creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000263315

2012년 8월

석사학위논문

JAK2 V617F 신속 검출을 위한 대립유전자중합효소연쇄반응법 및 융합곡선분석법의 유용성

조 선 대 학 교 대 학 원

바이오신약개발학과

박 우 관

JAK2 V617F 신속 검출을 위한 대립유전자중합효소연쇄반응법 및 융합곡선분석법의 유용성

Rapid allele-specific PCR and melting curve analysis for detection of *JAK2* V617F

2012年 8月 25日

조 선 대 학 교 대 학 원

바이오신약개발학과

박 우 관

JAK2 V617F 신속 검출을 위한 대립유전자중합효소연쇄반응법 및 융합곡선분석법의 유용성

Rapid allele-specific PCR and melting curve analysis for detection of *JAK2* V617F

지도교수 박 건

이 논문을 이학석사학위신청 논문으로 제출함

2012年 4月

조 선 대 학 교 대 학 원

바이오신약개발학과

박 우 관

박우관의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 문대수 인

위 원 조선대학교 교수 장숙진 인

위 원 조선대학교 교수 박 건 인

2012年 5月

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT

Ⅰ. 서론 1

Ⅱ. 연구방법 2

1. 연구대상 2

2. 검체 처리 2

3. 전통적인 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 3

4. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 3

5. 직접 융해곡선분석 4

6. BsaXI 제한효소 처리 이중중합효소연쇄반응법 및 염기서열분석법 4

7. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석법의 민감도 분석 5

8. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석법의 특이도 분석 5

Ⅲ. 결과 6

1. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 증폭산물의 융해온도 6

2. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 및 융해곡선분석법의 민감도 6

3. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 및 융해곡선

분석법의 특이도.....6
4. 전통적 대립유전자특이중합효소연쇄반응법과 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법-융해곡선분석법의 비교.....6
Ⅳ. 고찰.....7
Ⅴ. 참고문헌.....9
Ⅵ. 감사의 말씀.....18

그림 목차

Fig 1. Detection limit of the conventional allele-specific PCR assay.....12

Fig 2. Primers design for direct *JAK2* V617F allele-specific PCR-Melting curve analysis.....13

Fig 3. Result of BsaXI-treated nested PCR and direct sequencing.....14

Fig 4. Melting curves of direct allele-specific PCR.....15

Fig 5. Detection limit of the direct allele-specific PCR assay.....16

Fig 6. Detection limit of the direct allele-specific PCR assay (ASP) and melting curve analysis.....17

ABSTRACT

Rapid allele-specific PCR and melting curve analysis for detection of *JAK2* V617F

Park, Woo Kwan
Advisor: Prof. Geon Park
Department of Bio new drug development
Graduate School of Chosun University

Objectives: Detection of the *JAK2* V617F is an essential diagnostic tool for BCR/ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). Despite many techniques for detection of *JAK2* V617F have introduced in clinical laboratory fields, any techniques is required for purified DNA as template. We develop a rapid detection technique using direct real-time allele-specific PCR (ASP) and melting curve analysis without DNA preparation from whole blood.

Methods: Fifty venous samples of Patients with BCR/ABL-negative MPNs were used in the study. Because hemoglobin is a strong quencher, we treated 300 μL of whole blood by 600 μL of rapid RBC lysis solution at room temperature for 3 min. After centrifugation and discard of supernant, cell pellet was diluted with 100 μL of phosphate-buffer saline. A leukocyte suspension was used directly in the direct real-time ASP. For confirmation of results of direct real-time melting curve analysis, we also performed an in-house *JAK2* V617F ASP and a BsaXI-treated nested PCR-direct sequencing using purified DNA. For

investigating detection limit and specificity of this technique, we used HEL 92.1.7 cell-line and 96 samples of normal persons, respectively.

Results: Melting temperatures of *JAK2* V617F mutant melting peak and internal control melting peak were 77.0±0.3℃ and 83.5±0.2℃, respectively. Concordance rate with direct real-time melting curve analysis and in-house conventional ASP was 100% (60% vs 60%, respectively). Total running time and handling time of direct real-time melting curve analysis for 10 samples was 1.5 hr and only 10 min. The detection limit and specificity of real-time melting curve analysis was 2% and 100% according to BsaXI-treated nested PCR-direct sequencing.

Conclusions: Direct real-time ASP and melting curve analysis for detection of *JAK2* V617F is a rapid, reliable, and economic technique.

Ⅰ. 서 론

골수증식종양(Myeloproliferative neoplasms, MPN)은 골수에서 한 종류 이상의 골수세포(과립구계, 적혈구계, 거대핵세포, 비만세포)가 증식하는 조혈모세포의 클론성 질환이다[1]. 만성골수성백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML)의 경우 BCR/ABL1 융합 유전자의 발견으로 진단과 치료에 큰 발전을 가져왔다[2]. BCR/ABL1 음성 MPN에서는 질병특이적인 표지자가 발견되지 않았으나 최근 야누스 타이로신 활성효소 2 (Janus tyrosine kinase 2, *JAK2*)의 엑손 14에 위치하는 c.1849G>T 치환돌연변이에 의해 617번 아미노산이 발린에서 페닐알라닌으로 치환되는 점돌연변이(V617F)의 발견으로 BCR/ABL1음성 MPN의 진단과 치료에 있어서 새로운 길이 열렸다[3, 4]. *JAK2* V617F를 검출하기 위한 다양한 분자진단적 검사기법이 개발되어 이용되고 있으나 모든 기법이 순수하게 정제된 DNA를 사용해야만 한다. 이에 저자는 전혈에서 DNA 정제 작업 없이 직접 실시간 대립유전자중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석법을 이용하여 신속하게 검출하는 기법을 개발하고자 한다.

Ⅱ. 연구방법

1. 연구대상

JAK2 양성 검체는 *JAK2* V617F 동형접합 돌연변이를 가지는 HEL 세포주를 이용하였으며 *JAK2* 음성 검체는 정상인의 정맥혈에 대해 제한효소처리 이중중합효소연쇄반응법 및 염기서열분석법을 이용하여 검증하여 이용하였다. 민감도 비교를 위해 2010년 5월부터 2012년 5월까지 조선대학교병원 진단검사의학과에 *JAK2* V617F 대립유전자특이중합효소연쇄반응 검사 의뢰된 50개의 정맥혈 검체를 대상으로 하였으며 특이도 검증을 위해 정상인 98명의 신선 정맥혈 검체를 이용하였다.

2. 검체 처리

1) DNA 추출

정맥혈 200 μL에서 QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, MD, U.S.A.)를 사용하여 지침에 따라 genomic DNA를 분리 정제하였다. Epoch spectrophotometer (Biotek, Winooski, VT)를 이용하여 정제한 DNA의 농도와 순도를 측정한 후, 30 ng의 genomic DNA를 PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

2) buffy coat 제조

(1) 신선 정맥혈

신선 정맥혈 300 μL에 신속 적혈구용혈제 600 μL를 넣고 실온에서 3분간 방치한 후 간단히 원심한 후 상층액을 제거한다. Phosphate-buffered saline (pH 7.4)를 이용하여 세척하고 원심한 후 상층액을 제거하고 PBS 100 μL로 부유하고 섞어 준 후 Anydirect Lyse III (Bioquest, Seoul, Korea) 100 μL를 넣고 99도에서 5분간 처리하였다.

(2) 냉동된 정맥혈

냉동된 정맥혈을 실온에 15분 방치하여 완전히 녹이고 잘 섞은 후 300

uL를 다른 미세원침관으로 옮겼다. 해동된 정맥혈 300 uL에 신속 적혈구 용혈제 600 uL를 넣고 실온에서 5분 방치한 후 간단히 원심한다. 이 과정을 2번 반복한 후 Phosphate-buffered saline (pH 7.4)를 이용하여 세척하고 원심한 후 상층액을 제거하고 PBS 100 μL로 부유하고 섞어 준 후 Anydirect Lyse III (Bioquest, Seoul, Korea) 100 μL를 넣고 99도에서 5분간 처리하였다.

3. 전통적인 대립유전자특이중합효소연쇄반응법

DNA를 주형으로 이용하는 ASP는 기존 Baxter EJ 등[5]이 제안한 방법을 변형하여 사용하였다. ASP 반응물 조제는 2X EmeraldAmp GT PCR Mastermix (Takara, Otsu, Japan) 10 μL, 시발체 혼합물 2 μL 그리고 DNA 2 μL을 사용하고 최종 반응량이 20 μL가 되도록 물을 첨가하였다. BIO-RAD C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95℃에서 5분 반응시키고 95℃에서 10초, 63℃에서 20초, 72℃에서 20초를 40회 반복한 후 72℃에서 5분간 연장반응을 시켰다. 양성 및 음성대조를 위해 HEL 92.1.7 (TIB-180; American Type Culture Collection, Manassas, VA)와 BsaXI제한효소처리 이중중합효소연쇄반응법 및 염기서열분석으로 확인한 정상인 유전체 DNA를 각각 이용하였다(Fig. 1).

4. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법

JAK2 F617 대립유전자를 검출하기 위해 Baxter EJ 등[5]이 제안한 돌연변이-특이 전향시발체 (5’-AGCATTTGGTTTTAAATTAGGAGTAATA-3’)와 돌연변이-비특이 후향시발체 (5‘-CTGAATAGTCCACAGTGTTTTCAGTTTCA)를 이용하였으며 내부대조를 위해 FLCN 유전자의 CpG island 중 일부를 전향시발체(5’ - CACGGCTTTGTGTTCAGC - 3’)와 후향시발체(5’ - GCCAGGAGTTGATGAGGTAGA - 3’)를 이용하였다. PCR 조성은 10X Anydirect buffer (Bioquest, Seoul, Korea) 2 uL, r-Taq (ElpisBio, Seoul, Korea) 0.1 μL, 20X EvaGreen (Biotium, Hayward, CA) 1 μL, 시발체

혼합물 2 μL 그리고 용해된 buffy coat 2 μL을 사용하고 최종 반응량이 20 μL가 되도록 물을 첨가하였다. BIO-RAD CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95℃에서 5분 반응시키고 95℃에서 10초, 63℃에서 20초, 72℃에서 20초를 40회 반복한 후 72℃에서 5분간 연장반응을 시켰다. *JAK2* F617 돌연변이 특이 증폭산물의 길이와 예상 융해온도는 203 bp와 73℃였으며 내부 대조 증폭산물의 길이와 예상 융해온도는 173 bp와 83℃였다(Fig. 2).

5. 직접 융해곡선분석

상기 6에서 증폭된 산물을 0.5℃씩 증가시켜 60℃부터 90℃까지 가열시켜 융해곡선을 얻었다.

6. BsaXI 제한효소 처리 이중중합효소연쇄반응법 및 염기서열분석법

JAK2 V617F 음성 검체를 확인하기 위해 검출하한치가 0.001%로 알려진 BsaXI 제한효소 처리 이중중합효소연쇄반응법을 실시하였다[6]. 일차 PCR를 위한 조성은 2X EmeraldAmp GT PCR Mastermix (Takara) 10 μL, 전향시발체 (5‘-ATCTATAGTCATGCTGAAAGTAGGAGAAAG-3’) 10 pmol와 후향시발체 (5‘-CTGAATAGTCCACAGTGTTTTCAGTTTCA-3’) 10 pmol 그리고 DNA 2 μL을 사용하고 최종 반응량이 20 μL가 되도록 물을 첨가하였다. BIO-RAD C1000 Thermal Cycler 를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95℃에서 5분 반응시키고 95℃에서 10초, 63℃에서 20초, 72℃에서 20초를 40회 반복한 후 72℃에서 5분간 연장반응을 시켰다. 일차증폭산물은 정제하지 않고 일차증폭산물 10 uL에 BsaXI (New England BioLabs, Newton, MA) 0.5 uL를 넣고 37℃에서 3시간 처리하였다. 이렇게 제한효소처리된 일차증폭산물을 이차 PCR를 위한 주형으로 이용하였다. 이차 PCR를 위한 조성은 2X EmeraldAmp GT PCR Mastermix (Takara) 10 μL, 전향시발체 (5‘-GACAACAGTCAAACAACAATTC-3’) 10 pmol와 후향시발체 (5‘-CTGAGAAAGGCATTAGAAAGC-3’) 10 pmol 그리고 100배 희석된 제한효

소처리된 일차증폭산물 1 μL을 사용하고 최종 반응량이 20 μL가 되도록 물을 첨가하였다. BIO-RAD C1000 Thermal Cycler 를 이용하여 증폭과정을 수행하였으며 95℃에서 5분 반응시키고 95℃에서 10초, 63℃에서 20초, 72℃에서 20초를 40회 반복한 후 72℃에서 5분간 연장반응을 시켰다. 이차증폭산물을 PCR purification kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제한 후 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster, CA) 와 ABI PRISM 3730 DNA analyzer (PE Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석을 하였다 (Fig. 3).

7. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석법의 민감도 분석

HEL 세포와 정상 백혈구를 계수한 후 5 X 10^3개의 세포를 계대 희석한 buffy coat를 준비한다. HEL 세포와 정상 정맥혈에서 추출한 30 ng의 genomic DNA를 계대 희석하여 준비한다. 이를 각각 PCR 주형으로 사용하여 민감도를 분석하였다.

8. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석법의 특이도 분석

정상인 검체 98개를 대상으로 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석법을 실시하여 위양성 유무를 확인하여 특이도를 검증하였다.

III. 결과

1. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 증폭산물의 융해온도

JAK2 V617F 돌연변이 특이 증폭산물의 융해온도는 77.0℃±0.3℃였으며 내부대조 증폭산물의 융해온도는 83.5℃±0.2℃도였다. 비특이적 산물의 융해온도는 70.0℃±0.4℃였다 (Fig. 4)

2. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 및 융해곡선분석법의 민감도

직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 (Fig. 5) 및 융해곡선분석법의 민감도는 약 2% 이하였다(Fig. 6).

3. 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 및 융해곡선분석법의 특이도

정상인 검체 98개를 대상으로 실시한 검사에서 모두 음성 반응을 보여 특이도는 100%였다.

4. 전통적 대립유전자특이중합연쇄반응법과 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법-융해곡선분석법의 비교

전통적 대립유전자특이중합연쇄반응법의 민감도는 1%였으며 이는 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법-융해곡선분석법에 비해 민감하였다. 10개 검체를 위한 검사 시간(total running time)과 처리 시간(handling time)은 전통적 대립유전자특이중합효소연쇄반응법의 경우 2시간 30분 및 75분이었으며 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법-융해곡선분석법의 경우 1시간 35분 및 15분이었다. 50개의 임상검체를 대상으로 분석한 결과 동일한 양성율을 보였다 (60% vs 60%).

IV. 고찰

JAK2 V617F 돌연변이을 검출하기 위해 직접서열분석법(direct sequencing), 중합효소연쇄반응-제한효소길이다양성법(PCR-RFLP), 대립유전자특이중합연쇄반응법(allele-specific PCR, ASP)[5], 증폭내화성돌연변이시스템(amplification-refractory mutation system, ARMS)[14], Taqman PCR법[15, 16], 소식자해리분석법(probe dissociation analysis)[17], Locked nucleic acid-modified nucleotides (LNA) probes법[18], 대립유전자특이경쟁적방해자중합연쇄반응법(allele-specific competitive blocker PCR, ACB)[19] 그리고 MALDI-TOF법[20] 등이 소개되어 활용되고 있다. 이 들 검사법은 중합효소연쇄반응법이 기본적으로 수행되어야 분석 가능한 기법으로서 순수하게 정제된 DNA를 가지고 검사를 진행하는 한계를 가지고 있다. 이에 비해 본 연구에서 평가된 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법-융해곡선분석법은 정제되지 않은 용해물을 직접 PCR 반응에 이용하므로 핵산 추출 및 정제 시간과 노동력 그리고 비용을 줄일 수 있는 장점이 있다.

JAK2 V617F를 민감하게 검출하기 위해서는 높은 민감도를 가지는 검사 기법이 필요하다. 상기 검사법 중 기본적인 PCR 장비만으로 *JAK2* V617F 변이를 검출할 수 있는 검사법은 PCR-RFLP, ASP, ARMS 그리고 ACB 등이 있다. 이 중 ASP와 ACB를 제외한 PCR-RFLP과 ARMS는 반정량적으로 돌연변이 대립유전자의 비율을 측정할 수 있다. 기존 보고에 의하면 직접서열분석법, PCR-RFLP법, ASP법, ARMS 그리고 ACB법의 민감도는 각각 20%[5], 5%[21], 1.5%[5], 1~2%[14] 그리고 1%[19]이다. 본 연구에서 직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응법-융해곡선분석법의 민감도는 2%로 상대적으로 뛰어난 민감도를 보였다.

순수하게 추출된 핵산을 중합효소연쇄반응법에 이용하지 않고 정제 과정을 거치지 않은 세포 자체 또는 용해물을 이용을 가능케 하는 여러 가지 중합효소연쇄반응법들이 개발되고 있다. 예를 들어 전혈을 가열하거나[7] 마이크로웨이브로 처리하거나[8] 포르마마이드로 처리하는[9] 단순한 방법에서부터 중합효소연쇄반응을 위한 버퍼의 pH를 조정하는 방법[10] 그리고 화학적 조성을 변경하는 방법[11] 등이 있다. 본 연구에 이

용된 기법은 중합효소연쇄반응을 위한 버퍼의 화학적 조성을 변경하는 방법이다.

대립유전자특이연쇄반응법은 한 개의 염기 치환을 검출하여 대립유전자 유무를 확인할 수 있는 강력한 기법 중 하나이다. 본 연구에서는 이 기법을 정제되지 않은 용해물을 주형으로 하여 실현하였다. 이와 같은 연구기법은 최근 여러 논문에서 제시되고 있다[12-13]. 하지만 기존 연구는 전통적 중합효소연쇄반응법을 이용한 것으로서 결과를 분석하기 위해서는 전기영동 등의 추가 분석과정이 필요한 단점이 있다. 이에 반해 본 연구는 형광물질을 이용하여 실시간 분석이 가능하여 추가 분석을 위한 실험이 필요하지 않는 장점이 있다. 본 연구에서는 전혈을 이용하지 않고 적혈구를 제거한 buffy coat를 이용하였는데 이는 적혈구 내 혈색소가 강력한 형광신호를 quenching하기 때문이다.

직접 대립유전자특이중합효소연쇄반응 및 융해곡선분석법의 비교 대상 기법으로 이용한 전통적 대립유전자특이중합연쇄반응법은 기존 보고와 유사한 민감도를 보였으며 본 연구에 이용한 기법은 약간 낮은 2% 정도의 민감도를 보였으나 전체 검사 시간과 처리시간이 더 짧고 단순하고 임상 검사로 이용하는데 도움이 될 것으로 사료되었다.

결론적으로, 직접 실시간 대립유전자중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석법은 *JAK2* V617F를 검출하는 신속하고 신뢰할 만하며 경제적인 기법으로 사료되었다.

V. 참고문헌

1. Tefferi A and Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia 2008;22:14-22.

2. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. Ann Intern Med 2003;138:819-30.

3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 2005;352:1779-90.

4. Tefferi A and Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. Cell Cycle 2007;6:550-66.

5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005;365:1054-61.

6. Zhao AH, Gao R, Zhao ZJ. Development of a highly sensitive method for detection of JAK2 V617F. J Hematol Oncol 2011;10:40.

7. Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. Nucleic Acids Res 1990;18:5908.

8. Ohhara M, Kurosu Y, Esumi M. Direct PCR of whole blood and hair shafts by microwave treatment. Biotechniques 1994;17:726-8.

9. Panaccio M, Georgesz M, Lew AM. FoLT PCR: a simple PCR protocol for amplifying DNA directly from whole blood. Biotechniques 1993;14:238-43.

10. Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Kato S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation.

Ann Clin Biochem 2000;37:674-80.
11. Yang YG, Kim JY, Song YH, Kim DS. A novel buffer system, Any-Direct, can improve polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. Clin Chim Acta 2007;380:112-7.
12. Lee SH, Park G, Yang YG, Lee SG, Kim SW. Rapid ABO genotyping using whole blood without DNA purification. Korean J Lab Med 2009;29:231-7.
13. Lee HY, Park MJ, Kim NY, Yang WI, Shin KJ. Rapid direct PCR for ABO blood typing. J Forensic Sci 2011;56:S179-82.
14. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et at. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood 2005;106:2162-8.
15. Bousquet M, Le Guellec S, Quelen C, Rigal-Huguet F, Delsol G, Brousset P. Frequent detection of the JAK2 V617F mutation in bone marrow core biopsy specimens from chronic myeloproliferative disorders using the TaqMan polymerase chain reaction single nucleotide polymorphism genotyping assay: a retrospective study with pathologic correlations. Hum Pathol 2006;37:1458-64.
16. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et at. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 2005;7:387-97.
17. Lay M, Mariappan R, Gotlib J, Dietz L, Sebastian S, Schrijver I, et at. Detection of the JAK2 V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. J Mol Diagn 2006;8:330-4.
18. Markova J, Prukova D, Volkova Z, Schwarz J. A new allelic discrimination assay using locked nucleic acid-modified nucleotides (LNA) probes for detection of JAK2 V617F mutation. Leuk Lymphoma 2007;48:636-9.
19. Tan AY, Westerman DA, Dobrovic A. A simple, rapid, and sensitive

method for the detection of the JAK2 V617F mutation. Am J Clin Pathol 2007;127:977-81.
20. Koren-Michowitz M, Shimoni A, Vivante A, Trakhtenbrot L, Rechavi G, Amariglio N, et at. A new MALDI-TOF-based assay for monitoring JAK2 V617F mutation level in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation (allo SCT) for classic myeloproliferative disorders (MPD). Leuk Res 2007.
21. Frantz C, Sekora DM, Henley DC, Huang CK, Pan Q, Quigley NB, et at. Comparative evaluation of three JAK2V617F mutation detection methods. Am J Clin Pathol 2007;128:865-74.

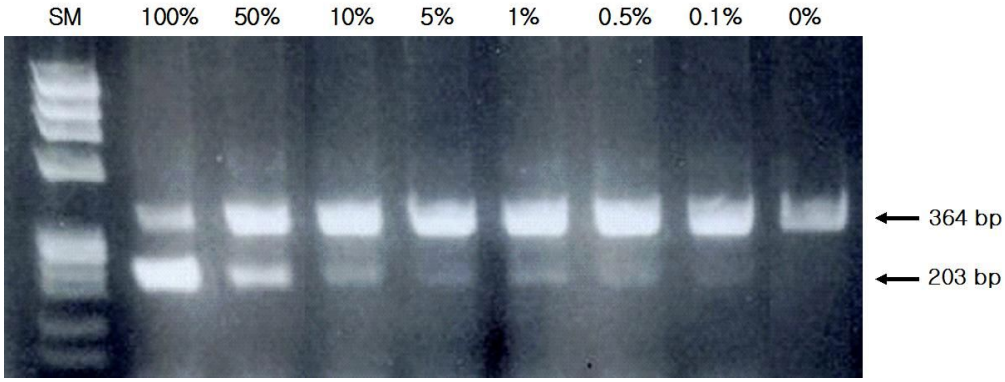


Fig. 1. Detection limit of the conventional allele-specific PCR assay (ASP). DNA from the HEL cell line (homozygous for the V617F mutation) was serially diluted with DNA from a *JAK2* V617F-negative sample confirmed by BsaXI-treated nested PCR and amplified in the ASP. The 364 bp of PCR product is an internal control and 203 bp is an mutant specific product. Percentage above each lane indicate percentage of DNA of HEL cell line. Detection lower limit of conventional ASP was 1%. The marker (SM) is ϕ X174/HindIII DNA size marker (TaKaRa, Otsu, Japan).

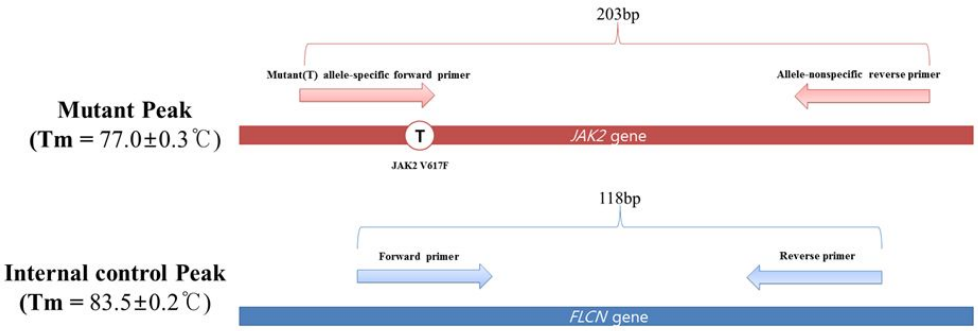
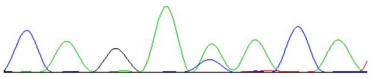


Fig. 2. Primers design for direct *JAK2* V617F allele-specific PCR-Melting curve analysis

(A) 0.1% V617F-positive sample



(B) V617F-negative sample

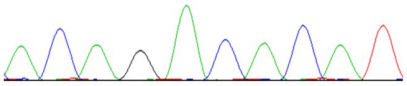


Fig. 3. Result of BsaXI-treated nested PCR and direct sequencing

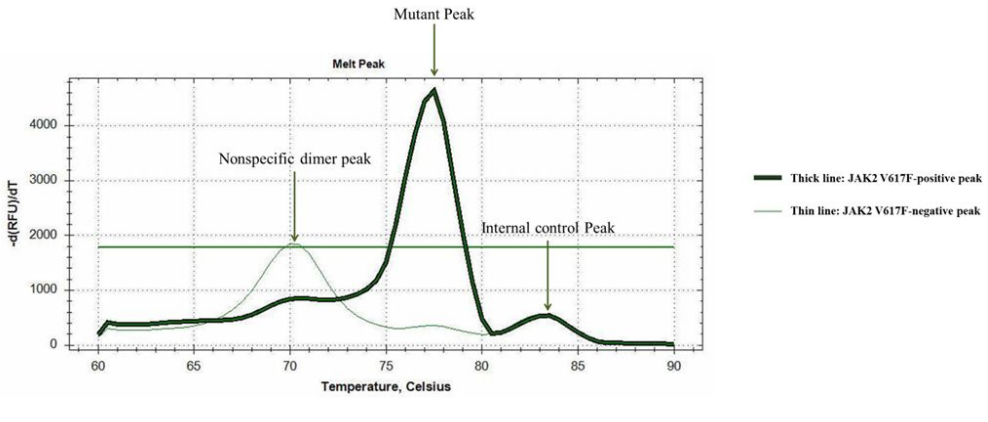


Fig. 4. Melting curves of direct allele-specific PCR

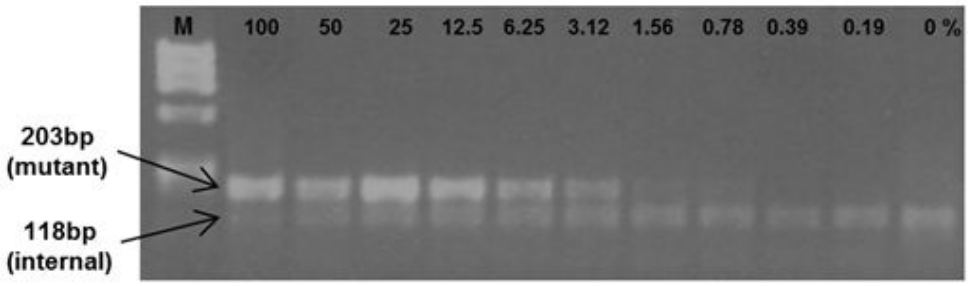


Fig. 5. Detection limit of the direct allele-specific PCR assay (ASP). Buffy coat lysate from the HEL cell line (homozygous for the V617F mutation) was serially diluted with buffy coat lysate from a *JAK2* V617F-negative sample confirmed by BsaXI-treated nested PCR and amplified in the ASP. The 118 bp of PCR product is an internal control and 203 bp is an mutant specific product. Percentage above each lane indicate percentage of DNA of HEL cell line. Detectin lower limit of direct ASP was about 2%. The marker (SM) is ϕX174/HindIII DNA size marker (TaKaRa, Siga, Japan).

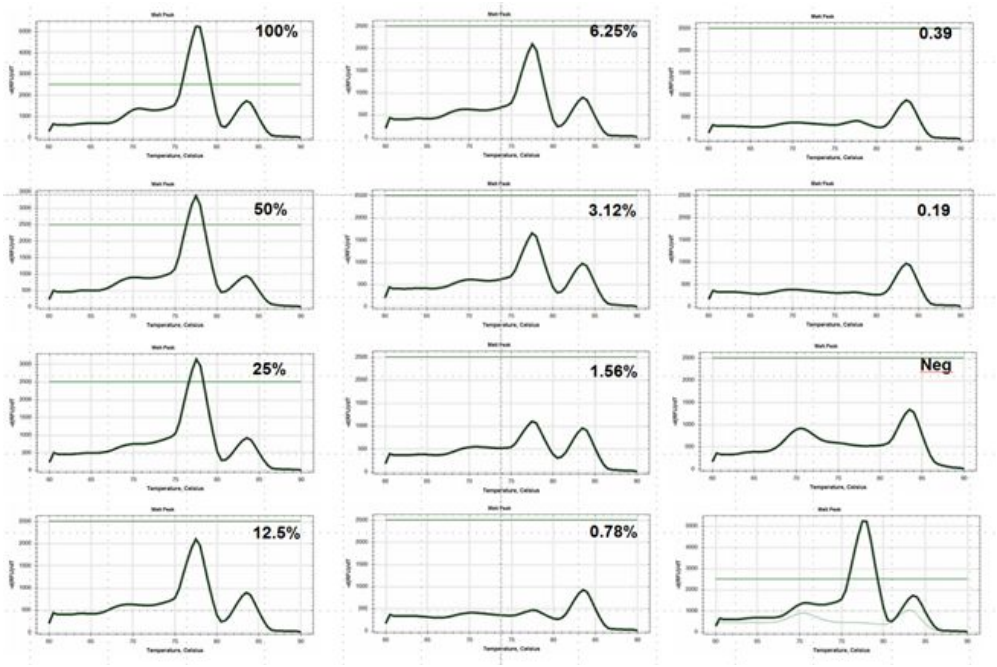


Fig. 6. Detection limit of the direct allele-specific PCR assay (ASP) and melting curve analysis.

Ⅵ. 감사의 말씀

석사 입학했을 때가 엊그제 같은데 벌써 2년이란 시간이 지나 학위 논문을 내니 감회가 남다릅니다. 처음 사회에 발을 내딛고 느꼈던 어려움과 고민들을 정리하고자 모든 것을 내려두고 대학원을 선택하였을 때, 그때의 두근거림과 미래에 대한 고민에 많이 힘들었습니다. 항상 표현에 서툴렀지만 언제나 묵묵히 저를 지켜봐주시고 제 선택에 힘을 싣어 주신 부모님께 큰 감사를 드립니다. 처음 이곳에 왔을 때부터 지금까지 한결같은 선한 눈빛과 밝은 얼굴을 지니신 우리 박건 교수님께 무한한 감사를 드립니다. 그렇기에 박건교수님의 지도아래 배우고, 생활하면서 실험실로 향하는 발걸음이 무거웠던 적이 없습니다. 부족한 저를 향한 굳은 신뢰와 배려에 보답하지 못한 것 같아 항상 죄송하고 감사합니다. 냉철한 지적속에 카리스마와 유머를 겸비하신 문대수 교수님, 항상 밝은 미소로 인사하시는 매사에 차분한 모습을 배우고 싶게 만드는 장숙진 교수님 감사합니다. 2년동안 가족보다 더 많은 시간을 함께 나눈 가슴이 따뜻한 남자, 아빠의 마음 이병설 선생님. 항상 정신적 지주이자 매사에 용기를 북돋아 주시는 선생님께 감사드립니다. 나의 엔돌핀이자 너무도 닮은게 많은 재광이형. 대학원 생활 함께 하면서 형한테 배우고 얻어간게 너무도 많아서 그 고마움은 끝이 없습니다. 형이 있어서 너무나 행복했습니다. 우리가 함께 나눈 시간은 이제 추억이 되었지만 앞으로 함께 나눌 수 있는 시간이 더욱 많기에 아쉬움은 뒤로 하겠습니다. 우리와 함께 고생한 지애, 많이 챙겨주진 못했지만 매사에 묵묵히 최선을 다하는 모습이 너무 좋아. 무엇을 선택하던 잘 될거라는 긍정적 생각만 가지고 지금처럼 달려가길 바란다. 정말 중요한 사람.. 대학원 선택에 있어 가장 큰 용기와 힘을 준 이초록. 우리가 함께한 이 선택이 이렇게 결실을 맺고 앞으로 인생에 더 큰 밑거름이 될수 있을거야. 지금까지 믿고 함께해줘서 고맙고, 사랑한다.

이제 작지만 큰 한걸음을 떼었습니다. 이 작은 책자에 수많은 추억과 노력이 담겨있고, 이게 앞으로 제 인생에 첫 출발점입니다. 매사에 긍정적이고 밝은 모습을 잃지 않고 살아가는 사람이 되겠습니다. 마지막으로 박우관 수고했다!!
감사합니다.

저작물 이용 허락서

학 과	바이오 신약 개발학과	학 번	20107508	과 정	석사
성 명	한글: 박 우 관 한문: 朴 佑 官 영문: Woo-Kwan Park				
주 소	광주광역시 북구 양산동 호반리젠시빌 202동 1008호				
연락처	E-MAIL : fixious@naver.com				
논문 제목	한글: *JAK2* V617F 신속 검출을 위한 대립유전자중합효소연쇄반응법 및 융합곡선분석법의 유용성 영어: Rapid allele-specific PCR and melting curve analysis for detection of *JAK2* V617F				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집・형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(o) 반대( )

2012년 8월 10 일

저작자: 박 우 관 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하