

# Real Time PCR 이전 단계인 RNA 증폭에 대한 FAQ

## 1. qPCR도 증폭인데, 왜 전 단계에서 증폭해야 하나요?

생검biopsies, LCM(Laser Capture Microdissection), cell sorting과 같이 작은 샘플에서 추출한 RNA 양은 매우 한정적입니다. 좋은 qPCR 실험 디자인은 다양한 종류의 컨트롤과 3회 반복 실험을 필요로 하기 때문에 충분한 양의 RNA가 필요합니다. 그러므로 관심 있는 유전자의 수가 증가함에 따라 샘플양도 증가합니다. 게다가 발현량이 적은 유전자들은 일반적으로 검출 레벨이 낮고, 이러한 한계는 양이 적고 구하기 힘든 샘플에서는 보다 더 중요하게 대두됩니다. qPCR 분석전에 RNA를 증폭하면 발현량이 적은 샘플들을 검출 가능한 범위로 올려, 높은 민감도와 재현성 높은 결과를 얻을 수 있습니다. 그러므로 RNA 증폭은 적은 생물학적인 샘플에서 충분한 양으로 많은 유전자에 대하여 보다 좋은 디자인, 유익한 정보를 주는 qPCR 검출을 가능하게 합니다.

## 2. 샘플양이 많은데, 증폭해야 할 이유가 있나요?

물론 있습니다. 예를 들어 전체 기관Whole organ과 같이 샘플양이 많다는 것이 qPCR에 사용할 수 있는 샘플이 많다는 것을 의미하는 것은 아닙니다.

첫 번째, 유전자 발현 연구의 주요 목적 중 하나는 관찰된 표현형이나 병리학적 현상과의 발현패턴의 연관성을 알아 보는 것입니다. 이 목적은 가능한 한 동일한 샘플을 이용하는 것이 가장 좋은 결과를 얻을 수 있습니다. 전체 기관이나 다른 기관의 많은 부분에 있는 서로 다른 세포의 세포는 발현 프로파일링이 겹치거나 낮은 분석능resolution을 나타낼 수 있으며, 다양한 소스로부터 유래한 RNA를 이용하여 실험할 경우 표현형과 발현 프로파일링 관계를 민감하고, 명확하게 연결시키기 힘들 수도 있습니다. LCM, cell sorting, 그외 다른 세포집단분류 cell population classification 등에 대한 접근 기술이 발전하면서, 대부분의 샘플은 동일한 세포의 모집단을 모을 수 있어서 보다 좋은 하위 분류sub-classification가 가능합니다. 이것은 qPCR을 이용한 유전자분석에서 보다 소중하고 정확한 생물학적인 결론을 가능하게 할 수 있습니다.

두 번째, mRNA 레벨에서 유전자의 differential expression은 반응상에서 다음에 있는 경로pathway의 첫 번째 지표인 경우가 있습니다. 이러한 지표 뒤에 정확한 생물학적인 연구를 위해서 단백질 발현, 단백질 변형modification, *in situ* hybridization 혹은 면역염색법 중의 하나로 꼭 검증해야 합니다. RNA 증폭은 원래 샘플을 활용하여 downstream 연구를 진행할 수 있게 해줍니다. 게다가 보다 큰 생물학적인 샘플은 종종 다양한 세포 타입과 하위 세포 타입이 혼합되어 있는 경우가 있습니다. RNA 증폭은 같은 조직샘플에서 다른 세포 타입에 대한 연구를 분리해서 가능하게 할 수 있으므로, 절개dissection나 cell sorting에 의한 세포 타입 분리도 가능하게 합니다.

## 3. 관심 있는 유전자가 적는데, 왜 RNA를 증폭해야 하나요?

수행하고 있는 연구가 한정된 수의 유전자에 집중되어 있다면 현재는 증폭의 필요성을 느끼지 못할지도 모릅니다. 그러나 과학은 매우 빠르게 새로운 기술과 발견, 조사와 분석적인 접근방법이 발전되고 있습니다. 예를 들어, 과거에 분석하지 못했던 새로운 array 데이터를 당신이 관심 갖고 있는 분야나 새로운 논문에서 발견하게 될 수도 있습니다. 당신이 cDNA 샘플을 증폭한다면, 원래 RNA 샘플을 보다 더 안정적이고 풍부하게 합성할 수 있습니다. 이 cDNA를 이용하면 증폭한 샘플과 데이터를 다시 만들 필요가 없으며 RNA 샘플의 추가적인 소모없이 주어진 시간 내에 연구할 수 있습니다. 따라서 cDNA합성은 유전자의 수를 늘리면서 미래의 qPCR 응용연구에 적용하기 위해 보존할 수 있는 유용한 단계입니다.

## 4. 실험 디자인에 RNA 증폭이 주는 가장 큰 장점은 무엇인가요?

- RNA 증폭은 실험 디자인에 중요한 영향을 줍니다.  
현재 당신은 qPCR을 위한 많은 샘플을 가지고 있으므로 생물학적 샘플에 대한 요구는 덜 할 것입니다. 하지만 다음 스텝의 연구 디자인을 위해 RNA 증폭의 유무를 고려하세요.
- 증폭을 하지 않으면,  
연구를 위한 적당한 양의 샘플을 확보하기 위해 샘플에 대한 pooling이 필요하거나 많은 수의 샘플을 수집하고 만들어야 합니다.
- 증폭을 하면
  - Pooling에 의한 나타날 수 있는 내재되어 있는 생물학적인 다양성을 줄이면서 양이 적은 샘플에 대한 연구를 할 수 있습니다.
  - 예를 들면 실험동물과 같이 수집하고 만들어 내야 하는 샘플의 수를 줄일 수 있습니다.
  - 수집한 샘플 내의 하위 모집단subpopulation과 특정한 세포 타입에 대한 연구를 할 수 있습니다. 그러므로 연구의 민감도를 증가시킬 수 있고 보다 중요한 생물학적인 데이터를 얻을 수 있습니다.
- 증폭을 하지 않으면,  
구하기 어렵고 양이 적은 임상샘플은 제한적인 연구에만 사용될 수 밖에 없습니다.

• 증폭을 하면

- 한정된 샘플로부터 충분한 양의 cDNA를 합성할 수 있으므로, 당신의 연구는 물론 공동 연구자들과 나누어 사용할 수 있는 충분한 샘플을 확보할 수 있습니다. 그러므로 원래의 RNA 샘플을 미래의 연구를 위해 남겨놓을 수도 있습니다.
- 극도로 한정되어 있고 구하기 힘든 환자 샘플을 충분히 활용할 수 있습니다. 예를 들어 당신이 갖고 있는 단 50 ng의 샘플은 5 µg의 가치를 가질 수 있습니다.
- 구하기 어려운 샘플의 데이터와 재료를 공동연구자들과 나눠 사용할 수도 있는 샘플 은행 컨소시엄을 구성할 수도 있습니다.

• 증폭을 하지 않으면,

한정된 샘플량을 기본으로 하여 디자인해야 합니다. 한정된 샘플 양은 실험디자인의 질적인 면에서 중요합니다.

• 증폭을 하면

- 당신의 모든 연구에서 생물학적 기술적 모든 부분에서 필요한 만큼 반복실험을 할 수 있습니다.

- 관심 있는 유전자 각각에 대하여 같은 발현 범위에서 충분한 내부 컨트롤 internal control 실험을 할 수 있습니다.
- 실험시스템에 대한 적당한 normalizing 유전자를 결정할 수 있고, 선택에 따라 많은 normalizing 유전자를 사용할 수 있다.
- 다양성이 줄어든 상용 컨트롤 RNA가 아닌 직접 실험샘플을 이용하여 qPCR 조건을 최적화할 수 있습니다.



실험 가설

뇌종양연구를 위하여 마우스 모델 시스템의 3개의 단계에서 tumor development와 RNA 발현을 연구하고자 한다. 최초 단계의 샘플로부터는 약 50 ng의 total RNA를 추출할 수 있고, 그 다음 단계에서 부터는 약 100 ng의 total RNA를 추출할 수 있다. 실험은 3회 반복으로 진행하고 qPCR은 2개의 housekeeping gene과 20개의 타겟 유전자를 증폭한다. 반응당 total RNA 10 ng을 사용하는 단일반응으로 진행한다.

• 증폭방법을 이용하지 않는 가설 모델

1. 이 연구에서는 총 22개 유전자의 발현을 조사한다. 이를 위해 최초 단계에서는 14-15 마리의 마우스가 필요하고, 그 후 단계에서는 마우스 7-8 마리가 필요하다. 따라서 총 28-30 마리의 마우스가 필요하다.
2. qPCR을 수행한 후 결과를 분석한다.
3. 이 연구에서 매우 유의성 있는 결과를 얻었다. 몇몇 단백질과 그 단백질의 위치 localization가 관여될 것이라는 가설을 세운다.
4. 새로운 마우스를 이용하여 단백질 위치 분석을 해야 한다. 단백질 위치 분석을 한다.
5. 단백질 위치분석이 이 가설을 증명한다. 그러나 여기에 아직도 추가로 다른 유전자들이 관여되는지 의문이 생긴다. 따라서 새로운 후보 유전자를 밝혀내기 위하여 microarray 실험을 하기로 결정한다. Microarray 실험은 각 단계에서 3회 반복 실험을 한다. 따라서 총 9 마리의 마우스가 필요하다. qPCR 분석에 이은 단백질 위치 분석을 통해 이와 같은 현상을 이해했으므로, 이와 동일하게 또 다른 24 마리의 마우스가 필요하다. 조직샘플은 추출해서 -80 °C에 보관한다. RNA 데이터와 단백질 데이터를 직접적으로 비교할 수 없다.
6. 새로운 유전자에 대해 단백질 위치와 면역침강반응은 물론 qPCR 실험을 진행한다.

• 증폭방법을 이용하는 가설 모델

1. 이 연구에서는 22개 유전자의 발현을 조사한다. 각 단계에 마우스 3 마리씩이 필요하다. 총 9 마리의 마우스가 이 실험을 위해 사용된다.
2. qPCR을 수행한 후 결과를 분석한다.
3. 이 연구에서 매우 유의성 있는 결과를 얻었다. 몇몇 단백질과 그 단백질의 위치 localization가 관여될 것이라는 가설을 세운다.
4. 새로운 마우스를 이용하여 단백질 위치 분석을 해야 한다. 단백질 위치 분석을 한다.
5. 단백질 위치가 이 가설을 증명한다. 그러나 여기에 아직도 추가로 다른 유전자들이 관여되는지 의문이 생긴다. 따라서 새로운 후보 유전자를 밝혀내기 위하여 microarray 실험을 하기로 결정한다. Microarray 실험은 각 단계에서 3회 반복 실험을 한다. 따라서 총 9 마리의 마우스가 필요하다. 단백질 위치 분석을 통해 이와 같은 현상을 이해했으므로, 조직샘플은 추출해서 -80 °C에 보관한다.
6. Microarray 샘플의 남아있는 cDNA를 이용하여 새로운 유전자에 대한 qPCR 분석을 실시한다. 조직의 남아있는 부분을 이용하여 단백질 위치 분석과 면역침강 실험을 하고, 이 결과를 qPCR 결과와 직접적으로 연결시켜 분석한다. 만약 결과가 연관성이 있다면, qPCR에는 첫번째 세트의 마우스를 사용할 수 있다. 추가로 RNA를 추출할 필요가 없으므로, 시간을 줄일 수 있다.

• 이 연구에서 qPCR 전에 cDNA를 증폭하는 장점

1. 비용을 줄일 수 있다. : 실험동물이 3-4배 정도 적게 필요하다.
2. 시간 절약 : 같이 증폭한 cDNA를 microarray와 qPCR 실험에 사용할 수 있다.
3. 단백질과 RNA 결과를 직접적으로 연결할 수 있다.
4. 반복실험의 총 횟수를 증가시키면서 동물의 개체간의 RNA 데이터를 비교할 수 있다.
5. 충분한 실험재료를 미래의 qPCR과 array 실험에 사용할 수 있도록 남겨둘 수 있다.