

Cycleave RT-PCR Cytochrome P450 정량 시스템

Cycleave RT-PCR CoreKit	TaKaRa Code CY502	50회
Cycleave Human P450 정량 Probe/Primer Set	TaKaRa Code CY401	각 20회
Cycleave Rat P450 정량 Probe/Primer Set	TaKaRa Code CY402	각 20회

Rat 및 human의 Cytochrome P450 mRNA의 발현량을 정량하기 위한 제품이다. 신속성과 정량성이 뛰어난 Real Time PCR법과 특이성이 높은 검출법인 cycling probe법의 조합에 의해 Cytochrome P450의 정확한 발현 해석을 수행한다.

Cycling probe법(Life Science & Biotechnology 27호 참조)은 RNA와 DNA로 이루어진 chimera probe와 RNase H를 조합한 고감도이며 특이성이 높은 검출방법이다(그림 1). Cytochrome P450에는 분자종간의 상동성이 높아 식별이 곤란한 유전자가 있으나 cycling probe법을 이용하면 이것을 정확하게 검출할 수 있다. 또한 PCR 반응은 Real Time PCR로 수행하므로 정확한 정량을 할 수 있으며, 전기영동이 필요하지 않아 신속한 결과를 얻을 수 있다.

본 고에서는 Rat의 CYP1A1과 CYP1A2의 발현 해석을 수행한 실험 예를 중심으로 측정값의 재현성과 타사 제품과의 비교결과에 대해서 소개한다.

내용

본 시스템에서는 각 Probe/Primer Set와 별도로 판매하는 Cycleave RT-PCR Core Kit을 조합하여 사용한다. Cycleave RT-PCR Core Kit에는 Real Time RT-PCR 반응 및 Cycling probe법에 필요한 효소와 buffer 등이 포함되어 있으며 Human용과 Rat용의 두 종류의 Probe/Primer Set에는 각 분자종을 특이적으로 검출하기 위한 primer, cycling probe와 검량선 작성용 RNA transcript 등이 포함되어 있다.

Human용에서는 10종류의 Cytochrome P450 분자종과 2종류의 housekeeping 유전자를, Rat용에서는 9종류의 Cytochrome P450 분자종과 1종류의 housekeeping 유전자를 각각 정량할 수 있다. 또한 이 제품은 Smart Cycler[®] System과 Smart Cycler[®] II System에 최적화되어 있다.

Cycleave RT-PCR Core Kit (50 회분)

[역전사 반응용 시약]	
M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H ⁻) (200 U/ μ l)	15 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	15 μ l
5 × M-MLV Buffer	100 μ l
Oligo dT Primer (50 uM)	25 μ l
[PCR 반응 시약]	
TaKaRa Ex Taq [™] R-PCR (5 U/ μ l)	12.5 μ l
Tli RNase H II (200 U/ μ l)	25 μ l
10 × R-PCR buffer	125 μ l
Mg ²⁺ solution (25 mM)	250 μ l
dNTP Mixture (각 10 mM)	70 μ l
RNase Free dH ₂ O	750 μ l

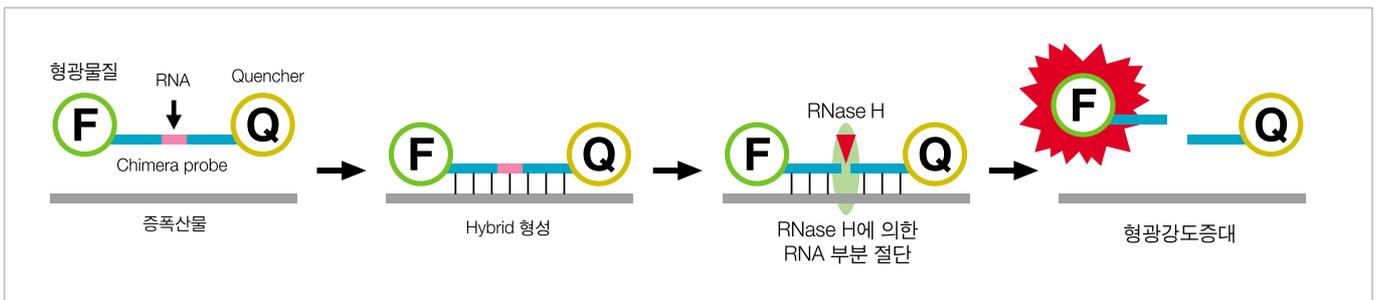


그림 1 Cycling probe법의 원리

Cycleave Human P450 정량 Probe/Primer Set (20 회분)

PCR Primer Mix	10 μ l \times 12 종류
Cycling Probe	20 μ l \times 12 종류
RNA transcript* (10 ⁶ copy/ μ l)	15 μ l \times 12 종류
Dilution Buffer (for RNA transcript)	1 ml

*검량선 작성용 standard RNA

【정량 가능한 분자종류】

Human CYP1A1	Human CYP2B7	(Human GAPDH)*
Human CYP1A2	Human CYP2C9	(Human β -action)*
Human CYP2A6	Human CYP2C19	
Human CYP2A7	Human CYP2D6	
Human CYP2B6	Human CYP3E1	

* RNA량 보정용 housekeeping 유전자

Cycleave Rat P450 정량 Probe/Primer Set (20 회분)

PCR Primer Mix	10 μ l \times 10 종류
Cycling Probe	20 μ l \times 10 종류
RNA transcript* (10 ⁶ copy/ μ l)	15 μ l \times 10 종류
Dilution Buffer (for RNA transcript)	1 ml

* 검량선 작성용 standard RNA

【정량 가능한 분자종류】

Rat CYP1A1	Rat CYP2C11	Rat CYP4A1
Rat CYP1A2	Rat CYP2E1	
Rat CYP2B1	Rat CYP3A1	(Rat Cyclophilin)*
Rat CYP2B2	Rat CYP3A2	

* RNA량 보정용 housekeeping 유전자

측정값의 재현성

본 제품을 사용하여 Smart Cycler[®] System으로 Real Time RT-PCR 해석을 하였을 경우의 데이터 신뢰성을 확인하기 위하여 측정값의 재현성을 조사하였다.

●방법 및 결과

본 실험에서는 Rat Cytochrome P450 정량용 Probe/Primer Set에 포함되는 Cyclophilin target set와 Cycleave RT-PCR Core Kit을 사용하였다. Rat 간에서 조제한 total RNA 시료 (100 ng/ μ l)를 Dilution Buffer로 10배 serial dilution하여 4단계 농도의 시료를 조제하여 이것을 주형으로 사용하였다. 각 농도의 시료마다 세 가지 반응의 RT-PCR을 실시하여 Ct값을 구하고 (그림 2-A), Ct값을 가로축에, RNA량 (주형량)의 로그값을 세로축에 plot하였다 (그림 2-B). 일정한 주형량에서 Ct값과 측정값 그리고 세 가지 반응에서의 격차 (CV값으로서 나타냄)를 표 1에 나타내었다.

표1 Ct값과 측정 결과의 격차

주형량 ^{*1}	Ct값 ^{*2}	CV (%)	측정결과	CV (%)
1	29.86 \pm 0.065	0.22	1.0 \pm 0.04	4.4
10	26.39 \pm 0.060	0.23	10.5 \pm 0.43	4.1
100	23.05 \pm 0.036	0.16	102.6 \pm 2.51	2.4
1000	19.73 \pm 0.015	0.08	988.4 \pm 10.3	1.0

*1 희석 전의 total RNA 1 μ l 에 포함되어 있는 주형량 (100 ng)을 1,000으로 했을 경우의 상대량.

*2 증폭곡선의 2차 도함수곡선을 이용하여 얻은 Ct값 (그림 2-A 참조)으로 평균 \pm 표준편차

표 1과 같이 각 주형량에서 Ct값의 격차는 거의 없고 (CV=0.08 ~ 0.22%), 측정값의 격차도 작은 것을 알 수 있었다 (CV=1.0 ~ 4.4%). 이와 같이 본 제품과 Smart Cycler[®] System을 함께 이용함으로써 재현성 높은 측정이 가능하다는 것을 확인하였다.

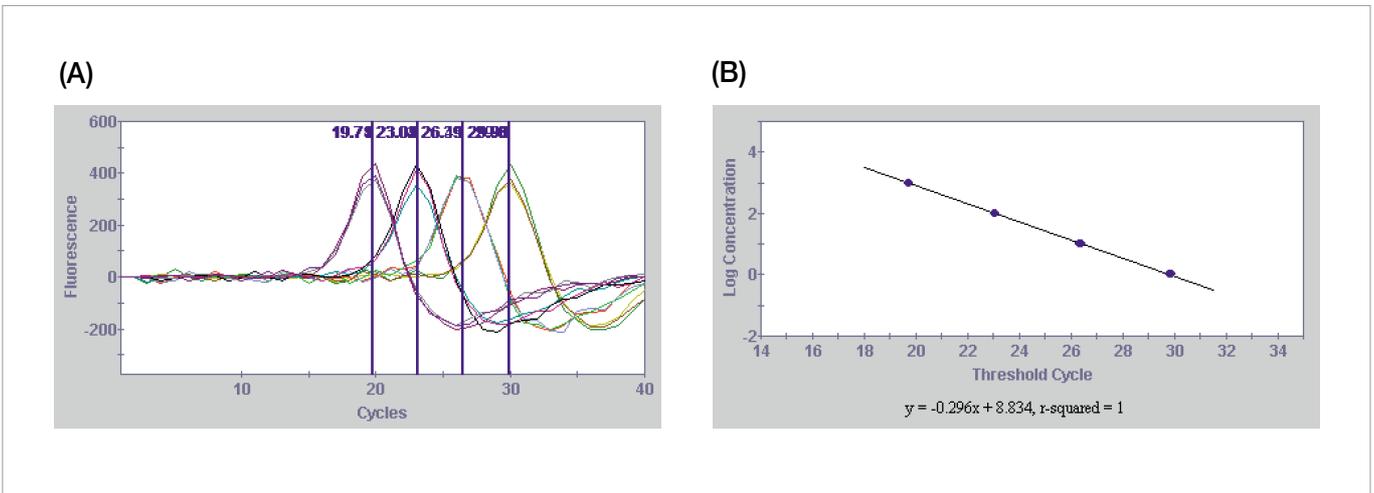


그림 2 (A) 증폭곡선의 2차 도함수곡선 (Ct값 자동 산출), (B) Ct값과 주형량에 대한 값의 plot

Ct (threshold cycle)는 일정 증폭산물양이 되는 cycle수로 산출하는 방법은 2가지가 있다. 한 가지는 어느 일정 형광강도의 한 지점에 threshold를 설정하여 그 선과 증폭 곡선이 교차하는 점에 대응하는 cycle수를 Ct값으로 하는 방법이다. 이 방법은 설정하는 threshold에 의해 Ct값이 바뀐다. 또다른 하나는 증폭곡선의 2차 도함수곡선 (A)을 이용하는 방법이다. (A)는 증폭 곡선을 2회 미분하여 얻을 수 있는 곡선으로, 그 peak (변화율이 가장 큰 곳)에 대응하는 cycle수를 Ct값으로 한다. 이 방법은 Ct값이 1 개로 정해져 앞의 방법에 비해 재현성이 높다. Smart Cycler[®] System에서는 위의 두 방법 모두 대응할 수 있는 기능을 갖고 있다.

Rat CYP1A1과 CYP1A2의 발현 해석

본 제품을 사용한 Rat Cytochrome P450의 발현 해석의 일례로서, Rat에 β -naphthoflavone (BNF)을 투여함으로써 Rat 간에서 CYP1A1과 CYP1A2의 발현량이 어떻게 변화하는가를 Real Time PCR (Smart Cycler® System 사용)로 해석한 실험을 아래에 나타내었다. 또한 RNA량의 보정은 housekeeping 유전자인 Rat Cyclophilin의 발현을 측정하여 수행하였다.

(1) 검량선 작성

●방법

Rat용 Probe/Primer Set에 첨부되어 있는 각 target의 RNA transcript (CYP1A1과 CYP1A2, Cyclophilin의 각 standard RNA)을 각각 Dilution Buffer로 10배 serial dilution하여 5단계 농도로 standard를 조제하고, 이것을 주형으로 Real Time RT-PCR을 수행하여 검량선을 작성하였다.

●결과

검량선의 일례를 그림 3에 나타내었다.

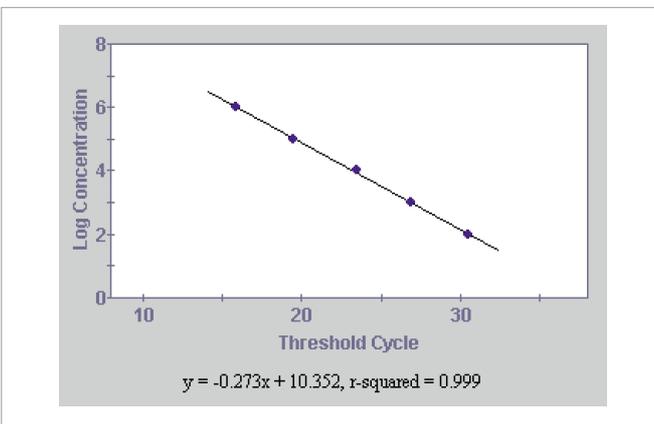


그림3 CYP1A1 target의 검량선

각 target 검량선의 상관계수는 모두 0.99이상으로 높은 직선성을 나타내었다. 이런 반응계에서는 신뢰성이 높은 정량 결과를 얻을 수 있다.

(2) Total RNA 시료의 측정

●방법

β -naphthoflavone (BNF) 투여/비투여 Rat의 간에서 각각 total RNA를 조제하여 10 ng을 주형으로 사용하였다. 각 시료에 대해 Rat CYP1A1, CYP1A2, Cyclophilin을 target으로 Real Time RT-PCR을 수행하고 (그림 4), 검량선을 바탕으로 발현량을 산출하였다. 그리고 Cyclophilin의 발현량을 기초로 total RNA량을 보정하고, CYP1A1과 CYP1A2의 상대적 발현량을 구하였다 (표 2).

●결과

CYP1A1 mRNA는 β -naphthoflavone (BNF)을 투여하지 않은 Rat의 간에서는 발현하지 않는 것으로 β -naphthoflavone (BNF) 투여에 의해 발현한다는 것을 확인하였다. 반면 CYP1A2 mRNA는 β -naphthoflavone (BNF) 투여/비투여 Rat의 간 어디에서나 발현이 나타났으며 β -naphthoflavone (BNF) 투여에 의해 발현량이 약 17배 상승한다는 것을 확인하였다 (표 2, 그림 4).

표2 상대적 발현량의 계산 결과

Sample	Relative Amounts*1			Norm. to Cyclophilin*2	
	CYP1A1	CYP1A2	Cyclophilin	CYP1A1	CYP1A2
Control	(ND)*3	5,173	6,216	(ND)*3	0.83
Test	3,228	35,392	2,478	1.30	14.28

*1 수치는 측정시료 중의 각 target mRNA copy수를 나타낸다 (검량선에 의해 산출)

*2 수치는 Cyclophilin 발현량에 대하여 각 CYP1 발현량의 상대값을 나타낸다 (보정값)

*3 ND: Not Detected.

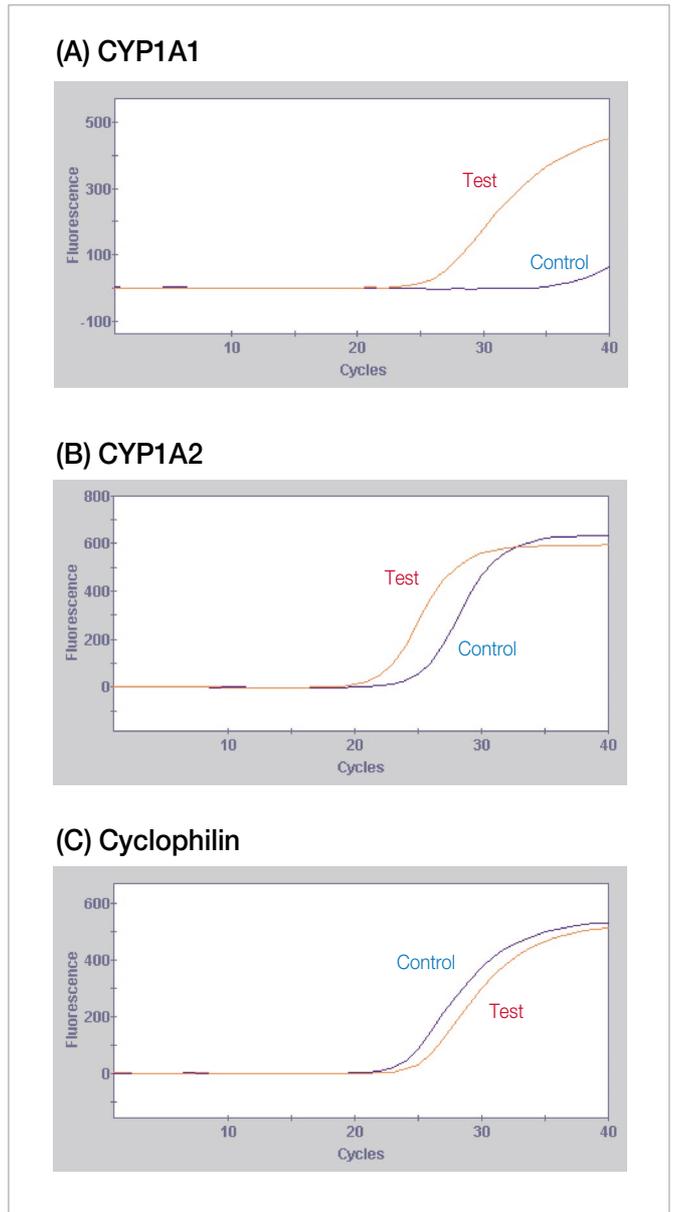


그림 4 각 target의 증폭곡선

타사 제품과의 비교

본 제품과 타사 제품에 대해 검출감도와 검출시간을 비교하였다.

●방법

본 제품의 Human GAPDH target set와 A사 제품을 사용하였다. 본 제품의 해석에는 Real Time PCR 장치로 Smart Cycler® System을 사용하고, A

사 제품의 해석에는 ABI PRISM® 7700을 사용하였다. 주형으로서는 A431 세포로부터 조제한 total RNA 5 pg ~ 50 ng을 사용하고, 60 cycle의 Real Time RT-PCR을 수행하여 검출감도와 검출에 필요한 시간을 비교하였다. 또한 Smart Cycler® System에서는 증폭곡선의 2차 도함수를 자동으로 계산하여 Ct값을 자동적으로 구하는 기능 (그림 2 참조)이 있다. 그러나 ABI PRISM® 7700에는 이 기능이 없으므로 비교가 가능하도록 본 실험에서는 각각 지수함수적 증폭영역의 거의 중앙에 threshold를 설정하여 Ct값을 구하였다.

● 결과

세로축에 Ct값을, 가로축에 주형량의 로그값 (log₂)을 plot한 결과를 그림 5에 나타내었다. 본 제품과 Smart Cycler® System을 조합하여 사용하였을 경우 total RNA 5 pg까지 검출할 수 있다. 그러나 A사 제품에서는 50 pg 까지 밖에 검출할 수 없었다. 또한 양쪽의 Ct값을 비교해 보면, 본 제품이 A사 제품에 비해 약 20 cycle 빠르게 검출되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5, 표3).

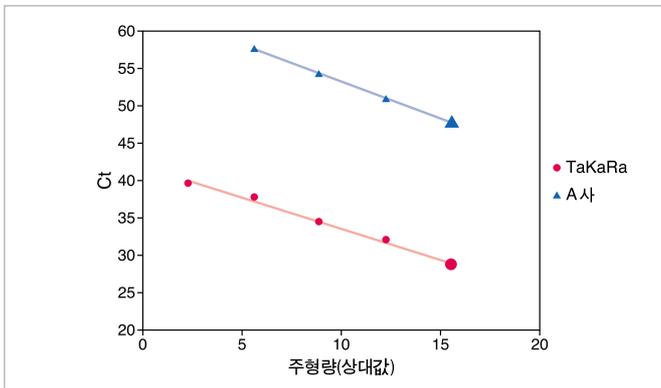


그림 5 Ct값과 주형량 (log₂)의 plot

표3 Ct값의 비교

주형 RNA량		Ct값	
pg	Log ₂ pg	TaKaRa	A사
5	2.32	39.55	57.60
50	5.64	37.76	54.40
500	8.97	34.38	51.02
5,000	12.29	31.87	47.71
50,000	15.61	28.69	-

사용한 Real Time PCR 장치가 다르므로 확실한 비교는 어려우나 본 제품과 Smart Cycler® System을 조합하여 사용함으로써, 보다 고감도이면서 신속한 Cytochrome P450의 발현 해석이 가능할 것으로 판단된다. 또한 본 실험의 경우, 60 cycle 반응시간은 Smart Cycler® System에서는 약 1시간, ABI PRISM® 7700에서는 약 2시간 반이었다.

맺음말

Real Time PCR 기술과 cycling probe법과의 조합에 의해 정확, 신속, 간단한 정량 RT-PCR이 가능해졌다. 당사에서는 Cytochrome P450 정량 시스템에 이어 앞으로도 Real Time RT-PCR용 제품을 지속적으로 출시할 예정이다.

Real Time PCR 용 SARS virus 검출 Kit가 Line up!

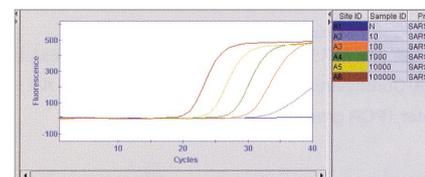
Smart Cycler® System을 이용한 SARS virus 검출에 최적!
 Cycleave RT-PCR SARS virus Detection Kit
 TaKaRa Code CY211 24 반응

특징

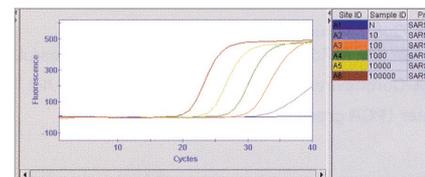
- 1) 특이성이 높은 cycling probe법을 이용한 고감도 검출 실현
- 2) Internal control에 의한 false negative 판정 가능
- 3) 측정시간 (핵산 증폭 시간) 40분으로 초고속
- 4) 넓은 범위의 검량선 작성이 가능하여 virus 정량도 가능



Cycleave RT-PCR SARS virus Detection Kit를 이용한 검출 예



Target 유래 signal (FAM channel)



Internal control 유래 signal (ROX channel)