

다중 중합효소연쇄반응을 이용한 핵산시료의 동정방법

박화용* · 유현주

한국한의학연구원 의료연구부

Simple Identification of DNA Samples Using Multiplex PCR

Hwa Yong Park*, Hyun Joo Yu

Department of Medical Research, Korea Institute of Oriental Medicine

Serious controls and cares using ID numbers and barcode needed throughly to have appropriate management in clinical tissues and nucleic acids inventories because these samples are the most essential and important materials in the experimental research laboratories. While almost all of the laboratories using and handling DNA samples as starting materials in their research, problems such as mixing up of two or more different samples together, contamination with other samples, and/or mistakes can occur, especially when it comes with large number of samples. These problems are rather frequent even though researchers pay more attentions to be far away from these obstacles. It has been such a long time since PCR became useful as an important and essential biological research tool among lots of bio-scientific research methods. In this research, we tried to set up a simple and cost-effective genotyping method using PCR and agarose gels, instead of expensive automated machines, for identification and discrimination among those DNA samples, as a kind of low level quality control and sample inventory management.

Key words : Multiplex PCR, Gender Genotyping, STR

서 론

중합효소연쇄반응이라고 불리는 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법은 1983년 Kary Mullis에 의해 고안되어 현재는 생명과학 연구 분야에서 없어서는 안 될 필수적인 방법이 되었으며 관련 시약과 상품의 개발로 이제는 더 이상 어렵고 복잡한 것이 아니다. 이는 1960년 대장균에서 제한효소(restriction enzyme)가 발견된 이후 현재까지 생명과학분야 최고의 발명으로 인정되고 있으며 생명과학, 의학연구와 진단 뿐 아니라 법의학, 식품, 환경위생, 동식물 검사 등의 분야에까지 다양하게 이용되고 있다. 분자생물학적 연구에서 DNA를 시료로 이용하는 경우 PCR 방법은 기본적인 필수적인 요구사항이 되었는데 수많은 시료를 대상으로 하는 경우 시료가 서로 뒤바뀌거나 다른 피험자 DNA와의 섞임, 또는 혼합이 발생하는 문제가 실제 연구현장에서 발생하고 있다. 특히 조직으로부터 DNA를 추출하는 과정, 또는 추출된 stock DNA를 희석하여 working DNA로 분주

하는 과정, 또는 공동연구를 위한 분양과정 등에서 이 같은 문제가 발생할 우려가 크다. 따라서 stock DNA와 working DNA가 서로 같은지를 확인할 필요가 있으며, 또한 혼합 여부도 실험적으로 판단하여야 할 상황이 생긴다. 인간의 조직이나 많은 수의 genomic DNA를 연구시료로 사용하는 연구분야에서는 더욱 그러한데 모든 한의학분야가 인간을 대상으로 하고 있으며 또한 현재 활발한 연구가 많은 연구자들에 의해 진행되고 있으며 이를 위한 한의학의 과학적 연구를 위해서는 인간의 조직이나 DNA가 연구시료로 활용되는 경우가 매우 많다. 특히 진료 및 진단의 정확성과 객관성 및 신뢰성을 확보하기 위한 연구, 또는 임상연구 등에서는 수많은 피험자를 대상으로 하여야 하며 이와 관련된 생명과학적 연구에 있어서는 시료의 철저한 관리가 이루어져야 함은 당연하다. 현재 PCR과 관련된 시약 및 장비는 충분히 개발되어 있고, 특히 자동염기서열 분석장치와 multiplex PCR kit를 이용하면 많은 수의 시료를 매우 정확하게 genotyping 할 수 있는데 이와 같은 장비는 친자확인이나 유전자 감식과 같은 법의학 분야에서 매우 유용하고 그 결과의 신뢰도는 모든 연구자들이 인정하고 있는 상황이다. 그러나 이런 장비를 운용하기 위해서는 많은 비용과 전문 인력이 필요하고 또

* 교신저자 : 박화용, 대전시 유성구 전민동 엑스포로 483 한국한의학연구원

· E-mail : uofaz@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9556

· 접수 : 2008/03/06 · 채택 : 2008/04/04

한 많은 수의 시료를 매일 분석하는 정도의 연구업무량이 있는 규모의 연구실이 아닌 곳에는 적합하지 않다. 장비를 유지하기 위한 소모품과 시약, 그리고 genotyping kit와 시약이 고가이기 때문에 더욱 그러하다. 본 연구에서는 고가의 자동 분석 장치나 분석 시약, 또는 kit 등을 사용하지 않으면서도 연구실에서 흔히 사용되는 PCR 방법과 관련시약을 이용하여 agarose gel 상에서 쉽고 간편하게 시료를 동정할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 PCR primer의 명칭과 sequence는 Table 1에 요약하여 설명하였다.

Table 1. PCR primers used in this study.

Primer	Sequences	PCR Product
AluXY	F: 5'-TGAAGAAATTCAGTTCATAGCTTGT-3' R: 5'-CAGGAGATCCTGAGATTATGTGG-3'	X chr. 878bp Y chr. 556bp
Penta E	F: 5'-ATTACCAACATGAAAGGGTACCAATA-3' R: 5'-TGGGTATTAAATTGAGAAAACCTCTACAATTT-3'	379~474bp
D8S1179	F: 5'-ATTGCAACTTATATGTATTTTGTATTTTCATG-3' R: 5'-ACCAAATTGTGTTTCATGAGTATAGTTC-3'	203~247bp
VWA	F: 5'-GCCCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATGTG-3' R: 5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'	123~171bp

Primer AluXY was synthesized according to the reference 3, and the other three primers synthesized using Promega PowerPlex® 16 information in the reference 4. F and R means forward and reverse primers, respectively.

Marker AluXY는 성별을 판별하기 위한 것이고 나머지 세 가지는 유전자 감식과 친자확인 등에 사용되는 microsatellite marker이다. Multiplex PCR에 앞서 네 가지의 PCR을 따로 시행하여 각각의 최적 PCR 조건을 찾았다. PCR 기기는 MJ Research사의 PTC-200 gradient cycler를 사용하였으며 남성의 genomic DNA 20ng을 주형으로하여 forward와 reverse primer 각각 0.1μM, dNTP 100μM, polymerase(TaKaRa EX Taq) 1 unit, 그리고 TaKaRa EX Taq Buffer는 최종 1×가 되게 넣고 total reaction volume 15μl에서 반응시켰다. PCR 조건은 initial denaturation 95℃ 3분, 그리고 denaturation 94℃ 1분, annealing 50℃~60℃ 1분, elongation 72℃ 1분으로 구성된 중합반응을 40 cycle 반복한 다음 final extension은 72℃에서 10분간 시행하였다. PCR product의 확인은 Cambrex 회사의 NuSieve 3:1 agarose와 0.5× TBE buffer를 사용하여 제조한 12.5×6cm크기의 4% gel을 Mupid® 전기영동 기기(일본 ADVANCE사)에서 running(2.5V/cml)하였는데, loading dye 중의 bromophenol blue dye가 gel에서 빠져나간 직후까지 running하고 ethidium bromide 염색하여 UV로 관찰, 사진촬영 하였다. 전기영동에 있어 gel buffer와 tank buffer는 모두 0.5× TBE buffer를 사용하였다. 각각의 PCR product를 성공적으로 얻을 수 있음을 확인하고, 이제는 이들 네 가지 종류의 primer를 하나의 tube에 넣고 한번의 PCR 반응으로 네 가지 서로 다른 product를 동시에 얻을 수 있는 최적의 multiplex PCR 반응 조건을 잡는 과정이 필요하다. PCR 반응에 필요한 여러 요소들의 양과 비율에 따라 결과는 지극히 다양하게 나타난다. 특히 네 가지 primer 각각의 양과 서로의 비율에 따라 매우 다양한 PCR product band pattern을 나

타내며 따라서 최적의 조건을 찾기 위해서는 반복적인 실험과 수정 보완이 필요하게 된다. 최적화된 multiplex PCR 반응 조건은 다음과 같다. Template genomic DNA (농도 10 ng/μl) 30 ng, AluXY primer 0.02 μM, Penta E primer 0.02 μM, D8S1179 primer 0.05 μM, VWA primer 0.07 μM, dNTP 250 μM, polymerase(TaKaRa EX Taq) 1.5 unit, 그리고 TaKaRa EX Taq Buffer는 최종 1.5×가 되게 넣고 최종 reaction volume 15 μl에서 반응시켰다. PCR의 온도와 시간 등의 조건은 initial denaturation 95℃ 3분, 그리고 denaturation 94℃ 1분, annealing 60℃ 1분, elongation 72℃ 1분으로 구성된 중합반응을 40 cycle 반복한 다음 final extension은 72℃에서 10분간 시행하였다. PCR product의 확인은 위에서와 같은 agarose gel 전기영동으로 하였다. 전체적인 multiplex PCR 방법의 구성과 최적 실험방법의 구축은 Henegariu 등의 방법을 참고하였다.^{1,2)}

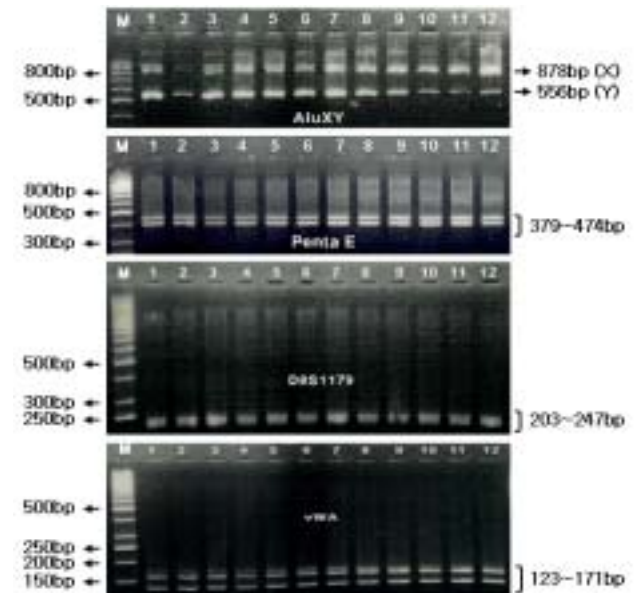


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR optimization products using gradient annealing temperature range of 50℃ (lane 1) ~ 60℃ (lane 12). M denotes 50bp DNA ladder marker.



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of multiplex PCR product of 8 different DNA samples. Note that these band patterns are differ each other. M denotes 50bp DNA ladder marker. Sample number 1, 5, and 8 are different males, and number 2, 3, 4, 6, and 7 are different females.

결 과

네 가지의 marker에 대하여 각각의 PCR 조건을 관찰하기 위하여 시도한 결과는 Fig. 1과 같다. PCR 조건을 잡기 위한 초

기 실험에서는 흔히 gradient PCR 방법을 많이 이용하는데 이는 최적의 annealing 온도를 찾기 위함이다. 본 연구에서는 annealing 온도를 50~61°C 범위의 temperature gradient에서 시도하였으며 결과적으로는 이 범위의 모든 온도에서 PCR product를 얻었다. Column별 온도는 column 1번에서 12번까지 순서대로 50.0, 50.3, 51.0, 51.8, 53.1, 54.7, 56.6, 58.2, 59.3, 60.2, 60.8, 61.0°C 이었다. AluXY PCR에서는 서로 다른 DNA 시료일 지라도 모든 시료에서 남성 DNA인 경우에는 X 염색체와 Y 염색체의 두 가지를 갖기 때문에 X 염색체에 해당하는 878 base pair(bp)와 Y 염색체에 해당하는 556bp의 두 개 band를 관찰할 수 있으며, 여성인 경우에는 성염색체의 구성이 XX이기 때문에 878bp의 한 개 band만 관찰된다. 나머지 세 가지의 marker에 대한 PCR product들 모두 예상대로 일정한 크기 범위 내에서 관찰할 수 있었는데 Penta E marker의 경우에는 379~474 bp, D8S1179는 203~247 bp, VWA는 123~171 bp의 범위 내에서 관찰되어 PCR 반응이 성공적으로 진행되었음을 알 수 있다. 이들 세 가지 PCR product의 크기가 일정 범위 내에서 다양하게 다른 이유는 반복염기서열(microsatellite repeat)의 수가 사람에 따라 다르기 때문이다. AluXY를 제외한 나머지 세 가지 microsatellite marker는 유전자 감식과 친자확인에 사용되며 법의학에서도 세계적으로 공인되어 사용되고 있는 Promega의 PowerPlex® 16 System에 포함된 16개 marker 중에서 서로 중복되지 않도록 PCR product의 크기가 다른 marker들을 선택하여 본 연구에 활용하였다. 염기서열 자동분석장치를 이용할 경우는 PCR product의 크기가 같더라도 primer를 서로 다른 형광염색으로 labeling하면 구분되어 볼 수 있지만 본 연구에서는 agarose gel 상에서 관찰이 가능하게 하기 위하여 product의 크기가 중복되지 않도록 구성한 것이다. 네 가지 각각의 PCR 반응의 조건을 확인한 후 네 가지의 primer를 모두 하나의 tube에 넣고 반응시키는 multiplex PCR 반응의 최적 조건을 잡는 과정이 필요한데 이 multiplex 반응역시 annealing 온도 50~60°C 범위에서 시도하여 최종적으로는 60°C로 정하였다. Fig. 2는 이 과정을 통해 얻은 최적화된 multiplex PCR 방법을 이용하여 8 가지 각각 다른 DNA 시료로 시험해 본 결과이다. 그림에서 보듯이 1, 5, 8번 lane의 시료는 AluXY의 위치에 band가 두 개씩 있으므로 남성의 DNA 시료임을 알 수 있고, 나머지는 band가 한 개씩 존재하므로 여성의 DNA임을 알 수 있다. 또한 시료 DNA가 남성인지 여성인지의 구분이 가능하고, 같은 시료인지 다른 시료인지의 판단도 가능하다. 그리고 Fig. 2에서도 알 수 있듯이 8개의 시료 중에서 같은 형태의 band pattern(genotype)을 보이는 시료는 없는 것으로 보아 소규모 실험실에서 성별의 감별과 genotyping에 의한 간단한 시료의 식별과 구분이 가능할 것으로 생각된다.

고 찰

AluXY는 남성, 여성의 구분을 가능하게 해주는 marker이지만 나머지 세 가지는 microsatellite marker이다. 각 marker별로 보면 Penta E는 [AAAGA] repeat 구조의 21개 allele, D8S1179는

[TATC] repeat 구조의 13개 allele, VWA는 [TCTG]와 [TCCA] insert가 있는 [TCTA] repeat 구조의 20개 allele이 현재까지 보고되어있는 상태이다. 집단유전학적인 측면에서 보면, 각 민족 집단 또는 인종 집단에 따라 각각의 marker에 대하여 보고된 allele의 수와 그 빈도가 조금씩 다르다. PowerPlex® 16 System을 이용하여, 성별 감별 marker를 제외한 15가지 marker를 인종에 따라 연구한 바에 의하면, matching probability(실제로는 다른 사람인데 같은 사람으로 genotyping이 될 확률)가 Caucasian-American은 1.83×10^{17} 명 중 한명, African-American은 1.42×10^{18} 명 중 한명, Asian-American은 3.74×10^{17} 명 중 한명 정도이다⁴⁾. 또한 통계학적으로 배제력이라 불리는 power of exclusion에 대하여 보고된 값은 Asian-American의 경우 0.9999998 (99.99998%)인데 이는 같은 genotype을 가짐으로 해서 같은 사람으로 판단될 수 있는 확률이 0.00002%라는 의미가 된다. 전 세계의 인구가 대략 60억명이라 할 때 이것은 친자확인과 유전자 genotyping 이라는 방법이 매우 강력한 실험적 도구임을 알 수 있게 해준다. 이것은 15가지의 marker를 genotyping 하였을 때의 통계학적 수치이다. 본 연구에서는 성별을 감별하기 위한 AluXY marker를 제외한 3가지의 marker 만을 이용한 것이므로 statistical power는 물론 현저히 감소하게 될 것이다. 그러나 대부분의 일반적인 실험실에서 다양한 민족으로 구성된 수천, 수만개의 DNA 시료를 대상으로 연구를 수행하는 일은 흔치 않기 때문에 성별 감별 marker를 포함한 세 가지 microsatellite marker만을 이용해서도 일반적 실험실에서 연구에 사용하고 있는 DNA 시료들이 서로 섞이지 않았는지, 뒤바뀌지 않았는지 정도의 test는 어느 정도 가능하다고 보여진다. 중요한 것은 본 논문의 방법을 이용해서 개인식별이나 친자확인, 법과학적 유전자 감식 등을 위한 genotyping 수단으로 이용할 수는 없으며 법과학적 효력도 가질 수 없다. 다만 소규모 실험실에서 정도관리 차원으로 random하게 DNA 시료들을 관리하면서 수시로 간편하게 test 해볼 수 있는 정도로 사용할 수 있을 것이다.

결 론

생명과학의 발전으로 모든 실험실에서 DNA 시료를 사용하고 있으며 PCR 역시 기본적인 실험방법의 하나가 되었다. 그러나 많은 수의 DNA 시료를 취급함에 있어 의도하지 않은 시료의 뒤바뀐과 섞임 등의 문제가 발생하고 있는 것이 사실이다. 본 연구에서는 고가의 대형 장비와 시약을 이용하지 않고도 쉽고 간단한 방법으로 성별구분 marker와 세 가지 microsatellite marker를 활용한 genotyping 방법을 고안하였다. 이 방법은 법과학적으로나 집단유전학적으로 활용될 수 있을 만큼의 statistical power나 변별력을 가지고 있지는 못하지만 정도관리 차원에서 시료의 취급과 운용 중에 random하게 시료를 test 해볼 수 있는 간편한 방법이라 할 수 있다. 이 방법으로 test 한 결과 분명 다른 시료임에도 불구하고 같은 genotype이 관찰될 수 있는 여지는 있다. 그러므로 이런 경우에는 Promega PowerPlex® 16 System과 같은 공인된 시약과 기기를 활용하여야 할 것이며 본 논문에서의 방

법에 의한 genotyping 결과는 법과학적으로나 또는 대외적으로
공신력을 갖는 것은 아님을 밝혀둔다.

참고문헌

1. Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*. 23: 504-511, 1997.
2. Schoske, R., Vallone, P.M., Ruitberg, C.M., Butler, J.M. Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 333-343, 2003.
3. Hedges, D.J., Walker, J.A., Callinan, P.A., Shewale, J.G., Sinha, S.K., Batze, M.A. Mobile element-based assay for human gender determination. *Analytical Biochemistry*. 312: 77-79, 2003.
4. STR DNA DataBase. http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_fact.htm
5. Promega. <http://www.promega.com/techserv/apps/hmnid/referenceinformation/popstat/>