중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 연구 기법

고려대학교 의과대학 내과학교실

차 대 룡

중합효소 연쇄반응의 원리 및 반응액조성 원칙

1. 중합효소 연쇄반응의 원리

PCR은 두가닥의 DNA를 주형으로 특정영역을 사이에 두고 primer라는 짧은 DNA를 각 상보가닥에 결합(hybridize)하여 기질이 되는 4종류의 deoxy nucleotide triphosphate(dNTP)의 존재하에 DNA polymerase의 작용으로 주형의 염기배열에 따라 새로운 DNA가 형성되는 과정이다. PCR의 원리는 크게 3단계 과정으로, DNA의 해리(denaturation), primer와 주형 DNA의 결합(annealing) 및 신장(extension) 과정 등으로 구성되며, 이러한 과정을 반복함으로써 목적하는 DNA 단편을 대량으로 얻을 수 있다.

2. 중합효소 연쇄반응의 반응액 조성원칙

PCR 증폭에 영향을 미치는 인자로는 PCR과정의 각 단계별 반응 온도와 시간, PCR 반응 용액내의 구성성분의 조성 상태(주형 DNA의 순도, dNTP 농도, Mg 농도, DNA polymerase의 종류 및 농도, Mg 이온의 농도), PCR cycle의 수, 고안한 primer의 상태 등에 따라 달라진다.

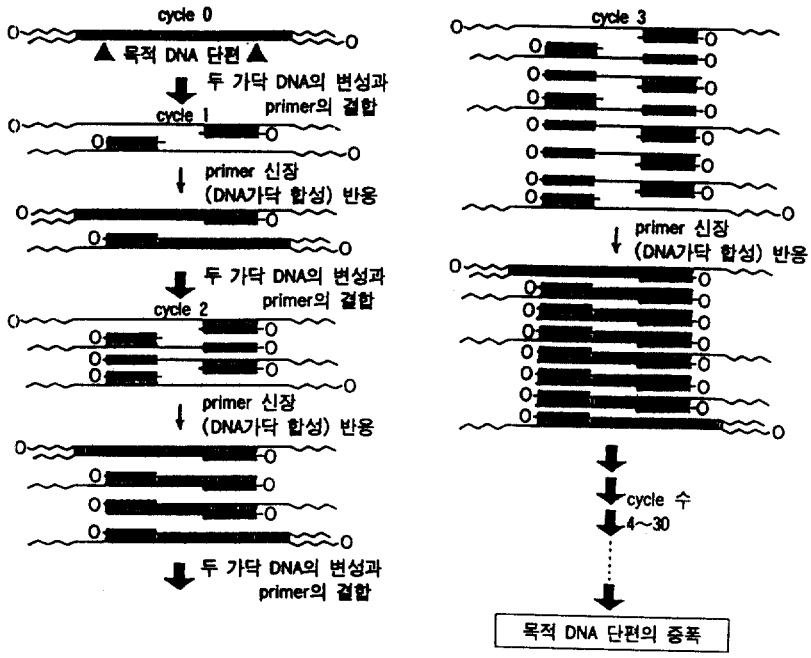


Fig. 1. PCR의 원리
목적하는 DNA영역을 사이에 둔 2종류의 primer를 사용하여 tube내에서 연속적인 효소반응을 증폭시키는 방법이다. DNA Polymerase에 의한 주형특이적인 DNA합성을 반복하여 목적하는 DNA 편을 수 십만배나 증폭시킬 수 있다.

1) PCR 반응 조건

DNA의 변성(denaturation) 온도를 너무 높이거나 시간을 길게 할 경우 DNA polymerase의 활성도가 감소하는데 일반적인 적정온도는 94℃에서 15-30초 처리하는 것이 일반적이다. 주형 DNA와 primer가 결합하는 annealing 온도는 primer의 염기배열과 길이에 의해 결정되며 primer의 melting temp 보다 낮게 설정하는 것이 일반적이며, 온도를 높일수록 주형 DNA와 primer의 mismatch가 줄어 반응특이성이 올라간다. multiplex PCR 처럼 동일 tube 내에 여러종류의 primer를 넣을 경우는 일반적으로 45℃ 이하로 온도를 낮춘다. 주형 DNA의 신장(extension)은 사용하는 DNA polymerase에 의해 달라지지만 DNA 합성 속도(초당 60 nucleotide합성, 70℃)를 고려하여 결정한다.

2) PCR cycle의 수

PCR을 시행하여 얻는 PCR 산물의 양은 2^n배가 되지만 실제로는 이보다 낮다. 그 이유로는 PCR의 진행과정에서 Taq의 활성도 저하, PCR에 사용되는 dNTP 등 기질의 부족, 증폭단편간의 annealing으로 인한 primer와 주형 DNA의 결합의 장애, pyroric acid 축적에 의한 Taq 활성 감소 등이 관여한다. 따라서 주형 DNA양이 미량일 경우를 제외하면 cycle 수를 불필요하게 증가시킬 필요가 없으며 초기에 PCR 조건을 설정하고자 할 경우는 다양한 PCR cycle 수를 갖고 PCR을 시행하여 비특이적인 band가 없이 목적하는 PCR 산물의 band가 가장 탁월할 때의 cycle 수를 이용하는 것이 원칙이다.

3) PCR 반응액의 조성

(1) Mg 이온 농도

PCR 과정에서 Mg 이온의 역할은 Taq 활성에 미치는 영향, 주형 DNA와 primer의 annealing과정, primer dimer 형성 등에 영향을 미치고 일반적으로 1.5-2.5mM 농도의 Mg이 사용된다. 따라서 시료내에 함유된 chelator(예 : EDTA) 등은 PCR 과정에 영향을 미칠 수 있다. 일반적으로 Mg 농도가 높아지면 비특이적인 band의 수가 증가하고 Taq의 활성도를 약화시킬 수 있으므로 주의를 요한다.

(2) dNTP의 농도

일반적으로 20-200 μM을 사용하고 dNTP가 많을수록 PCR과정중 핵산의 misincorporation 확률이 높아지며, dNTP가 낮은 경우 PCR의 특이성은 향상되나 PCR 산물의 수확은 감소한다. 단 사용하는 Mg 농도에 따라 최적 농도의 dNTP가 달라진다.

(3) PCR 용액내 반응 첨가물

SDS 등은 Taq의 활성을 감소시키고 Tween-20은 이를 억제하는 효과가 있으며, 일반적으로 DMSO, PEG, Glycerol, Formamide, BSA 등은 PCR의 반응 효율을 향상시킬 수 있다.

(4) 내열성 DNA polymerase

현재까지 알려진 DNA polymerase는 구조적으로 대장균 polymerase I으로 대표되는 Pol I 계열, 사람의 DNA polymerase α로 대표되는 α 계열로 구분된다. 이들은 각 계열별로 효소의 생화학적 특성이 유사하여 DNA 합성속도, 주형 DNA와 primer의 선호성, 저해제에 대한 감수성 등이 유사하다. Taq polymerase와 Tth polymerase 등의 Pol I 효소는 DNA 신장능이 강해 일반적으로 PCR에 널리 사용되나 mismatched incorporation을 억제하는 3'→5' exonuclease 활성이 없다. 반면 α 계열의 효소인 Pfu polymerase와 Vent polymerase는 3'→5' exonuclease 활성이 강해 보다 특이적인 PCR을 시행할 수 있으나 DNA 신장능이 약하다. 일반적으로 PCR 과정에 사용되는 DNA polymerase는 pH 8.3-8.8 용액내에서 활성도를 지니며, 이들 효소의 양이 많을수록 PCR 증폭산물의 양은 증가하지만 비특이적인 산물을 얻을 확률이 높아진다.

(5) Primer

일반적으로 PCR에 사용되는 primer의 농도는 0.2-1 μM로서 양질의 primer를 고안하는 과정은 성공적인 PCR의 필수요소라 할 수 있다. Primer의 설계는 computer program을 사용하는 방법과 인위적으로 고안하는 방법이 있으나 완벽한 primer의 설계는 일반적으로 여러번의 시행착오를 요한다. 목적하는 염기배열의 상류측(5'측)에서 설정한 primer를 sense primer, 하류측(3'측)에서 설정한 primer를 antisense primer라 명한다. Primer 고안시 주의 사항을 요약하면 다음과 같다. ① primer의 크기 : 일반적으로 15-30bp가 적절하고 20-25bp를 많이 사용한다. 길이가 짧은 경우 주형 DNA와의 annealing이 어려워지고 너무 길 경우 misannealing이 일어난다. 단 long PCR의 경우나 primer내에 제한효소 인식배열을 부가할 경우는 30-40bp의 primer가 효율적이다. ② primer간의 상보성 : 양 primer의 3' 말단의 염기

Table 1. 내열성 DNA Polymerase의 분류

Family	유 래	제품명	비 고
Pol I 형	*Bacillus caldotenax*	Bcabest DNA polymerase [TaKaRa]	5'→3' exo 활성을 상실한 변이체
	Bacillus stearothemophilus	Bst DNA olymerase[Biorad]	5'→3' exo 활성을 상실한 변이체
	Thermus aquaticus	TaKaRa Taq[TaKaRa]a) Ampli Taq[Perkin Elmer]a) Taq DNA polymerase [파마샤 등]	5'→3' exo 활성을 상실한 Stoffel fragment[Perkin Elmer], Gene Taq, ⊿Taq[Amersham]
	Thermus thermophilus	Tth DNA polymerase [Toyobo 등]a) rTth DNA polymerase [Perkin Elmer]	역전사활성이 있고, single tube RT-PCR에 이용 가능 5'→3' exo 활성이 결실된 ⊿Tth DNA polymerase도 있다.
	Thermus flavus	Tfl DNA polymerase[Promega]	
	Thermus 'ubiquitos'	Hot Tub DNA polymerase [Amersham]a)	
	Thermotoga maritima	Ultma DNA polymerase [Perkin Elmer]a)	3'→5' exo 활성을 가지고 있다. 5'→3' exo 활성은 상실되어 있다.
α 형	*Pyrococcus furiosus*	Pfu DNA polymerase [Stratagene]a)	5'→3' exo 활성결손 변이체도 시판되고 있다.
	Pyrococcus sp.(GB-D)	Deep Vent DNA polymerase [NEB]	〃
	Thermococcus litoralis	Vent DNA polymerase[NEB] Tli DNA polymerase[Promega]	〃
	Pyrococcus woesei	Pwo DNA polymerase[B.M.]a)	
혼합형		TaKaRa Ex Taq[TaKaRa]a) TaKaRa LA Taq[TaKaRa]a) rTth DNA Polymerase XL [Perkin Elmer]a) Taq Plus DNA polymerase [Stratagene]a) ELONGASE Amplification System[GibucoBRL]a) Exand.Long Template PCR System[B.M.]a)	LA-PCR용으로 조제된 효소

배열이 상보적일 경우 primer간의 annealing이 유발되어 primer dimer를 형성하게 된다. ③ primer내의 2차구조 형성 : primer내의 염기배열에서 서로 상보적인 염기배열이 존재할 경우 primer내에서 2차 구조를 형성할 수 있으므로 주의를 요한다. ④ GC 함량 : primer내의 GC 함량은 50-60% 전후가 되도록 하고 primer의 염기배열내에 GC 혹은 AT rich 영역이 없도록 고안한다. 또한 primer의 3' 말단이 주형 DNA와의 결합을 안정되게 하도록 primer의 3' 말단은 GC를 함유하는 것이 좋다. ⑤ Tm 값 : Tm 값은 두가닥 DNA의 50%가 한가닥 DNA로 해리할 때의 온도로 PCR 과정에서 annealing 온도는 Tm 값 이하로 설정할 필요가 있고 양 primer의 Tm 값이 다를 경우 우선 낮은 쪽을 기준으로 annealing temp를 설정한다. primer의 염기배열로 부터 간단하게 Tm값을 결정하는 방법은 A, T는 2℃, C, G는 4℃로 계산하여 이들을 합산한 온도가 primer의 Tm 값이 되고, PCR 과정중의 annealing 온도는 PCR 산

물의 결과를 보고 재설정할 필요가 있다. ⑥ 특수한 PCR에 대한 primer의 설계 : (a) Nested PCR-외측 primer와 내측 primer를 사용하는 PCR로 2차 PCR 과정에서 1차 PCR에 사용한 primer를 제거하지 않으면 primer 고안시에 이들 primer간에 상호작용을 확인해야 한다. (b) Multiplex PCR-여러 종류의 primer를 사용하여 시행하는 PCR로서 primer들 간의 상호작용 여부를 확인하고, PCR 산물의 크기를 고려하여 PCR 후에 전기영동상에서 각 유전자에 해당하는 band의 크기를 확인할 수 있어야 한다. (c) Long PCR-PCR로 1kbp 이상의 DNA를 증폭시켜야 하므로 PCR 과정중 primer의 3' 말단부위가 PCR 산물의 중간부위에 결합하지 않도록 설계할 필요가 있다. (d) Competitive PCR-검체의 DNA와 함께 동일 PCR tube내에서 mutant DNA가 경쟁적으로 증폭되는 PCR로서 mutant DNA의 형성 기술은 정량적 PCR에서 기술하고자 한다. (e) PCR cloning-PCR 후에 증폭시킨 PCR 산물을 subcloning 할수 있도록 primer의 5' 말단부위에 제한효소 인식배열을 부가하여 PCR이 끝난 후 PCR 산물을 vector내에 삽입시키고자 하는 경우로서 primer내에 첨가한 제한효소 인식부위의 삽입이 primer의 특이성에 장애를 주지 않고, primer dimer 형성에도 문제가 없게 고안할 필요가 있다. (f) Degenerate PCR-핵산의 염기배열을 모르고 단백구조만을 아는 상태에서 아미노산의 염기배열로 부터 추정한 primer를 사용하는 PCR로서 특정 아미노산을 code하는 핵산의 염기배열은 복수로 존재하므로 이를 mix primer 혹은 degenerate primer라고 한다. Primer 고안시 주의 사항은 가능한한 codon 수가 적은 아미노산 조합을 사용함으로써 PCR의 특이성을 향상시킬 수 있고, 불가피하게 다수의 조합일 경우에는 4종류의 염기에 해당되는 부위에 inosine을 사용한다. Primer의 3' 말단은 가급적 복수의 염기혼합이 아닌 특정의 염기가 되도록 설계하여 PCR 효율성을 높이도록 고안한다.

중합효소 연쇄반응의 종류

1. Long PCR(long and accurate PCR)

보편적인 PCR 기법으로 증폭할 수 있는 DNA 영역은 일반적으로 5kbp를 넘지 않고 실제로 1-2kbp

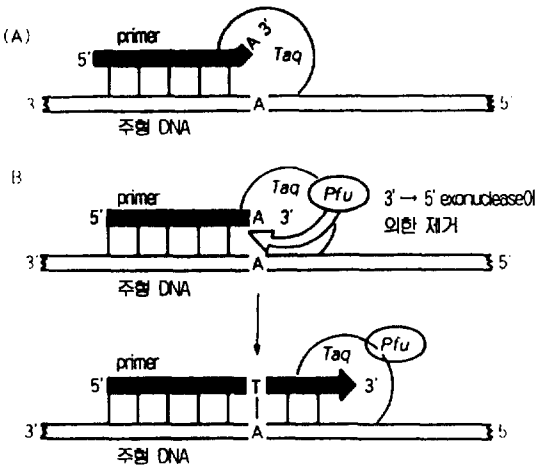


Fig. 2. Long PCR의 원리
(A) Taq DNA polymerase에 의한 PCR,
(B) Taq DNA polymerase에 3'→5' exonuclease를 갖는 polymerase를 공존시키는 long PCR.

가 대부분이다. long PCR은 PCR 시행과정에서 5'→3' exonuclease 활성을 지닌 Taq polymerase와 함께 3'→5' exonuclease 활성을 지닌 Pfu polymerase를 미량으로 첨가하여 긴 DNA의 합성이 이루어지도록 한 기법으로 10-20kbp까지의 DNA를 증폭시킬 수 있어 상동재조합 DNA(recombinant DNA) 합성에 응용되고 있다.

2. Hot start PCR

PCR을 시작할 때 온도가 Tm치 이하로 떨어지면 primer dimer 형성 및 비특이적인 PCR이 발생할 수 있다. 본기법의 원리는 첫번째 변성온도에 도달할 때까지 PCR의 구성 성분중의 하나를 제거하여 표적 DNA의 분리를 유발시킨 후에 모든 PCR 구성성분을 첨가하는 기법으로 일반적으로 Taq polymerase를 나중에 첨가하거나, 이에 대한 항체를 PCR시 첨가하는 기법이 사용된다.

3. RACE(rapid amplification of cDNA ends)

RACE란 cDNA 염기배열의 일부분만을 알고 있는 경우에 주변의 5' 혹은 3' 부위의 염기배열을 PCR로 증폭시켜 이부위의 염기배열을 확인하는 방법이다. 원리는 예를 들면 3' 말단부위의 염기배열을 알고자 할 때 미리 염기배열을 알고 있는 상류측 DNA로부터 고안한 primer와 polyA를 포함하고 제한효소

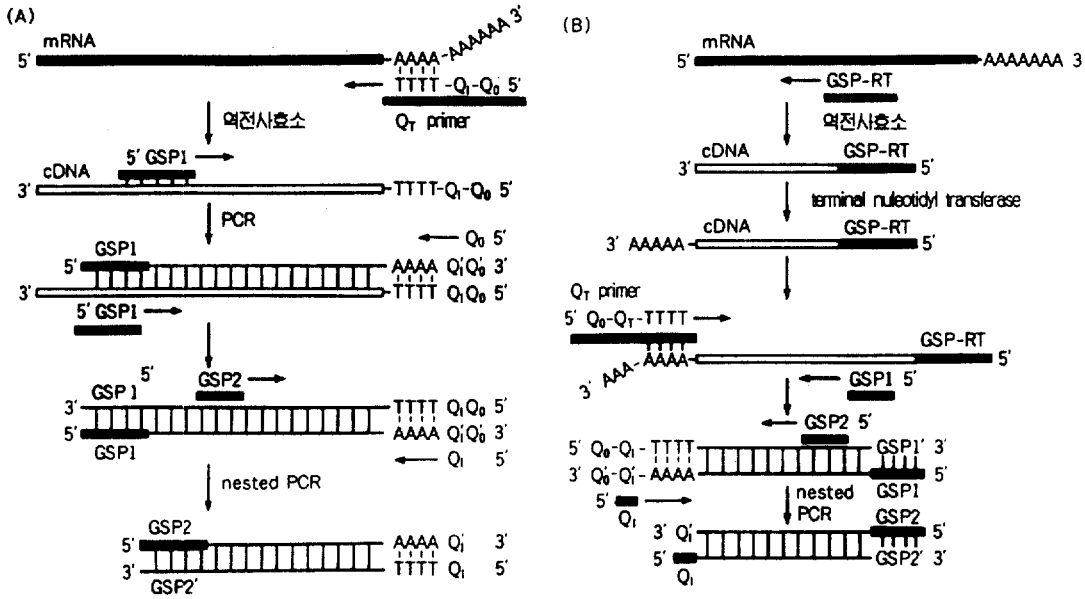


Fig. 3. RACE법에 의한 cDNA 말단의 증폭원리.
(A) cDNA 3' 말단의 증폭, (B) cDNA 5' 말단의 증폭 QT primer는 18 nucleotide의 Q0, 18 nucleotide의 QT(Q0의 3' 말단과 Q1의 5' 말단의 nucleotide는 공통)로 구성된 35 nucleotide의 Q0-Q1 배열중에 Hind Ⅲ, Pst Ⅰ, Xho Ⅰ의 인식배열이 들어 있다. GSP1, GSP2는 cDNA의 염기배열의 기지영역에 대응하는 유전자 특이적 primer. GSP1, GSP2는 cDNA의 기지의 염기배열 영역에 대응하는 유전자 특이적 primer. GST-RT는 역전사 반응용으 유전자 특이적 primer.

인식부위를 지니는 하류측 primer를 사용한다. 먼저 하류측 primer를 사용하여 3' 말단의 mRNA를 주형으로 역전사반응(reverse transcription)을 시행하여 1st strand cDNA를 합성한다. 그 후에 이 cDNA를 주형으로 기지영역의 상류측 DNA로부터 고안한 primer와 초기에 사용한 하류측 primer의 일부 염기배열로 구성된 하류측 primer를 사용하여 2차 PCR을 시행한다. 2차 PCR이 끝난 뒤 이들을 주형으로 하여 다시 nested PCR을 시행하면 3' 말단부위의 염기배열이 증폭된 DNA를 얻게 된다. 본기법의 원리를 요약하면 다음과 같다.

4. Nested PCR

목적하는 영역의 처음 PCR 산물을 주형으로 처음에 사용한 primer 보다 내측의 염기배열에서 고안한 새로운 primer를 사용하여 PCR을 시행하는 것을 nested PCR이라 한다. 일반적으로 2차 PCR은 1차 PCR에서 얻은 PCR 산물을 주형으로 내측의 primer를 사용하여 실시한다. 이과정에서 어느쪽이든 한쪽의 primer만을 내측의 primer로 사용하는 경우를

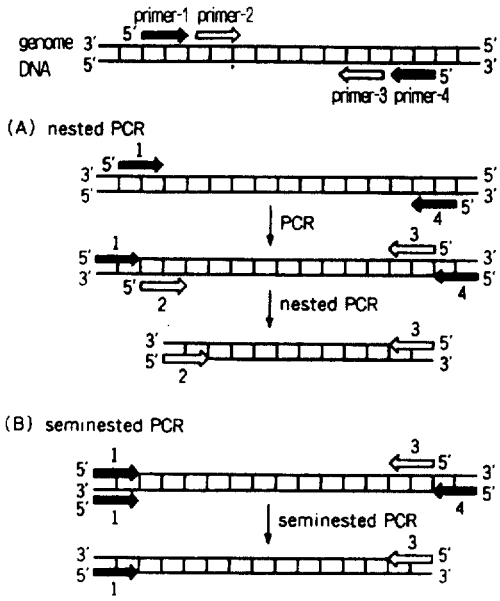


Fig. 4. Nested PCR, seminested PCR.

seminested PCR이라 하며, 이러한 기법은 목적하고자 하는 DNA 영역이외에서 비특이적으로 증폭되는

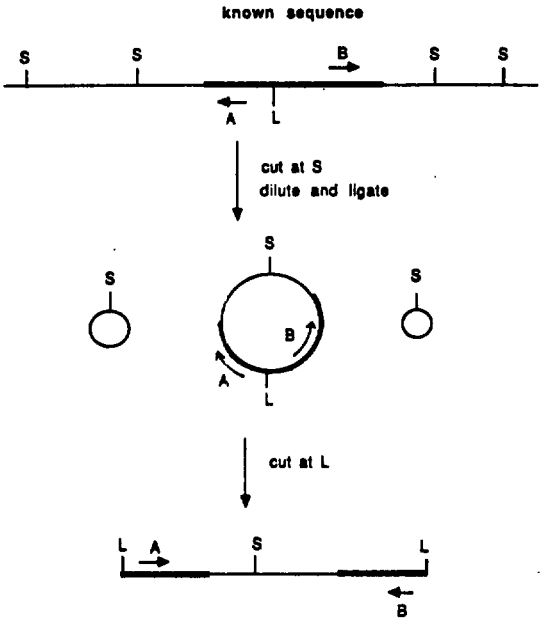


Fig. 5. Inverse PCR by circular permutation. A DNA strand with a segment of known sequence(heavy line) is cut with a restriction enzyme S, diluted and ligated to form circles. Circles containing the region of known sequence plus flanking DNA are linearized by cutting with a restriction enzyme which cuts at site L. Primers A and B(5'→3' orientation indicated by arrows) are then properly oriented to amplify flanking DNA.

DNA 산물을 제거함으로써 PCR 산물의 특이성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 본 기법은 검체의 DNA 순도가 떨어지거나, gene copy 수가 적은 유전자를 관찰하고자 하는 경우 유용하며 일반적인 PCR에 비해 약 1,000배 정도로 유전자를 관찰하는 예민도를 높일 수 있다.

5. Inverse PCR

이미 알고 있는 기지영역과 인접한 미지영역의 DNA의 염기배열을 알아내는 방법으로 우선 제한효소처리를 하여 기지영역으로부터 0.3-3kbp의 DNA 절편을 얻은 후 DNA를 circular form으로 만든다(inverse or inside-out PCR). 그 후 기지영역에서 고안한 primer(제한효소 전후 부위의 염기배열 사용)를 사용하여 PCR을 시행함으로써 미지영역의 DNA가 증폭된 circular DNA가 얻어지고, 그 후 다시 동일한 제한효소 처리를 하여 linear DNA를 만들어서

```
(A)        Q   L   N   A   T   L   N   K

(B)      CAG CTG AAC GCG ACG CTG AAC CAC
         CAA CTC AAT GCC ACC CTC AAT CAT
             CTA     GCA ACA CTA
             CTT     GCT ACT CTT
             TTG             TTG
             TTA             TTA

             C G     G       G     G
(C)    3'-GT  AI TT  CGI TGI  AI TT  GT-5'
             T A     A       A     A
```

Fig. 6. Design of highly degenerate oligonucleotides from peptide sequence data. (A) A segment of peptide sequence data from a tomato annexin shown in single letter code, (B) 'back-translation' of this peptide into all possible corresponding DNA codons, and (C) highly degenerate oligonucleotides designed from this data; note that the primer sequence in this example is complementary to the peptide coding sequence. Inosine has been incorporated at positions of fourfold redundancy. The potential number of sequences to which this oligonucleotide could hybridize are 8092. This primer was used with a second degenerate primer mix to generate the results shown in Fig. 6 The presence of residues such as serine, arginine, and leucine that have many possible codons is not a limitation to the design and successful utilization of such primers.

미지영역의 DNA 염기배열을 얻게 된다. 본기법의 원리를 요약하면 다음과 같다.

6. Degenerate PCR

일반적인 PCR은 이미 DNA 염기배열을 알고 있는 부위에서 primer를 고안하여 시행한다. 그러나 DNA의 염기배열이 밝혀지지 않은 유전자의 경우는 불가피하게 primer의 고안이 불가능한데 이러한 경우는 아미노산배열을 통해 각 아미노산에 해당되는 염기(한개의 아미노산에 3개의 핵산으로 구성)를 추정하여 PCR을 시행하게 된다. 일반적으로 동일한 아미노산이 coding하는 염기는 1종류 이상인 경우가 많으며 이러한 경우 primer의 염기배열은 다양하게 이루어질 수 있는데 이렇게 고안한 primer를 사용한 PCR을 degenerate PCR이라 한다.

7. Multiplex PCR

본기법은 한종류 이상의 primer pair를 한 개의

PCR tube내에서 동시에 시행하여 복수의 유전자를 동시에 증폭시키는 방법이다. 장점은 시료의 양을 최소한으로 줄일 수 있고 시료간의 cross contamination을 줄일 수 있으나 단점으로는 PCR tube내에 첨가되어 있는 여러 구성 성분들이 PCR 과정중에 경쟁적으로 소모될 수 있으므로 정량화작업에는 사용상의 문제점이 있다.

8. Reverse transcription(RT)-PCR

1) RT-PCR의 일반적인 개요

미량의 시료로부터 mRNA를 정량분석하고자 할 때 PCR의 예민도를 활용하는 기법으로 현재 임상에서 널리 이용되고 있다. RT-PCR은 RNA조제, 역전사효소반응(RT), PCR과정 등 총 3단계로 구성되며, RT-PCR의 최종 산물량의 결정은 시료로부터 RNA 회수율, RT 반응의 효율, PCR의 효율 및 시료내 DNA 혼입에 의한 증폭반응의 저해유무에 의해 결정된다. 역전사반응은 reverse transcriptase라는 효소에 의해 RNA dependent DNA polymerase 활성에 의해 mRNA를 주형으로 상보적인 cDNA를 합성하고(1st strand), 동시에 DNA dependent DNA polymerase 활성에 의해 cDNA를 주형으로 cDNA의 상보적인 DNA를 합성하게 된다(2nd strand). RT에 사용하는 효소는 크게 2종류로 AMV(avian myeloblastosis virus)유래의 효소와 MoMLV(molony murine leukemia virus)유래의 효소로 분류된다. AMV RTase는 상기 2개의 효소기능 이외에 mRNA : cDNA hybrid를 분해하는 RNase H 활성을 가지므로 긴 cDNA 합성을 할 수 없다는 단점이 있고, MoMLV RTase는 RNase 활성이 약하지만 반응온도가 37℃로 낮아 주형 RNA가 복잡한 2차구조를 지닐 경우 cDNA 형성에 문제가 있다.

2) RT에 사용되는 primer

크게 3종류로 oligo-dT primer, random 6 mer primer, 특정 염기배열에 특이적인 염기배열을 지닌 specific primer로 분류된다. Oligo-dT primer는 mRNA의 3' 말단에 존재하는 poly(A) tail과 결합하여 cDNA를 합성하는 것으로 RT의 효율성(efficiency)이 높다는 장점을 지니나 5' 말단부위에 존재하는 mRNA의 RT가 이루어지지 않을 가능성이 있으므로 신조직과 같이 사람으로부터 얻은 중요한 시료의 RT에는 문제가 있다. Random primer는 mRNA의 특정부위에 다발적으로 결합하여 mRNA를 역전사시키므로 RT의 효율성은 oligo-dT primer에 비해 떨어지나 5' 말단에 존재하는 mRNA 등도 역전사시킬 수 있다는 장점을 지니고 있다. Specific primer는 임상진단이나 정량적 RT-PCR 등의 경우에 관찰하고자 하는 특정 mRNA만을 증폭시키므로 이러한 경우에 사용된다.

3) RT-PCR 과정중 DNA 함입의 문제점

RNA의 RT 과정에서 시료내에 함유된 genomic DNA는 정량분석과정에서 문제를 일으킨다. 정량적 RT-PCR을 시행하고자 할 경우 시료내의 genomic DNA는 primer에 의해 동시에 증폭되므로 관찰하고자 하는 진정한 mRNA에서 유래된 cDNA의 증폭과정에서 상호 경쟁적으로 작용하여 cDNA PCR에 문제를 일으킬 수 있다. 이러한 문제점을 극복하는 방법으로 primer의 고안과정에서 서로 다른 exon 부위를 사용할 경우 intron이 포함된 genomic DNA의 경우 PCR 증폭산물의 길이가 cDNA PCR에 의한 증폭산물의 길이보다 큼으로써 전기영동상에서 쉽게 구분할 수 있다.

PCR을 사용한 mRNA의 정량분석(정량적 PCR)

1. 정량적 PCR의 일반적 개요

중합효소 연쇄반응은 소량의 세포로부터 특정 유전자의 존재유무를 검색하는 과정, 특정 유전자의 결함(deletion)이나 돌연변이(point mutation)의 확인과 유전자의 클로닝 및 특정 유전자의 발현 정도를 평가하는데 사용되고 있다. 유전자의 발현정도를 관찰하는 방법으로는 in situ hybridization, northern blot analysis, nuclease protection assay 및 PCR 기법 등이 있으며 전자의 3가지 방법은 검체내에 관찰하고자 하는 유전자의 발현이 아주 강하거나 혹은 다량의 조직을 필요로 하는 단점이 있으며 일반적인 PCR 기법은 검사 자체가 상당히 예민하고 소량의 세포로부터도 유전자 발현을 관찰할 수 있는 장점은 있으나 정량분석이 정확치 않다는 문제가 있다. 따라서 이러한 단점을 보완하고 소량의 조직으로부터 유전자 발현을 측정하는 새로운 분자생물학적 기법의 발달은 관찰하고자 하는 검체가 아주 소량인 경우 필수적 요건으로 1980년대 말에 새롭게 소개된 경쟁적 중합효소 연쇄반응(competitive PCR)은 이러한 문제점을

해결할 수 있는 새로운 기법으로 대두되고 있다.

2. RT-PCR을 이용한 mRNA 정량기법

RT-PCR을 이용한 mRNA의 정량시 문제점으로는 mRNA의 추출 효율과 역전사효소에 의한 역전사 반응의 효율성(RT efficiency)의 차이, PCR 과정에서의 증폭효율의 차이, PCR 반응 자체의 특성인 exponential and plateau effect 등을 들 수 있다. 일반적으로 PCR에 의한 PCR 산물의 수확은 $N=No \times 2^n \times (1+E)^n (0 \leq E \leq 1)$ 으로 표시된다. E는 PCR의

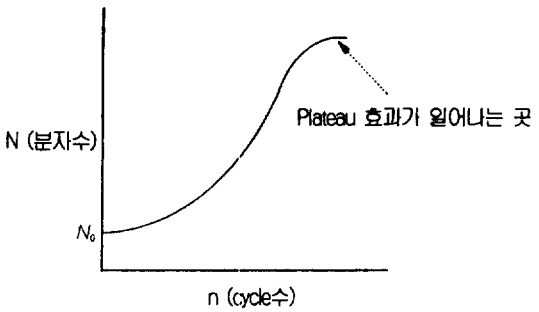


Fig. 7. PCR 반응에서의 exponential and plateau 효과. 실제로 PCR을 해 보면 증폭산물의 양이 처음에는 cycle수에 비례하여 대수적으로 증가하지만 증폭산물의 양이 어느 한도를 넘으면 증폭효율이 떨어지면서 최종적으로는 증폭하지 않게 된다. 이런 현상을 plateau 효과라고 한다.

증폭효율로서 사용하는 기질 DNA의 순도 및 염기배열 상태, primer의 종류, 증폭되는 DNA의 크기, 반응액내에 존재하는 각종 물질의 상태 등에 의해 결정된다. PCR은 기하급수적인 반응이므로 E의 차가 아주 작아도 최종 산물의 양에는 큰 차이를 유발시키므로 주의하여야 한다.

3. PCR 반응의 exponential & plateau 효과

PCR을 시행할 경우 증폭산물의 양은 처음에는 대수적으로 증가(exponential) 하지만, 증폭산물의 양이 어느 정도를 넘으면 증가가 저하되어 최종적으로는 더 이상 증폭이 일어나지 않는데 이를 plateau 효과라고 한다.

4. PCR을 사용한 유전자 발현의 정량분석

PCR을 통한 정량분석의 기본적인 개념은 검체내에 존재하는 mRNA가 역전사반응에 의해 cDNA로 전환되고 이를 주형으로 다시 PCR을 시행하여 PCR 산물의 양을 비교하는 것으로 검체내의 mRNA 양은 cDNA와 비례관계가 있으며, 이를 주형으로 한 PCR 산물은 cDNA 양과 비례한다는 것에 기초한다. 그러나 이미 기술한 바와 같이 PCR 산물의 증폭은 특징적으로 exponential & plateau 현상이 존재하므로 mRNA의 양과 cDNA의 양 및 PCR 산물의 양간에 정비례 관계가 있는 것은 아니다. 따라서 특정 유전

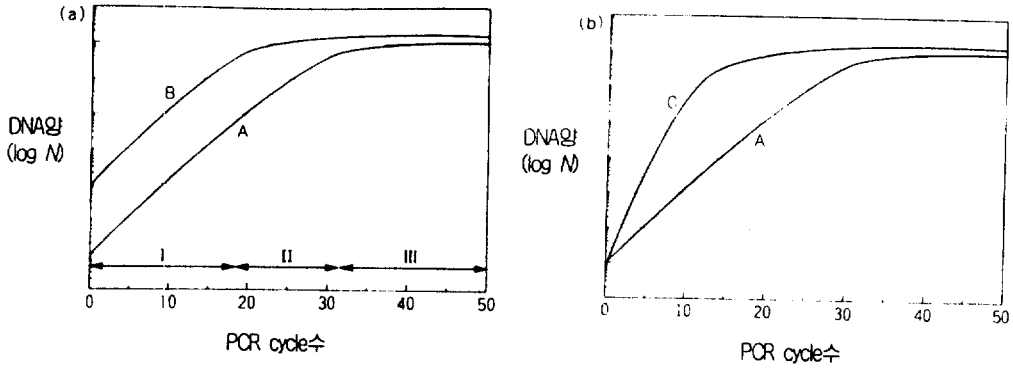


Fig. 8. 반정량적 PCR의 원리(semiquatitative RT-PCR).
***(a)** 내부표준물질에서 유래하는 증폭산물양(A)과, 목적 mRNA에서 유래하는 증폭산물양(B)의 변화를 PCR의 cycle수별로 나타내었다. 영역 I 은 A, B 모두 plateau에 도달하지 않았으므로 정량이 가능하다. 영역 II는 A가 plateau에 도달하지 않았으나 B가 도달했기 때문에 상호 비교가 안되므로 정량이 불가능하다. 영역III은 A, B 모두 plateau에 도달했기 때문에 정량이 불가능하다. **(b)** 내부표준물질에서 유래하는 증폭산물양(A)과 목적 mRNA에서 유래하는 증폭산물양(C)의 변화를 PCR의 cycle수별로 나타내었다. A와 C는 증폭효율이 다르기 때문에 상호비교가 안되므로 정량할 수 없다.*

자의 발현을 정량분석 하기 위해서는 PCR 산물의 양이 exponential phase(log phase) 내에 있음을 확인하고, 동시에 내부표준물질로 많이 사용하는 β-actin, GAPDH 등의 PCR 산물도 역시 동일한 exponential phase에 있음을 확인하여야 한다. 이를 위해 특정 유전자에 대한 PCR 조건을 달리하여(cDNA의 양 혹은 PCR cycle의 수) PCR을 시행한 후 각각의 조건에서 얻어지는 PCR 산물의 양을 계산함으로써 PCR과정이 log phase에 해당하는지를 확인하게 되는데 이러한 과정을 PCR 조건의 optimization이라고 한다. 이러한 방법으로 관찰하고자 하는 유전자와 내부표준물질을 사용하여 유전자를 정량분석하는 기법을 반정량적 PCR(semiquantitative PCR)이라고 한다.

이러한 반정량적 PCR의 민감도를 높이는 방법으로는 PCR에 사용하는 primer 혹은 nucleotide를 방사성 동위원소를 사용함으로써 PCR 최종산물에 방사성 활성도를 지니게 한 후 이들의 방사능의 정도를 측정하는 방법이 있다. 한편 이러한 복잡한 과정(PCR의 조건을 설정하는 과정)을 생략하고 정량적 분석이 가능한 방법으로 경쟁적 중합효소 연쇄반응(competitive PCR)이 있다.

본 기법은 일반적인 PCR과는 달리 한 실험관 내에 이미 알고 있는 농도의 mutant template를 넣어 검체내의 DNA와 같이 동시에 증폭시킴으로써 상호 경쟁적으로 DNA를 증량시키는 것으로 검체내의 DNA의 정량분석은 mutant template와 검체의 DNA가 동시에 equimolar amplification 된다는 특성을 통하여 분석이 가능하다. 따라서 이러한 competitive PCR을 시행하기 위해서는 mutant template가 필수적으로 현재 널리 쓰이는 mutant template는 크게 3종류로 genomic DNA, cDNA mutant, cRNA mutant 등이 있다. Genomic DNA는 특정 유전자의 증폭을 위해 양 primer를 제작하는 과정에서 100-200bp 크기의 intron을 포함하게 2개의 exon부위에서 각각의 5' primer와 3' primer를 설정함으로써 DNA의 증폭이 끝난후에 검체내의 DNA가 genomic DNA에 비해 100-200bp 정도의 작은 band를 보임으로써 두 개의 band를 구분할 수 있다. 그러나 이방법은 DNA 증폭의 효율성(efficiency)이 genomic DNA와 검체내 DNA간에 차이가 날 수 있다는 단점이 있으므로 널리 사용되지는 않고 있다.

현재 가장 많이 쓰이는 방법은 cDNA mutant를 사용하는 것인데 이는 site directed mutagenesis를 일으켜서 검사하고자 하는 특정 DNA와 같은 핵산의 배열을 보이나 크기를 보다 길거나 짧게 만들어 DNA 증폭이 끝난후 겔전기영동상 band의 크기로 구별을 하거나 혹은 검체내 DNA의 특정 뉴클레오타이드를 다른 뉴클레오타이드로 바꾸어서 새로운 제한효소(restriction enzyme)가 작용하는 부위를 발생시켜 DNA 증폭이 끝난후 제한효소 처리를 함으로써 검체 DNA와 mutant DNA를 구분할 수 있게 하는 방법이다. 그러나 이방법은 mutagenesis를 일으켜야 한다는 기술상의 문제점이 있고 각 유전자에 대한 primer 설정시에 여러번의 재시도(trial and error)를 요구하는 단점이 있으나 현재로선 가장 유용한 방법으로 사용되고 있다. 한편 최근들어 cRNA mutant를 사용한 방법이 보고되어 있고 이는 인위적으로 RNA를 제작한 후 reverse transcription 과정부터 mutant RNA와 검체내 RNA를 경쟁시켜 PCR을 시행하는 것인데 본 방법은 RT의 효율성을 따로 측정할 필요가 없이 mutant 와 검체내 RNA가 같은 효율로 RT된다는 장점은 있으나 RNA mutant의 정량분석이 힘들다는 문제가 있다.

Competitive PCR에서는 mutant cDNA가 보편화된 방법으로 널리 사용되고 있으며, 기본원리는 mutant DNA와 검체내 DNA가 동시에 증폭된다는 특성을 사용하는 것으로 총 6개의 시험관에 동량의 검체 DNA를 넣고 이미 농도를 알고 있는 mutant DNA를 서로 다른 농도로 각 시험관 내에 추가하여 PCR을 시행하게 된다. PCR이 끝난 검체는 겔전기영동을 시행하여 크기가 다른 2개의 band를 얻게 되

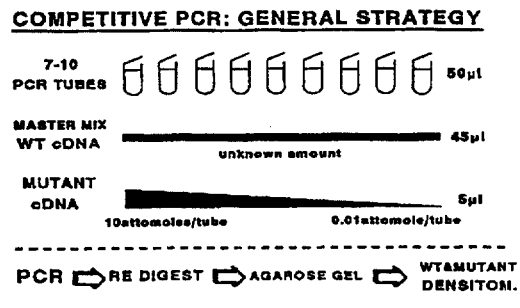


Fig. 9. 정량적 PCR의 원리(Competitive PCR).

며(즉 mutant DNA band와 검체내 DNA band) 두 band의 강도를 densitometer로 정량분석하여 서로 유사한 band 강도를 보이는 mutant DNA 양을 결정함으로써 검체내 DNA의 양을 결정하게 된다. Competitive PCR은 관찰하고자 하는 검체의 양이 소량으로 일반적인 northern blot 기법으로는 유전자 발현을 관찰하기 힘든 신조직검사의 시료 등에서 유용하게 사용될 수 있는 기법으로 현재 여러 임상영역에서 환자로부터 채취한 조직을 이용하고자 하는 시도가 활발하다.

PCR의 임상적 응용

PCR은 임상적으로 검체로 부터 특정 유전자의 검출, deletion 및 mutation과 같은 DNA 변이의 검출, 특정 유전자의 cloning과 유전자 발현에 대한 정량분석 등에 사용된다. 각각의 목적에 따라 사용되는 PCR 기법은 전자에 기술한 바와 같이 다양하게 적용할 수 있다. PCR 과정의 특수성으로 인해 현재 PCR 기법은 임상적으로 극소량의 검체내에 존재하는 DNA 혹은 RNA의 분석과정에서 필수적인 기법이라 할 수 있다. 환자의 혈액, 소변 및 신장조직검사를 통해 얻은 시료로부터 각종 유전자의 존재유무와 변이, RNA 함량을 비교 분석할 수 있는 기법으로 정량분석 기법은 이미 기술한 바와 같으며 여기서는 주로 변이 검출기법에 대하여 기술하고자 한다.

1. PCR에 의한 특정영역의 변이 검출

1) PCR-SSOP 기법

본 기법은 HLA 항원을 coding하는 유전자처럼 염색체상에 존재하는 특정유전자에 고도의 다형성이 존재할 경우 특정 유전자에 특이적인 oligonucleotide probe(SSOP)를 합성한 후 이것을 nylon filter에 고정한 PCR산물에 hybridization 함으로써 특정 유전자에 대한 다형성을 검출하는 기법으로 현재 임상에서는 HLA의 DNA typing 등에 사용되고 있다.

2) PCR-DDGE
(denaturing gradient gel electrophoresis)

이 방법은 전기영동용겔의 제작과정에서 변성제 농도의 차이를 둔 후 PCR산물을 전기영동하는 방법으로 기본원리는 DNA 상의 1염기치환 및 수십 염기쌍의 변화를 높은 효율로 검출하는 방법이다.

분석하고자 하는 DNA 서열을 PCR로 증폭시킨 후 변성제 농도기울기겔을 통해 전기영동을 시행함으로써 DNA상의 변이유무를 판단할 수 있다. 기본원리는 DNA는 온도상승에 따라 2중 나선구조가 부분융해를 거쳐 완전히 분리된 single strand로 전환된다.

일반적으로 20-300개의 염기쌍이 비교적 좁은 온도범위에서 2중 나선에서 단일 나선구조로 변화되는 용해온도는 염기서열에 의존한다. DNA 분자의 구조상의 변화는 polyacrylamide gel 전기영동에서 DNA 분자의 이동속도의 차이를 유발한다. 즉 일부에서는 2중 나선구조를 취하고 일부에서는 단일 나선구조를 지녀 해리된 DNA 분자의 이동속도는 완전한 2중 나선구조의 DNA에 비해 느려진다. DNA 구조내의 작은 변이는 변이부위의 DNA의 용해온도를 변화시키고, 용해온도가 낮은 염기서열을 지닌 DNA 절편은 높은 온도의 DNA에 비해 낮은 변성제 농도에서 부분해리되고 이동도가 현저하게 감소되므로 변이의 유무에 의해 DNA 단편의 차이가 유발된다.

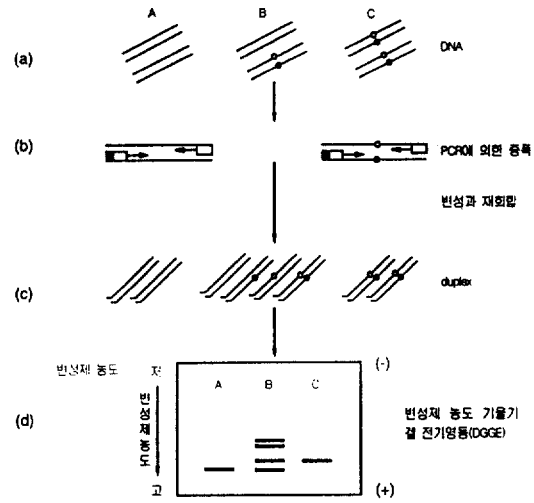


Fig. 10. PCR 증폭 DNA fragment의 PCR-DDGE의 원리. (a) A : 정상형 동형접합 DNA, B : 정상형 및 변이형의 이형접합 DNA, C : 변이형 동형접합 DNA ●, ○ : DNA상의 변이(치환, 결실, 삽입 등), (b) ■→ : 5'측 primer(흑색부분은 GC cramp를 나타낸다. ←▭ 3'측 primer, (c) 정상형 homoduplex, 두 종류의 heteroduplex, 변이형 homoduplex, 횡선부분은 GC cramp를 나타낸다. (d) 평행 DGGE 패턴의 모식도; (-)(+)는 음극, 양극을 겔의 좌측화살표는 변성제 농도의 증가방향을 나타낸다.

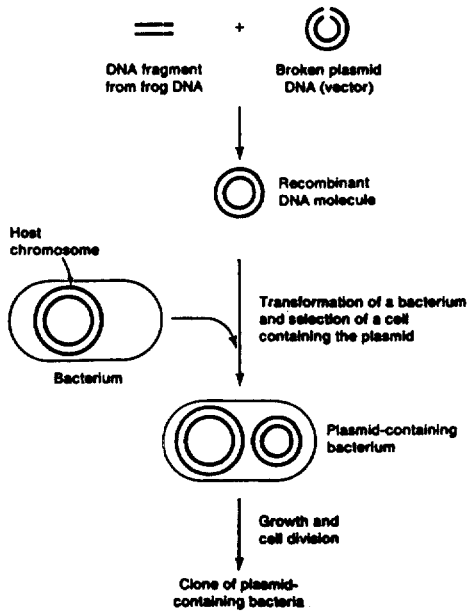


Fig. 11. An example cloning. A fragment of frog DNA is joined to a cleaved plasmid vector. The hybrid lasmid transforms a bacterium. Henceforth, frog DNA is carried to all progeny bacteria by replication of the plasmid.

3) PCR-RFLP 기법

RFLP란 특정제한 효소로 DNA를 절단시킬 경우 DNA 염기서열에 개체간의 차이가 존재하므로 이에 따라 제한효소 절단 DNA 단편의 길이가 달라지는 것을 의미한다.

RFLP 기법은 유전성 질환의 원인유전자를 동정하는 과정, 악성종양과 연관된 유전자를 밝히는 과정 등 현재 널리 임상에서 사용하고 있다. 따라서 본기법은 소량의 검체로 부터 관찰하고자 하는 DNA 영역을 PCR을 통해 증폭시킨 후 RFLP과정을 시행하여 염색체 혹은 DNA 구조의 변이의 존재유무를 파악하는 기법이라 하겠다.

2. PCR을 이용한 gene cloning

1) Cloning의 일반적인 개요

DNA cloning이란 관심있는 유전자를 함유하는 DNA 혹은 RNA 절편(fragment)을 선택적으로 다량으로 증폭시켜 분리하는 과정을 의미한다. 일반적인 cloning 기법은 염색체 DNA를 제한효소 처리한 후 일부 DNA를 vector(후에 설명함) 내에 삽입시켜 증

Table 2. Some Restriction Endonucleases and Their Cleavage Sites

Microorganism	Name of enzyme	Target sequence and cleavage sites
Generates cohesive ends		
Esherichia coli RY13	EcoRI	G↓A A|T T C C T T|A A↑G
Bacillus amyloliquefaciens H	BamH I	G↓G A|T C C C C T|A G G
Bacillus globigii	Bgl II	A↓G A|T C T T C T|A G↑A
Haemophilus aegyptius	Hae II	Pu G C|G C ↓Py Py↑C G|C G Pu
Haemophilus influenza Rd	Hind III	A ↓A G|C T T T T C|G A↑A
Providencia stuartii	Pst I	C T G|C A↓G G↑A C|G T C
Streptomyces albus G	Sal I	G↓T C|G A C C A G|C T↑G
Xanthomonas badrii	Xba I	T↓C T|A G A A G A|T C↑T
Thermus aquaticus	Taq I	T ↓C|G A A G|C↑ T
Generates flush ends		↓
Brevibacterium albidum	Bal I	T G G|C C A A C C|G G T ↑ ↓
Haemophilus aegyptius	Hae I	A G G|C C T T C C|G G A ↑ ↓
Serratia marcescens	Sma I	C C C|G G G G G G|C C C ↑

Note : The vertical dashed line indicates the axis of dyad symmetry in each sequence. Arrows indicate the sites of cutting. The enzyme TaqI yields cohesive ends consisting of two nucleotides, whereas the cohesive ends produced by the other enzymes contain four nucleotides. The enzyme HaeI recognizes the sequence GGCC whether the adjacet base pair is A · T or T · A, as long as dyad symmetry is retained. Pu and Py refer to any purine and pyrimidine, respectively.

폭시키는 방법(genomic DNA clone)과 mRNA로부터 cDNA를 형성한 후 이를 제한 효소처리 하여 동일한 기법으로 증폭시키는 방법(cDNA clone) 및 PCR을 사용하여 이미 알고 있는 염기배열의 일부위를 다량으로 증폭시키는 3가지 방법이 있다. 전자의 2가지 방법은 고식적인 기법으로 증폭시키고자 하는 DNA fragment를 본인 스스로 증식할 수 있는 개체의 유전자(DNA genome of self-replicating genetic element)에 삽입시킨 후 관심있는 유전자를 다량으로 증폭시키는 기법으로 recombinant DNA technology의 일종이다. 흔히 본인 스스로 증폭 가능한 개체로서 관찰하고자 하는 유전자가 삽입되는 것을 vector 혹은 cloning vehicle이라 부르며, 현재 사용되는 vector로는 plasmid, virus, phage 등이 있다. 이들은 각각 독특한 유전적 특징을 지니고 있으나 공통적인 특징으로는 ㉮ 자신이 스스로 증식할 수 있다. ㉯ vector DNA를 특정 세포에 삽입시킬 수 있는 기능이 있다. ㉰ 세포내로 삽입된 후(transfection) 이들을 구분할 수 있는 특징을 지닌다(예를 들면 plasmid pSC101에는 tetracycline이라는 항생제에 대한 내성을 지니고 있어 세균내로 transfection 된 후에 tetracycline이 함유된 배지에서 균배양을 할 경우 성공적인 transfection이 일어난 세균은 지속적으로 증식하나, transfection이 일어나지 않은 세균은 사망한다). 예를 들어 vector에 의해 한개의 virus 세포가 transfection될 경우 왕성한 증식능을 지닌 virus에 의해 하루내에 관련 유전자를 함유한 1,012개의 세포가 증식되어 다량의 유전자를 얻게 된다. 반면에 PCR cloning 기법은 이러한 일련의 복잡한 과정이 없이 단시간 내에 관찰하고자 하는 특정 DNA fragment를 다량으로 증폭시킬 수 있다는 장점이 있다. 다음의 도표 및 그림은 cloning의 일반원리와 이에 사용되는 vector 및 제한효소를 나타낸 것이다.

2) PCR을 이용한 gene cloning

PCR의 특성을 이용함으로써 single copy gene fragment를 다량으로 증폭시켜 subcloning 과정을 생략한 채로 직접 plasmid로 직접적인 cloning이 가능하다. 일반적인 gene cloning 과정과 달리 본기법은 cloning 하고자 하는 DNA의 상하류 염기배열(flanking region sequence)을 알아야 한다는 단점은 있으나 단기간에 모든 과정을 시행할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 여기서는 PCR을 사용한 cloning 기법을 간단히 기술한다.

(1) Primer의 설계

일반적으로 primer 염기배열 내부에 제한효소 인식배열을 부가하는데 여러 종류의 제한 효소중 blunt end(DNA의 정중앙을 절단하는 경우)를 형성하는 것보다는 cohesive end molecule(DNA를 절단하되 정중앙을 피하여 대칭적으로 절단하는 경우)을 형성하는 제한효소 인식배열을 부가한다. Primer 설계시 주의하여야 할 점은 다음과 같다.

㉠ Primer의 3' 부위는 target sequence와 적어도 25-30bp는 상호 보합적인 염기배열을 지녀야 한다. 따라서 가급적 제한 효소 인식부위는 primer의 5' 위치에 설계한다. 일반적인 PCR과정에서 PCR product의 특이성은 annealing temp를 올려줌으로써 이루어지고 이과정에서 primer의 3' 염기배열의 target sequence와의 상호 보합성의 정도는 대단히 중요하다.

㉡ 제한효소 인지부위의 설정이 primer의 3' 부위를 피할 수 없을 경우에는 가급적 target sequence

Table 3. Some Cloning Vehicles in Use at Present

Designation	Genotype or characteristics
Plasmid	
pSC101	*tet-r*
ColE1	*immE1*
pBR322	*tet-r amp-r*
pUC8/9	*amp-r lac*$^+$
pHC79	*amp-r tet-rλcos*
Phage	
λgt4 · λB	Can lysogenize; isthermally inducible
λ-Charon	*lacZ*$^+$
λ△z1	Insertion occurs in *lacZ* gene
M13mp7	Contains *lacP*, *lacO*, and *lacZ*; single-stranded DNA; useful for sequencing
Virus	
SV40	Virus infects animal cells. Maximum size of added DNA is no more than 3×10^6molecular weight units.

Abbreviations : tet, tetracycline; imm, immunity; amp, ampicillin; lacP, lac promoter; lacO, lat operator; lacZ, gene for β-galactosidase; cos, joined cohesive sites of phageλ

로부터 적어도 10-12bp 떨어진 곳에 설정한다.

㉢ 일부의 제한효소는 PCR product의 말단에 제한 효소인식배열이 존재할 경우 이들의 활성도에 문제가 있을 수 있으므로 가급적 제한효소 인식배열 주위로 적어도 6개 이상의 nucleotide를 두게 설계한다.

㉣ 양측 primer 간에 3' 말단부위의 상보성이 없게 주의하고 양 primer의 Tm 값은 비슷하며 primer의 GC 함량은 50% 전후가 되게 한다.

(2) PCR 조건의 선정

PCR cycle의 수는 경험적으로 여러번의 시행착오를 요하고, 일반적으로 25 cycle부터 시작하여 점차 횟수를 증가시킨다. 시작 당시 세포의 수가 작을 경우는 횟수를 증가시킬 필요가 있으나 지나치게 cycle 수를 늘릴 경우 비특이적인 DNA band가 증가함으로 추후 cloning 과정에 방해가 될 수 있으므로 주의를 요한다. Annealing temp는 가급적 높게 설정할수록 비특이적인 band의 형성을 방지하고 반응 특이성을 높일 수 있으나 primer 설계시 기존 주형의 DNA와 mismatched nucleotide가 많은 경우는 온도를 보다 낮게 설정하여야 한다. 또한 PCR의 특이성을 높이기 위해 hot start PCR을 시행할 수도 있다. 일반적인 PCR의 신장시간(extension time)은 PCR 산물 1kbp에 1분이 소요된다는 원칙에 근거하여 시간을 설정한다.

참 고 문 헌

1) Bloch W : A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* **30**:2735-2747, 1991
2) Moritama T, Murphy HR, Martin BM, Perez AG : Detection of specific mRNAs in single nephron segments by use of the polymerase chain reaction. *Am J Physiol* **258**:1470-1474, 1990
3) Ausubel FM, Brent R, Kingston RF, Moore DD, Seidman JA : Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, 1987
4) Berger SL, Kimmel AR : Guide to molecular cloning techniques. *Methods Enzymol* **152**:215-304, 1987
5) Wang AM, Mark DF : Quantitative PCR. PCR protocols : A guide to methods and applications, 70-75, 1990
6) Gilliland G, Perrin S, Bunn HF : Competitive PCR for quantitation of mRNA. PCR protocols : A guide to methods and applications, 60-69, 1990
7) Striker LJ, Peten EE, Yang CW, Striker GE : Molecular biology approach to human kidney biopsies. *Molecular Nephrology* 771-782, 1996