

중합효소연쇄반응-단일가닥입체형태다형태 방법을 이용한 미토콘드리아 D-고리에서의 CA 디뉴클레오티드 반복수의 결정

김주영¹, 김대광^{2,3}

¹영남대학교 의과대학 해부학교실, ²계명대학교 의과대학 의학유전학교실, ³한빛의학유전연구소

(2018년 7월 11일 접수, 2018년 9월 11일 수정접수, 2018년 9월 11일 게재승인)

간추림 : 중합효소연쇄반응-단일가닥입체형태다형태 (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism, PCR-SSCP) 방법은 돌연변이를 민감하게 검출하는 방법으로 의학유전학 영역에서 많이 사용되었다. 돌연변이나 단일뉴클레오티드다형태 (single nucleotide polymorphism, SNP)를 가지는 DNA 단일가닥조각은 전기영동 상에서 정상 야생 DNA 조각과는 다른 이동 양상을 보인다. 미토콘드리아의 복제와 전사는 D-고리에서 일어나며, 이 부위에 시토신-아데노신 (cytosine-adenosien, CA) 디뉴클레오티드의 반복수 다형태 ((CA)_n)가 나타난다. 이 연구에서는 자궁근종의 미토콘드리아 현미부수체의 불안정 논문에서 나타난 SSCP 양상을 재분석하고, 각 SSCP 양상에 대한 PCR 산물을 DNA 염기서열분석을 실시하여 SSCP 양상과 (CA)_n 다형태를 비교 조사하고자 한다. 총 50례의 자궁근종의 (CA)_n 다형태의 SSCP 양상은 단일가닥의 이동을 기준으로 네 가지 유형으로 분류할 수 있었는데, 아래쪽 단일가닥의 이동속도가 빠른 순으로 3가지 형으로 분류하였다. 제1형의 아래쪽 단일가닥의 높이는 서로 같았으나, 위쪽 단일가닥의 높이는 일치하지 않은 경우를 제 4형으로 분류하였다. DNA 염기서열 분석에서 제 1형의 (CA)의 반복수는 4회, 제 2형은 5회, 제 3형은 6회 그리고 제 4형은 제 1형과 같이 (CA)_n 반복수는 4회였다. 이와 같은 결과는 값비싼 염기서열을 이용하지 않고 단순히 PCR-SSCP 방법으로 미토콘드리아 D-고리의 (CA)_n 반복수를 구할 수 있다는 것을 보여준다.

찾아보기 낱말 : PCR-SSCP, 미토콘드리아 D-고리, (CA)_n 반복수

서 론

미토콘드리아는 핵 밖의 세포질 소기관으로 주 기능은 세포의 에너지 형태인 ATP를 생성하는 것이다. 사람 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)는 15,569 염기쌍으로 이루어진 두 가닥의 원형 DNA으로, 13개의 인산화산화효소, 단백질 합성에 필요한 22개의 tRNA 및 2개의 rRNA를 포함해서 모두 37개의 유전자로 구성되어 있다[1]. DNA 손상이 발생하는 경우에는 핵 DNA에 존재

하는 히스톤과 같은 방어 단백질 물질이 미토콘드리아 유전체에는 없으며, 또한 손상을 복구하는 능력이 한정되어 있다[2-5]. 그리고 연속적으로 활성산소를 생성하는 전자전달사슬에 가까이 위치하기 때문에[6] 미토콘드리아 유전체의 돌연변이는 핵 유전체보다도 수십 배에서 백 배 더 많이 나타나기에 mtDNA에서의 유전적 안정성은 중요하며 많은 관심을 끌고 있다[7].

미토콘드리아의 복제와 전사는 미토콘드리아 유전체의 조절 구역(control region) 또는 D-고리라고 알려진 곳에서 일어나며, 이것은 미토콘드리아 DNA 분자의 주요 비부호화 영역(non-coding region)이다[8]. D-고리에는 인간 미토콘드리아 유전체에서 가장 다형태를 보이는 영역으로 3개의 고변이부위(hypervariable region)가 있다(HVI, HVII

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 김대광(계명대학교 의과대학 의학유전학교실; 한빛의학유전연구소)
전자우편 : dkkimmd@kmu.ac.kr

그리고 HVIII) [9]. mtDNA 변이 중 가장 정보적인 하나는 HVIII에 있는 514번과 523번 서열 사이의(D514) 시토신-아데닌(cytosine-adenine, CA) 디뉴클레오티드 반복((CA)_n) 다형태이다[10]. D514 (CA)_n 다형태는 미토콘드리아 유전체 불안정성의 지표로 잘 알려져 있으며 법의학 검사 분석에 유용하게 사용된다[11,12].

중합효소연쇄반응-단일가닥입체형태다형태(polymerase chain reaction- single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 방법은 민감한 돌연변이 검사 방법의 일종으로 의학유전학 연구 영역에서 많이 사용되고 있다[13,14]. 이 방법은 변이를 찾고자 하는 유전자 부분을 PCR로 증폭하여 이 산물을 알칼리나 열로 변성시켜 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 만든 후 급속히 냉각시켜 이 산물을 전기영동 하는 방법이다. 냉각된 단일가닥 DNA 분자는 각각의 염기 서열 차이에 따라 고유한 입체 형태로 바뀌게 된다. 따라서 돌연변이나 다형태에 의해 하나의 염기가 변하면 전체 단일가닥 DNA구조가 변하는데, 이를 비변성 폴리아크릴아미드(non-denaturing polyacrylamide) 겔에서 전기영동을 하면 이동 속도의 차이로 인해 야생형 단일가닥 DNA의 띠와 다른 모양의 띠를 나타내게 된다. 또한 PCR-SSCP 방법의 장점으로 폴리아크릴아미드 겔의 해상도가 높기 때문에 뉴클레오티드 반복수 다형태를 지니는 경우 반복수의 차이에 따라 단일가닥 DNA의 이동은 다르게 나타난다. 그러므로 단일가닥 DNA 조각의 전기영동 양상을 분류하고 이의 염기서열을 파악하면 뉴클레오티드 반복수 다형태를 조사할 수 있다[15,16].

이 연구는 자궁근종에서 미토콘드리아 유전체 안정성에 대한 연구 결과[17]를 이용하여 D-고리의 (CA)_n에 대한 PCR-SSCP 양상을 분류하고 이에 상응하는 염기서열을 실시하여 PCR-SSCP 양상에 따른 (CA)_n 반복수를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. PCR-SSCP 양상 분류

50례의 자궁근종에서 조사된 미토콘드리아 부수체 안정성에 대한 연구 결과[17]에서 미토콘드리아 D-고리에서의 (CA)_n 반복수에 대한 PCR-SSCP 양상을 조사하였다.

2. PCR 증폭

미토콘드리아 D-고리의 (CA)_n 반복수 부위를 증폭하기 위하여 앞길잡이-CCCATACTACTAATC TCATCAA

와 뒷길잡이-TTTGGTTGGTTCGGGGTATG를 사용하였다. PCR 혼합물의 구성은 25 mmol MgCl₂ 1.8 μL, 5 mmol dNTP 1.2 μL, 각각의 시발체 0.6 μL (50 pmol), AmpliTaq Gold™ DNA polymerase (1.25 U) (Perkin Elmer) 0.25 μL, DNA 2 μL (100 ng)을 혼합하여 전체 용량이 30 μL가 되도록 하였다. PCR 반응주기는 94°C에서 10분 1주기를 시행하고 94°C의 변성; 30초, 55°C에서 불임, 45 초; 72°C의 연장 45초한 주기를 35회 시행하고 72°C에서 10분 유지하였다. 증폭 산물은 2% agarose 겔에 영동하여 증폭 유무를 확인하였다.

3. DNA 염기서열분석

Fluorescent dideoxy terminator 방법을 이용한 ABI377 기종(Perkin Elmer)을 이용하여 DNA 염기서열을 실시하여 (CA)_n 반복수를 확인하였다.

결 과

1. PCR-SSCP 양상 분류

미토콘드리아 D-고리의 (CA)_n 반복수를 포함하는 PCR-SSCP의 양상은 50례의 자궁근종에서 네 가지 유형이 관찰되었다(Fig. 1). 자궁근종과 이웃한 정상조직사이에서의 SSCP 차이는 보이지 않았으며, 모든 경우에서 두 개

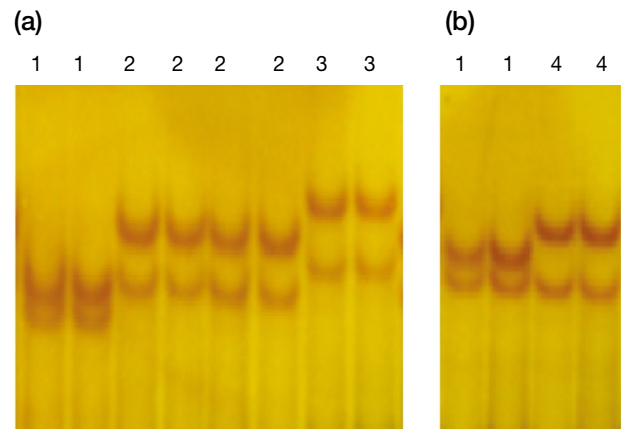


Fig. 1. Silver stained polyacrylamide gel showing PCR-SSCP patterns at locus (CA)_n of mitochondrial D-loop in uterine leiomyomas. 7.5% polyacrylamide gel was used for electrophoresis. At the top of each lane, number 1, 2, 3 and 4 represented the type of SSCP band mobility pattern. (a) The positions of single strands of type 1, 2 and 3 differed respectively. (b) In type 1 and 4, positions of the lower single strand of both were equal but those of upper strand were different.

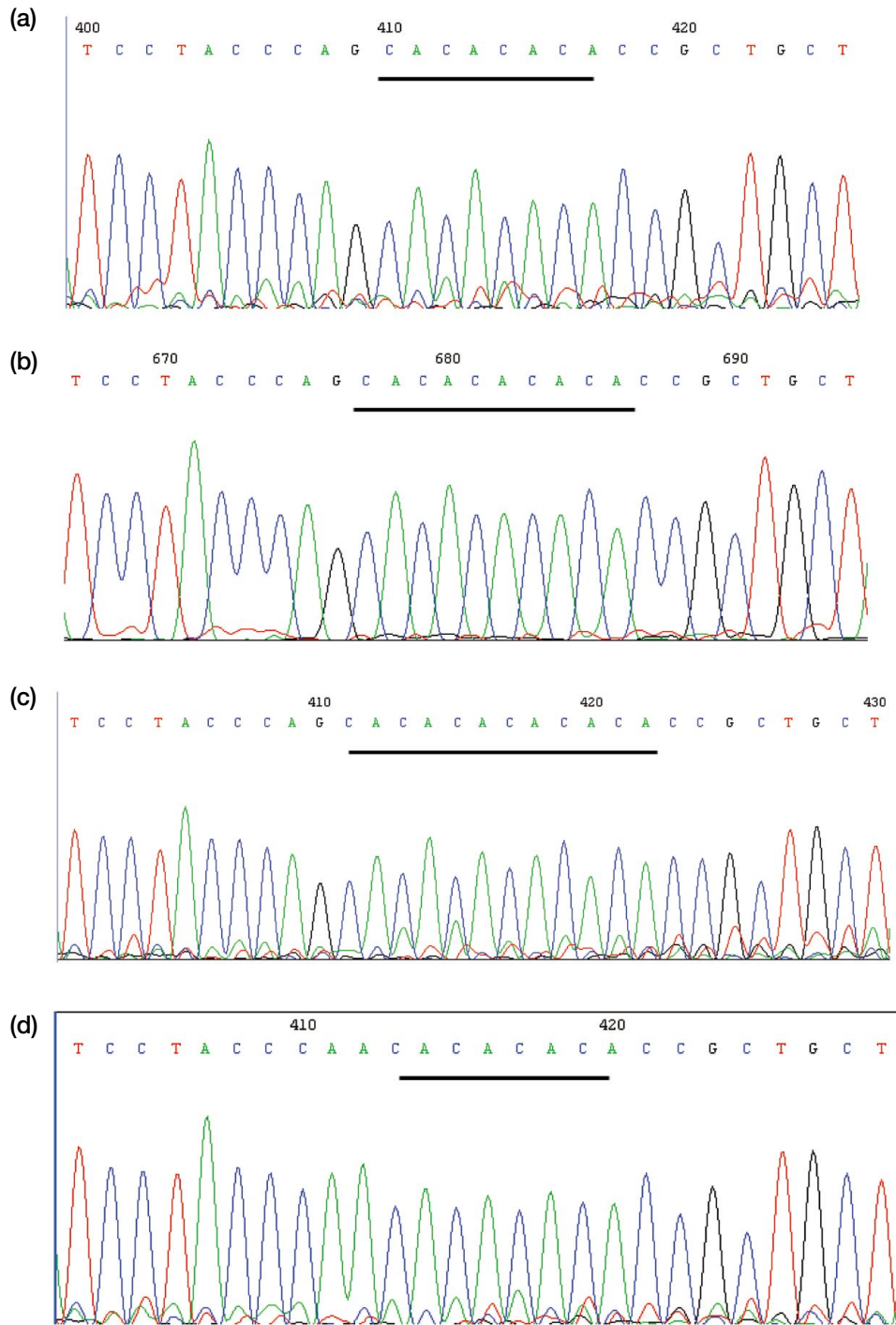


Fig. 2. DNA sequencing analysis. (a) Type 1 of SSCP pattern had CCAG(CA)₄CCGC sequencing structure. (b) Type 2 of SSCP pattern had CCAG(CA)₅CCGC sequencing structure. (c) Type 3 of SSCP pattern had CCAG(CA)₆CCGC sequencing structure. (d) Type 4 of SSCP pattern had CCAA(CA)₄CCGC sequencing structure.

의 단일가닥 DNA 띠만 보였고 추가적인 띠는 보이지 않았다. 두 가닥의 단일가닥 DNA가 평행하게 영동된 경우는 세 가지 유형으로 분류할 수 있었으며, 아래쪽 단일가

닥을 기준으로 가장 멀리 이동한 것을 제 1형으로 하였다 (Fig. 1a). 아래쪽 단일가닥은 제 1형과 같은 위치에 있으나, 위쪽 단일가닥은 제 1형과 다른 위치에 나타난 경우는

Table 1. Frequencies of mitochondrial D-loop (CA)_n repeat polymorphism in Koreans

Reference	Chung et al. [22]	Lee et al. [23]	This study
D-loop (CA) _n	Numbers (%)		
(CA) ₄	186 (37.6)	39 (38.6)	19 (38)
(CA) ₅	303 (60.6)	62 (61.4)	29 (58)
(CA) ₆	7 (1.4)		2 (4)
(CA) ₇	4 (0.8)		
Total	500	101	50

제 4형으로 간주하였다(Fig. 1b). 각 유형의 빈도는 제 1형은 36% (18/50), 제 2형은 58% (29/50), 제 3형은 4% (2/50) 그리고 제 4형은 2% (1/50)로 나타났다.

2. (CA)_n 반복수의 결정

DNA 염기서열분석을 이용하여 SSCP 양상 유형에 대한 (CA)_n 반복수를 조사해보았다. 제 1형의 염기서열 구조는 CCAG(CA)₄CCGC로 (CA)_n 반복수는 4개이며(Fig. 2a), 제 2형의 염기서열 구조는 CCAG(CA)₅CCGC로 (CA)_n 반복수는 5개이며(Fig. 2b), 제 3형의 염기서열 구조는 CCAG(CA)₆CCGC로 (CA)_n 반복수는 6개로 나타났다(Fig. 2c). 제 4형의 염기서열 구조는 CCAA(CA)₄CCGC로 (CA)_n 반복수는 4개이지만, 유형 1, 2 그리고 3에서는 (CA)_n 반복수 앞에 구아닌(G)가 나타나지만, 제 4형은 G 대신 아데닌(A) 염기가 치환된 다형태의 경우였다(m.513 G>A)(Fig. 2d). 그러므로 유형 1과 4는 (CA)_n 반복수가 4개인 경우에 속하며, 이의 빈도는 38% (19/50)가 된다.

고 찰

PCR-SSCP 방법은 현재 사용되는 자동화 기법이 개발되기 전까지만 해도 유전자의 점돌연변이, DNA의 작은 삽입 및 결손, 작은 재배열을 검출하는 방법으로 가장 많이 이용되었던 기법으로 재현성이 매우 높으며, 전기영동의 신호를 검출하기 위해 방사선 동위원소를 사용하지 않고 은염색법을 사용하면 실험자의 안정성과 경제적 측면에서 매우 효과적인 실험기법이다. PCR-SSCP 방법은 인간 유전자 다형태 뿐만 아니라 돼지, 염소, 닭 및 버팔로 같은 동물 가족들의 유전자 다형태 연구에도 사용되고 있다 [18,19]. 그리고 변경된 패턴을 갖는 PCR 생성물은 DNA 염기서열분석에 의해 분석하면 변이의 정확한 특성을 결정할 수 있다.

mtDNA는 유전적으로 매우 다형태를 띠는데 그 중에서

도 D-고리 D514에 (CA)_n 디뉴클레오티드 반복 부분이 존재하여 mtDNA의 다형태를 보여서 [10], (CA)_n 반복수는 법의학적으로 이용된다 [20]. 또한 정상 조직과 비교해서 종양 조직에서의 D514에서의 CA 디뉴클레오티드의 삽입과 결손은 미토콘드리아 유전체의 불안정성을 나타낸다 [11,21]

SSCP 전기영동 이동 양상에 따라 가장 멀리 이동한 제 1형의 (CA) 반복수는 4, 제 2형은 5 그리고 3형은 6으로 디뉴클레오티드 반복수의 차이에 따라 SSCP 전기영동 양상이 다르게 나타남을 확인하였다. (CA)_n 반복수 부분을 포함한 부위를 PCR 증폭한 후 통상적인 폴리야크릴아미드 전기영동을 시행하면 전기영동 이동 양상에 따라 (CA)_n 반복수를 알 수 있지만 같은 반복수의 다형태는 알 수 없다. 본 실험의 SSCP상 제 1형의 염기서열은 CCAG(CA)₄CCGC이고 제 4형은 CCAA(CA)₄CCGC인데, (CA)_n 반복수는 4개로 서로 같지만 (CA)_n 반복수 앞에 뉴클레오티드는 G가 A로 변한 다형태를 보이는 유형 1의 단일뉴클레오티드다형태 (single nucleotide polymorphism, SNP) 이다(m.513 G>A). 그러므로 PCR-SSCP 방법으로 (CA)_n 반복수를 가지는 경우의 다형태를 동시에 파악할 수 있는 장점이 있다.

본 실험에서 (CA)₄, (CA)₅ 및 (CA)₆의 빈도는 각각 38%, 58% 그리고 4%로 나타났다. Chung 등 [22]은 한국인 500명을 대상으로 실시한 (CA)_n 반복수 연구에서 (CA)₄, (CA)₅, (CA)₆ 및 (CA)₇의 빈도를 37.2%, 60.6%, 1.4% 그리고 0.8%로 보고하였으며, Lee 등 [23]은 (CA)₄가 38.6% 그리고 (CA)₅는 61.4%로 보고하였다(Table 1). 본 연구에서는 0.8% 빈도를 가지는 (CA)₇ 유형이 검출되지 않은 이유는 50례의 적은 조사 수에 의한 것으로 생각되며, 본 연구의 결과는 위의 두 연구 결과와 유사하게 나와서 PCR-SSCP 기법이 미토콘드리아의 D 고리에 나타나는 (CA)_n 유전자형의 다형태 연구에 사용될 수 있음을 시사한다.

PCR-SSCP 기법을 사용하여 전기영동상의 띠의 이동 양상을 비교하면 미토콘드리아 D-고리에서의 D514 (CA)_n 반복수를 알 수 있고 (CA)_n 반복수가 같은 경우에서의 다형태도 검출이 가능하기 때문에 PCR-SSCP 기법은 미토콘드리아의 D 고리의 D514의 다형태 연구에 안전하고 경제적인 실험 방법으로 사용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:289-333.

2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290:457-65.
3. Wallace DC: Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61:1175-212.
4. Wallace DC: Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8739-46.
5. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res* 2001; 488:119-33.
6. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 2002; 509:127-51.
7. Khrapko K, Coller HA, André PC, Li XC, Hanekamp JS, Thilly WG. Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13798-803.
8. Van Tuyle GC, McPherson ML. A compact form of rat liver mitochondrial DNA stabilized by bound proteins. *J Biol Chem* 1979; 254:6044-53.
9. Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet* 1991; 48:370-82.
10. Bodenteich A, Mitchell LG, Polymeropoulos MH, Meril CR. Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-loop. *Hum Mol Genet.* 1992; 1:140.
11. Lee JH, Hwang I, Kang YN, Choi IJ, Kim DK. Genetic characteristics of mitochondrial DNA was associated with colorectal carcinogenesis and its prognosis. *PLoS One.* 2015; 10:e0118612.
12. Szibor R, Plate I, Schmitter H, Wittig H, Krause D. Forensic mass screening using mtDNA. *Int J Legal Med.* 2006; 120:372-6.
13. 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.
14. Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 1993; 2:338-46.
15. Hayashi K. Recent enhancements in SSCP. *Genet Anal.* 1999; 14:193-6.
16. Inazuka M, Wenz HM, Sakabe M, Tahira T, Hayashi K. A streamlined mutation detection system: multicolor post-PCR fluorescence labeling and single-strand conformational polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *Genome Res.* 1997; 7:1094-103.
17. Lee JH, Ryu TY, Cho CH, Kim DK. Different characteristics of mitochondrial microsatellite instability between uterine leiomyomas and leiomyosarcomas. *Pathol Oncol Res.* 2011; 17:201-5.
18. Zhang L, Li DY, Liu YP, Wang Y, Zhao XL, Zhu Q. Genetic effect of the prolactin receptor gene on egg production traits in chickens. *Genet Mol Res.* 2012; 11:4307-15.
19. Raut AA, Kumar A, Kala SN, Chhokar V, Rana N, Beniwal V, et al. Identification of novel single nucleotide polymorphisms in the DGAT1 gene of buffaloes by PCR-SSCP. *Genet Mol Biol.* 2012; 35:610-3.
20. Szibor R, Plate I, Schmitter H, Wittig H, Krause D. Forensic mass screening using mtDNA. *Int J Legal Med.* 2006; 120:372-6.
21. Richard SM, Bailliet G, Páez GL, Bianchi MS, Peltomäki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:4231-7.
22. Chung U, Lee HY, Yoo JE, Park MJ, Shin KJ. Mitochondrial DNA CA dinucleotide repeats in Koreans: the presence of length heteroplasmy. *Int J Legal Med.* 2005; 119:50-3.
23. Lee JH, Kim DK. Association between Mitochondrial D-loop Polymorphism and Copy Number. *Korean J Phys Anthropol.* 2014; 27:131-6

Determination of Repeat Numbers of (CA)_n in Mitochondrial D-loop using Polymerase Chain Reaction-single Strand Conformational Polymorphism (PCR-SSCP)

Joo-Young Kim¹, Dae-Kwang Kim^{2,3}

¹*Department of Anatomy, College of Medicine, Yeungnam University*

²*Department of Medical Genetics, School of Medicine, Keimyung University*

³*Hanvit institute for Medical Genetics*

Abstract : Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis is a kind of sensitive mutation detection method that has been usually used in field of medical genetics. A single DNA strand with a mutation or nucleotide polymorphism has a different conformation from its wild-type counterpart, and these conformational differences result in different electrophoretic mobility. In previous study of mitochondrial microsatellite instability in 50 uterine leiomyomas, PCR-SSCP showed 4 types of band mobility at (CA)_n of the mitochondrial D-loop. In type 1 and 4, positions of the lower single strand of both were same but those of upper strand were different. In sequencing analysis, repeat number of (CA)_n in type 1 was 4, 5 in type 2, 6 in type 3, and 4 in type 4, respectively. Without using expensive sequencing analysis, PCR-SSCP method can be used to detect the repeat number of (CA)_n in mitochondrial D-loop.

Keywords : PCR-SSCP, Mitochondrial D-loop, (CA)_n repeat number