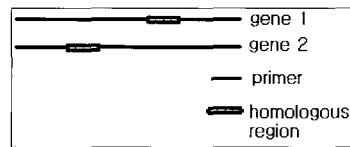


BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants

이 상 규 (경북대학교 생명공학부)

Genomic library, cDNA library, 혹은 복잡한 gene mixture 등으로부터 원하는 template을 효율적으로 증폭시키는 데는 두 가지 문제점이 존재한다. 먼저, 짧은 DNA fragment가 긴 것에 비해 증폭되기 쉽다는 것, 그리고 유전자 간에 유사 염기 서열의 존재로 실제로 존재하지 않는 인위적인 PCR product가 생성된다는 것이다(그림 1). 다시 말해서 유사 염기 서열이 존재하는 두 개의 template가 하나의 reaction tube에 존재한다면 서로 다른 incompletely extended primer (1)의 유사 염기 서열이 denaturation 후 다른 template의 primer로 작용하게 된다 (2). 즉 primer가 섞이게 된다. 바뀐 primer에 의해 extension이 일어나게 되고 (3) 결국 chimeric product가 생성된다 (4). 원래의 template에 비해 짧은 chimeric product를 우선적으로 증폭되게 되어 secondary band가 많은 PCR 결과를 얻게 된다.

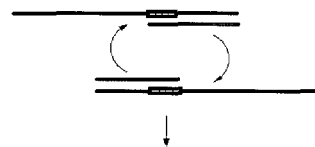
BEAMing(beads, emulsions, amplification and magnetics)은 emulsion PCR을 기초로 한 단일 template의 증폭 방법이다. 우선 PCR mixture를 emulsifier oil mix와 혼합하여 PCR mixture droplet을 만들어 각 droplet이 하나의 reaction tube 역할을 하도록 한다. 그리고 droplet에는 하나의 template만이 존재하도록 함으로써 유사 염기 서열을 가지는 template를 배제하는데 의의를 가진다. ① 먼저 template가 될 fragments를 만들고, ②



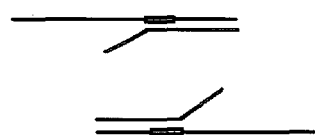
1. Incompletely extended primers



2. annealing to a heterologous target sequence (primer exchange)



3. extension



4. chimeric products



그림 1. Chimeric PCR product의 생성

biotin이 붙은 primer를 streptavidin coated bead와 binding 시킨다. ③ droplet에 bead와 primer, template 기타 PCR mixture가 존재하도록 하여 ④ emulsion PCR을 수행한다. ⑤ 유전적 변이를 포함하는 염기 서열, 그리고 3' end에 상보적인 염기 서열을 가지는 circularizable probe를 이용하여 rolling circle amplification을 수행하게 되면 유전적 변이를 가지는 DNA가 연속, 반복된 형태를 얻게 된다. ⑥ 마지막으로 원하는 fluorescein-labeled probe를 이용하여 유전적 변이를 확인하게 된다.

BEAMing과 rolling circle amplification을 이용하면 rare template만을 선택적으로 증폭하게 되고, 그 template에 존재하는 유전적 변이 또한 반복된 형태로 증폭되기 때문에 유전적 변이의 비율이 1/10,000보다 작다고 해도 충분히 검출할 수 있다. 따라서 각종 유전 질환 혹은 암의 초기 단계에 일어나는 미세

한 돌연변이가 축적되기 전에 진단적인 측면에서의 활용을 기대할 수 있다.

참고문헌

1. Li, M. et al., 2006. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat. Methods* 3, 95 - 97.
2. Williams, R. et al., (2006) Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR *Nat. Methods* 3, 545-550.
3. Diehl, F. Li et al., (2006) BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions *Nat. Methods* 3, 551-559.

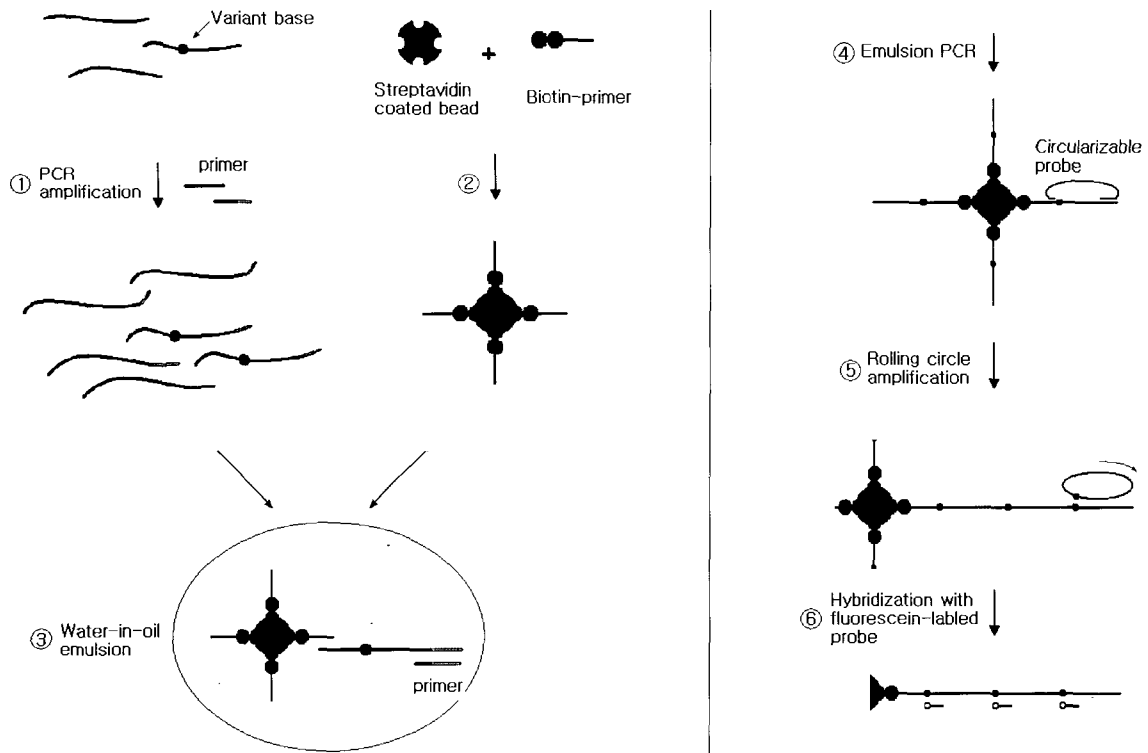


그림 2. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants.