

## PCR에 의한 사람CYP2C19유전자의 다형검사

지옥주, 박철민, 리명진

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《나라의 과학기술을 세계적수준에 올려세우자면 발전된 과학기술을 받아들이는것과 함께 새로운 과학기술분야를 개척하고 그 성과를 인민경제에 적극 받아들여야 합니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 138~139페이지)

시토크롬 P450은 이질성화합물의 대사에 참가하는 효소계로서 그 표현형을 예측하면 약물치료의 개별화를 실현할수 있으며 약물의 람용으로 인한 간질환을 예방할수 있다.

사람CYP2C19는 시토크롬 P450효소계의 구성성분의 하나로서 아미트리프틸린, 이미프라민, 에트트인, 오메프라졸, 디아제팜, 데스메틸디아제팜, 프로구아닌, 브로플라노톨, 헥소발피탈, S-메페니트인, R-메포발피탈 등의 약물대사에 관여한다.

CYP2C19의 변이는 아시아인들속에서 상대적으로 많이 나타난다고 한다. 그중에서 특히 엑손 5와 4에 변이점을 가지고있는 2형과 3형이 대부분을 이룬다.

우리는 사람CYP2C19의 중요한 몇가지 유전자다형을 PCR방법으로 검사하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

프라이머의 설계에 생물정보학프로그램들인 DNASTar 5.2, Vector NTI 8.0, BLAST들을 리용하였다.

설계한 프라이머는 전문연구소에서 합성하였다.

PCR를 위한 주형으로는 머리칼시료로부터 분리한 게놈DNA를 리용하였다.

게놈DNA분리는 선행방법[1]으로, PCR는 선행방법[2-4]에 따라 진행하였다.

PCR산물은 8% 폴리아크릴아미드겔전기영동을 통하여 확인하였다.

### 결과 및 논의

CYP2C19유전자형들중에서 제일 많이 나타나는 2형과 3형의 주요변이가 존재하는 엑손 4와 5를 표적으로 하여 연구를 하였다.

우리가 취급한 CYP2C19유전자형들의 주요변이들은 표 1과 같다.

표 1. CYP2C19유전자형들의 주요변이들

대립유전자	누클레오티드변화		변이위치	효과
	cDNA	유전자		
CYP2C19*1	없음	없음		정상
CYP2C19*2	681 G>A	19154 G>A	엑손 5	무활성
CYP2C19*3	636 G>A	17948 G>A	엑손 4	무활성
CYP2C19*7		19294 T>A	엑손 5	무활성
CYP2C19*17		-806 C>T	프로모터	활성강화

우선 엑손 4와 5부분을 증폭하기 위한 프라이머들을 설계하였다.(표 2)

표 2. *CYP2C19*의 엑손 4와 5를 증폭하기 위한 프라이머배열과 특성값

프라이머	배열(5'–3')	길이/nt	GC/%	$T_m/^\circ\text{C}$	증폭길이/bp
엑손 4(F)	CCCTGTGATCCCACCTTTCAT	20	50.0	51.1	305
엑손 4(R)	TATTCACCCCATGGCTGTCT	20	46.7	51.7	
엑손 5(F)	CCCACTACTATTGATTATTTCCC	23	39.1	51.8	267
엑손 5(R)	ATCACAAATACGCAAGCAGTCACA	24	40.0	51.6	
프로모터(F)	TGAGATCAGCTCTTCCTTCAGTT	23	43.5	51.7	360
프로모터(R)	ATGAGCTGTGTGGCACCAA	19	52.6	51.9	

다음 *CYP2C19*변이검출을 위한 특이프라이머들을 설계하였다. 특이프라이머들은 모두 앞방향에서 설계하였다.

뒤방향프라이머들로는 엑손 4(R)와 엑손 5(R)를 리용하였다.(표 3)

표 3. *CYP2C19*형검사를 위한 특이프라이머들의 몇가지 특성값

유전자형	프라이머이름	염기배열(5'–3')	길이/nt	$T_m/^\circ\text{C}$	증폭길이/bp
<i>CYP2C19</i> *2	2wt	TCATTGATTATTTCCCG	17	44.9	271
	2mt	CTATCATGATTATTTCCCA	20	46.2	274
<i>CYP2C19</i> *3	3wt	TAAGCACCCCCTGG	14	44.8	189
	3mt	GTAAGCACCCCCTGA	15	46.5	188
<i>CYP2C19</i> *7	7wt	GATCAAAATGGAGAAGGT	18	46.1	141
	7mt	ATCAAAATGGAGAAGGA	17	44.3	140
<i>CYP2C19</i> *17	17wt	CATCTCTGATGTAAGAGATAATGCG	25	52.0	292
	17mt	AATTTGTGTCTTCTGTTCTCAAAGT	25	50.4	116

표 3에서 보는바와 같이 프라이머의  $T_m$ 은 44.3~46.5 $^\circ\text{C}$ 였다. 3'–말단의 끝에는 해당 변이점들이 놓이며 정상형과 변이형에 특이적인 뉴클레오티드로 종결되었다. 17형에 대해서는 정상형과 변이형프라이머들을 서로 방향이 다르게 설계하였다.

증폭산물의 정확성을 보장하기 위하여 우선 엑손 4와 엑손 5를 증폭하기 위한 1차

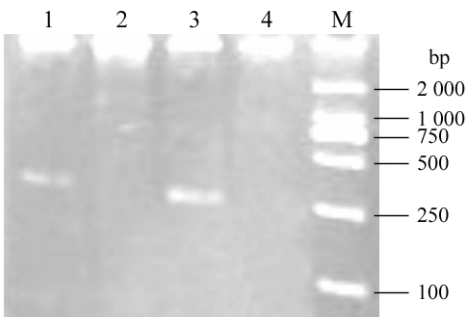


그림 1. *CYP2C19*의 엑손 4와 엑손 5의 PCR산물에 대한 8% 폴리아크릴아미드겔전기영동상

1–엑손 4(300bp), 2–엑손 4(음성),  
3–엑손 5(260bp), 4–엑손 5(음성),  
M은 분자량표식자 DL2000

PCR를 진행하였다. PCR는 초기변성 94 $^\circ\text{C}$  5min→94 $^\circ\text{C}$  30s, 50 $^\circ\text{C}$  30s, 72 $^\circ\text{C}$  1min, 순환 30회→최종늘이기 72 $^\circ\text{C}$  7min으로 하였다. 결과 예정된 크기의 증폭토막이 나타났다.(그림 1)

특이프라이머들을 직접 리용하여 게놈DNA를 주형으로 PCR를 진행하였을 때 기본띠의 세기가 약하고 부띠가 많아서 결과해석에 불리하였다. 아닐링온도를 45~60 $^\circ\text{C}$ 까지 변화시켜보았으나 부띠는 없어지지 않았다.(결과는 보여주지 않음)

이로부터 1차PCR산물을 주형으로 하고 특이프라이머들을 리용한 2차PCR를 진행하였다.(그림 2) 특이프라이머를 리용한 2차PCR조건은 초기변성 94 $^\circ\text{C}$  5min→94 $^\circ\text{C}$  30s, 60 $^\circ\text{C}$  30s, 72 $^\circ\text{C}$  1min, 순환 30

회→최종늘이기 72°C 7min이었다. 결과 산물들도 역시 부피들이 나왔지만 7형변이증폭산물이 얻어지지 않았다.(그림 2) 2형과 3형, 7형은 자기띠가 진하며 동시에 부피들이 함께 나타났다. 이것은 출발주형의 농도가 높기때문이며 이때 1누클레오티드다형에 대한 배렬특이증폭의 예민도가 떨어진다고 보았다. 이로부터 1차PCR의 순환수를 줄여주었다.

1차PCR에서 순환수는 20회로 하였다. 이때 전기영동상에서 증폭산물은 거의 나타나지 않았다.(결과는 보여주지 않음) 이 1차PCR산물 0.5 $\mu$ L를 주형으로 2차PCR를 진행하였는데 그 결과 부피들이 적어졌다.

2차PCR의 아닐링온도를 45~60°C사이에서 변화시켜보았는데 60°C에서 부피가 제일 적었다. 이와 동시에 기본띠들의 세기도 약해졌으므로 2차PCR의 아닐링온도를 60°C로 정하였다.

2차의 계단PCR결과 상당히 개선된 영동상을 얻을수 있었다.(그림 3)

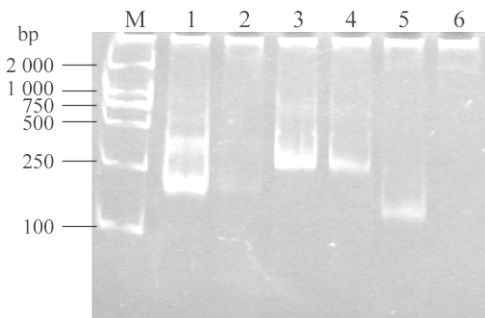


그림 2. 특이PCR산물들에 대한 7% 폴리아크릴아미드겔전기영동상  
1-3wt, 2-3mt, 3-2wt, 4-2mt, 5-7wt, 6-7mt, M은 DL2000

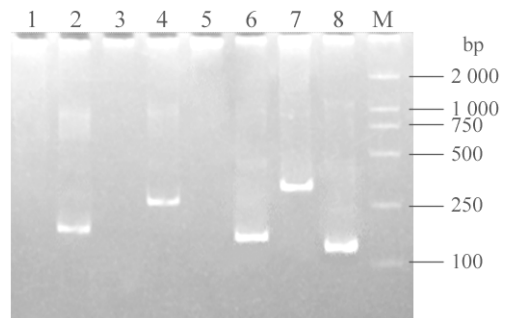


그림 3. 계단PCR산물들에 대한 7% 폴리아크릴아미드겔전기영동상  
1-3mt, 2-3wt, 3-2mt, 4-2wt, 5-7mt, 6-7wt, 7-17wt, 8-17mt, M은 DL2000

결과 얻어진 영동상에서는 부피들이 거의 없고 변이형증폭산물들은 정상형증폭산물에 비하여 현저히 약하여 뚜렷한 대조를 이루었다. 이 결과는 DNA염기배렬분석으로 확인되었다.

## 맺는 말

사람CYP2C19의 유전자형들인 1, 2, 3, 7, 17형들을 확인하기 위한 배렬특이프라이머들을 설계합성하고 우의 유전자형들을 확인할수 있는 PCR조건을 확정하였다.

## 참고 문헌

- [1] R. Paul et al.; Cytochrome P450, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 377~429, 2005.
- [2] Azaiez Jeffreys et al.; Nature, 316, 76, 1985.
- [3] James Robinson et al.; Nucleic Acids Research, 41, D1222, 2013.
- [4] S. J. Lee; Drug Metab. Dispos., 37, 11, 2262, 2009.

## **On Human CYP2C19 Genotyping by PCR**

*Ji Ok Ju, Pak Chol Min and Ri Myong Jin*

We have designed the specific primers for detecting *CYP2C19\*1*, *CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*3*, *CYP2C19\*7*, *CYP2C19\*17* genotypes and developed the PCR method for *CYP2C19* genotyping using these specific primers.

Key words: CYP2C19, genotyping, PCR