

선천성롱아유전자소편용 다중비대칭PCR조건에 관한 연구

김리향, 강기찬

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《우리는 어떤 최첨단과학기술이라도 우리의것으로 연구도입할수 있다는 신념과 배심을 가지고 선진과학기술을 받아들이기 위한 투쟁을 대담하게 진공적으로 벌려야 합니다.》
(《김정일선집》 제22권 증보판 24페이지)

다중비대칭PCR(Multiplex Asymmetric Polymerase Chain Reaction, MA-PCR)는 여러개의 유전자에 대하여 한오리DNA증폭산물을 동시에 얻어내는 방법으로서 DNA소편기술에서 중요한 공정의 하나이다.[2-4]

논문에서는 유전성질환인 선천성롱아와 관련된 유전자변이를 검사하기 위하여 DNA소편 검사용시료제조를 위한 4중비대칭PCR조건을 확립하기 위한 연구결과에 대하여 론의하였다.

재료와 방법

재료로는 선천성롱아환자의 머리칼을 리용하였다.

방법 머리칼모낭으로부터 사람게놈DNA의 분리는 선행방법[1]으로 하였다.

4중PCR는 선천성롱아와 관련있는 *GJB2*, *PDS*, *12SrRNA* 유전자에 대하여 진행하였으며 이때 리용한 프라이머배열과 특성값들은 표와 같다.

표. 4중PCR에 리용한 프라이머배열과 특성값

유전자	프라이머	배열(5'-3')	길이/nt	$T_m/^\circ\text{C}$	증폭길이/bp
<i>GJB2</i>	GJB2-F	GGATTGGGGCAGCTG	16	52.5	383
	GJB2-R	HEX-CGATGCGGACCTTCTGGG	18	56.1	
<i>PDS</i>	919-F	GCTCACCATTGTCGTCTGTAT	21	49.1	268
	919-R	HEX-GGGATGGATTAAACAATGCCAG	22	54.5	
	2168-F	AATGCGGGTTCTTTGACGA	19	52.9	106
	2168-R	HEX-CCTTGACCCTCTTGAGATTTCAC	23	53.6	
<i>12SrRNA</i>	1494-F	GTACACACCGCCCGTCAC	18	51.5	248
	1555-R	HEX-GGTTGTCTGGTAGTAAGGTGGAG	23	51.3	

다중PCR에 리용한 반응액의 조성은 1.5×PCR완충액, 25mmol/L MgCl_2 0.1mL, Taq폴리메라제(5U/ μL) 0.1 μL , 앞뒤방향프라이머 각각 4 $\mu\text{mol/L}$, 주형DNA 2.31 $\mu\text{g}/15\mu\text{L}$ 로 하였으며 PCR는 94 $^\circ\text{C}$ 에서 5min간 초기변성을 진행하고 94 $^\circ\text{C}$ 30s, 55 $^\circ\text{C}$ 30s, 72 $^\circ\text{C}$ 30s를 30회 반복한 다음 72 $^\circ\text{C}$ 7min 최종연장반응을 진행하는 방법으로 하였다. 아닐링온도는 45~60 $^\circ\text{C}$ 에서, 프라이머농도는 2~4 $\mu\text{mol/L}$ 에서 결정하였다. 비대칭PCR의 반응액조성은 우와 같으며 비형광프라이머와 HEX형광프라이머의 농도비를 1 : 10까지 높여 진행하였다. 얻어진 PCR산물들은 8% 폴리아크릴아미드겔전기영동(PAGE)으로 확인하였다.

결과 및 고찰

GJB2, *PDS*, *12SrRNA* 유전자를 증폭하기 위한 4중PCR 표에 보여준 4종의 프라이머들을 가지고 머리칼모양으로부터 분리한 사람게놈DNA에 대하여 PCR를 진행하고 8% 폴리아크릴아미드겔 전기영동을 진행한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 매 유전자들에 대하여 목적하는 위치(*GJB2*는 383bp, *12SrRNA*는 248bp, *PDS1*은 268bp, *PDS2*는 106bp)에서 증폭띠가 관찰되었으며 이 유전자들에 대한 동시증폭도 정확히 진행되었다.

GJB2, *PDS*, *12SrRNA* 유전자에 대한 4중비대칭PCR 우의 실험결과에 기초하여 *GJB2*, *PDS*, *12SrRNA* 유전자들에 대한 다중비대칭PCR를 진행하였다.(그림 2)

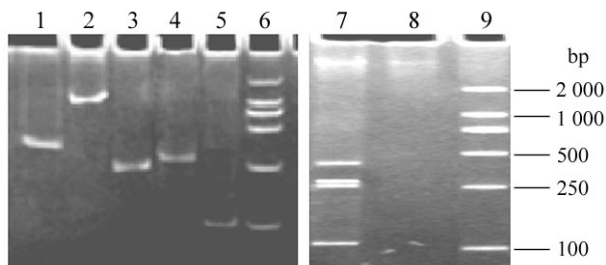


그림 1. 단독 및 4중PCR산물의
8% 폴리아겔 전기영동상

1-*GJB2*, 2-양성대조, 3-*12SrRNA*,
4-*PDS1*, 5-*PDS2*, 6-DL2000표식자,
7-4중PCR, 8-음성대조,
9-DL2000표식자

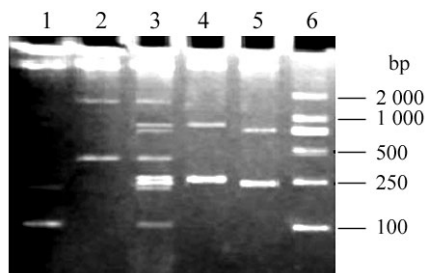
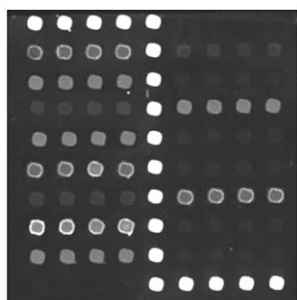


그림 2. 4중비대칭PCR산물의
8% 폴리아겔 전기영동상

1-*PDS2*(1 : 10), 2-*GJB2*(1 : 10),
3-4중비대칭PCR산물, 4-*PDS1*(1 : 5),
5-*12SrRNA*(1 : 5), 6-DL2000

그림 2에서 보는바와 같이 *GJB2*, *PDS1*, *PDS2*, *12SrRNA*에 대하여 비형광프라이머와 형광프라이머의 농도비를 각각 1 : 10, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 5로 하였을 때 4중비대칭PCR가 진행되어 매 유전자에 해당하는 한오리증폭산물이 얻어졌다.



7)

8)

그림 3. 4중비대칭PCR산물과 선천성롱아관련 유전자변이검사용 DNA소편과의 잡종화상

7) 잡종화상, 8) 소편정렬설계도

QC-점찍기양성대조, BC-점찍기음성대조,

NC-잡종화음성대조, W-정상형탐집,

M-변이형탐집

QC	QC	NC
35W	QC	35M
109W	QC	109M
235W	QC	235M
299W	QC	299M
2168W	QC	2168M
919W	QC	919M
1555W	QC	1555M
1494W	QC	1494M
BC	QC	QC

계속하여 얻어진 4중비대칭PCR 증폭산물을 선천성롱아관련유전자변이검사용 DNA소편과 잡종화시키고 소편주사장치로 주사한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 예측하였던대로 *GJB2* 유전자에서는 235delC 변이형에서, *PDS* 유전자에서는 919A>G 변이형에서 정상형에 비하여 잡종화신호 세기가 더 높았다. 이로부터 잡종화가 정확히 진행되었으며 4중PCR산물이 정확하다는 것을 알 수 있다.

맺 는 말

GJB2, *PDS*, *12SrRNA* 유전자에 대한 한오리증폭산물을 얻기 위한 4중비대칭PCR조건을 확정한고 선천성롱아관련유전자변이검사소편과의 잡종화를 통하여 정확성을 확정한였다.

GJB2, *PDS1*, *PDS2*, *12SrRNA*에 대하여 비형광프라이머와 형광프라이머의 농도비를 각각 1 : 10, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 5로 하였으며 아닐링온도는 53°C로 정하였다.

참 고 문 헌

- [1] 김성준 등; 세포 및 유전자공학연구통보, 2, 32, 주체93(2004).
- [2] W. Zheng et al.; Chinese Journal of Pediatrics, 38, 10, 14, 2000.
- [3] L. X. Zhu et al.; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 10, 3707, 2007.
- [4] R. Victor et al.; Nucleic Acid Research, 28, 12, 66, 2000.

주체103(2014)년 6월 5일 원고접수

Study on Multiplex Asymmetric PCR Condition for Hereditary Deafness Gene Chip

Kim Ri Hyang, Kang Ki Chan

We have established four-plex asymmetric PCR condition to produce single-stranded products of *GJB2*, *PDS*, *12SrRNA* and verified the accuracy through the chip hybridization. In *GJB2*, *PDS1*, *PDS2* and *12SrRNA*, the concentration ratios between forward primer and reverse primer are respectively 1 : 10, 1 : 5, 1 : 10 and 1 : 5. And the annealing temperature is 53°C.

Key words: multiplex asymmetric PCR, *GJB2*, *PDS*, *12SrRNA*