

PNA-mediated Real-time PCR을 이용한 BRAF V600E 변이 검출에 관한 연구

대전보건대학교 임상병리학과 DNA 동아리 지도교수 : 윤경아 교수님
회장 : 강수현 부회장 : 김서연

기술석사과정: 김지영, 방경남
4학년: 권순형

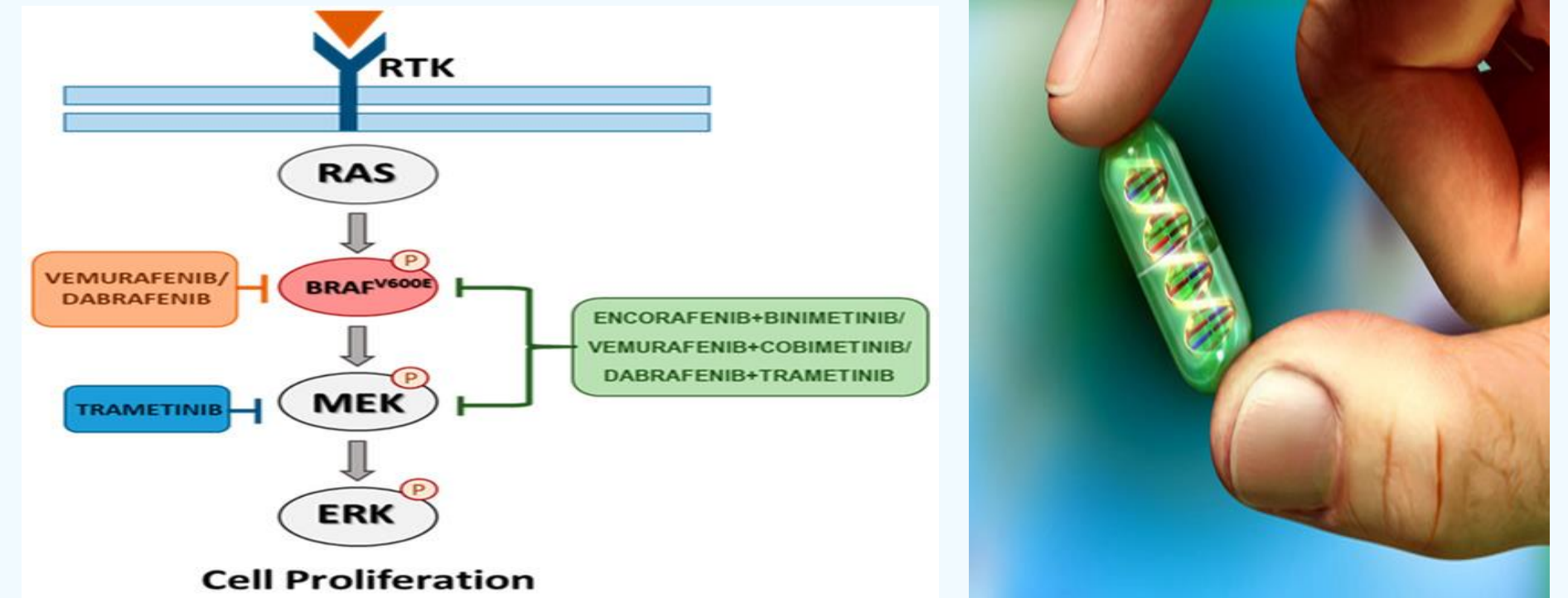
3학년: 김유림 김영록 김민서 박예림 유혜원 정선영 정유진 한승서 한진솔
2학년: 서윤주 강다운 김민서 박해열 박태영 조수빈
1학년: 김해은 김호영 권상빈 백송이 선혜빈 이수현 이다혜 유은서

INTRODUCTION

BRAF V600E 변이는 600번째 아미노산에서 발린(valine)이 글루탐산(glutamic acid)으로 치환되는 점돌연변이로, BRAF 단백질을 지속적으로 활성화하여 암세포의 무제한 증식을 가능하게 한다.

최근에는 BRAF 억제제(vemurafenib, dabrafenib)와 MEK 억제제(trametinib) 등의 표적치료제가 개발되어, BRAF V600E 변이 환자에서 임상적 유의성을 입증하고 생존율 향상에도 기여하였다. 임상적으로 BRAF V600E 변이는 흑색종 환자의 약 40 - 50%, 갑상선 유두암의 약 45%, 대장암의 약 8 - 10%에서 발견된다. 변이 보유 환자는 종양의 공격적 특성과 불량한 예후를 나타내며, 기존 항암화학요법이나 방사선치료에 대한 반응이 제한적이다. 따라서 BRAF V600E 변이 검출은 단순한 진단을 넘어, 환자의 맞춤형 치료 전략을 결정하는 핵심 예측적 바이오 마커로 활용된다. 이러한 치료제의 적용은 동반진단(companion diagnostics)의 필요성을 강조하며, 임상 현장에서 신속하고 정확한 변이 검출법이 요구된다.

본 연구에서는 PNAclamp™ BRAF Mutation Detection Kit를 이용하여 BRAF V600E 변이 검출의 가능성과 임상 적용성을 평가하고자 하였다.



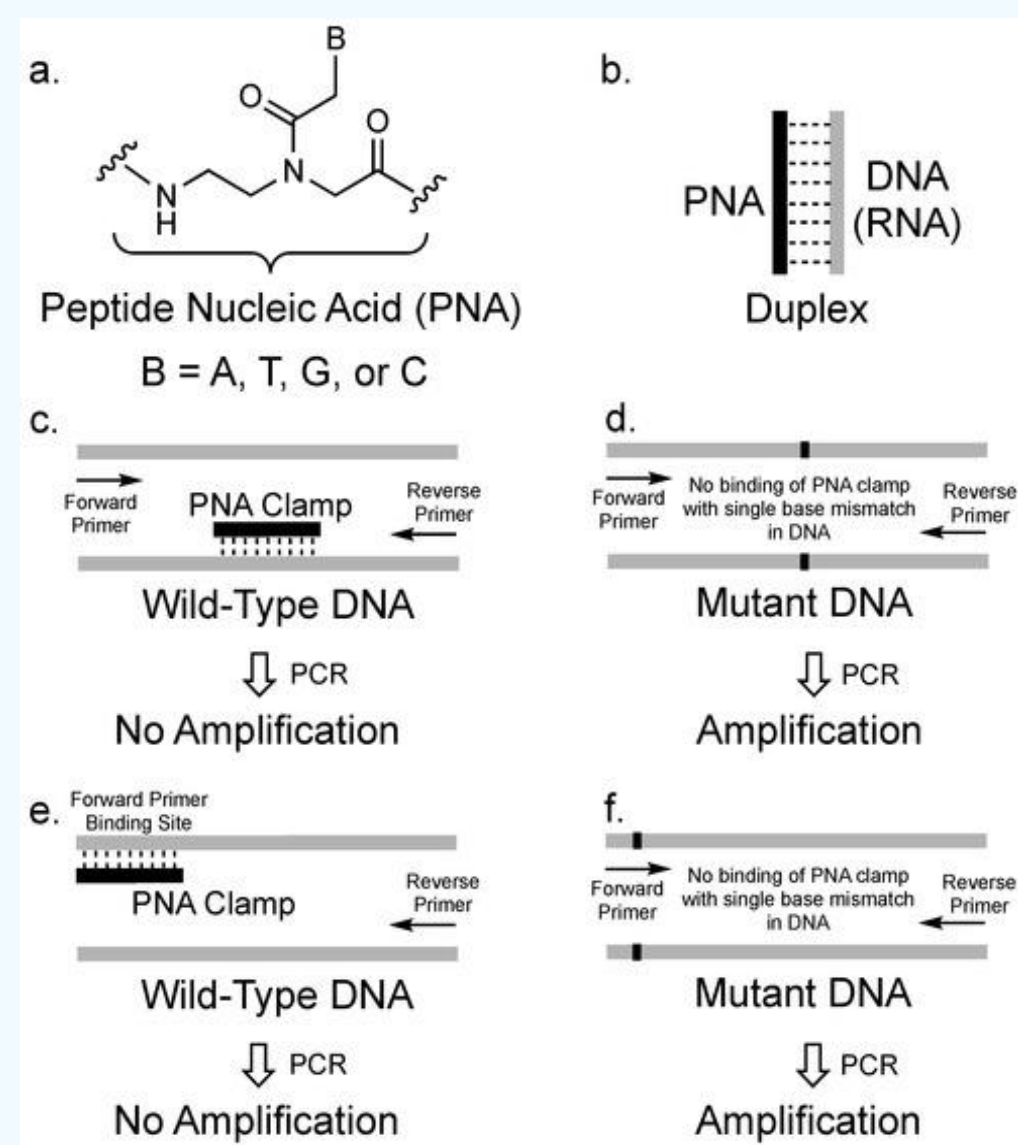
KEYWORD

PNA(probe-based clamping) 기술은 BRAF V600E를 포함한 주요 암 관련 변이(EGFR, KRAS등)를 민감하고 특이적으로 검출할 수 있는 방법으로 주목 받고 있다.

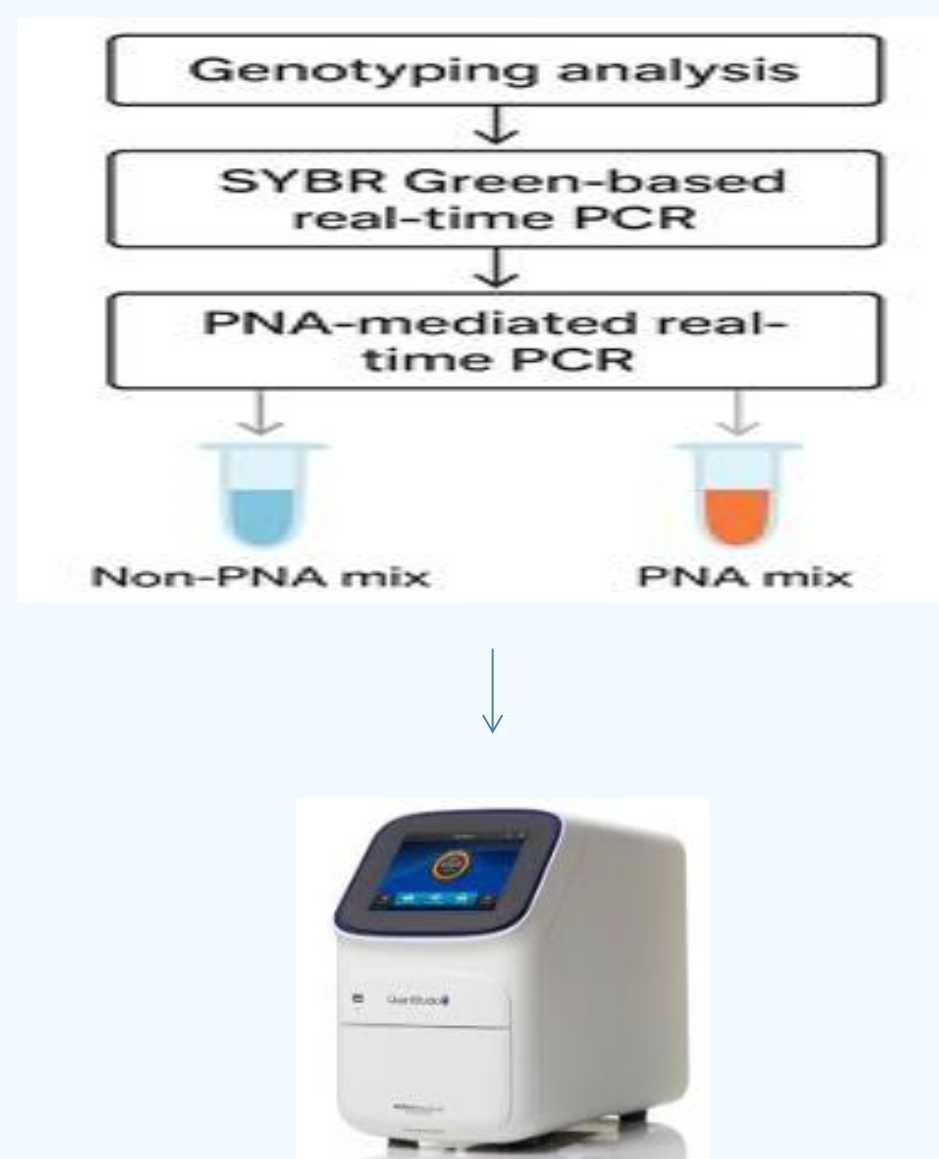
특히 PNAclamp™ 기술은 실시간 PCR 기반으로 표준화된 절차를 갖추고 있어, 임상검사실에서 변이 검출 및 맞춤진단 도구로 활용될 수 있다.

METHODOLOGY

CONCEPTS

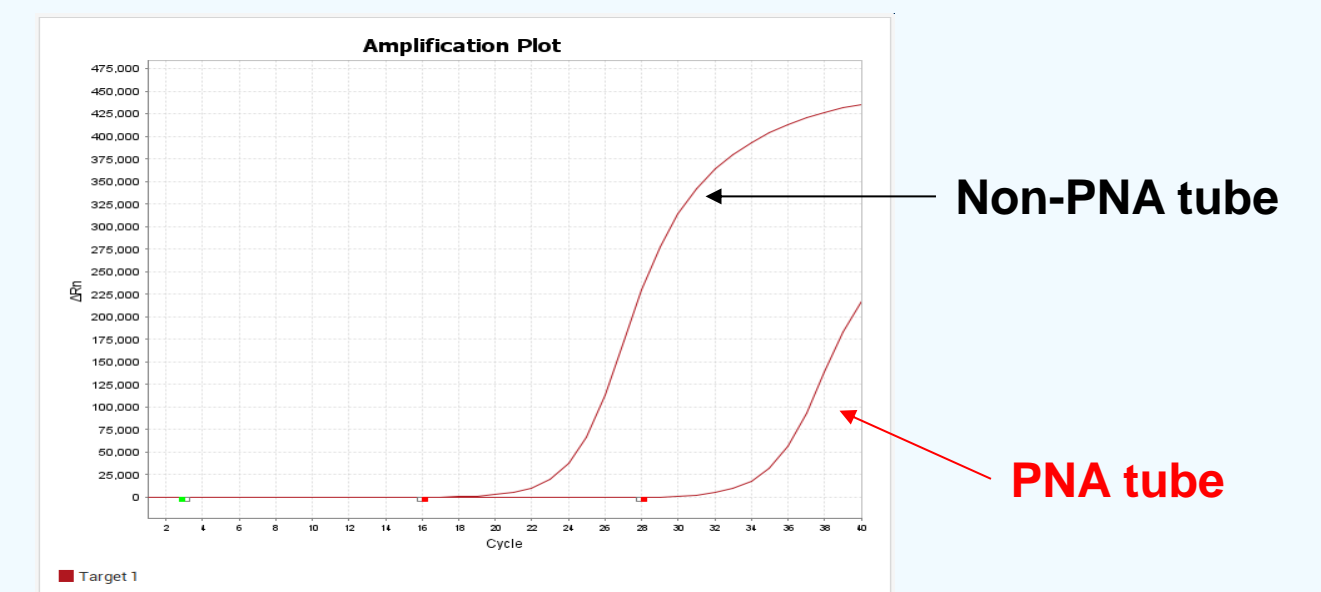


BRAF V600E GENOTYPING

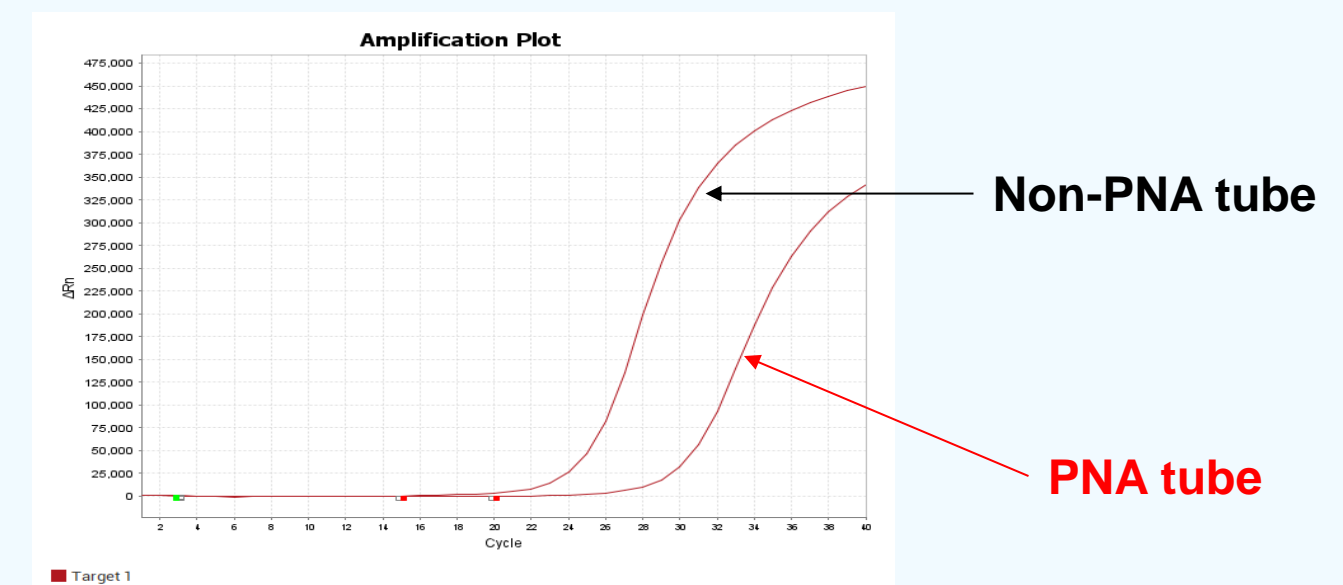


Detection of BRAF V600E Mutation

1. Wild type(Negative)



2. Mutant type(Positive)



〈판정기준〉

구분	ΔCt-1 (Standard Ct - Sample Ct)	ΔCt-2 (Clamping Control Ct - Sample Ct)	판정
양성 (Positive)	≥ 2.0	ΔCt-2가 정상 범위*	BRAF V600E 변이 있음
양성 (Negative)	< 2.0	ΔCt-2가 정상 범위*	BRAF V600E 변이 없음 (Wild type)
무효 (Invalid)	어떤 값이든	ΔCt-2 비정상 (클램핑 통제를 위한 Control 중 하나)	재검 필요

* ΔCt-1: 변이 표준 DNA(Standard)와 샘플 비교 → 실제 변이 존재 여부를 판정하는 핵심 지표
* ΔCt-2: 야생형 대조(Clamping control)와 샘플 비교 → 클램핑 정상 여부 확인용 보조 지표
* Cut-off 값: ΔCt-1 ≥ 2.0 → 변이 양성

돌연변이 검출에는 PNAclamp™ BRAF Mutation Detection Kit (Panagene Co., Korea) 를 사용하였으며, 본 키트는 야생형(wild-type) 서열에 특이적으로 결합하는 PNA probe를 통해 wild-type 증폭을 억제하고 mutant allele을 선택적으로 증폭하도록 설계되었다.

각 시료에서 추출한 DNA를 동일한 양으로 pre-mix와 혼합한 후, 두 개의 반응 튜브에 분주하였다.

1번 튜브에는 Non-PNA mix, 2번 튜브에는 PNA mix를 첨가하여 초기 변성 94 °C 5분, 변성 94 °C 30초, 결합 70 °C 20초, 신장 63 °C 30초를 1사이클로 하여 총 40 사이클 동안 Real-time PCR을 수행하였다 (QuantStudio™ 5).

RESULTS & DISCUSSION

- ✓ 본 연구에서는 PNAclamp™ BRAF Mutation Detection Kit를 이용하여 임상병리학과 재학생 검체에서 BRAF V600E 변이를 검출하고, 그 임상적 활용 가능성을 평가하였다.
- ✓ 실험 결과, 모든 검체에서 BRAF V600E 변이가 검출되지 않았으며, 이는 연구 대상이 일반인 집단이었기 때문으로 해석된다.
- ✓ BRAF V600E 변이는 흑색종, 갑상선 유두암, 대장암 등에서 높은 빈도로 관찰되는 중요한 분자적 바이오 마커이다. 변이 보유 환자는 종양의 공격적 특성과 불량한 예후를 보이며, 맞춤형 치료 전략 수립에 핵심적이다.
- ✓ 본 연구는 제한된 대상군에도 불구하고 PNA 기반 검출법이 임상적 진단에 적용 가능함을 확인한 점에서 의의가 있다.