

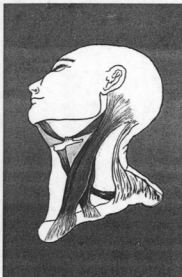
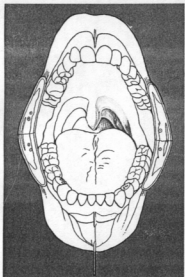
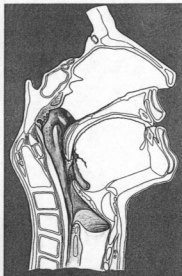
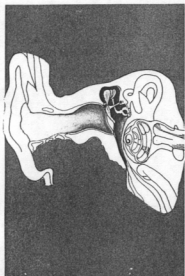
1995. 11. 24 발행

臨床耳鼻咽喉科

第 6 卷 第 2 號

Journal of Clinical Otolaryngology, Head and Neck Surgery

Vol. 6 No. 2



특집 :

분자생물학의 기초와 응용 ... 145

1. 핵산
2. DNA의 구조
3. DNA의 복제
4. 진핵세포 유전자의 구조
5. 진핵세포에서 단백질 합성과정
6. 의학분야에서 분자생물학의 응용
7. 분자생물학의 실험방법

원 저 186

임 상 239

부산·경남 이비인후과

지부회원 주소록 281

臨床耳鼻

Clin. Otol.

釜山·慶南 耳鼻咽喉科學會

임상 이 비 인 후 과

제 6 권 제 2 호

1995. 11. 24

목 차

특집 : 분자생물학의 기초와 응용	김 규 원	(145)
1. 핵산		
2. DNA의 구조		
3. DNA의 복제		
4. 진핵세포 유전자의 구조		
5. 진핵세포에서 단백질합성 과정		
6. 의학분야에서 분자생물학의 응용		
7. 분자생물학의 실험방법		
Southern Hybridization · Northern Hybridization · Western Blotting Immunohistochemistry · In Situ Hybridization · Polymerase Chain Reaction · Polymerase Chain Reaction의 응용분야 · PCR · SSCP · DNA Sequencing · RT-PCR · DDRT-PCR		
원저 :		
돌발성 난청환자에서 자기공명영상소견	전 경 명	(186)
돌발성 난청에서의 바이러스감염에 관한 연구	전 경 명	(192)
정상성인에서 전정기능검사에 대한 정량적 분석		
- 냉, 온 교대안진검사 및 정현과 회전안진검사 -	이 정 현	(203)
이명과 돌발성 난청에서의 저출력 레이저와		
Ginkgo-Extract의 병용요법에 의한 임상치험	박 기 현	(213)
안면신경마비를 동반한 측두골골절에 관한 임상적 고찰	방 진 현	(221)
부비동 내시경수술 환자에서의 OMU CT 소견	이 상 민	(227)
국소마취하에 레이저를 이용한 편도수술의 임상적 검토	김 경 현	(234)
임상 :		
의인성 비루관 폐쇄증 2례-내시경을 이용한 누낭비강문합술	진 태 훈	(239)
비안와대뇌형 모균증 1례	김 경 현	(243)
이상경상돌기증 치험례	제갈 재환	(248)
Modified Transpalatal Approach로 제거한 후비공 폐쇄들		
동반한 연구개 양성 혼합종 치험 1례	박 현 수	(253)
부인두강종양의 수술적치료	김 규 성	(260)
부갑상선 선종 1례	진 태 훈	(267)
우측 안면부에 거대혈종을 일으킨 해면상 혈관종	김 학 준	(270)
타액선의 악성혼합종양	김 용 환	(275)

Journal of Clinical Otolaryngology, Head and Neck Surgery

Vol. 6, No. 2, Nov, 1995

CONTENTS

The Basis and Applications of Molecular Biology	Kyu Won Kim	(145)
1. Nucleic Acid		
2. Structure of DNA		
3. Replication of DNA		
4. Genetic Structure of Eukaryocyte		
5. Protein Synthesis in Eukaryocyte		
6. Application of Molecular Biology in Medicine		
7. Methodology of Molecular Biology		
Southern Hybridization · Northern Hybridization · Western Blotting Immunohistochemistry · In Situ Hybridization · Polymerase Chain Reaction · Application of Polymerase Chain Reaction · PCR-SSCP · DNA Sequencing RT-PCR · DDRT-PCR		
Magnetic Resonance Imaging in Sudden Deafness	Kyong Myong Chon	(186)
Viral Study in Sudden Deafness	Kyong Myong Chon	(192)
Quantitative Analysis of Vestibular Function in Normal Adult		
— Bithermal Caloric Test and Sinusoidal Rotation Test —	Jung Hun Lee	(203)
Clinical Experience of a New Combined Therapy of Low Power Laser and Ginkgo-Extract on Tinnitus and Sudden Deafness	Kee Hyun Park	(213)
Clinical Study of Temporal Bone Fracture Associated with Facial Nerve Palsy	Jin Hyun Bang	(221)
OMU CT Findings in Patients with Endoscopic Sinus Surgery	Sang Min Lee	(227)
A Clinical Study of the Laser Assisted Tonsillectomy under Local Anesthesia	Kyung Hyun Kim	(234)
Two Cases of Iatrogenic Nasolacrimal Duct Obstruction Treated through Endoscopic Dacryocystorhinostomy	Tae Hoon Jinn	(239)
Rhinoorbitocerebral Mucormycosis	Kyung Hyun Kim	(243)
Two Cases of Elongated Styloid Process	Jae Hwan Je Kal	(248)
A Case of Pleomorphic Adenoma Causing Choanal Obstruction Treated by Modified Transpalatal Approach	Heon Soo Park	(253)
Surgical Treatment of Parapharyngeal Tumors	Kyu Sung Kim	(260)
A Case of Parathyroid Adenoma	Tae Hoon Jinn	(267)
A Case of Cavernous Hemangioma Formed Huge Hematoma of Right Face ...	Hag Jun Kim	(270)
Malignant Mixed Tumors arising in Salivary Glands	Yong Hoan Kim	(275)

Published by the Pusan-Kyongnam
Otolaryngological Society

Department of Otolaryngology, College of Medicine,
Pusan National University, 1-10 Ami-Dong, Suh-Ku
Pusan, Korea 602-739

분자생물학의 기초와 응용

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과
 김 규 원

The Basis and Applications of Molecular Biology

Kyu Won Kim, Ph.D.

Department of Molecular Biology, Pusan National University

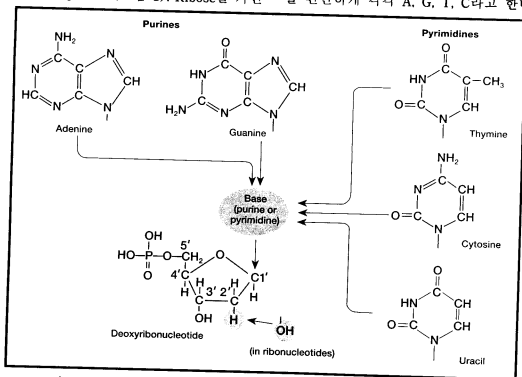
1. 핵 산

생명체에는 두 종류의 핵산이 존재한다. 즉 데옥시리보핵산인 DNA와 리보핵산인 RNA이다. 각각은 가지가 없는 선형의 고분자이며 모든 고분자와 마찬가지로 핵산도 단량체로 끊어질 수 있다. 이런 단량체들은 뉴클레오티드(nucleotide)라고 하며 이것은 다음과 같은 세 가지 부분으로 구성이 되어 있다.

1. 오탄당(pentose) : 2번 탄소(2'로 명명)에 OH기를 가진 ribose와 2번 탄소에 수소원자를 가진 deoxyribose(그림 1). Ribose를 가진

뉴클레오티드(ribonucleotide)는 RNA의 단량체이다. 데옥시리보뉴클레오티드(Deoxyribonucleotide)는 DNA의 단량체이다.

2. 질소를 함유한 환구조는 염기(base)라고 한다. 이 염기는 오탄당의 1' 탄소원자에 결합되어 있다. DNA에서는 4종류의 염기가 발견된다. 이들 중 아데닌(adenine)과 구아닌(guanine)은 이중환 구조로서 퓨린(purine)이라고 하고 다른 두 염기는 티민(thymine)과 시토신(cytosine)이며 이들은 단일환 구조로서 피리미딘(pyrimidine)이라고 한다. 이 4종류 염기를 간단하게 각각 A, G, T, C라고 한다. 이 중



(그림 1) DNA와 RNA의 단량체로 작용하는 nucleotide의 구조

KEY WORDS : Molecular Biology · Basis and Applications · Methodology

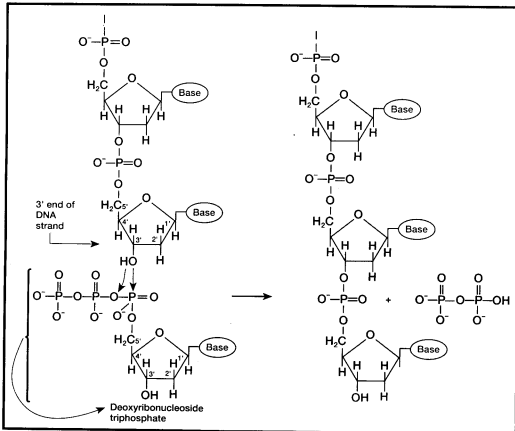
3종류, 아데닌(A), 시토신(C), 그리고 구아닌(G)은 RNA에도 동일하게 존재하나 티민(T)은 RNA에는 없고 그대신 피리미딘의 일종인 우라실(uracil, U)이 있다. 염기와 당의 복합체를 뉴클레오시드(nucleoside)라고 한다.

3. 하나, 둘, 또는 세 개의 인산기 : 이들은 오탄당의 5' 탄소원자에 결합되어 있다.

DNA와 RNA 둘 다 뉴클레오시드 3인산(nucleoside triphosphate)로 구성되어 있다. RNA의 뉴클레오시드 3인산은 ATP(adenosine tri-

표 1. Nucleoside와 mono, di, triphosphates의 명명법

	Base	Nucleoside (Base + Pentose)	Nucleotides		
			Nucleoside Monophosphate	Nucleoside Diphosphate	Nucleoside Triphosphate
RNA	Adenine(A)	Adenosine	AMP	ADP	ATP
	Guanine(G)	Guanosine	GMP	GDP	GTP
	Cytosine(C)	Cytidine	CMP	CDP	CTP
	Uracil(U)	Uridine	UMP	UDP	UTP
DNA	Adenine(A)	Deoxyadenosine	dAMP	dADP	dATP
	Guanine(G)	Deoxyguanosine	dGMP	dGDP	dGTP
	Cytosine(C)	Deoxycytidine	dCMP	dCDP	dCTP
	Thymine(T)	Deoxythymidine	dTMP	dTDP	dTTP



(그림 2) DNA의 합성

phosphate), CTP, GTP, 그리고 UTP이고 deoxy 유도체 (dATP, dCTP, dGTP, 그리고 dTTP)들은 DNA의 합성에 사용된다(표 1). 각각의 뉴클레오티드는 오탄당의 3' 탄소원자와 연결되어 다중체를 형성한다. 연결이 되면서 두 번째와 세 번째 인산기는 떨어져나간다(그림 2). 초기 DNA 연구에서 한가지 흥미로운 사실이 발견되었는데 생물 종마다 DNA에 포함된 4가지 뉴클레오티드의 상대적인 비율은 달랐지만 한 생물 중에 포함된 DNA에서 아데닌(A)과 티민(T)의 양이 완벽하게 같았고, 이와 유사하게 시토신(C)의 양은 구아닌(G)의 양과 항상 동일하였다(표 2).

표 2. DNA에 있어서의 염기의 비율

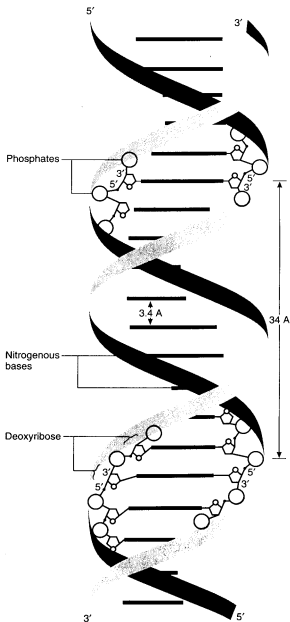
Relative Proportions(%) of Bases in DNA				
	A	T	G	C
Human	30.9	29.4	19.9	19.8
Chicken	28.8	29.2	20.5	21.5
Grasshopper	29.3	29.3	20.5	20.7
Sea urchin	32.8	32.1	17.7	17.3
Wheat	27.3	27.1	22.7	22.8
Yeast	31.3	32.9	18.7	17.1
<i>E. coli</i>	24.7	23.6	26.0	25.7

2. DNA의 구조

DNA가 유전자로서의 기능인 저장, 복제 그리고 정보의 표현 등을 나타낼 수 있는지를 알기 위해서는 DNA의 3차 구조를 알아야만 했고 이 연구는 1953년 영국의 두 과학자인 James Watson과 Francis Crick에 의해 성공적으로 수행되었다. 그들은 뉴클레오티드의 금속 모델을 이용하여 신속한 지각작용과 자가복제 능력을 포함한 DNA에 관한 모든 정보를 설명할 수 있는 분자 모델을 구축하는데 성공하였다.

Watson-Crick모델에서 DNA분자는 2개의 폴리뉴클레오티드 사슬 또는 "가닥"으로 구성되어 있다. 각 사슬의 골격은 당과 인산기가 번

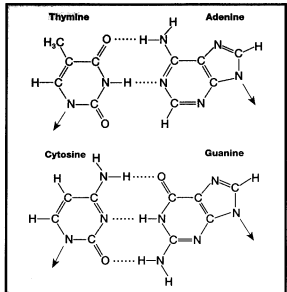
갈아 있는 구조로 형성되어 있다. 앞의 당의 5' 탄소원자에 연결된 인산기는 그 다음 당의 3' 탄소원자에 공유결합으로 연결되어 있고, 이 두 가닥은 서로가 꼬여있어서 마치 2중 나선 계단과 같은 모양을 하고 있다(그림 3). 따라서 이것을 이중나선이라고 하며 두 가닥은 각기 반대편 방향으로 뻗어 있다. DNA가닥들은 5'→3' 방향으로 조립되어 있고 관습적으로 이 방향으로 읽혀진다. 따라서 이중나선에서 한



(그림 3) DNA의 구조

가닥은 한 방향으로 조립되어 있고, 반대편 가닥은 반대 방향으로 나아가고 있다(그림 3). 이러한 가닥들을 서로 “역방향(antiparallel)”이라고 한다. 각각의 오탄당에 결합된 퓨린 또는 피리미딘 염기는 나선의 축으로부터 튀어나와 있다. 마치 계단의 한 단계처럼 이 두개의 염기가 평면상에 서로 마주보며 튀어나와 있다. 나선의 지름은 20Å이므로 그러므로 만일 두개의 피리미딘이 동일위치에 존재한다면 크기가 작아서 두 가닥의 기본골격사이에서 있는 공간을 걸쳐 연결이 되지 못할 것이다. 그 반면, 크기가 큰 두개의 퓨린은 그 공간 속에 끼어들어가지 못할 것이다. 그러나 퓨린 하나와 피리미딘 하나라면 이 공간에 잘 들어 맞는다. 앞에서 언급한 바에 의하면 DNA에 있는 A(퓨린)의 양은 T(피리미딘)의 양과 같고 C(피리미딘)은 항상 G(퓨린)과 양이 같다는 사실이 이미 알려져 있다. 이것이 나선의 공간에 배치되기 위해서 퓨린은 항상 피리미딘과 항상 짝을 이루어야 한다는 필요성과 일치한다. 그러나 왜 A는 C와 그리고 G는 T와 짝을 이루지 못하는가? 이에 대해서는 각 염기들의 분자구조를 면밀히 조사해 보면 알게 된다. 여기에는 퓨린과 피리미딘 사이에 존재할 수 있는 수소결합 때문이다. 수소원자를 가지고 있는 산소와 질소 같은 강한 전기음성원자(electronegative atom)들을 서로 접근시키면 수소결합이 형성될 수 있다. 아데닌과 티민의 N-H기의 위치는 두개의 수소결합이 형성될 수 있도록 하지만(그림 4), 구아닌과 티민을 짝을 짓게 하려면 이런 수소결합을 형성할 수 없다. 그러나 구아닌과 시토신을 한 평면에 놓아두면 세쌍의 강한 전기음성원자들에 의해 세 개의 수소결합이 형성된다(그림 4).

따라서 기하학적 형태와 이로 인한 수소결합의 형성 가능성에 의해 DNA에서 A의 양과 T의 양이 같고 C와 G의 양이 서로 같은 이유가 설명이 되며, 이러한 염기쌍(base pairs, bp)에 의해서만 이중 나선이 이루어 질 수 있다. 한 분자의 DNA는 수백 개로부터 수억 개의 염기쌍으로 구성될 수 있다. 수소결합 그



(그림 4) 티민과 아데닌, 시토신과 구아닌 사이의 수소결합의 위치

자체는 매우 약한 결합이지만 각 염기쌍을 이루고 있는 2개 또는 3개의 수소결합들이 합쳐진 상태에 의해 DNA는 아주 안정한 구조를 이루게 된다.

3. DNA의 복제

DNA의 구조는 유전정보에 관련된 두 가지 기본적인 특성의 구간을 이룬다. 즉 유전정보에 대한 저장기능과 복사기능이다. 염기의 직선적 서열은 4개의 단위로 구성된 부호로서 정보를 저장할 수 있음이 알려졌다. 그리하여 각각의 DNA 분자들은 완전한 두 세트의 암호화된 유전정보를 가지고 있다. 왜냐하면 한 가닥의 염기서열을 알게 되면 염기쌍의 법칙(A와 T, C와 G)에 의해 다른 한 가닥의 서열도 알 수 있기 때문이다. 이 두 염기서열들은 원본과 복사본과 같은 관계를 서로간에 가지고 있다. DNA가 그 자신과 똑같은 복사본을 만들 수 있는 근거를 이런 중복성이 제공한다.

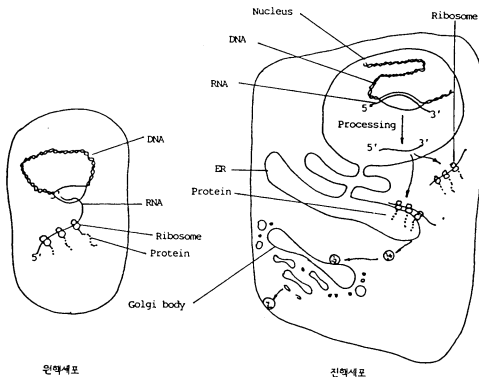
DNA복제는 DNA 이중나선이 열림으로써 시작된다. 이때 염기쌍간에 수소결합은 끊어지고, 이중나선의 두 가닥은 꼬인 것이 풀어진다.

이렇게 풀어지면, 분리된 가닥에 있는 염기 서열들은 합성되는 가닥에 들어갈 상보적인 염기들의 삽입을 유도하는 주형으로 작용하게 된다. 이 새로운 가닥들은 테옥시리보뉴클레오타이드 3인산에 의해 조립이 된다. 각 뉴클레오타이드들은 합성되고 있는 가닥에 연결이 되면서 두 번째와 세 번째 인산기는 제거가 된다(그림 2). 이와 같이 뉴클레오타이드의 연결기능을 가진 효소가 DNA중합효소이다. 이 효소작용에 의해 뉴클레오타이드들은 주형으로 작용하는 가닥에 있는 염기의 순서에 상보적인 순서로 조립이 된다. 따라서 주형에 있는 C는 새로운 가닥에 G가 들어가도록 하고, 이와 마찬가지로 G는 C가 들어가도록 유도를 한다. 이 복제과정이 완료가 되면, 두개의 DNA분자들은 서로 서로가 일치하고 또한 본래의 DNA하고도 동일한 것이 만들어진다.

4. 진핵세포 유전자의 구조

박테리아인 원핵세포와는 달리 사람과 같은 세포는 진핵세포라 한다. 진핵세포의 구조는 그림 5와 같이 원핵세포와 달리 소기관으로 구성되어 있으며, 유전자들을 포함하고 있는 염색체도 핵안에 존재한다. 이와같이 핵안에 존재하는 유전자들의 길이가 원핵세포의 유전자보다 훨씬 길고(표 3) 그 구조도 복잡하며, 이들 유전자로부터 단백질이 합성되는 과정도 여러단계를 거치면서 조절이 된다.

진핵세포 유전자들의 구조는 그림 6에 표시된 바와 같이 2중나선의 DNA와 히스톤 단백질들이 결합되어 먼저 nucleosome을 형성하며, 이들이 다시 packing되어 30 nm의 chromosome fiber를 구성한다(그림 7). 이 fiber들은 또 다시 loop를 형성하면서 응축이 되어 그림



(그림 5) 원핵 및 진핵세포의 구조

8과 같이 metaphase chromosome을 만들게 된다. 이 metaphase chromosome은 세포가 분열이 될 때 나타나고, 분열되기 전에는 이보다 풀어진 상태로 존재하면서 적절하게 RNA의 합성이 일어나서 필요한 단백질을의 번역이 일어난다. 이 경우 진핵세포의 유전자들이 어떠한 구조를 가지면서 RNA로의 전사가 일어나는지 아직 명확히 규명되어 있지 않다.

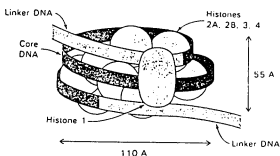
진핵세포 유전자 중 사람인 경우는 표 3에 나타난 바와 같이 haploid genome의 크기가 약 30억 bp이고 이 중 염색체의 길이를 1억 5천만 bp로 가정하였을 때, 그림 9와 같이 약 3000개의 유전자가 포함되어 있을 것으로 추정된다. 각 유전자에는 5' 상위부에 RNA로의 전사를 조절하는 조절염기서열이 있고, 그 다음에 유전정보가 mRNA로 전달되는 exon부위와 일단 RNA로 전사가 되지만 splicing에 의해 제거되어 mRNA로 넘어가지 않는 intron부위가 번갈아 가면서 존재한다. 그림 9와 같이 사람을 포함하는 진핵세포의 유전자에는 실제 단백질합성의 유전정보를 가진 부위는 전체 DNA중 소수에 불과하고 거의 대부분(~90%)은 단백질합성에 필요한 유전정보가 아니다. 즉 표 4와 같이 진핵세포 DNA의 많은 부분을 반복 DNA, 또는 기능이 알려지지 않은 spacer DNA들이 차지하고 있다. 이들이 왜 존재하는 지에 대해서는 몇가지 가설이 있으나 앞으로 인간 염색체의 DNA에 대한 연구가 더 진행되면서 새로운 설명이 가능할 것이다.

5. 진핵세포에서 단백질합성 과정

표 3. 각 생물체 genome의 DNA 양

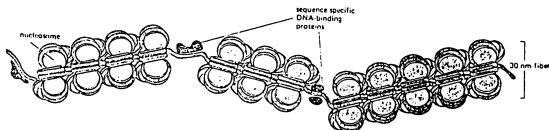
Organism	Number of base pairs	DNA length (mm)	Number of chromosomes
<i>E. coli</i>	4×10^9	1.4	1
Yeast (<i>S. cerevisiae</i>)	1.4×10^7	4.6	16
Fruit fly (<i>D. melanogaster</i>)	1.7×10^8	56	4
Human	3.0×10^9	990	23

Note: The values given are for haploid genomes.



(그림 6) Nucleosome의 구조

진핵세포 유전자로부터 전사과정을 거쳐서 합성된 RNA는 그림 10과 같이 일단 5' capping, 3'의 poly A addition이 되면서 primary RNA transcript가 생성되고 다시 앞에서 설명한 바와 같이 intron부위가 제거되는 RNA splicing과정을 거쳐서 비리소스 단백질합성을 할 수 있는 mRNA가 된다. 이 mRNA는 다시 핵에서 세포질 쪽으로 이동이 된 다음 ribosome과 결합하여 단백질 합성을 하게 된다. 이 과

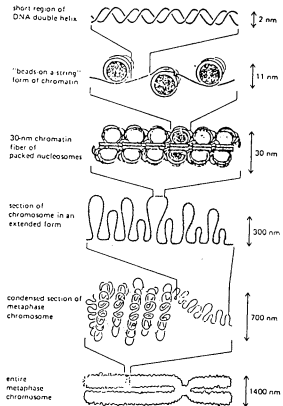


(그림 7) 30 nm chromatin fiber의 구조

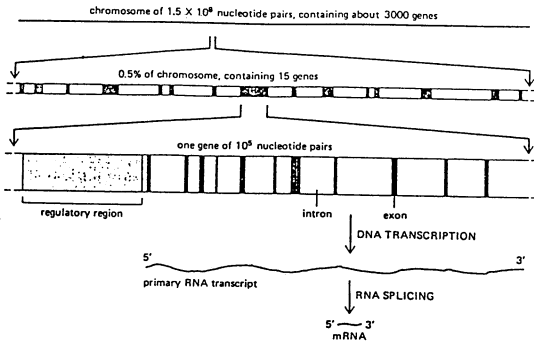
정의 최종 생성물인 단백질들은 세포 내의 효소, 구조 단백질, 막 단백질, 호르몬, 성장인자 등으로 작용하면서 여러가지 생물학적 활성을 나타낸다. 따라서 다세포 생명체에서 정상적인 분화, 발생과 생존을 위해서는 적정 단백질들이 적절한 시기에 적당한 양이 합성되어야 하므로 단백질 생합성 과정은 여러 단계에 걸쳐

표 4. 진핵세포 DNA의 종류

Protein-coding genes
Single-copy genes
Duplicated genes
RNA-coding genes
Most are tandemly duplicated
Pseudogenes
Repetitive DNA
Simple-sequence DNA
(as in satellite DNA)
Dispersed repetitive DNA
(includes mobile genetic elements)
Spacer DNA of unknown function

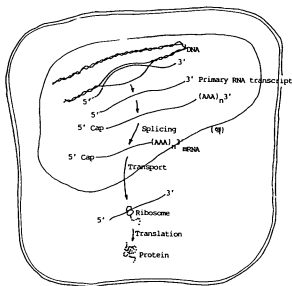


(그림 8) Metaphase 염색체의 형성과정



(그림 9) 인간 염색체들에 포함된 유전자들의 특징적인 구조

미묘하고도 엄밀하게 조절이 된다. 그 중 우선적으로 조절되는 단계가 유전자로부터 RNA를 합성하는 전사단계이며, 이 단계에는 여러 종류의 전사조절 인자들과 전사조절 염기서열들, 그리고 RNA polymerase 등이 상호작용하면서 적절하게 조절이 된다. 그 중의 한 예가 steroid 호르몬으로 이것은 steroid 호르몬 수용체와 결합한 복합체가 목표 유전자들의 전사를 일으킨다. 이것은 한 예에 불과한 것이고 사람과 같은 진핵세포의 유전자들이 어떻게 전사조절이 되고 있는 지는 아직 거의 대부분을 모르고 있다고 해도 과언이 아니다.



6. 의학분야에서 분자생물학의 응용

의학분야에 분자생물학의 연구결과들이 활용된 예를 살펴보면,

1978년, 인간단백질인 somatostatin(14 amino acid peptide neurotransmitter)을 유전자 재조합 기술에 의해 최초로 E. coli에서 발현시킴.

1980년, 유전자 재조합 기술에 의해 인간 insulin의 대량합성이 가능해 짐.

1981년, RFLP에 의한 인간 유전병의 진단이 최초로 성공함.

1982년, "Super mice"를 생성함. (Transgenic animal) Humulin으로 명명된 인간 insulin이 시판됨.

1985년, PCR에 의한 인간 유전병의 진단.

1990년, Human Genome Project 시작

1993년, Human Embryo의 cloning 성공.

이와 같이 두 분야간에 획기적인 접목이 지속되고 있으며, 표 5에 나타난 바와 같이 의학분야에 있어서 지금까지 생산된 재조합 DNA 합성물질들은 매우 다양하며 그 적용분야도 점차 확대될 전망이다.

그 중 인간 성장호르몬에 대한 재조합 DNA 합성법에 의한 제조과정을 살펴보면 그림 11과 같다.

인간 성장호르몬의 합성을 위해 발현백터를

(그림 10) 진핵세포에서 유전자로부터 단백질 합성의 과정

제조한다. 아미노산 24-191 부분을 인지하는 cDNA부분의 단편과 아미노산 1-24를 인지하는 새로이 합성된 DNA 단편을 서로 연결한다. 이렇게 제작된 plasmid를 박테리아 세포에 주입하면, 재조합 인간 성장호르몬이 세포내에서 계속적으로 생산된다. 이렇게 발현된 단백질은 원래의 인간 성장호르몬과 동일한 작용을 하게 된다.

그리고 최근에 개발되고 있는 유전자 치료법 (Gene therapy) 은 인간의 질병을 유전자 수준에서 근원적으로 치료해 보자는 시도로서 크게 두가지 방법이 개발되고 있다. 즉 돌연변이 등에 의한 유전자의 결함이 있는 경우 정상유전자로 교정하여 인간 질병을 치료하고자 하는 gene correction/replacement 또는 gene augmentation therapy법이 있고, 이와 반대로 유전자의 발현이 과다하거나 이상발현에 의한 질병인 경우는 그 유전자의 발현을 억제하여 치료하고자 하는 gene inhibition therapy가 있다.

1. Gene correction/replacement 또는 gene augmentation에 의한 유전자 치료법

표 5. Recombinant DNA products in medicine

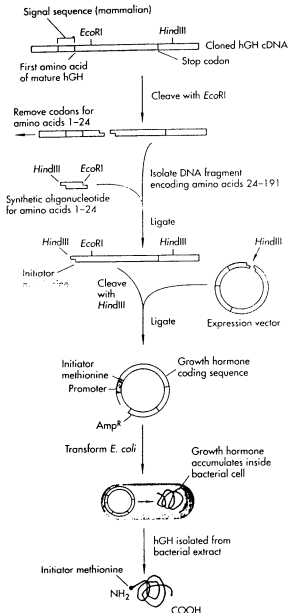
Product category	Examples/Uses
Anticoagulants	Tissue plasminogen activator(TPA) activates plasmin, an enzyme involved in dissolving clots; effective in treating heart attack victims.
Blood factors	Factor VIII promotes clotting and is deficient in hemophiliacs. Use of factor VIII produced by recombinant DNA technology eliminates the risks associated with blood transfusions.
Colony stimulating factors	Immune system growth factors that stimulate leukocyte production; used to treat immune deficiencies and to fight infections.
Erythropoietin	Stimulates erythrocyte production; used to treat anemia in patients with kidney disease.
Growth factors	Stimulate differentiation and growth of various cell types; used to promote wound healing.
Human growth hormone	used to treat dwarfism.
Human insulin	Used to treat diabetes.
Interferons	Interfere with viral reproduction; also used to treat some cancers.
Interleukins	Activate and stimulate different classes of leukocytes; possible uses in wound healing, HIV infection, cancer, immune deficiencies.
Monoclonal antibodies	Extraordinary binding specificity is used in diagnostic tests. Also used to transport drugs, toxins, or radioactive compounds to tumors as a cancer therapy; many other uses.
Superoxide dismutase	Prevents tissue damage from reactive oxygen species when tissues deprived of O ₂ for short periods during surgery suddenly have blood flow restored.
Vaccines	Proteins derived from viral coats are as effective in "priming" an immune system as the killed virus more traditionally used for vaccines, but are safer. First developed was the vaccine for hepatitis B.

1. 유전자 치환 또는 교정 (gene correction /replacement)

돌연변이가 일어난 유전자에 의해 발생된 질병의 경우 정상유전자로 바꾸어 교정할 수 있는 유전자 치료법으로서, 인간세포내에 외부 DNA와 재조합을 일으킬 수 있는 생화학적 체계를 갖고 있다는 사실에 의해 표적 핵산 염기서열을 알면 이 방법을 적용할 수 있다.

2. 유전자의 증폭 (gene augmentation)

결함이 있는 정상유전자를 다량 주입하여 정상적인 기능을 수행하는 세포로 만드는 방법이다. 이 방법은 무작위적으로 외부유전자를 세포의 염색체속으로 도입시키기 때문에 세포 염색체 DNA속으로 삽입되어 돌연변이를 일으킬 수 있다. 또한 주입시킨 유전자의 발현은 삽입된 세포내의 유전자부위에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에 유전자발현을 조절하는데에 문제가 있을 수 있으나, 외부유전자를 발



(그림 11) 재조합 DNA 기술에 의한 인간 성장호르몬의 제조과정

현시키는 효율성이 높기 때문에 유전자 치료법에 많이 이용되고 있다.

II. Gene inhibition 에 의한 유전자 치료법
 유전자의 과다 또는 이상 발현을 차단 또는 억제하는 방법으로는 mRNA와 결합될 수 있는 antisense RNA 또는 antisense DNA를 사용하는 방법들이 활발히 연구되고 있다. 그리고

RNA를 분해할 수 있는 ribozyme을 이용한 방법들도 개발이 되고 있다.

이러한 유전자 치료방법에 사용되는 외부유전자의 도입방법으로는 calcium phosphate 또는 DEAE-dextran mediated DNA transfection, lipofection, electroporation, microinjection, 그리고 retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus 등의 바이러스 벡터들을 이용한 방법들이 개발되어 있다. 그리고 현재 유전자 치료법의 적용은 골수세포, 간세포, 중추신경계, 그리고 악성암 세포들을 대상으로 하여 매우 활발하게 연구되고 있다.

7. 분자 생물학의 실험 방법

I. SOUTHERN HYBRIDIZATION

1. 실험의 의의 및 목적

절단된 DNA 단편의 복합체에서 특정의 염기 서열을 검출할 수 있는 방법으로서 유전자 cloning, 분자생물학적 연구에 필수적인 방법으로서 목적은 다음과 같다.

- clone된 DNA에 있어서의 특정 염기 배열의 위치 동정
- 제한 효소로 처리된 total genomic DNA에 있어서의 특정 염기배열의 동정
- 삽입된 외부 유전자의 copy수의 정량
- 인간 유전병의 진단을 위한 RFLP(restriction fragment length polymorphism)의 분석
- PCR 산물의 스크리닝 등에 사용되고 있다.

2. 실험 방법

(1) DNA preparation from tissue

- 1) Tissue 를 50ml tube에 넣는다.
- 2) Homogenizer buffer 12ml을 넣는다.

Homogenizer buffer

- 0.1 M NaCl
- 0.2 M sucrose
- 0.01 M EDTA
- 0.3 M Tris (pH 8.0)

3) Tissue 조각이 보이지 않을 때까지 homogenizer로 간다.

4) 10% SDS 750 ml에 넣고 vortexing 한다.

5) 1시간동안 65°C 수조에서 반응시킨다.

6) 8 M potassium acetate 2.1 ml 넣고 vortexing 한다. ice에 2시간 둔다.

7) 4°C에서 20분 동안 12,000 rpm으로 원심분리한다.

8) 상등액을 새로운 tube로 옮긴다.

9) phenol 12 ml과 chloroform 12 ml을 넣고 섞은 후, 4°C에서 10분 동안 10,000 rpm으로 원심분리한다.

10) 윗 층을 새로운 tube로 옮긴다.

11) chloroform 12 ml을 넣고 섞은 후, 4°C에서 5분 동안 10,000 rpm으로 centrifuge 한다.

12) 윗 층을 새로운 tube에 옮긴 후, ethanol 30 ml 넣은 후 섞어 준다.

13) -20°C에서 overnight로 DNA를 침전시킨다.

14) 13,000 rpm으로 30분 동안 원심분리한다.

15) 상등액은 버리고, 70% ethanol 30 ml을 넣는다.

16) 13,000 rpm으로, 10분 동안 원심분리한다.

17) Ethanol을 버리고, 상온에서 DNA pellet을 말린다.

18) DNA pellet을 dH₂O 300 µl에 녹인 후, 4°C에서 보관한다.

(2) Separation of restriction fragments of genomic DNA by agarose gel electrophoresis (그림 1)

1) 적당한 양의 DNA를(약 10 µl 정도) 하나 또는 이상의 제한효소로 자른다.

2) Digestion이 끝난 후, 적당량의 gel-loading buffer를 넣는다.

3) Agarose gel을 통하여 DNA조각을 분리한다. (genomic DNA의 경우, ethidium bromide 0.5 µl/ml을 포함한 0.5 TBE에서 0.7% gel로 running 한다.)

4) 전기 영동이 끝난 후 gel을 UV하에서 사진 찍는다.

(3) Transfer of DNA to nylon membrane

1) Gel을 depurination 용액(100 mM HCl)에 넣고 30분간 흔들어준다.

2) Gel을 denaturation 용액(0.2 N NaOH, 0.6 M NaCl)에 넣고 30분간 흔든다.

3) Gel을 neutralization 용액 (1 M Tris (pH 7.5), 0.6 M NaCl)에 넣고 30분간 흔들어준다.

4) nylon membrane과 3 MM paper를 gel크기에 맞추어 자른다.

5) Gel을 support에 놓고 nylon membrane과 3 MM paper를 차례로 transfer buffer (10×SSC) 에 적셔 gel위에 놓는다.

6) Gel주위를 wrap으로 둘러 싸다.

7) Paper towel 더미를 올리고 유리판을 올린 다음 무게를 가한다.

8) 8~24시간 동안 transfer가 되게 한다.

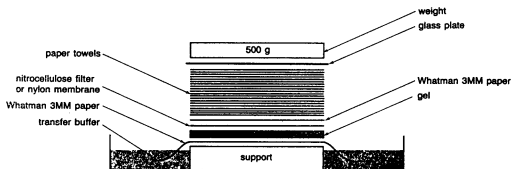


그림 1. Southern hybridization

9) Membrane을 꺼내서 0.4 N NaOH에서 1분간, 0.2 M Tris, 2×SSC 1분간 씻는다.

10) UV crosslinking을 2분간 하고, membrane을 완전히 말린다.

(4) Preparation of radioactive DNA probe by random primer labeling

1) Probe DNA를 5분간 100°C 에서 끓여서 denaturation 시킨다.

2) 순서대로 다음을 더한다.

5×OLB 10 μl

BSA(10 mg/ml) 2 μl

DNA(20~50 ng) upto 32.5 μl

³²P-dCTP 5μl

klenow(2 unit) 0.5μl

3) 37°C에서 5시간 이상 incubation한다.

solution O 2M Tris(pH 8.0) 1.25 ml

1M MgCl₂ 0.25 ml

H₂O 0.5 ml

solution A solution O 1 ml

0.1M dATP 5 μl

0.1M dGTP 5 μl

0.1M dTTP 5 μl

14.4M β-mercaptoethanol 18 μl

solution B 2M HEPES(pH 6.6) 2 ml

solution C 90 OD/ml Hexadeoxynucleotide 50 unit

A : B : C = 100 : 250 : 150 되게 섞으면 OLB가 된다.

4) Pasteur pipette에 Sephadex G-60으로 packing 한후 stop solution 200 μl 넣은 labeling mixture를 column에 건다.

5) 파란색 dye만 받아서 -20°C에서 보관한다.

(5) Hybridization

prehybridization solution

20×SSPC 2 ml

Deionized formamide 4 ml

Denhart's solution(100×) 0.4 ml

10% SDS 0.4 ml

salmon sperm DNA(10 mg/ml) 100 μl

BSA(100 mg/ml) 100 μl

DW 1 ml→total 8 ml

1) membrane을 bag이나 bottle에 넣고 prehybridization solution을 membrane cm²당 0.2 ml되게 넣고 42°C에서 3~5시간 incubation 한다.

Hybridization solution

20×SSPC 2 ml

Deionized formamide 4 ml

Denhart's solution(100×) 0.4 ml

10% SDS 0.4 ml

salmon sperm DNA(10 mg/ml) 100 μl

BSA(100 mg/ml) 100 μl

DW 1 ml

2) prehybridization이 끝난 후 solution을 버리고, Hybridization solution을 membrane cm²당 0.2 ml넣고, probe를 넣은 후 42°C에서 16~24시간 동안 incubation한다.

3) membrane을 2×SSC, 0.5% SDS에서 씻는다.

4) membrane을 2×SSC, 0.5% SDS에서 5분동안 상온에서 씻는다.

5) membrane을 68°C에서 1시간동안 0.1×SSC, 0.5% SDS에서 씻는다.

(6) Autoradiography

1) Washing이 끝난 membrane을 wrap으로 싸서 cassette에 넣은 후 암실에서 film을 넣는다.

2) -70°C에서 exposure(exposure 시간은 counter로 측정된 signal에 따라 다르다.)

3) 암실에서 film을 꺼내 Developing solution에 5분, fixing solution에 2~3분 동안 담귀서 보관한다.

참 고 문 헌

1. Southern, E.N(1975) Detection of specific sequences among DNA, fragments separated by gel electrophoresis J. Mol. Biol. 98, 503~517
2. Lehrach, H.Diamond, D.Wozny J.M., and

- Boedtger, H.(1977) DNA molecular weight determination electrophoresis under denaturing conditions; a critical reexamination, *Biochemistry* 16; 4743
3. Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured DNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77. 5201
 4. Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook. J. 1982. *Molecular cloning; A Laboratory Manual* and spring Harbor Laboratory press
 5. Wetmur, J.G. (1975) *Biopolymers*, 14, 2517



- 예) Hybridization of a human genomic DNA with a β -actin DNA probe lane 1 : 100 ng DNA molecular weight marker, lane 2 : 5 μ g DNA, lane 3 : 2.5 μ g DNA, lane 4 : 1 μ g DNA

II. NORTHERN HYBRIDIZATION

1. 목 적

northern hybridization은 조직이나 세포에 발현하고 있는 특정 RNA 해석을 위해 사용하는 방법으로 전기영동해서 RNA의 크기나 양을 알아보는 분자생물학적 방법을 말한다.

northern hybridization의 기본원리는 southern hybridization과 마찬가지로 전기영동으로 RNA를 크기별로 분리해서 membrane filter에 transfer시켜 고정된 다음 probe로 hybridization하여 검출한다. 그러나 RNA는 DNA보다 RNase에 의해 파괴되기 쉽다. RNA가 파괴되지 않고 정확한 크기를 측정하기 위해서는 특히 gel electrophoresis 단계가 중요하며 RNA 전기영동 장치는 RNA전용으로 사용하고 사용전에 0.2% diethyl pyrocarbonate로 처리한다. 또한 높은 온도와 중성이나 알칼리 pH에서는 DNA보다 특히 분해되기 쉬우므로 hybridization조건은, hybridization이 가능한 가장 낮은 온도에서 약한 산성의 buffer로 짧은 시간내에 해야 한다.

2. 실험방법

(1) Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform(AGPC) Extraction 방법에 의한 RNA 분리

1) T75 culture flask에서 키운 세포에 solution D를 5 ml를 처리하고, 4°C에 보관한다. (세포수가 많은 경우는 solution D를 10 ml 처리)

2) 50 ml polypropylene tube에 옮긴다. 2 M sodium acetate (pH 4) 0.5 ml과 saturated phenol 5 ml과 chloroform-isoamylalcohol(49 :

1) 1 ml를 첨가한다.

4) tube를 잘 흔든다. (vortexing)

5) 얼음에 30분간 넣어둔다.

6) 13,000 rpm에서 20~30분 동안 원심분리한다. 이때 4°C를 유지한다.

7) 상층액을 새 tube에 옮긴다.

8) 2 volume conc. ethanol을 첨가하여

-20°C에 한 시간이상 보관한다.

9) 13,000 rpm에서 20~30분동안 centrifuge를 돌린다. 이때 4°C를 유지한다. 그런 다음 상층액을 버린다.

10) pellet을 solution D로 녹인다음 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴다.

11) 800 μ l conc. ethanol을 첨가하여 -20°C에 한 시간이상 보관하여 RNA를 침전시킨다.

12) 13,000 rpm에서 30분동안 centrifuge를 돌린다. 이때 4°C를 유지한다. 그런 다음 상층액을 버린다.

13) 75% DEPC ethanol로 씻어낸다음, 완전히 말린다.

14) DEPC DW로 녹인다음 -70°C에 보관한다.

(2) RNA gel 전기영동과 transfer

1) 분리한 RNA를 DEPC-DW로 녹인 다음 1 μ l를 취하여 DW 1 ml에 녹인후 O.D. 값을 측정한다.

2) O.D. 값에 40을 곱하여 μ g/l 값을 구한다음, 30 μ g의 RNA를 취한다.

3) 30 μ g에 해당하는 부피의 3.3배에 해당하는 양의 sample buffer를 넣고 잘 섞는다.

4) 65°C에서 5분간 denaturation하고 급냉시킨 후 dye 2 μ l를 넣고 가볍게 centrifugation한다.

5) 미리 만들어 놓은 Gel에 loading 한 다음 100 mA 80 V 에서 3시간 30분에서 4시간 정도 전기영동시킨다. (buffer 1×MOPS)

6) 50 mM NaOH 1×SSC 용액에 30분간 shaking시킨다.

7) 10×SSC 용액에 10분간 shaking시킨다.

8) 10×SSC에 3MM과 Zeta membrane을 적신다.

9) Zeta membrane을 gel 위에 밀착시킨다. 이때 기포가 생기지 않게 주의한다.

10) 3 MM을 약 6장정도 덮는다. (southern과 동일)

11) transfer한 다음 lane표시후 transfer가

완전히 되었는지 확인한 다음 RNA가 붙은 면을 조심하고 18 S, 28 S 위치 표시후 UV crosslinker로 crosslinking을 실시한다.

(3) RANDOM PRIMER LABELING

- 1) DNA/Gel aliquot 을 5분동안 끓인다.
- 2) Rxn Soln.을 상온에서 첨가한다.

To 50 μ l	DNA	RNA
OLB buffer	4 μ l	10 μ l
BSA(10 mg/ml)	0.8 μ l	2 μ l
DNA/Gel(20~50 ng)	13 μ l	32.5 μ l
32P dCTP(10 μ Ci/ μ l)	2 μ l	5 μ l
Klenow(2 units/ μ l)	1 μ l	1 μ l

- 3) 상온에서 7시간이상 반응시킨다.

(4) RXN STOP.

- 1) Rxn stop soln 100 μ l + Random primer labeling mixture 20 μ l을 첨가한다.
- 2) 혼합액을 5분간 끓인다.
- 3) hybridization에 사용한다.

(5) Hybridization

- 1) prehybridization 용액을 처리하고 43 $^{\circ}$ C에서 4~24시간 shaking한다.

* Prehybridization Soln.

	8 ml	32 ml
20 \times SSPE	2 ml	8 ml (5 \times)
Formamide	4 ml	16 ml (50%)
Denhart's Soln.(100 \times)	0.4ml	1.6ml (5 \times)
10% SDS	0.4ml	1.6ml (0.5%)
ss DNA(10 mg/ml)	0.1ml	0.4ml (0.1 mg/ml)
BSA(100 mg/ml)	0.1ml	0.4ml (1 mg/ml)
DW	1 ml	4 ml

- 2) probe와 hybridization용액을 넣어 43 $^{\circ}$ C에서 4~24시간 shaking한다.

- ① probe에 dye 100 μ l를 넣음.
- ② TE-BEAD를 column에 채움. (기포주

의)

- ③ probe를 넣고 TE buffer를 채움. (elution 속도를 조절함)

- ④ Tube에 채운 probe를 100 $^{\circ}$ C 물에 7분간 담가둔다.

* Hybridization Soln

	8 ml	32 ml
20 \times SSPE	2 ml	8 ml (5 \times)
Formamide	4 ml	16 ml (50%)
Denhart's Soln.(100 \times)	0.4ml	1.6ml (5 \times)
10% SDS	0.4ml	1.6ml (0.5%)
ss DNA(10 mg/ml)	0.1ml	0.4ml (0.1 mg/ml)
BSA(100 mg/ml)	0.1 ml	0.4ml (1 mg/ml)
DW	1 ml	4 ml

3) Washing

- ① 상온에서 2 \times SSC, 0.1% SDS 용액에서 4번 세척한다.

- ② 50 $^{\circ}$ C에서 0.1 \times SSC, 0.1% SDS 용액에서 2번 세척한다.

- 4) X-ray film에 expose 시킨다.

4. Reference

1. Legrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boedtker, H.(1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions; a critical reexamination. Biochemistry 16 : 4743.
2. Thomas, P.S.(1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci U. S. A. 77, 5201.
3. Manitis, T., Fritsh, E., and Sambrook, J. 1982, Molecular cloning; A Laboratory Manual. Cold spring Harbor Laboratory Press.
4. Wetmur, J.G.(1975) Biopolymers, 14, 2517.

III. WESTERN BLOTTING (detected by ECL)

1. 실험의 목적 및 의의

전기 영동에 의해 분리된 NC membrane과 같은 solid support에 transfer한 후, 항원 단백질에 특이한 항체를 이용하여 단백질을 탐지하고, 정량하는 기법이다.

2. 실험 방법

(1) Protein Gel Electrophoresis

1) 시약

① Solution A (Acrylamide stock solution)

30% (W/V) acrylamide
0.8% (W/V) bis-acrylamide

② Solution B (4X Separating gel buffer)
: 100 ml

75 ml 2 M Tris-Cl (pH8.8)→1.5 M
4 ml 10% SDS→0.4%

21 ml H₂O

Stable for months in the refrigerator

③ Solution C (4× Stacking gel buffer) :
100 ml

50 ml 1 M Tris-Cl (pH6.8)→0.5 M

4 ml 10% SDS→0.4%

46 ml H₂O

Stable for months in the refrigerator

④ 10% Ammonium persulfate : 5 ml

0.5 g Ammonium persulfate

5 ml H₂O

⑤ Electrophoresis Buffer : 1 l

3 g Tris→25 mM

14.4 g Glycine→192 mM

1 g SDS→0.1%

H₂O to make 1 liter

→pH should be approximately 8.3

→Can also make a 10 X stock solution

2) Protein Gel

	Separating Gel	Stacking Gel
30% Acrylamide	3.3 ml	0.67 ml
Solution B	2.5 ml	1 ml (Solution C)
D.W.	4.2 ml	2.33 ml
Total	10 ml	4 ml
10% APS	50μl	20μl
TEMED	5μl	2μl

3) 전기영동

① 전기영동 Kit의 Gel 제조장치를 조립한다.

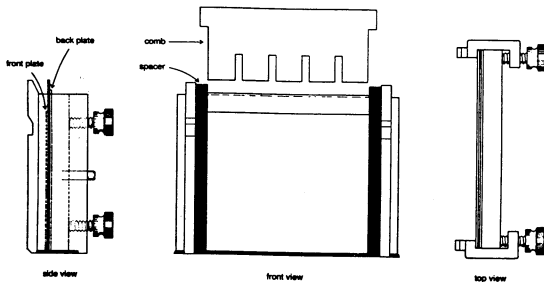
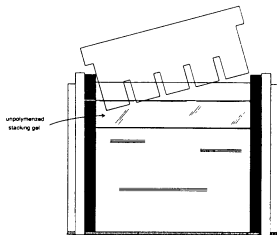
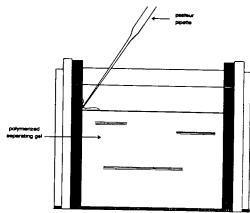
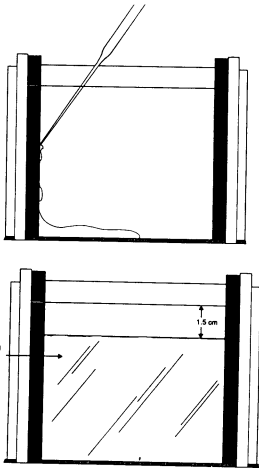


Fig. Bio-Rad Mini-Protean apparatus. Views of gel plate assembly.

② Separating Gel

: Solution A, B, D.W. 각각을 혼합한 다음, 1/50 10% APS, 1/500 TEMED을 혼합한다. →Gel 혼합액을 전기영동 Kit에 붓고 1시간이상 말린다.

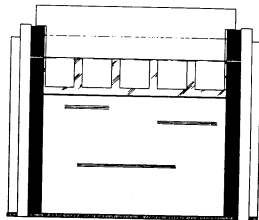


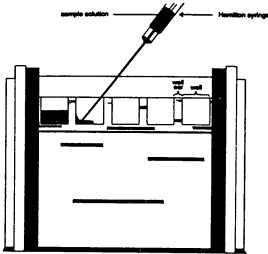
③ Stacking Gel

: Solution A, C, D.W. 각각을 혼합한 다음, 1/50 10% APS, 1/500 TEMED을 혼합한다. →Gel 혼합액을 전기영동 Kit에 붓고 1시간이상 말린다.

④ 전기영동 장치를 조립하고, 1X 전기영동 용액을 채운다.

⑤ 단백질을 loading 하고, 100~200 volt에서 전기영동을 한다.





(2) Protein Gel Staining and Destaining

1) 시약

- * Coomassie Blue : 1 liter
10 g Coomassie Blue R-250
450 ml MetOH
450 ml H₂O
100 ml Glacial Acetic Acid
- * Coomassie Gel Destaining : 1 liter
100 ml MetOH
100 ml Glacial Acetic Acid
800 ml D.W.

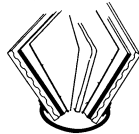
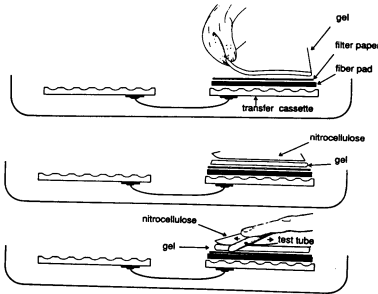
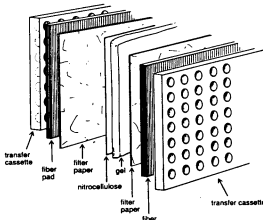
2) Protein Gel Staining → staining for 1 hour

3) Protein Gel Destaining → destaining for 30 mins and changes the destaining solution (2~3번)

(3) Protein Transfer to NC filter membrane

- * Transfer Buffer : 1 liter
1.93 g Tris → 15.6 mM
9 g Glycine → 120 mM
→ Can also be made up 20X stock solution

1) 아래 그림과 같이 gel과 NC filter membrane를 조립하고 용액을 채운 transfer kit에서 30~50 volt로 transfer한다.



(4) Western Blotting by ECL

1) 시약

• Washing Solution

TBS : 1 liter

5 ml 2 M Tris-Cl(pH7.5)→10 mM

37.5 ml 4 M NaCl→150 mM

957.5 ml D.W.

Can also be made as a 10× solution

→Add 1 ml Tween 20→0.1%

2) Block Membrane

5~10% Skim milk solution에서 2~3시간 동안 blocking 한다.

3) Western Blotting

① washing solution으로 15분씩 2~3번 반복 세척한다.

② First Antibody를 1 시간 처리한다.

③ washing solution으로 15분씩 2~3번 반복 세척한다.

④ Second Antibody 1 시간 처리한다.

⑤ washing solution으로 15분씩 2~3번 반복 세척한다.

⑥ ECL reaction

Sol A와 Sol B를 동일량 혼합하여 membrane를 1분간 반응한다.

⑦ Exposure

IV. IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)

1. 실험목적 및 의의

IHC 는 어떤 유전자가 발현되어 단백질이 세포질 내에서 만들어지면 슬라이드 위의 조직에 그 단백질에 대한 항체(일차항체)를 결합시키고, 그 항체에 대한 항체(이차항체)에 어떤 표식을 하여 다시 결합시킨 후, 그 표식을 예민한 검출 방법을 이용하여 육안적으로 알아볼 수 있도록 함으로써 특정 단백질의 발현이 어떤 세포의 어느 부위에서 발현되는지를 밝히는 것이다. western blotting은 단백질이 어떤 조직에서 발현되는지의 여부만을 밝히는 것임에 비하여 ISH는 조직의 어떤 부위에서 단백질이 발현되는가를 조사할 수 있는 방법이다. 따라서 이 방법은 병리학적인 진단에 광범위하게 활용되고 있다.

2. 실험방법

ex) Avidin-Biotin Peroxidase staining on Frozen tissue(ABC Method)

1) 조직을 적당한 크기로 잘라 냉동 절편을 만들어 미리 poly-L-lysine으로 처리된 슬라이드 위에 붙인다.

2) 조직이 붙은 슬라이드를 37℃ 건조대 위에 올려 놓고 10분 정도 고정시킨다.

3) 건조된 슬라이드에 고정액 4% paraformaldehyde (PBS (pH 7.4) 150 ml + 8% paraformaldehyde : 150 ml, mix to become 4% paraformaldehyde)를 처리하여 상온에서 15~30분 동안 방치한다.

4) PBS로 5분간 3회 세척한다.

5) 1% 소혈청 (bovine serum)을 조직 위에 처리한 뒤 상온에서 15~30분 동안 방치한

다. (Blocking)

6) 소혈청을 깨끗한 흡수지로 제거한다(세척하지 않는다).

7) 일차항체(1 : 1000~1 : 5000)를 조직에 처리한 뒤 37℃에서 1시간 반응시킨다.

8) PBS로 5분간 3회 세척한다.

9) 이차항체(biotylinated anti-mouse IgG (H+L), 1 : 200~1 : 500)를 조직위에 처리하고, 37℃에서 30분간 반응시킨다.

10) PBS로 5분간 3회 세척한다.

11) ABC를 조직에 한방울씩 떨어뜨리고 37℃에서 30분간 반응시킨다.

12) PBS로 5분간 3회 세척한다.

13) DAB 용액을 조직에 떨어뜨리고 37℃에서 10분간 방치한다.

14) PBS로 5분간 3회 세척한다.

15) 현미경하에서 염색된 조직을 관찰한다. 필요에 따라 methyl green 또는 hematoxylin으로 대조 염색을 실시한다.

3. References

1. Guesdon J-L, et al. J Histo Cyto 1979 : 27 : 1131
2. Warnke R. and Levy R. J Histo Cyto 1980 : 28 : 771
3. Hsu S-M, et al. J Histo Cyto 1981 : 29 : 557
4. Nagle R. B., et al. J Histo Cyto 1983 : 31 : 1010
5. Banerjee D. and Pettit S. R. Clin Path 1984 : 37 : 223
6. Escribano L. M., et al. J Histo Cyto 1987 : 35 : 213

V. IN SITU HYBRIDIZATION (ISH)

ISH는 동위원소나 바이오틴 (biotin) 등으로 표지된 어전 유전자의 DNA 또는 RNA probe를 슬라이드 위에 고정시킨 세포나 조직의 세포질 속에 있는 mRNA에 직접 결합되도록 하여 세포내 그 유전자의 DNA가 존재하는지 유무나 mRNA의 발현 정도를 조사하는 방법이다. ISH는 nucleic acid probe를 이용하여 세포와 조직의 DNA나 RNA를 검출하는 분자병리학적 검사방법으로 바이러스진단과 같은 감염성 질환, 유전적 질환, 암유전자의 검출 등에 활용된다. 이 방법은 Southern blotting과 Northern blotting이 DNA 존재나 RNA의 발현 여부만을 밝히는 것임에 비하여, 세포나 조직의 형태학적 구조가 잘 보존된 상태에서 유전자의 존재 또는, 발현의 정확한 부위를 직접 확인할 수 있어 특이성이 높은 장점이 있다.

2. 실험방법

(1) 조직 절편의 준비(Tissue preparation)
: 파라핀 고정 절편 준비

1) 고정(Fixation) : 조직을 적당한 크기로 잘라 고정액 (4% paraformaldehyde) 속에 담구어 냉장고에서 하루동안 보관한다.

2) 조직을 꺼내어 파라핀에 고정한 후 절삭기에서 5~10 m 정도의 두께로 잘라서 poly L-lysine으로 처리된 슬라이드 위에 붙인 후 보관 상자에 담아 실온에 보관 한다.

3) 사용 직전에 슬라이드를 xylene에 5분간씩 3회 담가 파라핀을 제거한다.

4) 100%, 95%, 80% 에탄올에 2분간씩 차례로 담가 다시 조직에 수분을 공급한다.

(2) 전 처리(Pretreatments) : 슬라이드에 0.2 N HCl을 30분간 처리한 뒤 proteinase K (50 µg/ml in 50 mM Tris-Cl, pH7.4)를 37°C에서 10분간 반응시킨다. 그런 다음 4% paraformaldehyde로 5분 동안 후고정하고 glycine (2

g/L in PBS)으로 세척한 뒤 탈수시킨다.

(3) prehybridization : 보합결합 용액 (50% DIF (deionized formamide), 4XSSC (1XSSC : 0.15 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate), 1XDenhart's soln (0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA), 2% Sarcosyl, 20 mM 2-mercaptoethanol 250 µg/ml of heat denatured ssDNA in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2))을 사용하여 상온에서 2시간 동안 반응시킨다.

(4) Probe preparation : BM사의 DIG DNA Labeling and Detection kit Nonradioactive (random primed DNA labeling with digoxigenin-dUTP, detection of hybrids by enzyme immunoassay)-1093 657, 또는 Nick Translation Kit-976 776를 사용하여 원하는 probe를 제조한다.

(5) Hybridization : 보합결합 용액에 열변성시킨 소식자를 처리하여 37°C에서 16시간 동안 반응시킨다.

(6) 세척(Washing) : 2XSSC/50% formamide 용액으로 37°C에서 1시간, 1XSSC/50% formamide용액으로 37°C에서 1시간 세척하고, 1XSSC용액으로 37°C에서 30분동안 3회, 0.5 XSSC용액으로 37°C에서 30분, 상온에서 30분 동안 세척한다.

(7) 검색(Detection) : BM 사의 Nonradioactive DNA labeling and detection kit로 결과를 확인한다.

3. References

1. Gee C.E., Roberts J.L. DNA 2 : 157~163, 1983
2. Leary J.J., Brigati D.J., Ward D.C. : Proc Natl Acad Sci USA 80 : 4045~4049, 1983
3. Brigati D. J., et al. Virology 126 : 32~50, 1983

VI. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

1. PCR의 원리

Polymerase Chain Reaction (PCR)은 특정 DNA sequence를 in vitro에서 증폭 시키는 방법이다. 이 방법은 1985년 Cetus사의 Mullis등에 의해 개발되었는데, 그 기본 아이디어는 이미 1971년 Khorana등에 의해 제안된바 있다. PCR의 기본 아이디어는 DNA 중합효소(DNA polymerase)가 단일가닥의 주형(template)과 primer를 이용하여 주형에 대한 상보 염기서열의 DNA를 5'에서 3'방향으로 합성해 나간다는 사실을 이용한 것이다(그림 1).

이 반응을 DNA 중합효소의 primer extension reaction이라고 한다. 실제 PCR 반응에서는 이와 동일한 원리를 이용하고 있으나 두개의 primer를 사용한다는 것이 다르다. 이 두 primer들은 두 가닥 DNA의 상보적인 가닥에 각각 결합할 수 있으며 이 primer들로부터 그림 2와 같이 두 가닥의 DNA를 합성할 수 있다. 그리고 이 반응을 반복함으로써 2개의 primer내의 DNA서열을 원하는 만큼 증폭이 가능하다.

이 증폭과정의 순서는

- 1) 이중가닥 DNA의 열변성(heat denaturation) (95°C에서 처리)
- 2) Primer와 DNA간의 annealing (50°C에서 처리)

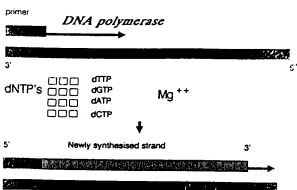


그림 1. DNA polymerase의 primer extension 반응

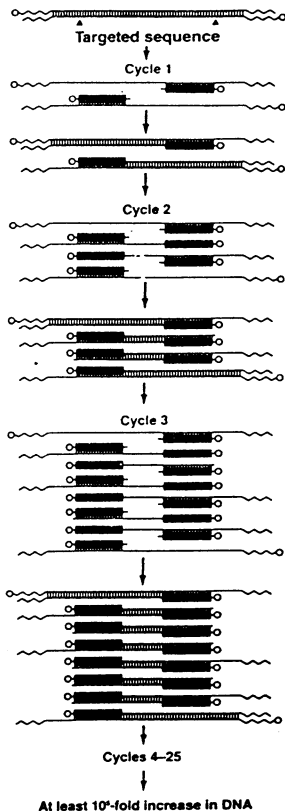


그림 2. PCR의 반응

3) DNA polymerase에 의한 primer extension 반응 (72°C에서 처리)이고 이 과정에서 고온 (95°C) 처리가 불가피하기 때문에 1970년대에 사용한 E.coli의 Klenow polymerase는 열에 불안정하여, 사이클을 반복할때마다 이 효소를 첨가해 주어야 하며 또한 annealing과 primer extension 반응도는 온도를 낮게 하여야 하기 때문에 비특이적 DNA서열들의 증폭이 일어날뿐 아니라, 조작이 번거롭고 실험자가 자리를 뜰수 없는 등 매우 불편하였다. 이러한 문제점들은 내열성 균주인 *Thermus aquaticus*에서 분리한 DNA polymerase, 즉 열에 안정한 Taq polymerase의 도입으로 해결되었다. 이 효소는 95°C에서도 변성되지 않으며, 72°C에서 효소 활성을 나타낼수 있다. 이 효소를 이용함으로써 열변성 과정을 반복하더라도 효소의 추가 공급이 필요 없으며, annealing과 primer extension반응에서는 반응속도를 높일수 있기 때문에 비특이적인 DNA서열의 증폭을 방지할수 있다. 그리고 이러한 온도의 상승과 강하등을 짧은 시간에 정확하게 조절할수 있는 thermal cycler가 개발됨으로써 현재와 같은 PCR방법이 확립되었다.

2. PCR components

PCR에 필요한 효소 및 시약들은 다음과 같다. 이들은 kit로 상품화가 되어 있으나 각각의 실험특성에 따라 적절하게 변화 시킬수 있다.

1) DNA polymerase

DNA polymerase는 대개의 경우 *Thermus aquaticus*에서 분리한 Taq polymerase를 사용하는데 그 외 *thermus thermophilus*에서 분리한 DNA polymerase, *Bacillus streothermophilus*에서 분리한 DNA polymerase, *Thermococcus litoralis*에서 분리한 DNA polymerase등도 사용되고 있다. Taq polymerase는 65°C~72°C에서 최대활성을 나타내며, 최적pH는 8.2~9.0 (in 10 mM Tris)이다.

2) Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs는 freeze-dried 또는 neutralized aqueous solutions 상태로 구입할수 있으며 -

20°C에서 몇달간 안정하다. 그러나 freeze-dried dNTPs는 사용전에 KOH로 중성화 시켜야 한다. Stock용액은 100배 농도로 만들어 보관한다.

3) Reaction buffer

대개의 경우 1988년 Saiki가 사용한 조성에 따라 만들어 사용하는데, 그 조성은 다음과 같다.

Tris-Cl (pH 8.4, 상온) 10 mM

KCl 50 mM

MgCl₂ 1.5 mM

Gelatin 0.01%

Tween20 0.01%

상기 조성중 gelatin은 bovine serum albumin으로 대체가 가능하며, non-ionic detergent인 Tween20 과 NP40은 0.1% Triton x-100으로 바꾸어 사용해도 무방하다. 그 외의 조성성분들은 경우에 따라 농도를 달리해서 사용하기도 한다. Stock은 100배 농도로 하여 -20°C에 보관한다.

4) Primers

대개의 경우 18~30 bp의 oligonucleotide를 합성하여 사용한다. 보관은 -20°C에 하는데, 반복된 freezing과 thawing을 피하기 위하여 소량씩 분주하여 보관 하는 것이 좋다. primer가 분해되지 않았는지 알아보기 위해서는 20% denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동을 해보면 된다.

각각의 primer sequence들은 동일한 G+C content를 가지며 self-complementarity에 의한 2차 구조를 형성하지 않아야 하고, 특히 3' 말단 부위에 상보성이 적은 것이 이상적이다. 그래서 대개의 경우는 PCR primer selection program이나, DNA sequence analysis program을 이용하여 적절한 primer를 선정하는 것이 좋다.

3. Target DNA

우선 target DNA는 증폭시킬 부분이 손상되거나 분해되어서는 안된다. 또한, 좋은 결과를 얻기 위해서는 PCR의 저해물질(예를 들면,

detergent, EDTA, 잔류 phenol 등)이 없어야 한다. 어떤 경우에는 target DNA를 매우 희석하여 그 속에 함유된 저해물질의 농도를 낮춤으로써 나온 결과를 얻을수도 있다. PCR의 수행시 target DNA를 93°C~95°C에서 5분간 처리하여 완전히 denaturation 시키는 것이 필수적이다.

4. Reaction condition

PCR의 시간, 온도 및 cycle 횟수는 target DNA와 primer에 따라 결정된다. 반응 용량은 10~100 μ l를 사용할 수 있고 일반적으로 20~50 μ l를 많이 사용하지만, sample수가 많은 경우는 시약 비용을 줄이기 위해 소량의 반응액을 사용한다.

primer들의 농도는 각 primer당 25~100 pmol/50 μ l를 사용하며, 반응시간은 nonspecific amplification과 전체 반응 시간을 줄이기 위해 가능한 짧게 한다. 즉, denaturing과 annealing 시간은 30초 정도, extension 시간은 kilobase당 1분정도(단, 마지막 extended incubation time 은 kilobase당 2분)로 한다. Cycle 수는 target DNA의 양과 PCR efficiency에 따라 차이가 나는데, 박테리아 1 colony로 부터 plasmid insert DNA를 증폭시킬 때는 20 cycle이면 충분하고, 그의 일반적인 경우는 더 많은 cycle을 요구한다.

5. Detection and analysis of the reaction product

PCR의 생성물은 DNA fragment이므로, 0.8~0.4% agarose gel에서 쉽게 확인 할수 있다. 이때 molecular weight marker로는 lambda DNA(HindIII digest) 또는 ϕ ×174 DNA(HaeIII digest)를 사용한다. 전기영동 결과 small

DNA product(primer-dimers 또는 primer 그 자체가 gel의 이동 경계선 가장 아래에 diffuse band로 보이고, 목적하는 product는 예상되는 size 자리에 sharp band로 관찰된다. 그의 여러 band 들이 보일 수 있는데 이들은 nonspecific priming에 의한 band 이거나 primer들의 농도 차이에 의한 단일가닥 DNA band일 수 있다.

6. Preparation of probes by the PCR

6kb DNA 까지는 다량의 DNA를 분리하기 위하여 세포배양을 하거나 플라스미드 분리 실험을 할 필요가 없이 PCR에 의해 증폭시킬 수가 있다. 그리고 M13과 pUC vector에 클론된 insert DNA들인 경우는 M13의 forward와 reverse sequencing primer를 이용하여 plate에서 자라고 있는 bacteria colony로 부터 직접 증폭시킬 수 있다. Phage plaque로 부터도 역시 적절한 primer들을 사용하여 증폭시킬 수 있다.

7. Preparation of single-stranded DNA

DNA sequence에 필요한 single-stranded DNA는 PCR product중 1~2%가 생성되기도 하며, 한 종류의 primer를 사용하여 15~30 cycle을 반응시켜 얻을수 있다. 이렇게 생성된 single-stranded DNA는 agarose gel 전기영동으로 쉽게 관찰할 수 있으며, electroelution과 ethanol precipitation에 의해 순수 분리 할수 있다. Direct sequencing은 다른 PCR primer를 사용하여 standard dideoxy protocols로 수행이 가능하다. single-stranded DNA를 얻는 또 다른 방법으로는 asymmetric primers, 또는 biotin-tagged primers 혹은 streptavidin-coated dna bead를 사용하는 방법들이 개발되어 있다.

VII POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)의 응용 분야

DNA가 생명의 정보를 간직하고 있다는 사실이 발표된 이후 여러 방법에서 이러한 유전자에 대한 연구가 이루어졌고 급기야는 유전공학의 발달에 의해 인간의 손으로 유전자를 자유자재로 다루거나 변형시킬 수 있는 정도까지 발전하게 되었다. 이러한 유전공학은 분자생물학의 주된과제의 하나로 부각되었으며 이러한 기술에 의해 생명현상들의 비밀들이 하나둘씩 풀려나가기 시작했다. 최근 급속하게 발달한 유전자 조작 기술에 의해 유전자의 구조 및 기능을 알게 되었으며 이를 유용물질의 대량생산에 이용할 수 있게 되었다. 뿐만 아니라 유전병의 진단이나 진화상의 연관성 조사 등도 가능하게 되었으며 나아가서 유전병의 근본적인 치료까지도 연구되고 있는 실정이다. 그러나 이러한 유전자 조작기술에 있어서 유전자 양이 너무 작거나 실험과정 중에 중요한 부분들이 상실되는 수가 많아 어려움을 겪는 수가 있다. 예를 들어 바이러스의 감염여부 진단을 보면 바이러스의 유전자가 삽입된 부분을 찾아내기는 극히 어렵고 이것이 잠복기중에 있다면 인간의 정상적인 유전자중에서 극미량의 바이러스 유전자를 찾아내려면 거의 불가능하였다. 또한 유전병의 진단에서도 돌연변이가 일어난 유전자를 찾이에는 어려움이 많고, 실령 찾아내더라도 이 부분만을 클로닝하여 조사하기에는 많은 어려움이 따른다. 이러한 난점들이 현재에는 PCR 방법에 의해 많은 부분들이 해결되고 있으며 이중 몇가지 응용분야에 대해 아래에서 소개하고자 한다.

1. 유전자 이상 및 유전병의 진단

유전병은 유전자에서 염기의 치환이나, 결실 혹은 전좌 등에 의해 변형이 되고 이 변형된 유전자로 부터 생성되는 비정상적인 단백질로 인해 일어나는 질병이다. 이러한 유전병을 진단하기 위해서는 이상이 생긴 유전자를 대량으로 증폭시켜야 할 필요성이 있다. 그러나 수

많은 유전자들 중에서 유전병이 일어난 특정 유전자만을 선택적으로 얻어 그 양을 증가시키기가 결코 쉬운 일이 아니다. 하지만 PCR을 이용함으로써 이러한 문제점이 쉽게 해결될수 있다(표1). 먼저 이상이 생겼으리라 생각되는 유전자 주변의 염기들과 가능한 oligonucleotide primer를 합성한후 그 부분을 PCR로 증폭시키면 원하는 유전자가 대량으로 증폭된다. 이렇게 증폭된 유전자를 바로 sequencing하여 돌연변이된 부분을 정확히 파악할 수 있으며 hybridization 조건을 엄밀히 하여 mismatch등을 검색할 수도 있다. 또한 유전자의 특정 부위를 절단할 수 있는 제한 효소를 이용하여 절단된 양상으로부터 잘못된 염기가 어떤 것인지 조사할 수도 있다(표2, 3).

2. 바이러스 감염여부의 진단

바이러스병에 의한 질병의 경우에도 PCR을 사용함으로써 신속하고 좋은 결과를 얻을수 있다. 종래의 바이러스 감염여부는 혈청학적 방법, 또는 바이러스 분리에 의해 조사하였지만, 정확성의 결여나 장시간(배양시 3~4주일 소요)이 필요했었다. 하지만 PCR을 이용하여 감염된 바이러스의 극미량 유전자를 증폭시키는 방법에 의해 단 시간내에 바이러스의 감염 여부를 조사할 수 있다. 즉 환자의 혈액을 얻어낸 후 조사하고자 하는 바이러스 유전자의 양쪽말단의 적절한 primer를 첨가한후 PCR로 증폭하면 바이러스의 DNA만 대량 증폭이 된다. 그런 다음 바이러스의 유전자를 probe로 하여 southern hybridization을 수행하여 바이러스의 감염여부를 조사한다. 이렇게 PCR을 이용함으로써 잠복기 중에 있는 소량의 바이러스까지도 추적이 가능함으로써 이 분야에 있어서 PCR의 사용은 필수적이라고 할 수 있다. 특히 hepatitis B virus(HBV), hepatitis C virus(HCV), human immunodeficiency virus type I (HIV-1) 등이 유발하는 바이러스 감염을 효과적으로 검색하는데 사용될 수 있다. 또한 RT-PCR을 이용함으로써 in vivo나 in vitro 상에서 바이러스성 질병의 초기 및 발병 단계

표 1. Sources of target DNA and approximate amounts of tissues required

Source of DNA	Amount typically used	Amount of DNA
Purified genomic DNA	50~500 ng	50~500 ng
Chorionic villus samples	small frond(5 mg)	1~3 µg
Guthrie blood spot	half a 5-mm spot	0.5~1 µg
Semen	30 µl	5~10 µg
Whole blood	30 µl	0.5~1 µg
Buccal cells	one mouth wash	0.1~1 µg
Tissue blocks	50 mg	0~10 µg
Cell suspensions	5×10 ⁵ cells	2.0~5 µg

표 2. Inherited disorders diagnosed using PCR protocols

Alpha-1-antitrypsin	Haemophilia A and B
β thalassaemia	Huntington's chorea
Cystic fibrosis	Phenylketonuria
Duchenne muscular dystrophy	Sickle cell anaemia
Myotonic dystrophy	Familial adenomatous polyposis

표 3. A comparison of Southern analysis and PCR analysis

Southern	PCR
Purified DNA	Many different tissues
5 µg Genomic DNA	0.5 µg genomic DNA
Four to five days	One day
Radioisotopes	No radioactivity

에 관여하는 pathogenic step을 연구하는데 유용하게 사용될 수 있다. 현재 HIV-1, HCV의 특정 mRNA를 검색하는데 이 RT-PCR이 사용되고 있다.

3. 법의학에의 응용

범죄 수사에 있어서 용의자들의 신원 검색과 진범의 결정등은 매우 중요한 일로서 이 과정에 PCR이 사용될 수 있다 왜냐하면 DNA배열 중의 어떤부분은 개개인에 있어서 특징적인 것이 있기 때문이다. 따라서 모발, 혈흔, 정액 등에 포함된 소수의 세포로부터 DNA를 추출하여 PCR을 통해 특정 유전자를 증폭함으로써

어느 사람의 세포인지를 검색할 수 있다(표4). 예를 들어 한개의 모발에 붙어 있는 세포로부터 DNA를 추출하고 그중 mitochondria에 존재하는 각 DNA의 개인 특이 DNA를 PCR로 증폭하여 염기 서열을 결정함으로써 특정인의 식별이 가능하다. 또한 HLA형 등의 개인 특이성도 PCR에 의해 결정이 될 수 있으므로 이 역시 법의학에서 응용이 된다.

4. 유전자 클로닝과 Sequencing에의 활용
유전자를 클로닝하기 위해서는 유전자의 양이 증폭되어야 하므로, DNA를 플라스미드 또는 phage vector등에 삽입시킨 후 대장균등을

통해 증폭시켜야 한다. 그러나 클로닝이나 sequencing 작업에 있어서도 PCR을 사용할 경우 세포를 거치지 않고 *in vitro*에서 바로 특정 유전자를 증폭할 수 있다. 즉 특정 단백질의 N말단과 C말단 아미노산의 서열이 결정되면 이로부터 *mixer primer*를 만들어 클로닝 할 수 있다. Sequencing 경우는 Sanger의 dideoxy 방법을 이용하여 PCR로 증폭된 DNA를 바로 sequencing 할 수 있고 이 경우 *subcloning*이 필요하지 않다. 이 dideoxy방법에서는 단일가닥 DNA가 필요하므로 T7 promoter를 결합시킨 PCR primer에 의해 DNA를 증폭하고, 증폭된 DNA로부터 T7 RNA polymerase를 이용하여 RNA를 합성한 다음, 역전사 효소를 이용하여 단일가닥 DNA를 생성하여 유전자 서열을 결정하는 방법도 고안되어 있다. 이 방법외에도 비대칭 PCR법을 이용하면 쉽게 단일가닥의 DNA를 증폭할 수 있다. 비대칭 PCR 방법은 두 개의 primer 중 하나의 양을 1/20~1/200로 적게 넣고 PCR을 행한다. 따라서 반응중에 적은 양의 primer는 소모되어 없어지므로, 이 primer로부터 DNA의 증폭은 정지하고 다른가닥의 DNA는 primer가 과량으로 존재하기 때문에 증폭이 계속되어 결과적으로 단일가닥의 DNA를 다량으로 합성하게 된다. 따라서 PCR에 의한 sequencing은 그 외에도 plasmid나 phage내에 유전자를 삽입하여 대장균에서 증폭시키는 클로닝과정이 필요치 않다. 최근 보고된바에 의하면 mRNA상에 특정한 부분의 primer를 합성한 후 여러차례에 걸쳐 PCR을 수행하여 5'쪽의 sequence를 다량 증폭시킨다. 이때 주목할 점은 primer를 이용하여 유전자를 증폭하고 증폭된 유전자 중간에 다시 특정 primer를 선택하여 5' 말단이 정확하게 증폭될 수 있게끔 한다. 그러면 그림 3에서 제시한 것처럼 5' 말단이 포함된 DNA를 얻을 수 있으므로 이를 sequencing하면 된다.

5. 그의 분자생물학 분야에서의 응용에

1) Transfection시킨 유전자의 검색

동물에게 외부의 유전자를 도입하는 방법으

로 *transgenic animal*처럼 유전자를 주입하는 방법이 있고 동물세포에는 *calcium phosphate transfection method*를 이용하는 방법 등이 있다. 이렇게 해서 얻어진 형질 전환세포 혹은 동물인 경우 외부에서 주입한 유전자가 존재하는지의 확인에도 PCR이 응용될 수 있다. 실제로 *transgenic mice*의 혈액을 소량 얻어서 PCR에 의해 외부 유전자의 존재여부를 확인한다.

2) 암전이 과정의 추적자로서 PCR의 응용

암세포의 이동과정을 확인하는데도 PCR이 성공적으로 쓰이고 있다. 전이성이 강한 암세포를 실험동물에 주사후 그 동물의 각 장기를 시간별로 분리한 다음, 주입한 암세포가 가지고 있는 특이 유전자를 PCR에 의해 증폭하여 조사하면 실험동물의 어느 장기에 얼마나 많은 암세포가 가서 자라고 있는지의 관찰이 가능하다. 이 실험의 경우 주사할 암세포와 실험동물사이에 유사성이 없는 유전자를 선택하여 PCR을 행해야 하는데 쥐나 인간으로부터 유래한 암세포를 *chick embryo*에 주사할 경우 쥐나 인간의 β -globin 유전자를 PCR로 증폭하여 추적조사하는 방법을 많이 사용하고 있다 (그림 4, 5, 6).

3) In vivo footprinting에의 응용

Footprinting 방법은 DNA에 결합하는 단백질의 조사에 널리 이용되고 있는 방법이다. 그러나 종래의 *in vitro*상에서 행하던 방법에 의해서는 실제 *in vivo*와는 단백질의 결합 양상이 달라서 문제점이 많았다. 따라서 최근 *in vivo* footprinting 방법이 개발되었다. 즉 이 방법에 의하면 세포의 핵을 분리하고 여기에 DNase I이나 Dimethyl Sulfide를 사용하여 무작위로 DNA를 잘라내는데 단백질이 결합한 부위는 보호되어 잘리지 않으므로 단백질이 결합된 부위가 어딘지를 알 수 있다. 그러나 이 방법에서의 문제점은 핵에서 분리되는 유전자의 양이 매우 작아서 검출하기가 어려웠으나, 이렇게 절단된 DNA단편들을 PCR을 이용하여 증폭하므로써 핵안에서 실제적으로 유전자에 결합된 단백질을 조사 할 수가 있게 되었다.

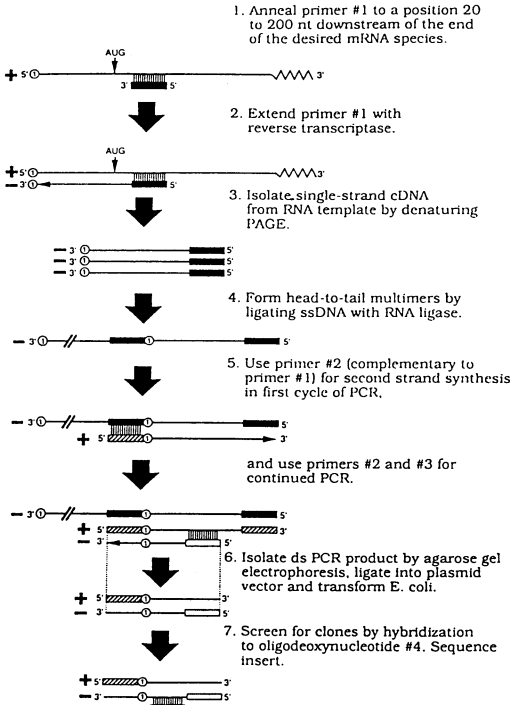


그림 3. mRNA 5' 말단에 대한 PCR 증폭과 sequencing 방법

3. LCR (Ligase Chain Reaction)의 원리와 이 방법에 의한 DNA진단법
 최근 개발된 LCR 방법은 지난 1980년대에 소개된 PCR방법보다 DNA 진단에서 훨씬 유

용하게 사용될 것으로 기대가 된다. 이 LCR 방법은 PCR과 마찬가지로 증폭하고자 하는 목표 DNA에 대한 상보성 염기배열을 가진 oligonucleotide를 이용한다. 그러나 PCR의

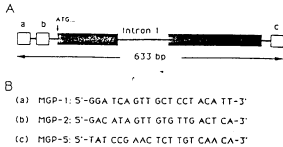


그림 4. 쥐 β -globin 유전자의 PCR primer(a, c)와 probe(b)

Liver



Lung



그림 5. PCR에 의한 chick embryo의 간과 폐에 전이된 NIH 3T3 세포의 검색

primer들이 목표 DNA 양끝의 서열에만 상보적인 반면, 그림 7과 같이 LCR의 primer들은 목표 DNA를 반응시키면 oligo들이 중앙에서만 nick이 된 채 서로 연결이 된다. 그런 다음 thermostable ligase를 넣어서 oligo들을 서로 연결시키면 primer들이 목표 DNA의 서열 전

체와 상보적으로 결합된 DNA 서열이 된다. 그 다음 PCR과 같이 고온(94°C)에서 DNA strand들을 증폭시킬 수 있다. 이 과정에서 LCR의 특징은 oligo primer들이 목표 DNA 서열과 완전히 match가 되지 않으면 ligase에 의해 oligo끼리 연결이 일어나지 않는다는 점이다. 따라서 ligase를 처리한 다음, 가열단계에서 각 oligo들은 목표 DNA에서 떨어지게 되고, 그러면 증폭이 일어나지 않게 된다. 그러므로 조사하고자 하는 sample DNA를 관찰할 수 없으므로, 목표 DNA 서열의 이상을 검색할 수가 있다.

즉 PCR은 2개의 primer 사이의 DNA 서열을 증폭시키지만, 증폭된 DNA 서열상에 어떤 돌연변이가 있는지를 조사하기 위해서는 DNA sequencing을 해야한다. 그러나 LCR은 조사하고자 하는 정확한 DNA서열만 증폭이 되므로 DNA의 증폭과 돌연변이의 검출, DNA polymerase의 확인, 혈액이나 조직중에 감염된 미생물의 DNA 검색등이 가능할 뿐만 아니라, 배양하지 않고 바이러스나 박테리아들의 DNA 서열상의 특성을 연구할 수가 있다.

실제 사용으로는 F. Barany에 의해 sickle cell anemia를 일으키는 헤모글로빈 DNA상의 점돌연변이가 성공적으로 검색되었고(그림 8), D. Nickerson과 L. Hood 등도 cystic fibrosis 등의 유전병에 대한 돌연변이를 검출하였음을 보고하였다. 그러나 PCR은 DNA의 양이 적고, 증폭시간이 빠르므로 앞으로도 계속해서 LCR과 같이 사용되면서 분자생물학 및 임상분야에 광범위하게 적용될 전망이다.

참 고 문 헌

1. R. Barany, (1991) PCR Method and Applications 1, 5.
2. D. Nickerson, L. Hood et al.,(1990) P.N. A.S. USA 87, 8923.
3. A. Martin & A.B. David, (1990) PCR Methods and Applications 1, 43.

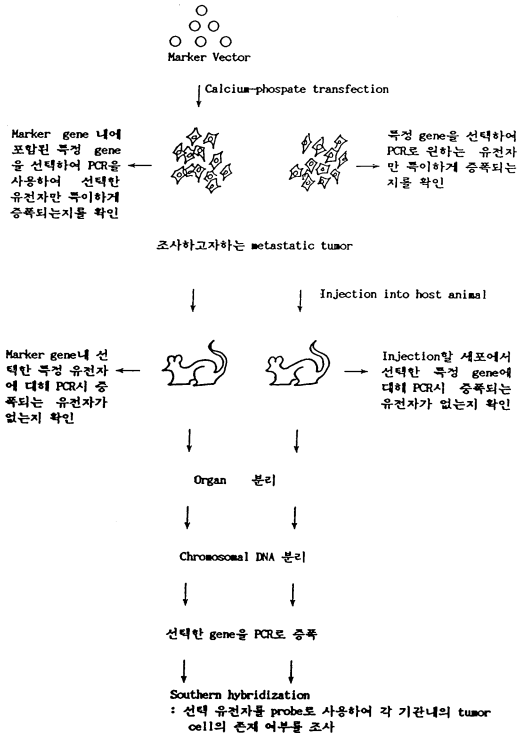


그림 6. PCR를 이용한 미세전이 현상의 관찰

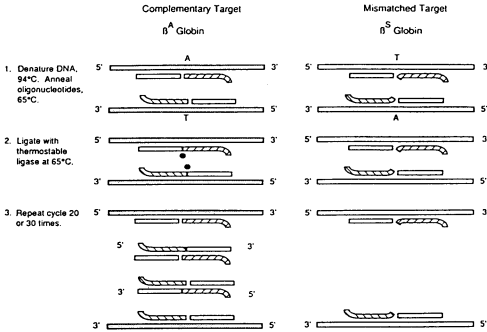


그림 7. LCR 방법에 의한 DNA의 증폭과 진단

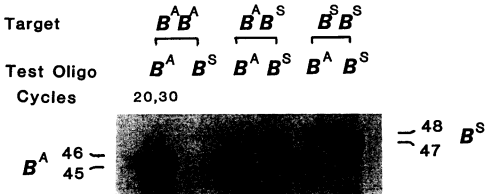


그림 8. LCR에 의한 sickle cell anemia의 진단

4. K.a. Eckert & T.A. Kunkel (1990) Nuc Aci Res 16, 10393.
5. H.A. Erlich, D.H. Gelfand and R.K. Saiki (1988) Nature. 331, 461.
6. J. Reiss et al.,(1990) Nuc. Aci Res., 18, 973A. Belyavsky et al., (1989) Nuc Aci Res 17, 2919.
7. J.M. Lowe et al.,(1990) Nuc Aci Sci 18, 1757.
8. E.G. Catherine et al.,(1991) PCR Methods and Applications 1, 46.
9. R.K. Saiki et al.,(1988) Science 239, 487.
10. K. Hayashi, (1991) PCR Methods and Applications 1, 34.
11. T.F. Asako et al.,(1993) PCR Methods and Applications 2, 323.
12. M. Reiko et al.,(1992) PCR Methods and Applications 2, 10.

VIII. PCR-SSCP

1. 실험의 의의 및 목적

PCR을 이용하여 DNA의 다형성이나 구조상의 변화를 검출할 수 있는 한 방법으로 SSCP (single strand conformational polymorphism) 이라는 방법이 있다. 두가닥의 DNA는 염기쌍을 형성하여 구조적인 안정화를 이루고 있으나 denature된 한가닥의 DNA는 염기서열의 종류에 따라 다른 conformation을 취하게 되고 분자내 상호작용에 의해 배열 특이적인 구조를 유지한다. 이러한 DNA에서 한 염기의 치환 또는 구조의 변화는 염기배열의 차이에 의해 secondary structure의 변화를 일으켜, 전기영동상에서의 이동거리가 서로 다르게 된다. 바로 이 성질을 이용한 기법이 PCR-SSCP이다. PCR-SSCP법은 genomic DNA중의 돌연변이나 다형성을 미량의 Sample로부터 출발하여 신속하고 간편하게 검출할 수 있는 새로운 방법으로서 유전자변이의 진단 및 암 유전자 진단 등에 이용되고 있다.

2. 실험방법

이 방법은 labeling된 primer를 이용하여 특정부위를 PCR로 증폭하고 labeling하고, 얻어진 labelled DNA segment를 변성시켜 single strand DNA로 만든 후 polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리한 후 Autoradiography로 띠의 위치를 검출하는 두단계로 구성된다.

(1) 먼저, 2개의 primer를 제작한 후 이것의 5'을 다음과 같이 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켜 동위원소(³²P)를 labeling 시킨다.

Sense primer (10 pmol/μl)	1μl
Antisense primer(10 pmol/μl)	1μl
10X kination buffer	0.4μl
(α- ³² P)dATP	1.1μl
Polynucleotide kinase	0.5μl

(2) PCR reaction

1) Template : chromosomal DNA, plasmid DNA등 사용.

2) Taq Polymerase(5000 u/ml)

dilution buffer : 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% glycerol
stock dilution : 250 u/ml

working : 0.25 u/10μl

3) dNTP(100 mM)

stock dilution(2.5 mM) : 4×(2.5μl) + 90 μl DW

working(50μM) : [4×(0.2μl)]/10μl

4) Primer(1000 pM) : 목적에 맞는 염기조성을 가지며, 15~30 mer를 많이 사용한다. GC contents는 약 50%가 좋고, up primer와 down primer사이의 homology가 높거나, 각각이 interstrand base pairing을 하지 않도록 적절히 선택한다.

stock dilution(1 pM) : 1μl of primer + 99μl of DW

working(0.1 pM) : 1μl/10μl

5) Procedure

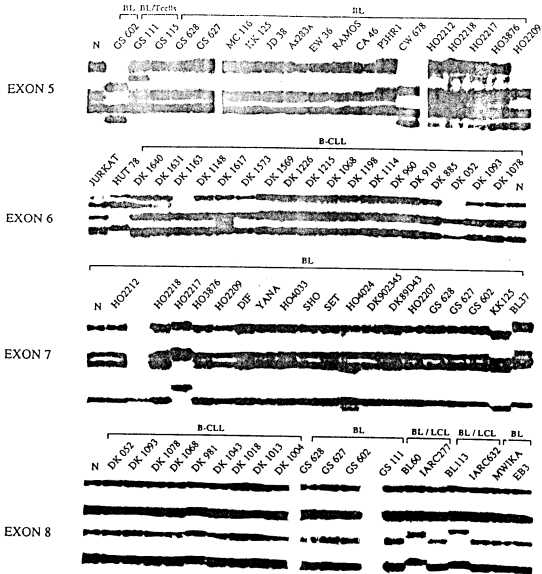
total volume	20μl	50μl	100μl
template	200 ng/1μl	2μl	5μl
primer-1	1000 pM	1 pM	2μl
primer-2	1000 pM	1 pM	2μl
sequenase buffer	10×	2μl	5μl
taq polymerase	5000 u/ml	250 u/ml	2μl
dNTP	100 mM	2.5 mM	1.6μl
D.W			8.4μl
			21μl
			42μl

* Master mix로 10×buffer, dNTP, D.W, Taq polymerase를 필요한 양만큼 섞어 사용하면, contamination를 방지하며, 시간을 절약할 수 있다.

* Primer와 template의 양은 가능한 작을수록 specific한 amplification에 유리하며, 사용하는 tips와 tubes는 멸균하여 가능한 깨끗한 것으로 사용한다.

* 반응량은 10μl-100μl로 다양하게 할 수 있으며, 증발을 방지하기 위해 Oil을 반응량과 동일하게 첨가한다. 조건을 잡기 위한 실험에는 20μl양이 적절하며 시약을 절약할 수 있다.

6) Cycles : 일반적으로 25~45 cycles(Main Cycle)까지 목적에 맞도록 다양하게 사용할 수



(그림) SSCP analysis of p53 mutations in lymphoid malignancies.

있다. 보통 Predenaturation 1 cycle→Main cycle 25~45 cycles→termination 1 cycle로 구성된다. 또한 Main cycle은 template denaturation, primer annealing, polymerization으로 구성된다.

7) Temperature

- Predenaturation : 95℃
- template denaturation : 94℃~95℃
- primer annealing : 37℃~65℃
- polymerization : 70℃~72℃
- termination : 72℃

* 일반적으로 많이 사용하는 온도 cycle (main cycle)은 94, 55, 72℃이며, annealing 온도는 primer의 denaturation과 melting 온도에 따라 조정된다.

8) Time

- Denaturation : 1~5 min
- Annealing : 1~3 min
- polymerization : 1~3 min

(3) PCR product에 formamide dye 45μl를 첨가한 후 10배로 희석하여 1μl를 6% polyacrylamide gel 상에 loading한다.→0.5× TBE buf.

fer로 40 Watt에서 전기영동

(4) gel판을 충분히 cooling 시킨 후 dry 시킨다.

(5) dry시킨 gel을 -70°C 에 exposure시킨다.

(6) Autoradiography를 실시하여 band를 확인한다.

3. 참고문헌

1. F. Barany, (1991) PCR Methods and Applications 1, 5.
2. D. Nickerson, L. Hood et al., (1990) P. N. A. S. USA 87, 8923.
3. A. Martin & A.B. David, (1991) PCR Methods and Applications 1, 43.
4. K.A. Eckert & T.A. Kunkel (1990) Nuc Aci Res 16, 10393.
5. H.A. Erlich, D.H. Gelfand and R.K. Saiki (1988) Nature. 331, 461.
6. J. Reiss et al., (1990) Nuc Aci Res 18, 973.
7. A. Belyavsky et al., (1989) Nuc Aci Res 17, 2919.
8. J.M. Lowe et al., (1990) Nuc Aci Sci 18, 1757.
9. E.G. Catherine et al., (1991) PCR Methods and Applications 1, 46.
10. R.K. Saiki et al., (1988) Science 239, 487.
11. K. Hayashi, (1991) PCR Methods and Applications 2, 34
12. T.F. Asako et al., (1993) PCR Methods and Applications 2, 323.
13. M. Reiko et al., (1992) PCR Methods and Applications 2, 10.

IX. DNA SEQUENCING

1. 실험의 의의 및 목적

1970년대 중반에 molecular cloning technique이 급속도로 발전하면서 수많은 gene의 구조와 기능을 분석하는 기초단계로서 DNA sequencing 기법은 각광을 받아왔다. 성공적인 DNA sequencing은 오늘날 대부분 protein의 sequence를 cDNA 또는 gene의 염기서열로부터 추정하기에 이르렀다. DNA의 염기배열에 대한 정보가 있어야 이를 토대로 유전자를 조작하거나 증폭할 수 있으며, 유전자의 성질이나 작용에 관한 더욱 발전된 기술을 수행할 수 있을 것이다. 이러한 DNA sequencing 기법을 사용하는 목적으로는 다음과 같다.

1) 어떤 유전자를 제한효소로 절단하여 새로운 벡터에 subcloning할 때 어느 제한 효소가 적당한 지를 결정하기 위하여 염기서열을 알고자 할 경우

2) cDNA를 만들려고 할 때 Exon과 intron의 구분이 어느곳인지 알기 위하여 염기서열을 알고자 할 경우

3) PCR에 의해 DNA를 증폭할 때에 어느 부분이 primer를 만들면 되는지 결정 하기 위하여 염기서열을 알아야 할 경우

4) RFLP를 조사하고자 할 때의 제한효소를 선택하기 위하여 염기서열을 알아야 할 경우 : point mutation의 유무를 알고자 할 때

5) site directed mutagenesis에서, 기본염기 배열을 확인할 경우

2. 실험방법

(1) Denaturation

1) 염기서열을 결정할 DNA를 분리, 정제하 고 약 3~4g 정도의 양이 되게 ethanol로 침전시킨다.

2) 준비된 sample 36 μ l 와 2 N NaOH & 2 mM EDTA 4 μ l를 Mix→37 $^{\circ}$ C water bath에서 30분 이상 둔다.

3) 3 M sodium acetate를 10분의 1 volume (4 μ l)을 첨가한 뒤 2~4 volume의 ethanol을 첨가한다.→-20 $^{\circ}$ C에서 30분, 또는 -70 $^{\circ}$ C에서 15분간 둔다.

4) 15분간 원심분리한다.

5) 70% ethanol로 washing한 후 pellet을 건조시킨다.

6) 증류수 7 μ l 정도로 DNA를 녹인다.

(2) Annealing : Primer+template

1) 7 μ l distilled water + 1 μ l primer (T3 primer 20 ng/D.W.) + 2 μ l 5x Reaction buffer
2) 65 $^{\circ}$ C에서 천천히 cooling시킨다.

3) Ice에서 chilling 시킨다.

(3) Reaction

1) Dilution enzyme solution과 premixture solution을 준비한다.

2) ddNTP를 2.5 μ l 씩 multi-well에 가한다.

3) Premixture solution 3.5 μ l과 dilution enzyme 2 μ l를 annealing이 끝난 sample과 섞어준다.→상온에서 5분간 둔다.

4) 위와 같이 labeling 된 sample 3.5 μ l를 ddNTP가 들어있는 well에 각각 넣고, 37 $^{\circ}$ C에서

도표 1.

구분	Premixture solution (3.5 μ l/sample)		Dilution enzyme (2.0 μ l/sample)	
구성요소	DTT	1 μ l	enzyme	0.25 μ l
	1 \times labeling mixture	2 μ l		
	³⁵ S	0.5 μ l	enzyme dilution buffer	1.75 μ l
비 고				

10분간 반응시킨다. : termination reaction

5) 10X stop solution을 4 μ l씩 well에 가한다.

6) 85 $^{\circ}$ C에서 3분간 둔 뒤 sequencing gel (6% polyacrylamide gel)에 loading 한다.

7) Gel running : 원하는 DNA sequence의 primer로부터 거리에 따라 Running time을 조절한다.

8) Gel 판을 꺼내어 얼음과 물로 충분히 cooling 시킨다.

9) 3 MM paper에 gel을 붙이고, dry시킨다.(약 60분간)

10) Isotope (35 S)의 activity를 Geiger counter로 check하고 -70 $^{\circ}$ C에 바로 exposure 시킨다.→1일 내지 3일 정도 둔 뒤, Autoradiography를 실시하여 sequencing band를 확인한다.

3. 참고문헌

1. Sanger, F., Nicklen, S, and Coulson, A.R. (1977) Proc Natl Acad Sci 74 : 5463.
2. Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) Proc Natl Acad Sci 74 : 560.
3. Chen, E.Y. and Seeburg, P.H. (1985) DNA 4 : 165.
4. Mierendorf, R.C. and Pfeffer, K. (1987) Methods Enzymol 152 : 556.
5. Tabor, S. and Richardson, C.C. (1987) Proc Natl Acad Sci 84 : 4767.
6. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning-A Laboratory manual. 2nd ed. Chapter 13. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
7. Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Methods Enzymol. 65 : 499.
8. Current protocols in molecular biology (1990) ed. by Ausubel, F.M. et al.
9. Chapter. 7, Wiley Interscience, USA.

X. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

1. 실험목적 및 의의

RT-PCR은 기존의 polymerase chain reaction을 응용한 것으로 증폭할 주형대상이 DNA 단편이 아니라 RNA이며, 사용 enzyme이 DNA polymerase가 아닌 reverse transcriptase라는 점을 제외하고는 그 원리는 PCR과 같다. 즉,

RNA를 주형으로 하여 RT-PCR한 결과의 생성물은 증폭된 cDNA가 된다. RT-PCR을 이용하여 특정 유전자의 발현정도를 조사할 수 있으며 cDNA library를 제작하는 데에도 이용할 수 있는 유용한 기법이다.

2. 실험방법(from Perkin Elmer Cetus)

(1) Reverse Transcription Protocol

① 아래의 순서대로 시약을 섞어 master mix를 준비한다.

도표 2.

조	성	량(μl)	최종농도
MgCl ₂ solution		4	5 mM
10×PCR Buffer II(500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl)		2	1×
Sterile DW		1	-
dGTP		2	1 mM
dATP		2	1 mM
dTTP		2	1 mM
dCTP		2	1 mM
RNase Inhibitor		1	1 U/μl
Reverse transcriptase		1	2.5 U/μl
Random Hexamer	}		2.5 μl
-or-			-or-
Oligo d(T) ₁₆		1	2.5 μl
-or-			-or-
"down stream" primer			0.75 μM
Positive control RNA	}		10 ⁴ copies
-or-		2	-or-
User provided experimental sample			<1 μg total RNA
전체 반응용액 부피		20	

② 증발이나 역류를 방지하기 위하여 50~100μl의 mineral oil을 떨어뜨린다.

③ random hexamer를 사용할 경우 위의 tube를 상온에 10분간 둔다.

④ 반응 program을 아래와 같이 하여 반응을 시킨다.

segment 1 : 42°C 15 min

segment 2 : 99°C 5 min

segment 3 : 5°C 5 min

Cycle Count : 1

(2) PCR protocol

① 각 sample을 위하여 최소한 아래의 PCR Master Mix 78μl가 필요하다.

조	성	량(μl)	최종농도
MgCl ₂ solution		4	2 mM
10xPCR buffer II		8	1x
Sterile DW		65.5	-
Taq DNA polymerase		0.5	2.5 U/100μl
total vol.		78	

② 각각의 reverse transcription reaction tube에 78 μ l의 PCR Master Mix을 넣는다.

③ Primer를 각 tube에 넣는다.

조 성	량(μ l)	최종농도
"Down stream" primer	1	0.15 μ M
"Upstream" Primer	1	0.15 μ M

- ④ 각 tube의 최종 부피는 100 μ l가 된다.
 ⑤ 30초 동안 5000 rpm으로 원심 분리한다.
 ⑥ PCR 증폭된 sample은 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

참 고 문 헌

1. Kawasaki, E.S., and Wang, A.M. (1989) Detection of Gene Expression. In : Erlich, H.A. ed. PCR Technology : Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, Inc., New York, NY, pp. 89~97.
2. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, Y.J., eds. (1990) PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
3. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., eds. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 7.10~7.11.

XI. DDRT-PCR

(Differentially Displayed Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

1. 목적과 의의

두개 이상의 조직 또는 세포에서 서로 다르게 발현되는 유전자를 동정하고 cloning하기 위한 목적으로 개발된 mRNA Differential Display technology는 RT-PCR과 DNA sequencing 방법을 이용함으로써 기존의 subtractive hybridization과 differential hybridization 방법보다 simplicity, sensitivity, producibility, versatility, speed의 면에서 우수한 장점이 있다. Primer 조합을 달리함으로써 결과적으로 15000여개의 mRNAs를 sequencing gel에서 display할 수 있고, 비교 sample과 서로 다르게 발현되는 클론을 PCR로 증폭시킬 수 있다.

2. 실험방법

(1) Reverse transcription of mRNA

For 20 μ l final volume	ul
dH ₂ O	9.4
5 \times RT buffer	4.0
dNTP(250 μ M)	1.6
Total RNA(DNA-free)	2.0
(0.1 μ g/ μ l, freshly dilute)	
T12MN(10 μ M)	2.0
Total	19.0

- 1) PCR program을 setting한다. 65 $^{\circ}$ C, 5 min \rightarrow 37 $^{\circ}$ C, 60 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 5 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C
- 2) 반응을 시작한다.
- 3) 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 한후, MMLV reverse transcriptase를 1 μ l 첨가한다.
- 4) 반응을 계속한다.
- 5) 반응이 끝나면 reaction mixture를 바로 PCR 반응에 사용하든지 -20 $^{\circ}$ C에 보관한다.

(2) PCR

20 μ l final volume for each

primer set combination	ul
dH ₂ O	9.2
10 \times PCR buffer	2.0
dNTP(25 μ M)	1.6
AP primer(2 μ M)	2.0
T12MN(10 μ M)	2.0
RT-mixture	2.0
α -[³² S] dATP(1200 Ci/mmmole)	1.0
AmpliTaq(Perkin-Elmer)	0.2
Total	20.0

- 1) 각각을 차례대로 첨가한 후 잘 섞는다.
- 2) mineral oil을 첨가하여 수증기 증발을 막도록 한다.
- 3) PCR 반응 : 94 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 denaturation, 72 $^{\circ}$ C에서 2분동안 annealing, 30초 동안 polymerization 반응을 40회 정도 시킨다. 다음 72 $^{\circ}$ C에서 5 분동안 termination 반응을 시키고 4 $^{\circ}$ C에서 PCR product가 안정화 되도록 한다.

주의사항)

PCR에 사용되는 primer set는 RT reaction에 사용된 것과 동일한 것을 첨가하도록 한다.

(3) 6% Denaturing Polyacrylamide Electrophoresis

RT-PCR mixture	3.5 μ l
Loading dye	2.0 μ l
Total	5.5 μ l

- 1) 반응 혼합물을 잘 섞은 뒤, 80 $^{\circ}$ C에서 2분간 처리한 뒤 얼음위에 둔다.
- 2) 6% DNA sequencing gel에 혼합물을 loading한다.
- 3) 60 watts constant power에서 3.5시간 동안 전기영동한다. 이때 전압이 1700 볼트가 넘지 않도록 조심하며 일반적으로 xylene dye가 밑바닥에 올때까지 전기영동을 하면 된다.
- 4) 반응이 끝나면 유리판 사이에 있는 gel을 3M paper에 붙이도록 한다.

5) gel을 랩에 싸서 80°C에서 1시간정도 vacuum drying한다.

6) 말려진 gel은 X-ray film에 감광한다. (overnight to a 72-hour exposure)

(4) Reamplification of cDNA probe

1) 현상이 끝난 X-ray film은 gel상에 위치를 잘 맞추어 올려놓는다.

2) 발현의 차이가 보이는 band의 위치를 확인한 후 그 위치의 gel을 칼로 잘라낸다.

3) gel slice를 100µl의 dH₂O에서 10분간 상온에 둔다.

4) 15분간 끓인다.

5) 2 분간 원심분리하고 상층액을 new microfuge tube로 옮긴다.

6) 10 µl of 3 M sodium acetate와 5 µl of glycogen (10 mg/ml) 그리고 450 µl of 100% EtOH을 각각 첨가한다.

7) -20°C, O/N

8) 10분간 4°C에서 원심분리하여 DNA를 가라 앉힌다.

9) 200 µl의 ice-cold 85% EtOH을 처리한다.

10) 5분간 원심분리한다.

11) 공기중에서 DNA를 말린뒤, 10 µl의 dH₂O에 녹인다.

12) 여기서 4 µl를 따서 reamplification에 사용한다.

13) 나머지는 -20°C에 보관한다.

14) REAMPLIFICATION

	µl
dH ₂ O	20.4
10X PCR buffer	4.0
dNTP(25 µM)	3.2
AP primer(2 µM)	4.0
T12MN(10 µM)	4.0
cDNA template	4.0
AmpliTaq(Perkin-Elmer)	0.4
Total	40.0

① 각각을 차례대로 첨가한 후 잘 섞는다.

② mineral oil을 첨가하여 수증기 증발을 막도록 한다.

③ PCR 반응을 시작한다.

(5) Purification of Reamplified Fragment

1. PCR mixture를 1.5% agarose gel상에서 전기영동한 후, 증폭된 PCR product만을 분리해 내도록 한다 (QIAEX kit from QIAGEN 또는 low melting agarose gel을 사용한다).

(6) Analysis of Reamplified Fragment

1) Northern Blot Analysis : 분리해 낸 PCR 반응물을 probe로 하여 mRNA 발현정도를 조사한다. 실제 Sequencing gel상에서 나타난 발현의 차이가 northern blotting에서도 같은 결과를 보이는지를 확인한다.

2) Direct Sequencing : Northern blotting에서 positive signal로 나타난 PCR fragment만을 선택하여 Direct sequencing한다.

7) Searching Database : Direct sequencing을 통해 염기배열이 밝혀지면 기존에 조사된 유전자들의 sequence와 비교하기 위해 Database search를 행한다.

3. 참고문헌

1. Peng Liang and Arthur B. Pardee. (1992). Science 257 : 967~971
2. Peng Liang et. al. (1992). Cancer Research 52 : 6966~6968
3. Peng Liang et. al. (1993). Nucleic Acids Res 21 : 3269~3275
4. Yi Sun et. al. (1994). Cancer Research 54 : 1139~11444.

4. DDRT-PCR의 원리.

