

정량 PCR

Competitive PCR과 Real Time PCR

PCR법으로 극히 미량인 DNA를 검출할 수 있다. 특히 RT-PCR은 미량의 RNA 검출 등에 큰 위력을 발휘한다. 그러나 통상의 PCR을 정량에 이용하기에는 증폭산물이 반드시 원래의 주형량을 반영하는 것이 아니므로, 단순하게 증폭산물의 양으로 주형량을 추정하기는 어렵다. 가장 큰 이유는 plateau 고원 효과이다. 즉 반응이 충분히 진행되면 정체기에 도달하여 초기 주형량에 관계없이 같은 양의 PCR 반응 생성물만을 얻을 수 있다. Plateau 효과의 주원인은 다음과 같다.

- ① DNA polymerase의 실패
- ② 기질의 고갈
- ③ Primer의 고갈
- ④ 반응부산물인 pyrophosphate에 의한 합성반응 저해
- ⑤ 생성된 DNA 가닥의 재결합으로 priming 저해

통상의 PCR로 정량하는 경우 지수적으로 생성물이 증폭하는 조건을 찾아내고 PCR 증폭산물을 전기영동에서 충분히 검출할 수 있는 생성량 범위 내에서 정량해야만 한다.

그러나 다양한 농도의 주형에 대하여 이러한 조건을 충족시키는 것은 어렵다.

본 고에서는 PCR에 정량성을 갖도록 개발한 competitive PCR법과 real time PCR법을 소개한다.

■ Competitive PCR (경합 PCR)

Competitive PCR에는 “DNA competitor”라고 하는 DNA 단편을 사용하는데 이 DNA competitor의 조건으로 다음 세 가지를 들 수 있다.

- 1) 목적 DNA와 같은 primer로 증폭할 수 있다.
- 2) PCR 증폭한 후에 목적 DNA와 구별할 수 있다(증폭 크기가 달라 제한효소 처리 단편의 전기영동 패턴이 다르다).
- 3) 농도 또는 양을 파악할 수 있다.

이 DNA competitor와 목적 DNA를 같은 반응액 중에서 같은 primer로 동시에 증폭하면 primer의 경합 작용으로 양자의 증폭이 일어나므로 증폭산물의 비가 원래 주형 양의 비율을 반영하게 된다. 또 양을 알고 있는 DNA competitor와 비교하므로서 목적 DNA의 양을 추정할 수 있다. Competitive PCR을 mRNA 정량에 응용한 것이 Competitive RT-PCR이다.

Competitive RT-PCR은 두 종류로 분류할 수 있다.

하나는 mRNA를 주형으로 역전사반응하여 cDNA를 합성한 다음, cDNA와 DNA competitor를 같은 튜브 내에서 반응하는 방법이고, 다른 하나는 역전사 반응시 mRNA와 함께 “RNA competitor”를 첨가하여 같은 튜브 내에서 반응하는 방법이다(그림 1). 후자는 역전사 반응 효율을 고려하여 원래의 mRNA 절대량을 추정할 수 있다.

그림 1과 같이 competitor RNA와 목적 mRNA의 양이 같을 경우(⑤)는 각각에서 유래하는 증폭산물량이 거의 같게 되며 이런 방법으로 목적 RNA 양을 추정할 수 있다.

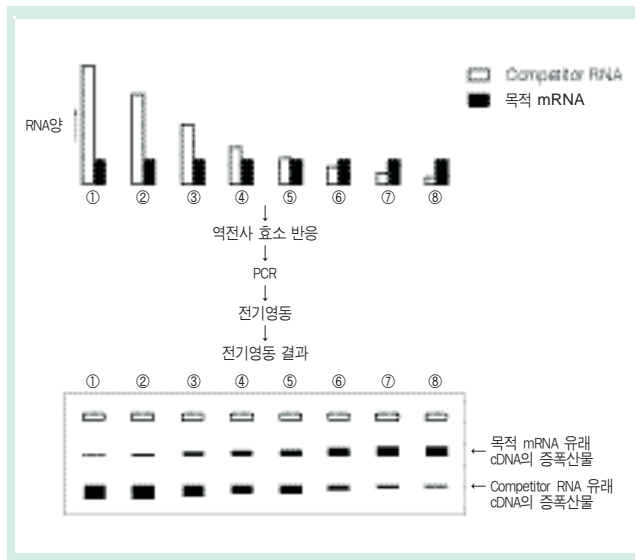


그림 1 Competitive PCR의 원리(RNA의 경우)

■ Real Time PCR

Real time PCR법은 PCR 증폭량을 실시간으로 확인하면서 해석하는 방법으로 전기영동이 필요없이 신속하게 정량할 수 있다. Real time PCR을 위해서는 thermal cycler와 분광형광광도계를 일체화한 장치(예를 들면 Smart Cycler® System(TaKaRa Code SC100))가 필요하다.

Real time PCR에 의한 정량 원리를 그림 2에 나타내었다. Serial dilution한 양을 알고 있는 DNA를 표준으로 PCR반응을 실시한다(그림 2-A). 이를 기본으로 증폭이 지수적으로 일어나는 영역에서 일정 증폭산물량이 되는 cyclus수(threshold cycle: Ct값)를 가

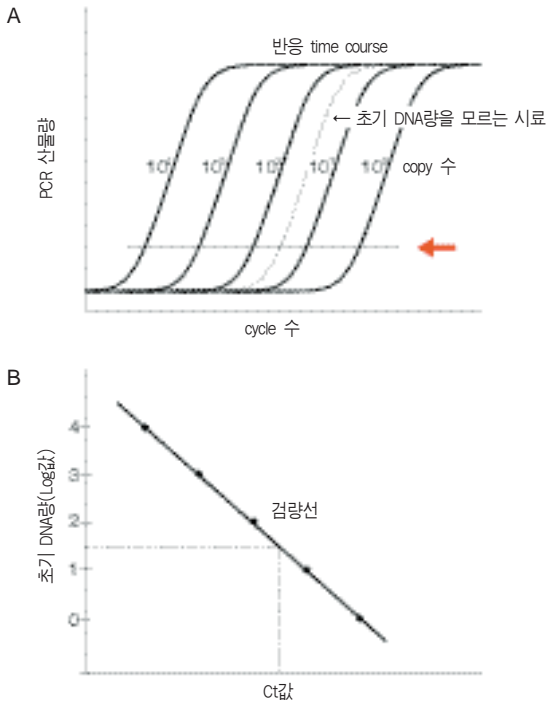


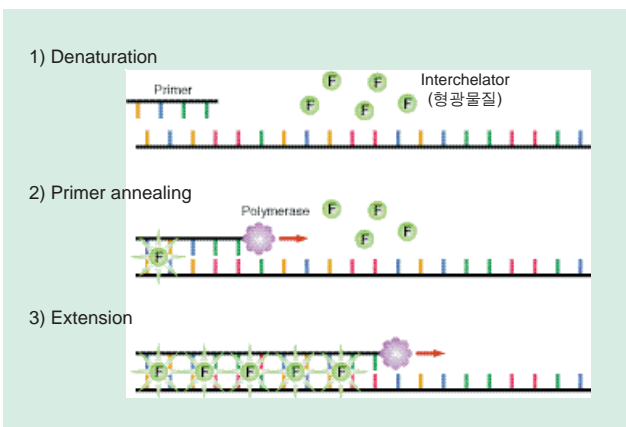
그림 1 Competitive PCR의 원리(RNA의 경우)

로축에, 초기 DNA 량을 세로축에 plot하여 검량선을 작성한다(그림 2-B). 미지농도 시료도 같은 조건 하에서 반응하여 Ct값을 구하여 목적 DNA 량을 측정한다.

통상 real time PCR은 형광시약을 사용한다. 형광을 monitor하는 방법에는 몇 가지가 있으나 Smart Cycler® System을 사용할 경우 아래 방법중 선택할 수 있다.

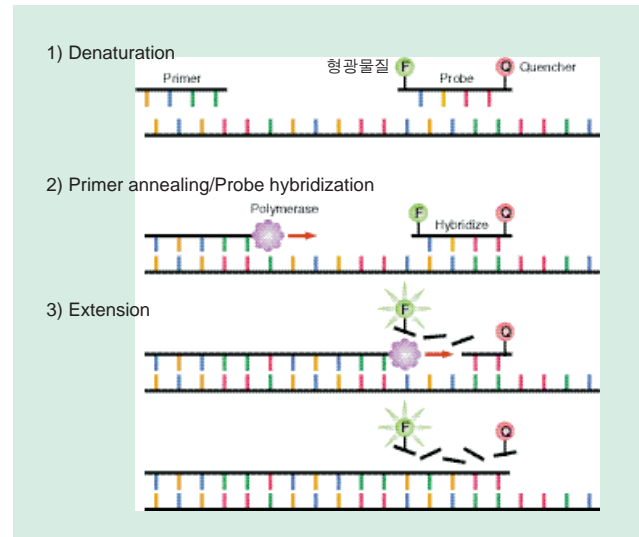
1) Interchelating법

Double strand DNA에 결합하여 형광을 나타내는 시약(interchelator: SYBR® Green I, EtBr 등)을 PCR 반응에 첨가하여 증폭과 함께 발색하는 형광을 검출하는 방법이다. Interchelator는 PCR 반응으로 합성된 double strand DNA에 결합하여 형광을 발하며 이 형광강도를 검출하여 증폭산물의 생성량을 측정할 수 있다. 또한 증폭 DNA의 용해온도를 측정할 수 있다.



2) TaqMan™ probe법

5' 말단을 형광물질(FAM 등)로 3' 말단을 quencher 물질(TAMRA 등)로 수식한 oligonucleotide(TaqMan™ probe)를 PCR 반응액에 첨가하는 방법이다. TaqMan™ probe는 annealing step에서 주형 DNA에 특이적으로 hybridize하지만, probe상에 quencher에 의해 형광 발생이 억제된다. Extension 반응시에 Taq DNA polymerase가 갖는 5' → 3' exonuclease 활성으로 주형에 hybridize한 TaqMan™ probe가 분해되어 형광색소가 probe에서 유리되므로 quencher에 의한 억제가 해제되어 형광을 발한다.



3) Molecular Beacon법

양 말단을 형광물질(FAM, TAMRA 등)과 quencher 물질(DABCYL 등)로 수식한 헤어핀형 이차구조를 만드는 oligonucleotide probe(Molecular Beacon probe)를 PCR 반응액에 첨가하는 방법이다. Molecular Beacon probe는 유리 상태에서 헤어핀 구조를 취하고 형광물질과 quencher 물질이 근접해 있어 형광발생이 억제된다. Probe는 annealing step에서 주형과 상보적인 영역에서 특이적으로 hybridize하고 이 때 형광물질과 quencher 물질과의 거리가 멀어져 quencher 물질에 의한 억제가 해소되어 probe상의 형광색소가 형광을 나타낸다. 한편 hybridize하지 않은 Molecular Beacon probe는 헤어핀 구조를 유지하고 있어 형광을 나타내지 않는다.

