

자기방사능법에 의한 DNA *in situ Hybridization* 방법*

계명대학교 의과대학 해부학교실

장성익 · 최인장 · 이인환 · 김대광 · 양창현 · 정용욱

서 론

In *situ hybridization*은 염색체 상에서의 DNA-DNA 또는 RNA-DNA 분자접종 형성에 의해 유전자의 염색체 상의 위치나 양을 분자접종된 핵산의 자기방사된 은입자로써 직접 알 수 있는 방법으로 원리는 Gall과 Pardue(1969)에 의해 도입된 이래 최근에는 유전자공학의 발전으로 흥미있는 유전자를 cloning하여 순도가 높은 DNA probe를 얻어 nick translation법(Rigby 등, 1977)의 이용으로 비방사능이 극히 높은 DNA probe 제작이 용이하게 되어 단일 copy 유전자의 mapping이 가능하게 되었다.

그러나 *in situ hybridization*에 이용할 DNA probe를 nick translation으로 표식할 경우 DNA probe의 조건으로 길이가 1.0kb이하일 때는 검출 감도가 상당히 낮기 때문에 길이가 어느정도 길고, 상동성이 높은 것이야만하기 때문에 운반체 DNA인 플라스미드나 파아지계통에 삽입된 DNA길이는 2~3 kb이상의 단일 copy DNA를 사용하는 것이 좋으며 특히, 표식은 운반체 DNA와 결합된 형태를 사용하여 DNA변성 후에도 길이가 길어져 분자접종 형성시에 dextran sulfate의 존재하에서 표식된 DNA probe가 염색체 상의 상동적인 DNA와 수지상으로 연결되어 검출감도를 향상시킬 수 있으므로 Jhanwar등 (1983)은 0.5kb의 c-ras 암유전자족을 운반체 DNA에 삽입하여 대량배양으로 얻은 DNA probe를 이용하여 사람 염색체에서의 좌위를 결정하는 데 성공하였다.

DNA probe의 자기방사법을 위해 표식에 이용되는 동위원소는 Table 1에서와 같이 4가지 종류가 주로 이용되나 염색체 상에서의 검출에는 ^{125}I (Gerhard 등, 1981)와 ^3H (Harper 등, 1981)가 최적이나 ^{125}I 의 경우는 γ 선을 내어 실제적으로 감광되는 것은 Auger

전자이며 반감기도 ^3H 에 비해 훨씬 짧아 표식후 즉시 사용하여야 하며 방사선 피복의 위협이 따르나 ^3H 은 다소 검출 능력은 낮으나 반감기가 길어 표식된 DNA probe의 보관이 어느정도 가능하며 방사선 피복능도 훨씬 낮아 ^3H 를 사용하기 위한 특별한 시설이 요구되지 않는다.

그래서 ^3H 을 이용한 DNA-DNA 또는 RNA-DNA 분자접종법으로 중기염색체 상에서의 특이한 유전자의 좌위 결정(Henderson, 1982; Jhanwar 등, 1983; Schwab 등, 1984)과 바이러스로 감염된 세포내의 virus핵산 검출(Henderson 등, 1983; Gupta 등, 1985; Schuster 등, 1987; Maitland 등, 1987)에 성공하였다.

본 연구에서는 N-myc 암유전자을 DNA probe로 이용하여 ^3H 로 표식시켜 신경모세포종주 SK-N-BE 중기염색체에 존재하는 동질염색부위가 N-myc 암유전자로 증폭되어 있는지를 DNA *in situ hybridization*과 개량된 Q-banding법(Yoshida 등, 1975)을 이용하여 최적의 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

암유전자 N-myc의 증폭과 분리

플라스미드 pMF3-SEB1-Nmyc을 숙주세포 HB101에 형질전환시켜 LB 배양액으로 대량배양하여 CsCl농도구배를 이용하여 초원심분리하여 DNA probe로 이용하였다.

신경모세포종주 SK-N-BE의 배양과 염색체 표본 제작

신경모세포종주 SK-N-BE를 MEM(Minimal Essential Medium: Gibco)과 RPMI 1640(Gibco)을 1:1로 섞은 배양액에 56°C, 30분간 처리하여 불활성시킨

* 이 논문은 1988년도 계명대학교 특수과제 연구비로 이루어졌다.

Table 1. Use of radioactive isotopes in nucleic acid probe preparation

Radio-isotope	Decay	Half	Specific activity of dNTTP precursor (Ci/mmol)	Maximum probes specific activity (dpm/μg) using	Usage
³² P	β^-	14.3 days	-3000	7.5×10^8	Detects singel copy genes by filter hybridization only. Too energetic for most in situ techniques. Intensity screens to enhance image.
¹²⁵ I	electron capture	60 days	1500	4×10^8	As above but also useful for in situ hybridization. Particularly to chromosomes. Some signal scattering however.
³⁵ S	β^-	87.4 days	>600	1.5×10^8	Filter hybridization sensitivity limited probably to 2~5 copies per cell. Use of fluorographic enhancement desirable. Excellent for in situ hybridization giving high resolution detections.
³ H	β^-	12.43 days	-75	2×10^7	Not applicable to filter detections even with fluorographic enhancement. Very high resolution on in situ hybridization but use of all four DNA precursors ³ H labelled in probe is advisable.

FBS(Fetal Bovine Serum: Gibco)를 10% 되게 섞어 배양하였다. 증식기때 Colcemid(0.02μg/ml)를 첨가하여 90분후에 세포를 원심분리하여 세포를 집적하고, 0.075M KCl저장액을 5ml첨가하여 잘 섞어 37°C 배양기에 15분간 두었다. 고정액(초산: 메탄올=1:3)으로 세포를 고정한 후 염색체 표본을 일반적인 방법으로 만들었다.

DNA in situ hybridization

1) 염색체표본의 전처리

RNase(100μg/ml)를 염색체표본에 50μl 떨어뜨려 카버 글라스를 덮어 37°C에 1시간 처리후 세척하여 각급 에탄올로 탈수시키고 70% formamide/2×SSC 용액에서 70°C, 2분간 처리하여 DNA를 변성시켜 20°C의 각급 에탄올로 탈수시킨 다음 진공건조시켰다.

2) Nick translation

dATP+dGTP(Amersam kit, No 5500) 5μl, ³H-dCTP(New England Nuclear, 54.3Ci/mmol) 5μl, ³H-TTP(New England Nuclear, 103.3Ci/mmol) 10μl, DNA probe(pMF3-SEB1-Nmyc, 5μg) 1μl와 효소액

(DNase+DNA polymerase: Amersam kit) 5μl를 섞은 후 전체량이 25μl되게 3차 중류수를 첨가하여 15°C, 90분간 반응시킨 다음 연어정자 DNA용액(10mg/ml) 2μl와 3차 중류수 173μl를 다시 넣어 잘 섞은 후 에탄올로 침전시켜 진공건조하였다.

3) Hybridization 혼합액 제조

Nick translation된 DNA probe를 3차 중류수 112μl로 녹인 다음 10×SSCP(10×SSC, 2M sodium phosphate, pH 7.4) 100μl, 연어정자 DNA용액 18μl와 50×Denhart용액(Ficol 400, bovine serum albumin, polyvinylpyrrolidone; 각각 200μg/ml) 250μl을 첨가하여 만들었다. 비방사능 측정은 hybridization 혼합액 1μl를 뽑아 측정한 결과 DNA μg당 $2 \sim 5 \times 10^7$ dpm이었다.

4) Hybridization과 세척

표식 DNA probe hybridization 혼합액 50μl를 염색체 표본에 떨어뜨려 카버 글라스로 덮어 50% formamide/2×SSC 용액으로 적신 여과지가 놓인 플라스틱 통에 넣어 잘 밀폐시켜 41°C, 14시간 hybridization을 시키고 2×SSC 용액내에서 카버 글라스를 제거하고 41°C의 50% formamide/2×SSC 용액에 15

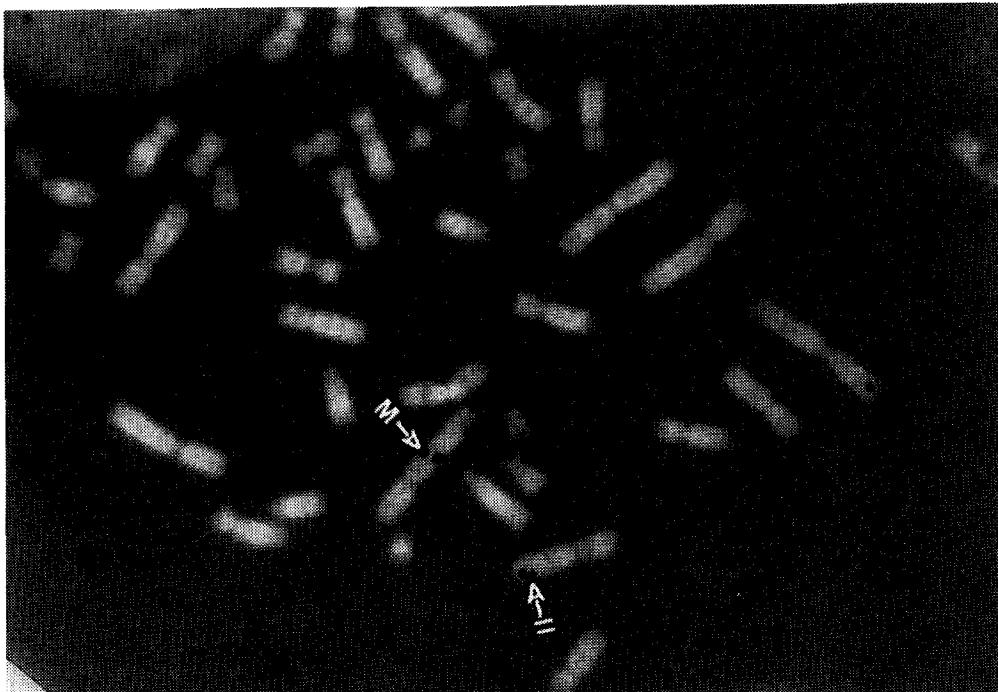


Fig 1. Hybridization of ^3H -labelled N-myc probe to the chromosome of a neuroblastoma cell line(SK-N-BE) metaphase, followed by Q-band staining. Silver grains are showed on homogeneously staining regions (HSRs). 11 arrow indicates a silver grain localized to HSR on 11p15 and M arrow indicates a silver grain localized to HSR on short arm of marker chromosome.

분간씩 2회 세척하고, 39°C 의 30% formamide/2×SSC 용액에 15분간씩 2회 세척한 다음 다시 상온의 0.1×SSC 용액에 15분간 1회 씻고 3차 증류수로 2분간 세척하여 각급 에탄올로 탈수 건조시켰다.

5) Autoradiography와 현상

41°C 의 Sakura-NR-M2 유제액과 3차 증류수를 1:2로 섞은 액에 2초간 담근 후 잠시 말리고 silicagel을 넣은 암상자내에 표본을 넣고 완전 밀폐시키고 4°C , 7~14일간 노출시켜 자기방사시킨 다음 Kodak D-19 현상액에서 20°C , 5분간 현상시켜 증류수로 씻고, 정착은 20°C , 2분간 실시하여 증류수로 씻어 건조시켰다.

6) 표본의 형광염색, 검정 및 사진촬영

표본의 형광염색은 quinacrine mustard와 Hoechst 33258로 이중염색하였으며, 검정은 BH2RFL 형광현미경으로 100개의 중기염색체를 관찰하여 기록 분석하였고, Kodak technical pan film 2415로 Q-banding을 촬영하고 다시 투과가시광과 형광을 동시에 사용하여 염색체 상에 그리고 휴지기 세포에 존재하는 은입자들을 촬영하였다.

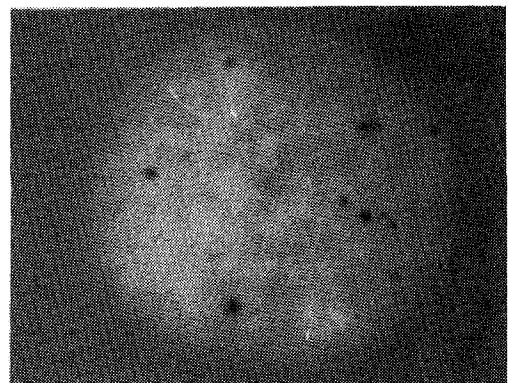


Fig 2. Hybridization of ^3H -labeled N-myc probe to the interphase nucleus of a neuroblastoma cell line SK-N-BE. It was impossible to localize nucleus due to not distinguishing the nuclear membrane and the scatter of radioactive disintegrations.

성 적

증폭과 순수분리한 pMF3-SEB1-Nmyc를 DNA

probe로 하여 Amersham kit를 이용한 nick translation후 비방사능을 측정한 결과 DNA의 μg 당 $2\sim 5 \times 10^7\text{dpm}$ 으로 table 1에서의 ^3H 에서 얻을 수 있는 최대치로 인정되었다.

Hybridization은 hybridization 혼합액에 첨가된 물질들의 농도에 의해 41°C , 14시간 정도가 적절하였

으며 배경을 좋게하고 비특이적으로 결합된 인공산물의 제거를 위해 표본의 세척에서 온도와 formamide 농도를 단계적으로 감소시키므로써 해결되었다.

자기방사는 4°C , 7~14일간하여 현상한 표본을 이중형광염색하여 양호한 Q-band상과 염색체 상과 휴지기 세포에 존재하는 은입자들(Fig 1과 Fig 2)을

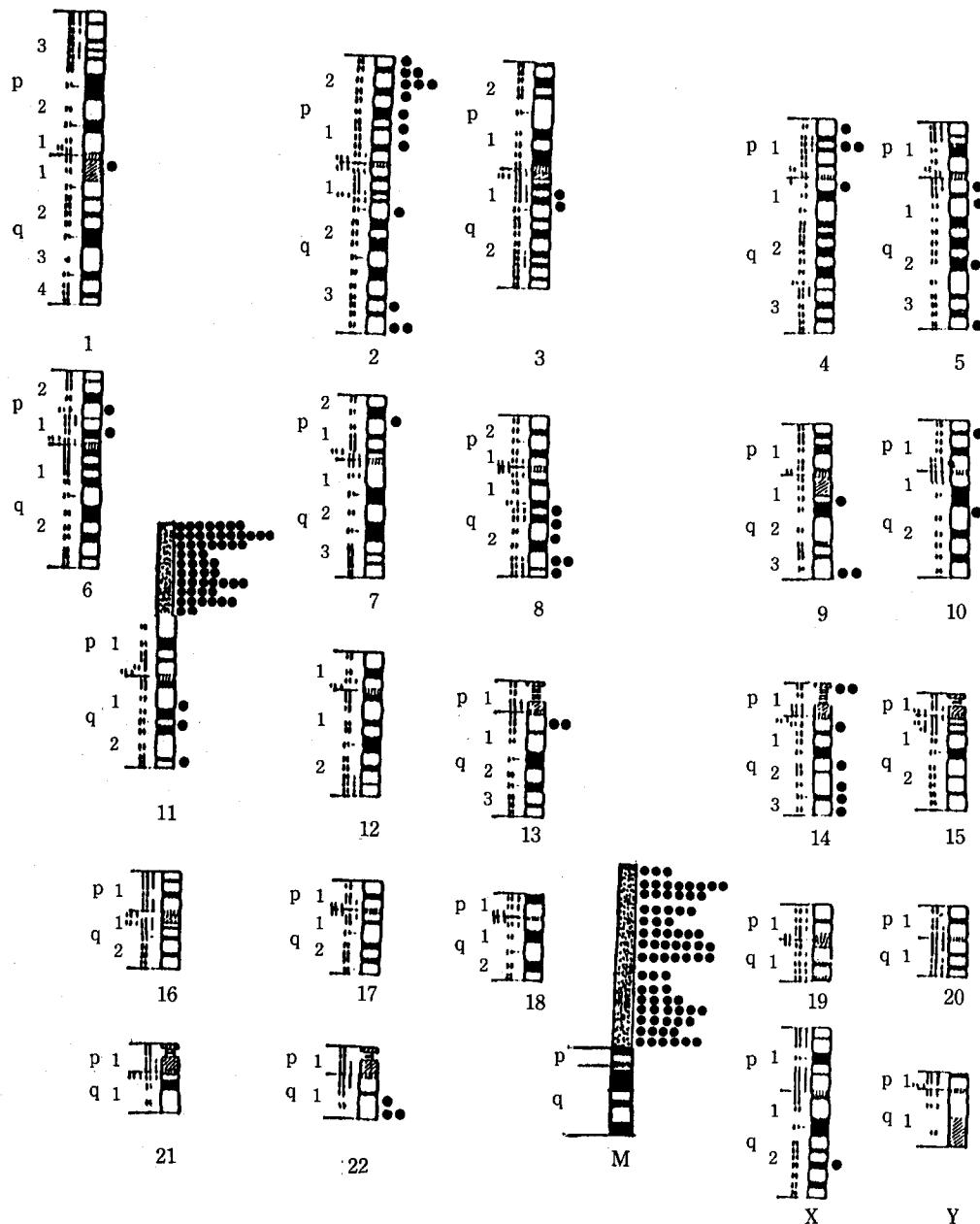


Fig 3. The distribution of labeled sites with N-myc probe in 80 SK-N-BE neuroblastoma cell line metaphases. The grain accumulations noted at the HSRs on the short arm of chromosome 11 and marker chromosome.

투과가시광과 형광을 동시적으로 사용하여 관찰할 수 있어 핵형분석이 용이하므로써 Fig 3에서의 암유전자 N-myc으로 표식된 부위의 분포도를 바로 작성할 수 있었다.

신경모세포종주 SK-N-BE의 중기염색체중 11번 염색체와 marker염색체의 동질염색 부위는 관찰된 전체은입자들(180개)중 54개(30.0%)와 76개(42.2%)로 각각 나타나 N-myc 암유전자로 증폭되어 있음을 알 수 있었다(Fig 1과 Fig 3).

핵막의 구별이 어렵고 방사선 동위원소의 scatter의 크기가 커 해상력이 떨어져 정확한 위치 결정이 어려웠다(Fig 2).

고 찰

In situ hybridization으로 Gall과 Pardue(1969)은 개구리의 난세포에서 증폭된 리보조울 유전자을 발견한 이래, Henderson(1982)은 동물염색체내의 단일 copy 유전자 좌위를 결정하였으나 in situ hybridization에 이용되는 DNA probe의 길이는 2~3kb이며 상동성이 높아야하나 Jhanwar 등(1983)은 0.5kb의 c-ras 암유전자족을 운반체 DNA에 삽입한 상태로 표식시킨 후 DNA 변성후에도 길이가 다소 길어 염색체상의 상동적인 DNA에 수지상으로 결합되어 검출감도를 향상시켰으며 또한 nick translation법(Rigby 등, 1977)이 도입되어 비방사능이 극히 높은 DNA probe 제작이 용이하게 되었다.

본 연구에 이용된 플라스미드 pMF3-SEB1-Nmyc은 2.0kb의 암유전자 N-myc를 함유하고 있으며 HB101 숙주세포에 쉽게 형질전환시켜 증폭과 순수분리하여 DNA probe로 이용가능하여 nick translation시켜 비방사능을 측정한 결과 DNA μg 당 $2\sim5\times10^7\text{dpm}$ 으로 in situ hybridization에 사용할 수 있었다.

여러가지 핵산 probe의 hybridization의 적정한 온도는 특이한 염농도와 hybridization에 소요되는 시간에 의해 결정되게 되기 때문에(Denhardt, 1966) hybridization 혼합액은 hybridization 감도를 증진시키는 데 중요한 역할을 하게 되며 특히, formamide는 hybridization 동안의 실제온도를 감소시키고, dextran sulfate는 혼합액의 점성을 높혀 hybridization 온도를 낮추는 데 효과적이다. 연어정자 DNA는 특이하지 않는 DNA부위를 포화시켜 인공산물을 최대한 줄이고 Denhardt용액은 표본의 배경을 깨끗하게 해 준다.

본 실험에서의 hybridization 혼합액으로 41°C , 14시간 hybridization하여 좋은 표본을 얻을 수 있었고 또한 표본의 세척 단계에서 formamide의 농도와 온도의 조절로서 더욱 깨끗한 표본을 얻었다고 사료된다.

Harper와 Sanders(1981)은 G-band을 하여 염색체 사진을 찍고 다시 탈색하여 in situ hybridization으로 단일 copy 유전자의 위치를 결정하였으나 Raap 등(1986)은 DNA변성을 위해 열이나 알칼리를 처리하는 동안 약 40%의 DNA의 소실이 있어 단일 copy 유전자 좌위 결정에 더 많은 실수가 생길 수 있으므로 본 연구에서는 자기 방사된 표본을 quinacrine mustard와 Hoechst 33258 이중형광염색법(Yoshida 등, 1975)으로 염색하여 형광현미경하에서 형광과 가시광을 동시에 조사하여 관찰하므로써 Q-banding에 의한 핵형분석과 은입자들을 함께 볼 수 있어 단일 copy 유전자 좌위를 쉽게 결정할 수 있는 장점이 있었다.

그러나 tritium의 scatter는 1~2 μm 로서 비방사능 물질인 biotin으로 DNA probe를 표식하여 fluorescein으로 검출 할 경우의 0.1 μm 해상에 대해 약 20배 정도의 낮은 해상이므로(Lawrence 등, 1988) 단일 copy 유전자의 좌우 결정을 위해 80개의 중기염색체를 관찰하여 통계적으로 처리하여 결정할 수 있었으나 휴지기 세포핵에서의 단일 copy 유전자 배열의 위치결정은 어려웠다.

Schwab 등(1984)은 tritium을 이용하여 암유전자 N-myc의 정상사람 염색체에서 좌위는 2번 염색체 단완 23에서 24부위에 위치하고 신경모세포종주 NMB, NGP와 NLF에 존재하는 동질염색부위에서의 암유전자 N-myc의 증폭을 62개의 중기염색체들에서 관찰하였는데 NMB의 13번 염색체 단완, NGP의 4번 염색체 단완 및 NLF의 9번 염색체 장완에 있는 동질염색부위들에서는 증폭되어 있으나 NGP의 12번 염색체 장완의 동질염색부위는 암유전자 N-myc의 증폭이 아닌 어떤 부가적인 DNA염기배열의 증폭으로 간주하였다.

본 연구에서 신경모세포종주 SK-N-BE의 11번 염색체 단완과 marker 염색체 단완에 있는 동질염색부위들에서 80개 중기염색체들의 전체 은입자들에서 30.0%와 42.2%를 각각 차지하였으므로 모두 암유전자 N-myc이 증폭되어 있는 것으로 사료되었다.

요 약

³H로 표식된 pMF3-SEB1-Nmyc을 이용한 DNA in situ hybridization의 최적 조건을 찾아 신경모세포종주 SK-N-BE내에서 암유전자 N-myc이 어떤 형태로 증폭되어 있는지를 관찰한 결과는 다음과 같다.

³H로 표식된 DNA probe의 비방사능 값은 DNA μg 당 $2\sim 5 \times 10^7 \text{dpm}$ 이었다.

표식된 DNA probe를 적절한 hybridization 혼합액에 녹여 표본에 41°C 로 14시간 hybridization시켜 좋은 결과를 얻었다.

자기방사는 1/2로 희석한 Sakura NR-M2 유제액으로 4°C 에서 7~14일간 실시하여 좋은 결과를 얻었다.

은입자들은 같은 중기염색체의 Q-band에 의한 핵형분석과 동시에 그 위치를 검출할 수 있었다.

통계처리로 신경모세포종주 SK-N-BE의 11번 염색체와 marker 염색체의 각 단원에 있는 동질염색부위들이 모두 암유전자 N-myc으로 증폭되어 있음을 밝혔다.

신경모세포종주 SK-N-BE의 휴지기 핵내에서 암유전자 N-myc의 위치를 결정할 수 없었다.

참 고 문 헌

Denhart DT: A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 23: 641-646.

Gall JG and Pardue ML: Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 63: 378-383.

Gerhard DS, Kawasaki ES, Carter Bancroft F, et al: Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3755-3758.

Gupta J, Gendelman HE, Naghashfur Z, et al: Specific identification of human papillomavirus type in cervical smears and paraffin sections by in the hybridization with radioactive probes: a preliminary communication. *Int J Gynecol Pathol* 1985; 4 (3): 211-218.

Harper ME, Ullrich A, Saunders GR: Localization

of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 4458-4460.

Harper ME, Saunders GF: Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 1981; 83: 431-439.

Henderson A: Cytological hybridization to mammalian chromosomes. *Int Rev Cytol* 1982; 76: 1-46.

Henderson A, Ripley S, Heller M, et al: Chromosome site for Epstein-Barr virus DNA in a Burkitt tumor cell line and in lymphocytes growth transformed in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1987-1991.

Jhanwar SC, Neel BG, Hayward WS, et al: Localization of c-ras oncogene family on human germ line chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 4794-4797.

Lawrence JB, Villnave CA, Singer RH: Sensitive high resolution chromatin and chromosome mapping in situ; Presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 1988; 52: 51-61.

Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, et al: Nucleic acid probes in the study of latent viral disease. *J Oral Pathol* 1987; 16: 199-211.

Raab AK, Marijnissen JG, Vrolijk J, et al: Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures. *Cytometry* 1986; 7: 235-242.

Rigby PWJ, Diechmann M, Rhodes C, et al: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977; 133: 237-251.

Schwab M, Varmus HE, Bishop JW, et al: Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene relate to c-myc. *Nature* 1984; 308: 288-291.

Schuster V, Mate B, Wiegand H, et al: Detection of human cytomegalovirus in urine by DNA-DNA and RNA-DNA hybridization. *J Infect Dis* 1986; 154 (2): 309-314.

Yoshida MC, Ikeuchi T, Sasaki M: Differential staining of parental chromosomes in interspecific cell hybrids with a combined quinacrine and 33258 Hoechst technique. *Proc Jpn Acad* 1975; 51: 184-187.

=Abstract=

Method for DNA *in situ* Hybridization by Autoradiography

Sung Ik Chang, MD; In Jang Choi, PhD; Ihn Hwan Lee, MD;
Dae Kwang Kim, MD; Chang Heon Yang, MD; Yong Wook Jeong, MD

Department of Anatomy, Keimyung University

School of Medicine, Taegu, Korea

To find out the optimal condition for DNA *in situ* hybridization using isotopically labeled DNA probe with the general goal of understanding how localization and organization of N-myc oncogene sequences within the SK-N-BE cell line, present investigation was carried out by ^3H -labeled pMF3-SEB1-Nmyc probe *in situ* hybridization.

The results were as follows;

Specific activities of $2\sim 5 \times 10^7$ dpm/ μg of DNA were gained after separation of the ^3H labeled DNA by spindialysis using sepharose CL-6B.

The chromosomes and interphase nuclei were hybridization with the labeled probe for 14hr at 41°C in a hybridization mixture solution: 50% formamide, 2 \times SSCP(2 \times SSC, 0.04M NaPO₄, pH7.0), 10% dextran sulfate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of sonicated salmon sperm DNA and 0.2mg/ml each of bovine serum albumin, Ficoll, and polyvinylphyrrolidone.

Autoradiography was performed by using half-strength Sakura NR-M2 emulsion for 7-14 days at 4°C.

Silver grains were simultaneously detected on Q-banded chromosomes in the same metaphase.

Amplifications of N-myc oncogene were conformed on homogeneous staining regions of chromosome 11 and marker chromosome by statistical analysis.

It was impossible with this technique to localize N-myc oncogene within the interphase nucleus of SK-N-BE cell line.

Key Words : DNA *in situ* hybridization, Gene cloning, Neuroblastoma cell line SK-N-BE, Nick translation, N-myc oncogene