

감별 증합효소 연쇄 반응에 의한 난소암종의 *c-myc* 유전자 증폭에 관한 연구

한양대학교 의과대학 병리학교실, 유전학교실* 및 산부인과학교실**

류근신·박찬금·이춘근*
조울희*·황윤영**·이종달

Detection of the *c-myc* Oncogene Amplification in Ovarian Carcinomas by Differential Polymerase Chain Reaction

Geun Shin Lyu, M.D., Chan Kum Park, M.D., Chun Geun Lee, M.D.*
Youl Hee Cho, M.D.*, Youn Yeoung Hwang, M.D.**
and Jung Dal Lee, M.D.

Departments of Pathology, Genetics*, and Obstetrics**
College of Medicine, Hanyang University

The amplification of *c-myc* oncogene was evaluated in 42 cases of ovarian carcinomas to correlate with clinical parameters. Using oligonucleotide primers, sequences from the *c-myc* exon-3 gene and from a control gene, tissue plasminogen activator (tPA), were amplified simultaneously by polymerase chain reaction (PCR). After the products of differential PCR (d-PCR) were electrophoresed, slot blot hybridization was performed, and hybridized with γ P³²dATP-labeled *myc* and tPA oligonucleotide probes and then autoradiographed. The signal intensities of the two products were quantitated by densitometry and the ratios of two products (*c-myc*/tPA) were measured. The ovarian carcinomas showed significantly increased amplification of *c-myc* oncogene compared to normal control group ($p < 0.05$). 15 of 42 cases (35.7%) showed various degrees of the MYC gene amplification up to 27 folds in various histologic types of ovarian carcinomas. No significant differences of the MYC gene amplification according to histologic subtypes, tumor grades and clinical stages of ovarian carcinomas were present ($p > 0.05$). (**Korean J Pathol 1997; 31: 644 ~ 654**)

Key Words: *c-myc* amplification, Differential polymerase chain reaction, Ovarian carcinoma

서 론

세포성 암유전자가 종양성 암유전자로 활성화되는 기전에는 점돌연변이(point mutation)에 의해 기능적으로 변화된 단백질을 생성하거나, 암유전자의 과다 발현(overexpression) 등 두 가지로 설명되고, 후자는 염색체 전위(chromosomal translocation), 촉진자 삽입(promotor insertion), 유전자증폭(gene amplification)에 의하는 것으로 알려져 있다¹⁻⁵.

세포성 암유전자의 증폭은 여러 종류의 암종에서 보고되고 있으며, 특히 조직학적으로 악성도가 높거나 임상적 병기가 높은 종양에서 흔히 관찰되며, 나쁜 예후를 나타낸다고 알려져 있다. 그러므로 종양 세포와 연관된 여러 유전적 결함 중에서 특히 유전자 증폭을 발견하는 것은 악성종양 환자의 치료 및 예후 판정에 좋은 지표로 사용될 수 있다⁶⁻⁹.

세포성 암유전자의 하나인 c-myc은 avian myeloblastosis virus 에서 처음 검출되었고, 유방암, 자궁경부암 및 대장암 등에서 과발현 또는 증폭이 보고되었으며¹⁰⁻¹², 이 유전자의 증폭이 환자의 예후 및 병기와 밀접한 관계가 있다는 것은 신경모세포종과 폐장의 소세포 암종 에서 이미 연구된 바 있고, 실제로 치료 효과나 예후 판정에 적용되고 있다^{9,13-16}.

그러나 난소암종에 있어서의 myc 유전자의 증폭과, 조직학적으로 서로 다른 유형의 난소 암종간의 연관성 및 환자의 병기와 예후에 관한 상관 관계에 대한 연구는 많지 않다.

Oligonucleotide 탐식자를 이용한 보합결합(hybridization)의 개발과 함께¹⁷, 1985년 Saiki등¹⁸에 의해 처음 소개된 중합효소 연쇄반응법(polymerase chain reaction)은 악성 종양에 있어서 이런 분자 유전학적인 연구를 매우 빠른 속도로 가능케 하는 혁신적인 방법인데, 종래의 유전자 증폭을 입증하기 위하여 이용되었던 Southern blot 방법과는 달리 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매된 조직을 이용할 수 있기 때문에 후향성 연구가 가능할 뿐만 아니라, 매우 소량의 DNA 만으로도 유전자 증폭의 입증이 가능하다는 장점이 있다^{19,20}. 그러나 여기에도 유전자 증폭을 입증하기에는 여러가지 문제점이 있는데, 그 이유는 중합효소연쇄반응 산물의 양이 온도나 사용된 시약의 농도 및 시행된 주기(cycle)에 따라서 현저하게 변화를 나타낼 수 있기 때문이다.

저자들은 이러한 문제점들을 배제하기 위해서 c-myc 유전자와 동일한 염색체에 있는 증폭이 되지 않은

대조 유전자를 동시에 사용하는 감별 중합효소 연쇄반응법을 이용하여, 포르말린에 고정되고, 파라핀에 포매된 42예의 난소암종 조직에서 그 조직학적 유형에 따른 c-myc 유전자의 증폭된 빈도 및 정도와 난소암종의 조직학적 등급, 임상 병기 및 그 예후와의 상관성을 관찰하고자 본 연구를 시행하였다.

실험 재료 및 방법

1. 재 료

중합효소 연쇄반응을 시행하기 위하여 1985년 9월 1일 부터 1992년 8월 31일까지 한양대학병원 조직병리과에 접수된, 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직중 난소암종으로 진단되었던 42예를 본 연구의 재료로 사용하였다. 개개의 종양을 조직학적으로 재검토하여 분류하고 International Federation of Gynecology and Obstetrics(FIGO)의 분류 기준에 따라 조직학적 등급을 정하였다. 조직학적 등급은 종양의 고형성 부위가 10% 미만일 경우 등급 I, 고형성 부위가 종양 전체의 약 10~50%를 차지하면 등급 II, 그리고 50% 이상일 경우 등급 III으로 정하였다. 임상적 병기는 환자의 의무기록지 및 추적 조사등의 임상적 정보와 수술 당시의 조직검사 결과지 등을 참고로 하여 FIGO 병기 구분 기준에 의해 정하였다. 난소암종 42예의 조직학적 유형은 Table 1에 제시하였다. 음성 대조군으로는 정상 성인의 혈액에서 추출한 DNA를 사용하였으며 양성 대조군으로는 myc 유전자가 iPA 유전자에 비해 2배 증폭된 것으로 알려진 SK-OV-3 세포주를 사용하였다.

2. 방 법

1) 종양 조직에서 중합효소 연쇄반응의 준비: 중

Table 1. Histologic types of formalin-fixed, paraffin-embedded ovarian carcinomas

Histologic types	No. of cases(%)
Papillary serous cystadenocarcinoma	17(40.5)
Mucinous cystadenocarcinoma	14(33.3)
Endometrioid carcinoma	8(19.0)
Adenocarcinoma, metastatic	2(4.8)
Unclassified	1(2.4)
Total	42(100)

합효소 연쇄반응을 시행하기 전에 종양에서 얻은 H&E 조직을 먼저 조직학적으로 재검토하여, 비종양성 기질을 포함하는 부위는 칼날로 제거한 후, 박절기를 이용하여 5 μ 두께로 10개의 조직 절편을 만들어서, xylene으로 파라핀을 제거시켰다. DNA 추출은 Jackson 등(1991)의 방법을 변형하여 사용하였다²¹. 파라핀이 제거된 조직 절편에 5 ml의 추출완충액(100 mM NaCl, 10 mM Tris, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0, 0.1 mg/ml proteinase K)을 넣고 실온에서 4~5일간 처리한 후 동량의 chloroform 용액(phenol : chloroform = 4:5)을 넣어 천천히 잘 섞어서 3500 rpm에서 20분간 2번 원심 분리하여 상층액만을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 다음 단계의 중합효소 연쇄반응을 효율적으로 수행할 수 있도록 GeneClean II kit(Bio 101, USA)를 이용하여 정제하였으며, 이 과정을 통하여 DNA양을 50 ng/ μ l로 일정하게 조절할 수 있었다.

2) 중합효소 연쇄 반응을 위한 oligonucleotide 시발체 준비: *c-myc* 유전자의 염기 배열을 증폭시키기 위하여 5'-CTCGGAAGG ACTATCCTGCTGCCAA-3'와 5'-GGCGCTCCAAGACGTTGTGTGTTTCG-3'의 시발체를 사용하였다. 전자는 *c-myc* 염기 서열의 nucleotides 6840에서 6865에 해당하는 것이다. 후자는 동일한 염기 서열의 nucleotides 6990에서 6965에 해당하는 상보성 염기이다. 효소적 증폭을 위한 대조 유전자로써 본 실험에 사용한 tissue plasminogen activator (tPA)의 염기 서열은 5'-TCAAAGGAGGGCTGTTCGCCGACAT-3'와 5'-TCCT GGAAGCAGTGGGCGGCAGAGA-3'이다. 첫 번째 것은 tPA 염기 서열의 1017에서 1042에 해당하는 것이고 두 번째 것은 1167에서 1142에 해당하는 상보성 염기이다. 위에 사용한 시발체들은 147 base 길이의 sequence를 증폭시킬 수 있다.

Oligonucleotide 탐식자로는 *c-myc*의 염기서열 6891에서 6910에 해당하는 5'-TCCTGAGACAGATCAGCAAC-3'과 tPA의 염기서열 1068에서 1087에 해당하는 5'-ATCTTTGCCAAGCACAGGAG-3'을 합성하였다. 모든 oligonucleotide는 *c-myc*의 염기서열은 Gazin 등²²을, tPA의 염기서열은 Ny 등²³의 보고를 인용하여 한국생공(주)에 주문 합성하였다.

3) 감별 중합효소 연쇄반응의 조건 설정: 중합효소 연쇄반응은 Schreiber와 Dubeau²⁴가 시행한 바와 같이 *c-myc*의 증폭을 위한 primer set와 tPA의 증폭을 위한 primer set를 같은 시험관 내에서 동시에 반응시켰다. 0.5 ml tube에 증류수 38.5 μ l, 10X 완충액

(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0 at 25°C, 0.1% gelatin and 1% TritonX 100) 5 μ l, primer mix (25 pmol/ μ l each) 1 μ l, dNTPs(25 mM each) 0.5 μ l, DNA 5 μ l, Taq polymerase(Promega, 5U/ μ l) 0.25 μ l 등을 순서대로 넣고 30 μ l의 광물성 기름을 가한 후 Thermal Cycler(Hybaid, UK)를 이용하여 수행하였다.

중합효소 연쇄반응의 온도 및 시간 설정은 자동 온도 변환 장치를 이용하여 초기 DNA 변성 반응을 위해 98°C에서 10분간으로 조정하였고, 처음 2주기는 추가적인 DNA 변성 반응을 위해 95°C에서 2분, 시발체 결합 반응을 위해 55°C에서 1분 그리고 사슬 연장 반응을 위해 74°C에서 3분간으로 조정하였으며, 나머지 38주기에서는 95°C에서 1분 30초, 55°C에서 1분 30초, 그리고 74°C에서 2분간으로 조정하였으며 최종적인 사슬 연장 반응을 위해 74°C에서 10분간 더 반응시켰다.

4) 전기영동, Slot blot교잡(hybridization) 및 자가방사기록법(Autoradiography): Chloroform을 이용하여 중합효소 연쇄반응 산물에서 광물성 기름을 제거한 후, 2% agarose gel에 PCR 반응액 10 μ l를 loading dye와 섞어서 loading하여 100 Volt에서 40분간 전기 영동시킨후, ethidium bromide(0.5 μ g/ml, Boehringer Mannheim, FRG) 용액으로 염색하여, 자외선 투조기로 147bp 위치의 DNA띠를 관찰함으로써, 중합효소 연쇄반응의 결과를 확인하였다. 나머지 40 μ l에 증류수 148 μ l, 10N NaOH 8 μ l, 0.5M EDTA 4 μ l를 첨가하여 10분간 끓인 후 200 μ l의 차가운 2M ammonium acetate (PH 7.0)을 넣은 후 점상 블롯 장치인 Bio-Dot SF (Bio-rad, USA)를 사용하여, nylon membrane(Hybond N+, Amersham, USA)에 전이시켰다. 한 검체당 2장의 흡착지에 blotting 시켰으며, 각 blotting 흡착지마다 음성 대조군으로써 *c-myc* 유전자의 증폭이 없는 정상 백혈구에서 추출한 DNA의 중합효소 연쇄반응 산물을 각각 blotting시켰다. 같은 배열을 갖는 2장의 흡착지를 5x SSPE(20x SSPE: 3.6M NaCl, 0.2M sodium phosphate, 0.02M EDTA pH 7.7), 5x Denhardt's solution(100x Denhardt's solution: 2% bovine serum albumin, 2% Ficoll, 2% poly-vinylpyrrolidone), 0.5% SDS 및 1 μ l/ml의 변성된 salmon sperm DNA를 포함하는 용액으로 65°C에서 1시간 동안 전보합결합(pre-hybridization)시키고, γ P³²로 표지된 *c-myc*과 tPA 탐식자를 각각 넣어 45°C에서 하룻밤 동안 보합결합시켰다. 이후 6x SSPE/0.1% SDS 용액으로 실온에서 30분간 세척하고, 2x SSPE/0.1% SDS 용액으로 58°C에서 15분간 2번 세척한 후 1x SSPE/0.1% SDS 용액

으로 58°C에서 10분간 세척하여 X-ray 카세트에 X-ray film과 함께 넣고 -70°C에서 3일간 노출시킨 후 현상하여 판독하였다.

5) 농도계측 및 유전자 증폭의 정량분석: 자가 방사 기록된 필름을 레이저 농도계측기(CS-9000, Shimadzu, Japan)를 이용하여, 교잡 신호 강도를 측정하였다. 각 검체의 음성 대조군에 대한 교잡 신호 강도의 비율을 구하였고, 최종적으로 *c-myc*/tPA의 비율을 구하여 *c-myc* 유전자 증폭의 정도를 관찰하였다.

6) 통계학적 방법: 계측된 모든 자료들은 t-test, paired t-test 그리고 analysis of value 방법을 이용하여 p-value를 구하였고 신뢰구간은 95%에서 판정하였다.

결 과

1. 종양의 등급, 병기, 추적기간

본 연구에 사용된 42예의 난소암종은 조직학적 유형별로 유두상 장액성 낭선암종 17예, 점액성 낭선암종 14예, 그리고 자궁내막양 암종이 8예였으며, 2예는 원발성 위 선암종이 난소에 전이된 것이었고, 나머지 1예는 그 조직학적 유형을 정할 수 없었던 예였다. 그리고 유두상 장액성 낭선암종 17예 중에는 경계성 종양 1예가 포함되어 있었다.

종양의 조직학적 등급으로는 12예, 16예, 및 14예가 각각 등급 I, 등급 II, 그리고 등급 III이었다. 등급 I 종양 12예 중 5예는 유두상 장액성 낭선암종이었고 나머지 7예는 점액성 낭선암종이었다. 등급 II 종양은 유두상 장액성 낭선암종 9예, 점액성 낭선암종 4예, 그리고 자궁내막양 암종이 3예였다. 등급 III 종양은 유두상 장액성 낭선암종과 점액성 낭선암종이 각각 3예였고, 자궁내막양 암종은 5예였으며, 2예는 전이성 암종이고, 나머지 1예는 그 유형을 결정할 수 없었던 예였다.

임상적 병기로는 병기 I과 III이 각각 18예씩이었고, 병기 II와 IV는 각각 2예였다. 조직학적 유형별로 볼때 점액성 낭선암종 14예중 13예가 병기 I 이었고, 유두상 장액성 낭선암종 17예중 12예가 병기 III이었다. 병기 II 종양은 점액성 낭선암종과 자궁내막양 암종이 각각 1예씩이었고, 병기 IV 종양은 장액성 낭선암종과 자궁내막양 암종이 각각 1예씩이었다.

추적 조사는 27예에서 가능하였고, 최저 9개월부터 최장 118개월까지 추적 조사되었다. 추적 조사의 기간 범위는 109개월이었고, 중간 기간은 62.5개월, 그리고 평균 기간은 42.3개월이었다. 추적조사가 가

능했던 27예의 조직학적 유형별 분포로는 장액성 낭선암종 14예, 점액성 낭선암종 9예, 및 자궁내막양 암종이 3예였다. 27예중 7예는 수술후 각각 9개월, 14개월, 23개월, 24개월 및 27개월만에 종양으로 사망하였다. 이들 7예 중에는 장액성 낭선암종이 4예였고, 점액성 낭선암종, 자궁내막양 암종, 및 그 유형을 정할 수 없었던 암종이 각각 1예씩 있었다. 또한 이들 7예중 6예가 모두 병기 III였다(Table 2).

2. 종합효소 연쇄반응의 결과

두 유전자간의 보합결합 신호강도 비율인 *myc*/tPA 비율, 즉 *c-myc* 유전자의 증폭은, 음성 대조군에서 0.88부터 1.29배 까지의 분포를 나타내었고, 평균 1.04 배였다. 실험군인 42예의 난소암종에서는 0.46부터 27.37배까지 다양한 증폭이 관찰되었으며, 평균 2.87 배로 대조군에 비하여, 실험군에서 더 의미있게 증폭됨을 관찰하였다($p=0.009$). 42예 난소암종 각각의 *myc*/tPA 비율은 Table 2에 제시하였다.

3. *myc*/tPA와 조직학적 유형, 등급, 병기 및 예후와 분석

myc/tPA 비율을 각각의 조직학적 유형별로 비교해 볼때, 유의 있는 차이를 관찰할 수 없었다($p=0.45$). 또한 조직학적 등급에서도 등급이 높을수록 *myc*/tPA 비율은 감소하는 경향은 있으나, 통계학적으로 유의한 차이는 관찰할 수 없었다($p=0.16$). 임상적 병기 I 과 II군은 병기 III 및 IV군에 비하여 *myc*/tPA비율이 비교적 높게 관찰되었지만, 통계학적으로 유의한 수준은 아니었다($p=0.051$). 또한 동일한 조직학적 유형 내에서, 조직학적 등급 및 병기에 따른 *myc*/tPA 비율의 차이도 관찰할 수 없었다($P>0.05$).

대조군과 비교하여, 위 양성율이 0%인 *myc*/tPA 1.3 배를 기준으로 *c-myc* 유전자 증폭 유무를 판정하였다. 본 연구에서는 42예중 15예(35.7%)에서 다양한 정도의 유전자 증폭이 관찰되었다. 이들 20예를 조직학적 유형별로 볼때 장액성 낭선암종 7예(35.3%), 점액성 낭선암종 6예(57.1%), 그리고 자궁내막양 암종이 1예(62.5%) 관찰되었으며 각각의 조직학적 유형에 따른 증폭 빈도의 차이는 관찰할 수 없었다($p=0.27$). 또한 조직학적 등급, 병기 I과 II군 및 병기 III군과 IV군간에도 증폭 빈도의 차이를 관찰할 수 없었으며($P>0.05$), 동일한 조직학적 유형 내에서, 조직학적 등급 및 병기에 따른 유전자 증폭 빈도의 차이도 관찰할 수 없었다($P>0.05$).

병기 III 종양 중 24개월 이내에 사망한 5예의

Table 2. Amplification of c-myc oncogene in ovarian carcinomas

Case no.	Histologic type	Grade	Stage	RT	Follow-up	myc/tPA
1	mucinous	III	Ia	0	alive, 55Mo	1.24
2	mucinous	I	Ia	0	alive, 57Mo	1.00
3	metastatic	III	-	?	?	1.28
4	metastatic	III	-	0	?	1.12
5	unclassified	III	IIIc	0	DOD 14Mo	1.54
6	mucinous	I	Ic	0	alive, 55Mo	27.37
7	mucinous	I	Ia	0	alive, 118Mo	2.32
8	mucinous	II	Ib	2 cm	DOD 27Mo	5.37
9	mucinous	I	Ic	0	alive, 98Mo	6.38
10	endometrioid	III	III	?	DOD 24Mo	5.86
11	mucinous	II	IIa	0	?	2.51
12	mucinous	II	Ia	0	?	2.74
13	serous	II	Ic	0	alive, 11Mo	13.58
14	serous	III	IIIc	4 cm	DOD 9Mo	0.46
15	serous	II	IIIc	2 cm	alive, 15Mo	0.90
16	serous	II	IIIc	4 cm	?	2.02
17	serous	III	IIIc	0	DOD 9Mo9	0.92
18	serous	I	Ic	0	alive, 13Mo	14.39
19	serous	II	IVb	?	?	0.79
20	serous	II	IIIc	0	alive, 29Mo	0.85
21	serous	II	IIIc	2 cm	alive, 63Mo	1.17
22	serous	III	IIIc	2 cm	DOD 14Mo	0.94
23	serous	I	IIIc	2 cm	?	1.01
24	serous	II	Ic	0	alive, 55Mo	1.47
25	serous	II	IIIc	0	alive, 72Mo	2.85
*26	serous	I	Ia	0	alive, 64Mo	1.04
27	mucinous	I	Ia	?	?	1.24
28	mucinous	I	IIIa	0	alive, 52Mo	1.12
29	mucinous	III	Ic	0	?	1.09
30	mucinous	I	Ic	0	alive, 44Mo	1.09
31	endometrioid	II	IIb	0	?	1.07
32	endometrioid	III	IV	0	?	1.26
33	endometrioid	II	Ic	0	alive, 44Mo	1.16
34	endometrioid	III	IIIc	2 cm	?	1.27
35	serous	I	IIIc	0	alive, 72Mo	1.46
36	serous	II	IIIc	2 cm	DOD 23Mo	2.02
37	mucinous	III	Ia	?	?	1.29
38	serous	II	Ia	0	alive, 48Mo	1.12
39	endometrioid	II	III	?	?	1.07
40	mucinous	I	Ic	0	alive, 43Mo	1.09
41	endometrioid	III	IIIc	2 cm	alive, 14Mo	0.99
42	endometrioid	III	IIIc	>4 cm	?	1.22

mucinous: mucinous cystadenocarcinoma

serous: papillary serous cystadenocarcinoma

endometrioid: endometrioid carcinoma

*borderline malignancy

RT: Residual tumor volume

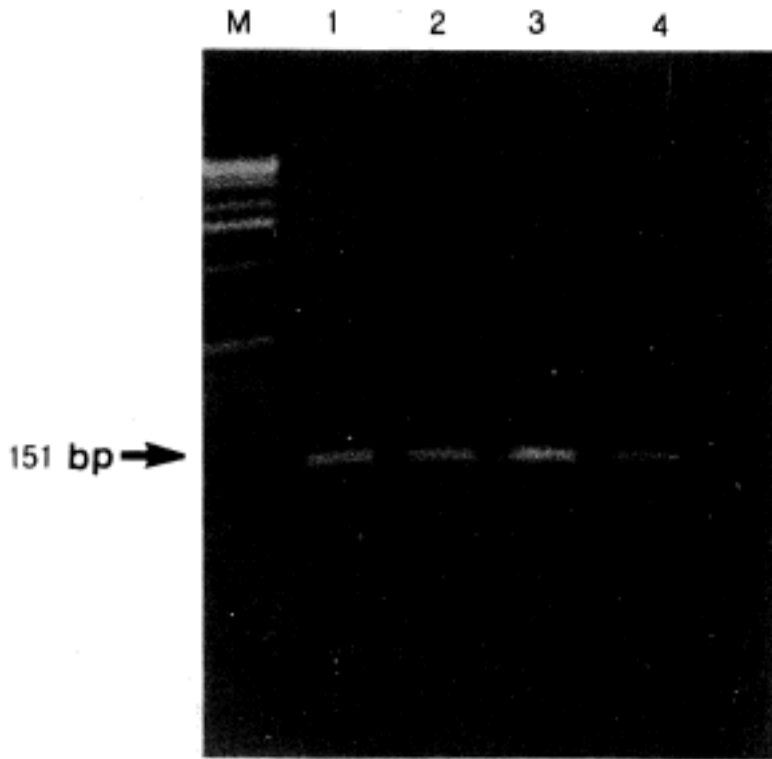


Fig. 1. DNAs were amplified using *c-myc*(lane 1 & 2) and tPA primers(lane 3 & 4). Lane 1 & 3; Ovarian Carcinoma Sample 9 Lane 2 & 4; Ovarian Carcinoma Sample 10

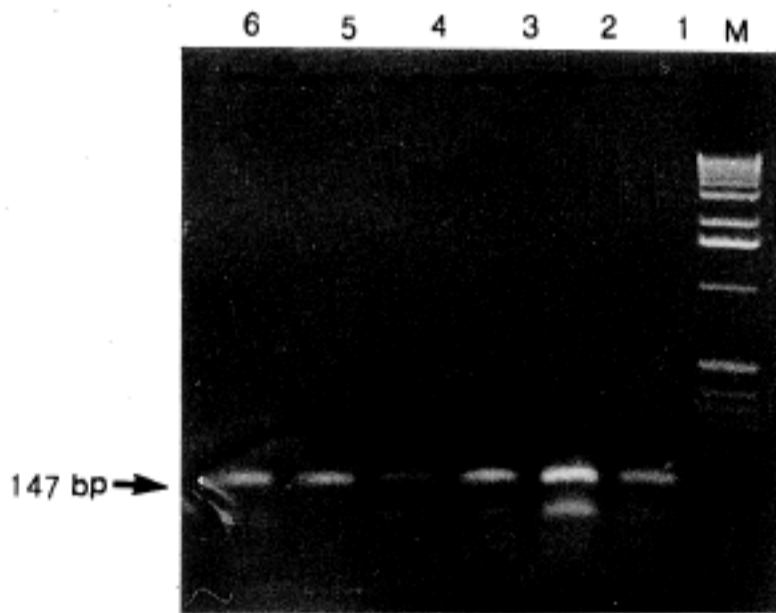


Fig. 2. DNAs were coamplified by PCR using *c-myc* and tPA primers. Lane 1 - 6; Ovarian Carcinoma Sample No. 9 - No. 14

myc/tPA 비율은 동일한 병기 내에서 25개월 이상 생존한 5예에 비하여 증가된 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 관찰할 수 없었다($P=0.053$).

잔여 종괴 부피(residual tumor volume) 유무를 조사한 결과 조사가 가능하였던 36예중 11예에서 잔여 종괴가 남아 있었다. 이중 8예는 2 cm, 3예는 4 cm이었다. 1예를 제외하고 모두 stage IIIc로 잔여 종괴 유무는 임상병기와 밀접한 관계가 있었으며 *myc*

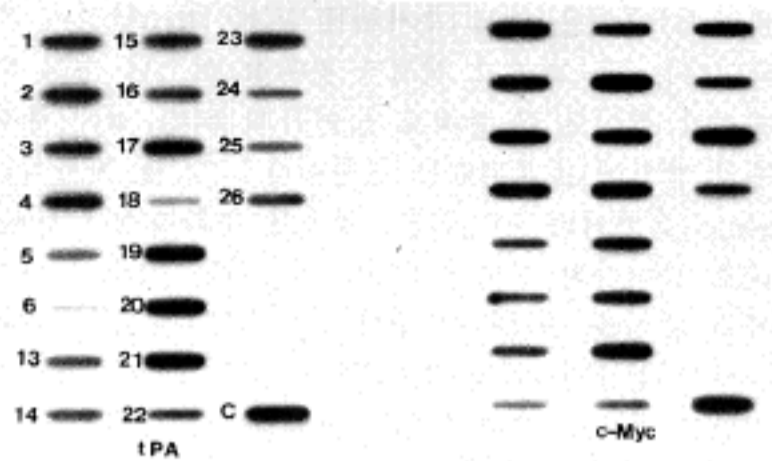


Fig. 3. Slot blot analysis of co-amplified PCR products probed with γP^{32} -dATP-labelled *c-myc* and tPA oligonucleotide probes.

유전자 증폭과는 상관관계가 없었다(Table 2).

이상의 결과를 종합하면, *c-myc* 유전자의 증폭 정도인 *myc*/tPA 비율과 그 증폭 빈도는 종양의 조직학적 유형, 등급 및 임상적 병기에 따라서 큰 차이가 없음을 관찰하였다.

고 찰

c-myc 유전자는 retrovirus의 일종이며, 닭에서 백혈병을 유발하는 avian myelocytomatosis virus MC 29의 변형유전자(transforming gene)인 *v-myc*과 세포성 상동 유전자로 처음 밝혀졌고, *v-myc*과 비교할 때, 유전 정보를 가지지 않는 부위인 exon 1이 더 추가되어 존재하는 것으로 알려졌다^{10,26}. 그후 chronic transforming avian leukemia virus의 provirus가 삽입되어, *c-myc* 유전자의 과발현이 발생되고, 이로 인하여 세포변환이 발생하는, 삽입성 변이 유발(insertional mutagenesis) 실험을 통하여, 세포 내재성 *myc* 유전자가 암발생 과정에 미치는 영향을 처음으로 증명하게 되었다⁴. 후속 해서 많은 림프 종양들에서만 아니라 다양한 암종에서도 *c-myc* 유전자가 전좌되거나 과발현 되는 양상이 관찰되어 이 유전자의 조절 이상과 악성 종양의 발생간에는 강한 연관성이 있음을 입증하게 되었다^{5,6,26,27}.

c-myc 유전자는 세포의 증식과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려졌는데, 예를 들면 정상 Go 상태의 세포가 유사분열 물질의 영향에 의해 *myc* mRNA 양의 증가와 함께 성장기로 될 뿐만 아니라, 생성된 mRNA의 해독을 방해하는 anti-sense oligonucleotide에 의해 세포 증식이 억압된다는 점, 조직배양 세포

에 *myc* 단백을 미세 주사하게 되면 DNA합성이 자극된다는 점, 그리고 세포가 분화를 하거나 성장 억제제의 투여로 Go상태로 들어가게 되면, *myc* 유전자의 발현이 소실된다는 점등이다²⁸⁻³⁰. 즉 지속적인 *c-myc* 유전자의 과발현은, 세포가 분화하거나 Go상태로 들어가지 못하게 하고, 계속적인 세포 분열과 세포 증식을 유도하게 된다³¹. 이러한 현상은 *c-myc* 유전자 산물인 *myc*단백(p67과 p64)의 구조적 특징에 기인한 것으로 알려져 있다. *myc*단백은 반감기가 짧고(약 30분), 핵 내에서만 작용하는 불안정 인산단백으로써, 여기에는 특징적인 leucin zipper domain과 helix-loop-helix domain이 존재하여, 이합체(dimer) 혹은 이질이합체등의 단백질과 합체 합성을 유발하거나, DNA의 특이한 염기서열에 결합을 함으로써 세포의 증식 및 DNA복제를 조절할 뿐만 아니라 특정 유전자의 전사를 조절한다고 밝혀졌다³²⁻³⁴.

유전자 조절 이상에 의한 *myc* 유전자의 과발현이 발생하는 기전에는 1) 염색체 전위 2) 유전자 증폭 3) 점 돌연변이 등이 있다. 염색체 변이나 점 돌연변이 기전은 주로 림프종양의 발생에 국한되어 발생하지만, 유전자 증폭 기전은 훨씬 더 광범위한 종양과 변형된 배양세포종에서 관찰되고, 고형성 종양에 있어서 유전자가 활성화되는 흔한 수단으로 알려져 있다^{5,6,35}.

c-myc 유전자의 증폭은 human cell line HL-60에서 처음으로 관찰되었고^{36,37}, 증폭에 의한 추가적인 유전자 복제 산물은 염색체에 결합되어, 통상의 Giemsa 염색에서 균질성 염색 부위(homogeneously staining region)로 관찰되거나, 작은 쌍을 형성하여 double minutes(DM)의 형태로 존재한다. 이 기전은 유전자의 복제수를 증가시켜 전사체와 그 유전자 산물을 증가시킴으로써 과발현을 유발하는 것으로 생각되고 있으며, 특정한 암종에서 특정한 암유전자의 증폭이 관찰된다는 것은 유전자 증폭이 동종의 암유발에 밀접한 관계가 있음을 나타내는 것으로 생각된다.

현재까지의 연구에 의하면 *c-myc* 유전자 증폭은 유방암, 자궁경부암 및 대장암 등에서 과발현 또는 증폭이 발견되었으며¹⁶⁻¹⁹, 일부 종양에서는 유전자 증폭이 임상적 병기 및 예후와 밀접하게 관련된다고 알려졌다. 예를 들면 원발성 신경모세포종에서 병기 III IV 종양은 병기 I II 종양에 비하여 *N-myc* 유전자의 증폭이 훨씬 더 증가 되었고, 자연적으로 퇴행하는 병기 IV-s 종양 내에서는 증폭이 없었다고 보고된 바 있다^{15,38}. 또한 폐장의 소세포 암종에서,

*c-myc*유전자 증폭이 20에서 70배 정도로 증가된 종양들은 훨씬 더 나쁜 경과를 취한다고 보고 되었다^{6,39}.

저자는 난소암종에 있어서, *c-myc* 유전자 증폭이 난소암종의 조직학적 유형, 등급 및 임상적 병기 등과 연관성이 있는지 여부를 파악하여, 과연 *c-myc* 유전자 증폭이 폐장의 소세포 암종에서와 같이, 예후 지표로 이용 가능한가를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하게 되었다. 또한 본 연구에 사용된 분자유전학적인 방법으로는 Schreiber와 Dubeau²⁴가 시행한 바와 같이 동일한 조건에서 *c-myc* 유전자와 대조 유전자를 같이 반응시키는 감별 중합효소 연쇄반응을 이용하였다.

현재 유전자 증폭을 측정할 수 있는 분자유전학적인 방법으로는, 증폭된 유전자에 대한 DNA탐식자를 사용하여 genomic DNA에 대한 Southern blot 방법이나 slot blot 분석 방법이 흔히 사용되어져 왔다. 그러나 이러한 실험 방법은 다량의 genomic DNA를 필요로 하게 되고, 신선한 조직만이 사용 가능하기 때문에, 후향적 연구가 불가능하다는 단점이 있다. 또한 종종 임상에서 얻어진 조직에서는 충분한 양의 DNA가 이용 가능하지 못하기 때문에 임상의학에 분자생물학적인 연구 기법을 적용시키기에는 많은 제약이 뒤따랐다. 이런 점에서 중합효소 연쇄반응 기법의 개발은, 유전학적인 분석에 분자기술학적인 방법을 적용시키는데 있어서 새로운 혁신을 일으켰다고 볼 수 있다. 이 기법은 매우 소량의 DNA를 필요로 할뿐만 아니라 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직을 이용할 수 있기 때문에, 악성 종양 환자에 있어서 어떤 특정 암유전자와의 관련성을 규명하거나, 예후 및 치료 효과의 판정과 연관지어 후향적인 연구를 할 수 있다는 장점이 있다. 즉 기존의 중합효소 연쇄반응 기법을 이용하면, 파라핀에 포매된 조직에 존재하는 1Kb이하의 대부분의 DNA절편들을 쉽게 증폭시킬 수 있다^{18-20,42,43}. 그러나 중합효소 연쇄반응은 너무 민감하여, 중합효소 연쇄반응 산물의 양 및 부란 온도나 시약 농도와 같은 여러 가지 변수의 경미한 차이에 의해서 현저하게 변화될 수 있기 때문에 정량분석을 하기에 어려움이 따른다. 본 연구에서 사용한 감별 중합효소 연쇄반응법은 이러한 문제점을 배제할 수 있고, 반응 주기수에 영향을 받지 않는다는 장점을 가지고 있다. 저자는 본 연구에 있어서 음성 대조 유전자로 *c-myc* 유전자와 동일한 염색체에 존재하는 *tPA* 유전자를 사용하여, 실질적인 *c-myc* 유전자 증폭만을 평가하였다.

Schwab과 Amler⁹는 실험 유전자와 동일한 염색체에 존재하는 대조 유전자를 사용하지 않을 경우에, 증폭치가 5미만이면 염색체의 다배수체 형성에 의한 결과일 수도 있기 때문에, 증폭 여부를 판단하는데 있어서 주의를 요할 것을 강조하였다. 이는 Schreiber와 Dubeau²⁴의 실험에서도 잘 보여주고 있다. 즉 tPA 유전자를 대조군으로 사용할 때 그들의 난소암종 30예중 5예(17%)에서 *c-myc/control*의 비율이 증가되었지만, 다른 염색체에 존재하는 α -lactalbumin 유전자를 사용할 경우, 30예중 11예(37%)에서 *c-myc/control*의 비율이 증가되는 소견을 보여 주었다. 이것은 결국 악성종양에서 흔히 관찰되는 염색체 중복현상등을 보정하지 못해서 발생한 결과라고 생각된다. 또한 tPA 유전자를 대조군으로 사용함으로써, 중합효소 연쇄반응에 이용된 DNA의 양을 보정할 수 있었다. 본 연구에서는 tPA 유전자의 중합효소 연쇄반응 산물이 종양군과 비교할 때 통계학적으로 의의있게 증가되어 있었다. 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직을 이용할 경우, 반응에 사용된 DNA량이 얼마나 되는지를 알 수 없으며 또한 기술적으로 동일량으로 조절할 수 없기 때문에 사실상 이러한 현상은 당연한 결과라고 볼 수 있다. 그러나 이 tPA 유전자의 반응산물을 기준으로 *c-myc* 유전자의 반응산물을 각각 비교하게 되면 이러한 문제점은 해결될 수 있었다.

본 실험 연구에서 42예 난소암종의 *c-myc/tPA* 비율은 평균 2.87배로서, 대조군인 정상 난소 세포주의 평균값보다 의의있게 증가되어 있음을 관찰하였다. 이 결과는 *c-myc* 유전자의 증폭으로 인하여, 암 유전자가 과발현 되었고, 그 결과로 난소암종이 발생할 수 있다는 가설을 뒷받침 할 수 있는 것으로 생각된다. 음성 대조군과 비교하여 *myc/tPA*의 비율이 1.3배 이상인 경우를 증폭이 일어났다고 판정하면 42예중 15예(35.7%)에서 증폭이 관찰되었다. 저자의 연구에서 *c-myc* 유전자의 증폭 빈도는 Schreiber와 Dubeau²⁴의 실험에서 관찰된 빈도(17%)보다 월등히 높지만, 이것은 저자의 실험에서, 대조군과 비교한 기준점(*c-myc/tPA*.1.3배)이 낮았기 때문으로 사료된다. 즉 Schreiber와 Dubeau는 그 비율이 2배 이상일 경우 양성으로 간주하였다. 본 연구에서 기준점을 2배 이상으로 할 때, 42예중 12예(28.6%)가 양성을 나타내어 Zhou등(1988)의 실험에서 관찰된 25%와 유사한 빈도를 나타내었다.

본 연구에서는 조직학적 유형, 등급 그리고 임상적 병기에 따른 *c-myc* 유전자의 증폭 정도 및 증폭

빈도의 차이를 관찰할 수 없었다. Schreiber와 Dubeau²⁴의 연구도 본 연구와 마찬가지로 *c-myc* 유전자의 증폭 정도와 조직학적 등급간에 연관성을 관찰하지 못하였는데, *c-myc* 유전자의 증폭이 관찰되었던 5예 중에는 등급 I과 III에 각각 1예가 포함되어 있었다. 이들은 또한 종양의 조직학적 등급은 오히려 *c-myc/α-lactalbumin* 비율과 더욱 잘 연관된다고 하였는데, 등급 I과 III에서 각각 23% 및 55%의 빈도를 관찰하였고, 이것은 바로 역형성이 심한 종양일수록 염색체의 임의적 이상이 증가된 것을 반영하는 것이라고 해석하였다. 이러한 관점에서 볼 때 *c-myc* 유전자의 증폭은 종양의 발생에 밀접하게 연관되어 있지만 조직학적 악성도와는 관계가 없다고 생각된다. 또한 본 연구의 42예 난소암종 중에는 경계성 장액암종 1예가 포함되어 있었다. 이 종양의 *c-myc/tPA* 비율은 종양군의 비율에 비하여 훨씬 낮은 수치를 나타내었다. Watson등⁴¹의 연구에 의하면 *c-myc* 유전자의 발현은 조직학적 등급에 따라서 차이가 없다고 보고하여 저자의 실험 결과와 일치하는 소견을 보였지만, 그들의 경계성 종양 6예의 *c-myc* 유전자 발현은 정상군과 의의있는 차이를 보였고, 악성종양과는 큰 차이가 없다고 보고하였다. 본 연구에서는 경계성종양이 1예 포함되었기 때문에 그 *c-myc/tPA* 비율을 판정하기가 곤란하였다.

저자의 연구에서 비록 통계적인 의의를 가지지는 못했지만, 임상적 병기가 낮을수록 *c-myc* 증폭이 더 증가되는 경향이 있음을 관찰하였다. 또한 같은 병기 내에서 *c-myc* 유전자 증폭이 높은 종양은 낮은 종양에 비하여 그 예후가 나쁜 양상임을 관찰하였다. 실험 대상 층계가 비교적 적고, 각각의 조직학적 유형들이 어느 특정 병기에만 편중되는 분포를 보이기 때문에, 이 결과로부터 어떤 단정적인 결론을 얻기는 어렵다고 생각되나, 이런 현상은 다음의 3가지 측면에서 분석이 가능하리라 생각된다. 첫 번째로, 낮은 병기의 종양에서 유전자 증폭이 더 강하였다는 점은 단적으로 *c-myc* 유전자 증폭이 난소암종의 암발생 과정에 깊이 기여하고 있음을 나타내는 것이고, 또한 밀접한 인과관계가 성립함을 나타내는 것이라 생각된다. 두 번째로, *c-myc* 유전자의 증폭은 적어도 난소암종에 있어서 종양의 경과에는 기여하지 못한다는 것이다. 즉 암발생 과정의 초기 단계에만 관여할 것이라는 생각이다. 이러한 견해는 Schwab과 Amler⁹의 유전자 증폭과 암발생 및 그 경과에 관한 가설로 설명될 수 있다. 즉 암유전자가 증폭이 되면 숙주세포의 증식을 가속시켜 암을 유발할 뿐

만 아니라 종양의 경과에 기여할 수도 있다. 그러나 종양의 경과를 종양 세포들의 진행적이고, 질적으로 상이한 세포학적 특성에 따라서 좌우된다고 생각할 때, 동종의 암이라도 그 생물학적 습성이 상이한 전구세포로부터 발생되면, 종양의 경과에는 차이가 생길 수 있다. 그러므로 유전자 증폭이 암발생 초기에 관여하게 되면 그 증폭의 정도에 관계없이 종양의 경과에는 차이가 유발될 수 있다는 것이다. 세 번째로, *c-myc* 유전자의 증폭은 난소암종에 있어서 보다 더 나쁜 예후를 나타낼 수 있을 것이라는 것이다. 유전자 증폭이 예후판정의 좋은 지표가 될 수 있다는 점은, 신경모세포종이나 폐장의 소세포암종에서 이미 잘 알려진 사실이다. 본 연구에서는, 난소암종에 있어서 다른 예후관계 인자가 관여될 수 있다는 가능성을 완전히 배제할 수는 없지만 동일한 병기 내에서 *myc* 유전자의 상대적인 복제수가 많았기 때문에, 나쁜 예후를 나타내었다고 생각되며, 이는 보다 더 퇴행성인 종양일수록 염색체의 다배수체 형성이 흔히 관찰된다는 점을 고려해 볼 때 쉽게 설명될 수 있으리라 생각된다.

끝으로, 본 연구에서는 후향적인 연구를 토대로 *c-myc* 유전자 증폭과 조직학적 유형, 등급, 임상 병기 및 예후와의 연관성을 찾아보았다. 보다 더 많은 수의 난소암종과, 추적조사를 재료로 과연 *c-myc* 유전자 증폭이 예후 지표로 사용될 수 있는가를 검증해야 하겠고, 난소암종에 있어서 *c-myc* 유전자 증폭이 암 발생과정 및 종양의 경과에 어떤 방식으로 영향을 미치게 되는지에 대해서, 보다 더 많은 연구가 뒤따라야 하겠다. 또한 종양환자의 경과에 따른 *c-myc* 유전자 증폭을 전향적으로 조사함으로써, 상급 임상 과제들을 해결해야 할 것으로 사료된다.

결 론

42예의 난소암종에서 *c-myc* 유전자 증폭의 정도와 그 빈도 및 조직학적 유형, 등급, 임상적 병기 그리고 예후와의 연관성을 알아보고자, *c-myc* 유전자와 동일한 염색체에 위치한 *tPA* 유전자를 같은 조건 내에서 동시에 반응을 시키는 감별 증합효소 연쇄반응을 시행하였고, 그 반응 산물을 slot blotting하여, $\gamma P^{32}dATP$ 로 표지된 *c-myc*과 *tPA* oligonucleotide 탐식자로 보합결합 시킨 후 자가방사기록법을 시행한 후, 농도계측기를 이용하여 보합결합 신호 강도 및 *c-myc/tPA* 비율을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *c-myc* 유전자 증폭은 1.3배부터 27배까지 다양한 정도로 증폭되었고, 그 평균값은 대조군에 비하여 의미 있게 증가(2.87 배)됨을 관찰하여 *c-myc* 유전자 증폭이 난소암종의 발생과 밀접하게 관련되어 있음을 알 수 있었다.

2. *c-myc* 유전자 증폭 정도 및 그 빈도는 조직학적 유형, 등급 및 임상적 병기에 따라서 큰 차이는 없었다.

참 고 문 헌

1. Varmus HE. The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann Rev Genet* 1984; 18: 553-612.
2. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. *Cancer Res* 1985; 45:1437-43.
3. Leder P, Battey J, Lenoir G, et al. Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 1983; 222: 765-71.
4. Hayward WS, Neel BG, Astrin SM. Activation of a cellular oncogene by promotor insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 1981; 209: 475-80.
5. Alitalo K, Schwab M, Lin CC, Varmus HE, Bishop JM. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene(*c-myc*) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1983; 80: 1707-11.
6. Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF, Minna JD. Amplification and expression of the *c-myc* oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 1983; 306: 194-6.
7. 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: 177-82.
8. Wong AJ, Ruppert JM, Eggleston J, et al. Gene amplification of *c-myc* and *N-myc* in small cell carcinoma of the lung. *Science* 1986; 233: 461-4.
9. Schwab M, Amler LC. Amplification of cellular oncogenes: A Predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromo Cancer* 1990; 1: 181-93.
10. Sheiness DK, 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: 514-8.
11. Escot C, Theillet C, Lidereau R, et al. Genetic alteration of the *c-myc* proto-oncogene(*myc*) in human primary breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci (USA)*

- 1986; 83: 4834-8.
12. Rothberg PG. The role of the oncogene *c-myc* in sporadic large bowel cancer and familial polyposis coli. *Semin Surg Oncol* 1987; 3: 152-8.
 13. Nau MM, Brooks BJ, Carney DN, et al. Human small cell lung cancer show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83: 1092-6.
 14. Shibuya M, Yokota J, Ueyama Y. Amplification and expression of a cellular oncogene(*c-myc*) in human gastric adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1985; 5(2): 414-8.
 15. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1985; 313: 1111-6.
 16. Snapka RM. Gene amplification as a target for cancer chemotherapy. *Oncol Res* 1992; 4: 145-50.
 17. Bos JL, Verlaan-deVries M, Jansen AM, et al. Three different mutation in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 9155-63.
 18. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
 19. Li HH, Gyllensten UB, Cui XF, et al. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1988; 335: 414-7.
 20. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 1988; 167: 225-30.
 21. Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. PCR. A practical approach. Edited by McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. Oxford University Press, New York, 1991, p29-36.
 22. Gazin C, DeDinechin SD, Hampe A, et al. Nucleotide sequence of the human *c-myc* locus: Provocative open reading frame within the first exon. *Embo J* 1984; 3: 383-7.
 23. Ny T, Elgh F, Lund B. The structure of the human tissue-type plasminogen activation gene : Correlation of intron and exon structures of functional and structural domains. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1984; 81: 5355-9.
 24. Schreiber G, Dubeau L. *C-myc* protooncogene amplification detected by polymerase chain reaction in archival human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1990; 137: 653-8.
 25. Graf T, Beug H. Avian leukemia viruses: Interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Acta* 1978; 516: 269-9.
 26. Cole MD. The *myc* oncogene: It's role in transformation and differentiation. *Ann Rev Genet* 1986; 20: 361-4.
 27. Kelly K, Siebenlist U. The regulation and expression of *c-myc* in normal and malignant cells. *Ann Rev Immunol* 1986; 4: 317-38.
 28. Reed JC, Nowell PC, Hoover RG. Regulation of *c-myc* mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1985; 82: 4221-4.
 29. Kaczmarek L, Hyland JK, Watt R, Rosenberg M, Baserga R. Microinjected *c-myc* as a competence factor. *Science* 1985; 228: 1313-5.
 30. Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, et al. A *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 1987; 328: 445-9.
 31. Prochownik EV, Kukowska J. Deregulated expression of *c-myc* by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* 1986; 322: 848-50.
 32. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper. A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; 240: 1759-64.
 33. DePinho RA, Schreiber-Agus N, Alt FW. *Myc* family oncogene in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 1991; 57: 1-46.
 34. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with *myc*. *Science* 1991; 251: 1211-7.
 35. Schwab M, Ramsay R, Alitalo K, et al. Amplification and enhanced expression of the *c-myc* oncogene in mouse SEWA tumor cells. *Nature* 1985; 315: 345-7.
 36. Collins S, Groudine M. Amplification of endogenous *myc* related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* 1982; 298: 670-81.
 37. Dalla-Favera R, Wong-Staal F, Gallo RC. Oncogene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary cells of the same patient. *Nature* 1982; 299: 61-3.
 38. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced disease

- stage. *Science* 1984; 224: 1121-4.
39. Johnson BE, Ihde DC, Makuch RW, et al. Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patient and its relationship to clinical status and course. *J Clin Invest* 1987; 79: 1629-34.
40. Zhou DJ, Gonzalez-Cadavid N, Ahuja H, et al. A unique pattern of proto-oncogene abnormalities in ovarian adenocarcinomas. *Cancer* 1988; 62: 1573-6.
41. Watson JV, Curling OM, Munn CF, Hudson CN. Oncogenic expression in ovarian cancer: A pilot study of c-myc oncoprotein in serous papillary ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1987; 28: 137-50.
42. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.
43. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *ScarringMethods in Enzymol* 1987; 155: 335-50.
-