met mutation made an estimate of child obesity DNA mutant. The ss-DNA fragments, which are different to original DNA fragments, were prepared by directly immersing in 1 °C ice bath after denaturing the amplified 207-bp human obesity ds-DNA sample at 95 °C. The prepared ss-DNA fragments were separated in a fused-silica capillary (50 μ m I.D. \times 365 mm O.D. \times 60 cm total length; 30 cm effective length) filled with 1.5% poly(vinylpyrrolidone) (M_r 1 300 000), 1.0% poly(ethyleneoxide) (M_r 600 000) and 5%(w/v) glycerol as the sieving matrix and running buffer, based on gel electrophoretic separation. Under the electric field of 375 V/cm, the human obesity DNA was analyzed within 9 min at the CE. The SSCP-CE showed at least the 10-times faster analysis time than the traditional slab gel electrophoresis.

Keywords: Human Obesity DNA, Polymerase Chain Reaction, Single Strand Conformation Polymorphism/Capillary Electrophoresis, Point Mutation

서 론

단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 분석방법 중 하나인 단일가닥구조다형성(single strand conformation polymorphism, SSCP)과 이형집합자분석(heteroduplex analysis, HA)은 염기서열 검증을 위해 일반적으로 사용되고 있는 전기영동법의 분석기술이다.^{1,9} 유전자 이상 검출은 유전적 돌연변이 검출을 위해 주로 사용 되고 있으며, 비만 역시 하나의 선천성 유전적 돌연변이의 예이다. 비만은 체질량지수(body mass index, BMI)를 사용하여 간단히 정의할 수 있는데, 일반적으로 BMI(몸무게(kg)를 키의 제곱(m²)으로 나눈 값)가 30보다 크면 비만으로 분류되고 있다.¹⁰⁻¹³ 인간의 질병 중에서도 우리가 크게 인식하지 못했던 비만은 현대 사회에 들어 유전학적 분석에 의해 점점 체계화 되어가며, 사회적 질병으로 인식되고 있으며, 전세계적으로 많은 증가추세를 보임에 따라 점점 관심이 집중되고 있다.^{11,14-16} 비만은 체내에 지방이 과도하게 축적된 상태를 말하며,¹² 일반적인 비만의 측정법으로는 인체측정법(anthropometry),¹⁷ 생체전기 임피던스분석법(bioelectrical impedance analysis, BIA),¹⁷⁻²⁰ 이중에너지 x선흡수법(dual energy x-ray absorptiometry, DEXA),^{18,21} 초음파법(ultrasound),²¹ 피하지방 두께측정법(skinfold thickness, SFT)²² 등이 있다. 하지만, 이와 같은 측정방법들은 선천적 질환이 아닌 후천적인 질환을 진단하게 측정하는 것에 불과하다. 후천적인 질환을 측정한다는 것은 이미 발병한 다음 측정을 한다는 것인데, 현재 요구되고 있는 예방의학의 측면에서는 이와 같은 후천적인 비만측정 방법들은 적합하지 않다.

유전자 이상의 검출방법은 유전적 돌연변이를 검출하기 위해 유전자칩(DNA chip),^{23,24} 유전자 염기서열 분석(DNA sequencing),²⁵ 변성제기울기 젤전기영동(denaturing gradient gel electrophoresis),^{26,27} 대립유전자-특이적 증합효소연쇄반응(allele-specific polymerase chain reaction),³ 단일가닥구조다형성(single strand conformation polymorphism),^{1,24,50} 이형집합자분석(heteroduplex analysis),¹ 역전사-증합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR),²⁸ 증폭내화성 돌연변이시스템(amplification refractory mutation system)^{27,29} 등이 사용되고 있다.

현재 SSCP에서는 시료제조 시에 주로 수산화메틸수은, 포름아마이드, 수산화나트륨 그리고 우레아와

같은 화학시약들을 첨가하는데,¹⁰ 이러한 화학물질의 사용은 검출감도를 감소시키거나, 분석시료의 오염을 가져올 수 있는 문제점들이 있다. 지금까지는 주로 SSCP에 의해 생성된 각각의 유전자단편들을 polyacrylamide TBE 젤이나 MDE[®](mutation detection enhancement) 젤 용액에서 전통적인 슬랩젤전기영동을 하여 분리하고, 브롬화 에티디움(ethidium bromide, EtBr) 또는 은으로 염색하여 나타나는 유전자 띠를 확인하여 특이유전자를 분석하였다.^{9,10}

하지만, 본 연구에서는 preproghrelin 혹은 ghrelin 유전자 이상으로 single nucleotide polymorphism인 Arg51Gln, Leu72Met, G274A 중에서 소아비만의 관련이 예측되는 Leu72Met 변이를³⁰ 특이유전자로 선택하여 PCR로 증폭한다. 증폭된 유전자의 SSCP시료준비 시에 현재 일반적으로 사용하는 화학시료의 첨가없이 글리세롤, poly(vinylpyrrolidone)(PVP)와 poly(ethyleneoxide)(PEO)의 혼합 충전젤을 사용하여 CE에서 단지 9분 안에 Leu72Met 변이인 비만유전자를 분석하는 방법을 소개한다. 이러한 방법은 SSCP 과정과 전기영동에서 올 수 있는 시료의 오염을 최소화 할 수 있으며, 분석시간을 단축할 수 있는 장점을 가지고 있다.

실 험

시약 및 시료. 본 연구에서 사용한 비만유전자 시료는 Leu72Met 변이로 전북대학교 병원에 내원한 소아로부터의 시료 중에 정상과 변이로 확인된 유전자로써³⁰ 전북대학교 의과대학에서 제공 받은 것을 사용하였다. 포름아마이드(formamide), 우레아(urea), 브롬화 에티디움(ethidium bromide, EtBr), 핵산가수분해 효소가 없는 물(nuclease free water), 5× PCR buffer, GoTaq™ DNA polymerase와 5 mM dNTP는 Promega 사(Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 특이유전자를 증폭시키기 위해 정방향 합성개시물질, 5'-AGC AGA GAA AGG AGT CG-3(와 역방향 합성개시물질, 5'-TGT TCA CTG CCA CCT CT-3를 제노텍(Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 0.5× TBE 완충용액(0.089 M tris, 0.089 M borate, 0.002 M EDTA, pH 8.36)은 시판되는 TBE 분말시료(Amersco, Salon, OH, USA) 8.5 g을 3차 증류수 1 L에 녹여서 제조하였다. 저장용기 완충액/충진물질은 0.5 g/mL 브롬화 에티디움(Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)이 들어있

는 0.5× TBE 완충용액에 5%(w/w) 글리세롤(Showa, Japan)을 만들고, 여기에 분자량이 1 300 000인 1.5%(w/v) PVP(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 약 2분 동안 흔들어진 후 분자량이 600 000인 1%(w/v) PEO(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣어주고 약 6시간 동안 천천히 저어주면서 제조하였다. 100-bp DNA ladder는 Seegene사(Seoul, Korea)에서 구입하여 PCR을 통해 증폭하여 사용하였다.

중합효소연쇄반응. PCR반응은 열순환기(Perkin-Elmer model 2400, USA)를 사용하여 배양(incubation)은 94°C에서 5분 동안 1주기로 한 뒤, 변성(denaturing)은 94°C에서 60초, 합성개시물질 결합(annealing)은 56°C에서 1분, 유전자 신장(extension)은 72°C에서 1분 동안 30주기로 하였고, 72°C에서 7분 동안 1주기로 유지하고(holding), 4°C에서 보관하였다. 반응혼합액 50 µL의 최종 성분조성은 10 µL의 5× PCR buffer, 0.5 mM dNTP, 각각 0.2 pM인 정방향 합성개시물질 5'-AGC AGA GAA AGG AGT CG-3'와 역방향 합성개시물질 5'-TGT TCA CTG CCA CCT CT-3', 59.5%의 핵산가수분해효소가 없는 물, 1.25 U의 GoTaq™ DNA polymerase와 3.0 µL의 정제된 유전자시료이다. 증폭된 최종 유전자의 길이는 207-bp였다.

단일가닥구조다형성. 200 µL PCR 튜브에 핵산가수분해효소가 없는 물 9.0 µL를 넣고 증폭된 207-bp 유전자 산물 1 µL를 넣은 후, 95°C로 가열된 열탕기(FINEPCR, ALB64, Korea)에서 5분 동안 방치 후, 즉시 1°C의 얼음중탕에서 3분 동안 방치한 뒤 CE에서 시료로 사용하였다.

모세관전기영동법. CE는 He-Ne 레이저(λ_{ex} =543.5 nm, λ_{em} =610 nm; Melles Griot 05-LGR-193, CA, USA)를 광원으로 하는 레이저-유발 형광검출기를 가진 본 연구실에서 자체 제작한 것을 사용하였다. 전기장은 고전압 전원장치(Spellman®, CZE1000R, NY, USA)를 사용하였다. 모세관은 50 µm 내경, 365 µm 외경과 총길이 60 cm인 용융-실리카 모세관(Polymicro Technologies, AZ, USA)을 사용하였으며, 유효길이는 30 cm 이었다. 모세관 충전물질 및 저장용기 완충용액은 0.5 mg/mL EtBr이 포함된 0.5× TBE(pH 8.36) 완충용액에 0~5%(w/w) 글리세롤과 분자량이 1 300 000인 0~5%(w/v) PVP(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 약 2분 동안 흔들어진 후 분자량이 600 000인 0~3%(w/v) PEO(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 넣어주고 약 6시간 동안 천천히 저어주

면서 제조하였다. 모세관의 충전물질은 모세관의 한 쪽에 주사기를 사용하여 유체역학적으로 주입하였다. 시료의 주입은 계면동전기적으로 60초 동안 250 V/cm의 전기장을 걸어주어 주입하였으며, 시료의 분리는 375 V/cm의 전기장에서 약 10분 동안 행하였다.

결과 및 고찰

PCR을 통해 증폭된 Leu72Met 변이유전자인 207-bp 유전자 산물을 전통적인 슬랩젤 전기영동과 모세관 젤전기영동에서 유전자의 길이를 먼저 확인하였다. SSCP 방법은 ds-DNA에 점돌연변이가 있을 경우, 높은 온도에서 ss-DNA로 되었다가 갑자기 낮은 온도로 떨어뜨리게 되면 초기의 ds-DNA의 구조로 되돌아오지 못하고 ss-DNA 자체에서 초기와는 다른 구조적인 변형을 가져오게 되는데, 이러한 다른 형태의 유전자 단편들을 전기영동을 하여 각 유전자 단편들을 분리/분석한다(Fig. 1).

SSCP를 하기 위해 200 µL PCR 튜브에 증폭된 PCR 생산물 1.0 µL와 핵산가수분해효소가 없는 물 9.0 µL을 각각 혼합하여 잘 섞은 뒤, 95에서 5분 동안 방치하고 즉시 1°C의 얼음중탕에서 3분 동안 방치하여 생성된 다양한 유전자 단편들을 CE에 주입하여 비만유전자의 특이피크를 분리하였다. 일반적으로 지금까지의 대부분의 SSCP법에서는 유전자의 변성을 위해 포름아마이드와 우레아를 사용하고 있다. 본 실험에서도 먼저 SSCP 시에 넣어주는 포름아마이드와 우레아의 영향을 확인하기 위해 우레아의 농도를 150 mM로 고정하고, 포름아마이드의 농도를 0~30%에서 변화 시키면서 포름아마이드의 농도의 영향을 조사하였다(Fig. 2). 하지만, 예상과는 달리 포름아마이드를 첨가하지 않았을 때, 각각의 특이 유전자 피크들에 대해서 더 좋은 분리도와 감도를 보여주었다. 일반적으로 포름아마이드는 시료의 표면장력을 감소시키고, ds-DNA를 ss-DNA의 변형시켜 온도를 갑자기 떨어뜨렸을 때 구조적인 다형성을 만들며 PCR 산물에 있는 미네랄 오일도 녹여서 검출감도를 증가시키지만,⁴⁹ 본 CE의 결과에서는 포름아마이드가 반대로 검출감도의 감소를 유발시키며, SSCP에 의해 생성된 유전자 피크들의 분리도의 증가에는 거의 영향을 미치지 않는다는 새로운 사실을 알 수 있었다. 이것은 모세관젤 전기영동적 분리가 PEO, PVP, 글리세롤의 혼합젤 상

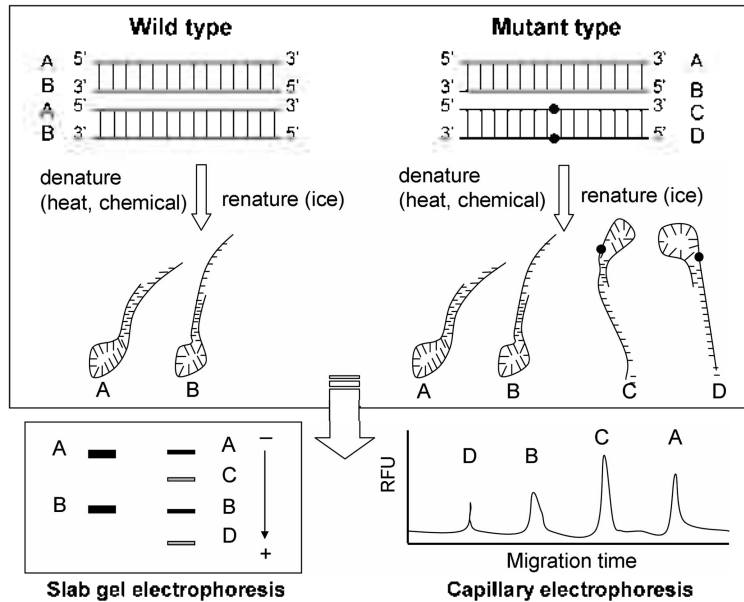


Fig. 1. Schematic diagram for the explanation of single strand conformation polymorphism (SSCP).

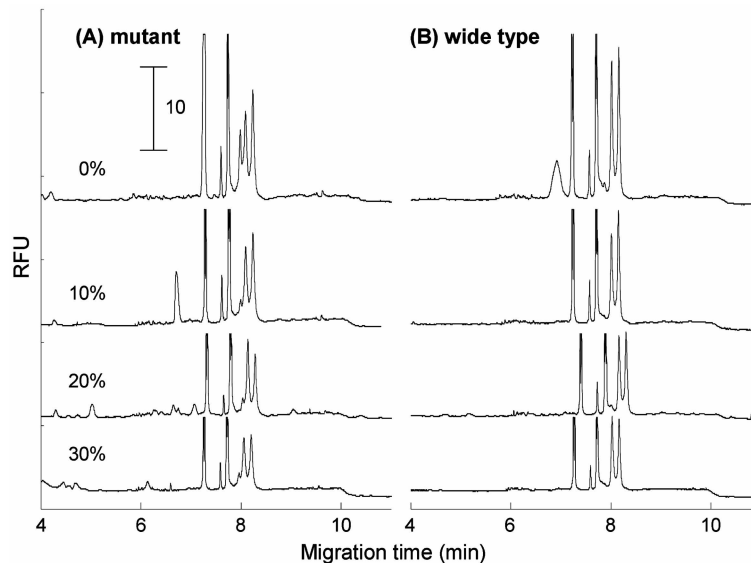


Fig. 2. Electropherograms showing the effect of formamide on the resolution (R_s) of adjacent DNA peaks in CE. CE separation conditions: sieving matrix and run buffer, 1.5% PVP (M_n 1 300 000) and 1.0% PEO (M_n 600 000) containing 5.0% wt glycerol in 0.5 × TBE with 0.5 ppm EtBr; capillary, 50 μ m I.D., 365 μ m O.D. × 60 cm total length (30 cm effective length); samples preparation, heated at 95 °C for 5 min and chilled on ice bath (1 °C) for 3 min before CE injection with the sample (nuclease free water 5.0–9.0 μ l, 1.5 M urea 1.0 μ l, formamide 0–3.0 μ l, and amplified PCR sample 1.0 μ l, into 200 μ l PCR tube); injection, electrokinetic injection at –15 kV for 60 s; applied separation electric field, 375 V/cm.

에서 유전자의 크기에 따라 분리가 일어나므로, 크기와 전하의 비에 의해 시료가 분리되는 자유용액에서

의 일반적인 CE 분리이론과는 달리 시료의 표면장력이 분리도에 큰 영향을 미치지 않음을 보여주는 것이다.

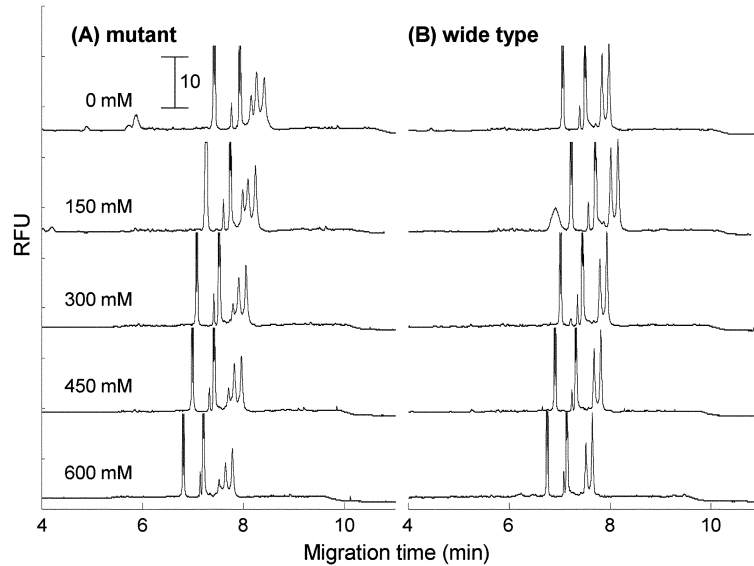


Fig. 3. Electropherograms showing the effect of urea on the resolution (R_s) of adjacent DNA peaks in CE. Samples preparation: heated at 95 °C for 5 min and chilled on ice bath (1 °C) for 3 min before CE injection with the mixing sample (nuclease free water 5.0-9.0 μ L, 1.5 M urea 1.0 μ L, formamide 0-3.0 μ L and amplified PCR sample 1.0 μ L into 200 μ L PCR tube) without formamide. Other experiment conditions were the same as those in Fig. 2.

포름아마이드를 넣지 않고 우레아의 농도를 0-600 mM의 범위에서 변화시키면서 우레아 농도에 대한 특이 유전자 피크들의 감도와 분리도의 영향을 조사하였다(Fig. 3). 결과에서 보는 바와 같이 우레아의 농도 또한 유전자 피크들의 분리와 검출에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.⁹

포름아마이드와 우레아가 본 실험에서 큰 영향을 주지 않기 때문에 포름아마이드와 우레아를 넣지 않고 단지 95°C의 온도만으로 ds-DNA를 ss-DNA로 변성 시킨 후 1°C 일음중탕에서 온도를 갑자기 떨어뜨려 ss-DNA가 초기의 ds-DNA가 아닌 다른 형태의 ss-DNA의 다형성을 만든 뒤(Fig. 1). CE에서 전기장과 완충용액 중의 PEO, PVP와 글리세롤의 농도 등 최적의 CE 분리인자 등을 조사하였다. 먼저 분리도에 대한 전기장의 영향을 조사하기 위해 각각의 PVP, PEO, 글리세롤의 단일젤 조건에서 분리를 시도하였으나 유전자 피크들에 대해 좋은 분리도를 얻지 못하였다. 따라서 1.5%(w/v) PVP, 1.0%(w/v) PEO와 5.0%(w/v) 글리세롤로 이루어진 혼합젤에서 전기장의 영향을 조사해 본 결과 375 V/cm의 전기장에서 가장 좋은 분리도(R_s)를 보여주었다(Table 1). 이때 너무 낮은 전기장을 걸어주면 특이 피크들의 분리가 잘 되지 않았고,

또 너무 높은 전기장을 걸어주면 분리도가 떨어지는 경향을 보여주었다.

PVP의 농도에 따른 특이 유전자들의 분리도의 영향을 알아보기 위해 1.0%(w/v) PEO와 5.0%(w/v) 글리세롤로 이루어진 혼합젤에 PVP의 농도를 0~2.5%(w/v)에서 변화시키면서, 전기장을 375 V/cm을 걸어주었을 때, 1.5%(w/v) PVP에서 가장 좋은 R_s 값을 보여주었으며(Table 2). PEO 농도에 의한 분리도의 영향을 알아보기 위해 1.5%(w/v) PVP와 5.0%(w/v) 글리세롤로 이루어진 혼합젤에 PEO의 농도를 0~2%(w/v)로 변화시키면서, 375 V/cm의 전기장을 걸어주었을 때, 1.0%(w/v) PEO에서 가장 좋은 R_s 값을 보여주었다(Table 3).

SSCP의 젤에 사용되는 다양한 성분의 영향에 대한 결과에 의하면, 풍부한 하이드록실기를 가진 글리세롤을 전혀 사용하지 않고서도 100% 가까이 SSCP를 검출할 수 있으며,³¹⁻³³ 10~15%(w/w) 글리세롤을 셀에 포함했을 때는 검출한계의 감소가 나타난다.⁸ 또한 하이드록시에틸 셀룰로오스(hydroxyethyl cellulose, HEC) 젤에 10%(w/w) 글리세롤을 넣어 SSCP를 분리하는 등⁵ 다양한 글리세롤의 농도에 대한 영향이 보고되고 있다. 따라서 인간의 미만유전자의 SSCP에 대해서도

Table 1. Effect of electric field strength on the resolution (R_s) of adjacent DNA peaks in CE.

Mutant type				Wild type			
Electric field (V/cm)	Peaks	Migration time (min)	R_s	Electric field (V/cm)	Peaks	Migration time (min)	R_s
250	a	-	-	250	d	-	-
	b	-	-		e	-	-
	c	-	-				
333	a	-	-	333	d	-	-
	b	-	-		e	-	-
	c	-	-				
375	a	8.1533	0.504	375	d	7.8400	0.781
	b	8.2567	0.667		e	7.9767	
	c	8.4100					
417	a	7.3167	0.408	417	d	7.3200	0.650
	b	7.4167	0.666		e	7.4533	
	c	7.5533					
458	a	6.3567	0.493	458	d	-	-
	b	6.4700	0.567		e	-	
	c	6.5833					

* $R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$, where t_1 , t_2 , w_1 and w_2 are migration times and peaks widths of adjacent DNA peaks.

Table 2. Effect of PVP on the resolution (R_s) of adjacent DNA peaks in CE.

Mutant type				Wild type			
PVP (%)	Peak	Migration time (min)	R_s	PVP (%)	Peak	Migration time (min)	R_s
0.0%	a	-	-	0.0%	d	-	-
	b	-	-		e	-	-
	c	-	-				
1.0%	a	7.3300	0.444	1.0%	d	7.4467	0.646
	b	7.4300	0.504		e	7.5500	
	c	7.5433					
1.5%	a	8.1567	0.530	1.5%	d	7.8400	0.854
	b	8.2600	0.681		e	7.9767	
	c	8.4133					
2.0%	a	8.9567	0.500	2.0%	d	-	-
	b	9.0967	0.632		e	-	
	c	9.2800					
2.5%	a	-	-	2.5%	d	-	-
	b	-	-		e	-	
	c	-	-				

글리세롤의 농도영향을 조사하였다. 375 V/cm의 전기장에서, 1.5%(w/v) PVP와 1.0%(w/v) PEO를 고정시켜 놓고, 글리세롤의 농도를 조사해본 결과, 5%(w/v) 글리세롤에서 돌연변이형 유전자에서는 피크 a, b와 c에서 0.504와 0.667의 R_s 값을 나타내었고, 정상형 유전자에서는 피크 d와 e에서 R_s 가 0.781로 가장 좋았다(Fig. 4). 이러한 결과는 일반적으로 글리세롤의 하이드록실기는 ss-DNA의 구조를 유지시켜 주는데 중

요한 역할을 하지만 너무 높은 농도에서는 비만유전자의 특이피크들의 검출한계를 감소시킬 수 있었다. 또한, SSCP법을 이용해 ds-DNA가 ss-DNA로 되었을 때, 실온 온도에서는 약 30분까지 안정함을 알 수 있었다.

인간의 비만유전자의 SSCP에 의한 다양한 구조의 유전자 산물에 대한 선택된 최적의 CE조건에서 특이피크들의 모양과 수를 비교하여 인간의 비만유전자

Table 3. Effect of PEO on the resolution (R_s) of adjacent DNA peaks in CE.

Mutant type				Wild type			
PEO (%)	Peaks	Migration time (min)	R_s	PEO (%)	Peaks	Migration time (min)	R_s
0.0%	a	-	-	0.0%	d	-	-
	b	-	-		e	-	-
	c	-	-				
0.5%	a	-	-	0.5%	d	-	-
	b	-	-		e	-	-
	c	-	-				
1.0%	a	7.9267	0.530	1.0%	d	7.4700	0.819
	b	8.0300	0.682		e	7.6133	
	c	8.1767					
1.5%	a	9.3100	0.495	1.5%	d	9.4333	0.656
	b	9.4833	0.597		e	9.6433	
	c	9.7133					
2.0%	a	-	-	2.0%	d	-	-
	b	-	-		e	-	-
	c	-	-				

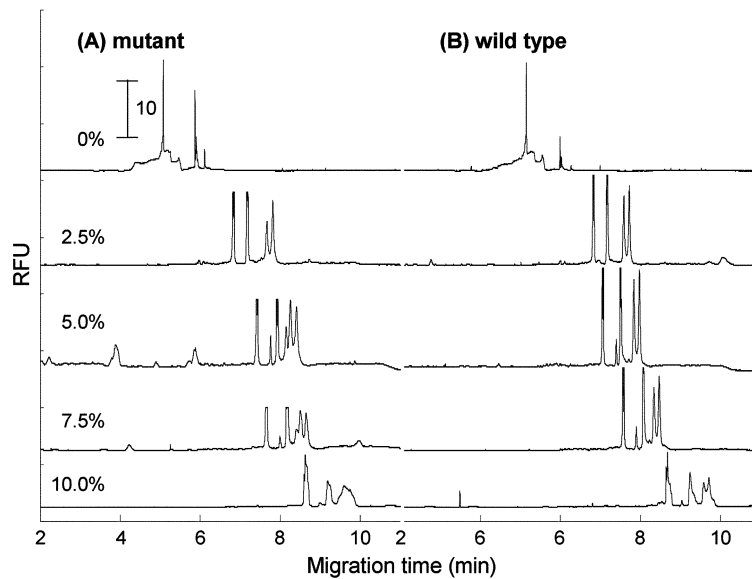


Fig. 4. Electropherograms showing the effect of glycerol on the resolution (R_s) of adjacent DNA peaks in CE. Sieving matrix and run buffer, 1.5% PVP (M_r 1 300 000), 1.0% PEO (M_r 600 000) and 0-10% wt glycerol in $0.5\times$ TBE buffer with 0.5 ppm EtBr. Other experiment conditions were the same as those in Fig. 2.

인 돌연변이형유전자와 정상형유전자를 분석할 수 있었다(Fig. 5). 최적의 CE 실험조건인 0.5 mg/mL EtBr 이 포함된 $0.5\times$ TBE (pH 8.36) 완충용액에 5%(w/v) 글리세롤, 1.5%(w/v) PVP, 1.0%(w/v) PEO가 혼합된 완충용액에서 돌연변이형 유전자에서는 3개의 특이

피크가(a, b, c in Fig. 5A) 정상형 유전자에서는 2개의 특이피크가(d, e in Fig. 5B) 검출되며, 특이 유전자들에 대해 가장 좋은 분리도로 비만유전자를 CE에서 최소 98.5% 이상의 높은 실험결과의 재현성($n=5$)으로 단지 9분 안에 정확히 분석할 수 있었다.

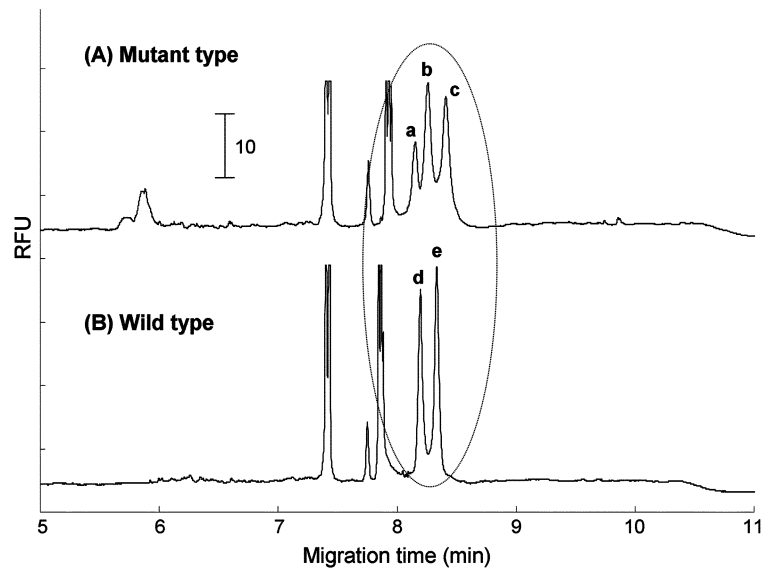


Fig. 5. Representative electropherograms of the human obesity DNA of mutant type (A) and wide type (B) in the optimum CE separation conditions. CE optimum conditions: sieving matrix and run buffer, 1.5% PVP (M_n 1 300 000), 1.0% PEO (M_n 600 000) and 5.0% wt glycerol in 0.5× TBE buffer with 0.5 ppm EtBr; capillary, 50 μ m I.D. \times 365 μ m O.D. \times 60 cm total length (30 cm effective length); sample preparation, heated at 70 °C for 5 min and chilled at ice bath (1 °C) for 3 min before CE injection with the sample (mixture of nuclease free water 9.0 μ l. and PCR sample 1.0 μ l.); electrokinetic injection, -15 kV for 60 s; applied separation electric field, 375 V/cm. RFU: Relative fluorescence unit. Indicators: a, b and c=specific peaks of mutant type, d and e=specific peaks of wild type.

결 론

SSCP법은 점돌연변이가 있는 비만유전자인 Lcu72Met 변이 ds-DNA를 95의 높은 온도에서 ss-DNA로 변성시킨 뒤, 온도를 1로 갑자기 떨어뜨려, ss-DNA가 처음의 ds-DNA와 다른 모양의 ds-DNA 조각들을 생성하게 하고, 생성된 유전자단편들의 이동도 차이를 이용하여 CE에서 분리/검출하여 인간의 비만유전자를 정확하고 빠르게 분석할 수 있는 새로운 SSCP-CE 방법을 개발하였다.

본 연구에서는 다양한 화학시약들을 첨가하지 않고서도, 단지 온도의 변화를 이용하여 ss-DNA 구조의 다형성을 만들 수 있었으며, PVP, PEO와 글리세롤이 혼합된 겔의 조성파 전기장의 조건을 변화시켜 줌으로써 인간의 비만유전자를 단지 9분 안에 분석할 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 MDE*젤이나 polyacryamide 젤 등을 사용한 전통적인 슬랩젤전기영동법 보다 최소 10배에서 최대 72배의 빠른 분석시간으로 인간비만의 조기진단을 가능하게 하여 예방의학으로의 응

용 가능성을 보여주는 것이다. 본 연구에서 개발한 SSCP-CE법은 단지 인간비만에 관여하는 유전자의 분석뿐만 아니라 다른 질병에 관여하는 다양한 점돌연변이 유전자의 분석에도 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

저자들은 비만유전자 시료를 제공하여 준 전북대학교 의과대학 소아과에 감사사를 드린다. “연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(02-PJ10-PG4-PT02-0042).”

인 용 문 헌

1. Kourkine, I. V.; Hestekin, C. N.; Buchholz, B. A.; Barron, A. E. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2565.
2. Kourkine, I. V.; Hestekin, C. N.; Magnusdottir, S. O.; Barron, A. E. *Biotechniques* **2002**, *33*, 318.
3. Tian, H.; Brody, L. C.; Fan, S.; Huang, Z.; Landers, J. P. *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 173.
4. Tian, H.; Jaquins-Gerstl, A.; Munro, N.; Trucco, M.

- Brody, L. C.; Landers, J. P. *Genomics* **2000**, *63*, 25.
5. Tian, H.; Brody, L. C.; Landers, J. P.; *Genome Res.* **2000**, *10*, 1403.
6. Nataraj, A. J.; Olivos-Glander, I.; Kusukawa, N.; Highsmith, W. E. Jr. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1177.
7. Inazuka, M.; Wenz, H. M.; Sakabe, M.; Tahira, T.; Hayashi, K. *Genome Res.* **1997**, *7*, 1094.
8. Vidal-Puig, A.; Moller, D. E. *Biotechniques* **1994**, *17*, 490.
9. Hongyo, T.; Buzard, G. S.; Calvert, R. J.; Weghorst, C. M. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3637.
10. Zimmermann, M. B.; Gubeli, C.; Püntener, C.; Molinari, L. *Swiss Med. Wkly* **2004**, *134*, 523.
11. Giugliano, R.; Melo, A. L. *J. pediatr.* **2004**, *80*, 129.
12. Champe, P. C.; Harvey, R. A.; Ferrier, D. R. *Lippincott's Illustrated Reviews Biochemistry*: 3rd Ed. Chap 26: Lippincott Williams & Wilkins, **2004**.
13. "Tackling obesity in England" Report by comptroller and auditor general: Session 2000-2001, *15*. February **2001**.
14. Comuzzie, A. G. *Best Pract. Res. Clin. Endoc. Metab.* **2002**, *16*, 611.
15. Flores-Martinez, S. E.; Islas-Andrade, S.; Machorro-Lazo, M. V.; Revilla, M. C.; Juarez, R. E.; Mujica-Lopez, K. I.; Moran-Moguel, M. C.; Lopez-Cardona, M. G.; Sanchez-Corona, J. *Ann. Genet.* **2004**, *47*, 339.
16. Briganti, E. M.; Shaw, J. E.; Chadban, S. J.; Zimmet, P. Z.; Welborn, T. A.; McNeil, J. J.; Atkins, R. C.; Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study *Med. J. Aust.* **2003**, *179*, 135.
17. Kim, M.-G.; Kim, C.-K. *Korean J. Phy. Edu.* **2001**, *40*, 559.
18. Cho, Y. H.; Choi, S. K.; Kim, D. Y.; Woo, J. T.; Kim, S. W.; Yang, I. M.; Kim, J. W.; Choi, Y. K. *Korean Soc. study Obesity* **1997**, *6*, 59.
19. Nunez, C.; Gallagher, D.; Visser, M.; Pi-Sunyer, F. X.; Wang, Z.; Heymsfield, S. B. *Med. Sci. sports Exerc.* **1997**, *29*, 524.
20. Heymsfield, S. B.; Wang, Z. M.; Visser, M.; Gallagher, D.; Pierson, R. N. Jr. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 478S.
21. Lukaski, H. C. *Am. J. Clin. Nutr.* **1987**, *46*, 537.
22. Moreno, L. A.; Letún, J. F.; Serún, R.; Mesana, M. I.; Fleta, J. *Nutr. Res.* **2004**, *24*, 235.
23. Devauchelle, V.; Chiochia, G. *Rev. Med. Interne* **2004**, *25*, 732.
24. Alberola, T. M.; García-Martínez, J.; Antúnez, O.; Viladevall, L.; Barceló, A.; Ariño, J.; Pérez-Ortín, J. E. *Int. Microbiol.* **2004**, *7*, 199.
25. Scherer, J. R.; Kheterpal, I.; Radhakrishnan, A.; Ja, W. W.; Mathies, R. A. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1508.
26. Yergeau, E.; Filion, M.; Vujanovic, V.; St-Arnaud, M. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *60*, 143.
27. Mach, R. L.; Kullnig-Gradinger, C. M.; Famleitner, A. H.; Reischer, G.; Adler, A.; Kubicek, C. P. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95*, 333.
28. Amoroso, M. G.; Longobardo, L.; Capparelli, R. *Bio-technol. Lett.* **2004**, *26*, 1731.
29. Buitkamp, J.; Semmer, J. *BMC Infect. Dis.* **2004**, *4*, 30.
30. 조대선, 이재은, 김선영, 김선준, 강창원, 황평환, 이대열. *대한소아내분비학회지* **2004**, *9*, 59.
31. Glavae, D.; Dean, M. *Hum. Mutat.* **1993**, *2*, 404.
32. Hayashi, K.; Yandell, D. W. *Hum. Mutat.* **1993**, *2*, 338.
33. Highsmith, W. E. Jr.; Nataraj, A. J.; Jin, Q.; O'Connor, J. M.; El-Nabi, S. H.; Kusukawa, N.; Garner, M. M. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1195.