

Ghrelin 유전자의 Leu72Met 다형성 분석에서 PCR-RFLP, PCR-SSCP, Amplication Refractory Mutation System(ARMS)의 비교분석

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 임상의학연구소*

강주성 · 김세림* · 김선영* · 주찬웅 · 조수철 · 황평한*

Comparison of PCR-RFLP, PCR-SSCP, Amplication Refractory Mutation System(ARMS) in Leu72Met Polymorphism of Ghrelin Gene

Ju Sung Kang, M.D., Se Rim Kim, M.S.*, Sun Young Kim, Ph.D.*
Chan Uhng Joo, M.D., Soo Chul Cho, M.D. and Pyoung Han Hwang, M.D.*

Department of Pediatrics, Research Institute of Clinical Medicine*,
School of Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, Korea

Purpose : The role of ghrelin, which promotes the secretion of growth hormone, was not well known until now. Recently it was found that the mutation of ghrelin gene is related to obesity and diabetes. This study is to find the screening method that can easily and effectively detect the polymorphism of Leu72Met in ghrelin gene of obesity patients and apply it to clinical usage.

Methods : We compared PCR-RFLP, PCR-SSCP and ARMS methodologies for analyzing of the polymorphism of Leu72Met in ghrelin gene of obesity children, and also studied the merits and demerits of these methodologies.

Results : In this study, we were able to find out the band of peculiar allele of Leu72Met in ghrelin gene using PCR-RFLP, PCR-SSCP and ARMS analyses. The polymorphism of Leu72Met in ghrelin gene determined by all above methodologies was in complete agreement. Compared to the PCR-RFLP and PCR-SSCP, ARMS analysis is simple, inexpensive and also consume less time. It is very sensitive to analyze the polymorphism and easy to understand the results of test.

Conclusion : Though PCR-RFLP, PCR-SSCP and ARMS analyses were sensitive to analyze the polymorphism of Leu72Met in ghrelin gene, ARMS analysis appears to be more efficient than PCR-RFLP and PCR-SSCP. Therefore, we conclude that ARMS analysis is suitable to analyze the polymorphism of Leu72Met in ghrelin gene for large quantity of specimens. (**Korean J Pediatr 2005; 48:1068-1075**)

Key Words : Ghrelin, Polymorphism, PCR-RFLP, PCR-SSCP, ARMS

서 론

최근에 발견된 성장호르몬의 분비를 자극하는 생리적 펩티드 호르몬인 ghrelin은 성장호르몬의 분비를 강력하게 촉진하는 것 외에도 프로락틴, 부신피질 자극호르몬(ACTH)을 분비하게 한다. 이러한 내분비 작용 이외에도 ghrelin은 식욕을 유발하는 효

과를 가지고 있으며 지방의 사용을 감소시키는 등 에너지대사에도 영향을 미치며, 위장관 운동, 위산과 소화효소의 분비, 췌장의 내분비 기능에 영향을 미치며 심혈관 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다^{1, 2)}. 위와 같이 성장호르몬 분비를 촉진하는 이외의 여러 작용을 가지고 ghrelin은 여러 질병에서의 역할은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 그러나 최근에 ghrelin 유전자 변이가 비만과 당뇨병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 현재까지 보고된 preproghrelin 혹은 ghrelin 유전자 이상으로는 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)인 Arg51Gln, Leu72Met, G274A가 있다. 이중 가장 흔한 이상인 Leu72Met 변이는 변이를 동반하지 않은 경우에 비해 비만이 시작되는 시

접수 : 2005년 6월 13일, 승인 : 2005년 8월 1일
책임저자 : 황평한, 전북대학교 의과대학 소아과학교실
Correspondence : Pyoung Han Hwang, M.D.
Tel : 063)250-1472 Fax : 063)250-1464
E-mail : hwaph@chonbuk.ac.kr

기가 빠른 것으로 알려져 있다⁴⁾.

중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 DNA를 증폭하고 유전자의 변이 부위를 분석하는 방법으로는 제한효소 단편길이 다형분석법(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)이 일반적으로 diallelic polymorphism을 스크리닝 하는데 사용되었다. 또 다른 분석 방법에는 중합효소 연쇄반응-단일가닥 구조 다형성(single strand conformational polymorphism, SSCP)⁶⁾, allele specific oligonucleotide(ASO)⁷⁾나 amplification refractory mutation system(ARMS)⁸⁾과 DNA 염기서열 분석법(sequencing) 등이 있으나 방법에 따라 고가의 시약과 제한효소, 동위원소 및 probe 등을 사용해야 하는 단점이 있다. 이중 PCR-SSCP 분석법이 가장 널리 사용되고 있다. SSCP 분석법은 Orita 등⁶⁾에 의해 처음 보고되어 PCR 산물을 열 변성시킬 때 1차 구조의 차이에 의해서 생기는 단일 가닥의 3차 구조의 차이가 겔 상에서 전기영동을 하였을 때 이동 변위로 나타난다는 것이 그 원리이다. 즉 정상적인 DNA나 돌연변이된 DNA간의 염기서열 차이가 전기영동의 이동 양상의 차이를 보여준다는 것이다. SSCP법의 주된 장점은 간편성과 민감도가 높아서 DNA의 변이를 스크리닝하는 방법으로는 가장 많이 사용되는 방법이지만 단점으로는 PCR 산물의 크기가 200 bp 정도 될 때 70-95% 가량의 유전자 변이를 검색하는 효율을 가지나 타겟의 크기가 증가할수록 변이의 검출률이 감소한다⁹⁾. DNA 염기서열 분석법과 SSCP는 알지 못하는 다형성을 식별하는 것에 도움이 되는데, RFLP, ASO와 ARMS는 일반적으로 기존에 알고 있는 diallelic 다형성을 찾아내는데 이용된다. 그 중 ARMS의 원리는 primer의 3'-end가 모형 DNA의 염기서열과 mismatch가 되면 PCR시 primer extension이 되지 않는 것을 이용한 것으로 일단 적당한 primer 디자인과 PCR 조건이 확립되면 PCR과 전기영동의 두 단계만 시행하면 결과를 판독할 수 있어 술식이 간단하고 시간소요가 적으므로 대량검체에 이용할 수 있다는 장점이 있다⁸⁾.

일반적으로 ghrelin 유전자의 Leu72Met와 같은 diallelic 다형성을 스크리닝하는데 SSCP, RFLP, sequencing 등이 사용되었다^{4, 5, 10)}. 따라서 본 연구는 비만소아에서 proghrelin 유전자의 Leu72Met 다형성 분석을 RFLP, SSCP와 ARMS 분석 방법을 이용하여 비교분석하고 이들의 검사방법의 장단점을 알아보고 향후 비만 환자들에서 가장 효과적이고 정확하게, 손쉽게 proghrelin 유전자의 Leu72Met 다형성 분석을 검출할 수 있는 스크리닝 방법으로 임상적 적용에 이용하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상

전주시내 초등학교 4, 5학년을 대상으로 실시한 집단 건강검진을 받은 소아들 중에서 무작위로 선정하여 검사에 동의한 소아들을 대상으로 하였다. 비만의 정의는 1998년 대한소아과학회

에서 발표한 한국 소아의 체질량 지수 자료에 따라 정의된 소아 비만아와 정상아의 혈액을 채취하였다.

2. Genomic DNA 추출

Ghrelin 유전자형을 측정하기 위한 DNA는 말초혈액세포로부터 분리하였다. Genomic DNA 분리는 DNaid II 시약(Genotech, Daejeon, Korea)을 이용하여 회사의 사용설명서에 따라 DNA를 추출하였다. 간략하면 혈액 200 μ L에 동량의 용해 용액을 넣어 50°C에서 50분간 반응시켰다. 클로로폼 500 μ L를 첨가한 후 13,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층의 200 μ L를 새로운 튜브에 취하였다. 동량의 이소프로판올을 첨가하여 DNA를 침전시키고, 정제된 DNA의 분리를 위하여 70% 에탄올로 2회 세정하였다. 멸균 증류수 40 μ L에 녹여서 사용하였으며, 시료 당 2 μ g 정도의 DNA를 정제하였다.

3. 중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction, PCR)

Ghrelin의 Leu72Met 유전자형의 분석을 위하여 사용한 primer는 사람의 각 유전자 cDNA의 염기서열에 근거하여 제작하였다. PCR-RFLP와 PCR-SSCP를 수행하기 위하여 Sense primer, 5'-agc aga gaa agg agt cg-3'; antisense primer, 5'-tgt tca ctg cca cct ct-3' 2개의 primer를 이용하여 ghrelin 유전자의 exon 2를 포함하는 207 base-pairs DNA 단편을 PCR 기술을 이용하여 증폭하였다. 간략하면 분리된 genomic DNA 25 ng를 취하여 reaction buffer 5 μ L, 500 μ M dNTP mixture 5 μ L, MgCl₂ 3 μ L, primer 10 pmol 1 μ L, Taq-polymerase(5 U/ μ L) 0.25 μ L 및 증류수를 가하여 총 50 μ L을 만들었다. 중합효소 연쇄반응 조건은 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 1분간 변성반응(denaturation), 56°C에서 1분간 결합반응(annealing), 72°C에서 1분간 연장반응(extension)을 30회 반복하여 증폭된 DNA 중 10 μ L를 취해서 2% agarose 겔에서 전기영동 하였다.

4. PCR 산물의 정제

PCR 산물의 정제는 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였다. Spin column 시험관을 2 mL 시험관에 넣은 후, PCR 산물 50 μ L와 PB buffer 250 μ L를 넣고 잘 섞어 spin column 시험관에 옮겨서 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 여과액은 버린 후 spin column 시험관에 PE buffer 0.75 mL를 첨가하여 다시 1분간 원심분리하였다. 여과액을 버린 후 에탄올을 완전히 제거하기 위하여 10,000 rpm에서 다시 2분간 원심분리하였다. 그 후에 새로운 시험관으로 spin column을 옮기고 elution buffer 30 μ L를 첨가 후에 상온에서 1분간 반응시킨 후에 원심분리하여 여과액을 회수하여 사용하였다.

5. 제한효소 단편길이 다형분석법(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

PCR 증폭 여부 및 크기가 확인된 PCR 산물에서 72번 아미노산의 변이를 확인하기 위하여 RFLP 분석법을 이용하였다. 정제된 PCR 산물 10 µL를 제한효소 BsrI(NEB, Beverly, MA, USA)으로 65°C에서 밤새도록 배양하여 PCR 산물을 완전히 절단시켰다. 절단된 DNA 단편을 확인하기 위하여 2% agarose 겔에서 전기영동 하여 각 개체의 유전자형을 결정하였다.

6. 중합효소 연쇄반응-단일가닥 구조 다형성(PCR-Single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP)

Biorad사의 mini gel 전기영동장치에 Mutation Detection Enhancement(MDET)(Htdrolink, AT biochem Inc., Malvern, USA) 겔을 장착하고 1×TBE buffer를 채운 후에 온도를 10°C로 맞추고 겔 전체의 농도가 안정화되도록 100 V에서 1시간 동안 전기를 흘려주었다. 그런 다음 PCR 산물 2 µL와 loading dye(95% formamide, 20 mM EDTA, 10 mM NaOH, 0.02% bromophenol blue, 0.02% xylene cyanol) 4 µL를 혼합하여 98°C에서 7분간 변성시키고 이 혼합물을 에탄올을 부어서 -70°C에서 보관한 얼음에서 2분 동안 급속냉각 시켜 100 V에서 약 3시간 동안 전기영동 시켰다. 전개가 끝난 후 조심스럽게 겔을 떼어내어 10% acetic acid 용액에서 30분간 고정시키고 증류수로 3회 세척하였다. 0.2% AgNO₃와 0.15% formaldehyde 용액에서 40분간 염색시키고, 3차 증류수로 수 초간 세척 후 3% NaNO와 0.15% formaldehyde 용액에서 약 5분 동안 발색시켰다. 밴드가 확인되면 3% acetic acid 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고 겔 건조기로 건조시킨다.

7. Amplification Refractory Mutation System(ARMS)

Ghrelin 단백질의 72번째 아미노산이 leucine(CTG)과 methionine(ATG)으로 구성되어 있는지를 확인하기 위하여 primer 1; 5'-cca gca gag aaa gga gtc gaa gaa gc-3'를 공통 sense primer로, 72번째 codon의 첫 번째 염기인 C 혹은 A를 3'-end에 갖는 primer 2; (wild(C) allele):5'-aga ggt acc gac ccg gac ttc cTg-3' 및 primer 3; (mutant(A) allele):5'-aga ggt acc gac ccg gac ttc cTt-3'를 antisense primer로 고안 제작하여 allele 특이산물이 생성될 수 있게 하였다.

각 검체에 대한 PCR은 정상 유전자 형(primer 1/2)과 돌연변이 유전자형(primer1/3)을 사용하여 각각 2개의 PCR 튜브로 별도로 수행하였다. PCR 반응액은 먼저 동결 건조된 ghrelin primer(각각 1,100 pmoles)에 primer suspension액 110 µL를 각각 첨가하여 잘 녹인 후 각각 2 µL를 이용하며, 40 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM dNTPs, 10X reaction buffer를 적당량 혼합하여 PCR master mix를 만든 후 4 µL를 사용하였고, 8-MOP 12 µL, 그리고 추출 DNA 2 µL를 첨가하여 잘 혼합한 후 총 20 µL의 반응액을 만들었다. PCR 반응은 thermal cy-

cler(Perkin Elmer 2400)를 이용하여 전변성반응(predenaturation)을 94°C에 10분간 시행하고, 변성반응 94°C/30초 및 결합반응 62°C/30초, 연장반응 72°C/30초 총 30회 시행한 후, last extension을 72°C/10분 시행하여 종료하였다. PCR이 끝난 뒤 각 튜브에 10-15분간 UV transilluminator를 조사하여 PCR 산물을 불활성화 시켰다. 증폭된 ghrelin 유전자를 확인하기 위해 PCR 산물 10 µL를 2% agarose 겔에서 100 V, 15분간 전기영동한 후 allele특이 산물(133 bp)을 통상의 방법으로 관찰하였다.

결 과

1. PCR-RFLP에 의한 ghrelin 유전자의 Leu72Met 변이검색

PCR-RFLP 분석을 위해 관련 유전자의 영역에 특정 염기서열을 포함하는 primer를 이용하여 ghrelin 유전자의 exon 2를 포함하는 207 base-pairs DNA 단편은 PCR 기술을 이용하여 만들어진 산물을 정제 후 제한 효소 BsrI를 처리하여 BsrI의 인지부위의 존재 여부에 따라 제한효소 좌위의 다형현상의 발현여부를 확인하였다. BsrI 제한효소를 처리한 결과 BsrI의 인식부위인 actggn이 exon 2에 있는 정상형인 C 대립유전자는 110 bp와 97 bp의 단편으로 절단되는 반면 돌연변이형인 A 대립유전자는 207 bp의 단편이 잘라지지 않는 상태로 발현되는 것을 알 수 있다. 따라서 호모상태의 C 대립유전자를 가진 개체는 110 bp와 97 bp만을 가지는 밴드 양상을 나타내며 C와 A 대립유전자간의 이형 접합체를 가진 개체는 207 bp와 110 bp와 97 bp를 보이며 A 대립유전자는 호모상태로 가진 개체는 207 bp의 밴드 양상을 보인다(Fig. 1).

2. PCR-SSCP에 의한 ghrelin 유전자의 Leu72Met 변이검색

PCR-SSCP 분석은 비정상적인 밴드 형태를 보이고 있다. 앞선 실험에서 확인된 정상 ghrelin의 정상형과 돌연변이형의 검체의 PCR-SSCP 전기영동 결과는 이동 결과가 다른 두개의 밴드를 보였다(Fig. 2). Lane 1의 돌연변이 형에서는 lane 3의 야생형보다는 빠른 이동을 보이고 있다. C와 A 대립유전자간의 이형 접합체를 가진 검체는 하나의 밴드가 겹쳐있는 3개의 비정상적인 이동 현상을 보이고 있다. Lane 3의 정상적인 ghrelin 유전자형을 가진 검체와 다른 비정상적인 이동도나 밴드양상을 보인 검체는 exon 2 부분의 점 돌연변이를 가진 검체로 사료된다.

3. ARMS에 의한 ghrelin 유전자의 Leu72Met 변이검색

ARMS의 원리는 유전자의 정상형과 돌연변이형에 해당하는 primer를 각각 넣고 PCR를 시행하면 둘 중 하나에서 PCR 산물이 검출된다는 사실에 기초를 둔다. 따라서 호모상태의 C 대립유전자를 가진 검체는 PCR tube 1(primer 1/2, wild type; Leu72Leu)에서만 PCR 반응이 일어난 allele 특이산물의 밴드가

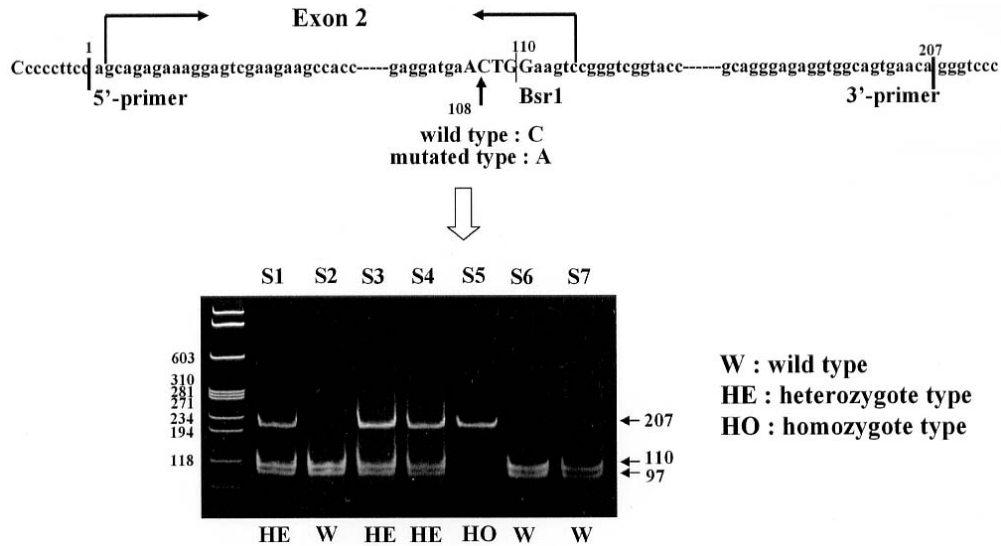


Fig. 1. Leu72Met polymorphism analysis of ghrelin gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). The PCR products of homozygous wild type of ghrelin gene digested with restriction enzyme, BsrI, which recognizes the sequence of 5actggn3, displayed two bands of 110 and 97 bp, while in the homozygous mutated type, the products showed one band of 207 bp, and the heterozygotes contains all 3 bands(97, 110, and 207 bp). Genomic DNA was obtained from 7 obese children(s1-S7). W : wild type, M : mutated type, HO : homozygote type, HE : heterozygote type.

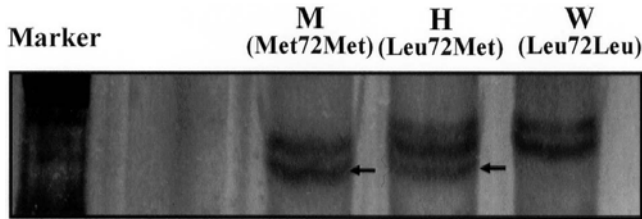


Fig. 2. Leu72Met polymorphism analysis of ghrelin gene by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism(PCR-SSCP). Aberrantly migrated DNA bands of mutated ghrelin were showed, which are indicated by arrows. Genomic DNA was obtained from 3 obese children. W : wild type, M : mutated type, H : heterozygote type.

관찰되고 A 대립유전자는 호모상태로 가진 검체는 PCR tube 2 (primer 1/3, mutant type; Met72Met)에서만 allele 특이산물의 밴드가 관찰되며 C와 A 대립유전자간의 이형 접합체를 가진 검체는 PCR tube 1, tube 2 모두에서 PCR 반응이 일어난 allele 특이산물의 밴드가 관찰되었다(Fig. 3). 본 실험에서 검체를 대상으로 시행한 PCR-RFLP와 ARMS법에 의한 ghrelin 유전자형 검사 결과는 일치하였다.

고 찰

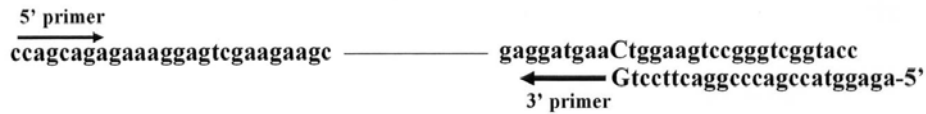
Ghrelin은 growth hormone secretagogue(GHS) 수용체의 내인성 리간드로 처음 발견되었다¹⁾. 그러나 ghrelin은 강력한 성장호르몬 분비 촉진인자로서의 역할 외에도 인슐린과 당대사에

관여하며 에너지 대사에도 관여하고 있음이 최근의 연구에 의해 밝혀졌고¹¹⁾, 특히 질환과 관련하여 아직까지 명확하게 규명된 것은 아니지만 비만, 고혈압, 2형 당뇨병 등에서 ghrelin의 유전자 변이가 관련이 있음이 밝혀지고 있다³⁻⁵⁾.

Ghrelin의 유전자는 사람의 3번 염색체 장완(3q25-26)에 위치하고 있으며 4개의 exon으로 구성되어 117개의 아미노산으로 된 preproghrelin을 코딩하고, 이 preproghrelin이 28개의 아미노산으로 된 ghrelin으로 octanoylation이 되어 활성화된다는 것이 밝혀져 있다¹²⁾. 현재까지 보고된 preproghrelin 혹은 ghrelin 유전자 이상으로는 single nucleotide polymorphism(SNP)인 Arg51Gln, Leu72Met, G274A 등이 있다. 이 중 가장 흔한 이상인 Leu72Met 변이는 변이를 동반하지 않는 경우에 비해 비만이 시작되는 시기가 빠른 것으로 알려져 있다. 또한 비만한 아이의 경우에는 비만 정도가 심하고 당에 의해 유발된 인슐린 분비가 적다고 하였다³⁾. 활성형 ghrelin의 마지막 아미노산의 이상인 Arg51Gln 변이가 있는 경우에 20-40대의 체중이 변이가 없는 비만군에 비해 의미 있게 낮았다. 또한 이 변이가 성인에서 2형 당뇨병과 고혈압의 위험인자라는 보고가 있다⁵⁾. Prader-Willi(PW) 증후군 환자에서는 ghrelin의 농도가 현저히 증가되는데 이는 PW 증후군의 특징인 다식증이 비정상적으로 높은 ghrelin에 기인될 수 있음을 암시해준 소견이다¹³⁾. 따라서 성장장애, 비만, PW 증후군, 심혈관 질환, 인슐린 및 당 대사 장애 등의 여러 질환에서의 ghrelin의 역할을 규명하기 위하여 많은 질환으로부터 유전자 변이분석이 절실히 필요하다.

분자생물학적 기법의 발달로 인하여 PCR로 증폭된 DNA 단

W : wild type



M : mutated type

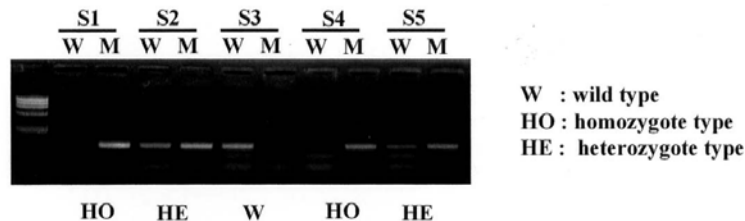
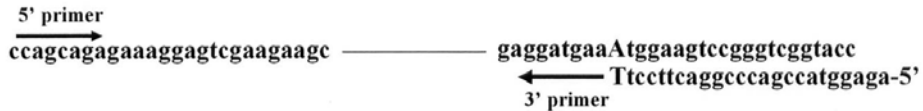


Fig. 3. Primer pairs used for ghrelin screening by amplified refractory mutation system (ARMS) and Leu72Met polymorphism analysis of ghrelin gene by ARMS. Genomic DNA was obtained from 5 obese children(S1-S5). W : wild type, M : mutated type, HO : homozygote type, HE : heterozygote type.

편을 이용한 여러 가지 돌연변이의 분석 방법은 DNA 염기서열의 변화를 찾아내는데 적용되었다. PCR 산물을 직접 염기서열 분석법을 이용할 수 있지만 일반적인 유전자변이를 알아내는 방법은 그 변이의 종류와 위치, 염기서열을 알지 못하는 경우와 변이의 종류나 위치를 알고 있는 경우로 나누어진다. 전자에는 하나의 염기가 변이된 DNA가 전기영동 시 이동 차이를 보이는 PCR-SSCP, 열 변성 후 다시 재 annealing 시켜 비 변성 폴리 아크릴라마이드 겔에서 전기영동 시 homoduplices와 heteroduplices간에 이동 차이를 보인다는 heteroduplex analysis (HA), 폴리 아크릴라마이드 겔의 변성 차이(denaturing gradient), 온도 차이에 따라 변이를 갖는 DNA 단편은 대조 duplex와 비교하면 변화를 보여주는 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)와 temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) 방법, heteroduplex내의 mispaired nucleotide를 화학물, 효소 등으로 분해하여 전기영동 상 차이를 보는 chemical cleavage method(CCM), enzyme mismatch cleavage (EMC), RNA probe를 사용하여 RNA-RNA hybrid를 만든 후 RNA 가닥의 mismatch로 인하여 결합이 되지 않은 부위를 RNase를 사용하여 단일 가닥 RNA만을 절단하는 Rnase A mismatch cleavage, 단일 가닥의 DNA가 변성된 후 다시 접힐 때 구부러지며 hairpin 모양의 2차구조가 형성되는데, 점돌연변이가 있으면 이 2차구조가 변화되어 cleavage I endonuclease로 hairpin loop의 5'를 절단할 때 다른 양상을 보이는 것을 이용한

cleavage fragment length polymorphism(CFLP)법¹⁴⁾, 점돌연변이 혹은 격자이동(frameshift) 돌연변이에 의해 형성된 stop codon에 의해 결국 전환된 단백질의 크기가 작아지는 원리를 이용한 protein truncation test(PTT) 등이 있다¹⁵⁾. SSCP와 HA 분석법이 이들 스크리닝 검사법 중 가장 단순하다. 후자의 경우는 DNA내의 제한효소 인식부위가 제한효소에 의해 선택적으로 잘려지면 다양한 핵산조각을 전기영동 상에서 확인 할 수 있는 RFLP, 교잡반응 시 하나의 염기가 mispairing될 때 용해 온도가 감소되는 차이를 이용한 ASO⁷⁾나 primer의 3'-end가 모형 DNA의 염기서열과 완전히 일치하지 않으면 primer가 연장이 되지 않는 것을 이용한 ARMS⁸⁾나 PCR amplification of specific alleles(PASA) 등이 있다¹⁵⁾.

그동안 많이 사용되어 왔던 PCR-RFLP는 제한 효소(restriction endonuclease) 처리에 의한 DNA 단편의 길이 차이를 확인하여 SNP를 구분하는 방법이다. 즉 분석하고자 하는 유전자 부위를 PCR로 증폭한 후, 증폭된 DNA를 제한효소로 절단시켜 단편 상에 존재하는 SNP 부위가 특정 제한효소에 의하여 인식 부위가 있는 것을 알아본다. 증폭된 DNA의 SNP에 의하여 특정 제한효소의 인식부위가 새로 생성되거나 또는 현존하는 제한 효소 인식부위가 소실되어 제한효소에 의한 DNA의 단편 양상이 달라지고 이것은 전기영동을 통하여 agarose 겔에서 쉽게 확인할 수 있다. 현재는 많은 종류의 제한효소가 시판되고 있고 원하는 염기서열에 작용하는 인식부위를 찾아주는 소프트웨어가

무료로 제공되고 있어 손쉽게 이용할 수 있다. 이 방법의 장점으로는 써던 블롯팅을 이용한 기존의 RFLP 방법보다는 쉽고 간편하며, 이형접합체의 확인이 용이하며, 30-40%의 SNP는 제한효소의 인식부위를 가지고 있지 않은데 이를 해결하기 위해서 primer상에 1-2 bp의 변화를 주어 실제하지 않는 절단 부위를 만들어 이용하는 방법도 고안할 수 있다¹⁶⁾. 이 방법의 가장 큰 단점은 DNA 염기서열 변이가 제한효소 인식부위의 변화를 초래하는 경우에만 이용될 수 있다는 것이다. 따라서 RFLP 분석법은 DNA 다양성 부위에 제한효소가 작용하는 염기서열이 존재하거나 염기서열이 이미 알려진 유전자의 변이 등을 구분하는데는 매우 유용하지만 새로 변이된 유전자를 조사하는데 한계가 있다¹⁵⁾. 본 실험에서도 ghrelin 유전자의 exon 2를 포함하는 207 base-pairs DNA 단편은 PCR로 증폭하여 BsrI 제한효소를 이용한 PCR-RFLP법은 비교적 용이하고 간단하여 널리 쓰이는 방법이지만 충분한 고농도의 DNA가 필요하며 전기영동 결과의 올바른 해석이 이루어지기 위해서는 PCR 증폭 산물에 대한 제한효소의 완전한 소화가 있어야 되는데 이러한 조건을 만족하지 않으면 정확한 ghrelin 유전자형 검사가 불가능하다는 문제점이 있어 제한효소의 적정 환경을 위하여 65°C에서 밤새도록 배양하여 완전 소화를 유도하였다.

돌연변이 분석법 중에서 PCR로 증폭한 후 직접 염기서열 분석법이 가장 정확하나 이는 시간과 비용이 많이 들어 PCR-SSCP 분석법이 가장 많이 사용된다⁶⁾. 그러나 기존의 SSCP 분석법은 동위원소를 이용한 것이어서 이로 인한 인체에 미치는 방사능의 피해, 약 48시간이 소요되는 긴 실험시간, 결과 판독의 어려움 등이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 Cold-SSCP의 방법으로 변형되었다¹⁷⁾. 이 방법은 동위원소를 사용하지 않고 소형의 겔판을 이용하고 밴드가 동위원소를 이용한 것보다 선명하여 최근에는 많이 이용되고 있다. 이 방법은 DNA 단편의 뉴클레오티드 염기서열에 의한 단일가닥 DNA 분자들이 비변성 조건(nondenaturing condition)하에서 독특한 3차원적 구조를 형성하는 성질에 기초를 두고 있다. 분석하고자 하는 유전자를 PCR로 증폭하여 이 PCR 산물을 알칼리나 열로 변성시킴으로써 두 가닥 DNA를 단일 가닥 DNA로 만든 후 급속히 냉각시켜 이 산물을 비변성 폴리아크릴라마이드 겔을 이용하여 전기영동한 다음, 겔을 silver 염색하여 변이를 확인한다. 알칼리나 열로 변성시킨 후 얼음 속에서 급속히 냉각하면 단일 가닥 DNA는 각각의 염기서열 차이에 따라 고유한 3차원적 구조 형태로 바뀌게 된다. 따라서 돌연변이에 의해 하나의 염기가 변해도 전체적인 구조가 변한다. 그 결과 단일 가닥 DNA의 전기영동 시 이동속도의 차이를 보이므로 돌연변이를 확인 할 수 있다. 이 방법을 이용하면 감수성과 특이성이 높아 기존의 RFLP 방법으로 확인 불가능한 변이까지 간편하고 신속하게 검출할 수 있고 PCR에 의해 증폭된 많은 DNA 단편에서 하나의 염기가 치환되어 있는 것을 포함한 염기서열 변화의 검색이 가능하게 되었다⁶⁾.

이 방법의 장점으로는 ① 사용이 간편하고 ② 특수 장비가

필요치 않으며 ③ 정상형으로 부터 돌연변이 밴드를 분리하여 분석이 가능하고 ④ 동위원소를 사용하지 않는다는 점이다. 그러나 단점으로는 ① 단편의 크기가 제한되어 분석할 PCR 산물의 크기가 200 bp보다 큰 경우 감지 할 수 있는 변이의 민감도가 크게 떨어지며 ② 모든 변이를 발견하기 위하여 각기 다른 조건이 설정되어야 하며 ③ 가끔은 겔의 해석이 어렵다 ④ 미지의 염기서열에서는 덜 이용된다⁹⁾.

SSCP 기술상의 몇 가지 영향을 받는 요소를 살펴보면 첫째 DNA 가닥의 변성이 완전하지 못하면 판독이 매우 어렵기 때문에 완전 변성이 매우 중요하다. 처음 변성은 거의 denaturing agent(eg, formamide, methylmercuric hydroxide, sodium hydroxide, urea) 존재 하에서 고열로 수행한다. 이중 formamide가 가장 많이 사용되며 잘 변성이 된다. 이때 주의점은 formamide나 urea 같은 denaturing agent의 농도가 5% 정도로 낮아야 겔출률이 높아진다. 둘째는 SSCP의 감수성을 높이기 위하여 전기영동 상 영향을 미치는 인자는 ① 겔 기질(gel matrix)의 구성요소 ② DNA 단편의 크기 ③ 완충액의 구성성분 이온의 강도와 pH ④ 글리세롤 같은 완충액의 첨가물 ⑤ 겔의 온도 ⑥ DNA 농도 ⑦ 절편의 G+C의 함량 등이 있다⁹⁾.

PCR 산물의 크기가 200 bp 정도 될 때 70%-95% 가량의 유전자 변이를 검색하는 효율을 가지나 타겟의 크기가 증가할수록 변이의 검출률이 감소한다⁹⁾. 전기영동 완충액 역시 농도가 낮으면 이동상의 변화가 불분명하게 된다. 또한 겔에 10% 글리세롤을 추가하면 이동상의 속도가 상당히 느려져 밴드 분포에 영향을 미치는데 경우에 따라서 DNA 다형성에 의한 이동 변위가 더욱 분명해지기도 한다. TBE 완충액에 글리세롤을 첨가하게 되면 완충액의 pH가 낮아지게 되는데 핵산인의 전기적 반발력이 감소되어 밴드가 치밀해져 구분이 어렵다⁹⁾. 전기영동 중 겔의 온도가 17°C가 유지되면 분명한 이동상의 변화를 볼 수 있으나 23°C로 증가되면 밴드 모양이 분명히 분리되지 않는다. Hongyo 등¹⁸⁾은 10°C에서 가장 선명한 밴드를 볼 수 있다고 하여 전기영동과정 중 높은 전압에 의한 열이 발생하면 열에 의해 단일 가닥 DNA 분자의 형태가 불안정해져 밴드를 관찰할 수 없기 때문에 겔의 온도를 일정하게 유지해 주는 냉각시스템이 필요하다. 단일 가닥이 두 가닥으로 reannealing 되는 것을 막기 위하여 로딩하는 DNA의 농도가 낮아야 한다⁹⁾. 위와 같이 전기영동에서 적절하게 밴드를 구분하기 위해서는 겔의 상태와 성분 그리고 전기영동의 조건 등이 중요하다. 이런 최적 조건은 염기서열과 직접 연관이 있기 때문에 각각의 PCR 산물에 해당하는 최고의 효율을 얻을 수 있는 조건을 찾을 필요가 있다. 본 연구에서는 다양한 농도의 폴리아크릴라마이드 겔에서 글리세롤을 다양한 농도로 섞어 보았고 전기영동의 조건도 다양하게 바꿔 보았으나 밴드의 구분이 용이하지 않았다. MDETM 겔을 사용하면서 밴드가 비교적 뚜렷하게 구분되었고, 이후 동일한 겔 성분과 동일한 조건에서 전기영동 하였다. SSCP 분석 결과, 정상과 돌연변이 시료사이에 밴드 상의 뚜렷한 차이를 보였다. 하

지만 보다 좋은 조건을 만들기 위하여 PCR 생성물을 정제하여 야하고, 전기영동에 4시간 silver 염색에 3시간이 소모되며 실험자의 실험에 대한 숙련도에 따라라도 결과의 차이를 보이는 문제점이 있다.

ARMS의 원리를 살펴보면, PCR을 두 가지 반응으로 각각 시행해야 하는데, 첫 번째 반응에서는 정상형 염기서열에 상보적인 5' primer를 사용하고 다른 두 번째의 반응에서는 돌연변이나 다형성에 대해 상보적인 5' primer를 사용한다. PCR 산물은 당연히 타겟 DNA의 염기서열과 primer가 일치할 때 생성된다. 따라서 돌연변이 DNA나 정상형 DNA 중의 하나만 증폭하게 된다. 이는 PCR에 이용되는 Taq DNA 중합효소의 3'-exonuclease proofreading activity가 없는 것에 기초를 두고 있는데¹⁹⁾, 이는 primer의 3'-end의 염기가 타겟 DNA의 염기와 일치하지 않으면 PCR 중 DNA 중합효소에 의한 primer 연장에 불응화(refractoriness)가 생긴다는 점을 이용한 것이다⁸⁾.

Taq 중합효소를 이용한 ARMS법의 시행 시 primer 연장의 불응화 정도는 purine/purine 혹은 pyrimidine/pyrimidine의 mismatch가 purine/pyrimidine의 mismatch보다 더 큰 것으로 알려져 있다. Wenham 등²⁰⁾은 ARMS를 이용한 apo E 유전자 다형성의 분석에서 primer의 3'-end와 대응하는 모형 DNA의 염기의 mismatch가 G/T 혹은 A/C의 purine/pyrimidine mismatch이므로 primer의 3'-end로부터 두 번째 염기인 G를 T로 치환하여 primer의 allele 특이성을 높였다고 보고하였다. 이에 저자들은 primer의 allele 특이성을 높여 ghrelin 유전자형을 판별하고자 primer의 3'-end로부터 첫 번째 염기를 mismatched 염기로 치환한 3개의 primer를 이용한 ARMS 방법을, 실용적이고 경제적이면서 검사실에서 대량검체를 쉽게 처리할 수 있는 ghrelin 유전자형의 판별방법에 이용하고자 하였다.

ARMS의 감수성을 증가시키기 위하여 PCR 반응에서 dNTP, 마그네슘 그리고 primer 농도를 감소시켜야 하며, 혹은 단순히 annealing/extension 온도가 증가하도록 primer를 제작한다. 역으로 말하면 이 시약들의 농도가 증가하거나 annealing/extension 온도가 감소하면 잘못된 결과로 판독 오류가 생길 가능성이 있다⁸⁾. 따라서 본 실험에서도 annealing/extension 온도의 차이에 따라 결과가 차이가 있어 판독오류가 생길 수 있으므로 분석 전에 RFLP 등으로 확인된 시료를 대상으로 재현성 실험을 확인한 뒤 가장 좋은 조건을 확립 후 시료를 분석해야 하는 단점이 있으나 일단 가장 정확한 조건이 확립되면 PCR-RFLP의 결과와 모두 일치하였다. ARMS법은 PCR과 agarose 겔 전기영동의 두 단계로 결과를 판독할 수 있어 술식이 간단하고 시간소요가 적고, 분석하려는 DNA의 최소 양으로 실행할 수 있으며, RFLP처럼 고품질의 DNA 준비가 필요치 않으며, 대량검체에 적용할 수 있다는 장점이 있다⁸⁾.

따라서 본 실험에서 시행한 ghrelin의 Leu72Met 유전자의 돌연변이를 확인하는 방법 중 PCR-SSCP 방법은 점돌연변이의 존재 여부를 많은 시료를 대상으로 쉽게 분자학적 스크리닝 할

수 있는 장점이 있으나 조작이 간단하지 않고 비용부담이 많다. BsrI 제한효소를 이용한 PCR-RFLP법은 비교적 용이하고 간단하여 널리 쓰이는 방법이지만 충분한 고농도의 DNA가 필요하며 전기영동 결과의 올바른 해석이 쉽지 않았다. 이에 비하여 ARMS 분석법은 위의 방법들보다는 간편하여 검사의 소요시간도 짧으며, 검출률이 높고 결과 해석이 매우 쉬워 대량 검체에 적용에 매우 효과적으로 사료된다.

요 약

목적 : 성장호르몬 분비를 촉진하는 ghrelin는 여러 질병에서의 역할은 아직까지 잘 알려져 있지 않았다. 그러나 최근에 ghrelin 유전자 변이가 비만과 당뇨병과 관련이 있는 것으로 알려졌다. 현재까지 보고된 ghrelin 유전자 이상으로는 SNP인 Arg51Gln, Leu72Met, G274A가 있으며 이중 가장 흔한 이상인 Leu72Met 변이이다. 일반적으로 ghrelin 유전자의 Leu72Met와 같은 diallelic 다형성을 스크리닝하는데 SSCP, RFLP, sequencing 등이 사용되어 왔으나 향후 비만 환자들에서 가장 효과적이고 정확하게, 손쉽게 ghrelin 유전자의 Leu72Met 다형성 분석을 검출할 수 있는 스크리닝 방법을 찾아 임상적 적용에 이용하고자 하였다.

방법 : 비만소아에서 ghrelin 유전자의 Leu72Met 다형성 분석을 PCR-RFLP, PCR-SSCP와 ARMS 분석 방법을 이용하여 비교분석하고 이들의 검사방법의 장단점을 알아보았다.

결과 : PCR-RFLP, PCR-SSCP와 ARMS 분석 모두에서 allele 특이산물의 밴드가 뚜렷이 구별할 수 있었으며 상기 방법에 의한 결과는 모두에서 일치하였다. PCR-SSCP 방법은 점돌연변이의 존재 여부를 많은 시료를 대상으로 쉽게 분자학적 스크리닝할 수 있는 장점이 있으나 조작이 간단하지 않고 비용부담이 많다. BsrI 제한효소를 이용한 PCR-RFLP법은 비교적 용이하고 간단하여 널리 쓰이는 방법이지만 충분한 고농도의 DNA가 필요하며 전기영동 결과의 올바른 해석이 쉽지 않았다. 이에 비하여 ARMS 분석법은 위의 방법들보다는 간편하여 검사의 소요시간도 짧으며, 검출률이 높고 결과 해석이 매우 쉬웠다.

결론 : 따라서 본 실험에서 시행한 ghrelin의 Leu72Met 유전자의 다형성을 결정하는 방법 중에는 ARMS 분석법이 정확하고 검사 분석법 및 결과 해석이 매우 쉽고 검사의 소요시간도 짧아 대량 검체에 적용에 매우 효과적으로 사료된다.

References

- 1) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999;402:656-60.
- 2) Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct en-

- doctrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-61.
- 3) Korbonits M, Gueorguiev M, O'Grady E, Lecoeur C, Swan DC, Mein CA, et al. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4005-8.
 - 4) Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Snyder EE, Changnon M, Sjöström L, et al. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3996-9.
 - 5) Pöykkö S, Ukkola O, Kauma H, Savolainen MJ, Kesaniemi YA. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia* 2003;46:455-8.
 - 6) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.
 - 7) Weisgraber KH, Newhouse YM, Mahley RW. Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:1212-7.
 - 8) Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989;17:2503-16.
 - 9) Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 1999;20:1177-85.
 - 10) Hinney A, Hoch A, Geller F, Schafer H, Siegfried W, Goldschmidt H, et al. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2716.
 - 11) Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:240-4.
 - 12) Wajnrajch MP, Ten IS, Heiman ML. Genomic organization of the ghrelin gene. *J Endo Gen* 2000;1:231-3.
 - 13) DelParigi A, Tschöp M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, et al. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5461-4.
 - 14) Oldenburg MC, Siebert M. New Cleavase Fragment Length Polymorphism method improves the mutation detection assay. *Biotechniques* 2000;28:351-7.
 - 15) Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem* 1997;43:1114-28.
 - 16) Friedman KJ, Highsmith WE Jr, Prior TW, Perry TR, Silverman LM. Cystic fibrosis deletion mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem* 1990;36:695-6.
 - 17) Calvert RJ, Weghorst CM, Buzard GS. PCR amplification of silver-stained SSCP bands from cold SSCP gels. *Biotechniques*. 1995;18:782-4.
 - 18) Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3637-42.
 - 19) Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988;27:6008-13.
 - 20) Wenham PR, Newton CR, Price WH. Analysis of apolipoprotein E genotypes by the Amplification Refractory Mutation System. *Clin Chem* 1991;37:241-4.