

기존의 핵산증폭기를 사용한 유리슬라이드상에서의 원위치 종합효소 연쇄반응

오정균¹ · 장진수² · 이재영*

¹성균관대학교 생명과학과

²목암연구소

목포대학교 생물학과

기존의 핵산증폭기를 사용하여 유리 슬라이드상에서의 효과적인 원위치 종합효소 연쇄반응(*in situ* PCR)을 수행하기 위해서는 여러 가지 조건들을 고려해야 하는데, 이러한 조건에는 PCR 용액의 세포속으로의 침투, 증폭된 PCR 산물의 세포의 유출의 방지, PCR 용액 성분의 유리슬라이드로의 비특이적 부착으로 인한 손실, 열에 의한 시약의 증발, heat block으로부터 슬라이드로의 열전도성 등이 있다. 특히 PCR 용액 성분의 세포내로의 침투를 보장하기 위해서는 다소 높은 농도의 PCR 용액성분(특히 4.5 mM MgCl₂ 농도)이 필요하였고, Taq 효소는 PCR 전 처리(pre-PCR incubation)를 수행하는 경우, 50 µl 반응당 5~10 units이면 충분하였다. 또한 PCR의 전형적인 온도-시간 양상(temperature-time profile)을 만족시키기 위해서는 먼저 샘플의 건조화를 방지해야 하는데, 이를 위해서 heat block 속의 빈 공간에 적당량의 물을 첨가했고, 설정온도와 실제온도를 측정해본 결과 약 3~4°C의 차이가 있었다.

Key words □ heat conductivity, high molecular weight products, *in situ* PCR, temperature-time profile

다양한 원위치 종합효소 연쇄반응(ISPCR) 기술이 여러 연구실에서 개발되었으나(2, 3, 5, 6, 8, 12), 대상 세포나 조직, 유전자, 샘플의 고정, PCR의 조건 등이 서로 다르므로 일관된 프로토콜이 정립되지 않은 실정이다. 따라서 만족한 결과를 얻기 위해서는 가능한 PCR 조건을 최적화시킬 수 있는 방법들(1, 4, 7, 11, 13, 14)이 필요하다. 이를 위해서 primer의 변형이 고안되었고, 아가로즈 첨가, PCR 용액내의 고농도의 Mg 이온 첨가, 고농도의 Taq 효소의 사용 등이 적용되어 그 효율성이 평가되었다. 본 연구에서는 이미 Molt/LAV 세포 등을 이용하여 tailed primer의 사용 가능성(9, 10), 아가로오스의 이용(10), 다양한 PCR 용액의 사용(10), Thermanox coverslip (T.C)위에 샘플의 고정, T.C를 PCR 튜브내에서 ISPCR 수행(10), 부피가 큰 증폭산물을 만들기 위한 biotinylated dUTP의 사용(9)등을 통하여 여러 변수들을 시험해 보았다. 그러나 아직 동일한 샘플을 사용하여 유리슬라이드에 고정시키고 기존의 핵산증폭기의 heat block위에서 ISPCR을 수행하기 위한 조건들은 시험해 보지 못했다. 본 연구에서 고려할 조건들로는 액상 PCR에 비교해 볼 때 유리표면에 Taq 효소나 Mg 이온 등이 비특이적으로 부착하여 소실될 가능성이 많으므로 일부 고농도 성분을 가진 PCR 용액을 사용할 것이고, 이와 병행하여 종전의 연구에서처럼 tailed primer와 아가로오스를 사용할 것이다. 또 열에 의한 시약의 증발을 막기 위해 고무개스

킷을 사용하고, PCR 튜브가 들어가는 heat block속의 공간에 적당량의 물을 넣어 사용하고, 모든 것이 준비된 슬라이드를 비닐랩으로 밀봉하여 사용할 것이다. 특히 heat block에서 슬라이드로의 열전도성을 측정하기 위해 온도측정기의 탐침부위를 개스킷내의 PCR 용액-아가로오스 혼합물에 고정시키고 설정된 PCR 온도와 지속시간을 실제 측정치와 비교할 것이다.

재료 및 방법

실험재료 및 준비

ISPCR을 위해서 HIV-1에 감염이 된 Molt/LAV와 감염 안 된 Molt의 현탁배양세포들을 사용하였고 이전의 보고들(9, 10)에서 언급된 바와 같이 계대배양하였다. 실험재료로 쓰이기 위해 신선한 배양액에서 자라는 현탁배양세포들을 PBS로 2번 세척하였고 원심분리(5분, 160×g)하여 모은 후 슬라이드 위에 놓고 건조한 후에 에탄올-빙초산의 혼합액(3:1)으로 5분 동안 고정하였다. 이후 100% 에탄올로 세척하였고 70% 에탄올 속에 냉장상태(4°C)로 보관하였다. ISPCR전에 이 슬라이드들은 각각 20분 동안 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl과 1.0 M Tris-Cl/1.5 M NaCl속에서 각각 핵산분리와 재결합이 수행되었다. 그 후 70%, 100% 에탄올에서 탈수화되고 상온에서 건조되었다.

사용된 Primer와 Probe

증폭의 대상이 되는 부위는 HIV-1의 gag 위치이고 gag 1551-

*To whom correspondence should be addressed.
 Tel: 061-450-2347, Fax: 061-454-0267
 E-mail: jaeyunglee@hotmail.com

1665 부위를 증폭할 수 있는 primer들로는 SK38과 SK39이 사용되었고, 이들 각각의 5'쪽에 서로 상보적으로 결합할 수 있는 18개의 꼬리서열을 연결하였고, 특히 SK38에는 이 꼬리서열의 3'쪽에 *Rsa* I 제한효소부위(GTAC)를 더 첨가하여 각각 TRSK38과 TSK39이라 명명하였다. Probe로는 이 부위의 존재를 확인할 수 있는 J16, J17, J18이 사용되었고, ³⁵S로 방사능 표지되었다. 이들의 염기서열과 결합하는 위치는 그전 보고(9, 10)에 표시되었다.

ISPCR 반응을 위한 준비와 반응조건

고무개스킷을 건조된 세포샘플 주위에 위치시키고 그 안에 5 μM의 primer, 250 μM의 각각의 dNTPs, 10 units/50 μl 반응의 Taq enzyme과 PCR 용액 II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂)를 섞어 넣는다. 이 위에 파라필름을 덮고 45°C에서 3시간 동안 배양시킨다(PCR 전 처리). 이 후 이 용액을 제거하고 슬라이드를 80°C로 예열된 heat block위에 고정시키고 개스킷 속에 예열된 PCR용액 II-2.5% SeaKem GTG 아가로오스(FMC Bioproducts, Rockland, USA) 혼합물을 채운다. 이 슬라이드를 비닐랩으로 덮고 상온으로 식도록 한다. 1 ml 정도의 2차 증류수를 heat block속의 공간에 골고루 채우고 슬라이드를 그 block위에 고정시킨다. 비닐랩과 알미늄 포일로 슬라이드가 놓인 block을 덮어 씌운다.

PCR 조건은 94°C에서 1분(첫 cycle은 5분), 55°C에서 2분, 72°C에서 1분간 60 cycle을 수행하고 25°C로 식힌다. 슬라이드로부터 비닐랩을 제거하고 아가로오스가 붙은 상태로 1시간, 폐고 1시간 동안 4% paraformaldehyde속에서 PCR후 고정을 수행한다. 이 후 슬라이드를 PBS 용액으로 씻어내고 70%와 100%의 에탄올로 탈수시킨다. 이 후의 원위치 혼성화(ISH)와 방사능표지 촬영은 이전의 보고(10)에서와 동일하게 수행한다. 세포들은 김사업색액으로 염색하고 광학현미경으로 관찰한다.

온도-시간 양상

핵산증폭기(DNA thermal cycler; Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA)는 "step cycle" mode (94°C, 1분; 55°C, 2분; 72°C, 1분)로 고정하고 온도측정기(Thermocouple; Fluke 52K/J Thermocouple)의 금속탐침부위를 개스킷속의 PCR용액-아가로오스 혼합물속에 삽입시키고 온도와 지속시간을 기록기(Fisher Recordall series 5000)에 의해 그래프 차트에 기록한다. 차트 스피드는 2.5 cm/분이나 0.25 cm/분으로 고정하였다.

결과 및 고찰

온도-시간 양상(그림 1)

튜브속 용액내에서의 실제 핵산분리 온도는 설정온도보다 약 1°C 낮았는데, heat block위에 슬라이드를 놓고 개스킷속의 아가로오스-PCR 용액은 약 3-4°C 낮았고, 결합과 중합화 온도는 튜브속의 용액상 PCR 온도와 거의 같았다. 세 온도간의 전반적인 전환시간 간격은 튜브에서보다 느렸다. 따라서 열전도성은 튜브

속에서보다 훨씬 낮은 것으로 나타났는데, 이론적으로 분리 온도를 3-4°C 올리는 것이 필요할 것 같았다. 그래서 분리 온도를 98°C, 96°C, 94°C로 설정하고 결합과 중합화 온도는 그전과 같이 각각 55°C, 72°C로 설정하여 실제 슬라이드위에서의 온도를 측정된 결과, 98°C, 96°C로 설정하면 실제온도는 92-93°C가 되었는데, 이때 아가로오스-PCR 용액이 개스킷으로부터 터져나와 이후로는 94°C (실제온도는 90-91°C)로 설정하여 PCR을 수행하였다. 많은 cycle(60 cycle)동안 일어나는 아가로오스-PCR 용액의 건조화로 인해 전형적인 온도-시간 양상이 훼손될까 하여 heat block내의 빈 공간에 약 1 ml의 물을 첨가하였더니 일정한 온도와 지속시간이 전 cycle을 통해 유지되었다.

유리슬라이드 위에서의 실제 ISPCR(그림 2)

0.5 μM의 tailed primer와 PCR 용액 I (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂)을 사용하여 슬라이드위의 개스킷속에 Molt/LAV 세포들에 ISPCR을 수행하였는데, Molt 세포를 사용하였을 때와 Taq 효소를 사용하거나 제거하였을 때에는 signal이 배경과 차이가 없을 정도로 거의 같았다(자료 미제시). 이는 아마도 종전의 보고에서처럼 저농도의 primer와 PCR 용액의 사용에 기인한 것으로 보인다. 따라서 다음 단계로 고농도를 쓰기로 하고 먼저 pBH10 DNA를 튜브속에서 5 μM의 tailed primer와 PCR 용액 II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂)를 사용하여 PCR을 수행하였는데, 결과는 PCR 용액 I을 사용하였던 종전의 결과들과는 달리 30, 60 cycle에서 1차 증폭산물(primary PCR product)만이 강하게 증폭이 된 반면 30 cycle 이후의 거대분자(high molecular weight product)는 형성되지 않았다(자료 미제시). 이는 많은 양의 primer가 30 cycle 후에도 계속 남아 60 cycle까지 충분히 사용되어 0.5 μM의 primer를 사용하였을 때처럼 30 cycle 후에 primer의 고갈로 인하여 일어나는 1차 산물간의 상보적인 꼬리서열간의 결합이 일어날 기회가 없어진 것으로 풀이된다. 그러나 슬라이드상에서는 아무리 5 μM의 많은 primer를 사용하더라도 세포막이나 아가로오스와



Fig 1. Temperature-time profile of ISPCR under an agarose overlay. The profile was obtained using a DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) set to "Step Cycle" mode. Sample (slide) was placed on the metallic heat block of DNA thermal cycler. Temperature-time profile of the sample was determined with a miniature thermocouple (Fluke 52 K/J Thermocouple) probe of which the end is inserted into 2.5% agarose mixture inside the rubber gasket and marked on the graph chart by a recorder (Fisher Recordall series 5000). Chart speed was set to 0.25 cm/min for 59 cycles and 2.5 cm/min for the last cycle. Cycler was programmed to denature at 94°C for 1 min, anneal at 55°C for 2 min, and extend at 72°C for 1 min. Dots on the graph represent the onsets and endings of each programmed temperature.

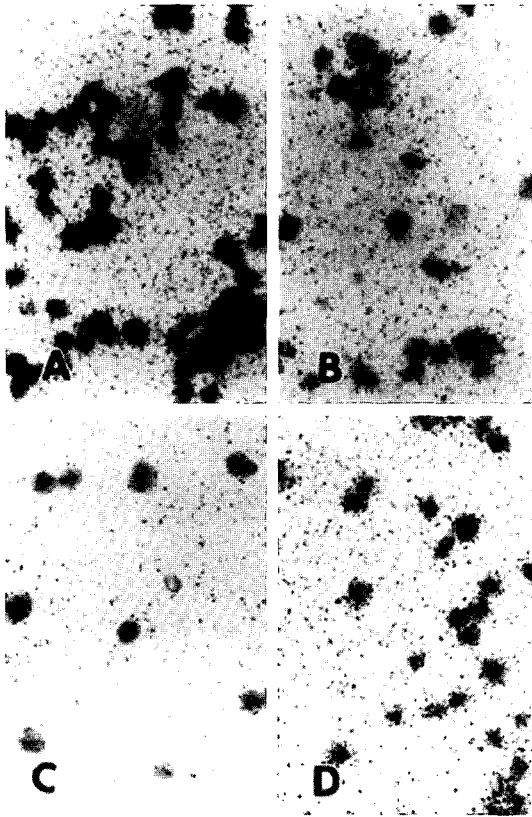


Fig 2. ISPCR of cells on slides under an agarose overlay. Targets in Molt/LAV cells were amplified *in situ* on the slide under the mixture of PCR-2.5% SK GTG agarose using PCR buffer II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂) and tailed primers with (panel A) or without (panel B) 10 units/50 µl reaction of Taq enzyme. 5 units/ 50 µl reaction of Taq enzyme was also used to Molt/LAV cells (panel D). Uninfected Molt cells were amplified on the same slide as Molt/LAV cells with PCR buffer II, tailed primers and 10 units/50 µl reaction of Taq enzyme (panel C). Cyclyer was programmed to 60 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 2 min, and extension at 72°C for 1 min. ISH was carried out with ³⁵S-end labeled probes of J16, J17 and J18 after post-PCR fixation in 4% paraformaldehyde and followed by autoradiography (4 days exposure). Cells were counterstained with Wright-Giemsa and photographed with the final magnification of × 300.

같은 물리적 장벽들이 primer의 세포내로의 접근을 어렵게 하여 세포내의 목표 핵산에게는 적은 양의 primer를 사용하는 것과 비슷한 효과를 나타내리라 예상하였다. 이처럼 5 µM의 tailed primer를 사용하여 Molt/LAV 세포들위에 10 units/50 µl 반응의 Taq 효소를 사용(Fig. 2, panel A), 5 units의 Taq 효소를 사용(panel D), 혹은 Taq 효소를 제거(panel B)하여 PCR 용액 II와 함께 ISPCR을 수행하였다. 예상처럼 5 µM의 primer에 Taq 효소 10 units (panel A), 5 units (panel D)를 사용한 경우가 많은 signal을 내었고, 감염되지 않은 Molt 세포들(panel C)에서는 signal이 거의 없었다. 반면 Taq 효소를 사용하지 않은 Molt/LAV (panel B)에서는 panel A, D에서보다는 적었지만 어느 정도의 signal을 보였는데 이는 아마도 PCR 전 처리과정을 수행하는 3

Table 1. Considerations of various steps for ISPCR using the conventional DNA thermal cyclyer

Preparation of sample	Washing with PBS. Fixation with ethanol-glacial acetic acid (3:1) on the slide. Dehydration with 100% ethanol. Storage of sample slide under cold 70% ethanol until use. Denaturation and renaturation in 0.5 M NaOH/1.5M NaCl and 1.0 M Tris-Cl/1.5M NaCl for 20 min respectively. Dehydration with 70%, 100% ethanol. Dryness at room temperature.
Pre-PCR incubation	Addition into the rubber gasket of 5 mM primer, 250 µM dNTP, 10 units/50 ml Taq enzyme, and PCR buffer II (10 mM Tris-Cl, pH8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl ₂), 3 hr incubation at 45°C
Main PCR	With same concentration of primers, dNTP, and Taq enzyme, PCR buffer II-2.5% agarose mixture poured into the rubber gasket. PCR protocol: Total 60 cycles of denaturation (94°C, 1 min, except for the first cycle with 5 min), annealing (55°C, 2 min), and extension (72°C, 1 min). One ml of D.W added into the empty space of the heat block.
Post-PCR fixation	One hour fixation each in 4% paraformaldehyde before and after removal of PCR buffer II-agarose mixture.
<i>In situ</i> Hybridization	Hybridization with ³⁵ S-labeled oligonucleotide probe. Emulsion treatment of the sample slide under darkness. Cold storage for 4 days under darkness. Development, fixation and washing under darkness. Dryness at room temperature
Observation	Staining with giemsa. Observation with light microscope under 300X magnification.

시간 동안 첨가되었던 Taq 효소가 세포내로 유입되고 이후의 ISPCR 동안에도 남아 있어 목표 핵산을 어느 정도 증폭시켰던 것 같다. Panel B에서처럼 PCR 전 처리 동안에 Taq 효소를 첨가시키고 ISPCR 동안에는 제거했던 이유는 Molt/LAV를 증폭 없이 순수하게 ISH했을 때의 결과(HIV-1의 존재에 의한 probe와의 혼성화에 의한 signal)와 비교하려는 것이었는데 별 차이가 없었다. 이 모든 결과로 볼 때 기존의 핵산증폭기를 사용하여 유리슬라이드위에서 ISPCR을 수행할 때에는 많은 양의 primer와 높은 농도의 PCR 용액의 성분들(특히 Mg⁺⁺ 이온)을 사용하고, 많은 cycle 동안 일어나는 샘플건조를 막고 전형적인 온도-시간 양상을 유지하기 위해서는 heat block속의 공간에 적당량의 물을 첨가하여 적절한 열전도성을 보장함으로써 적절한 ISPCR 조건 (Table 1)을 취할 수 있을 것 같다.

한편 이미 유명 회사들에서 판매하는 ISPCR 전용의 원위치 핵산증폭기들(미국 Roche사의 GeneAmp In Situ PCR system 1000, 혹은 영국 Hybaid사의 OmniGene In-Situ system이나 OmniSlide System등)이 보급되어 있는데 이 전용기기들도 위에서 언급한 샘플의 건조방지, 온도-시간양상의 일정성, 많은 양의 PCR 용액 성분들을 고려한 것으로서, 추후에 가능하다면 이들에

의한 결과들과도 비교해 봄으로써 경제적인 측면에서의 기존 핵산증폭기에 의한 ISPCR 기술개발의 중요성도 가능해 볼 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 2002학년도 목포대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Andras, S.C., J.B. Power, E.C. Cocking, and M.R. Davey. 2001. Strategies for signal amplification in nucleic acid detection. *Mol. Biotechnol.* 19, 29-44.
2. Bagasra, O., T. Seshamma, and R.J. Pomerantz. 1993. Polymerase chain reaction *in situ*: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and specific genes. *J. Immunol. Meth.* 158, 131-145.
3. Chiu, L.P., S.H. Cohen, D.W. Morris, and G.W. Jordan. 1992. Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 333-341.
4. De Bault, L.E. and J. Gu. 1996. *In situ* hybridization, *in situ* transcription, and *in situ* polymerase chain reaction. *Scanning Microsc. Suppl.* 10, 27-44.
5. Embretson, J., M. Zupancic, J. Beneke, M. Till, S. Wolinsky, J.L. Ribas, A. Burke, and A.T. Haase. 1993. Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 357-361.
6. Haase, A.T., E.F. Retzel, and K.A. Staskus. 1990. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 127-135.
7. Komminoth, P. and A.A. Long. 1993. *In situ* polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Archiv. B. Cell. Pathol.* 64, 67-73.
8. Komminoth, P., A.A. Long, R. Ray, and H.J. Wolfe. 1992. *In situ* polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins. *Diagn. Mol. Pathol.* 1, 85-87.
9. Lee, J.Y. 2001. Methods of *in situ* PCR to retain the amplification products inside the cells. *Kor. J. Microbiol.* 37, 294-298.
10. Lee, J.Y., J-K. Auh, and G.W. Jordan. 2002. Evaluation of several parameters of *in situ* polymerase chain reaction (ISPCR) to reduce the leakage of amplifiants from the cells. *J. Microbiol.* 40, 70-76.
11. Mutty, C.E., E.A. Timm Jr., and C.C. Stewart. 1999. Effects of thermal exposure on immunophenotyping combined with *in situ* PCR, measured by flow cytometry. *Cytometry* 36, 303-311.
12. Nuovo, G.J., F. Gallery, P. MacConnell, J. Becker, and W. Bloch. 1991. An improved technique for the *in situ* detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Pathol.* 139, 1239-1244.
13. Paskins, L., J. Brownie, and J. Bull. 1999. *In situ* polymerase chain reaction and cycling primed *in situ* amplification: improvements and adaptations. *Histochem. Cell Biol.* 111, 411-416.
14. Urbanczyk-Wochniak, E., M. Filipecki, and Z. Przybecki. 2002. A useful protocol for *in situ* RT-PCR on plant tissues. *Cell Mol. Biol. Lett.* 7, 7-18.

(Received June 26, 2003/Accepted August 15, 2003)

ABSTRACT: *In Situ* PCR on the Glass Slide Using the Conventional DNA Thermal Cyclers

Chung-Kyoon Auh¹, Jin-Soo Chang², and Jae Yung Lee* (¹Department of Biological Sciences, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea, ²Mogam Biotechnology Research Institute, Yongin 449-910, Korea, Department of Biology, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea)

In order to establish effective *in situ* PCR on the glass slide using the conventional DNA thermal cyclers, several parameters should be considered. These include full accessibility of PCR reagents into the cells, prevention of diffusing PCR products out of the cells, loss of PCR reagents by nonspecific adherence onto the glass slide, dryness of PCR reagents by heat, and heat conductivity from the heat block to the glass slide. Especially, to guarantee the full accessibility of PCR reagents to sample, relatively higher concentration of PCR reagents (particularly 4.5 mM of Mg⁺⁺) was required while 5 to 10 units/50 µl reaction of *Taq* enzyme was enough as long as the step of pre-PCR incubation was included. Dryness of sample was prevented by addition of distilled water into the empty slots in the heat block, thereby providing the reproducible temperature-time profile of PCR. Observed temperature was lower than the programmed temperature by 3 to 4°C.