

중합효소연쇄반응에 의한 DNA진단 DNA Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction

영남대학교 의과대학 미생물학교실

이태윤 · 김성광

서 론

유전자진단은 DNA진단이라고도 불리며 유전자를 이용하여 시행하는 진단기술을 일반적으로 지칭한다. 이는 특정 DNA배열의 유무나 구조상의 변화를 검출함으로써 질병의 진단을 가능케하며 이 진단법이 일반 검사실에서 사용되기 위하여는 정확성, 신속성, 미량, 고감도화, 비방사성동위원소(*radioisotope*)화, 간편화 및 자동화등이 요구된다.

유전자진단을 위한 종래의 DNA구조해석기술은 Southern hybridization¹⁾을 토대로 행하여져 다음과 같은 복잡한 과정을 거쳐야 했다; (1) 검체 DNA의 제한효소(*restriction endonuclease*)에 의한 절단, (2)절단된 DNA의 전기영동에 의한 분획(*separation*), (3)membrane에의 DNA전이(*transfer*), (4)방사성동위원소를 이용한 probe DNA의 표식(*labeling*), (5)hybridization 과정, (6)autoradiography에 의한 DNA의 검출등이다. 따라서 이들 방법은 각각의 원리, 및 사용되는 장치가 다양한 여러가지 단계를 조합해 놓은 것으로 검체중에 특정 DNA배열이 존재하는지 유무와 제한단편의 크기에 변화가 생길 정도의 유전자구조변화를 정확하게 포착할 수는 있으나 제한효소에 의해 절단되는 DNA부위(제한부위)의 위치 및 갯수의 변화에 근거하므로 병을 일으키는 변이에 의해 검체내 DNA내에 새로운

제한부위가 출현하거나 혹은 기존의 제한부위가 결실(*deletion*)될 때에만 검출이 가능하다는 문제점을 갖고 있다. 이러한 제한부위의 출현이나 결실이 없는 경우에는 정상형 및 변이형 짧은 DNA(*oligonucleotide*) probe를 사용하여 hybridization을 시행하여 정상형과 변이형을 판별하는데 이 경우에는 비특이적인 결합때문에 진단에 정확성을 기하는데 어려움이 많았다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 DNA probe의 특이성을 높이든지 목표로 하는 DNA배열의 양을 상대적으로 높이는 두가지 개선책을 생각할 수 있다.

그러나, 중합효소연쇄반응(*polymerase chain reaction*)²⁾[이하 PCR로 약함]은 상술한 문제점들을 동시에 해결함으로써, 유전자진단에 있어서 새로운 장을 열었다.

즉, 질병의 진단에 있어서 관심의 대상이 되는 유전자의 특정부위(특이도의 문제를 해결)를 목표로 하여 그 부위만을 시험관내에서 대량으로 증폭시켜(민감도의 문제를 해결) 전기영동을 통하여 육안으로 관찰할 수 있을 만큼의 DNA를 얻을 수 있게 된 것이다.

이러한 PCR의 성공에는 크게 세가지의 요소가 관여한 것으로 생각된다. 첫째는, PCR이 처음 사용될 때에는 열에 약한 DNA중합효소밖에 없어 중간중간에 이효소를 보충해 주어야 했으나, 내열성의 *Taq* DNA중합효소^{3,4)}가 발견됨으로써

이 문제를 해결한 것이고, 둘째는 원하는 DNA배열을 임의로 합성할 수 있는 DNA자동 합성기의 개발이며, 셋째는 PCR의 모든 온도 및 시간변화의 과정을 자동 온도 및 시간제어장치 (automated thermal cycler)를 사용하여 DNA증폭과정을 자동화할 수 있었던 것이다.

PCR의 원리⁵⁾

PCR은 시험관내에서 내열성의 DNA중합효소에 의하여 원하는 DNA만을 증폭하는 기술로써 증폭이 일어나는 DNA의 양단에 DNA합성의 출발점이 되는 상보적인(complementary)단일나선(single-stranded)의 primer DNA를 필요로 한다.

보통 DNA의 이중나선의 5'쪽 말단에 상보적인 (complementary) 20~40base-pairs(bp)정도의 primer배열을 결정하여 DNA를 합성한다.

PCR은 한 주기가 각각 세단계로 나뉘어 진다. 그 첫단계로 DNA이중나선을 단일나선으로 만드는 열변성(denaturation)과정, 둘째단계로는 원하는 DNA배열만을 증폭하기 위하여 primer DNA를 각각의 단일나선에 결합시키는 (annealing)과정, 마지막 세단계로는 DNA중합효소에 의하여 DNA를 중합하는 (polymerization [혹은 extension])과정이다.

PCR 한 주기가 끝나면 DNA는 2배로 되므로 n회 반복할 경우 원하는 DNA를 2ⁿ배로 증폭할 수 있다는점이 PCR의 기본되는 원리이다(Fig.1).

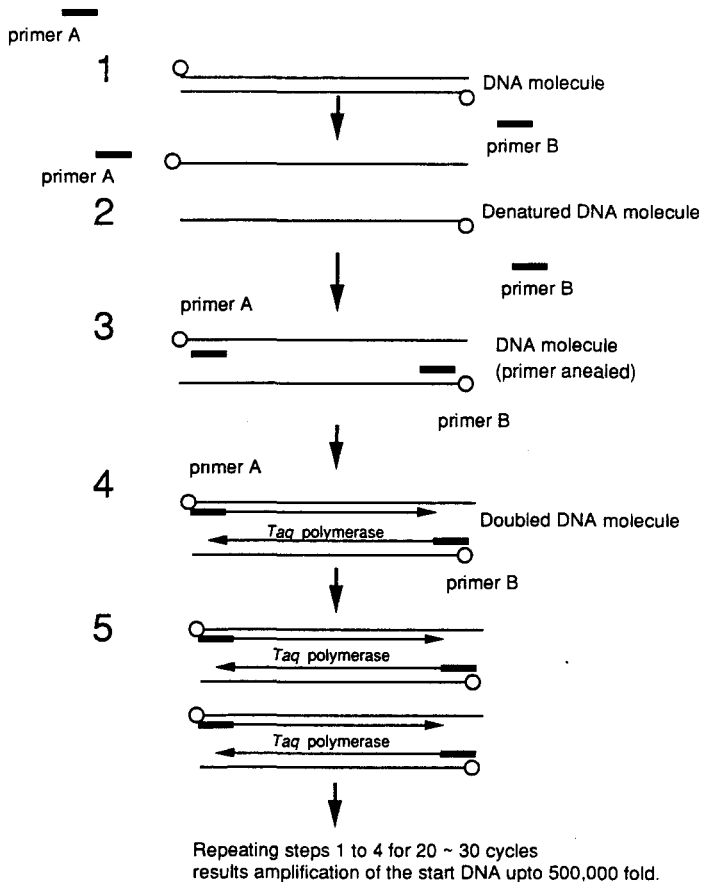


Fig. 1. Basic principle of the polymerase chain reaction

PCR의 응용

DNA 1분자까지도 검출할 수 있는 PCR법은 DNA진단뿐 아니라 다른 여러분야에도 새로운 전망을 보여주었다.

PCR법은 유전병의 진단이나 세균 및 바이러스계능의 검출을 통한 감염병의 진단에 매우 유용하다. 특히 유전병의 출산전 진단과 같이 미량의 가검물을 사용하며 신속성을 요구하는 검사에 대하여는 위력을 발휘한다.

모발 한개의 모근에 있는 DNA로부터 DNA 진단을 했다는지⁶⁾체액이나 구강세척액내에 함

유되어 있는 세포를 사용하며 피검자에게는 고통을 주지 않으면서 DNA진단을 시행한 보고도 있다⁷⁾.

PCR법에 의한 DNA의 분석은 유전병의 진단, 감염성세균 및 바이러스의 검출뿐 아니라 암세포에 일어나는 H-ras유전자 점변이(point mutation)의 검출⁸⁾, philadelphia 염색체에서 보이는 abl 유전자의 전위(translocation)의 검출, RNA를 주형(template)으로 하는 complementary DNA(cDNA)의 cloning등 그 응용범위가 극단적으로 넓게 여러분야에 걸쳐 있으며 이들은 Table 1에 요약되어 있다⁹⁻²⁴⁾.

Table 1. PCR에 의해 진단이 가능하거나 발병을 예측할 수 있는 질병및 감염증의 원인체들.

유전병	암	
α1-antitrypsin deficiency	Non-Hodgkin's lymphoma	
βthalassemia	Retinoblastoma	
Cystic fibrosis	Chronic myelogenous leukemia	
Duchene muscular dystrophy	바이러스 감염증	
Myotonic dystrophy		
Lesch-Nyhan syndrome	Human T-cell leukemia viruses Human immunodeficiency virus Hepatitis B virus Hepatitis C virus Human papilloma virus Human cytomegalovirus Enteroviruses Epstein-Barr virus Human herpes virus type 6 Varicella-zoster virus Adenovirus	
Hemophilia A & B		
Huntington's chorea		
Phenylketonuria		
Sickle cell anemia		
Familial adenomatous polyposis		
Human von Willebrand's disease		
세균감염증		기생충감염증
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
<i>Mycobacterium leprae</i>		<i>Toxoplasma gondii</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>		
<i>Helicobacter pylori</i>		
<i>Clostridium difficile</i>		
<i>Treponema pallidum</i>		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		

PCR의 장점과 단점

PCR법은 과거에는 대장균의 DNA중합효소 유래의 Klenow fragment를 사용했었다. 이 경우

DNA중합효소의 지속성(processivity [중합반응을 지속시킬 수 있는 길이])의 한계때문에 증폭이 가능한 DNA의 길이는 200~300bp의 한계

가 있었다. 또한 열에 의해 변성되므로 매번 DNA중합효소를 공급해 주어야만 했었다. 이때문에 PCR을 25 cycles나 반복하는 것이 쉽지가 않았다. 그러나, 내열성균의 DNA중합효소(*Taq* 중합효소)가 사용됨으로써 PCR법은 비약적으로 그 유용성을 더하게 되었다. *Taq* 중합효소를 사용함으로써 주기마다의 효소공급이 불필요하게 되었고 조작의 대부분이 온도의 조절뿐인 단순한 과정으로 되어 자동온도 및 시간제어장치가 개발되었다. 그리고 지속성이 좋은 *Taq* 중합효소를 사용함에 의해서 2~3kilo basdpairs(kb)의 길이의 DNA까지도 증폭시킬 수 있게 된 것이 개량점이다.

따라서, 종래의 실험법과 비교하면 (1)가검물 중 DNA양이 1/1000이하라도 충분하며 (2)방사성동위원소를 사용하지 않고, (3)판독이 빠르면 하루만에 가능한 점들이 PCR의 장점이다.

DNA진단에 있어서 획기적인 기술인 PCR법의 가장 큰 특징은 미량의 가검물도 분석이 가능해졌다는 점에 있다. 예를 들어 2kb의 DNA를 50만배 증폭할 수 있다고 하면, 기존에 사용되던 Southern hybridization법은, 사람의 전 게놈(genomic) DNA 1 μ g(10^{-6} g)중 2kb가 차지하는 부분은 약 0.7 μ g이나 DNA를 전기영동한 후 여과막에 이전하는 효율등을 생각하면 0.1 μ g(10^{-10} g)의 2kb DNA가 실제 검출이 가능하다. 그러나, PCR법으로는 그 50만분의 1, 즉 0.2×10^{-18} g의 2kb크기의 DNA만 있어도 검출이 가능해졌다. 2kb의 이중 나선DNA(분자량은 약 1.3×10^6 g) 0.2×10^{-18} g/ $1.3 \times 10^6 = 0.15 \times 10^{-24}$ mole로서 여기에 Avogadro수 6×10^{23} 을 곱하면 분자수 0.09가 된다.

즉, PCR법에 의하면 임상가검물중에 2kb-DNA가 0.09분자수만 있어도 이론적으로 검출이 가능하다는 것이다. 0.09분자수란 실제로는 존재하지 않는 수치이므로 이는 결국 검체중에 1분자의 DNA만 있어도 PCR법으로 검출이 가능

하다는 이론상의 결론을 얻을 수 있다.

반면, PCR법에는 몇가지의 단점이 관찰된다; (1)PCR법은 primer DNA를 필요로 하므로 DNA배열이 밝혀져 있는 것만이 대상이 된다. (2)증폭의 효율이 반응조건, primer 배열, 및 가검물내 DNA의 순도등에 따라 다르므로 DNA의 정량적인 분석이 어렵다. (3)감도가 너무 높기 때문에 다른 가검물이 혼재되어 있을 때에는 문제가 되는 경우도 있다. 예를 들면 출생전 진단을 용모를 사용하여 시행할때 모친유래의 세포(혈액세포등)가 아주 적은 양이 존재하여도, 판정에 혼란을 야기시키는 경우가 있다.

가검물에 존재하는 DNA의 분리

여러가지 DNA분리방법이 사용되는데 여기서는 시료의 종류에 따라 간단히 기술하고자 한다. DNA분리과정중에는 몇가지 원칙만 지키면 여러 문제점들을 피할 수 있다. 각 가검물별 DNA분리방법들의 예를 들면 다음과 같다.

A) 연조직(soft tissue)이나 세포부유액(cell suspension)의 경우는 NaOH존제하에 5분간 열탕한 후 원침하는 정도로 족하다.

B) 경조직(hard tissue)는 잘게 썬(slicing)후 proteinaseK를 사용하고 phenol/chloroform으로 DNA를 추출해야 한다.

C) 파라핀 포매조직(paraffin-embedded tissue)은 파라핀을 메스로 제거하고 잘게부순 후 proteinaseK처리전에 xylene으로 왁스성분을 제거해야 한다²⁵⁾.

D) 포르말린 고정조직(formalin-fixed tissue)은 PCR에 사용할 정도의 DNA를 얻을 수 있으나 포르말린 처리시간이 길면 DNA crosslinking에 의해 실제 PCR에 사용가능한 양은 감소할 수 있다²⁵⁾.

E) 이외에도 glass bead나 zirconium bead를 사용, bead-beating을 통한 물리적인 방법으로 세포를 파괴시킨 후에 DNA를 추출하는 방법도

매우 효율적인 것으로 알려져 있다²⁶⁾.

PCR산물의 분석

A) 겔 전기영동(gel electrophoresis) : Nusieve agarose 겔(gel)을 사용하면 10bp~2kb의 DNA 단편을 분별할 수 있다. 보다 높은 해상도를 위하여는 polyacrylamide gel(8~10%)을 사용하나 신경독성(neurotoxicity)이 있으므로 사용시에 주의를 요한다.

B) Restriction fragment length polymorphism (RELP)²⁷⁾ : 이제까지는 게놈 DNA를 분리해서 agarose겔 전기영동 후 여과막에 DNA를 Southern blotting한 다음 방사성동위원소가 표식된 DNA probe를 사용하여 hybridization하였으나, PCR을 사용하면서부터는 관심있는 제한부위를 중심으로 그 전의 DNA만을 증폭하여 그 제한부위의 존재여부 혹은 갯수에 의하여 PCR산물을 분석하는 방법이 가능해졌다. 이는 소량의 DNA만을 사용 방사성동위원소를 쓰지 않고도 24시간내에 PCR산물의 분석이 가능한 장점을 가지고 있다. 우선 관심있는 제한 부위를 중심으로 한 DNA염기배열을 알아야 하며 목적하는 DNA의 크기(약 100~200bp가 좋음)를 선정하여 그 DNA양단의 15~40bp의 배열을 primer로 사용하여 DNA를 증폭시킨다. 또 대부분의 PCR 산물은 그 자체로서도 제한효소에 의해 잘 소화되나 그렇지 못한 경우는 부득불 phenol/chloroform추출로 DNA를 정제한 후 제한효소로 소화시켜야 한다. 이때는 항상 대조군을 넣어 불완전소화에 의한 해석의 오류를 방지하도록 해야 한다. 제한효소에 의하여 소화된 DNA 단편의 크기는 polyacrylamide gel을 사용하여 판별할 수 있게 된다.

C) 다른 한편의 방법은 allele-specific oligonucleotide (ASO)를 probe로하여 hybridization을 통하여 정상형과 변이형을 분석하는 방법이다. PCR산물은 게놈 DNA보다 매우 높은 농도로

존재하므로 이와같이 작은 크기의 oligonucleotide probe로도 분석이 가능하다.

PCR의 민감도와 특이도증강⁴⁾

A. Nested PCR(nPCR)

이 nPCR의 원리는 한번 PCR을 시행한 후 PCR 산물을 주형(template) DNA로 하여 PCR을 다시 한번 시행하는 것이다. 첫번째 PCR은 바깥쪽 primer쌍을 사용해서 시행하고 두번째 PCR은 안쪽 primer쌍을 사용해서 시행한다. 첫번째 PCR에서 생긴 보다 큰 DNA 단편이 두번째 PCR의 주형이 된다. 이렇게 두번 PCR을 시행하는 것이 (한번에 25 주기를 한다면) 단순히 PCR을 50주기 반복하는 것보다 1000 배 정도의 민감도를 얻을 수 있다. 이는 작은 DNA 단편이 PCR증폭시에는 보다 효율적으로 사용되기 때문이다.

PCR의 특이도는 증폭하고자 하는 DNA염기배열 양말단에 결합하는 primer에 의하여 결정되는데 nPCR에서는 이 primer를 2회에 걸쳐 사용하므로 1회만 사용하는 일반적인 PCR보다는 월등한 특이도를 보인다.

가검물이 아주 불순하거나 미량의 DNA를 사용할 경우 PCR의 민감도에 문제가 생긴다. 이 nPCR법을 사용하면 DNA증폭에 있어서 민감도 및 특이도를 모두 증가시킬 수가 있다(Fig. 2).

B. Hot nested PCR

그 원리는 nPCR과 같으나 단지 두번째 PCR 시에 5'-말단에 polynucleotide kinase를 사용하여 방사성동위원소를 표식시켜 PCR을 시행하는 차이점이 있다. 또한 생산된 'hot' nPCR 산물은 고해상도의 polyacrylamide denaturing gel에서 크기를 정확히 판별할 수 있다.

여기서 'hot'이라는 말은 방사성동위원소를 사용한다는 뜻으로 이 경우 민감도를 nPCR보다 더욱 증강시킬 수 있다. 또한 polyacrylamide gel의 고해상도를 통하여 매우 드문 염기배열의 검출이나 지속성 바이러스 감염의 연구에 적합

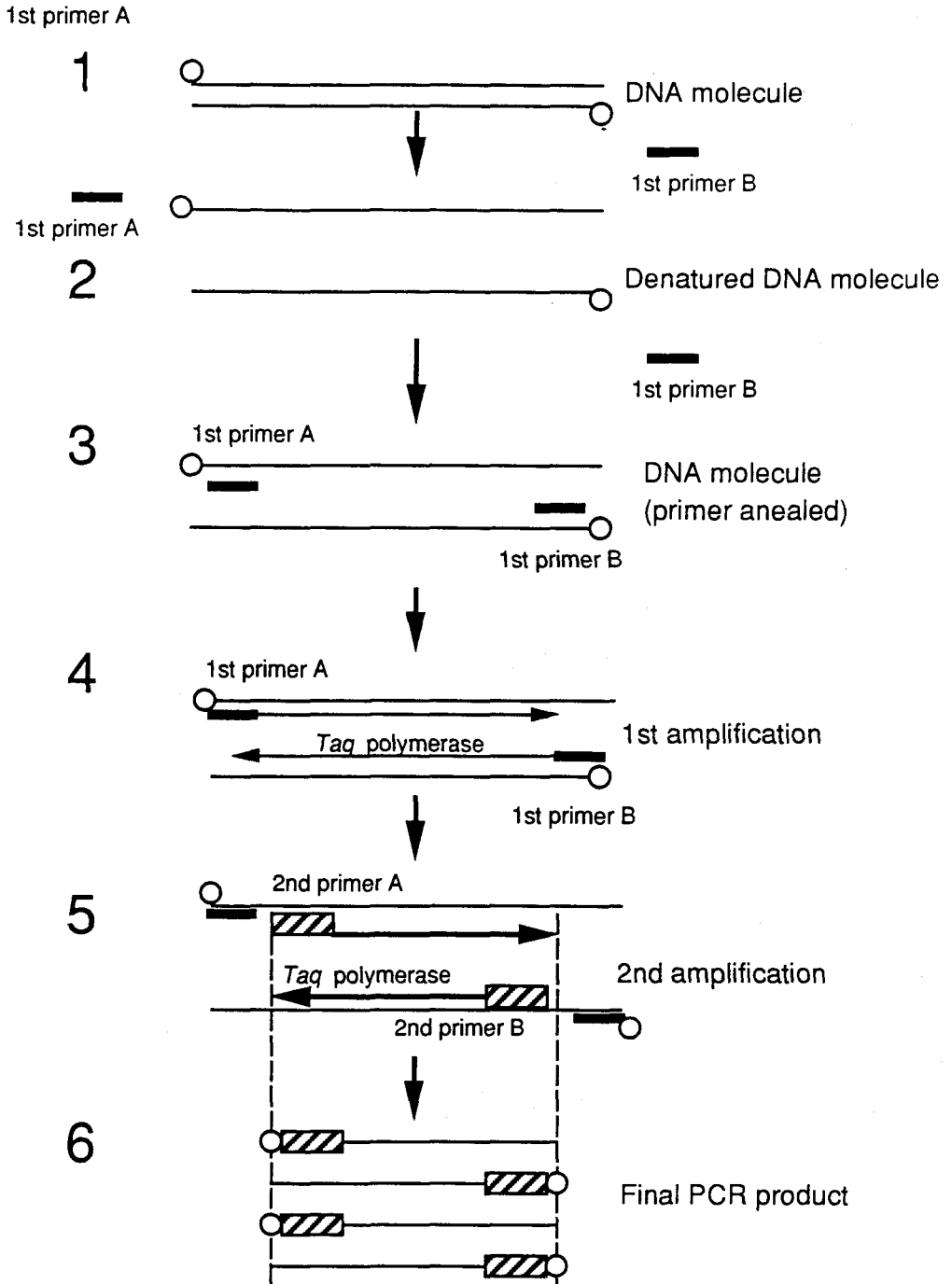


Fig. 2. Principle of the nested PCR which increases both the sensitivity and specificity of the PCR reaction using nested primers.

한 것으로 알려져 있다.

C. PCR시 DNA오염(contamination)의 방지

PCR을 진단목적으로 사용하는데 있어서 가장 큰 문제점은 DNA를 포함한 핵산의 오염에 의한 위양성결과이다. 더우기 같은 primer쌍을 가지고 같은 PCR산물(amplicon)을 계속 증폭하는 실험실에서는 아무리 주의해도 쌓이는 amplicon들에 의한 오염이 흔히 일어나게 된다.

예를 들면 10⁻⁶ml정도의 물방울도 10⁵분자수 정도의 amplicon을 함유할 수 있으므로 이러한 amplicon은 마치 날아다니는 DNA에 의한 오염의 인상을 준다. 또한 amplicon오염의 경우에는 확실하게 목적하는 PCR산물이 가검물로부터 생성되는 듯이 보이므로 결과 판정에 있어서 혼란을 초래하게 된다.

이러한 DNA오염을 방지하기 위해서는 다음의 두 단계의 주의가 필요하다.

(1) 제1단계 주의사항 ;

(i) 가검물 DNA준비장소, PCR반응혼합액 (primer 포함) 만드는 장소, PCR반응장소(thermal cycler의 위치), 및 PCR산물의 전기영동장소들을 모두 따로 격리된 장소를 사용하여야 한다.

이 중에서도 특히 PCR반응혼합액 만드는 장소와 PCR반응 및 전기영동장소는 서로 다른 방으로 해 주는 것이 필수적이다. 서로 다른 방에는 각각 pipette을 따로 써야 한다.

(ii) 사용하는 모든 pipette tip은 일회용으로 하되 tip상부에 숨을 쫓아 pipette의 끝에 DNA가 묻어 다른 tube로 전파되는 것을 방지하여야만 한다.

(iii) 항상 일회용 비닐장갑을 착용하고 실험하도록 한다. 장갑은 수시로 교체해 주는 것이 좋으며 특히 격리된 장소사이를 오갈때에는 반드시 교체해 주어야 한다.

(iv) PCR에 사용되는 시약은 크게 들로 나누어 각각 다른 냉동고(-20℃이하)에 보관해야 한

다.

가장 문제가 되는 것이 primer의 오염이므로 PCR혼합액은 반드시 독립된 장소에서 만들고 primer는 여러개로 분주하여 보관한 후 하나씩 녹여서 사용하도록 한다.

그럼에도 불구하고 primer용액이 amplicon에 의하여 오염되었을 때에는 이 오염된 primer용액을 변성 polyacrylamide 겔 전기영동 후 primer에 해당하는 DNA띠 (band)만을 젤로부터 잘라내어 'Crush and Soak'법에 의하여 amplicon이 오염되지 않은 primer를 추출, 재정제할 수 있다.

(v) PCR에 사용된 모든 pipette tip과 tube들은 1회용으로 재사용하면 안된다.

(vi) 여러개의 시료를 사용하여 실험할 경우 두개 이상의 tube뚜껑을 동시에 열어 놓지 않도록 한다.

(vii) PCR중에 DNA오염이 발생했는지를 판정하기 위해 가검물 DNA대신에 증류수를 넣은 PCR을 항상 동시에 시행하여 아무런 PCR산물도 생기지 않는 것을 확인할 수 있는 대조가검물을 병행하여야 한다.

(2) 제2단계 주의사항

제2단계 주의사항은 적극적으로 amplicon들을 파괴시킴으로써 오염을 방지하는 방법이다. 이는 PCR반응전에 시행하는 것과 반응 후에 시행하는 것으로 양분된다.

(i) PCR반응전 소독(PrePCR sterilization) ;

효소를 사용하는 방법으로 dNTP중 dTTP를 dUTP로 대체하여 PCR반응혼합액에 넣어준다. 그러면, 생성되는 amplicon은 thymine대신에 uracil을 함유하게 된다.

따라서, 시료의 DNA(thymine함유)와 amplicon의 DNA가 구분가능하게 되고 uracil-n-glycosylase(UNG)라는 효소를 사용하면 uracil이 떨어져 나와 amplicon DNA만을 선택적으로 파괴시킬 수 있다. 이는 PCR반응혼합액에 UNG를

넣고 실온에서 약 10분간 반응시키면 된다.

94°C에서 10분간 가열하여 UNG를 파괴시킨 후 PCR반응을 시행한다. 단지 이 방법은 가열에 의해 UNG가 완전히 파괴되지 않을 경우 PCR의 민감도를 저하시키는 단점이 있다.

(ii) PCR반응후 소독 ;

이는 psoralen유도체인 4'-aminoethyl-4,5'-dimethyl-isopsolaren (4'-AMDMIP)를 사용한다.

이 물질을 PCR반응 혼합액속에 PCR반응전에 넣어 주고 PCR후에 긴 파장(300~400nm)의 자외선을 조사하면 이 자외선이 tube를 투과하여 반응혼합액속의 isopsolaren을 활성화시켜 pyrimidine잔기와 cyclobutane adducts를 만들어 다음번 증폭시에는 Taq DNA중합효소가 이를 주형 DNA로 사용하여 DNA를 증합할 수 없게 된다. 대개 300bp정도의 길이에 50% G+C content를 갖는 amplicon은 거의 완벽하게 소독이 가능하다.

이의 문제점은 PCR산물을 검정하기 위하여 probe를 써서 hybridization하고자 할때 PCR산물 DNA내에 isopsoralen이 crosslink를 이루고 있으므로 떨어지는 hybridization의 효율을 보충해 주어야 하는 것이다.

PCR을 사용한 DNA진단의 실제 예

본교실에서 시행하고 있는 감염증의 진단을 위한 PCR중 결핵 및 나균검출에의 응용에 관하여 실례를 들고자 한다.

결핵균의 검출

결핵균의 검출을 위한 PCR산물의 크기는 123 bp이다. 균배양양성인 가검물을 사용한 PCR산물의 polyacrylamide 겔 전기영동결과가 Fig. 3에 제시되어 있다. 배양결과가 양성인 것 뿐 아니라 음성인 경우에도 결핵균에 특이한 123bp의 PCR산물을 관찰 할 수 있어 PCR의 높은 민감도를 보여주고 있다. 또한 결핵균이외의 항상균

(mycobacteria other than tubercle bacilli, MOTT)에서는 이 PCR산물이 관찰되지 않아 이는 PCR에 사용한 primer의 특이도를 보여주고 있다. 이들 PCR산물은 그 크기만 확인한 것이므로 보다 확실하게 목적하는 DNA인지를 알기 위하여는 결핵균의 IS6110 DNA를 probe로 사용하여 hybridization을 시행해야 한다. PCR을 시행하기 전의 주형 DNA및 PCR시행후의 PCR산물중 각각 2.5µl를 취하여 dot blot hybridization을 시행한 결과 123bp를 보인 모든 경우에서 probe DNA와 hybridize함을 알 수 있었다(Fig. 4).

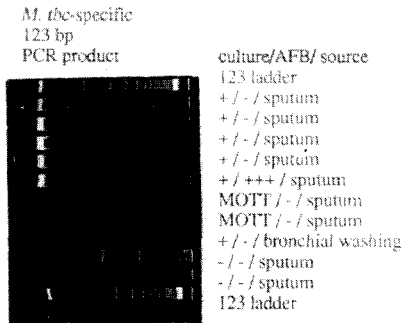


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of M. tuberculosis-specific PCR products which shows no amplification in specimens containing mycobacteria other M. tuberculosis(MOTT) or no mycobacteria.

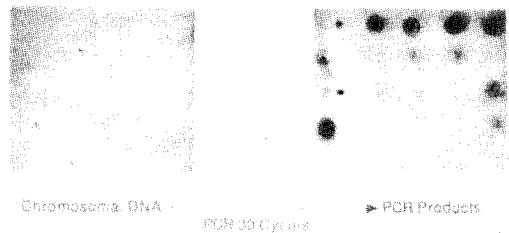


Fig. 4. Dot blot hybridization of PCR products from clinical specimens with ³²P-labeled 123bp DNA fragments prepared from M. tuberculosis chromosomal DNA as a probe.

나균의 검출

R1 및 R2 primer를 사용하는 경우 증폭이 예상되는 DNA의 크기는 360bp이다. Armadillo에서 자란 나균 및 나환자의 혈액을 가검물로 한 PCR결과가 Fig. 5에 나와있다.

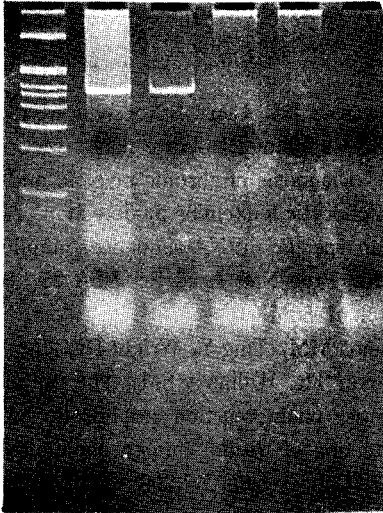


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of *M. leprae*-specific PCR products. Lanes show pBR322 digested with *Hinf*I *M. leprae* DNA from armadillo tissue, DNA from blood of leprosy patient, DNA from blood of normal person, pBR 322 DNA, and distilled water, from left.

결 론

PCR법은 미량의 DNA로부터 어떤 특정의 DNA를 1일 정도에 수십만배까지 증폭하는 방법으로 유전병의 진단, 감염의 유무를 알기 위한 세균이나 바이러스의 검출, 암의 예후를 진단하기 위한 활성 암유전자의 검출 및 개인식별등 각분야에의 응용이 활발히 진행되고 있다.

PCR법의 원리는 증폭하고자 하는 DNA영역의 양말단에 각각 결합하는 두종류의 짧은 DNA

(primer)를 사용하여 내열성인 *Taq* DNA중합효소로 DNA를 신장시키며 이를 반복함으로써 DNA는 기하학적으로 증폭된다. 증폭된 DNA는 전기영동 및 ethidium bromide염색에 의해 크기 및 존재를 확인할 수 있다.

PCR법은 미량의 가검물이라도 분석가능하고 분석이 단 시간내에 이루어진다. 또한 DNA시료의 양이 적거나 단편화되어 있어도 목적하는 부위만 포함하고 있으면 분석이 가능한 장점을 가지고 있다.

반면, PCR법은 적어도 primer로 사용할 부분의 DNA염기배열은 알고 있어야 분석이 가능하고, 효소에 의한 중합과정에서 오류가 발생할 가능성이 있다. 또한 민감도가 높아 DNA오염(contamination)등에 의해 위양성이 나올 수 있는 단점을 가지고 있으나, 이러한 문제들에 대한 해결방안들이 나오고 있어 이 획기적인 방법이 병원의 검사실에서도 감염증의 진단 및 암세포의 활성화에 의한 예후를 판정하는 검사방법으로서 일상적으로 사용될 날이 곧 올 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Southern EM : Detection of specific DNA sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 : 503-517. 1975
2. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Armheim N : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354, 1985.
3. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Durmmond R, Gelfand DH : Isolation,

- characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. J Biol Chem 264 : 6427-6437, 1989.
4. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ : PCR protocols. a guide to methods and applications. Acad Press, Inc pp325-415, 1989.
 5. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487-546, 1988.
 6. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA : DNA typing from single hairs. Nature(London) 332 : 543-546, 1988.
 7. Li HH, Gyllensten UB, Cui XF, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N : Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature (London) 335 : 414-417, 1988.
 8. Ehlen T, Dubeau L : Detection of *ras* point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. Biochem Biophys Res Commun 160 : 441-447, 1989.
 9. Newton CR, Kasheker N, Graham A, Powell S, Gammack A, Riley J, Markham AF : Diagnosis of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. Nucleic Acids Res 16 : 8233-8243, 1988.
 10. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nauyen PN, Casckey CT : Detection screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res 16 : 1141-1156, 1988.
 11. Gibbs RA, Nguyen PN, McBride LJ, Keopf SM, Daskey CT : Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated direct DNA sequencing of in vitro amplified cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 1919-1923, 1989.
 12. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J : An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. application to hemophilia A. N Engl J Med 317 : 985-990, 1987.
 13. Debrovic A, Trainor KJ, Morley AA : Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. Blood 72 : 2063-2065, 1988.
 14. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne M, Smith SD, Camplin R, Witte ON, McCormick FP : Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 85 : 5698-5702, 1988M
 15. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM : The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papilloma viruses. Cancer cells 7 : 209-214, 1989.
 16. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frerault V, Nassif X, Hance AJ : Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet ii : 1069-1071, 1989.
 17. Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH : Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*, J Clin Microbiol 26 : 2240-2245, 1988.
 18. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT : Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis 161 : 977-981, 1989.
 19. Hance AJ, Grandhamp B, Levy-Frebault V, Lecossier D, Rauzier L, Bocart D, Gicquel B : Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 3 : 843-849, 1989.
 20. Pao CC, Lin SS, Wu SY, Juang WM : The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes.

- Tubercle 59 : 27-36, 1988.
21. Pao CC, Yen TSB, You JB, Mas JS, Fiss EH, Chang CH : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol 28 : 1877-1880, 1990.
 22. Patel RJ, Fries JWU, Piessens WF, Wirth DF : Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 28 : 513-518, 1990.
 23. Cho SN, Lee TY, Yoon KH, Chung DH, Chong YS, Kim JD : Derection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction. J Kor Soc Microbiol 25 : 491-499, 1990.
 24. Plikaytis BB, Gelber RH, Shnnick T : Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer amplification assay. J Clin Microbiol 28 : 1913-1917, 1990.
 25. Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL : Analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun 142 : 710-716, 1987.
 26. Yoon KH, Lee TY, Cho SN, Kim JD, Chung DH, Kim JD : Comparison of DNA preparation methods from *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens for polymerase chain reaction. J Kor Soc Microbiol 26 : 159-166, 1991.
 27. Manistis T : Molecular cloning. a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982.