大韓不妊學會誌: 第28卷 第3號 2001
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 28, No. 3, 2001, 9

Laser Captured Microdissection을 이용한 유전자 발현에 대한 연구 (I): RT-PCR을 위한 난자의 RNA 추출 및 증폭을 위한 최소한도의 확립

차병원 여성의학연구소[1], 포천중문의과대학교[2]

박창은[1] · 고정재[1,2] · 차광렬[1,2] · 이경아[1,2*]

Analysis of the Gene Expression by Laser Captured Microdissection (I): Minimum Conditions Required for the RNA Extraction from Oocytes and Amplification for RT-PCR

Chang Eun Park[1], Jung Jae Ko[1,2], Kwang Yul Cha[1,2], Kyung-Ah Lee[1,2*]

[1]Infertility Medical Center, CHA General Hospital, [2]College of Medicine, Pochon CHA University Seoul, 135-081, Korea

Objective: Recently, microdissection of tissue sections has been used increasingly for the isolation of morphologically identified homogeneous cell populations, thus overcoming the obstacle of tissue complexity for the analysis cell-specific expression of macromolecules. The aim of the present study was to establish the minimal conditions required for the RNA extraction and amplification from the cells captured by the laser captured microdissection.

Methods: Mouse ovaries were fixed and cut into serial sections (7 ㎛ thickness). Oocytes were captured by laser captured microdissection (LCM) method by using PixCell II^{TM} system. The frozen sections were fixed in 70% ethanol and stained with hematoxylin and eosin, while the paraffin sections were stained with Multiple stain. Sections were dehydrated in graded alcohols followed by xylene and air-dried for 20 min prior to LCM. All reactions were performed in ribonuclease free solutions to prevent RNA degradation. After LCM, total RNA extraction from the captured oocytes was performed using the guanidinium isothiocyanate (GITC) solution, and subsequently evaluated by reverse transcriptase -polymerase chain reaction (RT-PCR) for glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH).

Results: With the frozen sections, detection of the GAPDH mRNA expression in the number of captured 25 oocytes were not repeatable, but the expression was always detectable from 50 oocytes. With 25 oocytes, at least 27 PCR cycles were required, whereas with 50 oocytes, 21 cycles were enough to detect GA PDH expression. Amount of the primary cDNA required for RT-PCR was reduced down to at least 0.25 ㎕ with 50 oocytes, thus the resting 19.75 ㎕ cDNA can be used for the testing other interested gene expression. Tissue-to-slide, tissue-to-tissue forces were very high in the paraffin sections, thus the greater number of cell procurement was required than the frozen sections.

Conclusion: We have described a method for analyzing gene expression at the RNA level with the

*교신저자: 이경아, 우) 135-081 서울시 강남구 역삼1동 606-5, 차병원 여성의학연구소, 포천중문 의과대학교 생리학교실,
Tel: 02) 3468-3440, Fax: 02) 501-8704, e-mail: kal1227@hitel.net
본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (2000-2-20500-001-2)지원으로 수행되었음.

homogeneously microdissected cells from the small amount of tissues with complexity. We found that LCM coupled with RT-PCR could detect housekeeping gene expression in 50 oocytes captured. This technique can be easily applied for the study of gene expression with the small amount of tissues.
Key Words: Laser captured microdissection, Mouse ovary, Gene expression, RT-PCR

최근 분자생물학적 기술의 발전은 개별적인 세포 단위의 유전적, 기능적인 변화를 찾는 수준에까지 진행되었다. 분자생물학적 기법 중 유전자 발현을 보기 위해서 대체로 Northern blot analysis, RNase protection assays, in situ hybridization 등이 사용되는데, 이들 방법은 많은 양의 mRNA를 필요로 하기 때문에 적은 양의 시료를 갖고 시작할 경우에는 적용하기 힘든 단점이 있다. 또한 여러 가지 세포로 이루어진 조직을 대상으로 할 경우, 전체 조직으로부터 얻은 mRNA는 서로 다른 세포의 것이 혼합되어 있기 때문에 유전자 발현을 세포 특이적으로 환산하여 산출할 수 없는 단점이 있다.[1]

최근에 개발된 laser captured microdissection (LCM) 기술의 발전으로 아무리 복잡한 구조를 갖는 조직이라고 하여도 조직 절편으로부터 순수한 세포군을 선택적으로 얻어서 사용할 수 있기 때문에,[2~6] 각 세포 특이적인 DNA, RNA 및 단백질의 발현을 비교 분석할 수 있다. LCM을 이용하기 전에는 조직 절편의 슬라이드에서 수작업으로 긁어내는 방법이 사용되었으나 이는 아주 정교하게 특정세포를 분리해 내지 못해 정확성이 떨어졌다. 반면에 LCM의 기술은 현미경하에서 조직을 눈으로 보면서 낮은 에너지의 laser beam을 이용하여 원하는 부위를 찍어내기 때문에 동종조직 (homogeneous tissue)을 선택하거나 순수한 세포만을 선택적으로 얻기에 용이하게 되었다.[7~9]

PixCell II^{TM} LCM system은 조직 절편 위에 transfer film이 접촉하게 한 후에 laser pulse를 주게 되면 transfer film이 녹아서 원하는 세포위에 떨어지게 되고, transfer film을 떼어낼 때 film에 붙은 세포만이 떨어져 나오기 때문에 순수한 세포군을 포획하게 되는 원리로 작동한다.[7] 이후 transfer film에 포획한 세포군은 DNA, RNA, 혹은 단백질 분석 등 원하는 분석을 위해 digestion buffer로 추출하게 된다.[10]

LCM을 위해 시료를 제조하는 과정은 신선한 검체로 신속하고 간편하며, 분석을 원하는 물질이 변질되지 않도록 안전하게 진행되어야 한다. 특정세포의 유전자 발현을 관찰하기 위해서는 우선 세포의 구조가 선명하게 구별가능할 수 있도록 조직의 형태학적인 구조가 잘 유지되어야 하며, 특히 RNA의 상태가 잘 보존되어야 할 것이다. 이와 같은 이유 때문에 LCM 검체로부터 RNA 추출을 위한 적합한 상태와 적절한 고정제의 선택이 중요하다. 동결 절편 (frozen section) 방법에 비해 상대적으로 전체 과정이 길고 복잡한 파라핀 절편 (paraffin section) 방법을 이용할 때 핵산의 회수 효율성이 낮다.[1]

LCM과 RT-PCR 방법을 병행할 경우, 임상적으로 얻어진 아주 적은 양의 검체라고 하더라도 유전자 발현을 비교 분석할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 이와 같이 아주 적은 양의 시료를 대상으로 LCM을 이용해 세포를 포획하고 RT-PCR 방법으로 유전자의 발현양상을 연구할 때 필요한 최소한의 세포 수, cDNA 양, 그리고 PCR cycle 수 등의 RT-PCR 조건을 결정하고자 함이다. 이를 위하여 실험동물의 난소를 이용, 세포의 숫자를 세기 쉽고 RNA가 풍부한 난자를 LCM으로 포획하고 mRNA를 추출하여 housekeeping 유전자 중에서 glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)의 유전자 발현을 비교 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 생쥐 난소 준비

생후 3주 된 ICR 생쥐에 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Folligon, Intervet, Boxmeer, Holland)를 5 IU씩 복강주사하고 48시간 후에 생쥐를 경추탈골 시킨 후, 난소를 얻었다. 난소는 곧바로 OCT compound에 포매하여 급속냉각 시킨 후 cryostat (Shandon, Cheshire, England, UK)을 이용해 7 ì m로 연속절편하여 슬라이드를 제작하였고, 사용 전까지 -70℃에 보관하였다. 파라핀의 경우는 난소를 70% EtOH로 먼저 고정한 후, 파라핀을 침투시켜 포매하고 사용 전까지 -20℃에 보관하였다. 모든 난소조직은 LCM

을 하는 날 오전에 절편을 만들었다.

2. LCM을 위한 조직 준비

동결조직의 경우 제작된 슬라이드를 공기 중에서 30초간, 70% EtOH에 30초간 고정과정과 DEPC-dH_2O의 수세과정을 거친 후, Hematoxylin 용액으로 염색하고 DEPC-dH_2O와 bluing 용액으로 처리하였다. 그리고 70% EtOH과 90% EtOH에서 탈수과정을 거친 후 Eosin 용액으로 세포질을 염색하고, 70% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH 순으로 30초씩 탈수과정을 거쳤다. 그런 후, xylene에 5분씩 2번의 탈수과정을 마치고 후드에서 20분간 air dry 시켰다. 파라핀조직의 경우는, 제작된 슬라이드를 xylene 처리과정을 통해 절편으로부터 파라핀을 제거하고, 알코올 과정을 거쳐 물로 세척한 후, Multiple stain 용액으로 염색하였다. 마찬가지로 70% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH 순으로 30초씩 탈수과정을 거친 후, xylene으로 5분씩 2번의 탈수과정을 마치고 후드에서 20분간 air dry 시켰다.

3. LCM 과정

1) 난자의 포획 (Procure)

PixCell II^{TM} system (Arcturus Engineering, Inc., Mountain View, USA)에 장착된 현미경 하에서 난포의 크기가 400 ㎛ 이상이면서 antrum이 형성된 난포의 난자를 포획하였다 (Figure 1). 난자의 수는 5, 25, 50, 100, 200의 5그룹으로 나누었다. 이때 laser beam은 선택하고자 하는 세포의 크기에 따라 7.5~30 ㎛ diameter까지 spot size를 조절할 수 있는데, 본 연구에서는 15 ㎛의 laser를 사용하였고, power는 조직의 상태에 따라 20~40 mW 범위에서 사용하였다.

2) Total RNA extraction

포획한 세포가 붙어 있는 transfer film (CapSure TF-100; Arcturus Engineering, Inc., Mountain View, USA)은 200 ㎕의 GITC digestion buffer가 담긴 튜브 (Brinkmann Inc, Westbury, NY)에 담아 cap 표면이 완전히 buffer에 닿도록 튜브를 거꾸로 세운 채 42°C에서 incubation하면서 3~4번 inversion을 시행한다. 이때 lysis에 필요한 시간을 알아보기 위하여 2, 5, 15, 30분으로 변화하여 비교하였다. Incubation 후에 위 용액을 spin down시키고, RNA extraction을 위해 새로운 1.5 ml 튜브에 담고 2 M sodium acetate (pH 4.0) 20 ㎕, water saturated phenol 220 ㎕, chloroform-isoamyl alcohol (23:1) 60 ㎕를 첨가한 후 잘 섞어주고 15분간 얼음 위에 세워 놓았다. 그리고 4°C 14000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층을 새로운 tube에 옮긴 후 15 ㎍/㎕의 Glycoblue (Ambion, Inc., Austin, Tx) 3 ㎕와 isopropanol 200 ㎕를 첨가하여 -70°C에서 1시간 동안 놓아둔다. 그 후 다시 4°C 14000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 상층액을 따라 버리고 침전물에 75% EtOH을 넣고 4°C에서 5분간 14000 rpm으로 washing하였다. RNA 침전물을 공기 중에 건조시킨 후 DEPC-dH_2O로 용해시켜 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다.

3) 역전사 중합효소연쇄반응 (RT - PCR)

역전사 (reverse transcription) 반응에는 분리된 RNA suspension 5 ㎕를 사용하여 Superscript II RTase (Gi-

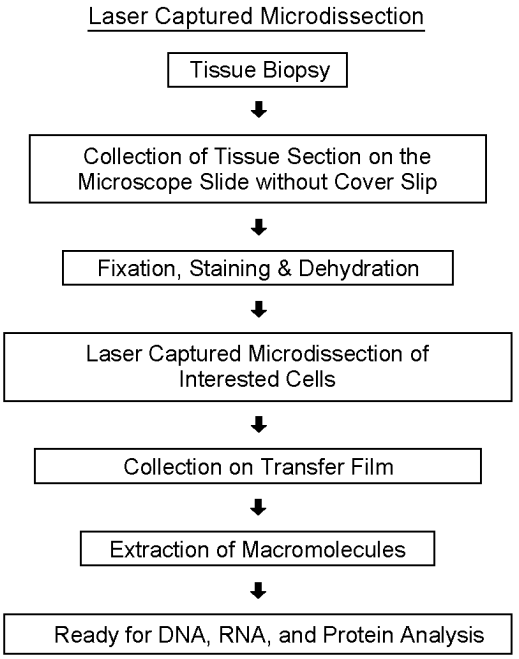

Figure 1. Schematic diagram describing procedures for LCM. After tissue fixation, staining, dehydration as described in the materials and methods, cells of interest are located and CapSure^{TM}, optically transparent device, is placed on the tissue. A laser pulse releases the cell from surrounding structures transferring it to the thermoplastic film. The cells bound to the CapSure device is lifted and placed onto a standard microcentrifuge tube for subsequent extraction and analysis of macromolecules.

bcoBRL, Rockvile, MD)를 이용하여 42℃에서 60분간 반응하여 cDNA를 합성하였다. 총 반응용액을 20 ㎕로 하여 Superscript II RTase 200 U, 10 mM dNTP, oligo (dT) primer 0.5 ㎍, 25 mM $MgCl_2$을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 중합효소연쇄반응 (PCR)에 사용된 GAPDH primer는 forward primer로 5'-ACCAC-AGTCCATGCCATCAC-3', reverse primer로 5'-TCCA-CCACCCTGTTGCTGTA-3'를 사용하였다. 이때 예상되는 PCR 결과는 446 bp였다. PCR은 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% Tween 20, 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.625 UNIT Taq DNA polymerase가 포함된 PCR master mixture (ABgene, Survey, UK)를 전체 25 ㎕ 반응으로 하여 시행하였다. 94℃에서 5분간 predenaturation 반응한 후에 94℃에서 40초 denaturation, 60℃에서 40초 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 반복하였고 postelongation 반응을 72℃에서 10분간 실시하였다. 이를 통해 얻어진 PCR product는 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 Image Analyze (Vilber Lourmat, France)로 확인하였다.

결 과

Figure 1은 LCM을 이용하여 조직으로부터 RNA, DNA, 단백질 분석까지 진행할 때 그 일련의 과정을 보여주는 flow chart이다. 우선 조직을 적출하여 동결하거나 파라핀으로 포매하여 연속 절편을 만든다. 그리고 고정, 염색, 탈수단계를 거쳐 LCM을 위한 슬라이드를 제작하고, Pixcell II™ LCM system을 사용하여 원하는 특정 세포를 transfer film에 포획한 후 transfer film으로부터 원하는 물질을 추출하여 분자생물학적 분석을 진행할 수 있다. 본 실험에서는 RNA를 추출하여 housekeeping 유전자의 발현을 비교하였다.

Figure 2는 제작된 절편에서 난자를 포획하기 전 (A, D)과 후 (B, E)의 조직학적인 사진으로 antrum이 형성된 type 7 또는 type 8 난포로부터 난자만을 포획하는 모습을 보여주고 있다. Figure 2C, 2F처럼 transfer film에 난자만을 포획하여 다음 실험에 공시하였다. 그러나 파라핀을 이용할 경우 (D, E, F)에는 Figure 2E와 같이 세포가 깨끗하게 떨어져 나오지 않

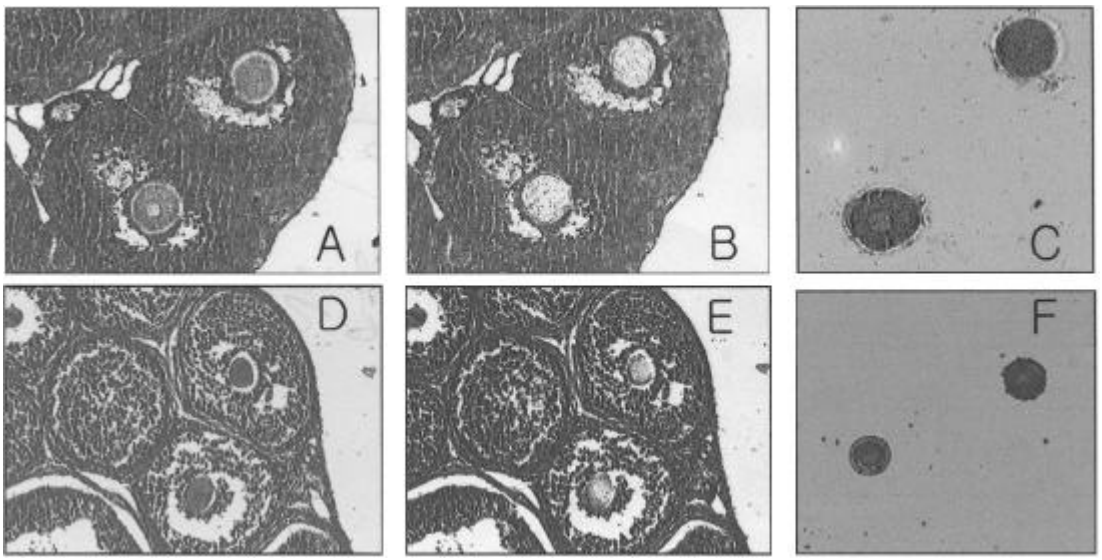

Figure 2. Microphotographs of sections of preovulatory ovarian tissues for LCM. Sections were fixed and stained. Panels show the section before **(A, D)** and after **(B, E)** removal of a oocytes by LCM. The archived image of the oocytes captured on the CapSure™ transfer film is shown in **C** and **F**. Panels **A, B, C:** frozen sections (×400), Panels **D, E, F:** paraffin-embedded sections (×200).

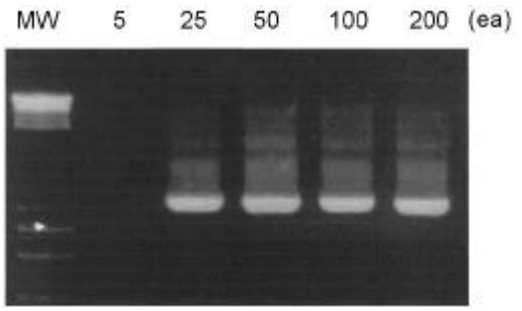

Figure 3. Expression of mouse GAPDH according to the number of oocytes captured by LCM. Lane 1: 1 kb plus ladder, Lane 2: 5 oocytes, Lane 3: 25 oocytes, Lane 4: 50 oocytes, Lane 5: 100 oocytes, and Lane 6: 200 oocytes.

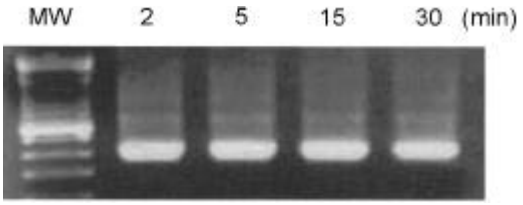

Figure 4. Expression of mouse GAPDH according to the duration for the lysis buffer treatment. Total RNA derived from 50 laser captured microdissected oocytes was extracted for 2 min (lane 2), 5 min (lane 3), 15 min (lane 4), and 30 min (lane 5). Lane 1 depicts 1 kb plus ladder.

아, 동결 절편에 비하여 transfer rate가 떨어진다.

Figure 3은 난자를 5, 25, 50, 100, 200번 포획한 후 GAPDH의 유전자 발현양상을 관찰한 결과이다. 난자 5개를 포획해서는 GAPDH의 유전자 발현을 전혀 관찰할 수 없었으며, 그 이후 25, 50, 100, 200의 경우에는 발현을 관찰할 수 있었다. 그러나, 25개를 포획한 경우에는 band를 매 실험마다 관찰할 수 없었고, 50번 이상을 포획한 경우에는 band를 언제나 관찰할 수 있었다.

Figure 4는 난자를 50번 포획한 transfer film으로부터 난자를 회수하기 위해 42°C에서 lysis buffer를 처리한 시간에 따른 GAPDH의 유전자 발현양상을 나타낸 것이다. 2분에서 30분까지 band의 양상에는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그래서 이후 모든 실험에선 결과를 확실히 관찰하기 위해서 42°C에서 30분으로 처리하였다.

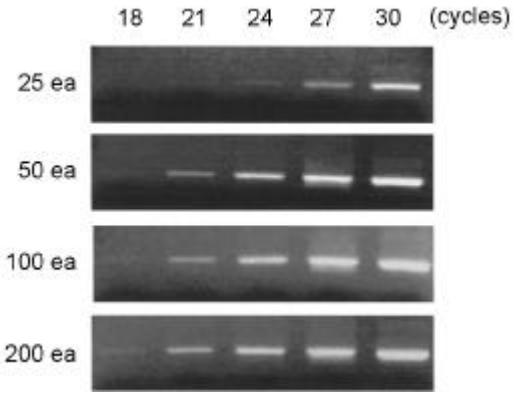

Figure 5. Expression of mouse GAPDH according to the number of cells procured and that of PCR cycles in the case of frozen sections. Total RNA derived from each number (25, 50, 100, 200) oocytes was amplified for cDNA synthesis, and the 20 ìl primary cDNA was used for PCR. PCR was performed to the number of 18, 21, 24, 27, and 30 PCR cycles, then analyzed on the electrophoresis gel.

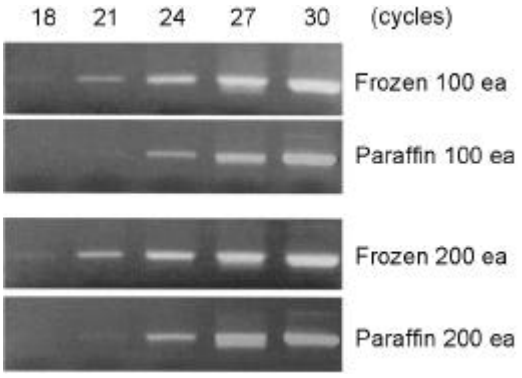

Figure 6. Expression of mouse GAPDH according to the number of cells procured and that of PCR cycles in the case of paraffin-embedded sections. Total RNA derived from 100 and 200 oocytes were amplified for cDNA synthesis, and the 20 ìl primary cDNA was used for PCR. PCR was performed to the number of 18, 21, 24, 27, and 30 PCR cycles, and analyzed on the electrophoresis gel.

Figure 5는 난자를 25, 50, 100, 200번 포획한 수와 PCR cycle 수에 따른 GAPDH의 발현양상을 나타낸 것이다. 동결 절편으로부터 난자를 각각 25개, 50개, 100개, 200개의 포획한 후, 얻은 total RNA를 20 ìl의 cDNA로 만들어 4 ìl씩 분주하여 PCR하였다. Lane 1부터 5까지는 각각 18, 21, 24, 27, 30 cycles의 PCR

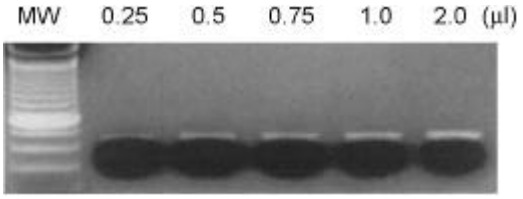

Figure 7. Expression of mouse GAPDH according to the amount of cDNA used for PCR. Total RNA derived from 50 oocytes (frozen) was amplified for cDNA synthesis and various amounts of cDNA was used for PCR. Lane 1: 1 kb plus ladder, Lane 2: 0.25 ìl, Lane 3: 0.5 ìl Lane 4: 0.75 ìl Lane 5: 1 ìl Lane 6: 2 ìl cDNA.

결과를 나타내는 것이다. 난자 25개 포획한 경우에 있어서는 24 cycle에서 약하게 27 cycle부터 확연히 발현을 관찰할 수 있었다. 50개를 포획한 경우는 18 cycle에서 약하게 21 cycle부터는 확실히 관찰할 수 있었다. 그 이상을 포획한 경우에도 50개와 마찬가지로 21 cycle 부터 확실한 발현을 관찰할 수 있었다. 그래서 21 cycle을 최소의 PCR cycle 수로 결정하였다.

같은 수의 난자를 포획하여도, 파라핀 sample의 경우 transfer rate가 떨어지기 때문에 PCR에 필요한 cDNA의 양 및 PCR cycle의 수가 더 많아야 할 것이다. 따라서 다음으로는 파라핀 절편으로부터 난자를 100개 및 200개 포획하여 Figure 5와 똑같은 조건으로 PCR한 후에 전기영동하였다 (Figure 6). 파라핀 절편의 경우 같은 수의 난자를 포획하였을 경우, 눈으로 band를 확인하기 위해서는 동결 절편에 비하여 PCR을 3 cycle 이상 더 돌려야 관찰가능 하였다.

마지막으로 전기영동 후 눈으로 확인할 수 있는 최소한의 cDNA의 양을 알아보기 위하여 난자를 50번 포획한 경우, PCR에 사용할 cDNA 의 양을 변화하여 이에 따른 GAPDH의 발현양상을 알아보았다 (Figure 7). cDNA 양을 0.25 ìl, 0.5 ìl, 0.75 ìl, 1 ìl, 2 ìl를 사용하여 PCR 21 cycle을 진행한 결과, cDNA 0.25 ìl만으로도 PCR을 21 cycle에서 유전자 발현을 관찰할 수 있었다.

고 찰

순수한 세포군을 분리하기 위하여 cell line culture (세포배양), xenograft (이종이식), flow cytometry (유세포 분석) 등의 방법들이 이용되었다.[8] 세포배양은 다른 세포와 섞여 있는 것은 방지할 수 있지만, 성장환경요인으로 인해 생물학적 성격이 변화하게 되어 엄격한 의미로 원래의 생체내 조직에서 일어나는 유전자 발현을 관찰하기는 어려운 단점이 있다. 이종이식은 자가복제를 하는 장점은 있으나 비싸고 전문성이 요구되어지며 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 유세포 분석기는 이종조직으로부터 순수한 세포군을 분류하여 질병의 진행상태에 대해 알아볼 수 있으나, 세포가 부유액으로 존재하여야 한다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법이 microdissection이다. 그 중에서도 laser를 이용하는 LCM은 완벽하게 순수한 특정 세포군을 얻을 수 있고, 또한 임상진단에 있어서도 아주 적은 양의 특정 세포를 가지고서도 정량적, 정성적으로 유전자 발현을 분석할 수 있는 장점이 있다.[11,12]

난소는 매우 복잡한 구조를 이루고 있다. 난자는 cumulus cell과 직접 접촉하고, 그 겉으로 granulosa cell, theca interna, theca externa의 차례로 둘러싸여 있다. 이렇게 이루어진 난포는 난소의 기질 안에 파묻혀 있기 때문에, 난소로부터 난포를 분리하기 위해서는 물리적인 처리 외에도 효소를 처리하는 것이 좋다. 특히 사람의 난소와 같이 기질이 매우 치밀한 경우, 효소를 반드시 처리해야 하고, 또 처리 시간이 길어지기 때문에 그동안 각종 세포의 생리학적 특성이 변화할 확률이 높다. 따라서 조직을 얻는 즉시로 조직학적 관찰을 위한 고정을 하게 되면 그 상태 그대로 보존할 수 있다. 본 실험에서는 LCM을 이용하여 Figure 2와 같이 현미경하에서 조직을 눈으로 확인하면서 난자만을 정확하게 포획하여 난자만의 특이적인 유전자 발현을 관찰할 수 있었다. 난자를 이용한 이유는 세포의 크기가 커서 세포의 개수를 각각 세어서 포획할 수 있고, 난자 안에 존재하는 mRNA 의 양이 다른 세포에 비하여 많은 장점이 있기 때문이다. 본 연구에서는 LCM을 위해 필요로 하는 최소한의 세포 수를 결정하기 위해 마우스의 난자를 이용해 GAPDH의 발현으로 객관화하였다. 이때 최소한의 조건은 난자 50번을 포획하여 0.25 ìl의 cDNA 를 사용하고 21 cycle로 PCR 할 경우, GAPDH를 확인할 수 있었다.

위 결과에서처럼 난자 5번 포획으로는 GAPDH의 발현을 전혀 관찰할 수 없었고, 25번을 포획하는 경우

에는 재현성이 없었으며, 50개 이상을 포획해야 안정적으로 발현을 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 연구의 결과를 다른 세포의 연구에 접목할 경우, 난자와의 크기 및 세포내 transcripts의 양을 고려하여 포획할 세포의 숫자를 조절할 필요가 있을 것으로 사료된다. 또한 특정 유전자를 대상으로 할 경우, GAPDH의 발현에 비교하여 사용할 cDNA의 양을 조절할 수 있을 것이다. 본 연구의 결과는 임상의 경우, 환자로부터 얻는 소량의 조직으로부터 특이적인 유전자 발현을 관찰하거나 조직학적인 진단 표지자 (marker) 등을 연구하는데 유용한 정보를 제공하며 위 연구 결과를 바탕으로 세포의 개수, internal control의 발현관찰을 위한 cDNA 의 양 등과 같은 실험 조건결정을 결정하는데 기본적인 정보를 제공할 수 있을 것이다.

LCM을 이용한 RNA의 분석에 있어서 RNA 및 세포의 회수율 (transfer rate)을 최상으로 얻기 위해서는 신선한 동결 절편 (fresh-frozen section)을 사용하는 것이 바람직하나, 동결 절편의 경우는 파라핀 절편에 비하여 조직내 세포의 구조를 관찰하기가 더 어렵다. 더구나 LCM을 하기 위해서 cover slip 을 덮지 않고 관찰해야 하기 때문에, 원하는 세포를 떼어내기 어려운 구조를 갖는 조직의 경우에는 파라핀 절편을 사용하는 것이 더 효과적일 것이다. 본 연구결과, 파라핀 절편을 사용했을 경우, 비록 동결 절편에 비하여 세포 및 RNA 의 회수율은 떨어졌어도 RNA 를 이용한 RT-PCR이 가능하였으므로 정확한 구조를 요구하는 경우에는 파라핀 절편을 이용해도 무방할 것으로 사료된다. 그러나, RNA의 변성을 유발하는 endogeneous nuclease를 방지하기 위해 신속하게 다루어져야 한다.

이제까지의 보고에 의하면 DNA의 분석을 위해서는 100~500개의 세포,[13~15] RNA의 분석을 위해서는 500~1000개의 세포를[1,16~18] 필요로 하였다. 본 연구실에서는 난자 10개, 근육세포 20개를 포획해서도 DNA 분석이 가능하였으며 (data not shown), RNA 분석의 경우는 본 연구 결과에서처럼 난자의 경우는 동결조직으로는 최소한 50개, 파라핀조직으로는 최소한 100개를 가지고도 유전자 발현을 관찰할 수 있다는 것을 알게 되었다. 단백질 분석을 위해서는 RNA 분석을 위해 필요한 세포 수보다 월등히 많은 세포 즉, 대략 5000개 이상의 세포가 필요할 것으로 추천하고 있다.[6] 그러나 NANO 과학이 발달하고 있는 추세로 본다면, 앞으로 단백질 분석을 위해서 필요한 세포의 숫자도 더 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

특정 순수 세포에서 특이적으로 발현하는 유전자를 규명하기 위해서는 본 연구에서와 같이 LCM과 RT-PCR을 통한 유전자 발현분석 이외에도 cDNA Microarray나 subtractive hybridization[19] 등의 기법을 LCM과 접목하면 한층 더 정확한 유전자 발현을 규명할 수 있을 것이다. 따라서 앞으로 LCM을 이용한 연구가 기초 및 임상 여러 방면에서 유용하게 사용될 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

1. Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, Foley JF, Maronpot RR. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from Laser Capture Microdissected Tissue. Mol Carcinogen 1999; 25: 86-91.
2. Luo L, Salunga RC, Guo H, Bittner A, Joy KC, Galindo JE, et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nature Med 1999; 5: 117-22.
3. Murakami H, Liotta L, Star RA. IF-LCM: Laser capture microdissection of immunofluorescently defined cells for mRNA analysis rapid communication. Kidney Int 2000; 58: 1346-53.
4. Neira M, Danilova V, Hellekant G, Azen EA. A new gene (rmSTG) specific for taste buds is found by laser capture microdissection. Mammalian Genome 2001; 12: 60-6.
5. Simone NL, Remaley AT, Chaboneau L, Petricoin EF, Glickman JW, Emmert-Buck MR, et al. Sensitive immunoassay of tissue cell proteins procured by laser capture microdissection. Am J Pathol 2000; 156: 445-52.
6. Wittliff JL, Kunitake ST, Chu SS, Travis JC. Applications of laser capture microdissection in genomics and proteomics. J Clin Ligand Assay 2000; 23: 66-73.
7. Bonner RF, Emmert BM, Cole K, Pohida T, Chuaqui

R, Goldstein S, et al. Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. Science 1997; 278: 1481-3.

8. Curran S, McKay JA, McLeod HL, Murray GI. Laser capture microscopy. Mol Pathol 2000; 53: 64-8
9. Schutze K, Lahr G. Identification of expressed genes by laser mediated manipulated of single cells. Nat Biotechnol 1998; 16: 737-42.
10. Chu SS, Kunitake S, Travis JC. Laser Capture Microdissection: Applications in Cancer Research. URL http://www.biomedicalproducts.com 2000.
11. Bernsen MR, Dijkman HBPM, Vries E, Figdor CG, Ruiter DJ, Adema GJ, et al. Identification of multiple mRNA and DNA sequences from small tissue samples isolated by laser-assisted microdissection. Lab Invest 1998; 78: 1267-73.
12. To MD, Done SJ, Redston M, Andrulis IL. Analysis of mRNA from microdissected frozen tissue sections without RNA isolation. Am J Pathol 1998; 153: 47-51.
13. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: Opening the microscopic frontier to molecular analysis. Trends in Genetics 1998; 14: 272-6.
14. Sirivatanauksorn Y, Sirivatanauksorn V, Bhattacharya S, Davidson BR, Dhillon AP, Kakkar AK, et al. Evolution of genetic abnormalities in hepatocellular carcinomas demonstrated by DNA fingerprinting. J Pathol 1999; 189: 344-50.
15. Tam AS, Foley JF, Devereux TR, Maronpot RR, Massey TE. High frequency and heterogeneous distribution of p53 mutations in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. Cancer Res 1999; 59: 3634-40.
16. Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, et al. Expression of ob receptor in normal human adrenals: Differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. J Clin Endocrin Metab 1998; 83: 4459-66.
17. Jin L, Thompson CA, Qian X, Kuecker SJ, Kulig E, Lloyd RV. Analysis of anterior pituitary hormone mRNA expression in immunophenotypically characterized single cells after laser capture microdissection. Lab Invest 1999; 79: 511-4.
18. Kohda Y, Murakami H, Moe OW, Star RA. Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection. Kidney Int 2000; 57: 321-31.
19. Luqmani YA, Lymboura M. Subtraction hybridization cloning of RNA amplified from different cell populations microdissected from cryostat tissue sections. Anal Biochem 1994; 222: 102-9.