

실험 Set Up Guide



실험주제

Real Time PCR

■ 실험원리

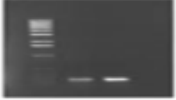
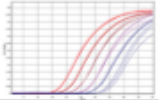
Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)은 1992년에 도입되어 생명공학에 응용되기 시작하였 이 기술은 잘 알려져 있는 PCR기법을 개량한 것이다.

PCR은 핵산의 효소 증폭을 이용하며, 극히 적은 양의 시료를 대량으로 증폭할 수 있다는 장점 과 그 과정이 간단하여 Cloning, Sequencing 등의 기본기술로 응용되었다.

그러나 분석 도구로서의 PCR은 증폭된 산물의 정량화가 불가능하다는 한계점을 갖고 있다.

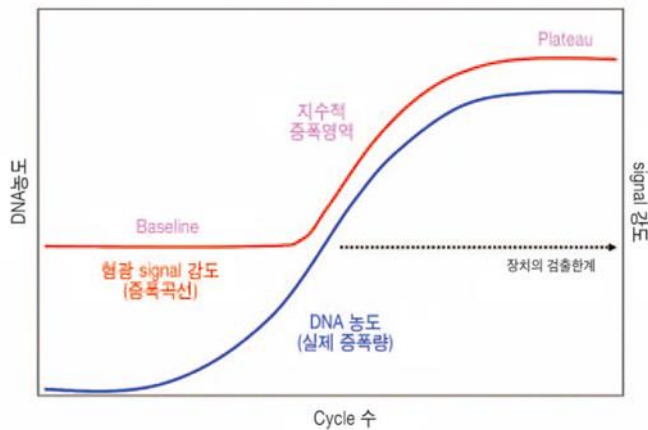
이 한계를 극복할 수 있는 실험기법이 Real Time PCR 이다. 이 기법은 증폭되는 핵산물질에 형광을 붙이고 이 형광을 지속적으로 검출하는 방식으로 이루어진다.

Real time PCR에서는 PCR 증폭산물을 Real time으로 모니터링하여 증폭이 지속적으로 일어나는 영역에서 정량한다.

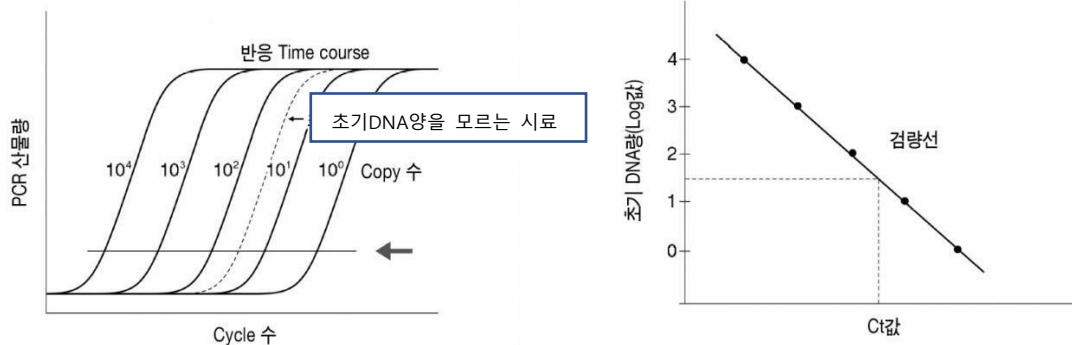
	RT-PCR	RT-qPCR
분석	End Point, Plateau Phase	Logarithmic Phase
Application 차이	정성분석 (band의 intensity 만으로 발현 유무를 확인)	정량분석 (정확한 발현양을 수치로 확인가능) → 민감도 높고 정확한 실험이 필요할 경우 주로 사용
장단점	간편하고 쉽게 확인가능 정성분석	별도의 형광 시약 필요 정량분석
장비	일반 PCR 장비	qPCR 장비
데이터		

PCR에서는 1 cycle마다 DNA가 지수적으로 증폭하다가 plateau에 도달한다. 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 증폭산물량이 형광으로 검출 가능한 양에 도달하면 증폭곡선이 일어나기 시작해 지수적으로 signal이 상승하다가 plateau에 도달한다.



초기 DNA량이 많을수록 증폭 산물량이 검출 가능한 양에 달하는 cycle 수가 적어지므로 증폭 곡선이 빨리 나타난다. 따라서 단계적으로 희석한 표준시료를 사용하여 Real time PCR 반응을 하면 초기 DNA량이 많은 순서로 같은 간격으로 늘어난 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 Ct값을 산출하여 이 검량선과 대조하면 초기 template량을 구할 수 있다.



전형적인 qRT-PCR 기술의 응용은 병원균의 검출, 유전자 발현의 분석, Single Nucleotide Polymerase (SNP)분석, 염색체 이상의 분석, Real-Time Immuno PCR 에도 응용되고 있다.

■ 실험을 위한 준비

- Real Time PCR 전용 기기 및 전용 Tube
- Real Time PCR 용 primer
- Real Time PCR 용 시약
- Template Total RNA 및 cDNA합성
- Micropipette 및 tip

■ 실험 Protocol [본 Protocol은 2 Step Real Time PCR을 기본으로 작성되었습니다.]

Step1] Template Total RNA 준비 및 cDNA합성

Step2] qPCR

- A. 장치
- B. 검출방법선택
- C. Primer 제작
- D. Real Time PCR 반응
- E. DATA 분석

Step1] Template Total RNA 준비 및 cDNA합성

Template Total RNA 준비

RT-qPCR 검출의 민감도와 정확성은 cDNA의 품질과 양에 따라 달라지며, 이는 분리된 RNA의 quality와 purity에 따라 결정된다.

RNA는 DNA처럼 안정한 상태가 아닌 single strand의 불안정한 상태이기 때문에 Degradation이 쉽게 일어난다. 이를 방지하기 위한 주의사항이 있다.

- ✓ prep 전 RNA prep에 사용되는 모든 공간, 기기, pipette 등을 70% EtOH을 이용해 닦아 RNase를 최대한 제거.
- ✓ Tubes and pipette tips 등 RNA prep에 사용되는 모든 제품은 Nuclease-free lab ware 를 사용
- ✓ RNA나 관련 시약을 다룰때에는 반드시 latex glove 착용
- ✓ RNase-free reagents
- ✓ RNase inhibitor 사용

관련제품

Method	Product Name	Brand	Cat No
Solution	Trisure	Bioline	BIO-38032
Column	ISOLATE II RNA Mini Kit	Bioline	BIO-52072
Column	ISOLATE II RNA Plant Kit	Bioline	BIO-52077

cDNA합성

분리된 RNA는 실험 handling이 어렵기 때문에 Reverse transcriptase를 이용해 모두 DNA로 바꿔 사용한다.

-Template RNA (total RNA 또는 mRNA)

-Primer (OligodT, Random, SS Primer)

-RT 전용 효소

-dNTP

-RNase Inhibitor

-RT Buffer

@ Primer 선택 @

-Random primer

Random hexamer는 cDNA 합성 효율이 좋고, PCR 증폭 위치, mRNA의 2차 구조, mRNA 분해 등의 영향을 덜 받기 때문에 mRNA 전체 길이에 걸쳐서 효율적으로 역전사 반응을 할 수 있다.

-Oligo-dT primer

RNA의 3'poly(A) tail 부분부터 역전사 반응을 실시하고자 하는 경우에는 oligo-dT primer를 사용한다.

- Gene specific primer

특정 유전자만을 검출하는 경우에는 유전자 특이적 primer를 역전사 반응에 사용할 수 있다.

저희 프리케어진과 직접 상의하세요.

RT KIT 선택 시 고려사항

■ 반응온도

: 42°C~60°C까지 제품별로 다양하다.

: mRNA 2차 구조는 촘촘해서 RT 효소가 사이에 들어가 합성 진행하는 것이 어려우며 고온에서 합성이 필요

■ 합성길이

: -7kb~ 20Kb까지 제품별로 다양함

■ 반응시간

: 샘플량이 많거나 빠른 실험진행을 원할 경우 반응시간이 짧은 제품을 선택

[반응시간 15분~ 60분으로 다양하다.]

■ 민감도

: Prep이 어려울 수록, RNA 발현양이 작을수록 민감도가 좋은 제품을 선택해야 함

■ **구성형태**

: Premix Type / 별도 Vial Type

■ **RNase H**

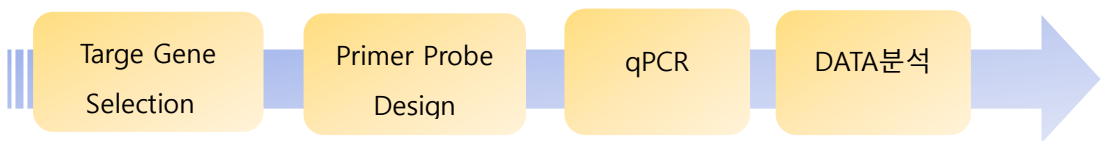
: cDNA합성 후 RNA가 제거되지 않을 경우 다시 cDNA에 붙어 primer annealing 저해.

관련제품

Product Name	Brand	Cat No
SensiFAST cDNA synthesis kit	Bioline	BIO-65053
Tetro cDNA Synthesis Kit	Bioline	BIO-65043
M-MLV ReverseTranscriptase (200U/ul)	M-biotech	19500

Step3] 검출방법 선택 및 Assay

qPCR Process



A. 장치

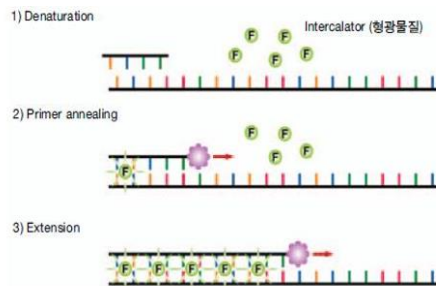
Realtime PCR을 하기 위해서는 thermocycler와 분광 형광강도계가 일체화된 Realtime PCR 전용장치가 필요하다. Thermocycler로 DNA를 증폭시키면서 분광 형광 광도계로 그 증폭산물을 측정해 나간다. 고속으로 PCR 반응을 진행할 수 있는 기기와 96 well을 진행할 수 있는 기기 등 다양하다.



B. 검출방법 선택 및 Assay

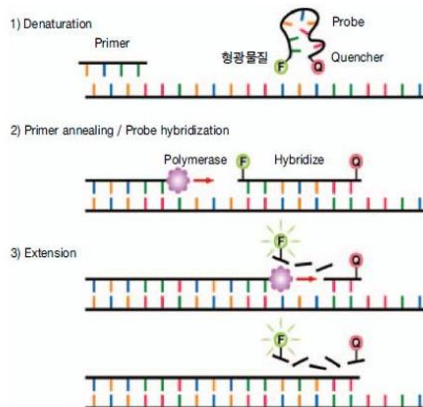
Interchelating 방식 (SYBR GREEN)

- SYBR GREEN은 Double strand DNA에 결합하여 형광을 나타내는 Interchelator임.
PCR 반응으로 합성된 dsDNA에 결합하여 형광을 나타냄.
모두 검출하기 때문에 유전자별로 probe를 준비할 필요가 없음.
- 저렴한 비용
- Sequence non-specific binding을 하기 때문에 미세 정량분석 부적합함.
- 분석방법: 단편이 증폭되면 Melting point (Tm) 에서는 급격한 형광량의 변화를 보인다.

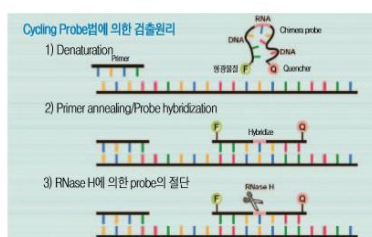


Probe 방식 (TaqMan Probe)

- 5' 말단은 형광물질 (FAM 등)로 3' 말단은 quencher 물질(TAMRA등)로 수식한 oligonucleotide를 PCR 반응액에 첨가하는 방법임.
TaqMan probe는 annealing step에서 template DNA에 특이적으로 Hybridize 하지만, probe상에 quencher에 의해 형광 발색이 억제된다. Extension 반응시 Taq DNA polymerase 가 갖는 5'-3' exonuclease 활성으로 template에 hybridize한 TaqMan probe가 분해되어 형광색소가 probe에서 유리되면서 quencher에 의한 억제가 해제되어 형광을 나타냄.
- 검출 특이성이 높음.
- Probe 설계를 위한 전용 소프트웨어를 사용 또는 설계가 끝난 Probe를 구입해서 사용.
- 상동성이 높은 서열을 구별하는 경우, SNP typing과 같은 실험에 적합.
- 가격이 비싼 편임.



Cycling Probe 법



RNA와 DNA로 이루어지는 chimera probe와 RNase H로 구성된 고감도의 검출방법.

Probe는 5' 말단은 형광물질로, 3' 말단은 quencher 물질로 표식되어 있음. 이 Probe는 일반적으로 quencher에 의해 형광을 발하지 못하지만, 증폭 산물 중의 상보적인 서열과 hybrid를 형성한 후 RNase H에 의해 RNA잔기가 절단되면 강한 형광을 나타내게 됨. 또 probe의 RNA부분이 mis-match되면 RNase H에 의해 절단되지 않기 때문에 서열 특이성이 매우 높은 검출 방법이며 SNP typing에 최적임.

C. Primer 디자인

Primer 디자인은 Real time PCR을 성공시키기 위한 가장 중요한 요소로 PCR 증폭효율이 나쁜 primer로는 고감도 검출이 불가능하고 또 primer-dimer 등 비특이적 증폭이 발생하기 쉬운 primer로는 정확한 정량이 어렵다. Primer 디자인 전용 소프트웨어를 사용하여 설계하거나 설계가 끝난 것을 구입해서 사용할 있다.

Primer 디자인 시 고려사항

■ 서열의 상보성

Primer 내부나 primer간에 3 base 이상 상보적이지 않게 한다.

Primer 3'말단 의 상보성에는 특별히 주의한다

■ 특이성

BLAST 검색으로 primer의 특이성을 확인한다

■ Tm값

Forward primer, reverse primer의 Tm값을 비슷하게 한다. Tm값 계산은 전용 소프트웨어로 실시.

$$(Tm = 2(A+T) + 4(G+C))$$

■ 증폭 사이즈

80~150 bp가 최적

■ Primer의 size

17~25 bp •

Primer 디자인은 저희 프리케어진과 상의하세요!!

D. Realtime PCR 반응

기본적으로 사용하는 Real Time PCR 시약의 조건을 준수한다.

- Denaturation: 주형이 게놈 DNA일 경우는 30초 정도로 함.
(1분 정도의 열변성이 필 요한 경우도 있지만, 1분을 넘는 변성조건에서는 결과가 안정되지 않을 수 있으므로 주의가 필요함.)
PCR의 변성 단계: Real Time PCR의 target 증폭 size는 보통 300 bp 이하이므로, 5초 정도로 하면 됨.
- Annealing 단계: 반응특이성이 낮은 경우는 온도를 높이거나 시간을 짧게 설정함.
증폭효율이 나쁠 경우는 온도를 내리거나 시간을 길게 설정함.
- Extension (3 step PCR) : 신장 시간을 길게 설정하면 비특이적 증폭산물이 생기기 쉬우므로 주의가 필요함.
- Cycle 수 : Standard의 경우 처음에는 40 cycle에서 시작하고, 필요에 따라 cycle수를 증감함.

관련제품

Product Name	Brand	Cat No
SensiFAST SYBR Hi-Rox Kit	Bioline	BIO-92005
SensiFAST™ SYBR Lo-ROX Kit	Bioline	BIO-94005
SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit	Bioline	BIO-98005
1 mL PrimeTime® Gene Expression Master Mix	IDT	1055770

E. DATA 분석

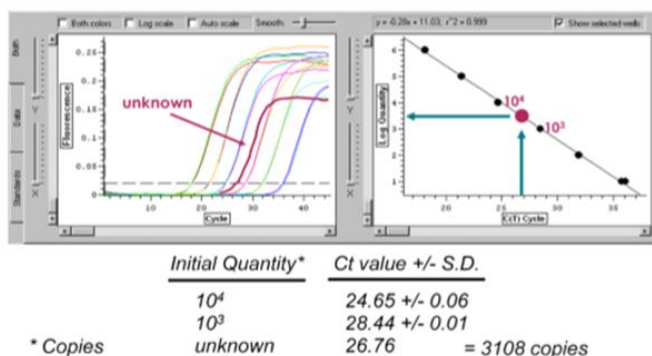
Ct값 산출방법

Ct값 산출 방법에는 반응을 일으키는 최소의 역가(Threshold)와 증폭 곡선의 교차점을 Ct값으로 하는 방법 (Crossing Point법) 외에, 증폭 곡선의 2차 도함수를 구해 그것이 최 대가 되는 점을 Ct값으로 하는 방법이 있다 (2nd Derivative Maximum법).

•정량

절대 정량: 표준 샘플을 이용해 검량선을 작성하여 미지 샘플의 절대량을 측정하는 방법이다.

*Standard curve 최소 5개 이상, Sample이 standard curve 내에 있어야 한다.



상대 정량: 상대 정량은 유전자 발현 해석으로 일반적으로 이용되고 있는 유전자의 발현량이 미지 샘플에 대해 control sample에 대해서 얼마나 증감하고 있는지를 분석하는 방법이다.

상대 정량 실험에서는 발현량을 알고 싶은 목적 유전자 외에 반드시 reference 유전자의 측정도 실시한다. Reference 유전자는 샘플간의 주형량 표준화를 위한 것이며, 유전자 발현 해석 실험에서는 일반적으로 housekeeping 유전자가 이용된다.

	유전자 H		유전자 X	
	정량결과 ¹	정량결과 ¹	보정값 ²	상대량 ³
RNA시료 A	6391.5	343.4	0.054	1.000
RNA시료 B	8589.7	17.3	0.002	0.037
RNA시료 C	7432.9	1946.1	0.262	4.874

유전자 X: 측정하고자 하는 샘플 / 유전자 H: Housekeeping gene

발현량의 차이를 파악하기 쉽도록 control 시료를 1이라고 한 경우의 상대량을 구한다.

RNA 시료 A를 control시료로 하고 각 시료의 보정값을 RNA 시료 A의 보정값으로 나누어 상대량을 구한다.

[단, 서로 다른 유전자가 동일 시료 내에서 어떤 중량비로 발현하고 있는지는 정확하게 구할 수 없음.]

예)

- Reference gene : GAPDH
- Target gene : p53
- Duplications (#1, #2)

#1

Sample	Ct p53	Ct GAPDH	$\Delta p53-GAPDH$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Rel. to p53 siRNA
non-target siRNA	37.65	28.83	8.82	0.00	$2^{-0.00}$	1.00
p53 siRNA	41.58	29.15	12.43	3.61	$2^{-3.61}$	0.081952

#2

Sample	Ct p53	Ct GAPDH	$\Delta p53-GAPDH$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Rel. to p53 siRNA
non-target siRNA	37.72	29.47	8.25	0.00	$2^{-0.00}$	1.00
p53 siRNA	42.23	30.42	11.80	3.55	$2^{-3.55}$	0.085522

Rel. to p53 siRNA	Rel. to p53 siRNA	평균	편차
1.00	1.00	1.00	0
0.081952	0.085522	0.08	0.003

