

칩 기반 등온 증폭반응법을 이용한 폐암에서의 EGFR 유전자 돌연변이 검출 시스템 개발

안영창 · 박수민 · 서재원 · 윤일규 · 정덕현 · 이은영 · 남윤형 · 장원철* · 권필승¹ · 김종완²

단국대학교 첨단과학대학 화학과, ¹단국대학교병원 진단검사의학과,

²단국대학교 의과대학 진단검사 의학교실

(2009. 4. 30. 접수, 2009. 10. 22. 승인)

Chip-based isothermal amplification method for EGFR gene mutations in lung cancer

Young-Chang Ahn, Su-Min Park, Jae-Won Seo, Il-Kyu Yoon, Duck-Hyun Jung,
Eun-Young Lee, Youn-Hyoung Nam, Won-Cheoul Jang*, Kwon Pil Seung¹ and Jong Wan Kim²

Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute,
Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

¹Department of Laboratory Medicine, Dankook University Hospital Cheonan 330-715, Korea

²Department of Laboratory Medicine, Dankook University College of Medicine,
Cheonan 330-715, Korea

(Received April 30, 2009; Accepted October 22, 2009)

요 약: 폐암은 전 세계적으로 높은 사망률 때문에 죽음에 이르게 되는 암이다. 폐암은 소세포암과 비소세포암 두 종류로 나누어 지는데 비소세포암 환자에서 EGFR 돌연변이가 발견되었고 이 EGFR 돌연변이는 방사선치료와 EGFR tyrosin kinase의 저해제인 gefitinib과 erlotinib의 반응에도 연관되어진다. 이와 같이 EGFR 돌연변이의 검출은 효과적인 치료방법을 제시해 줄 수 있을 것이다. 본 연구에서는 간단하고 값이 싸며, 반응시간이 더 빠르게 유전자 다형성을 검출 할 수 있는 칩-기반 등온증폭반응을 수행하였다. 그 결과, 이 등온증폭 방법은 빠른 증폭 시간과 높은 민감성, 특이성을 가지고 있었으며 현증 검증에서 EGFR 돌연변이를 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 유용한 방법이 될 것이다.

Abstract: Lung cancer is the main cancer on the world today, due to the high case fatality. Lung cancer can divide into two major types, such as small-cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC). Mutations in the epidermal growth factor receptor (EGFR) have been described in patients with advanced NSCLC. Mutations in the EGFR are associated with clinical and radiographic responses to EGFR tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. Thus, the detection of EGFR mutation can offer an effective information in clinical decision-making. In this study, We developed very simple, cheap and rapid mutation detection system by chip-based isothermal amplification method. The method described here has shown the advantages of rapid amplification, high sensitivity, and specificity. Also, it will be useful for rapid and reliable clinical diagnosis of EGFR mutation.

Key words: Chip, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), Isothermal Amplification, Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)41-550-3433 Fax : +82-(0)41-550-3438

E-mail : wjang@dankook.ac.kr

1. 서 론

폐암은 침습성과 전이성이 높은 악성종양으로 전 세계적으로 암 사망률 1위를 차지하고 있을 만큼 치유가 힘든 암 중의 하나이다. 한국에서도 2000년도에 들어서 폐암의 주원인이 되는 흡연율이 증가하면서 위암보다 사망률이 높아져 폐암이 사망률 1위를 차지하고 있다. 위암의 발생률이 1위임에도 불구하고 폐암의 사망률이 1위인 것은 위암에 비해서 조기 진단율이 낮기 때문이며 의학기술의 상당한 발전이 있었음에도 불구하고 이미 진행된 폐암은 치유가 힘들며 5년 후 생존율이 14%일 정도로 예후가 좋지 않다.^{1,3}

폐암의 종류는 임상적으로 크게 두 종류의 소세포암과 비소세포암으로 구분하고 이 중 비소세포폐암 환자의 10~15%에서 EGFR 돌연변이가 검출된다.^{4,5} EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)이란 상피 성장인자 수용체로 EGFR의 변이는 종양조직에서만 나타나는 체세포의 변이이다. EGFR의 비정상적인 발현은 EGFR ligand와 발현, EGFR의 증폭, EGFR의 변이 등의 기전에 의하여 발생한다. 이 EGFR 돌연변이는 EGFR tyrosine kinase domain의 exon 18~21에 위치하며 EGFR tyrosine 억제제인 gefitinib과 erlotinib에 임상적으로 반응하는 환자 중 80%에서 검출된다. exon 18~21 중 exon 19에서의 돌연변이가 약 45%를 차지하며 exon 21에서는 약 40~45%를 차지한다고 보고되고 있다.^{6,11}

일반적으로 DNA 분석에 많이 사용되는 방법 중 하나는 PCR-direct sequencing 방법이다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 소요되며 비용이 비싸고 신속한 진단에 어려움이 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 신속하고 감도 높은 비대칭 등온증폭법(SMART Amplification Process, SMAP)에 의한 EGFR exon 19의 검출 방법에 대해 연구하였다.¹²

본 연구에서 가장 특징적인 것은 등온증폭장비에 칩을 넣어 반응 후 칩의 색변화를 직접 눈으로 확인할 수 있으며 기기의 사용법이 간단하고 가벼워 장소에 구애받지 않고 임상진단 실험실 및 기타 어느 장소에서도 검사가 가능하다는 강점을 가지고 있다는 것이다.

본 연구에서는 칩을 이용한 비대칭 등온증폭법을 사용하여 EGFR exon 19의 돌연변이를 칩의 색변화로 확인하였으며, 전기영동 및 염기서열분석법을 동시에 수행하였다.

2. 실험 및 방법

2.1. 시료

본 연구에서는 단국대학교병원의 비소세포폐암으로 진단 받은 환자의 FFPET (formalin-fixed paraffin-embedded tissue) 슬라이드를 받아 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

2.2.1. 시약

FFPET에서 genomic DNA 추출 시 사용한 xylene은 Sigma 제품을 사용하였고, PCI-9 (phenol chloroform isoamyl alcohol)은 bioWORLD (U.S.A) 제품을 사용하였다. DNA 증폭반응에 *Bst.* DNA polymerase는 New England Biolabs (U.S.A)에서 구입하여 사용하였으며 색 확인시 사용한 SYBR Green I은 invitrogen (U.S.A) 제품을 사용하였다. 전기영동의 agarose는 Q-bio gene (U.S.A) 제품인 QA-AgaroseTM를 이용하였다.

2.2.2. 기기

DNA의 증폭은 칩을 이용한 등온증폭장비에서 증폭하였으며, 증폭산물의 확인은 Mupid- α (Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. FFPET에서 genomic DNA 추출

FFPET 슬라이드를 칼로 긁어서 2 mL 원심분리 튜브(tube)로 옮기고 1 mL의 xylene을 넣고 강하게 섞어 주었다. 그 후 5 분 동안 상온에서 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. pellet이 떨어져오지 않게 상층액을 조심히 제거한 후, 한 번 더 1 mL의 xylene으로 처리하고 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 1 mL의 ethanol을 넣고 강하게 섞어준 후, 5 분 동안 상온에서 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. pellet이 떨어져오지 않게 상층액을 제거하고, 한 번 더 1 mL의 ethanol을 넣고 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 튜브를 열고 65 °C에서 ethanol이 완전히 증발 할 때까지 건조시켰다. 튜브에 400 μ L의 조직분해 완충용액(tissue lysis buffer)과 20 μ L의 Proteinase K (20 mg/mL)를 넣고 70 °C에서 1 시간 동안 반응 시켰다. 그리고 튜브에 동량의 PCI-9 (phenol chloroform isoamylalcohol 25:24:1)를 넣고 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5 mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 상층액을 옮긴 튜브에 2 M sodium acetate를 30 μ L와 차가운 100% ethanol를 900 μ L 넣은 후 가볍게 섞어주었다. DNA

Table 1. Primer sequence sets used to amplify EGFR gene for SMAP

		Sequence of primers (5'→3')	Size of oligo(bp)
Exon 19	FP	ACCTTCTACCCTCAGAAGGTAGGATTCCTTGTTGGC	37
	TP	GTTTGTATAGCGCTCTGGATCCCAAGAAGGT	30
	BP	CGGGAATTTAACTTT	16
	CP	TATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATC	28
	OP1	CTCTCTCTGTCATAGG	16
	OP2	AGCAGAAACTCACATC	16

의 수율을 최대화하기 위해 -20 °C에서 30 분 동안 두었다. 그 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 한 후 상층액을 버렸다. 70% ethanol를 500 µL 넣고 가볍게 섞어 준 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거했다. Ethanol을 완전히 제거하기 위해 오븐에서 1시간 30분 동안 건조 시킨 후 50 µL의 용리 완충용액(elution buffer)을 넣었다. 이렇게 분리한 DNA는 곧바로 실험에 사용하거나 4 °C에 보관하고, 장기간 보존하기 위해서는 -20 °C에 저장하였다.

2.4. 비대칭 등온증폭반응(SMAP)

Table 1의 등온증폭 반응 primer set를 이용하여 각 시료의 증폭산물을 얻었다. 총 20 µL의 반응용액 (Table 2)은 PreMix 18 µL와 DNA 2 µL로 구성되었으며 PreMix는 한번에 제조하여 0.2 mL PCR 반응 튜브에 18 µL씩 동량 분주한 후, DNA를 첨가하였다. 20 µL의 반응용액과 SYBR Green I 100X 6 µL를 칩의 두 주입구에 각각 넣고 등온증폭장비를 사용하여 비대칭 등온증폭법으로 DNA를 증폭시켰다. 증폭 후 펌프가 작동하여 두 시약을 섞어주었다. 이 때 SYBR Green I이 DNA와의 결합으로 형광강도가 증가하여

Table 2. Condition of working solution for SMAP

Components of premix solution	Volume
<i>Bst.</i> 10X reaction buffer (10 mM tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM(NH ₄) ₂ SO ₄)	2 µL
10 mM dNTP mix (2.5 mM each)	2 µL
Forward primer (10 pmole/µL)	0.5 µL
Reverse primer (10 pmole/µL)	0.5 µL
FP (10 pmole/µL)	1 µL
TP (10 pmole/µL)	1 µL
BP (10 pmole/µL)	1 µL
CP (10 pmole/µL)	2 µL
<i>Bst.</i> Polymerase(5 U/µL)	1.5 µL
Template DNA (25 ng/µL)	2 µL
Deionized water	6.5 µL
Total	20 µL

Table 3. Condition of SMAP cycle

Condition	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
Initial denature	63	0	
Denature	63		
Annealing	63	60	
Extension	63		

눈으로 확인 할 수 있게 된다.

2.5. Agarose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인

2% (w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid-α (Advance, Japan) 전기영동장치로 PCR 산물을 분석하였다. agarose 2 g을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 0.5X TBE (Tris-boric acid-EDTA) 완충용액 100 mL을 채운 후에 전자렌지에서 2~3 분 동안 녹인 후 용액을 gel 용기에 부어서 30 분 정도 굳혀 2% agarose gel을 만들었다. gel이 완전히 굳은 것을 확인하고 comb을 뽑고 준비가 됐으면 전기영동장치에 0.5X TBE 완충용액을 채운 후 증폭산물 4 µL와 6X Loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol) 0.8 µL를 섞어서 4.8 µL씩 loading했다. 100 V에서 25 분 동안 전기영동 시켰다. 그 후에 젤을 떼어내어 ethidium bromide (EtBr)로 10 분간 염색하고 다시 10분간 증류수로 DNA와 결합하지 못한 EtBr을 씻어냈다. 그 후 UV transilluminator 위에 agarose gel을 올려놓고 반응여부를 확인했으며 마지막으로 염기 서열분석법으로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 비대칭 등온증폭법에 의한 EGFR 돌연변이 검출

본 연구에서 사용된 비대칭 등온증폭반응은 DNA

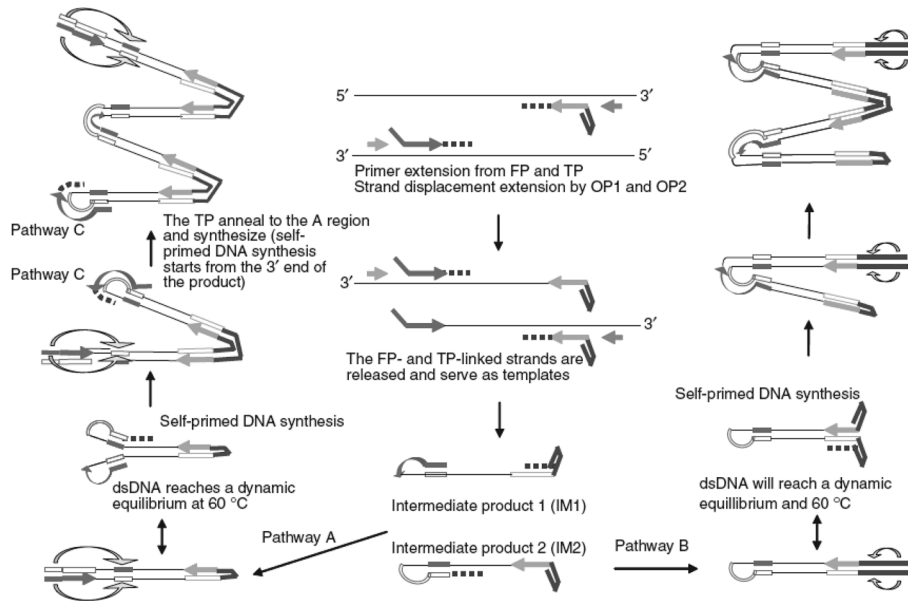


Fig. 1. SMAP amplification process.



Fig. 2. Isothermal Amplification Device.

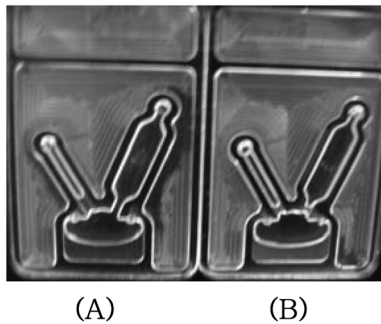


Fig. 3. Chip-based isothermal amplification for EGFR exon 19 gene.

증폭에 일반적으로 사용되는 PCR보다 증폭시간을 단축할 수 있으며 높은 감도를 나타낸다. SMAP 반응에

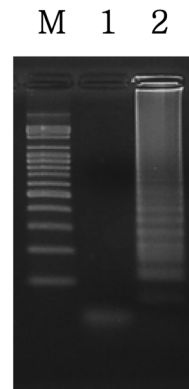


Fig. 4. Electrophoresis of amplicons. Lane 1: wild type, Lane 2: mutant type, Lane M: sizing control.

서는 5개의 primer를 사용하는데 이 5개의 primer가 SNP나 돌연변이를 인지하고 구별하여 효과적으로 증폭하게 한다(Fig. 1).

Table 1의 등온증폭 반응 primer set와 새로 고안하여 개발한 칩을 이용할 수 있는 등온증폭장비(Fig. 2)를 사용하여 증폭산물을 얻었다. Fig. 3은 EGFR 돌연변이의 칩의 색변화를 나타낸 것이며 Fig. 4는 증폭된 산물을 이용하여 agarose gel 전기영동을 통해 확인 한 것이다. Fig. 5는 염기서열분석을 통해 비교하였다.

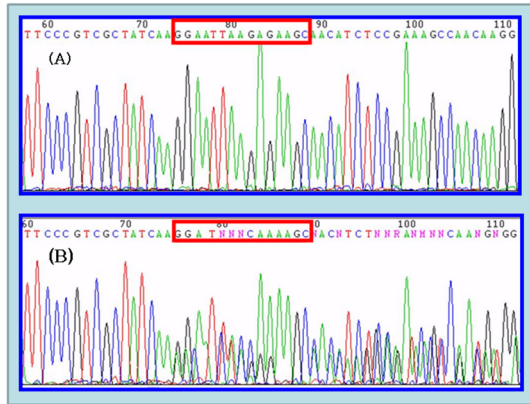


Fig. 5. Sequencing analysis of EGFR exon 19 gene. (A): Wild type, (B): Mutant type. A deletion at position 2235-2249 in exon 19(Δ E746-A750).

4. 결 론

폐암은 종류에 따라 치료방법이 달라지며 비소세포암 환자의 일부에서 gefitinib과 erlotinib에 대한 효과가 현저하게 좋아졌으며 그들의 공통적인 특징은 비흡연자, 여자, 동아시아계, 선암종 이었다. 폐암의 빠른 진행성과 높은 전이성을 고려할 때 조기 진단이 가장 중요하다.¹³⁻¹⁵

단국대학교 병원에서 비소세포폐암으로 진단 받은 환자를 대상으로 FFPET에서 genomic DNA를 추출하여 칩을 기반으로 한 비대칭 등온증폭법을 이용하여 돌연변이를 검출하였다. 그 결과 칩의 색으로 돌연변이의 검출을 확인 할 수 있었으며 agarose gel 전기영동과 염기분석반응에 의해 EGFR 유전자의 증폭산물을 확인 하였다.

PCR을 사용하여 돌연변이를 검출시 2~3시간이 소요되는 반면 등온증폭 방법은 Taq. DNA polymerase 대신 Bst. DNA polymerase를 사용하여 변성, 접합, 신장에 온도변화를 주지 않고 일정 온도에서 이 변화를 모두 시행함에 따라 실험시간을 60분으로 단축할 수가 있었다.

본 연구자들은 칩을 이용한 등온증폭법을 통해 EGFR 돌연변이 뿐만 아니라 병원성 미생물의 검출이 필요한 장소에서 현장검증이 가능 할 수 있도록 개발할 예정이며, 칩을 통해 실험시간을 단축시키며 간단하게 돌연변이를 검출하는 방법을 제시하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의

지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과임

참고문헌

1. A. Jemal, K. C. Chu and R. E. Tarone, Recent trends in lung cancer mortality in the United States. *J. Natl. Cancer, Inst.* **93**, 277-283(2001).
2. D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani, Global cancer statistics, *CA Cancer. J. Clin.*, **55**, 74-108(2005).
3. S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman and D. A. Haber, *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 169-181(2007).
4. A. Kurup and N. H. Hanna, *Crit Rev Oncol Hematol*, **52**(2), 117-126(2004).
5. A. Spira and D.S. Ettinger, *N. Engl. J. Med.* **350**, 379-392(2004).
6. J. H. Schiller, D. Harrington, C. P. Belani, C. Langer, A. Sandler, J. Krook, J. Zhu and D. H. Johnson, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 92-8(2002).
7. T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavathal, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Chrisriani, J. Settleman and D. A. Haber, *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2129-39(2004).
8. W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris and H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13306-11(2004).
9. H. Shigematsu, L. Lin, T. Takahashi, M. Nomura, M. Suzuki, I. I. Wistuba, K. M. Fong, H. Lee, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, Z. Feng, J. A. Roth, J. Herz, J. D. Minna and A. F. Gazdar, *J. Natl. Cancer, Inst.* **97**, 339-46(2005).
10. S. F. Huang, H. P. Liu, L. H. Li, Y. C. Ku, Y. N. Fu, H. Y. Tsai, Y. T. Chen, Y. F. Lin, W. C. Chang, H. P. Kuo, Y. C. Wu, Y. R. Chen and S. F. Tasi, *Clin. Cancer. Res.* **10**, 8195-203(2004).
11. J. G. Paez, P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, Johnson BE and Meyerson M, *Sci.*, **304**, 1497-500(2004).
12. S. Kobayashi, *N. Engl. J. Med.*, **352**, 786-92(2005).
13. Uramoto, H. and Mitsudomi, T. *Br. J. Cancer.* **96**, 857-863(2007).

14. C. I. Henschke and O. S. Miettinen, Women's susceptibility to tobacco carcinogens, *Lung Cancer*, **43**, 1-5(2004).
15. P. B. Bach, M. W. Kattan, M. D. Thornquist, M. G. Kris, R. C. Tate and M. J. Barnett, Hsieh L. J. and C. B. Begg, *J. Natl. Cancer, Inst.* **95**, 470-478(2003).
16. Y. M. Coyle, A. T. Minahjuddin, L. S. Hynan, J. D. Minna, *J. Thoracic Oncology*, **7**, 654-61(2006).
17. O. Y. Gorlova, S. F. Weng, Y. Zhang, C. I. Amos, M. R. Spitz, *Int. J. Cancer*, **121**, 111-118(2007).
18. O., Catelinois, A. Logel, D. Laurier, S. Billon, D. Hemon and P. Verger, *Environ Health Perspect*, **114**, 1361-1366(2006).
19. M. Tokumo, S. Toyooka, K. Kiura, H. Shigematsu, K. Tomii, *Clinical Cancer Res.*, **11**, 1167-1173(2005).
20. T. M. Chin, Diyanah Anuar, Ross Soo and Wei Qi Li, *Clinical Chemistry*, **53**, 62-70(2007).