

RT-PCR법 – II. 역전사효소 반응

(주)다인바이오 연구소

현재 분자생물학분야에서 RNA 수준의 gene expression (유전자 발현)과 cDNA (complementary DNA) cloning에 널리 이용되고 있는 RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)은 생명정보가 DNA에서 RNA로 전달된다는 분자생물학 분야의 Central Dogma의 예외를 증명하는 reverse transcriptase (역전사 효소, RT)의 발견에서부터 기원한다¹⁾. 1960년대, Howard Temin 은 positive strand RNA retrovirus가 세포에 감염된 후 transform되는 현상을 설명하기 위해서 RNA retrovirus가 세포에 감염되면 이 RNA 바이러스를 주형 (template)으로 하여 RNA virus와 상보적인 DNA (cDNA)가 만들어지고, 이 DNA를 template로 하여 RNA virus가 증식을 한다는 “provirus 가설”을 처음으로 주장하였다. 이 가설에서 Temin은 RNA에서 DNA가 합성되기 위해서는 RNA염기서열에 의존적인 DNA polymerase (중합효소)인 RT의 존재를 예언하였다. 이후, Temin은 감히 당대의 “Central Dogma”를 거스른 대가로 동료 과학자들로부터 엄청난 비난을 받았지만, 1970년에 David Baltimore와 각각 독립적으로 retrovirus내에 RT가 존재함을 보여줌으로써 “provirus hypothesis”를 입증하였고 이 발견으로 둘은 1975년 노벨 생리의학상까지 수상하였다. 이 중요한 발견이 실제 분자생물학 실험 분야에 기여하게 된 한 계기는 이 RT에 ribonuclease H 활성 (reverse transcription이 종료된 후 생긴 RNA-cDNA hybrid 상태에서 RNA만을 분해하여 결국 cDNA만 남게 함)이 있음이 알려지면서부터 이 발견을 기반으로 RT가 RNA를 template로 하여 cDNA를 cloning 할 수 있는 방법으로 쓰일 수 있는 가능성이 제시되었다.

PCR이 발견되기 전까지는 “cDNA library” 라는 방법으로 cDNA를 cloning 했고, PCR 이후로는 RT와 PCR이 결합된 방법인 RT-PCR이 cDNA cloning에 널리 이용되고 있다. RT-PCR은 cDNA의 cloning 이외에도 특정 유전자의 expression 수준을 연구할 때에도 중요하게 쓰일 수 있다. 특히, 최근 들어서는 “Real time RT-PCR” 이라는 새로운 기술이 일반화되어 상당히 정밀하게 differential gene expression 수준을 연구할 수 있게 되었다. 이 Real time RT-PCR은 유전자들의 differential expression 수준을 보기 위한 cDNA microarray 실험에서 나온 결과를 다시 한번 확인할 때 쓰일 수 있다. 보통 cDNA microarray 실험에 쓰이는 chip (또는 slide)에는 10,000개 이상의 유전자들이 심어 지는데, 이 실험에서 결과로 얻어진 differentially expressed된 유전자들의 false positive 여부를 확인할 때 쓰인다.

1. 역전사효소 반응

(1) 역전사효소 (Reverse Transcriptase; RTase)

mRNA 자체는 PCR의 기질이 될 수 없다. 따라서 RT반응으로 mRNA로부터 cDNA를 합성할 필요가 있다. RTase는 RNA-dependent DNA polymerase 활성을 가져 mRNA를 주형으로 상보적인 cDNA를 합성 (1st strand 합성)하고 동시에 DNA-dependent DNA polymerase 활성을 가져 합성된 cDNA의 complementary strand를 합성할 수 있다 (2nd strand 합성). RT반응에는 통상 avian myeloblastosis virus (AMV) 유래와 molony murine leukemia virus (MoMLV) 유래의 2종류 RTase가 이용된다. AMV 유래 RTase는 상기의 2개 활성뿐만 아니라 mRNA: cDNA hybrid를 강력하게 분해하는 RNase H 활성을 가지므로, 1st strand 합성이 저해되어 긴 cDNA를 합성할 수 없다는 단점을 가진다. 한편 MoMLV 유래 RTase는 RNase H 활성이 비교적 약하므로 이론적으로는 긴 DNA 합성이 가능하지만, 반응의 최적온도가 37°C로 AMV 유래 RTase의 42°C보다 낮으므로 주형 mRNA가 복잡한 고차구조를 가지는 경우에는

cDNA의 신장반응이 저해된다. 이와 같이 AMV 유래 RTase와 MoMLV 유래 RTase는 모두 일장일단을 지나 필자는 MoMLV 유래 RTase를 선호한다. 또 두 효소는 최적 pH, 최적 염농도 등에서도 차이가 있으므로 주의해야 한다. 최근 Myers 등은 RTase 활성화와 PCR 활성 모두를 가지는 Tth polymerase를 보고 하였다²⁾. RT-PCR 반응을 1개의 효소로 수행하면 RT반응을 고온에서 할 수 있으므로 주형 mRNA의 고차 구조의 영향을 줄일 수 있다는 점 등의 장점이 있으며 종래의 방법보다 감도가 약 100배 더 증가한다는 보고도 있다. 그러나 RT반응에 Mn^{2+} 이온을 필요로 함에 따라 반응의 정확도 (fidelity)가 낮아지는 것이 단점이다.

(2) RT반응에 사용하는 Primer

RT반응의 primer는 목적에 따라 ① oligo(dT)12~18 primer, ② 특정 염기서열에 대한 상보적인 primer, ③ random 6 mer primer 등의 3종류를 이용할 수 있다. Full-length cDNA를 얻고자 하는 경우는 oligo(dT) 12~18 primer가 유용하다. Target mRNA의 양이 극히 적을 것으로 예상되는 경우에도 oligo(dT) 12~18 primer는 동일 mRNA분자의 poly(A)+의 다양한 부위와 결합하여 복수의 신장반응을 개시할 수 있다. 또 RT-PCR법에 기초한 DDA (differential display analysis)를 할 때는 RT 산물을 일차 정제 분획하는 목적으로 oligo(dT) 12~18 primer의 3'말단에 A, G, C, (T)를 다양한 조합으로 2염기 정도 붙인 primer를 이용한다.

이에 반해 임상진단이나 정량적 RT-PCR법 등의 경우에는 보다 선택적으로 특정의 염기서열을 증폭할 필요가 있으므로 특정염기 서열에 대한 상보적인 primer를 이용한다. 필자 등은 20염기 정도의 길이를 가진 primer를 이용하여 양호한 결과를 얻었다. 또 random 6 mer primer는 mRNA의 5'말단 등과 같이 oligo(dT) 12~18 primer를 이용한 RT 반응으로 신장되기 힘든 영역의 해석이나 임상진단에 있어 target 으로 하는 염기서열이 짧아야 좋은 경우 등에 자주 이용된다.

(3) DNA의 혼입에 대한 대책

미량의 mRNA를 검출하는 경우 또는 정량적인 해석을 하는 경우에 가장 큰 문제점은 시료에 genome DNA가 혼입되는 것이다. 일반적으로 2개의 primer를 다른 exon상의 염기서열과 상보적으로 설정하면 설사 혼입한 genome DNA가 cDNA와 함께 PCR의 주형으로 작용하더라도 genome DNA의 경우는 intron도 동시에 증폭되므로 단편의 길이가 다른 mRNA 유래의 RT-PCR 산물과 구별할 수 있고, genome DNA 유래의 intron을 함유하는 단편은 cDNA 유래의 단편보다 길기 때문에 증폭효율이 낮을 것으로 예상된다. 그러나 genome DNA 유래의 단편이 원하는 cDNA 유래의 단편과 길항적으로 증폭하므로 반응의 정량성에 장애가 된다. 한편 intron을 결실한 유전자나 pseudo 유전자가 존재하는 경우에는 혼입한 genome DNA 유래의 단편과 mRNA 유래 단편의 길이 차이를 구별할 수 없다. 따라서 RNA 용액에 DNase 처리하여 혼입한 genome DNA를 완전히 제거할 필요가 있다.

(4) 방법

A. 준비

- Reverse Transcriptase
- RNase Inhibitor

- 10× RT buffer

750 mM KCl
500 mM Tris-HCl(pH8.3)
30 mM MgCl ₂

B. RNA 시료의 deoxyribonuclease(DNase) 처리³⁾

- ① 아래의 용액을 혼합한다.

Total RNA(20 μg)	16.0 μl
10X DNase buffer	2.0 μl
RNase Inhibitor	1.0 μl
<u>DNase(RNase free)</u>	<u>1.0 μl</u>
Total	20.0 μl

- ② 37°C에서 1시간 반응시킨다.

- ③ 90°C에서 5분간 가열한다.

- ④ 원심분리하여 얼음위에 놓는다.

이 용액은 직접 RT 반응에 이용할 수 있으나, phenol/chloroform 추출, ethanol 침전으로 RNA를 회수해도 좋다.

C. 역전사효소 반응

(a) **Annealing** : 특정 염기서열에 대한 상보적 primer를 이용하는 경우

- ① 아래의 용액을 혼합한다.

RNA 용액(1 μg/μl)	1.0 μl
RT Primer(50 nM)	1.0 μl
10× RT buffer	1.4 μl
<u>dH₂O</u>	<u>6.6 μl</u>
Total	10.0 μl

- ② 혼합액을 95°C에서 2분간 가열한다.

- ③ 55°C에서 1시간 반응한다.

- ④ 원심분리한다.

Oligo(dT) 12~18 primer를 이용하는 경우에는 동일한 반응계에 40~100 pmol 첨가한다.

(b) Primer 신장반응

① 아래의 용액을 혼합한다.

Primer와 annealing한 RNA 혼합액	10.0 $\mu\ell$
Dithiothreitol(100 mM)	1.4 $\mu\ell$
dNTPs mixture(각 5 mM)	1.4 $\mu\ell$
RNase Inhibitor	0.7 $\mu\ell$
Reverse transcriptase(200 units/ $\mu\ell$)	0.5 $\mu\ell$
Total	14.0 $\mu\ell$

② 37°C에서 1시간 반응시킨다.

③ 80°C에서 5분간 가열한다.

④ 원심분리하여 얼음위에 놓는다.

2. PCR

RT반응으로 얻은 cDNA를 주형으로 PCR을 실시함으로써 mRNA를 검출할 수 있다. mRNA를 고감도로 검출하고자 하는 경우는 방사성 동위원소를 이용한 PCR을 한다. 여기에는 표식 primer를 이용하는 경우와 표식 nucleotide를 이용하는 경우의 2가지 방법이 있다. 일반적으로 방사성동위원소를 이용한 PCR은 검출감도가 높으므로 반응을 아주 소량으로도 할 수 있어 방사성 동위 원소나 효소, 기질을 최소량으로 할 수 있다. 필자 등은 5 $\mu\ell$ 용량의 PCR로도 양호한 결과를 얻었다^{4, 5}. mRNA 검출을 목적으로 하는 경우는 통상 30 cycle의 PCR을 이용한다. 한편 mRNA의 정량을 목적으로 하는 경우에는 PCR 산물이 지수함수적으로 증가하는 cycle수를 단편별로 예비실험으로 결정할 필요가 있으나 통상 21~25 cycle이 적당하다.

(1) 준비

· T4 polynucleotide kinase

· *Taq* polymerase

· 10X polynucleotide kinase buffer

500 mM Tris-HCl(pH8.3)

100 mM MgCl₂

50 mM Dithiothreitol

· 10X *Taq* polymerase buffer

500 mM KCl

100 mM Tris-HCl(pH8.3)

15 mM MgCl₂

0.1%(w/v) gelatin

· [γ -³²P] ATP(7,000 Ci/nmol, 160 mCi/ml, ICN Biochemi-cals)

· [α -³²P] dCTP(3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham)

· dNTP Mixture(각 1.25 mM)

· 합성 oligonucleotide

(2) 방사성 동위원소(RI)를 이용한 PCR법

mRNA를 고감도로 검출할 필요가 있는 경우, 특히 염기서열의 이상을 검출하기 위해 SSCP 해석을 하고자 하는 경우는 primer를 방사선표식하여 PCR에 이용한다. 이 경우는 ^{32}P 를 기질로 하여 T4 polynucleotide kinase로 primer의 5'말단을 표식한다. RT-PCR 산물을 SSCP로 해석하는 경우에는 양측의 primer를 표식하는 것이 mRNA 구조의 이상을 검출하기 위해 반드시 필요하지만 양 primer를 동등한 강도로 방사성표식을 하기 위해서는 좌우 primer 각각에 대하여 별개의 kinase 반응을 해 줄 필요가 있다. 특히 표식한 primer는 정제할 필요가 없고, T4 polynucleotide kinase 반응액의 일부를 직접 PCR 반응액에 첨가한다. 단 kinase 반응액의 성분이 PCR을 저해하지 않도록 kinase 반응은 PCR의 최적 pH인 8.3에서 수행하고, 반응 후 가능한한 소량의 dH_2O 로 희석한다. SSCP 해석에서 명료한 signal을 얻기 위해서는 최소량의 PCR 산물을 비변성 polyacrylamide gel로 분리하는 것이 가장 바람직하다. 이를 위해 PCR에 이용하는 primer가 높은 방사활성을 갖도록 표식해야 한다. A, B에 소개하는 것은 PCR 산물을 SSCP 해석하는 것을 염두에 둔 protocol이다.

A. Primer 5'말단의 RI 표식 (30시료 동시 분석의 경우)

① 다음의 용액을 첨가한다.

Sense 또는 antisense primer (150 μM)	1.0 μl
10X kinase 완충액 (pH8.3)	0.3 μl
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$	1.3 μl
dH_2O	1.1 μl
<u>T4 polynucleotide kinase (10 unit/μl)</u>	<u>0.3 μl</u>
Total	4.0 μl

② 37°C, 30분간 반응한다.

③ 80°C, 2분간 가열한다.

④ 원심분리하여 얼음위에 놓는다.

⑤ dH_2O 12.0 μl 를 첨가하여 primer 농도를 10 μM 로 조정한다.

B. RI 표식 primer를 이용한 PCR (1시료 해석의 경우)

Primer 신장반응으로 얻은 cDNA 용액의 일부 (1 μl)를 PCR 주형으로 직접 이용한다.

① 아래의 용액을 혼합한다.

Primer 신장반응 용액의 일부 1.0 μl

10X <i>Taq</i> polymerase buffer	0.5 μl
dNTP Mixture (각 1.25 mM)	0.4 μl
RI 표식 sense primer (10 μM)	0.5 μl

RI 표식 antisense primer (10 μ M)	0.5 μ l
dH ₂ O	1.6 μ l
<u>Taq polymerase (0.25 unit/μl*)</u>	<u>0.5 μl</u>
Total	5.0 μ l

* Taq polymerase는 1× PCR buffer로 희석한다.

② PCR thermal cycler로 증폭반응을 실시한다.

초기 열변성 : 94°C, 1분

cycle 반응 : 94°C, 30초 ; 55°C, 30초 ; 72°C, 1분

cycle 수 : 30 cycles(검출을 목적으로 하는 경우),

21~25 cycles(정량을 목적으로 하는 경우)

최종신장반응 : 72°C, 7분

편법으로 94°C, 20초; 60°C, 1분의 2단계를 1 cycle로 해도 좋다. 또 annealing 온도는 primer에 따라 차이가 나므로 최적조건을 검토해야 한다.

C. RI 표식 nucleotide를 이용한 PCR (1시료 해석의 경우)

① 아래의 용액을 혼합한다.

Primer 신장반응액의 일부	1.0 μ l
10X Taq polymerase buffer	0.5 μ l
dNTP Mixture(각 1.25 mM)	0.4 μ l
Sense primer (10 μ M)	0.5 μ l
Antisense primer (10 μ M)	0.5 μ l
[α - ³² P dCTP]	0.2 μ l
dH ₂ O	1.4 μ l
<u>Taq polymerase (0.25 unit/μl*)</u>	<u>0.5 μl</u>
Total	5.0 μ l

② Cycle 반응은 B-②와 동일하게 실시한다.

D. Polyacrylamide gel 전기영동에 의한 분리

① PCR 반응액의 일부 (1 μ l)를 9 μ l의 10% glycerol, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.

② 5~6% polyacrylamide gel (90 mM Trisborate pH8.3, 4 mM EDTA)에 1 lane 당 1 μ l씩 loading하고 실온에서 전기영동한다.

③ Gel을 여과지상에서 건조한 후 실온에서 X-ray film에 30~60분간 감광하여 signal을 얻는다.

(3) Primer를 방사성 표식하지 않은 (non-RI) PCR법

PCR 산물을 RI 표식할 필요가 없는 경우에는 아래의 protocol에 따른다. RI 표식의 경우와 비교하면 검출감도가 떨어지나 간편한 조작으로 다양한 목적에 이용할 수 있다.

① 아래의 용액을 혼합한다.

Primer 신장반응액의 일부	1.0 μl
10X <i>Taq</i> polymerase buffer	1.0 μl
dNTP Mixture (각 1.25 mM)	1.6 μl
Sense primer (10 μM)	1.0 μl
Antisense primer (10 μM)	1.0 μl
dH ₂ O	3.9 μl
<i>Taq</i> polymerase (0.25 unit/ μl *)	0.5 μl
Total	10.0 μl

* *Taq* polymerase는 1X PCR 완충액으로 희석한다.

② B-②와 동일한 cycle로 PCR 한다.

③ PCR 반응액을 2 μl 의 25% glycerol, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.2% bromophenol blue, 0.2% xylene cyanol 혼합액으로 희석한다.

④ 3~4% Nusieve:SeaKem (3:1) agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색하여 증폭단편을 검출한다.

3. References

- 1) Temin, *Science*, 192, (1975, 1976).
- 2) Myers, T. W., Gelfand, D. H. : *Biochemistry*, 30, 7661-7666 (1991).
- 3) Makino, R., Sekiya, T., Hayashi, K. : *Technique*, 2, 295-301 (1990).
- 4) Murakami, Y., Katahira, M., Makino, R., Hayashi, K., Hirohashi, S., Sekiya, T. : *Oncogene*, 6, 37-42 (1991).
- 5) Murakami, Y., Hayashi, K., Sekiya, T. : *Cancer Res.*, 51, 3356-3361 (1991).
- 6) <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=435554&mobile&categoryId=577>
- 7) PCR 기초강좌, 백전백승 PCR가이드/Takara
- 8) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. : *Science*, 239, 487-491 (1988).
- 9) <http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/>
- 10) http://www.scieng.net/zero/view.php?id=tech&page=1&page_num=20&category=&sn=&ss=&sc=&keyw ord=&prev_no=&select_arrange=&desc=&no=1024