정신과에서 분자유전학의 치료적 적용

이 민 수*†

Therapeutic Appilication of Molecular Genetics in Psychiatry

Min Soo Lee, M.D.*†

ABSTRACT

Advances in molecular biology contribute to the understanding genetic mechanism of psychiatric disorders. They have renewed hope for the discovery of disease relevant gene.

However, the results somewhat confused. And we will wait for a long time for the application of gene therapy in schizophreniar. Fortunately we could classified the schizophrenia with genotypes of dopamine and serotonin receptors. It is expected that this genetic classification could provide key strategy for the therapeutic application in biological treatment for schizophrenia.

The purpose of this article is to call attention of the institute participants to linkage, association, mRNA expression, genotypic classification and to the need for more systemic research. The author summarized the modified methods which were done in his laboratory in appendix.

KEY WORDS : Schizophrenia · Linkage · Association · mRNA expression · Genotypic classification · Therapeutic application.

서 론

가계, 쌍생아, 양자의 연구는 유전적 요소가 정신질환의 발현에 중요하다는 사실을 간접적으로 제시해 주었다. 분자유전학기법은 이러한 유전적 요인에 대한 직접적인 연구를 가능하게 하였으나, 아직 연관연구(linkage study)는 여러 가지 제한점 때문에 일관성 있는 결과를 보여주지 못하고 있다(Amos등 1991 ; Gelshon과 Goldin 1987). 최근에는 여러 수용체유전자에 대한 분리가 가능해짐에 따라 정신분열병의 병인론과 관련이 있는 후보유전자(candidate gene)의 연합연구(association study)가 관심을 끌고 있다(McGuffin등 1995). 그러나 기존의 항정신병약물과는 다른 약리작용을 가진 새로운 비정형적 항정신병약물의 개발과 정신병의 유전적 원인 요소에 대한 일관성 없는 결과는 정신병의 후보유전자가 원인 보다는 정신증상의 발현과 더 관련성이 있을 수 있다는 가설을 제시하게 되었다(Seeman 1993). 더구나 정신병에 대한 유전자 치료가 확립되지 않은 상태에서 원인이 되는 유전자만 알아내는 것도 치료적인 면에서는 생각해 볼 문제이다.

정신과영역에서 분자유전학의 치료적 적용에 대한 이해를 위해서 1) 연관연구와 연합연구에 대해 정리하고, 2) 도파민 아형과 새로운 항정신병약물 및 약물투여후 mRNA expression에 대해 알아보고 3) 향후 정신분열병의 원인이 되는 유전자의 연구와는 별개로 도파민 아형에 따른 정신분열병의 분류를 시도해 보는 것이 필요하다고 사료된다. 저자는 향후 실험을 하는데 조금이나마 도움을 주고자 본 교실에서 시도한 방법을 부록으로 정리해 놓았다.

연관(linkage)연구

유전적 표지자(genetic marker)를 이용한 연구들은 유전자를 찾아내고 분리하여 질환을 분자적 기초에서 이해한다. 새로운 분자 생물학적 기술은 결과적으로 수백가지의 표지자를 인간 지놈(genome) 전체에 대한 시발점으로 유용하게 하였고, 보다 복잡

*고려대학교 의과대학 신경정신과학교실
Department of Neuropsychiatry, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea
†교신저자 : 이민수, 136 - 705 서울 성북구 안암동 5가 126 - 1
전화) 920 - 5354, 전송) 923 - 3507

한 표현형(phenotype) 모두에 대해서도 본격적으로 연관연구를 시작할 수 있게 하였다.

연관연구에서 재결합비율(recombination fraction)은 만약 유전자좌(locus)가 다른 염색체에 있거나, 같은 염색체에 매우 멀리 떨어져 있다면, 독립적 분류(assortment)가 발생하고, 자녀에서 재결합 비율은 1/2이 된다. 그러나 만약 두 유전자좌가 서로 가깝거나, 분류가 더 이상 독립적이지 않을 때 재결합 비율은 1/2이하로 관찰된다. 이렇게 재결합 비율의 크기는 두 유전자좌간의 물리적 거리에 비례하고, 유전자좌가 매우 가까이 존재한다면, 재결합은 드물게 일어나서 0에 접근한다. 유전자의 거리는 centimorgan(cM)으로 측정되고, 1cM은 재결합이 매100 감수분열당 한 번 일어나는 거리인데 이 경우의 재결합 비율은 0.01이 된다. 다른 흔한 방법으로 lod score(Morton 1955)가 사용되는데 최소한 lod score가 3이상이면 1000배의 차이가 되어 연관이 있는 것으로 판정한다. 그러나 정신분열병과 같은 복합 유전질환의 경우 위양성율이 높아 lod score가 3.6 이상인 경우 유의한 연관성이 있는 것으로 그리고 5.4 이상을 매우 유의한 연관이 있는 것으로 해석한다(Lander와 Kruglyak 1995). Lod score가 2 이하인 경우에는 1/100배가 되어 연관이 완전히 배제된다. 그러나 실제로 정신분열병과 같은 복잡한 질환에서는 불완전한 투과도와 불완전한 전이 방식 때문에 lod score의 가치를 감소시키고 많은 표본수를 필요하게 한다. 정신분열병이나 정동장애 같은 발병연령이 다양한 질환은 표현형이 시간에 따라 변한다는 사실을 염두에 두어야만 한다. 최근에는 multipoint 연관분석을 수행하는 방법으로, 질환의 상호분리와 단일 표지자가 연구되는 two-point 연관분석 대신에, 같은 염색체에 가까이 같이 있는 다양한 표지자들이 연구되고 있다. 이러한 방법은 유전자좌의 거의 정확한 위치를 찾아내고, 염색체의 특별한 위치에서 질환의 유전자좌를 배제하게 할 수 있다.

Sherrigton등(1988)이 정신분열증과 염색체 5q11-13 부위의 제한효소절편길이다형성(restriction fragment length polymorphism : RFLP)사이에 연관성을 보고한 이후 많은 연구들이 있었으나 Sherrington등(1988)의 결과를 입증하지는 못했다. 가계 내에서의 도파민 수용체 아형(D1 ; 5q31-34, D2 ; 11q22-23, D3 ; 3q13.3, D4 ; 11p, D5 ; 4p16.3)과 정신분열증간의 연관관계가 아직은 밝혀지지 않고 있다(이민수 1996 ; Coon등 1993).

연합(association)연구

몇 개 또는 많은 유전자좌가 관련되고 전이의 유형이 알려지지 않는 질환들을 위한 대체적이고 보완적인 전술이 대립유전자 연합(allelic association) 연구이다. 연합연구는 환자군과 정상군에서 표지자 표현형의 빈도(frequency)가 비교되는데 전형적인 예가 십이지장궤양환자가 높은 빈도의 o형 혈액형을 나타낸다는 것이다. 진성 연합은 질환의 원인이 되는 유전자좌와 표지자 대립유전자좌 사이의 재결합율이 1%미만의 강한 연관불균형을 보이거나, 표지자 유전자좌 자체가 그 질환의 병인론에 관련되어 있을 때 나타난다. 표지자와 가족내의 질환 유전자사이의 연관은 보통 인구내의 대립유전자 연합을 일으키지는 않는다. 연합연구는 표지자의 특성과 질환의 공동분리(cosegregation)가 가계내에서 이루어지는 연관연구와는 다르며, 유전성, 투과도, 질환의 발병연령에 대한 고려를 할 필요가 없다는 이점이 있다(Nothen등 1992). 그러나, 만약 재결합이 0.01이하로 연관이 매우 강하다면 두 대립유전자간의 연관불균형이 남아 있기 때문에 일반 인구연구에서 대립유전자의 연합이 나타날 수 있다. 따라서 계층화를 방지하기 위하여 동종의 인구에서 연합연구를 해야 한다.

도파민 아형과 새로운 항정신병약물

도파민 D2의 유전자 분리를 처음으로 하여 도파민 D1, D3, D4, D5가 차례로 분리되었다(표 1). 도파민 D1과 D5는 짧은 3번째 cytoplasmic loop와 C-terminal tail을 보이며 Gs 단백질과 결합(coupling)되어 있으며, 도파민 D2, D3, D4는 긴 3번째 cytoplasmic loop와 짧은 C-terminal tail을 나타내며, Gi나 Go 단백질과 결합되어 있다. 도파민 D1과 D5는 intron 없이 계속적으로 nucleotide가 coding되어 있는 데 비해, 도파민 D2, D3, D4는 DNA분절(exons)이 intron에 의해 분리되는 양상을 보인다(Schwartz등 1993).

Clozapine은 5-HT2와 도파민 D4 수용체에 강한 친화력을 보이는 반면에 도파민 D1과 D2에는 약한 결합력을 나타낸다. Remoxipride는 쥐의 선조체 도파민 D2의 결합력이 낮다. Risperidone은 5-HT 수용체와 도파민 D2 수용체에는 강한 결합력을 보이는 반면에 도파민 D1 수용체의 결합력은 상당히 낮다(Jackson등 1993). 이러한 새로운 항정신병약물의 다른 특성을 보더라도 도파민 수용체 아형의 유전자형에 따른 분류는 시도해 볼 필요가 있다고 판단된다.

mRNA 분석을 통한 유전자 표현에 대한 연구

사람 뇌의 유전자 표현에 대한 연구는 mRNA를 풍부하고 다양하게 하였다(Dokas 1983). Non-polyadenylated mRNA가 뇌발달에 중요한 역할을 하고, 반복되는 DNA 염기배열순서에 의해서 유전자의 전사(transcription)가 특수하게 표현되는 것 등을 고려해 볼 때 특정한 뇌 부위에서 mRNA에 대한 연구는 정신과 질환과 연관된 유전자를 찾아내는데 아주 장래성있는 접근방법이다. 원칙적으로 mRNA에 보완적(complementary)인 cDNA를 적절한 효소로 만든 후에 환자와 정상대조군의 cDNA 유전

Table 1. Characteristics of dopamine receptors

	D1	D2	D3	D4	D5
Coding sequence	446 A.A.	D2A=443 A.A. D2B=414 A.A.	400 A.A.	387 A.A.	477 A.A.
Chromosomal location	5 q31 - q34	11 q22 - q23	3q 13.3	11p	4q 16.3
Highest brain densities	Neostriatum	Neostriatum	Paleostriatum	Medulla Frontal cortex	Hypothalamus Hippocampus
Characteristic agonist	SKF-38393	Bromocriptine	7-OH-DPAT	?	SKF-38393
Characteristic antagonist	SCH-23390	Haloperidol	UH 232	Clozapine	SCH-23390
Adenyl cyclase	Stimulates	Inhibits	?	Inhibits	Stimulates

자 libraries를 대조함으로써 특수한 유전자를 찾을 수 있다. 이 같은 과정에 의하여 어떤 질환에 특수하게 나타나는 cDNA 클론은 RFLP 연관성 연구에서 사용될 수 있다. 그러나 정신과 영역에서 이 방법이 중요한 것은 정신작용약물에 의해 유전자 표현이 변화됨으로써 기능상의 변화를 관찰할 수 있기 때문에 정신과의 생물학에 또 다른 의미의 유전자 클론을 가능하게 해준다. 약물에 의해서 발현이 개시 또는 종료되는 유전자는 약제투여전과 후의 cDNA 유전자를 가능하게 함으로써 그 상태를 분별할 수 있다.

최근에는 약물(이민수 등 1996 ; Nguyen등 1992 ; Oh등 1994)이나 전기충격요법(안용민 등 1993 ; Cole등 1990)이 c-fos, c-jun 및 jun B과 같은 immediate early gene의 mRNA 표현에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 과정으로 Friedman등(1984)은 인터페론(interferon)에 의해 개시종료(on-off)되는 유전자를 분리하였다. 이러한 mRNA가 적절한 뇌 조직을 얻기가 어렵고, mRNA 수준을 보는 것이기 때문에 병적인 상태와 정상사이에 유전자 표현의 차이가 큰 경우에만 찾아낼 수 있다는 문제점은 있으나 분자약물학(molecular pharmacology)과 약물유전학(pharmacogenetics)의 발전에 큰 역할이 기대된다.

mRNA는 DNA의 염기배열순서에 의해서 유전자의 전사(transcription)가 표현되고, 병적이거나 특수한 상태(약물투여나 전기충격요법 등) 상태와 정상 상태의 mRNA 수준의 차이가 나타나기 때문에 특정한 뇌 부위에서 mRNA에 대한 연구는 정신과 질환과 연관된 유전자를 찾거나 분자약물학과 약물유전학의 발전에 큰 역할을 할 수 있다고 판단된다. 따라서 후부유전자의 변이와 mRNA 표현의 병합이용은 정신분열증의 원인보다는 치료에 더 큰 역할을 할 수 있다.

도파민수용체 유전자형에 따른 정신분열병환자의 분류

정신분열병은 다양한 원인에 의한 이질적인 집단이기 때문에 진단분류가 시간에 따라서 변화한다. 현재의 진단분류체계는 환자가 표현하는 증상을 중심으로 하였기 때문에 근본적인 원인 부분에 대한 고려가 부족하며, 생물학적 치료 특히 약물치료에 대한 근본 대책을 세우는데도 제한점이 있다. 최근 분자생물학의 발달은 정신분열병의 유전적 요소에 대한 직접적인 연구를 가능하게 하였다. 정신분열병의 병인론에서 도파민전달과 수용체의 변화가 주요한 원인이라는 가설이 지지되어 왔으며(Seeman 1993), 5가지 도파민 수용체아형이 이미 분리되어 외국은 이미 많은 논문(Nanko등 1993, 1994 ; Ravindranathan등 1994 ; Steven 등 1993)이 발표되고 있다. 정신분열증의 원인이 되는 수용체 유전자형에 의한 분류가 가능하다면, 이러한 분류는 정신분열증 환자의 생물학적 치료반응과 치료대책을 수립하는데 중요하다고 할 수 있다. 이 경우 첫째, 각각의 도파민 유전자형에 유의하게 효과적인 약물의 종류를 알아냄으로 약물에 의한 부작용을 최소화할 뿐만 아니라 치료효과를 증대할 수 있다. 둘째, 도파민 유전자형에 특수하게 나타나는 증상의 특징을 본석함으로써 증상학과 원인론의 상관성에 대한 기초연구를 정립할 수 있다. 세째, 정신분열병환자의 치료반응에 대한 예측인자를 파악함으로써 적절한 치료대책을 수립할 수 있다.

결 론

결과적으로 연관분서과 연합연구를 통하여 정신분열병의 원인이 되는 유전자의 위치가 밝혀지고 분리될 것을 확실하다. 그러나 정신분열증의 원인이 되는 유전자와는 별개로 유전자형에 의한 분류를 치료의 전략으로 활용하는 것은 가치있는 일이다(표 2). 이러한 시점에서 여러 수용체 중에서도 우선 도파민수용체 유전자형에 의한 분류를 하여 시간이 지나도 변하지 않고 다만 더 세분될 수 있는 분류를 정립하고, 그 분류에 의한 치료반응을 약물학과 증상학적인 면에서 분석하여 치료반응에 대한 예측 및 치료 대책수립을 하는 것이 도파민수용체 자체는 물론 향후 제시될 다른 생물학적 원인 분류에 대한 기초를 제공할 수 있다고 사료된다.

Table 2. Distribution of genotypes of the dopamine D1, D2, D3, D4 and D5 receptors in schizophrenic patients

Patient No	Sex	Age	Genotype of dopamine receptor				
			DRD1	DRD2	DRD3	DRD4	DRD5
1	M	45	B2B2	A2A2	1 2	rep 4.4	146 / 146
2	M	31	B2B2	A1A2	2 2	rep 4.4	142 / 146
3	F	41	B1B2	A1A2	2 2	rep 4.4	146 / 146
4	M	34	B2B2	A1A1	1 1	rep 4.4	136 / 138
5	M	29	B2B2	A1A1	1 2	rep 4.4	146 / 146
6	M	33	B1B1	A1A2	2 2	rep 2.4	142 / 142
7	F	23	B2B2	A2A2	1 2	rep 4.4	138 / 146
8	M	40	B1B2	A2A2	1 1	rep 2.4	138 / 140
9	M	30	B2B2	A1A1	1 1	rep 2.4	146 / 148
10	F	36	B2B2	A1A2	2 2	rep 2.4	140 / 142

중심 단어 : 정신분열병 · 연관 · 연합 · mRNA 표현 · 유전자형분류 · 치료적 적용.

참고문헌

안용민 · 주연호 · 채인영 · 박주배 · 배창대 · 이정균 · 김용식 : 전기경련충격이 백서 *c-jun* 및 *jun B* 발현에 미치는 영향. 대한신경정신의학회 제*35*차 추계학술대회 초록집. 서울, 대한신경정신의학회, *pp128*

이민수 · 임혜경 · 김정현 · 김형건 · 서광윤 · 곽동일 : *PCR*과 *RFLP*을 이용한 한국인 정신분열증 환자의 염색체 *5*번 *q11.2*–*q13.3*간의 *linkage*에 대한 연구. 대한신경정신의학회 제*36*차 추계학술대회 초록집. 서울, 대한신경정신의학회, *pp147*

이민수 · 김표한(1995) : 분자유전학을 통한 정신분열증의 이해. 생물정신의학 *3* : *14-21*

이민수 · 한창수 · 김정현 · 김영태 · 곽동일(1996) : 항정신병약물에 의한 백서 뇌에서의 *c-fos* 효과 발현 : 할로페리돌과 클로자핀의 효과비교. 생물정신의학 *3* : *115-120*

A mos CI, Martinez M, Bale SJ(1991) : *Can s susceptibility locus for schizophrenia be excluded from chromosome 5q11−13? Am J Hum Genet 48* : *1206-1208*

Cole AJ, Abu-Shakra S, Saffen DW, Barban JW, Worley PF (1990) : *Rapid rise transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures. J Neurochemistry 55* : *1920-1927*

Coons H, Byer W, Holik J, Hoff M, Myles-Worsley M, Lamfelt L, Sokoloff P, Schwartz J-C, Gelshon ES, Goldin ER(1987) : *The outlook for linkage research in psychiatric disorders. J Psychiatr Res 21* : *541-550*

Friedman RL, Manly SP, McMahon M, Kerr IM, Stark GR(1984) : *Transcriptional and transcriptional regulation of interferon induced gene expression in human cells. Cell 38* : *745-755*

Jackson DM, Mohell N, Bengtsson A, Malmberg A(1993) : *What Are Atypical Neuroleptics and How Do They Work? In* : *New Generation of Antipsychotic Drugs* : *Novel mechanism of Action. Ed by Brunello N, Mendelwicz J, Racagni G, Vol 4, Basel, Karger, pp27-38*

Lander E, Kruglyak L(1995) : *Genetic dissection of complex traits* : *guideline for interpreting and reporting linkage results. Nature Genetics 11* : *241-247*

McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE(1995) : *Genetic basis of schizophrenia. Lancet 346* : *678-682*

Morton NE(1955) : *Sequential tests for the detection of linkage. Am Hum Genet 7* : *277-318*

Nanko S, Fukida R, Hattori M, Saski T(1994) : *Further evidence of no linkage between schizophrenia and the dopamine D3 receptor gene locus. Am J Med Genet 54 (3)* : *264-267*

Nanko S, Hattori M, Ueki A, Ikeda K(1993) : *Dopamine D4 receptor polymorphism and schizophrenia. Lancet 341 (8846)* : *689-690*

Nguyen TV, Kosofsky BE, Brinbaum R, Cohn BM, Hyman SE : *Differential expression of c-fos and Zif268 in rat striatum after haloperidol, clozapine and amphetamine. Neurobiology 89* : *4270-4272*

Nothen MM, Erdmann J, Korner J, Lanczik M, Fritze J, Fimmers R, Grandy D, O'Dowd B, Propping P(1992) : *Lack of association between dopamine D1 and D1 receptor genes and biopolar affective disorder. Am J Psychiatry 149* : *199-201*

Oh BH, Meltzer HY, Loy MT(1994) : *Clozapine attenuates kainic acid induced c-fos expression.* 대한신경정신의학회 제*36*차 추계학술대회 초록집. 서울, 대한신경정신의학회, *pp146*

Ravindranathan A, Coon H, Delisi L, Holik J(1994) : *Linkage analysis between schizophrenia and a microsatellite polymorphism for the D5 dopamine receptor gene. Psychiatric Genetics 4* : *77-80*

Schwartz J-C, Giros B, Martres M-P, Sokoloff P(1993) : *Multiple Dopamine Receptors as Molecular Targets for Antipsychotics. In* : *New Generation of Antipsychotic Drugs* : *Novel mechanism of Action. Ed by Brunello N, Mendelwicz J, Racagni G, Vol 4, Basel, Karger, pp1-14*

S eeman P(1993) : *Schizophrenia as a brain disease. Arch Neurol 50* : *1093-1095*

Steven J, Rosemarie P, John H, Mark H(1993) : *Linkage analysis of schizophrenia The D1 Dopamine Receptor gene and several flanking. DNA Markers Hum Hered 43* : *58-62*

Waldo M, Freedman R, Plaetke(1993) : *Linkage analysis of schizophrenia with five dopamine receptor genes in nine pedigree. Am J Hum Genet 52* : *278-334*

□부　　록□

말초 혈액으로부터 genomic DNA의 정제

1. 시약 및 기구

ACE shocking solution

NH_4Cl	8g,
$Na_2EDTA\ H_2O$	1g,
KH_2PO_4	0.1g

; make up 1 liter, check that the pH is between 6.8 - 7.2 and filter sterilze

Nuclei Lysis Buffer

Tris(pH 8.0)	10mM,
NaCl	400mM,
EDTA	2mM

; make up 1 liter, and filter sterilze

Saturated NaCl

10% SDS

Proteinase K (20mg/ml)

Microfuge (refrigerated)

Heat block

2. 방　법

1) 혈액 1.5ml을 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 serum을 제거한다.
2) 남은 pellet에 ACE shocking solution을 500μℓ 넣고 서서히 3분간 흔들어준다.
3) 1번, 2번 과정을 2회 반복한다.
4) 상층액을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 Nuclei lysis Buffer를 넣고 pellet을 잘 섞어준다.
5) 10% SDS 30μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간동안 반응시킨다.
6) Saturated NaCl 140μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다.
7) 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 tube에 옮긴다.
8) 2배 부피의 에탄올을 넣고, 침전된 DNA를 회수하여 새 tube에 옮긴다.
9) 침전된 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시킨다.
10) 건조된 DNA를 멸균된 증류수 50μℓ에 녹인다.
11) 정제한 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인한다.

DNA 농도측정 : fluorometer 이용

1. 시약 및 기구

10X TNE	100mM Tris (12.11g)	
	10Mm EDTA (3.72g)	
	2M NaCl (116.89g)	
H3328		
Dye solution A	10X TNE	10ml
	dw	90ml
	H3328	10μℓ
Calf thymus DNA		
calf thymus DNA (1mg/ml)		100μℓ
10X TNE		100μℓ
DW		800μℓ

2. 방　법

1) 미리 fluorometer를 warm up 시켜놓는다
2) Dye A 2ml넣어 영점 맞춘다
3) calf 2μℓ 넣고 scale 100으로 맞춘다.
4) Dye A 2ml에 sample DNA 2μℓ넣어 농도를 측정한다.

Gel electrophoresis

1. 시약 및 기구

1) Agarose gel

50X TAE	242g Tris base
	57.1mlglacial acetic acid
	100ml 0.5M EDTA(pH 8.0)

Agarose

2) Acrylamide gel

5X TBE	54g Tris base
	27.5g boric acid
	20ml 0.5M EDTA(pH8.0)
30% Acrylamide	29g acrylamide
	1g polyacryamide
	total 100ml dw 넣고 약간 가열하여 녹인 후 filtration 한다.

10% APS

TEMED

EtBr	10mg/ml stock solution을 희석해서 쓴다.	
loading dye	0.25% bromophenol blue (0.075g)	
	0.25% xylene cyanol FF (0.075g)	
	15% Ficoll (4.5g)/30ml	
ladder	Gibco ladder (μg/μℓ)	50μℓ
	loading dye	100μℓ
	dw	450μℓ
		분주해둔다

2. 방 법

1) Gel을 만든다.

Agarose gel은 1X TAE buffer 이용 (2% gel)

Acrylamide gel은 0.5X TBE buffer 이용 (5% gel)

5X TBE	6ml
30% Acrylamide	10ml
dw	44ml
APS	200μℓ
TEMED	100μℓ

2) gel이 완전히 굳은후 30분가량 100V에서 running 한다.

3) EtBr staining 10 - 20분 한다.

4) Transilluminator에서 확인한다.

Polymerase Chain Reaction

1. 시약 및 기구

Primer (10 pmol/μℓ) ;

Template DNA

10mM dNTP mixture

10X Taq polymerase buffer :

500mM KCl

100mM Tris HCl (pH 9.0, 25℃)

1.0 % Triton X - 100

25mM $MgCl_2$

PCR machine

2. 방 법

1) PCR은 극소량의 DNA contamination에도 민감하므로 조심하여 수행한다.

2) 0.5ml microfuge tube에 PCR 반응의 component들을 섞는다.

Template DNA	50ng
Primer	25pmole
$MgCl_2$	1.5mM
10X reaction buffer	5μℓ
dGTP, dCTP, dTTP, dATP	200μM
Taq polymerase	1U

; up to 50μℓ with H_2O

3) Mineral oil을 20μℓ 넣는다.

4) Thermal reactor의 tube rack을 면봉으로 잘 닦고 mineral oil을 한 두 방울 떨어뜨린다.

5) Program을 입력하고 실행한다.

94℃	4분
68℃	1분
72℃	1분

에서 1 cycle

94℃	1분
68℃	1분
72℃	1분

에서 9 cycle

90℃	30초
68℃	1분
72℃	30초

에서 30 cycle을 수행하고,

final extention으로 72℃에서 10분을 수행한다.

6) Polyacrylamide gel electrophoresis : amplification 여부를 확인하기 위하여, 10% polyacrylamide gel에 반응액 10μℓ를 6X loading dye와 섞어 loading하여 전기영동을 수행한다. BPB가 거의 바닥에 닿을 만큼 이동하면 전기영동을 끝내고 staining하여 transilluminator에서 확인한다.

Silver sequencing

1. 시약 및 기구

Promega kit Q4130 이용.

1) Ladder sequencing

① 0.5ml microcentrifuge tube 4개에 각각 G, A, T, C 2μℓ씩 넣는다.

② 새 tube에

Template DNA (pZEM pUC.	4μℓ
DNA sequencing buffer	5μℓ
pUC/M13 Forward Primer	3.6μℓ
dw	3.4μℓ
Taq polymerase	1μℓ

넣고 가볍게 mixing 한다.

③ 위 ② mix를 ①에서 준비한 tube에 각각 4μℓ 씩 넣는다.

④ PCR 돌린다. (file #12)

2) Plate 준비

① Gel판을 10% NaOH에 overnight 시켜 깨끗이 제거한 후 씻

어 말린다.

② EtOH로 long glass short glass를 닦아준다.

③ Short glass에 bind siline solution 1ml을 떨어뜨린 후 주의해서 wipe

bind siline solution	bind siline	300㎕
	EtOH	95ml
	Acetic acid	5ml

④ Long glass 에는 sigma coat 1ml 떨어뜨리고 wipe

⑤ 5분 drying 후 EtOH로 닦아준다.

⑥ Glass 사이에 spacer 꽂고 집게로 고정

⑦ 6% sequencing gel

40% acrylamide	380g acrylamide 20g bisacrylamide/1l	14.99ml
5X TBE		20ml
8M urea		48g
dw		15ml
		100ml/heat

약 50ml와 APS 35 40㎕ TEMED 200㎕ 섞어 spacer 꽂아둔 glass에 부어준다.

⑧ Gle 굳으면 1X TBE 부어주고 sample loading

⑨ 2500V에서 5시간 running

3) Silver staining

① Gel 판을 분리한후 fix/stop solution (200ml acetic acid + 1800ml dw)에서 20분

② Dw washing 3분간 3회반복

③ Staining solution에서 30분

silver nitrate	2g
37% Formaldehyde	3ml
ddw	2l

④ 미리 냉장시킨 developing solution 5분이내.

Sodium carbonate	60g
37% Formaldehyde	3ml 사용직전 넣어준다.
Sodium thiosulfate	400㎕ 사용직전 넣어준다.
ddw	2l

어느정도 band 보이면 fix/stop solution을 부어준다.

⑤ dw로 washing후 건조시킨다.

4) Exposed APC film

① Gel이 완전히 말랐는지 확인한다.

② Light box 위에 gel판을 올려 놓고 safe light만 켠다.

③ Film을 coating 부분이 아래로 향하게 gel 위에 올린다.

④ Light box on하여 30초 정도 감광시킨다.

⑤ Off 한 후 film을 developing solution에 담근다. 상이 나타날때까지

⑥ Dw로 washing

⑦ Film을 fixing solution에 담근다. 3분

⑧ Dw로 washing

Sequencing

1. Dideoxy-mediated Sequencing reactions using Sequenase

1) 시 약

Univeral forward primer : 0.3 pmol/㎕ (¡ 2ng/㎕)

ss DNA template : 0.1 0.5 ㎍/㎕

Stock labeling mixture

dGTP (0.5mM)

dCTP (0.5mM)

dTTP (0.5mM)

[α - ^{35}S] dATP : (600Ci/mmol ; 10mCi/ml in water)

Chain - extension/chain - termination mixtures

5X Sequenase buffer

0.1M DTT

Water bath : 37℃, 65℃

2) 방 법

① 다음과 같은 components를 epp. tube에 섞는다.

Primer (0.5 pmol)	2.5㎕
5 X Sequenase buffer	2.0㎕
ss DNA template	2㎕ (¡ 1 ㎍)
H_2O	3.5㎕

② Denaturation and annealing :

이 mixture를 65℃에서 2분간 incubation 한 후, 상온이 될 때까지 방치하여 template와 primer를 annealing 시킨다.

③ A nnealing 되는 동안 labeling mix를 5배, Sequenase를 7배 희석시킨다.

④ Annealing이 끝난 후 새 epp. tube에 아래의 용액을 섞고 상온에서 2분간 reaction 시킨다.

Template/primer	10㎕
DTT	1㎕
Labeling mix	2㎕
[α - ^{35}S] dATP	1㎕
Sequenase	2㎕

⑤ 미리 준비된 termination mix tube(ddATP, ddCTP, dd - GTP, ddTTP)에 위에서 반응시킨 용액을 4㎕씩 넣고 37℃에서 5분간 반응시킨다.

⑥ 반응이 끝난후 reaction stop solution을 4μℓ씩 넣는다.

2. Denaturing Polyacylamide Gel Electrophoresis

1) 시약 및 기구

40% Acrylamide solution
- acyrlamide (DNA - sequencing grade) 380g
- N, N′ - methylenebisacrylamide 20g
- distilled H2O to 600ml

10XTBE
Urea
10% Ammonium persulfate (APS)
TEMED(N,N,N′,N′ - tetramethylethylenediamine)
Sequencer
Power supplier(2000V)
Coating solution

2) 방 법

① 아래와 같은 조성으로 6% acrylamide/urea gel monomer 용액을 만든다.

40% acrylamide	15ml
10X TBE	10ml
Urea	46g

distilled H2O to 100 ml

; filter the solution through a nitrocellulose filter (0.45 micron pore size)

이 monomer solution에 APS와 TEMED를 첨가한다.

② Casting the gel

Glass plate를 잘 닦은 후, 한쪽 plate만 coating solution으로 coating한다. 이 plate를 assembe 한 후, 90도 각도로 세워서 acrylamide solution을 붓고, comb를 꽂는다.

Acrylamide monomer solution을 30분에서 1시간동안 polymerize 시킨다.

③ Gel이 굳은후 sequencing sample 1 2μℓ을 loading 한다.

④ 이 gel을 1500V에서 3 4시간동안 running 시킨다.

⑤ Running이 끝난후 gel을 3MM paper에 붙인 후 gel dryer로 말린다.

⑥ 말린 gel을 cassette에 넣고 X - ray film에 2 3일간 exposure 시킨다.

⑦ X - ray film을 현상하여 sequence를 읽는다.

Total RNA의 정제

1. 시약 및 기구

Guanidium homogenizer Buffer

4M	guanidium thiocyanate
5mM	sodium acetate (pH 5.2)
0.15mM	dithiothreitol
0.5%	sodium lauryl sarcosinate

Acid phenol
Chloroform
Homogenizer

2. 방 법

1) Cell pellet(또는 Tissue)에 5 volume의 guanidium homogenizer Buffer를 넣고 glass/teflon homogenizer로 cell을 lysis 시킨다.
2) 이 homogenized된 cell suspension에 동일 volume의 acid phenol을 넣고 vortexing 한다.
3) 이 용액에 다시 chloroform을 total volume의 1/2 volume을 넣고 vorexing하여 완전히 섞어준다.
4) 이 용액을 4℃에서 12,000rmp으로 20분 동안 원심분리하여 유기용매층과 수용액층을 분리한다.
5) 상층액을 취하여 1/2 volume의 chlololform을 첨가하여 4)번 과정과 동일한 조건에서 원심분리한다.
6) 상층액을 취한후, LiCl 1/10 volume 가하고, - 20℃에 1시간정도 보관한 다음, 위와 같은 조건으로 원심분리한다.
7) 원심분리해서 생성된 pellet을 70% ethanol로 washing 한 후 건조한다
8) 건조된 RNA를 DEPC로 처리된 증류수에 녹인다.

Northern hybridization

1. Electrophoresis of RNA through agarose gel containing formaldehyde

1) 시약 및 기구

RNA
10X formaldehyde gel running buffer :

0.2M	MOPS (pH 7.0)
80mM	sodium acetate
10mM	EDTA

Agarose
Ethidium bromide
Formaldehyde gel - loading buffer :

50%	glycerol
1mM	EDTA
0.25%	Bromophenol blue
0.25%	Xylene cyanol FF

Agarose gel electrophoresis kit

UV transilluminater

2) 방 법

① 다음과 같이 1.2% denaturating agarose gel을 만든다.

Agarose	1.65g
ddH_2O	119.50ml

이들을 microwave oven에서 녹이고, 60℃로 식으면

10X formaldehyde gel running buffer	13.75ml
formaldehyde	4.10ml

을 가한다.

② Gel이 응고되는 동안 loading할 sample은 다음과 같은 조건으로 준비한다.

RNA	4.5㎕
10X formaldehye gel running buffer	1.0㎕
Formaldehye	3.5㎕
Formamide	10.0㎕

이 sample을 65℃에서 15분간 incubation한 후 ice에서 냉각시키다.

③ Sample을 loading 하기전에 5V/cm로 5분간 prerunning하고, 2)에서 준비한 sample에 Formaldehye gel - loading buffer를 2㎕를 가하고 gel에 loading 한다.

④ 이 gel을 1X formaldehye gel running buffer에서 3 4 V/cm로 running 한다.

2. Hybridization

1) 시약 및 기구

Nylon membrane (positively charged)
3MM paper(Whatman)
Transfer buffer(20X SSC) : NaCl, 3M ; Sodium citrate, 0.3M, pH 7.0)
Hybridization buffer : 5X SSC, 2% blocking reagent, 50% formamide, 0.1% N - lauroylsarcosine , SDS 0.02%
UV crosslinker
Hybridization incubator
Vacuum transfer unit

2) 방 법

① Electrophoresis후 사진을 찍고, gel의 불필요한 부분은 잘라낸다.

② Nylon membrane으로 transfer 하기 전에 gel 20X SSC (DEPC treated)로 15분간 2번 equilibration 시킨다.

③ Vacuum transfer the RNA to Nylon membrane from agarose gel
Vacuum을 10cm/Hg로 조절한다.
Gel이 마르지 않도록 transfer solution을 부어주면서 1 3시간동안 transfer를 수행한다.

④ RNA fixation : filter를 UV crosslinker로 link 시킨다.

⑤ Labeling of probe : DIG oligonucleotide 3′ - End labeling kit를 이용한다.

a) Ice상에서 reaction component들을 혼합한다.
4㎕ 5×tailing buffer,
4㎕ $CoCl_2$ solution,
100 pmol oligonucleotide,
1㎕ DIG - ddUTP solution,
1㎕ (약 50 units) terminal transferase.

b) 37℃에서 1시간 정도 반응시킨다.

c) Termination mix(1㎕ glycogen solution, 200㎕ of EDTA 0.2M)를 가한다.

d) Ethanol precipitation : 2.5㎕의 4M LiCl와 75㎕의 냉각된 (- 20℃) ethanol을 첨가하여 잘 섞은 후 - 70℃에서 30 분간 방치한다. 원심분리(13,000rpm, 10분) 후 70% ethanol 50㎕를 넣어 washing 한다.

e) Probe DNA pellet 을 공기 중에서 말린 후 증류수 10㎕에 녹인다.

f) - 20℃에 보관한다.

⑥ Prehybridization
Hybridization buffer 20ml/100cm^2 filter를 hybridization bottle에 넣고 hybridization과 같은 온도에서 membrane을 precoating 시킨다(probe가 작을 경우는 생략 가능).

⑦ Hybridization
68℃에서 2.5 3시간 hybridization을 수행한다. (Hybridizer 이용) ; Hybridization buffer의 양은 2.5ml/100 cm^2 filter로 한다.

⑧ Washing

a) 상온에서 0.1% SDS를 포함하는 2×SSC solution 50ml로 서서히 흔들어주면서 5분 정도 washing 한다.

b) Washing solution을 교체한 후 다시 5분 정도 washing 한다.

c) 0.5% SDS를 포함하는 0.1×SSC로 5분 정도 washing 한다.

3. Chemiluminescent detection and autoradiography

1) 시약 및 기구

Red rotor
37℃ incubator
X - ray film & cassette
Plastic 용기
Buffer 1 :
Maleic acid, 0.1M
NaCl, 0.15M

; adjusted pH to 7.5(20℃) with NaOH ; autoclaved

Blocking stock solution :

Blocking reagent, 10%(w/v), in buffer 1 ; autoclaved and stored at 4℃

Buffer 2 : 2% blocking reagent in buffer 1

Washing buffer : buffer 1 + Tween - 20, 0.3%(w/v)

Buffer 3 :

Tris - HCl, 0.1M

NaCl, 0.1M

$MgCl_2$, 50mM

Adjusted pH to 9.5(20℃) with NaOH

Lumigen PPD substrate solution :

0.1mg/ml in buffer 3

2) 방 법

① Membrane을 Washing buffer로 5분간 washing 한다.

② Blocking : buffer 2(100ml/100cm^2 filter)에 30분간 방치한다.

③ Antibody binding : diluted antibody conjugate solution(75 mU/ml in buffer 2)에 30분 정도 반응시킨다.

④ Washing : unbound conjugate를 제거하기 위하여 washing buffer(100ml/100cm^2 filter)로 15분씩 2번 washing 한다.

⑤ Equlibration : buffer 3(20ml/100cm^2 filter)으로 5분간 반응시킨다.

⑥ Membrane을 substrate인 Lumigen PPD solution(0.1mg/ml)에 넣어 5분정도 반응시킨다.

⑦ 물기를 어느정도 제거한 후(마른 3MM paper에 blotting), 젖은 membrane을 37℃에서 10분간 preincubation 한다.

⑧ 상온에서 15 25분 정도 X - ray film에 노출시킨다.

DRD1 Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100 μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

도파민 D1 수용체 유전자에서 다형성(Polymorphism)을 보이는 부위에 대해 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 도파민 D1 수용체 유전자좌를 분석하기 위해 사용한 시발체의 염기배열순서는 다음과 같다.

Forward

5′ - ACTGACCCCTATTCCCTGCT - 3′

Reverse

5′ - AGCACAGACCAGCGTGTTC - 3′

PCR은 25μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/25μℓ
DNTP	200μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng
	25μℓ

반 응온도와 시간은 94℃에서 10분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

B1절편과 B2절편을 구별하기 위해 PCR 생성물을 DdeI제한효소로 절단하고 2% 한천 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영하였다.

4. Determination of PCR products

Size of product : 207bp

Cutting with DdeI : Allele B1 - 146bp 61bp

B2 - 146bp 42bp 19bp

참고문헌

Sven C, Markus MN, Jeanette E, Peter P(1994) : *Detection of*

four polymorphic sites in the human dopamine D1 receptor gene (DRD1). Human Molecular Genetics 3(1) : 209

DRD2 Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000rpm에서 1분간 원심분리한후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

도파민 D2 수용체 유전자에서 다형성(Polymorphism)을 보이는 부위에 대해 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 도파민 D2 수용체 유전자좌를 분석하기 위해 사용한 시발체의 염기배열순서는 다음과 같다.

Forward
5′ - CCGTCGACGGCTGGCGAAGTTGTCTA - 3′
Reverse
5′ - CCGTCGACCCTTCCTGAGTGTCATCA - 3′

PCR은 25μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	Each 20pmol/25μℓ
DNTP	200 μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng
	25μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 10분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 1분, 50℃에서 1분, 72℃에서 1분30초간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

A1절편과 A2절편을 구별하기 위해 PCR 생성물을 TaqI제한효소로 절단하고 2% 한천 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영하였다.

4. Determination of PCR product

Size of product : 310bp
Cutting with TaqI : Allele A1 - 310bp
Allele A2 - 180bp 130bp

참고문헌

Grandy DK, Zhang Y, Civelli O(1993) : *PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. Human Molecular Genetics 2(12) : 2197*

DRD3 Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

도파민 D3 수용체 유전자에서 다형성 (Polymorphism)을 보이는 부위에 대해 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 도파민 D3 수용체 유전자좌를 분석하기 위해 사용한 시발체의 염기배열순서는 다음과 같다.

Forward

5′ - GCTCTATCTCCAACTCTCACA - 3′

Reverse

5′ - AAGTCTACTCACCTCCAGGTA - 3′

PCR은 25μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/25μℓ
dNTP	200 μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng

25μℓ

반응온도와 시간은 94°C에서 10분간 1주기를 수행한 후 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 10분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

A1절편과 A2절편을 구별하기 위해 PCR 생성물을 MluI 제한효소로 절단하고 2% 한천 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영하였다.

4. Determination of PCR product

Size of product : 304bp

Cutting with TaqI : Allele 1 - 314bp

Allele 2 - 206bp 98bp

참고문헌

Corcq MA, Mant R, Asher son P, Willinms J, Hode Y, Mayerova A, Collier D, Lannfelt L, Sodoloff P, Schwartz JC, Gill M, Macher JP, Mcguffin P, Owen MJ(1992) : *Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. J Med Genet 29 : 858-860*

DRD4 Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2 mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56°C에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

도파민 D4 수용체 유전자에서 다형성(Polymorphism)을 보이는 부위에 대해 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 도파민 D4 수용체 유전자좌를 분석하기 위해 사용한 시발체의 염기배열순서는 다음과 같다.

Sense

5′ - GCTGCTGCTCTACTGGGC - 3′

Antisense

5′ - GTGCACCACGAAGAAGGG - 3′

PCR은 50μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/25μℓ
DNTP	200 μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng

50μℓ

반응온도와 시간은 94°C에서 5분간 1주기를 수행한 후 94°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 5분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

도파민 수용체인 DRD4유전자에 나타나는 48bp 반복서열을 분석하기 위해 5% poly acrylamide 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영하였다.

4. Determination of PCR product

Size of product : 520bp 570bp 620bp 670bp 720bp 760bp

참고문헌

Shaikh S, Collier D, Kerwin RW, Pilowsky LS, Gill M, Xu WM, Thornton A(1993) : *Dopamine D4 receptor subtypes and response to clozapine. Lancet 341 : 116*

DRD5 Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

1) DRD5-microsatellite(D5(CT/GT/GA)n)

도파민 수용체인 DRD5 유전자 D5(CT/GT/GA)n 부위에대해 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

DRD5 유전자 D5(CT/GT/GA)n를 분석하기에 사용된 시발체 염기 배열 순서는 다음과 같다.

5′-CGTGTATGATCCCTGCAG-3′
5′-GCTCATGAGAAGAATGGAGTG-3′

PCR은 50μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 10pmol/50μℓ
dNTP	200μM
Taq polymerase	2.5U
Template DNA	100ng

50μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 5분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

2) DRD5-exonic polymorphism

도파민 수용체인 DRD5 유전자의 exon에 위치한 mutation (Pro 326 : CCT→CCC)을 분석하기위해 그 유전자 부위에 대해 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

DRD5 유전자를 분석하기에 사용된 시발체 염기 배열 순서는 다음과 같다.

A : 5′-CCGGAGGGCCTTCG-3′
B : 5′-CCGGAGGGCCTTCA-3′
C : 5′-CCTGGGAGGAGGACT-3′

PCR은 50μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	0.1μM
dNTP	200μM
DMSO	10%(w/w)
Taq polymerase	0.5unit
Template DNA	100ng

50μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 5분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

1) DRD5-microsatellite(D5(CT/GT/GA)n)

DRD5 유전자 D5(CT/GT/GA)n의 경우, PCR을 통해 증폭된 DNA들은 대립유전자에 따라 2 24bp정도의 차이를 보이는데, 이를 구별하기 위해서 6% urea polyacrylamide sequencing gel에 전기 영동이 요구된다. 즉, 증폭된 DNA들은 sequencing loading dye와 섞은 후, 1분간 끓여 변성시킨 후 sequencing gel에 loading한다. 이후 1500V에서 8시간 동안 전기영동을 수행하고 전기영동이 끝나면 은염색(silver staining)을 통해 절편을 확인한 후 PCR에 의해 증폭된 DNA를 pUC 19 ladder와 비교하여 정확한 길이를 분석한다.

2) DRD5-exonic polymorphism

도파민 수용체인 DRD5 유전자의 exon에 위치한 mutation (Pro 326 : CCT→CCC)을 분석하기 위해 allelespecific amplication(PASA)을 이용한다. Primer A와 C에 의해 증폭된 절편은 a2(C 대립유전자)이며 Primer B와 C에 의해 증폭된 절편은 a1(T 대립유전자)으로 이를 구별하기 위하여 5% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투과기(ultraviolet transillu-minator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영한다.

참고문헌

Steve SS, Janet LS, Leonard L, Heston(1993) : *A common exonic polymorphism in the human D5 dopamine recertor receptor gene, 92 : 633-634*

5-HT2A(5-hydroxytryptamine type 2a) Receptor Gene Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000rpm에서 1분간 원심분리한후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

세로토닌 수용체인 5-hydroxytryptamine type 2a 유전자의 nucleotide -24에서 318 부위에 대해 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

세로토닌 수용체인 5-hydroxytryptamine type 2a 유전자를 분석하기에 사용된 시발체 염기 배열 순서는 다음과 같다.

5′-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGTCT-GCTACAAGTTCTGGCTT-3′

5′-CTGCAGCTTTTTCTCTAGGG-3′

PCR은 50μℓ의 반응용량으로 3주기와 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/50μℓ
dNTP	200μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng
	50μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 3분, 60℃에서 45초, 72℃에서 1.5분간 3주기를 수행한 후 94℃에서 1분, 60℃에서 45초, 72℃에서 1.5분간 각각 35주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

세로토닌 수용체인 5-hydroxytryptamine type 2a 유전자에 위치한 mutation(TCT→TCC : 102)을 분석하기 위해 PCR 생성물(372bp)을 MspI 제한효소로 절단한다. 이를 구별하기 위하여 5% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투과기(ultraviolet transillu-minator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영한다.

4. Determination of PCR product

Size of product : 372bp

Cutting with MspI : Allele 1 - 372bp

Allele 2 - 216bp 156bp

참고문헌

Warren JT, Peacock ML, Rodfiguez LC, Fink JK(1993) : An *MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene(HTR2) : detection by DGGE and RFLP analysis. Humane Molecular Genetics 2(3) : 338*

Interleukin 2 Receptor β(IL-2Rβ) Gene Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic ly-

sis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

Interleukin 2 receptor β gene의 dinucleotide repeat인 (GT)n 부위에 대해 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

Interleukin 2 receptor β gene의 dinucleotide repeat인 (GT)n를 분석하기에 사용된 시발체 염기 배열 순서는 다음과 같다.

5′ - GAGAGGGAGGGCCTGCGTTC - 3′
5′ - CACCCAGGGCCAGATAAAGA - 3′

PCR은 50μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 10pmol/50μℓ
dNTP	200 μM
Taq polymerase	2.5U
Formamide	5%
Template DNA	200ng
	50μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 5분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 20초, 60℃에서 20초, 72℃에서 30초간 각각 25주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

Interleukin 2 receptor β gene의 dinucleotide repeat인 (GT)n의 경우, PCR을 통해 증폭된 DNA(대략 153bp)들은 대립유전자에 따라 2 16bp 정도의 차이를 보이는데, 이를 구별하기 위해서 6% urea polyacrylamide sequencing gel에 전기영동이 요구된다. 즉, 증폭된 DNA들은 sequencing loading dye와 섞은 후, 1분간 끓여 변성시킨 후 sequencing gel에 loading한다. 이후 1500V에서 8시간 동안 전기영동을 수행하고 전기영동이 끝나면 은염색(silver staining)을 통해 절편을 확인한 후 PCR에 의해 증폭된 DNA를 pUC 19 ladder와 비교하여 정확한 길이를 분석한다.

4. Determination of PCR product

Size of product : 149bp - 163bp
Allele1 149 Allele2 151 Allele3 153 Allele4 155
Allele5 157 Allele6 159 Allele7 161 Allele8 163

참고문헌

Eric SB, Miles BB, Henrik V(1993) : *Dunucleotide repeat polymorphism in the IL-2Rβ gene. Nucleic Acids Research 19(14) : 4022*

Interleukin 2 Gene Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000 rpm에서 1분간 원심분리한후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

Interleukin 2 gene의 simple repeat인 (CA)n(CT)n 부위에 대해 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

분석에 사용된 시발체 염기 배열 순서는 다음과 같다.

5′ - AAA GAG ACC TGC TAA CAC A - 3′
5′ - CCT ATG TTG GAG ATG TTT AT - 3′

PCR은 50μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
each Primer	each 10pmol/50μℓ
dNTP	200 μM

Taq polymerase	2.5U
Formamide	5%
Template DNA	200ng

50μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 3분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 20초, 60℃에서 20초, 72℃에서 30초간 각각 25주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

Interleukin 2 gene의 simple repeat인 (CA)n(CT)n의 경우, PCR을 통해 증폭된 DNA들은 대립유전자에 따라 2 32 bp정도의 차이를 보이는데, 이를 구별하기 위해서 6% urea polyacrylamide sequencing gel에 전기 영동이 요구된다. 즉, 증폭된 DNA들은 sequencing loading dye와 섞은 후, 1분간 끓여 변성시킨 후 sequencing gel에 loading한다. 이후 1500V에서 8시간 동안 전기영동을 수행하고 전기영동이 끝나면 은염색(silver staining)을 통해 절편을 확인한 후 PCR에 의해 증폭된 DNA를 pUC 19 ladder와 비교하여 정확한 길이를 분석한다.

4. Determination of PCR product

Size of PCR product : 115bp - 147bp

A1 147bp A2 145bp A3 143bp A4 141bp A5 139bp
A6 137bp A7 135bp A8 133bp A9 131bp A10 129bp
A11 127bp A12 125bp A13 123bp A14 119bp A15 115bp

참고문헌

Eppien C, Frank M, Nagy M, Nurnberg P, Eppien JT(1994) : *Dinucleotide repeat polymorphism in the IL2 and IL5RA genes. Human Molecular Genetics 3 : 679*

MAO_A

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100 μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

Monoamine oxidase A 유전자에서 다형성(Polymorphism)을 보이는 부위에 대해 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 사용한 시발체의 염기배열순서는 다음과 같다.

Sense
5′ - TTA AAT GGT CTC GGG AAG G - 3′
Antisense
5′ - GCC CAA TGA CAC AGC CTT T - 3′

PCR은 25μℓ의 반응용량으로 35주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/25μℓ
dNTP	200 μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng

25μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 10분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 30초, 55℃에서 1분, 72℃에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

A1절편과 A2절편을 구별하기 위해 PCR 생성물을 EcoRV제한효소로 절단하고 2% 한천 겔에서 전기영동한 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 자외선 투사기(ultraviolet transilluminator)에서 관찰하고 polaroid 카메라(polaroid, film 667)로 촬영하였다.

4. Determination of PCR Products

Size of product : 488bp
Cutting with EcoRV : Allele A1 - 488bp
A2 - 456bp 32bp

참고문헌

Beatrice C, Dominique C, Florence T, Sonia D, Philippe P, Sophie L, Thierry V, Viviane M, Cosette M, Francoise C, Claudine L,

Jacques M, Michel P, Thierry F(1996) : *Association study between schizophrenia and monoamine oxidase A and B DNA polymorphisms. Psychiatry Research 62 : 221-226*

D5S39 D5S76 Locus Methods

1. Genomic DNA의 정제

말초 혈액 1.5ml를 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 혈청을 제거하고, 남은 pellet에 ACE shocking solution(NH4Cl 8g, Na2EDTAH2O 1g, KH2PO4 0.1g을 증류수 1ℓ에 녹인 용액)을 500μℓ을 넣고 서서히 3분간 흔들어 적혈구를 제거한다. 상기 과정을 2회 반복한다.

상층막을 깨끗이 제거한 후 남은 pellet에 400μℓ의 nucleic lysis Buffer[Tris(pH 8.0) 10mM, NaCl 400mM, EDTA 2mM]를 넣고 pellet을 잘 섞어준다. 여기에 10% SDS 27μℓ와 proteinase K 10μℓ를 첨가하고 56℃에서 2시간 동안 반응시키고 saturated NaCl 135μℓ를 넣고 상온에서 15분간 방치한다. 13000rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 새 관에 옮긴 후 2배 부피의 에탄올에 넣고 침전된 DNA를 회수하여 새 관에 옮긴다. 이 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 건조시키고, 증류수 100μℓ에 녹인다.

2. 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)을 이용한 유전자형의 판별

도파민 D1 수용체 유전자에서 다형성(Polymorphism)을 보이는 부위에 대해 중합효소연쇄반응을 시행하였으며 도파민 D1 수용체 유전자좌를 분석하기 위해 사용한 시발체의 염기배열순서는 다음과 같다.

1) D5S39

5′ - CCATTGTATTAGGGTTCTCCAG - 3′

5′ - CTCTTGGTTTCCTGGCTTCGG - 3′

PCR은 25μℓ의 반응용량으로 30주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/25μℓ
dNTP	200 μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng

25μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 10분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 1분, 60℃에서 1분, 72℃에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

2) D5S76

5′ - CAG TCC TCG TGG AAT CAT GC - 3′

5′ - TAT TTG CAC TTA TTT ACT GCT CC - 3′

PCR은 25μℓ의 반응용량으로 30주기를 수행하였고 반응조건은 다음과 같다.

Taq pol buffer	50mM KCl/10mM TrisCl(pH 8.3)
MgCl2	1.5mM
Each Primer	each 20pmol/25μℓ
dNTP	200 μM
Taq polymerase	3U
Template DNA	200ng

25μℓ

반응온도와 시간은 94℃에서 10분간 1주기를 수행한 후 94℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 30초간 각각 35주기를 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분간 1주기를 수행하였다.

3. 증폭된 생성물의 분석

D5S39 D5S76의 경우 PCR을 통해 증폭된 DNA들은 대립유전자형에 따라 2 10bp 정도의 차이를 보이는데 이것을 구별하기 위해 PCR 생성물을 6% urea polyacrylamide sequencing gel에 전기영동이 요구된다. 즉, 증폭된 DNA들은 sequencing loading dye와 섞은 후, 1분간 끓여 변성시킨 후 sequencing gel에 loading한다. 이후 1500V에서 8시간 동안 전기영동을 수행하고 전기영동이 끝나면 은염색(silver staining)을 통해 절편을 확인한 후 PCR에 증폭된 DNA를 pUC 19 ladder와 비교하여 정확한 길이를 분석한다.

4. Determination of PCR products

Size of product : D5S39 - 218bp 222bp 224bp 226bp 230bp

D5S76 - 94bp 102bp 108bp 112bp

참고문헌

Sherrington R, Mankoo B, Dixon M, Curtis D, Kalsi G, Melmer G, Gufling H(1993) : *Microsatellite polymorphism for chromosome 5 bands q11.2−13.3. Hum Hered 43 : 197-202*