

한국인 다기관 암 코호트 시료의 DNA 생활성도 평가

양미희, 유지현, 김청식, 신애선, 강대회, 장성훈¹⁾, 박수경¹⁾, 신해림²⁾, 유근영

서울대학교 의과대학 예방의학교실, 건국대학교 의과대학 예방의학교실¹⁾, 국립암센터 암역학관리연구부²⁾

Assessment of DNA Viability in Long Term-Stored Buffy Coat Species for the Korean Multicenter Cancer Cohort

Mihi Yang, Ji Hyun Yoo, Cheong Sik Kim, Aesun Shin, Daehee Kang, Soung-Hoon Chang¹⁾, Sue Kyung Park¹⁾, Hai-Rim Shin²⁾, Keun-Young Yoo

Department of Preventive Medicine, Seoul National University College of Medicine;
Department of Preventive Medicine, Konkuk University College of Medicine¹⁾;
Division of Cancer Control & Epidemiology, National Cancer Center²⁾

Objectives : Peripheral blood-buffy coat fractions (N = 14,956) have been stored at -70 °C in the headquarter of the Korean Multicenter Cancer Cohort (KMCC), since 1993. To study the future molecular etiology of cancers using specimens of the cohort, properly stored specimens are necessary. Therefore, the DNA-viability of the buffy coat samples was investigated.

Methods : Buffy coat fraction samples were randomly selected from various collection areas and years (N = 100). The DNA viability was evaluate from the UV-absorbent ratios at 260/280nm and the PCR for β -globin was performed with genomic DNA isolated from the buffy coat.

Results : PCR products were obtained from 85 and 98% of the C and H area-samples, respectively, using 50 or 100 μ l of the buffy coat. There were significant differences in the yields of the PCR-amplifications from the C and H areas (p < 0.05), which was due to differences in the homogenization of the buffy coat fractions

available as aliquots. The PCR-products were obtained from all of the samples (N = 7) stored at the C area-local center, but the other aliquots stored at the headquarter were not PCR-amplified. Therefore, the PCR products in almost all the samples, even including the DNA-degraded samples, were obtained. In addition, an improvement in the DNA isolation, i.e. approx. 1.6 fold, was found after using extra RBC lysis buffer.

Conclusions : PCR products for β -globin were obtained from nearly all of the samples. The regional differences in the PCR amplifications were thought to have originated from the different sample-preparation and homogenization performance. Therefore, the long term-stored buffy coat species at the KMCC can be used for future molecular studies.

Korean J Prev Med 2003;36(4):373-376

Key Words: Cancer, Cohort, Korean, Blood, Buffy coat, DNA, Viability

서 론

한국형 다기관 암 코호트(KMCC, Korean Multicenter Cancer Cohort)는 한국인 사망원인의 수위를 차지하는 악성종양의 원인을 감수성지표 (susceptibility biomarker)인 유전자다형성 (genetic polymorphism), 노출 및 반응지표를 이용하여 분자역학적 연구를 통해 구명하고자 1993년부터 구축되었다. 이를 위해 지역조사 시 소변 및 혈액 시료를 채취하여 생체 시료은행을 확립하였다 [1,2]. 이 중 유전자다형성 연구를 위해서는 말초혈 유래의 buffy coat를 보관하고 있다. 이는 국내에서 지금까지 진행

되고 있거나 진행되었던 코호트 중 생체 시료의 보관 차원에서는 가장 장기간에 해당하는 것이다.

한편, 암코호트를 구축시, 장래 이용할 목적으로 장기간 보관하게 되는 생체시료의 질은 전체 연구의 질을 결정하는 중요한 사항이다. 그러나, 보관에 대한 생체 시료의 질 관리 (quality control), 나아가, DNA의 생활성도 (viability) 파악을 위한 기준 (guide line)은 국내외적으로 아직 제대로 마련되어 있지 않은 실정이다. 현재, 전혈 (whole blood)로부터 양질의 DNA를 얻기 위한 혈액 보관법 [3]이나, 다양한 시간과 온도에 따른 DNA 생활성도에 관한 연구는 다수 이루어져 있지만

[4], 이들은 주로 DNA extraction 후의 보관방법을 다뤄 전혈로 부터 얻은 buffy coat를 보관해온 한국형 다기관 암 코호트 시료와 같이 buffy coat 시료에서 DNA 생활성도를 비교 조사한 연구는 거의 없다.

DNA 자체는 냉장이나 냉동 보관 중인 시료를 얼리거나 녹이는 과정을 반복하여도 실험 결과에 큰 영향을 미치지 않지만, 생체시료 자체인 냉동 보관된 전혈을 반복하여 '얼렸다 녹였다' 하면 한번 반복에서도 DNA 수득률이 25% 정도 떨어진다는 보고도 있다 [5].

본 연구에서는 2003년 현재, 최장 10년간 냉동 보관되고 있는 생체시료, buffy coat의 DNA 생활성도를 점검함으로써 향후 DNA 분석을 중심으로 하는 연구의 타당성을 평가해 보고자 하였다.

접수 : 2003년 7월 4일, 채택 : 2003년 9월 3일

*본 연구는 2002년도 보건복지부 암정복추진연구개발사업의 지원으로 이루어졌음.

책임저자 : 유근영(서울시 종로구 연건동 28, 전화 : 02-740-8324, 팩스 : 02-747-4830, E-mail : kyyoo@plaza.snu.ac.kr)

연구방법

1. 시료

우리나라 남부 C 및 H지역 거주 자원의 혈액을 heparinized tube에 채취한 후 현장에서 원심분리하여 혈장, buffy coat, 적혈구 분획 (fraction)으로 나누어 1993년부터 2003년 7월 현재까지 서울 의대에서 -70 °C 냉동고에 보관하여 왔다 (N=14,956). 이 연구에서는 보관 중인 buffy coat 시료 중 채취 지역과 채취 연도를 고려하여 C지역의 1996년, 1998년, 2001년 시료와, H지역의 1995년과 1997년 시료, 즉 두 지역, 5개 년도의 시료를 각 20 개씩 난수표를 이용한 무작위 선정으로 총 100 개의 시료에 대하여 분석하였다. 본 실험을 위하여 무작위선정한 시료 기증자들의 성별분포는 남자 32 %, 여자 68 %이었으며, 연령분포는 49세 이하 35 %; 50세~59세, 22 %; 60세~69세, 28 %; 70세 이상 15 %로, 전체 코호트 대상자들의 성별 및 연령분포와 유의적 차이가 없었다.

2. Genomic DNA 분리

각 buffy coat로부터 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI)와 동회사에서 제공한 protocol에 따라 genomic DNA를 추출하고, UV-spectrophotometer로 DNA의 흡광도를 측정하여 DNA의 질과 양을 평가하였다. 이때 사용한 흡광도 ratio는 260 nm/ 280 nm이었다.

3. DNA 생활성도 검사

추출한 genomic DNA를 주형 (template)으로 house keeping gene인 β -globin 유전자의 PCR을 시행하였으며 [6], PCR의 증폭유무로 buffy coat로부터 얻은 DNA의 생활성도를 평가하였다. 즉, buffy coat 50 μ l 또는 100 μ l로부터 genomic DNA를 추출한 후, 2 μ l의 genomic DNA (DNA량으로 약 100 ng), 각 20 pmole의 primer (sense, 5'-CCACCTCA TCCACGTTACC-3; antisense, 5'-GAAGAGCCAAGGA-

CAGGTAC-3), universal PCR mixture (Bioneer, Daejeon, Korea)을 혼합한 20 μ l의 PCR 반응액을 thermocycler (GeneAmp PCRsystem 2700, Applied Biosystem, Foster city, CA)에 적용하여 PCR (94 °C, 4분; 94 °C, 1분; 54 °C, 1분; 72 °C, 1분)으로 35 cycle; 72 °C, 5분)을 실시하였다. PCR 산물의 생성 여부는 PCR이 끝난 반응액을 5 μ l 씩 1.5 % agarose gel 상에 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 MyImager™ (서린 바이오사이언스, Seoul, Korea)로 확인하였다.

4. 자료분석

대상 시료 기증자들의 분포와 UV 흡광도 측정 결과는 빈도분석으로 제시하였고, 각 단계에서 DNA 추출 후의 PCR 결과는 PCR 증폭 여부를 [yes/no]로 이분 변수 화하여 지역별과 지역내 연도별로 Fisher's exact test 또는 two sided χ^2 -test로 비교하였으며, DNA 농도와 PCR 증폭 강도의 관계는 상관분석으로 분석하였다. 모든 자료의 분석에는 SPSS 프로그램 (ver 10.0)을 사용하였다.

결 과

1차적으로 buffy coat 50 μ l를 사용하여 DNA를 추출하고 이를 β -globin 유전자를 목적으로 PCR 실시한 결과는 Figure 1과 같다. 총 100 개의 시료 중 72 개의 시료로부터 PCR 산물을 얻었으며 (PCR 수득률, 72 %), 지역이나, 각 지역내 연도에 따른 PCR 수득률의 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

다음으로 시료량에 따라 PCR 수득률이 달라지는지를 평가하기 위하여 1차 실험에서 PCR 산물을 얻지 못한 28 개의

시료에 대하여 시료량을 2배로 증량, buffy coat 100 μ l로 2차 PCR을 시행한 결과, 28 개의 시료 중 18 개의 시료에서 PCR 산물을 얻어, buffy coat 50 μ l를 사용한 1차 PCR 결과에 합하여 PCR 수득률은 전체적으로 72 %에서 90 %로 처음보다 18 % 증가하였다 (Table 2). 2차 PCR 후, 각 지역내에서 연도별 차이가 없었으나, PCR 수득률이 H지역 (98 %)이 C지역 (85 %)보다 유의하게 높았으므로 지역 간 차이의 원인을 조사한 결과, H지역은 전혈에서 buffy coat 분리 후 1개 tube로 본부에서만 보관한 반면, C지역은 분리한 buffy coat를 균질화 하지 않고, 2개의 tube로 분주 (aliquot)하여 본부와 C지역센터에 각각 보관하고 있는 것으로 밝혀졌다. 그러므로, C지역센터보관 시료의 DNA 농도는 본부의 것과 차이가 의심되었다. 이를 확인하기 위하여, 2차 PCR 후에도 본부 시료로는 PCR 산물을 얻을 수 없었던 총 9개 시료 중 달리 분주되어 C지역센터 보관중인 7개 시료를 이용하여 3차 PCR을 시행한 결과, 7개 시료 모두에서 PCR 산물을 얻었다 (Table 3). 이로써 지역 간의 PCR 수득률 차이는 전처리차이, 즉, 분주 전 buffy coat fraction을 균질화했는지 여부에 의한 것으로 사료된다.

한편, DNA 추출시 그 추출 수득률을 높이기 위한 방법으로 적혈구 용해 (RBC lysis)가 불완전하지 않았나 의심하여 1차 PCR에서 PCR 산물을 얻지 못한 본부 보관 시료 (N=28)에 Promega사 kit에서 제공하지 않는 RBC lysis buffer (Promega)를 추가로 가하여 1차 PCR 실험시와 동일한 양인 buffy coat 50 μ l에서 DNA를 추출, PCR을 실시하였다. 그 결과, 이 중 16개의 시료에서 PCR 산물을 얻을 수 있었으며 전체적으로 PCR 수득률은 72 %

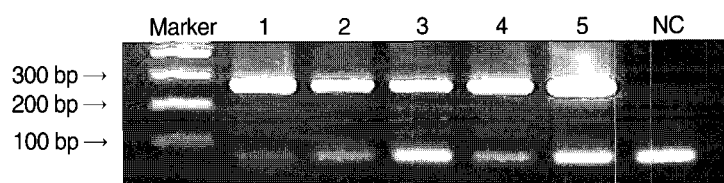


Figure 1. Profiles of PCR products: The length of PCR product is 268 bp.

Table 1. Yields of PCR amplification with 50 μ l of buffy coat

	PCR product (number of subjects [%])		
	Obtained	Non-obtained	Total obtained [†]
C area*			
year 1996	13 [65]	7 [35]	
year 1998	16 [80]	4 [20]	40 [67]
year 2001	11 [55]	9 [45]	
H area*			
year 1995	15 [75]	5 [25]	
year 1997	17 [85]	3 [15]	32 [80]
Total	72 [72]	28 [28]	72 [72]

* Differences in PCR amplification among years in C and H area (p = 0.24 and 0.69, respectively)

[†] Differences in PCR amplification between areas (p = 0.18)

Table 2. Yields of PCR amplification with 50 μ l and 100 μ l of buffy coat

	PCR product (number of subjects [%])		
	Obtained	Non-obtained	Total obtained [†]
C area*			
year 1996	18 [90]	2 [10]	
year 1998	18 [90]	2 [10]	51 [85]
year 2001	15 [75]	5 [25]	
H area*			
year 1995	20 [100]	0 [0]	
year 1997	19 [95]	1 [5]	39 [98]
Total	90 [90]	10 [10]	90 [90]

* Differences in PCR amplification among years in C and H area (p = 0.31 and 1.0 respectively)

[†] Differences in PCR amplification between areas (p < 0.05)

Table 3. Final yields of PCR amplification with buffy coat stored at the headquarter or a local center

	PCR product (number of subjects [%])		
	Obtained	Non-obtained	Total obtained [†]
C area*			
year 1996	20 [100]	0 [0]	
year 1998	20 [100]	0 [0]	58 [97]
year 2001	18 [90]	2 [10]	
H area*			
year 1995	20 [100]	0 [0]	
year 1997	19 [95]	1 [5]	39 [98]
Total	97 [97]	3 [3]	97 [97]

* Differences in the yields among years in C and H area (p = 0.13 and 1.0, respectively)

[†] Differences in the yields between areas (p = 0.65)

에서 88 %로 증가하였다. 즉, 완전한 적혈구 용해는 DNA 분리 수득률과, 나아가 PCR 수득률을 높이는 것으로 밝혀졌다.

260/280 흡광도 ratio의 분포는 0.5-2.5 (median 1.55)로 normal distribution (Shapiro-Wilk W test, p=0.19)을 따르며 각 시료에서 분리된 DNA 농도와 PCR 수득률 사이에는 유의한 양의 상관관계가 있었다 (p < 0.01).

매회 분리한 genomic DNA 1 μ l를 그대로 2 % agarose gel에 적용하여 DNA

손상 (degradation)을 조사한 결과, 전체적으로 평균 30 %에서 손상된 패턴을 보였지만 (Figure 2), 앞서 기술한 실제 PCR 결과, 거의 전 시료에서 PCR 산물을 얻을 수 있었으므로 손상된 DNA 시료라 하더라도 PCR에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 평가되었다.

고찰

지역사회 인구집단을 대상으로 한 코

호트연구는 위험요인에 대한 노출 여부를 질병이 생기기 이전에 측정하여 질병 발생으로 인한 노출 요인의 측정 비뚤림을 방지할 수 있고, 질병의 발생을 노출군과 비노출군에서 직접 측정할 수 있다는 일반적인 코호트의 장점 이외에도 생체시료를 보유한 경우에는 기반조사 당시에 수집하지 못했던 노출에 대한 정보를 생체시료를 이용하여 측정하여 후향적인 코호트 연구가 가능하다는 장점이 있다.

KMCC 코호트는 한국인에서 빈발하는 암의 원인을 역학적으로 구명하기 위하여 전향적 코호트 연구를 수행할 수 있는 지역사회 단위 대규모 전향적 코호트를 구축함을 목적으로 하였다 [1,2]. 이 코호트를 통하여 특정 암과 개인 생활습관, 환경적 요인 및 숙주 요인과의 관련성을 역학적으로 규명함은 물론, 암 발생에 관련된 여러 생체지표, 개인 숙주 감수성 및 종양 표지자와의 관련성을 분자역학적으로 규명함으로써 향후 암의 원인에 관한 새로운 가설을 증명할 수 있도록 생체시료은행을 연구 개시단계에서 구축하는 것을 또 하나의 목적으로 하였다. 한국인을 대표하는 대규모 인구집단을 대상으로 코호트로 구축하고자 KMCC 코호트는 일반 지역사회에 거주하는 지역주민 중 현지에서 수행되는 암 선별검진사업 (cancer screening)에 자발적으로 참여하는 30세 이상 성인 남녀 모두를 대상에 포함하였다. 생체시료은행 구축을 위해서는 참여자의 동의를 받아 개개인으로부터 기증받은 혈액 및 소변을 장기간 보관하고 있다.

생체시료 중 단핵구의 생활성도는 신선한 buffy coat 유래와 단지 1-2 주 냉동보관한 buffy coat 유래를 비교할 때 냉동보관 시 현저히 떨어진다고 보고되었고 [7], 혈청 중 각종 영양소의 경우, 그 생활성도 유지를 위해 생체시료은행의 보관조건을 제시하여 왔다 [8,9]. 그러므로, 코호트연구와 같이 장기간 생체시료를 보관하는 경우, 그 보관에 많은 주의가 필요하다고 사료된다. 그러나, 생체시료 중 DNA 사용을 목적으로 생체시료은행의 보관조건에 대한 기준은 거의 전무한 형편이다. 혈청

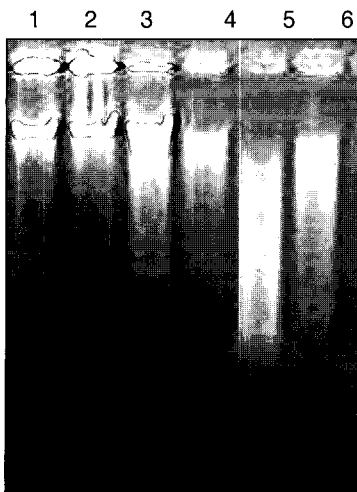


Figure 2. Profiles of isolated genomic DNA samples : lane 1-3, intact; lane 4-6, degraded.

과 조직보관은행에 대하여는 미국 Committee on National Monitoring of Human Tissues에서 그 기준을 제시하고 있으며 [10], DNA와 단백질 부가체 (adducts)는 섭씨 -70 °C 보관으로 거의 안전한 것으로 알려져 있다 [11-12]. 이러한 보편적 기준에 근거하여 [13], KMCC의 생체시료는 보관되어 왔으며, 본 연구는 이 생체시료를 이용하여 유전자다형을 중심으로 한 숙주 인자 연구를 수행하기 앞서, 장기간 보관에 따른 생체시료의 질을 점검할 필요에 의해 수행되었다.

본 연구 결과, DNA 손상정도, UV 260/280 nm ratio, 실제 PCR 증폭 등 일련의 과정에서 시료의 거의 전부에서 성공적인 PCR 결과를 보였으므로 현재 보관 중인 KMCC 시료를 이용한 향후의 특정 유전자다형 진단을 포함하는 일련의 분자역학적 암-병리학 연구가 가능하리라고 예상된다. 또한, buffy coat로부터 genomic DNA를 분리할 때 적혈구 용해를 완전히 하는 것이 DNA 수득률을 높이는 것으로 관찰되었으므로 향후 상품화된 DNA 분리용 kit 사용 시에는 불완전한 적혈구 용해를 막기 위해 적혈구 용

해용 buffer의 추가 사용이 권장된다.

결론

유전적 개인차를 중심으로 한 암 감수성 인자를 구명하기 위하여 구축된 KMCC의 생체시료은행에는 말초혈 유래 buffy coat가 1993년부터 2003년 현재까지 10년 간 보관되어왔다. 현 시점에서 암코호트의 중요한 요소인 생체시료의 적절한 보관 및 생활성도 평가는 향후 보관된 시료를 이용하게 될 연구의 질을 결정하는 중요한 사항이다. 이 연구에서는 이러한 목적에서 KMCC의 생체시료은행에서 무작위로 선정한 buffy coat 시료 (N=100)를 이용하여 DNA 생활성도를 검사하였으며, 그 결과, 본부에만 있고 지역센터에 없던 3개 시료를 제외하고 본부 또는 지역센터에서 보관해온 전체 buffy coat에서 PCR 증폭이 가능했다.

결론적으로 현재 초저온냉동고(섭씨 -70 °C)에서 장기간 보관 중인 KMCC-buffy coat 시료의 보관상태는 양호하며, 현재의 보관방법을 유지함은 향후 PCR을 주 내용으로 하는 유전자다형 진단 등 KMCC시료를 사용한 분자역학적 암-병리학 연구를 위하여 문제가 없는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Yoo KY, Shin HR, Chang SH, Lee KS, Park SK, Kang D, Lee DH. Korean Multi-center cancer cohort study including a biological materials bank (KMCC-I). *Asian Pac J Cancer Prev* 2002; 3: 85-92.
2. Yoo KY, Shin HR, Chang SH, Choi JM, Kim CY, Lee KS, Lee WJ, Kang D, Kim SM, Lee BO, Lee DH, Park SK, Sung J, Ju YS, Kim DS, Kang JW, Cho SH. Current status of multicenter cancer cohort study with biological materials bank in Korea. *Korean J Epidemiol* 1998; 20: 275-278(Korean)
3. Gustafson S, Proper JA, Bowie EJ, Sommer SS. Parameters affecting the yield of

DNA from human blood. *Anal Biochem* 1987; 165: 294-299

4. Medisen L, Hoar DI, Holroyd CD, Crisp M, Hodes ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet* 1987; 27: 379-390
5. Kenneth SR, Haite NE, Kelly KF. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J Med Genet* 1990; 27: 569-570
6. Nan H, Kim H, Kang J, Bae JW, Choe KH, Lee KH, Kim ST, Won CH, Kim YM. Effects of genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1, CYP1A1 and CYP2E1 on risk of lung cancer. *Korean J Prev Med* 1999; 32: 123-129(Korean)
7. Pero RW, Olsson A, Bryngelsson C, Carlsson S, Janzon L, Berglund G, Elmstahl S. Quality control program for storage of biologically banked blood Specimens in the malmo diet and cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention* 1998; 7: 803-808
8. Comstock GW, Burke AE, Hoffman SC, Norkus EP, Gross M, Helzlsouer KJ. The repeatability of serum carotenoid, retinoid, and tocopherol concentrations in specimens of blood collected 15 Year Apart. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention* 2001; 10: 65-68
9. Comstock GW, Norkus EP, Hoffman SC, Xu M, Helzlsouer KJ. Stability of ascorbic acid, carotenoids, retinol, and tocopherols in plasma stored at -70 °C for 4 years. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 1995; 4:505-507
10. CNMHT, Monitoring human tissues for toxic substances. Washington, D.C., National Academy press; 1991
11. Goldring JM, Lucier GW. Protein and DNA adducts. In: Hulka BS, Wilcosky TC, Griffith JD editors. Biological markers in epidemiology. New York: Oxford University Press;1990, p.173-195
12. Winn DM, Gunter EW. Biologic Specimen banks: A resource for molecular epidemiologic studies. In: schulte PA, Perera FP, editors. molecular epidemiology principles and practices. Academic Press; 1993.p. 217-234
13. Available from : UK biobank, http://www.ukbiobank.ac.uk/documents/draft_protocol.pdf