

암의 분자생물학적 진단

개명대학 의과대학 미생물학교실

서 민호

서 론

최근 분자생물학과 유전공학의 급속한 발달로 인해 생명과학분야의 연구에 혁신적인 변화가 초래되고 있으며 인류최내의 질병인 암에 있어서도 원인 규명과 암화과정연구가 깊이있게 진행되기 시작했고 나아가서 새로운 진단법과 치료법이 새만되고 있는 실정이다^[1-7] 분자생물학자인 많은 연구방법들^[8-17], 이를테면, DNA, RNA 분리법, Southern, Northern, Dot, Slot, Western blotting법, 유전가 클로닝법, DNA Sequencing법, site directed mutagenesis법, chloramphenical acetyl transferase (CAT) assay법, polymerase chain reaction(PCR-)법, gene transfer법, antisense RNA법 등의 계속적인 개발로 인해 과거에는 접근하기 매우 어려웠던 암의 원인과 암화과정 및 암의 진이기선의 본질적 규명이 가능하게 되었으며, 암화과정 및 암의 진이에 관련되는 많은 단백질들의 입체구조 규명과 기능분석, 이들을 지령하는 유전자 DNA의 규명 및 유전자 발현과정, 즉 mRNA 합성과정에 참여하는 많은 인자의 1/1명이 가능하게 되었다^[18-20]. 이러한 연구를 토대로 특성화된 암에 대한 특성화된 유전자 및 유전자 산물의 이상이 나타나나는 것이 발견되어 암의 분자생물학적 진단이란 새로운 진단영역이 내두되며 되었으며, 이를 유전자와 유전자 산물은 암의 치료에 대한 반응도 혹은 암의 예후와 밀접한 관계가 있음이 알려져서 암의 분자생물학적 치료효과판정 및 예후추정이 임상의학에 적용되기 시작했다^[21-24].

또한 암화과정에서 빌생학과 유전자 기능을

antisense RNA 등을 통해 억제해주고^[20-23] 결손유전자 기능을 gene transfer 방법으로 보충해 주는 등, 분자수준에서 수술을 가하여 암세포를 정상세포로 환원시켜 암을 근본적으로 치료코자 하는 일련의 유전자 치료법^[25-28]이 최첨단분야로서 연구되고 있으며, 몇 가지는 이미 성공을 거둔 실정이어서 다가오는 21세기 의학에서는 기초의학의 영역은 물론이고 내과적, 외과적 oncologist^등 모두가 평연적으로 molecular biologist로서의 임무를 수행하게 될 것으로 전망하고 있다^[4, 7-10].

본 논문에서는 먼저 암의 진단 및 예후판정 등에 사용되는 현재의 각종 분자생물학적인 진단 테크닉의 목적 및 방법을 간단히 설명한 후, 암의 진단과 관련된 각종 유전자들과 유전자 산물의 진단적 의미 및 현황을 소개하고 결론을 맺고자 한다.

분자생물학적 진단법

1. 가검물 채취 및 보관

환자의 혈액, 외과적으로 얻은 암조직, 내시경적으로 얻은 암조직, 소변, 냉동설린 혹은 파라핀절편의 생검조직 등을 가검물로 사용하게 된다. 혈액은 농성 5-10ml을 채혈하여 0.1mM EDTA, 10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl의 항응고액이 함유된 buffer 15-30ml에 넣고 섞어 4°C 혹은 냉동 보관하다가 사용한다. 암조직은 자출후 즉시 cryotube에 담아 액화설兜에 넣어 보관하다가 사용한다. 기타 가검물도 가능한한 저온에서 보관하는 것이 좋으며 특히 RNA를 분석코자 할 경우에는 가능한한 신선한 시료, 저온, 및 RNase의 오염이 없는 상태로 보관해야 한다.

2 DNA분리 및 보관

이액에서 DNA를 분리하는 방법은 통상 Kunkel 등의 방법^{3,4)}이 널리 쓰인다. 즉, 혈액에 항응고제 buffer를 넣어 섞고 얼음에 두어 혈액을 용열시킨 후 위심하여 상층액을 세기한다. 여기에 75mM NaCl-25mM EDTA(SE)액을 넣고 섞은 후 sodium dodecyl sulfate(SDS)와 proteinase K를 넣어 혼합후 방지하여 세포를 끊으나

여기서 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 섞은 후 위심하는 조작은 3-4회 실시하여 세단백을 키고 상층액을 뽑아 3M sodium acetate와 ethanol을 넣어 DNA를 침전시킨 후 유리병으로 실물치킨은 DNA는 간사내어 70% ethanol로 세척 후 10mM Tris-1mM EDTA(TE)액에 DNA는 놓여 UV spectrometer(파장 260nm 및 280nm)로 농도 및 순도를 측정한 후 4°C 냉장고에 보관하며, 수년간 보관이 가능하다.

암조직에서 DNA를 분리하는 방법은 통상 Blin 및 Stafford의 방법^{5,6)}이 널리 쓰인다. 주 100-500mg 정도의 암조직을 뉴브에 담고 10mM Tris-0.1M EDTA액을 넣어 ultraturrax 혹은 polytron homogenizer로 15,000-20,000rpm에서 3-5분 정도 조작을 키고 RNase와 SDS를 넣어 섞은 후 37°C에서 1시간 정도 뉴브나 여기에 proteinase K를 넣고 섞은 후 50°C에서 3시간 정도 두어 세포를 끊으나 phenol-chloroform-isoamyl alcohol을 넣고 섞은 후 위심하는 세단백과 성은 3-4회 실시후 상층액을 뽑아 10M ammonium acetate와 ethanol을 넣어 DNA를 침전시킨 후 유리병으로 실물치킨은 DNA는 간사내어 70% ethanol로 세척후 TE액에 DNA는 놓여 UV spectrometer로 농도 및 순도를 측정한 후 4°C 냉장고에 보관한다.

3. RNA 분리 및 보관

RNA 분리는 비교적 간단하고 경제적인 Chomczynski 및 Sacchi 방법^{7,8)}이 널리 쓰이며, 실험과정에서 RNase의 오염으로 인한 RNA 손성이 호방하므로 항상 비단성감을 끼고 오염우려를 두이고 시유우 유시하며 실험하는 것이 좋다. 100-400mg 정도의 암조직을 뉴브에 넣고 4M guanidium thiocyanate, sodium citrate, sarkosyl, 2-mercaptoethanol, anti-foam A emulsion 등은 보통이거나 GT buffer를 넣

어 homogenizer로 15,000rpm에서 3-5분 정도 조작을 키고 sodium acetate, water saturated phenol, chloroform-isoamyl alcohol mixture 등은 치딩령 냉고 섞은 후 얼음에 15분 냉치한다. 이것을 10,000rpm에서 4°C로 20분 위심하여 상층액을 세류^{9,10)}로 옮긴 후 냉량의 2-propanol을 넣고 -70°C에 2시간 냉치한다. 이것을 10,000rpm에서 4°C로 30분 위심하여 상층액을 버리고 소량의 GT buffer와 isopropanol을 넣어 RNA침사를 끊여 microfuge tube로 옮긴 후 -70°C에 2시간 냉치한다. 이것을 microfuge로 4°C에서 15분 위심하여 상층액을 세기후 75% cold ethanol로 세척후 Speedvac concentrator(Savant Co., U.S.A.)에서 5분간 간조시킨다. 여기에 diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수 소량을 넣어 끊으나 UV spectrometer로 농도 및 순도를 측정한다. RNA의 보관은 RNA액에 0.1 volume의 3M sodium acetate와 2.5 volume의 cold ethanol을 넣어 섞은 상태로 -70°C에 보관하며 약 1개월 정도 유효하다.

4 Dot blotting 및 Slot blotting법

분자생물학적 진단법의 중요한 부분 중의 하나는 두정 DNA 혹은 RNA의 양지, 질지 변화 유무를 관찰하기 위해, 분리된 DNA 혹은 RNA액을 nitrocellulose 혹은 nylon(주로 positively charged nylon) filter에 접종하여 고정시킨 후, 목적하고자 하는 DNA만獨立하게 결합하는 냅지자(probe)를 이용하여 DNA-DNA 혹은 RNA-DNA hybridization(시료 상보적인 염기들끼리 결합하여 DNA-DNA 혹은 DNA-RNA double helix를 형성하는 것)을 실시하고 그 강도 및 형태를 방사능 표한 혹은 색소표현으로 관찰하는 이루바 blotting법이 널리 쓰이고 있다. 그중에서도 가장 간편하고 신속한 것이 dot blotting과 slot blotting이며, dot blotting은 Fig 1과 같이 DNA나 RNA가 filter상에 '△' dot형으로 고정되는 것을 뛰어넘어 주로 정성검사에 널리 쓰이나 slot blotting은 DNA나 RNA가 filter상에 각각의 slot형으로 고정되는 것을 뛰어넘어 densitometer의 감도에 용이하므로 주로 정량분석에 널리 쓰인다.

검사하고자 하는 DNA나 RNA를 95°C로 가열하거나 NaOH등의 약간의 혹은 formaldehyde등으로

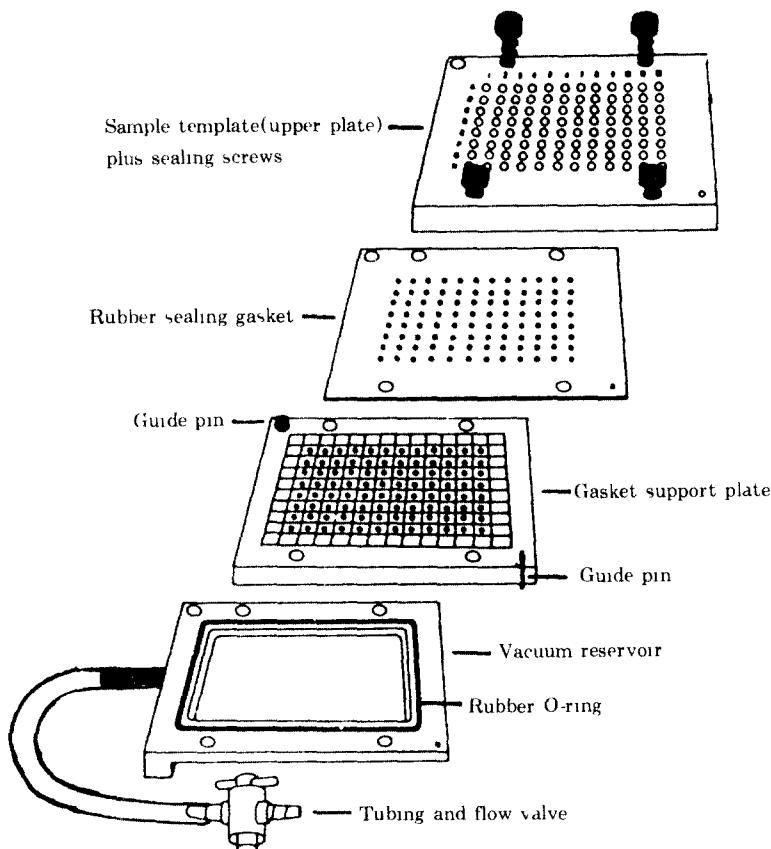


Fig 1. Diagram of a typical "dot blot" apparatus. The filter is placed above the sealing gasket and samples are applied to individual wells (Illustration courtesy of Bio-Rad)

denaturation(두 가지 혼산이 한가닥 쪽으로 풀리는 것)시킨 후 nitrocellulose 혹은 nylon filter가 장착된 Dot blot 장치(Fig 1) 혹은 slot blot 장치에 접종하고 전기증류를 이용하여 DNA나 RNA를 filter에 흡착시킨 후 80°C dry oven에서 1~2시간 baking하여 고정시키고 비닐봉지에 넣고 sealing 후 대시케이터에 보관하다가 hybridization을 실시하여 관찰한다.

5. Southern blotting법

특정부위의 DNA를 절단하는 제한효소(restriction endonuclease)로 DNA를 절단시킨 후 전기영동했을 때, 특정유전자 DNA내에 돌연변이가 있으면, 절단된 DNA의 크기 및 수가 변화(restriction

fragment length polymorphism RFLP)되게 되는데 이것을 사시화한 것이 Southern blotting 방법이나 이 방법은 특정유전자 DNA의 양적인 변화(DNA 유전자의 증가) amplification이라 한다)도 동시에 관찰할 수 있어서 분사생물학적 분석에 널리 쓰이는 방법이다. 원래 영국의 E M Southern이 개발하였기 때문에 그 이름을 따서 명명되었으며, 유사한 개념으로 RNA의 분석하는 방법인 Northern blotting과, 단백질을 분석하는 방법인 Western blotting의 명명은 발명자의 이름이 아니고 Southern(남쪽)에 대한 Northern(북쪽), Western(서쪽) 등의 일종의 익살스러운 이름으로 명명된 것이다.

Southern blotting에 앞서 겹사한 DNA 10 μg 을 취하여 30unit의 세히효소(Eco RI, Bam HI 등)와 buffer를 넣고 37°C에서 몇시간 반응시켜 DNA를 절단시키고, bromophenol-blue(BPB)와 xylene cyanole이 함유된 gel loading buffer와 섞은 후 0.8% agarose gel에 loading 하고 1×Tris-Borate-EDTA(TBE) buffer로 20 Volt로 16시간 정도 수평형 잡수식 전기영동(horizontal-submarine gel electrophoresis)을 실시한다. 이 때 DNA size marker(흔히 Hind III 처리된 bacteriophage DNA가 사용됨)를 함께 영동시켜야 추후 영동된 DNA 절편의 크기를 알 수 있다. 영동이 끝난 후 gel을 ethidium bromide액에 1시간 염색후 UV transilluminator(파장 302nm)에 놓고 적색필터가 장착된 Polaroid camera로 촬영한 후 Southern blotting을 실시한다.

사진촬영이 끝난 gel의 한쪽 귀퉁이를 삼각형으로 조금 잘라내어 위치표시를 한 후 0.2N HCl용액(depurination solution)에 10분 정도 남구어 depurination(DNA의 이동이 용이하도록, DNA를 gel 상에서의 위치변동은 없이 잘게 잘라주는 조사 생

약해도 무방함)을 실시후 증류수에 잠시 헹구고 5N NaOH-1.5M NaCl 액(denaturation solution)에 1시간 남구어 DNA를 denaturation 시킨 후 증류수에 잠시 헹군다 그다음에 1M Tris-1.5M NaCl액(Neutralization solution)에 1시간 남구어 gel의 pH를 중화시킨 후 증류수로 잠시 헹구고 Fig 2와 같이 20×SSC(sodium chloride-sodium citrate)액이 함유된 그릇에 장치된 Whatmann 3MM paper위에 gel을 얹고 그위에 nitrocellulose filter를 얹고 Whatmann 3MM paper 3장과 10cm 높이의 paper towel 및 500g 정도의 무게(책 혹은 스라이드 글라스 등)를 얹어 몇시간-하루정도 blotting을 실시한다. Southern blotting시에 DNA 이동의 원리는 paper towel의 모세관원리에 의한 흡수작용에 의해 20×SSC액이 빨려 올라오면서 gel속의 DNA도 함께 빨려 올라와 nitrocellulose filter에 딱 붙어버리게 되는 원리이다. blotting된 filter는 물기를 세거후 80°C dry oven에서 1-2시간 baking하여 고정시킨 후 비닐봉지에 넣고 sealing 후 데시케이터에 보관하다가 hybridization을 실시한다.

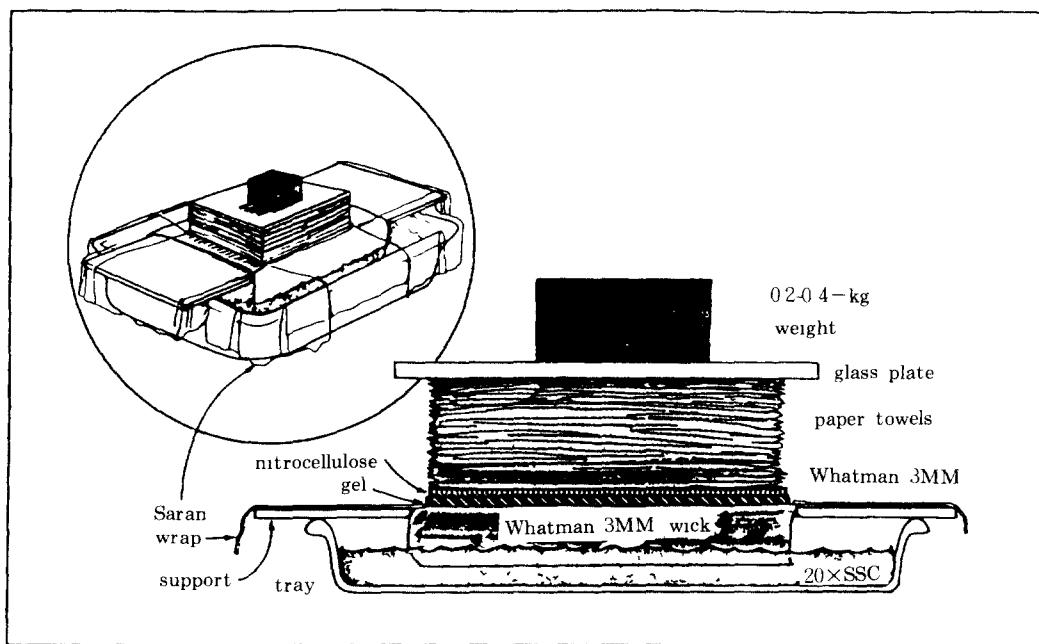


Fig 2 Transfer pyramid for Southern blotting

6. Northern blotting법

Northern blotting의 목적은 특정 RNA의 양적 인 변화(RNA의 증가를 유전사변현증가[increased gene expression]라 한다) 관찰과 아울러 RNA의 다형성(polymorphism) 관찰 등으로 동일 RNA의 질적 변화를 조사하는데 있다

먼저 MOPS(3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid)와 formaldehyde를 함유한 0.9% agarose gel(RNA가 denaturation된 상태로 영동되는 denaturing gel임)을 제작후 formaldehyde, MOPS, formamide 등을 함유한 RNA액 20 μ g을 gel loading buffer와 함께 섞어 gel에 loading하고 1× MOPS buffer로 20 Volt, 16시간 정도 수평형 잠수식 전기영동을 실시한다. 영동된 gel을 ethidium bromide액에 30분 염색후 UV transilluminator와 Polaroid camera로 촬영한 후 Northern blotting을 실시하며, 그 방법은 Southern blotting의 경우와 거의 같다 다만 Northern blotting시에는 gel 속의 RNA는 이미 denaturation되어 있으므로 depurination, denaturation, neutralization 등의 과정이 필요없이 사진촬영 후 바로 blotting을 실시하면 된다 blotting된 filter는 역시 Southern blotting시와 같은 방법으로 보관하다가 hybridization을 실시한다

7. Hybridization 및 autoradiography법

Dot, Slot, Southern 혹은 Northern blotting 되어 데시케이터에 보관하던 nitrocellulose filter에 0.75M sodium chloride, 0.075M sodium citrate, 0.1% SDS, 0.02% polyvinyl pyrrolidone(PVP), 0.02% Ficoll 400, 0.02% bovine serum albumin (BSA), 5% salmon sperm DNA 및 50% formamide를 함유한 용액을 넣고 42°C에서 16시간 prehybridization을 실시하여 비특이적 핵산결합반응을 없애준다 그다음에 동위원소 혹은 기타 발색 물질로 표식된 probe를 넣고 42°C에서 40시간 hybridization을 실시한다 hybridization된 filter를, 순차적으로 회색된 농도의 SSC-SDS액으로 잘 세척하여 비특이결합 probe를 최대한 제거하고 공기 중에서 건조시킨 후 암실에서 증감지(intensifying screen)가 장착된 X-ray 카세트안에 nitrocellulose filter와 X-ray film을 린착시켜 넣은 후

-70°C에서 1~7일간 감광시킨 다음 현상하여 판독한다 이때 만약 filter상에 목적하는 유전자자가 많이 있었다면 probe가 많이 결합하게 되어 autoradiography상에 강한 감광표식이 나타나게 되는 것이다. 그리고 probe가 비동위원소성 probe, 즉 biotin-avidin probe 혹은 digoxigenin probe 였다면 autoradiography 과정 없이 ELISA 발색법과 유사한 방법으로, 세척된 nitrocellulose filter에 바로 발색시켜 그 결과를 판독할 수 있다 동위원소 probe는 Nick translation법¹¹⁾에 의해 제조하거나 상품을 구입해서 쓰는데, 예민도가 더 높은 장점은 있으나 동위원소의 위험성, 반감기의 제한성, 절차의 복잡성 때문에 최근에는 예민도는 좀 못하지만 취급하기 훨씬 쉽고 경제적이며 반감기의 제한을 받지 않는 비동위원소 probe, 특히 digoxigenin-antidigoxigenin system을 이용한 probe나 chemiluminescence probe의 경우 예민도도 좋기 때문에 이용이 부쩍 증가하고 있는 추세이다

8. Western blotting법

Western blotting의 목적은 특정 유전자산물인 단백질의 질적, 양적 변화를 높은 예민도로 검사코자 하는데 있다 먼저 단백질을 분리후 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하여 coomassie blue 등의 단백염색액에 염색 후 사진촬영을 한다 그리고 Fig. 3과 같이 electro-blotting 장치를 이용하여 gel상의 단백질 분획들을 전기적인 힘으로 nitrocellulose(혹은 positively charged nylon) filter로 이동시키고 filter를 skim milk액에 남궈 비특이적 반응을 없앤다. 세척된 filter를, 특정단백질에만 특이하게 결합하는 항체(주로 monoclonal antibody를 이용함) 액에 담구고 바로 발색시켜 그 결과를 판독한다. 이때 monoclonal antibody 등의 항체를 절약하기 위해 nitrocellulose filter를 전기영동된 lane 별로 길게 잘라서 한장 한장씩을 항체액이 든 쪽과 진tray에 담구고 발색시키게 되며 발색방법에 따라서 시간이 지나면서 발색된 단백 band가 사라지기 때문에 미리 사진촬영을 해두어야 한다

9. In Situ hybridization법

이 방법의 주된 목적은 DNA나 RNA의 발현정도를 조직내에서 직접 관찰 할 수 있도록 하여, 조

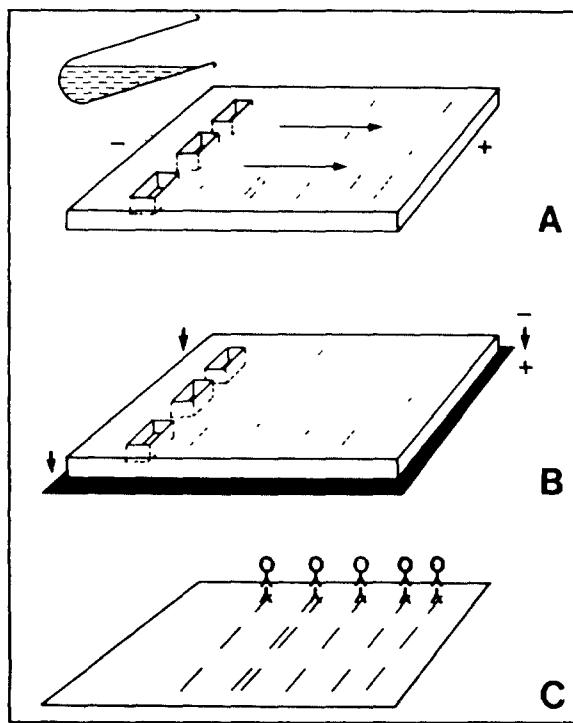


Fig 3 The Western blot method involves electrophoresis of disrupted HTLV III/LAV virions on slab gels. Most viral antigens can thus be individually detected. Cells of a malignant T-cell line infected with HTLV III/LAV are lysed and the lysate centrifuged and placed in wells on a polyacrylamide gel slab(A). Electrophoresis then separates the various viral proteins by molecular weight and charge. When this is complete the slab gel is placed adjacent to a nitrocellulose sheet and the viral proteins 'blotted' upon it again using electrophoresis(B). The patient's serum is then added to the nitrocellulose sheet and, if HTLV III/LAV antibodies are present they will react with the viral antigens. After washing, labelled antihuman immunoglobulin is then applied and the 'Western blot' of the viral proteins is visualised(C).

직내에서의 유진자의 발현위치 및 발현량을 정확히 조사하고자 하는데 있으며 임상적으로 널리 사용되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾. In Situ hybridization은 대상재료로는 냉동조직절편이나 파라핀절편, 그리고 세포도 맘표본 등이 있다.

먼저 조직이 잘 들어붙는 특수코팅된 slide glass(adhesive pretreated slide APT slide)를 제작하거나 구매하여 사용하며, Slide 위에 조직절편을 얹고 60°C에서 1시간이상 처리하여 조직을 slide에 붙인다. 그리고 파라핀절편의 경우는 xylene과 alcohol 및 증류수에 닦아 낸 파라핀 과정을 거쳐

야 하고, 냉동조직절편인 경우에는 acetone에 닦아 낸 후 시킨다. 이것을 proteinase K로 37°C에서 15분간 처리하여 세포를 끊어낸 후, hydrogen peroxide(quenching reagent)로 처리하여 조직내 peroxidase에 의한 비특이적 반응을 없애 다음 증류수와 alcohol을 단계식으로 거쳐 날수시킨다. 탈수된 slide에 hybridization에 사용되는 날지용 probe를 넣고 cover glass로 덮은 후 92°C에서 10분간 가열하여 denaturation 시킨 후 37°C에서 30분간 냉각하여 hybridization을 시킨다. 여기에 post-hybridization에 낸 37°C에서 10분 정도 높은

wash buffer로 세척하고 streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase mixture와 3-amino 9-ethyl carbazole(AEC)로 반응시켜 발색시킨 후 hematoxylin이나 fast green으로 대조염색한다. 제작된 slide를 water mounting으로 cover glass를 덮어 100~400X의 배율로 현미경관찰하고 시진촬영하여 관찰한다. In Situ hybridization은 이외에도 더 예민한 방법으로서 S¹ nuclease와 S³⁵-dATP 및 사진현상액을 이용한 방법도 쓰이고 있다.

10 DNA sequencing법

이 방법의 주된 목적은 특정한 DNA 부위의 염기서열(Adenine, Thymine, Cytosine, Guanine)을 밝혀내므로써 DNA상의 돌연변이 여부 및 DNA의 유사성을 조사하는데 있다. 인슐린의 아미노산 서열을 최초로 밝힌 공로와 φX 174 바이러스의 DNA Sequencing을 최초로 이룬 공로로 두번이나 노벨상을 받은 바 있는 영국 F. Sanger 교수의 Dideoxy NTP(dd NTP)방법⁴⁰⁾이 가장 많이 쓰인다. 먼저 검사코자 하는 DNA를 M13 bacteriophage cloning법 혹은 asymmetrical PCR법을 이용하여 single strand DNA로 만든다(농장 DNA는 두가지다, 즉 double strand DNA로 존재함). 준비된 single strand DNA를 microfuge tube에 넣고 primer DNA와 reaction buffer를 넣어 섞은 후 85°C로 가열된 heating block에 끊은 후 block를 실온에 약 30분 방치하여 35°C 이하까지 식도록 하므로써 primer가 single strand DNA에 결합하도록 한다. 이렇게 primer가 결합된 DNA(annealed DNA)를 저온에서 dithiotreitol(DTT)과 labeling mixture, S³⁵-dATP 및 sequenase 등을 넣고 살금은 후 상온에서 3~5분 반응시켜 DNA 합성을 유도한다. 이때 S³⁵-dATP가 새로이 합성되는 DNA strand에 incorporation되면서 DNA가 합성되기 시작한다. 이 혼합액을 ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP가 각각 2.5μM씩 들어있는 4개의 tube에 3.5μL씩 넣어 주고 잘 섞은 후 37°C에서 3~5분간 반응시키면, 합성되던 DNA에 ddNTP가 들어가 1자리에서 합성이 정지되게 한다. 이때 ddNTP는 template DNA의 염기서열에 상보적으로 결합되며 때문에 '정한 염기서열에는 특정한 ddNTP만 결합하여 그곳에서 합성이 정지되어 결과 여러가지 길이의 S³⁵-dAT-

P-labeled-DNA가 존재하게 되는 것이다 즉, 100 base로 된 DNA sequence 중에 Adenine이 10번, 20번, 30번, 40번, 50번 base 위치에 존재했다면 ddTTP를 넣어주면 이 나섯군데에 임의로 결합하게 되고, DNA는 맨 앞의 primer가 붙은 1번 base에서부터 ddTTP까지 합성된 후 중지되게 되므로, 그 결과 합성된 DNA는 10 base짜리(1~10번 base), 20 base짜리(1~20번 base), 30 base짜리(1~30번 base), 40 base짜리(1~40번 base), 50 base짜리(1~50번 base) 등의 다섯종류의 DNA가 만들어져 있는 것이다. 여기에 BPB와 xylene cyanole이 함유된 stop solution을 4μL 첨가한 후 -80°C에 보관한다. 전기영동 시전에 이 DNA액을 80~85°C에서 2분간 가온한 후 DNA sequencing용 대형 수직형 전기영동기에 설치된 polyacrylamide-urea-gel에 shark tooth comb을 사용하여 ddNTP 종류별 DNA액을 loading하고 1×TBE buffer로 2,000 volt로 4시간 수직형 전기영동을 실시한다.

영동이 끝난 gel을 한쪽 유리판에 붙은 상태로 조심스럽게 떼내어 5% Acetic acid, 5% methanol 용액이 든 큰 tray에 남구어 15~20분 고정시키고 꺼낸 후 Whatmann 3MM paper를 gel크기에 맞게 잘라서 gel위에 얹어 두었나가 gel이 paper에 붙은 상태로 유리판에서 떨어져 나온다. 이것을 대형 gel dryer에 넣고 80°C로 1~2시간 정도 건조시킨 후 건조된 gel을 x-ray cassette(14×17 inch, 혹은 그 이상)에 넣고 암실에서 x-ray film을 넣은 후 실온에서 1~3일 autoradiography를 실시하고 현상후 밀바나(+)에서 부터 먼저 나타나는 base band 순서대로 읽으면 염기서열이 결정되게 되는 것이다. 그 이유는 크기가 작은(base수가 적은) DNA 일수록 빨리 선기영동되기 때문이다.

11 Polymerase Chain Reaction(PCR)법

대부분의 분자생물학적 진단법이 어느 정도량 이상의 가검물을 필요로 하는데 비해 PCR법은 극소량의 DNA sample만 있어도 3~6시간만에 수백만 배 이상의 동일한 DNA를 합성할 수 있기 때문에, 소량의 가검물을 검사할 경우, 혹은 아주 희소한 유전자를 검사할 경우에 매우 유용하게 사용할 수 있는 최첨단 테크니의 하나이다^{11, 16, 17)}. PCR의 원리는

Fig 4와 같이 먼저 갑사하고자 하는 특정 DNA를 94°C(denaturation temperature)로 가우하면 DNA 이중나선구조가 풀려서 두가닥의 single strand DNA가 된다 이 때 헌가닥을 sense strand, 다른 쪽을 antisense strand라 한다

그다음에 sense strand의 3'-end 쪽에 특이하게 결합하는 oligonucleotide primer(oligonucleotide란, 동상 수base-수백base 정도의 적은 base로 구성된 DNA를 말하며 PCR primer용으로는 20base 정도가 널리쓰임)와, antisense strand의 3'-end에

특이하게 결합하는 oligonucleotide primer를 넣고 37°C~60°C(primer annealing temperature)로 온도를 낮추면 각각의 single strand DNA에 각각의 primer가 결합한다(DNA의 합성은 기시부에 primer DNA가 붙어야만 합성이 되기 때문에 primer가 필요함). 그 다음에 94°C의 고온에서도 파괴하지 않고, 72°C에서 가장 기능을 잘 발휘하는 특수한 DNA 합성효소인 Taq DNA polymerase(*Thermus aquaticus*라는 우천 박테리아에서 분리함)와 dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 즉 DNA 합성의

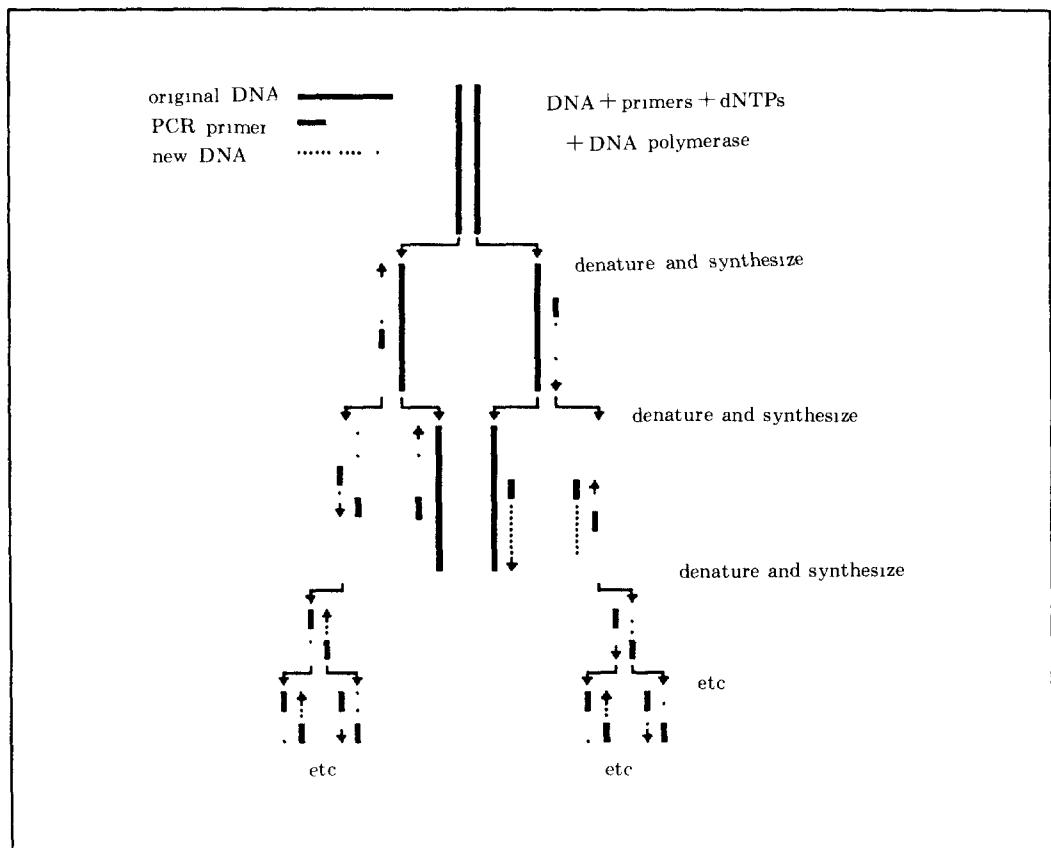


Fig 4 The polymerase chain reaction DNA to be amplified is denatured by heating the sample In the presence of DNA polymerase and excess deoxynucleotide triphosphates, oligonucleotides that hybridize specifically to the target sequence can prime new DNA synthesis The first cycle is characterized by a product of indeterminate length, however, the second cycle produces the discrete "short product" which accumulates exponentially with each successive round of amplification This can lead to the many million-fold amplification of the discrete fragment over the course of 20 to 30 cycles

building block임)를 놓고 72°C(DNA extension temperature, synthesis)로 온도를 올리면 각각의 single strand DNA를 template(DNA 합성의 주형)로 하여 각각의 daughter strand DNA가 합성되어 두개의 double strand DNA가 생기게 된다. 이것을 다시 94°C로 가온하면 각각의 double strand DNA가 denaturation되어 4개의 single strand DNA가 된다. 이것을 37°C~60°C로 온도를 낮추면 다시 4개의 DNA 각각에 primer¹⁵이 결합하게 되고, 72°C로 온도를 올리면 4개의 DNA 각각이 template로 작용하여 각각의 daughter strand DNA가 합성되어 결국 네개의 double strand DNA가 만들어진다. 이렇게 세속 세속 세속이 온도를 바꾸어 주면 DNA는 2의 n승(2^n)으로 증가하게 되는 것이다. PCR의 초기연 구자들은 3가지 온도의 water bath을 앞에 두고 사람이 손으로 일일이 tube를 옮기며 실험하였는데, 최근에는 전자식 기능을 갖춘 일종의 heating block인 temperature cycler(PCR machine)가 많은 회사에서 개발되어 시판되고 있다. 그리고 최근에는 asymmetrical PCR이라고 하여 primer 중 어느 한쪽의 양을 적게(50:1 정도) 넣어 PCR을 실시하면 한쪽 strand만을 훨씬 많이 만들 수 있게 된다. 이렇게 해서 single strand DNA를 손쉽게 만들어 바로 DNA sequencing을 실시할 수 있다. 새래적인 M13 cloning¹⁶으로 single strand DNA를 만들어 sequencing 할 때 1개월 이상씩 걸리던 것을 asymmetrical PCR을 통해 direct sequencing 법의 개발로, 불과 4~5일내에 sequencing이 가능하게 되었다. PCR은 또한 소량의 특정 DNA를 증폭시켜 direct cloning을 가능케 함으로써 몇 달 이상 걸리던 gene cloning을 1주일만에 해낼 수 있는 놀라운 성과를 올리고 있으며 그외에도 PCR의 다양한 응용이 계속 개발되고 있다.^{15, 16, 17}

12 분자생물학 검사실의 필요장비는 다음과 같다

- (1) 전기영동기 수평형 선기영동기(대형 및 minigel), 수직형 선기영동기(대형 및 소형), power supply, electro-transfer chamber(대형 및 소형), DNA sequencing apparatus, high voltage power supply

- (2) 원심분리기 소형 고속원심기(12,000rpm 이상), 냉동원심분리기, 일반원심분리기
- (3) PCR temperature cycler, heating block.
- (4) Freezer, Deep freezer, refrigerator, liquid nitrogen tank, ice flaker
- (5) Dry oven, autoclave, microwave oven
- (6) Shaking water bath, Incubator, shaker, Rocker, rotator, Bead-beater shaker, vortex mixer
- (7) Ultraturrax(혹은 polytron) homogenator
- (8) UV spectrophotometer(microcuvette 포함)
- (9) UV transilluminator(302nm 포함), Polaroid MP4 camera, UV-goggle, X-ray cassette(대형, 소형)
- (10) Speed-vac dryer, Dessericator, vacuum pump.
- (11) Vinyl sealer, acryl protection shield
- (12) Densitometer
- (13) Dot blot, Slot blot apparatus
- (14) cryocutting microtome
- (15) Biological safety cabinet
- (16) CO₂ incubator
- (17) inverted microscope, microscope, 형광현미경
- (18) Cell harvester
- (19) Micropipette, pipet aid
- (20) Balance, pH meter, stirrer, hot plate, water distiller, demineralizer

암의 진단과 관련된 유전자 및 유전자산물

1 암유전자(oncogene)

암은 세포성장에 영향을 주는 환경적 요인, 유전적 요인 등 많은 원인에 의해 세포가 정상적인 조절을 벗어나 성장 및 분화의 균형이 깨어져서 발생하며 분자생물학의 발달로 인해 암유전자가 발암기전 및 예후에 깊이 관여함이 밝혀졌다^{1, 2, 3, 4, 5}. 암유전자는 1969년에 미국 국립암연구소(NCI)의 Huebner와 Todaro에 의해 처음 기술되었으며⁴², 세포의 분화 및 증식 등 고유한 기능에 중요한 역할을 하는 유전자임이 밝혀졌다^{1, 4, 5, 18, 19, 20, 21}. 이러한 암유전자가 활성화되는 분자생물학적 기전으로는 첫째

암유전자 DNA의 양식인 증폭(amplification)^{13~20)}, DNA의 돌연변이^{14~17)}, DNA의 전위(translocation)²⁴⁾등 DNA상의 변화와, 뉴酹 transcripton(mRNA 합성) 차위에서의 과발현으로 인한 RNA의 증가^{24~26)}, 셋째 translation(단백합성) 차원 혹은 그이하 차위에서의 고밀환으로 인한 암나 백질의 증가 등을 두 수 있다^{14~15~20)}. 지금까지 알려진 암유전자의 종류는 100여가지가 되며 이로의 가능은 첫째 tyrosine kinase, serine/threonine kinase 등의 protein kinase로 사용하기나, 뉴酹 growth factor 혹은 growth factor receptor로 사용하거나, 셋째 GTP 결합단백 혹은 GTPase로 사용하거나, 넷째 해나백질로 사용하여 세포의 신호전달체계(signal transduction system)에 변화를 초래시켜 세포의 분화 및 증식에 이상이 생기게 된다^{1~20~23~41)}.

암유전자의 세포내외의 사용부위를 나타내면 Fig 5와 같다.

이미 허 암유전자의 변화를 검사하는 방법은 다음과 같다. 첫째 암유전자 DNA의 증폭유무를 검사하기 위해서 가검물에서 DNA를 분리하여 간단히 Dot blotting이나 slot blotting을 실시하여 암유전자 DNA는 정량하거나, 혹은 Southern blotting을 실시하여 증폭여부를 검사한다. 둘째 암유전자 DNA상의 돌연변이 유무는 검사하기 위해서는 Southern blotting을 실시하여 암유전자 DNA 실린의 RELP²⁷⁾ 위치하여 돌연변이를 주정할 수 있으며, 특히 oligonucleotide probe²⁸⁾ 사용한 Southern blotting으로 암유전자내의 돌연변이를 정확히 찾아낼 수 있다. 또는 두상 DNA의 sequencing을 실시하여 정확한 돌연변이 검사를 실시할 수 있다. 그리고 PCR 기법을 이용하여 암유전자내의 돌연변이 여부를 신속 정확하게 검사할 수 있다. 셋째 암유전자 DNA의 염색체간의 전위를 조사하기 위해서는 세포유전학적 염색체검사와 염색체의 in-

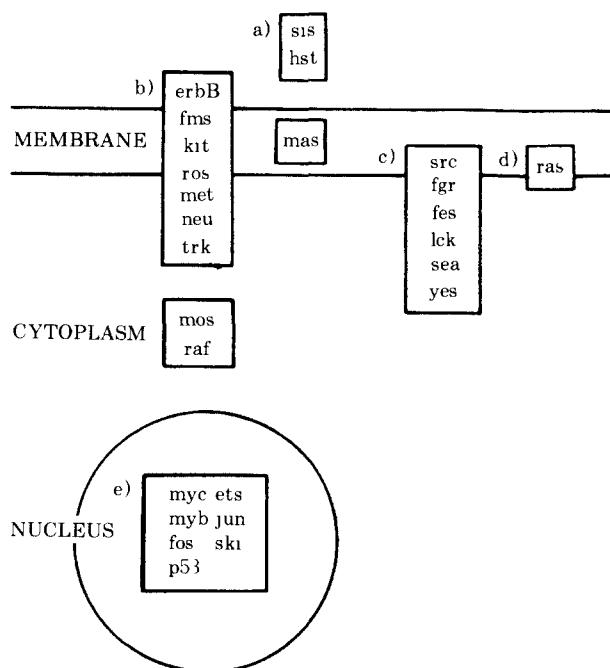


Fig 5 Schematic presentation of the cellular compartments where oncogene or proto-oncogene products are localized. The growth factors(external mitogenic signals)(a), transmembrane tyrosine kinase growth factor receptor membranes(b), nonintegral membrane associated proteins of the src gene family(c), and ras gene family(d) plus oncogenes localized in the nucleus(e)

*situ hybridization*검사, 그리고 Southern blotting을 통한 RFLP로써 검사할 수 있다. 넷째 암유전자의 transcription 차원에서의 과발현유무를 검사하기 위해서는 가검물에서 RNA를 분리하여 간단히 Dot blotting이나 Slot blotting을 실시하여 암유전자 RNA를 정량하거나, Northern blotting을 실시하여 RNA증가여부를 검사하거나 그리고 조직을 박절하여 *in situ hybridization*을 실시하고도 써, 조직내에서의 암유전자 과발현여부 및 반현위치까지 성화히 검사할 수 있다. 최근에는 암유전자의 promoter site(RNA polymerase가 결합되도록 하여 transcription을 시발시키는 DNA 부위임)의 활성도 여부를 검사하는 chloramphenicol acetyl transferase(CAT) assay, site directed mutagenesis 등의 침단기법이 개발되어 암유전자의 활성화의 transcription 차원에서의 더욱 성화한 진단이 가능하게 되었다. 다섯째 암유전사산물인 암난백질의 증가 및 활성여부를 검사하기 위해서는 암난백질을 분리하여 Western blotting을 실시하여 검사한다. 그리고 조직을 박절하여 immunohistochemistry의 기법으로 조직내에서의 암난백질의 과발현여부 및 발현위치 등을 검사할 수 있다. 각종 암에 있어서의 암유전자 변화의 신단시 응용을 Table 1에서 4 가지로 나타내었다.

암유전자의 종류와 관련

되는 암을 요약하면 Table 1과 같다.

Table 1. Cellular Oncogenes Amplified in Human Tumors

Tumor	Oncogene	Amplification
Small-cell lung cancer	c-myc	up to 80×
	N-myc	up to 50×
	L-myc	up to 20×
Neuroblastomas	N-myc	up to 250×
Glioblastomas	c-erbB(EGFR)	up to 50×
Mammary carcinoma	c-erbB2(HER2)	up to 30×

선위와 관련되는 암을 요약하면 Table 2와 같다. 암유전자의 돌연변이와 관련되는 암을 요약하면 Table 3과 같다. 암유전자의 과발현과 관련되는 암을 요약하면 Table 4와 같다.

2. 항암유전자(antioncogene)

Retinoblastoma나 Wilm's tumor등의 분자유전자 발암기전을 연구하다가 어느 특정한 유전자가 존재하면 암유전자의 활동을 억제하여 암의 발생을 억제하고, 만일 이 유전자가 소실되거나 불활성되면 암유전자의 활동을 억제할 수 없어서 암의 발생이 이루어짐을 발견하여 이러한 유전자를 항암유전자라 부르게 되었다.^{17~19)}

Table 2 Chromosomal Translocations in Human Malignancies

Gene Locus	Human Neoplasm	Percentage of Tumors with Translocation or Gene Rearrangement		
				Chromosome Translocation
c-myc	Burkitt's lymphoma	80		t(8.14)(q24.q32)
		15		t(8.22)(q34.q11)
		5		t(2.8)(q11,q24)
bcr-abl	Chronic myelogenous leukemia	90~95		t(9.22)(q34.q11)
	Acute lymphocytic leukemia	10~15		t(9.22)(q34.q11)
bcl-1	Chronic lymphocytic leukemia of B cell type	10~20		t(11.14)(q13.32)
				t(14.18)(q32,q21)
bcl-2	Follicular lymphoma	85~95		

Table 3 Mutational Change in Oncogenes

	Oncogene	Disease
Point mutation	ras	AML, myelodysplastic disease
		Colon cancer
		Breast cancer
		Bladder cancer
		Papillomas
Amplification	N-myc	Neuroblastoma, retinoblastoma
	c-Erb-b	Breast cancer
	c-myb	Colon cancer
	c-myc, N-myc	Small-cell carcinoma-lung
	c-Erb-b	Ghial tumors
Translocation	c-myc	Burkitt's lymphoma
	c-abl	CML

Table 4 Activation of Cellular Oncogenes in Human Cancer

	Disease	Oncogene
Colon		ras, myb
Prostate		ras
Breast		ras, Her, Erb-b-2
Myelodysplastic disease		ras
Burkitt's lymphoma		c-myc, bcl-1
Small-cell carcinoma of the lung		N-myc, c-myc
Non-small-cell carcinoma of the lung		Erb-b
Neuroblastoma		N-myc, ets-1
Wilms' tumor		N-myc
Ewing's sarcoma		c-myc
Neuroepithelioma		c-myc
Squamous cell head and neck		Erb-b
CML		abl
T-cell ALL		tcl-2
Follicular non-Hodgkin's lymphoma		bcl-2
Myeloma		myc, ras
Glioblastoma		sis

항암유전자와 소설여부를 검사하기 위해서는 세포유산화식 염색체검사와 염색체상에서의 *in situ hybridization*에 의한 검사, Southern blotting을 통한 RFLP검사, Northern blotting을 통한 암유전자 RNA발현도 검사, PCR검사, 그리고 CAT assay 등의 방법을 통한 항암유전자의 promoter기능과 항암유전자 단백산물(주로 transcription을 조절하는 단백질)의 기능검사 등이 사용되고 있다. 각종 임에 있어서의 항암유전자 변화의 진단적 응용을 요약하면 Table 5와 같다.

3 세포외 기질 유전자(Extracellular matrix gene)

암세포가 성장하기 위해서는 암유전자, 항암유전자, 성장인자 등과 세포내외의 성장조절 신호신호체계도 중요한 뿐만 아니라, 암세포가 붙어서 기라는 표면, 즉 laminin, fibronectin, collagen 등의 세포외 기질단백도 매우 중요한 역할을 한다¹¹⁻¹⁴⁾.

특히 암세포가 멀리까지 번져가는 전이성(metastasis)여부는 이를 세포외기질 유전자와 민첩한 관계를 갖고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 즉 전이성이 강한 암세포는 세포외부환경의 laminin과 결합하여 관계없이(laminin-independent) 성장이 잘 되는데 그것은 암세포 자체에서 laminin과 유사한 특성을 띠어내기 때문일이 뻔하였다. 몇 가지 예를 들면 강한 전이성을 가진 fibrosarcoma 세포는 그들이 높은 laminin을 생산하여, 유방암세포에는 laminin과 fibronectin 수용체가 20배 이상 증가되어 있으며, CML(chronic myelocytic leukemia) 등의 암세포에서도 hemonectin 등의 혈액세포 특이식 세포외 기질단백이 발생된다¹⁸⁻²⁰⁾.

자기 스스로 자신의 세포외 기질단백을 합성하는 암세포는 강한 전이성을 갖고 있는데 차단하여 암세포의 세포외 기질유전자 상대적 감사함으로써 암의 metastasis 여부는 판정하기나 예후는 추정할 수 있게 되었는데, 세포외 기질유전자 및 유전자산은 감시에는 Dot, Slot, Southern, Northern, Western blotting 뿐만 아니라 *in situ hybridization*, immunohistochemistry 및 PCR법 등이 사용된다.

4 성장인자 및 수용체(growth factors and growth factor receptors)

구성 암세포에 특이하게 사용하는 성장인자들은 면역으로 인해, 모두 상상인 자는 암의 표지자(cancer-

Table 5 Deletion of Cancer Suppressor Genes(Antioncogenes) by Loss of Heterozygosity

Disease	Chromosomal Location of Loss of Heterozygosity	Genes in the Region
Rhabdomyosarcoma	11p 15.5 → 11p Ter	Unknown
Myelodysplastic syndrome	5q	GMCSF, IL-3
	7q21-22	PDGF receptor, CSF-1, c-FMS met
Renal cell carcinoma	3p(also 3, 11) or (3, 8) translocation	
Wilms' tumor	11p13	ras
Retinoblastoma	13q14	Retinoblastoma antioncogene
Osteogenic sarcoma	13q14	
Ewing's sarcoma / neuroepithelioma	t(11.22)	
Bladder cancer	11p	ras
Embryonal Tumors	11p13	
Beckwith-Wiedeman syndrome (rhabdomyosarcoma and hepatoblastomas)		
Small-cell	3p(14-23)	?
Colorectal cancer	5q	?
Acoustic neuroma	1p	?
Neuroblastoma	1p(31-36)	?
Prostate	10q(23-24)	?
Testicular	Isochromosome 12q	?
Melanoma	1p 22	?
Meningioma	Monosomy 22	?

Note The examples of loss of heterozygosity in each chromosome listed may not be specific for each neoplasm(the date are very early in their analysis) and, in some cases cited, it is found in only a small percentage of patients(e.g., 5q in colon cancer). In addition, "benign" or the malignant conditions(benign polyps of the colon, midline granuloma) have been found to exhibit loss of heterozygosity.

cer marker)로 사용하는 새로운 진단법이 개발되어 되었다.^{20, 21, 24, 45)} 이를 성장인자와 특정암과의 진단적응용을 요약하면 Table 6 과 같다. 성장인자와 그 유전자의 검사법으로는 Dot, Slot, Southern, Northern, Western blotting, in situ hybridization, immunohistochemistry 및 PCR 법 등이 사용된다.

5 기타 암의 진단과 관련된 유전자

DNA Virus의 일종인 Human Papilloma Vi-

rus(HPV)는 인간에 세 condyloma, laryngeal papilloma, Bowen's disease, cervical carcinoma, penile carcinoma 등 여러가지 종양을 유발하며 HPV의 type에 따라 종양의 종류가 결정된다.⁴⁶⁾ HPV는 특히 사상암의 조기진단에 매우 중요한 역할을 하고 있으며 그 type은 주로 HPV 16, 18, 31, 35, 39 등이다. HPV의 type에 따른 종양의 종류를 요약하면 Table 7 과 같다. HPV의 진단자 검사법으로는 조직이나 세포노마표본을 간단히 in situ hyb-

Table 6 Growth Factors as Markers of Cancer

Organ Site of Cancer	Growth Regulatory Molecule That Is Marker of Cancer
Pancreas	Cholecystokinin
Breast, lung	EGF receptor (ERB-b)
Small-cell carcinoma of the lung	Bombesin
Glioblastoma	PDGF
Acute T-cell leukemia	IL-2 receptor
Acute myeloid leukemia	IL-3, GM-CSF
Melanoma	MSH
Thyroid cancer	TSH

ridization 하므로써 검사할 수 있고⁷³, 그 외에 Dot, Slot, Southern blotting 등이 쓰이며 최근에 PCR에 의한 HPV 진단법이 개발되었다^{74~76}.

Adult T cell leukemia나 lymphoma와 관련 깊은 HTLV-1(Human T Lymphotropic Virus-1) 검사와, Burkitt's lymphoma나 nasopharyngeal carcinoma와 관련 깊은 EBV(Epstein-Barr Virus) 검사, 그리고 간암과 같은 위험이 있는 HBV(Hepatitis B virus) 검사도 PCR을 이용하여 정확히 진단을 할 수 있게 되었다^{71~73}.

결 론

임유선사와 항암유선사, 기타 암화과정에 관계되거나 많은 유전자들과 유전자산물의 구조와 기능이 분자수준에서 밝혀져감에 따라 암의 진단과 치료에 획기적인 변화가 시작되었다. 험액이나 각종 상기 면 암조직을 재취하여 DNA나 RNA 혹은 단백산물을 분리한 뒤 각종 blotting법에 의해 유전자의 질서, 양식 변화를 정확히 감사할 수 있게 되었고 이를 토대로 기존 세래식 방법으로 감별이 어려웠던 암의 진단이 이루어지고 있으며 암환자의 예후 판정 및 치료에 대한 효과판정에도 분자생물학적 방법이 응용되고 있다. 특히 낙소량의 유전자만 존재하여도 이를 다시 각내에 증폭시켜 검출하고, 난

Table 7 Currently Recognized HPV Types and Their Clinical Manifestation

HPV types	Clinical manifestation
HPV 6a-f	Condylomata acuminata CIN-I-III, VIN-I-III, Laryngeal papilloma
HPV 11 or, b	Condyloma acuminata CIN-I-III, laryngeal papillomas Conjunctival papillomas
HPV 16	Condyloma acuminata CIN-I-III, VIN-I-III, Bowenoid papulosis Carcinoma of cervix & penis
HPV 18	Condyloma acuminata CIN-I-III, VIN-I-III, Bowenoid papulosis Carcinoma of cervix & penis
HPV 31	CIN-I-III, Carcinoma of cervix
HPV 33	Bowenoid papulosis, CIN-I-III, Cervical carcinoma
HPV 34	Bowenoid papulosis, Bowen's disease
HPV 35	CIN-I-III, carcinoma of cervix
HPV 39	Carcinoma of cervix
HPV 42	Genital papillomas, Bowenoid papulosis, Flat condylomas

CIN—Cervical Intraepithelial Neoplasia

VIN—Vulvar Intraepithelial Neoplasia

시일만에 DNA Sequencing 및 gene cloning 까지도 가능케 하는 PCR법은 암의 초기진단이나 암치료 후 산증 암세포의 검출, 암의 예후판정 등 다양한 상분야에 이미 널리 응용되고 있다. 이러한 방법은 분자생물학적 창출해낼 수 있는 훌륭한 테크닉으로 환예에 불과하며, 현재 미국의 Cold Spring Harbor 연구소가 중심이 되어 전세계적 차원으로 진행하고 있는 「Human Genome Project」라는 최첨단 분자생물학 연구사업이 마무리된 후에는 암의 분자생물학적 진단은 정확도와 예민도는 더욱 높아지고 검사과정은 매우 간편화, 혹은 신시동화되어 질 것이고, 암의 치료는 이제 세포내의 분자차원에

서 수술을 가하는 molecular surgery의 출현 등, 지금으로서는 전문가들조차도 상상할 수 없는 놀라운 업적들이 이루어져, 21세기의 암의 진단 및 치료는 분자의학으로의 혁명적 변화에 의한 새로운 시평을 열게 될 것으로 사료된다

참 고 문 헌

- 1 Bishop JM The molecular genetics of cancer *Science* 1987. 235 305-311
- 2 Weinberg RA The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus *Science* 1985. 230 770-776.
- 3 Land H, Parada LF, Weinberg RA Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis *Science* 1983. 222 771-778
- 4 Ponten J Oncogenes for the oncologist. *Acta Oncologica* 1987. 1 3-12.
- 5 Griffin JA Recombinant DNA-Potential for gene therapy *Am J Med Science* 1985. 289 98-106.
- 6 Slamon DJ, deKernion JB, Verma IM, et al Expression of cellular oncogenes in human malignancies *Science* 1984. 224 256-262
- 7 Rupp GM Molecular biology and medical Science *N Engl J Med* 1988. 319 449-450
- 8 Blin N, Stafford DW A general methods for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes *Nucleic Acids Res* 1976. 3 2303-2306.
- 9 Chomczynski, P, Sacchi N Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987. 162 156-159
- 10 Southern EM Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *J Mol Biol* 1975. 98 503-517.
- 11 Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, et al Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977. 113 237-251.
- 12 O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, et al DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer *Br J Cancer* 1990. 61 671-674
- 13 Ceccherini-Nelli L, Re VD, Viel A, et al Ha-ras-1 restriction fragment length polymorphism and susceptibility to colon adenocarcinoma *Br J Cancer* 1987. 56 1-5.
- 14 Kerr IB, Lee FD, Quintanilla M, et al Immunocytochemical demonstration of P21 ras family oncogene product in normal mucosa and in premalignant and malignant tumours of the colorectum *Br J Cancer* 1985. 52 . 695-700
- 15 Mueller PR, Wold B In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR *Science* 1989. 246 780-786
- 16 Pfeifer GP, Steigerwald SD, Mueller PR, et al Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR *Science* 1989. 246 810-813
- 17 Brahim M, Haase AT Detection of viral sequences of low titration frequency by in situ hybridization *Proc Natl Acad Sci USA* 1978. 75 6125-6129
- 18 Cooper GM Cellular transforming genes *Science* 1982. 218 801-806.
- 19 Sheiness D, Bishop JM DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus *J Virol* 1979. 31 514-521.
- 20 Friend SH, Dryja TP, Weinberg RA Oncogenes and tumor-suppressing genes. *N Engl J Med* 1988. 318 618-622
- 21 Nowell PC Molecular events in tumor development *N Engl J Med* 1988. 319 575-577
- 22 Elvin P, Kerr IB, McArdle CS, et al Iso-

- lation and preliminary characterisation of cDNA clones representing mRNAs associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer *Br J Cancer* 1988, 59 36–42
- 23 Knudson AG Jr Hereditary cancer, oncogenes, an antioncogenes *Cancer Res* 1985, 45 1437–1443
- 24 de Jong D, Voetdijk BMH, Beverstock GC, et al Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma *N Engl J Med* 1988, 318 1373–1378
- 25 Farwell J, Flannery JT Cancer in relatives of children with central-nervous-system neoplasms *N Engl J Med* 1984, 311 749–753
- 26 Henry JA, Nicholson S, Hennessy C, et al Expression of the oestrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer relation to oestrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy *Br J Cancer* 1989, 61 32–38
- 27 Vijver MV, Peterse JL, Moor WJ, et al Neu-protein overexpression in breast cancer *N Engl J Med* 1988, 319 1239–1245.
- 28 Forrester K, Almoguera C, Han K, et al Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis *Nature* 1987, 327 298–303
- 29 Saglio G, Camaschella C, Giai M, et al Distribution of Ha-ras-1 proto-oncogene alleles in breast cancer patients and in a control population *Breast Ca Res Treat* 1988, 11 147–153
- 30 Izant JG, Weintraub H Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by antisense RNA *Science* 1985, 229 345–352
- 31 Holt JT, Gopal TV, Moulton AD, et al Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83 4794–4798
- 32 Nishikura K, Murray JM Antisense RNA of proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of NIH3T3 cells *Mol Cell Biol* 1987, 7 639–649
- 33 Holt JT, Redner RL, Nienhuis A An oligomer complementary to c-myc RNA inhibits proliferation of HL60 promyelocytic cells and induces differentiation *Mol Cell Biol* 1988, 8 963–973
- 34 Wong PC, Chung SW, Nienhuis AW Retroviral transfer and expression of the interleukin-3 gene in hematopoietic cells *Genes Dev* 1987, 1 358–365
- 35 Deisseroth AB Newer methods of cancer treatment, in DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds) *Cancer*, ed 3 Philadelphia, JB Lippincott Co, 1989, pp 2413–2426
- 36 Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, et al Analysis of human γ -chromosome-Specific reiterated DNA in chromosome variants *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74 1245–1249
- 37 Ostrow RS, Manias DA, Clark BA, et al Detection of human papillomavirus DNA in invasive carcinoma of the cervix by *in situ* hybridization *Cancer Res* 1987, 47 649–653
- 38 이동후, 이중남 간세포암 조직표본내 유전자 쌍결합 반응기법에 의한 간엽B형 바이러스 DNA 검색 내한 소화기병학회집지, 1988, 20 112–117
- 39 정영락, 박성수, 이동후 외 편평세포성 폐암의 c-Ha-ras 암유전자 발현에 관한 *in situ* hybridization 검색, 내한의학협회지 1990 33 160–166
- 40 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74 5463–5467
- 41 Bishop JM Cellular oncogenes and retroviruses *Ann Rev Biochem* 1983, 52

- 301-354
- 42 Huebner RJ, Todaro GJ Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer *Proc Natl Acad Sci USA* 1969, 64 1087-1094
- 43 Saksela K, Bergh J, Lehto VP, et al Amplification of the c-myc oncogene in a subpopulation of human small cell lung cancer *Cancer Res* 1985, 45 1823-1827
- 44 Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas *N Engl J Med* 1985, 313 1111-1116
45. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage *Science* 1984, 224 1121-1124
46. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour *Nature* 1983, 305 245-248
- 47 Alitalo K, Schwab M Oncogene amplification in tumor cells *Adv Cancer Res* 1986, 47 235-281
- 48 Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al Human breast cancer Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene *Science* 1987, 235 177-182
- 49 Parkes HC, Lillycrop K, Howell A, et al c-erbB₂ mRNA expression in human breast tumours comparison with c-erb B: DNA. *Br J Cancer* 1990, 61 39-45
- 50 문한림, 헌치화, 김홍교 외 두경부 뿐평상피암 조직에서 c-myc 종양 유전자의 증폭 대한암학회지 1990, 22 32-36.
- 51 Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, et al A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24
- human bladder carcinoma oncogene *Nature* 1982, 300 149-152
- 52 Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, et al Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982, 300 762-765
53. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, et al Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue *Nature* 1983, 302 33-37
- 54 Cory S Activation of cellular oncogenes in hemopoietic *Adv Cancer Res* 1986, 47 189-234
- 55 Klein EA, Fair WR, Chaganti RSK Molecular and cytogenetic events in urologic tumors *Seminars Urol* 1988, 6 2-21
- 56 Olumi AF, Skinner EC, Tsai YC, et al Molecular analysis of human bladder cancer. *Seminars Urol* 1990, 7 270-277
- 57 Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM, et al Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83 7391-7394
- 58 Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, et al Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilm's tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 1987, 236 175-180
- 59 Lee WH, Bookstein R, Hong F, et al Human retinoblastoma susceptibility gene Cloning, identification, and sequence *Science* 1987, 235 1394-1399
- 60 Lee WH, Shew JY, Hong FD, et al The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity *Nature* 1987, 329 642-645.
61. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989, 57 1083-1093
- 62 Stanbridge EJ Identifying tumor suppressor

- genes in human colorectal cancer *Science* 1990, 247 12-13
- 63 Hand PH, Thor A, Siblom J, et al Expression of a laminin receptor in normal and carcinomatous human tissues as defined by a monoclonal antibody *Cancer Res* 1985, 45 2713-2714
- 64 Verini J, Lovett EJ, McCoy JP, et al Differential expression of a laminin like substance by high and low metastatic tumor cells *Am J Pathol* 1983, 111 27-34
- 65 Guirguis R, Marguiles I, Taraboletti G, et al Cytokine induced pseudopodial protrusion is coupled to tumor cell progression *Nature* 1987, 329 261-263
- 66 Campbell A, Long M, Wicha M Hae-monectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage *Nature* 1987, 329 744-745
- 67 Takobashi M, Keating A, Singer J A functional defect in initiated adherent layers from chronic myelogenous leukemia long term cultures *Exp Hematol* 1985, 13 926-931
- 68 Howley PM Principles of carcinogenesis viral, in De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA(eds) *Cancer*, ed 3 Philadelphia, J B Lippincott Co, 1989, pp149-166
- 69 Brule AJC, Meijer CJLM, Bakels V, et al Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction *J Clin Microbiol* 1990, 28 2739-2743
- 70 Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ Detection of human papillomavirus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction *J Exp Med* 1988, 167 225-230
- 71 Duggan DB, Ehrlich GD, Davey FP, et al HTLV-I-induced lymphoma mimicking Hodgkin's disease Diagnosis by polymerase chain reaction amplification of specific HTLV-I sequences in tumor DNA *Blood* 1988, 71 1027-1032
- 72 Telenti A, Marshall WF, Smith TF Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction *J Clin Microbiol* 1990, 28 2187-2190
- 73 Keller GH, Huang DP, Shin WK, et al Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization *J Clin Microbiol* 1990, 28 1411-1416