Quantitative Real-Time PCR

(주)다인바이오 연구소

1. 정의

PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술

2. 원리

Real time PCR에서는 PCR 증폭산물을 Real time으로 모니터링하여 증폭이 지수적으로 일어나는 영역에서 정량 하기 때문에 기존 기술인 RT-PCR법과 달리 PCR의 증폭속도 이론을 기초로 정확한 정량이 가능하다.

3. RT-PCR법을 이용한 mRNA 정량시의 문제점

RT-PCR법을 이용하여 mRNA를 정량할 때에는 다음과 같은 세가지 사항들이 문제점으로 대두된다.

1) mRNA의 추출효율 및 역전사효소에 의한 역전사 반응의 수율

RT-PCR법을 이용하여 mRNA를 정확하게 정량하려면 PCR 반응의 전단계인 mRNA의 추출과 역전사효소 반응시의 수율도 고려해야한다.

2) PCR 반응시의 증폭효율의 차이

PCR은 이론적으로 1 cycle 반응에서 목적의 DNA 단편을 2배로 증가시키므로 반응전 최초의 주형 DNA양을 N_0라 할 때, n cycle 후의 반응생성물 N은 $N=N_0 2^n$ 으로 나타낼 수 있다. 그러나 실제로는 primer의 annealing 효율이나 DNA 가닥의 합성효율이 반드시 100%가 되지는 않으므로 각 cycle의 증폭효율을 E로 하여 $N=N_0 2^n(1+E)^n$, $(0 \le E \le 1)$ 로 나타내는 경우가 많다.

3) PCR 반응시의 plateau 효과

실제로 PCR을 해보면 증폭산물의 양이 처음에는 cycle수를 거듭함에 따라 대수적으로 증가하나 증폭산물의 양이 어느 한계를 넘으면 증가가 저하되면서 최종적으로 증폭하지 않게 됨을 알 수 있다. 이러한 현상을 plateau 효과라한다. 기존 PCR은 최종적인 산물의 결과만을 확인하기 때문에 초기 sample의 양을 정확하게 알 수 없다.

4. Real-Time PCR의 장점

Real time PCR법은 End Point에서 PCR 증폭산물을 확인하는 기존의 PCR법에 비해서 다음과 같은 잇점을 갖고 있다. ① 실시간으로 PCR 증폭산물을 확인 가능하므로, 초기 DNA와 RNA의 정확한 정량이

B-B205, Woolimlions Valley II, 146-8 Sangdaewon-dong, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea 462-120
www.dynebio.co.kr / dyne@dynebio.co.kr / Tel : +82-2-571-1305

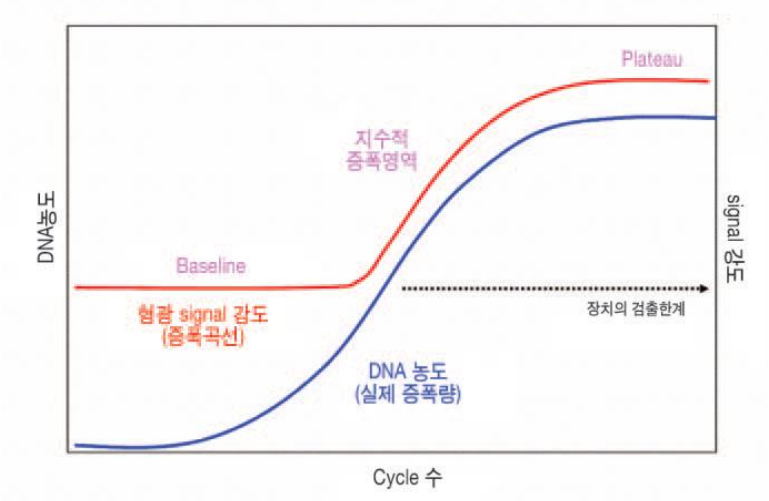
가능하다. ② 전기영동이 필요 없어 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며, 오염의 위험성이 적다. 현재는 유전자 발현해석과 SNP typing 등에 있어 필수적인 기술이 되고 있다.

5. Real-Time PCR에 의한 정량분석의 원리

먼저 Real time PCR에 의한 정량 메커니즘을 살펴보자. Real time PCR에 서는 PCR 증폭산물을 Real time으로 모니터링하여 증폭이 지수적으로 일어나는 영역에서 정량 하기 때문에 기존 기술인 RT-PCR법과 달리 PCR의 증폭속도 이론을 기초로 정확한 정량이 가능하다.

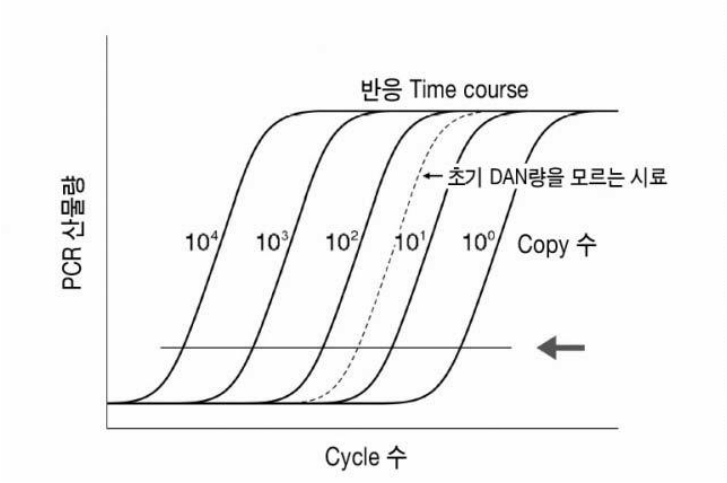
PCR에서는 1 cycle마다 DNA가 지수적으로 증폭하다가 plateau에 도달한 다. 이 증폭의 모습을 Real time으로 모니터링한 그림이 증폭곡선이다. 아래의 모식도는 DNA 농도 (실제의 증폭산물량)를 청색으로 나타내고 그것을 형광으로 검출한 signal 강도를 적색으로 나타내었다. PCR 증폭산물량

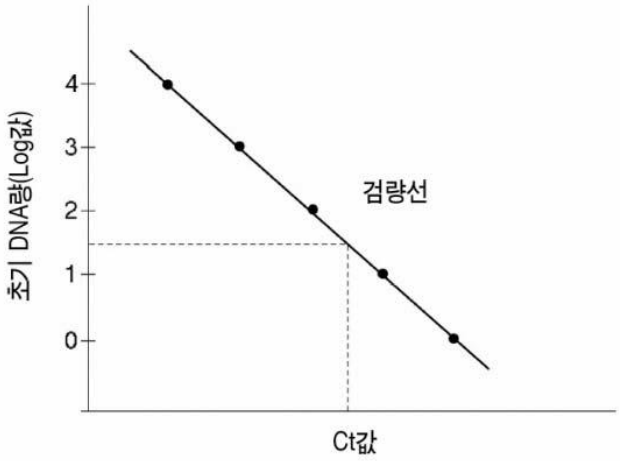
이 형광으로 검출 가능한 양에 도달하면 증폭곡선이 일어나기 시작해 지수적으로 signal이 상승하다가 plateau에 도달한다.



초기 DNA량이 많을수록 증폭산물량이 검출 가능한 양에 달하는 cycle 수가 적어지므로 증폭곡선이 빨리 나타난다. 따라서 단계적으로 희석한 표준시료를 사용하여 Real time PCR 반응을 하면 초기 DNA량이 많은 순서로 같은 간격으로 늘어선 증폭곡선이 얻어진다. 여기서 적당한 지점에 threshold를 설정하면 threshold와 증폭곡선이 교차하는 지점: Ct값 (Threshold Cycle)이 산출된다.

Ct값과 초기 주형량 간에는 직선적인 관계가 있어 아래 그림과 같은 검량선을 만들 수 있다. 미지의 시료에 대해서도 표준시료와 마찬가지로 Ct값 을 산출하여 이 검량선과 대조하면 초기 template량을 구할 수 있다.





6. Real-Time PCR 장치와 검출방법

1) 장치

Real time PCR를 하기 위해서는 thermal cycler와 분광 형광 광도계가 일체화된 Real time PCR 전용 장치가 필요하다. Thermal cycler로 DNA를 PCR 증폭시키면서 분광 형광 광도계로 그 증폭산물을 측정해 나간다. 다양한 기종의 Real time PCR 장치가 판매되고 있는데, 고속으로 PCR 반응 이 되도록 연구된 것과 96 well plate 단위로 반응할 수 있는 것 등 다양한 특성을 갖춘 장비들이 판매되고 있다.

2) 검출방법의 선택

Real time PCR에서는 PCR 증폭산물을 형광을 통해 검출한다. 검출방법은 크게 interchelating법과 형광표식 probe를 이용하는 2가지 방법이 있다. Interchelating법은 double strand DNA를 모두 검출하기 때문에 유전자별로 probe를 준비할 필요가 없어 저렴한 비용으로 반응계를 구축할 수 있다는 장점이

있는 반면 검출 특이성은 그다지 높지 않다. 형광표식 probe를 이용하는 방법은 비용은 많이 들지만 검출 특이성이 높아 비슷한 서열까지도 구별해서 검출할 수 있다. 검출방법은 실험 목적에 따라서 선택한다.

7. References

- PCR 기초강좌, 백전백승 PCR가이드/Takara
- 처음하는 Real time PCR/Life Science & Biotechnology