

보존된 파라핀 블록에서 핵산 추출기법에 관한 연구

광주보건대학 임상병리과

주 경 응

The Study of Nucleic Acid Extraction Method from Archival Paraffin Blocks

Kyung-Woong Joo

Department of Clinical Pathology, Gwangju Health College, Gwangju, 506-701, Korea

It designed a study to examine the efficiency of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using an non-heating and heating method. Archival paraffin blocks of liver, kidney, colon were randomly selected. Each paraffin block was prepared in 20 microtubes. For each paraffin blocks were tested non-heating DNA extraction to 10 microtubes and heating protocol under pH 7.0 and 10 0°C to 10 microtubes. Evaluation of the results of DNA extraction was carried out by measuring concentration by UV spectrophotometry and then PCR amplification. DNA extraction content that non-heating method was liver 5±0.7 µg/mL, kidney 2±0.3 µg/mL, colon 6±0.4 µg/mL and heating method was liver 12±0.6 µg/mL, kidney 7±0.5 µg/mL, colon 10.±0.3 µg/mL. Successful RNA extraction was observed, by β-actin amplification, in 46.7% sections for samples treated by the heating method versus 30.0% using non-heating DNA extraction. The extracted nucleic acid showed better values for samples heated at 100°C. Therefore heating extraction of nucleic acid is reliable, quick and efficiency.

Key Words : Paraffin-embedded tissue, Nucleic acid extraction, PCR, RT-PCR

I. 서 론

조직에 보존된 핵산을 이용한 분자유전학진단은 임상에서 진단과 치료 후 경과 관찰을 위해 다른 검사 결과와 함께 서로 상호보완적으로 이용되고 있다. 조직병리학적 평가를 위하여 병리학적 시료들을 포르말린으로 고정하고 파라핀 포매하여 사용하고 있다. 파라핀 블록에서 조

직의 구조나 단백질은 잘 보존되지만, 핵산은 활성이 상당히 저하된 상태로 보존되어 있다(Goelz 등, 1985). 핵산이 임상진단과 분자유전연구에 매우 중요한 가치를 가지지만 효율적으로 추출하는 데는 여러 가지 문제들을 가지고 있다(Goelz 등, 1985; Dubeau 등, 1986; Shibata 등, 1988; Rupp와 Locker, 1988).

본 저자는 분자유전학적 진단을 위해 핵산추출을 보다 효율적으로 하고자 포르말린 고정 후 파라핀 포매되어 1년간 보존되어 있던 간장, 신장, 대장 블록에서 DNA와 RNA를 가열추출법 및 비가열추출법으로 추출하여 차이를 비교 분석 하였다. DNA 추출결과의 평가는 자외선

교신저자 : 주경응, (우)506-701, 광주광역시 광산구 신창동 683-3
광주보건대학 임상병리과
TEL : 062-958-7624, 017-202-7577
E-mail : jookw@ghc.ac.kr

분광광도계에서 260 nm에서 흡광도를 측정하고 농도를 계산하였으며, RNA는 블록으로부터 얻은 β -actin 유전자를 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 함으로써 PCR을 수행하는데 추출량이 적절한 지를 비교하여 효과적인 추출기법을 증명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 조직

포르말린에 고정하고 파라핀 포매되어 1 년간 보존된 간장, 신장, 대장조직을 사용하였다. 이 조직은 환자로 부터 절취되어 10% 중성포르말린으로 실온에서 24 시간 고정하였다. 고정된 조직을 하강계열의 에탄올에 흡수하고 자일렌으로 청정하였다. 자동침투기(RH-12EP-2, Sakura Finetek, Japan)에서 파라핀을 침투시키고 자동포매장치(Histocentre 2, Shandon, USA)에서 파라핀 포매하여 사용하였다. 파라핀 블록의 선택은 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 후 조직의 크기와 전체세포 수가 비슷하게 분포된 각각의 블록을 선택하였다. 각 장기마다 10 μ m 절편을 만들어 20 개 미세시험관에 2 절편씩을 넣어 전체가 20 μ m가 되도록 하였으며, 전체 60 개를 실험에 사용하였다.

2. 연구방법

1) 파라핀 용해

(1) 비가열 추출법

20 μ m 절편이 있는 시험관에 자일렌 500 μ L 첨가하여 30 분간 교반하고 15,000 \times g에서 15 분간 원심(Z323, HERMLE, Germany)하였다. 상층을 제거하고 새로운 자일렌을 첨가하여 동일과정을 반복하였다. 두 단계 100% 에탄올에서 37°C에서 30 분간 각각 처리하고, 15,000 \times g에서 15 분간 원심하였다. 하층의 조직만을 남겨 공기건조하였다.

(2) 가열 추출법

20 μ m 절편이 들어있는 각 시험관에 유니버살 완충액(pH 7.0) 500 μ L를 첨가하여 교반하고 고압증기멸균기(HVE50, SMD bank, Korea)로 100°C에서 20분간 가열하였다. 절편을 55°C까지 식힌 후 소화시키전에 파라핀을

제거하였다.

2) 소화

Phosphate buffer saline(PBS)로 15 분간 2 회 수세단계를 거치고, 용해완충액(proteinase K 20 mg/mL, 50 μ L, 1 M Tris-HCl 액 10 μ L, 0.5 M EDTA 2 μ L, 10% SDS 100 μ L, 증류수 838 mL) 500 μ L를 넣고 52°C에서 하룻밤 동안 조직절편을 완전히 용해시켰다.

3) 추출 및 정제

Phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1) 500 μ L를 첨가하여 조직에서 왁스를 제거하고, vortex(Minimax II, BARNSTEAD, USA)로 혼합한 다음, 실온에서 15,000 \times g 10 분간 원심분리 시켰다. 상층액은 10 μ L 피펫을 사용하여 고압멸균된 미세시험관에 옮기고 동량의 클로로포름을 첨가하여 vortex로 혼합하여 15,000 \times g 5 분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 미세시험관으로 옮기고 3 M sodium acetate 0.1 vol 첨가하여 다시 vortex에서 혼합하였다. 다시 isopropanol 1 vol을 첨가하고 -20°C에서 하룻밤을 반응시켰다. 15,000 \times g에서 15 분간 원심하여 상층은 버리고 침전물을 70% 에탄올에 한 번 씻어낸 후 공기건조시킨 후 멸균수 200 μ L로 재부유하였다.

4) 농도와 순도 측정

추출된 DNA를 200 배 희석하여 자외선 분광광도계(DR-4000, HACH, USA)에서 260 nm에서 흡광도를 측정하고 농도를 계산하였다(Kalb와 Bernlohr, 1977).

5) RT-PCR 분석

RNA 평가를 위하여 탈파라핀 후 비가열추출법 및 가열추출법에 의해 정제하여 시료 5 μ L, β -actin 유전자 시발체(β -actin 시발체; down stream 5'-CTCAGGAGGA-GCAAT-GATCTTG-3', upstream 5'-CTGGGCATGGAGT-CCTGTGG-3', Ponte 등, 1984) 1 μ L, 10 \times reverse transcriptase buffer 2 μ L, 10mM dNTP 1 μ L, 10mM DTT, reverse transcriptase(250U/ μ L) 1 μ L를 첨가하여 최종 용량이 20 μ L가 되게 하여 PCR 증폭(PhC-3, BioRad, USA)하였다. 최초 변성은 94°C에서 4 분간하고 35 회(94°C, 30 초 : 60°C, 30 초 : 72°C, 30 초)을 수행하였고 마지막 중

합단계는 72°C에서 3 분간하였다. 시료를 PCR 전에 DNase(Amersham Pharmacia Biotech, St Albans, UK)로 37°C에서 12 분간 소화시킨 후 DNase를 94°C에서 5 분간 가열하여 변성시켰다. PCR 생성물은 8% 폴리아크릴아마이드 비변성 겔(HE99X, HOEFER, USA)에서 ethidium bromide 염색 후 자외선 촬영(CV415LS, UVITEC. USA) 하여 관찰하였다.

III. 결 과

1. DNA 추출량

비가열 추출법에서 30 개 절편 중 11 개(36.7%), 가열 추출법에서 30 개 절편 중 17 개(56.7%)에서 DNA를 추출할 수 있었다. DNA 추출량은 비가열추출법에서는 간장에서 5±0.7 µg/mL, 신장에서 2±0.3 µg/mL, 대장에서 6±0.4 µg/mL, 그리고 가열방법에서는 간장에서 12±0.6 µg/mL, 신장에서 7±0.5 µg/mL, 대장에서 10±0.3 µg/mL의 DNA를 추출했다(Fig. 1).

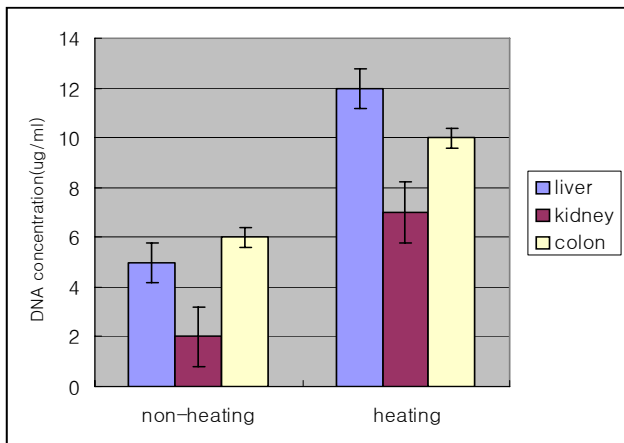


Fig. 1. Comparison of DNA yields obtained by non-heating and heating method

2. RT-PCR 생성물

비가열추출법에서 PCR 생성물이 간장의 30.0%(10 개 시료 중 3 개), 신장의 20.0%(10 개 시료 중 2 개), 대장의 40.0%(10 개 시료 중 4 개)로, 전체 30 개 시료에서 9 개 (30.0%)에서 나타났다. 가열추출법에서는 간장의 60.0%

(10 개 시료 중 6 개), 신장의 30.0%(10 개 시료 중 3 개), 대장의 50.0%(10 개 시료 중 5 개)로, 전체 30 개 시료에서 14 개(46.7%)에서 β-액틴이 PCR 증폭 양성을 보였다. 비가열추출법 및 가열추출법 모두에서 간장이나 대장에 비해 신장에서의 생성물이 낮게 나타났다(Fig. 2).

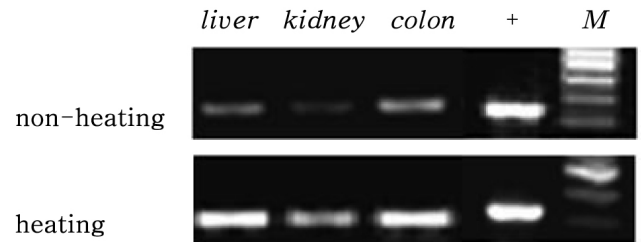


Fig. 2. Gel electrophoresis of RT-PCR products with actin (541 bp) +, positive control sample ; M, DNA ladder.

IV. 고 찰

분자생물학의 발달과 그 의학적 연구로 일부 질병의 진단에 직접적으로 분자생물학적 방법을 이용하게 되었으며 유전자 치료의 가능성도 한층 높아지고 있다. 분자유전학진단은 임상진단과 치료 후 경과 관찰을 위해 다른 검사 결과와 서로가 상호보완적으로 이용되고 있다. 현재 분자유전학검사의 대상은 유전성 질환, 종양 및 감염 질환 등이며 그 적용대상은 급속히 늘어나고 있다. 대부분의 종양에서 종양 그 자체가 유전되지는 않으나 종양의 발생은 기본적으로 유전자의 이상과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되며, 일부의 종양에서 그 원인이 밝혀지고 있다. 이와 같이 유전성 종양 등 유전성 질환에 대한 진단을 위하여 조직으로부터 핵산의 분리가 필요하다.

병리적 시료들은 임상진단을 위하여 일반적으로 포르말린으로 고정하고 파라핀 포매한다. 이렇게 보관된 조직은 조직구조와 단백질들은 보존되지만, 핵산은 활성이 저하되어 보존되어 있기에 추출을 어렵게 하고 있다. 핵산은 임상진단과 상관하여 분자유전학적 검사를 위한 귀중한 자원이 되고 있으며 많은 실험자들이 체계적이고 효과적인 핵산추출 기법에 대해 연구하였다(Goelz 등, 1985; Dubeau 등, 1986; Shibata 등, 1988; Rupp 등, 1988; Sato 등, 2001).

파라핀 포매된 생물학적 조직시료로부터 핵산을 회수

하는 방법은 탈파라핀, 소화 및 정제 등 3단계로 이루어지고 있으며, 이와 같은 원리를 응용하는 핵산 추출은 자일렌으로 파라핀을 용해하고 에탄올로 조직을 탈수 처리하는 가장 전통적인 방법이 발표된 이래(Goelz 등, 1985), 현재 가장 많이 이용되고 있는 조직을 직접 소화시키거나 마이크로오븐에서 파라핀을 용해시키는 방법들이 소개되었다(Banerjee 등, 1995).

본 논문에서는 파라핀 포매되어 보존되어 있던 인체 조직 블록으로부터 신속 정확하고 간단하게 핵산을 분리하는 방법을 찾기 위해 DNA와 RNA를 가열추출법 및 비가열추출법으로 추출하여 차이를 비교분석하였다.

문헌에 의하면 파라핀 포매되어 보존된 조직은 고정 시간과 방법이 DNA 보존에 영향을 줄 수 있다고 하였다(Greer 등, 1991). 파라핀블록의 보존기간에 따라서도 DNA 추출과 증폭에 영향을 줄 수 있다고 하였다(Shibata 등, 1988). 최근의 연구에서 보존된 블록으로부터 DNA 추출에 있어서 열이나 pH가 영향을 주며, 높은 온도에서 효과적으로 추출되는 것이 증명되었고(Frank 등, 1996; Faulkner와 Leigh, 1998; Coombs 등, 1999), 알칼리성 조건에서 효율적인 DNA를 얻을 수 있고 안전하다고 하였다(Shi 등, 2000; Howe 등, 1997).

본 실험에 사용된 모든 시료는 중성 포르말린으로 실온에서 24시간 고정하고 파라핀 포매되어 1년간 보관되어 있던 간장, 신장, 대장조직을 사용하여 고정이나 보관 기간을 동일한 조건으로 실험하였다. 파라핀 블록의 선택은 H&E 염색 후 조직의 크기와 전체세포 수가 비슷하게 분포된 각각의 블록을 선택하였다. DNA 추출결과의 평가는 자외선 분광광도계에서 DNA 농도를 산출하였으며, 표본으로부터 얻은 β -actin 유전자 RT-PCR을 함으로써 RNA의 추출방법으로 적절한지를 서로 비교하였다.

단순 가열방법은 PCR 증폭 후 유전자의 변형을 분석하는 목적에 이용되는 DNA를 얻을 수 있는 방법이다. PCR 증폭에 적당한 핵산 준비에 중요 방해요인은 파라핀 왁스제거와 정제이며, 가열추출법이 actin PCR을 하기 위한 충분한 결과를 얻을 수 있었다고 하였다(Kulski와 Pryce, 1996). 또한 최근 연구에 의하면 보존된 하나의 파라핀 절편에서 단순 가열방법으로 DNA 추출하고 동시에 면역염색을 할 수 있음이 증명되었다(Yamashita 등, 2001).

본 실험에서는 여러 단계의 pH 변화(pH 5.0~9.0)를 설

정하고 유기용매로 처리하는 비가열법과 pH 변화(pH 5.0~9.0)와 온도변화(70~120°C)를 설정하여 가열하는 단순가열법으로 핵산추출을 시도하였다. 그 결과 pH 7.0에서 100°C로 가열하여 추출하는 기법에서 유전자 변형을 증명할 수 있을 있는 충분한 양의 DNA를 얻을 수 있었다. 비가열추출법에 비해 가열추출법에서의 DNA 농도가 증가되어 추출됨을 알 수 있었지만, 장기별로는 유의할 만한 차이는 없었다.

RNA의 추출을 관찰한 바 간장, 신장, 대장 블록에서 가열 추출법은 46.7%, 비가열추출법에서는 30.0%를 얻을 수 있었다. 가열추출법을 시행한 조직 모두에서 RT-PCR에 충분한 RNA량을 얻을 수 있었고, 유기용매를 이용하는 비가열추출법보다 더 효율적인 것으로 나타났다(Fig 2). β -액틴 생성물에서 조직의 종류에 따른 유의할 만한 소견을 보이지는 않았지만, 간장이나 대장 조직에 비해 신장조직에서 약간 낮게 나타나는 경향을 보였다.

가열추출법은 어떤 유기용매도 사용하지 않고, 각 시료는 오로지 미세시험관에서 단순 가열로 전과정이 이루어지게 함으로써 실험하는 동안 핵산의 소실을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 오염 가능성도 줄일 수 있었다. 더욱이 전체적인 과정이 간편하고 빠르기 때문에 PCR을 위한 DNA나 RNA 양을 얻는데 3 시간 이하가 소요되었다. 이와 같은 결과에서 포르말린에 고정하고 파라핀 포매된 조직으로부터 핵산을 회수하는데 가열추출법이 비가열법보다 더 빠르고 간편하면서 효율적인 방법임을 알 수 있었다.

본 연구 기법이 오래 보존된 파라핀 표본으로부터 보다 짧은 시간 내에 효과적으로 핵산을 추출하는데 기초 자료로 응용함으로써 분자유전진단 기법을 발전시켜 유전성질환의 진단에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques* 18:768-773, 1995.
2. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation

- of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 27:e12-17, 1999.
3. Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res* 46:2964-2969, 1986.
 4. Faulkner SW, Leigh DA. Universal amplification of DNA isolated from small regions of paraffin-embedded, formalin-fixed tissue. *BioTechniques* 24: 47-50, 1998.
 5. Frank TS, Svoboda-Newman SM, Hsi ED. Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR. *Diagn Mol Pathol* 5:220-224, 1996.
 6. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130:118-126, 1985.
 7. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB and Manos MM. PCR amplification from paraffin embedded tissues. *Am. J Clin Path* 95:117-124, 1991.
 8. Howe JR, Klimstra DS, Cordon-Cardo C. DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for PCR amplification of archival material. *Histol Histopathol* 12(3):595-601, 1997.
 9. Kulski JK, Pryce T. Preparation of mycobacterial DNA from blood culture fluids by simple alkali wash and heat lysis method for PCR detection. *J Clin Microbiol* 34:1985-1991, 1996.
 10. Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L. Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* 12:1687-1696, 1984.
 11. Rupp GM, Locker J. Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 6:56-60, 1988.
 12. Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA Extraction Methods for Polymerase Chain Reaction Amplification from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *Diagn Mol Pathol* 10(4):265-271, 2001.
 13. Shibata D, Martin WJ, Arnheim N. Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res* 48:4564- 4566, 1988.
 14. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 49:931-937, 2001.
 15. Kalb VF Jr, Bernlohr RW. A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem* 82:362-371, 1977.
 16. Yamashita K, Yoshida T, Shinoda H, Okayasu I. Novel method for simultaneous analysis of p53 and K-ras mutations and p53 protein expression in single histologic sections. *Arch Pathol Lab Med* 125:347-352, 2001.