

PCR에 의한 DNA 증폭에 미치는 온도와 Cycle 수

원광보건대학 임상병리과 · 원광의료원¹

김종호 · 신상희¹

The Effect of Temperature and Cycles on Amplification of DNA by PCR

Kim, Chong-Ho., Shin, Sang-Hee¹

Dept. of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College

Dept. of Clinical Pathology, Wonkwang Medical Center¹

In order to study the effect of temperature of denaturation, annealing and extension and cycles on amplification of DNA by PCR method, We isolated the hepatitis B virus DNA from hepatitis B patient blood and compared the density of DNA amplified by Reference PCR Program (denaturation at 94°C for 30 sec., annealing at 60°C for 1 min., extension at 72°C for 1 min., holding at 72°C for 5min., 30 cycles) that is usually used in laboratory to the density of DNA amplified by PCR program changed only the denaturation temperature or annealing temperature or extension temperature. We amplified about 341bp of hepatitis B virus DNA by Reference PCR Program from hepatitis patient blood, but the DNAs denatured at 72°C or 60°C were not detectable on photoradiography film. The DNA amplified at 37°C of annealing temperature was not detectable, but the DNA annealed at 72°C was detectable the lower density of DNA than the DNA amplified by Reference PCR Program. Each DNA amplified by PCR program changed only the extension temperature to 37°C or 60°C was almost same density as DNA amplified by Reference PCR Program.

We compared the density of hepatitis B virus DNA amplified by Reference PCR Program for 30 cycles, 20 cycles, 10 cycles, and 5 cycles. The DNA cycled for 20 cycles was not amplified well as cycled for 30 cycles, but the DNA was detectable on the photoradiography film. The DNAs amplified for 10 cycles or 5 cycles were not detectable on photoradiography film. The concentration of hepatitis B virus DNA amplified in Reference PCR condition for 30 cycles, 20 cycles, 10 cycles, and 5 cycles were 72 μ g/ml, 83 $\times 10^{-3}$ μ g/ml, 27 $\times 10^{-6}$ μ g/ml, and nondetectable, respectively.

Key Words: PCR, Hepatitis B virus DNA

I. 서 론

DNA가 합성 증폭하려면 target template DNA가 존재

하여야 하고 시발체, dNTP(denucleotide triphosphate)들, DNA 중합효소 그리고 이온결합에 영향을 미치는 Mg과 같은 금속이온들이 필요하다(Engelke 등, 1988; Erlich 등, 1988).

DNA의 합성은 가장 먼저 2중 나선인 DNA가 변성되어 단일 가닥이 되고 여기에 상보적으로 시발체가 결합함으로써 DNA 중합효소가 합성을 시작한다. DNA가 변

교신저자: 김종호, (우) 570-750 전북 익산시 신룡동 344-2
원광보건대학 임상병리과
Tel: 063-840-1213
E-mail: chkim@wkhc.ac.kr

성 될려면 68°C 이상 높은 온도에서 가능하기 때문에 37°C를 유지하는 인체 내에서는 DNA helicase의 작용에 의하여 DNA가 변성 된다(Farr 등, 1988; Gyllensten 등, 1988; Krawetz 등, 1989; Kwok 등, 1989).

시험관내에서 polymerase chain reaction(PCR)법에 의하여 DNA를 증폭하는 방법은 1976년 Chien 등(1976)에 의하여 *Thermus aquaticus*로부터 95°C에서도 활성을 잃지 않는 Taq. DNA 중합효소를 발견함으로써 Saiki 등(1985)이 처음 PCR protocol을 제시하였다.

이후 많은 연구자들은 PCR의 조건에 관한 연구를 하였으며 시험관내에서 DNA를 증폭하는데 활용하였다(Mullis 등, 1986; Mullis 등, 1987; Li 등, 1988; Ochman 등, 1988; Oste, 1988; Saiki 등, 1988b).

본 연구에서는 PCR의 변성반응 온도, 결합반응 온도, 그리고 연장반응 온도의 변화와 반응회수가 DNA의 증폭에 미치는 영향을 연구하기 위하여 B형 간염 바이러스 양성인 사람의 혈액으로부터 분리한 DNA를 B형 간염 바이러스 cDNA로부터 합성한 시발체들을 사용하여 각 온도 조건과 반응회수를 달리하면서 PCR 하였다.

II. 재료 및 방법

DNA 분리

B형 간염 바이러스 양성인 환자 혈액을 12,000 rpm에 10분 동안 원침하여 분리한 혈청 50 μ l와 세포용해 완충액 50 μ l를 1.5ml Ependorp 시험관에 넣고 혼합 한 후 mineral oil를 1방울 가하고 microwave heater에서 1분 동안 가열후 1분동안 진탕을 5회 반복한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원침하고 상층 DNA를 PCR에 사용하였다.

PCR

DNA를 증폭하는 PCR의 온도 조건에 의한 DNA 증폭 정도를 확인하기 위하여 Thiers 등(1988)이 사용한 PCR 변법을 기준 PCR 방법으로 실험에 사용하였다. 기준 PCR 방법은 B형 간염 바이러스 DNA와 PCR에 필요한 시약들을 혼합한 후 94°C에서 5분 동안 전변성한 후 94°C에서 30초 동안 변성, 60°C에서 1분동안 결합, 그리고 72°C에서 1분 동안 연장하는 과정을 30 회수 실시하고 72°C에서 5분 동안 보존 반응한다. 기준 PCR 방법에 의하여 증폭한 DNA와 변성, 결합 그리고 연장 온도를 변화시키면서 증폭한 DNA를 비교하였다. 주형 DNA인 B형 간염 바이러스

스 DNA를 PCR에 의하여 증폭하기 위하여 B형 간염 바이러스 양성인 환자 혈청을 사용하였으며 기준 방법에 의하여 환자의 혈청이 양성임을 확인하였고 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입한 PCR 시약들과 Taq. polymerase의 활성을 확인한 후 실험에 사용하였다. 사용한 Primer는 B형 간염 바이러스 cDNA 로부터 합성한 시발체 I(sense, 5'-GTTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTG-3')과 시발체 II(antisense, 5'-AATAGTTGTCTGATTTTT-AGGCCCATATTAAC-3')를 사용하였고 Perkin- Elmer에서 제조한 GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Boston, NE, USA)을 사용하여 DNA를 증폭하였다.

1% agarose gel 전기영동과 Photoradiography

증류수 100ml에 agarose 2g를 가하고 Microwave heater에서 용해한 후 증류수 80ml과 10X TBE buffer(pH, 8.0, tris base 121g, boric acid 61.7g, EDTA-2Na-2H₂O 7.44g) 20ml 그리고 10mg/ml 농도인 ethidium bromide 20 μ l를 혼합 하고 gel를 만들었다. 각 PCR product 20 μ l를 loading 하고 110V에서 1시간 동안 전기영동하였다. 전기 영동한 gel를 VILBER LOURMAT회사의 TFX-20M UV- Illuminator(Marne La Vallee, france)에 놓고 FP-3000B film (Fuji photo Film co., Tokyo, Japan)을 사용하여 photoradiography하였다. 기타 실험에 사용한 시약은 Sigma Chemical Co(St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하였다.

III. 결 과

B형 간염 바이러스 양성인 환자 혈청으로부터 DNA를 분리하고 변성, 결합 그리고 연장 온도의 변화에 따른 DNA 증폭도를 실험하기 위하여 환자혈청에 B형 간염 바이러스의 DNA 존재를 확인하고 PCR에 사용하는 시약들의 기능을 확인하였다(Fig. 1).

기준 PCR방법에서 유지하는 변성 온도인 94°C를 72°C, 60°C로 각각 변화시킨 DNA 증폭도를 비교한 결과 72°C, 60°C에서는 증폭되지 않았다(Fig. 2).

결합 기준 온도 60°C를 37°C, 72°C로 변화시켜 DNA를 증폭한 결과 37°C 조건에서는 증폭되지 않았고, 72°C조건에서는 기준온도인 60°C에서 증폭된 DNA보다는 낮은 양의 DNA가 증폭되었다(Fig. 3).

연장 표준온도 72°C를 37°C, 60°C로 변화시킨 조건에서 DNA를 증폭한 후 비교한 결과, 표준 조건에서 증폭된 DNA 양과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 4).



Fig. 1. PCR products of hepatitis B virus DNA amplified by Reference PCR Program. Non reactive control without hepatitis B virus DNA(lane 1), without Primer I and II(Lane 2), without dNTPs(lane 3), without Taq. Polymerase(lane 4), reactive control(lane 5) and marker DNA(lane 6).



Fig. 2. PCR products of hepatitis B virus DNA amplified by PCR Program denatured at 60°C, annealed at 60°C and extended at 72°C(lane 1), by PCR program denatured at 72°C, annealed at 60°C and extended at 72°C(lane 2), by Reference PCR program(lane 3) and Marker DNA(lane 4).



Fig. 3. PCR products of hepatitis B virus DNA amplified by PCR Program. denatured at 94°C, annealed at 72°C and extended at 72°C(lane 1), by PCR program denatured at 94°C, annealed at 37°C and extended at 72°C(lane 2), by Reference PCR program(lane 3) and Marker DNA(lane 4).



Fig. 4. PCR products of hepatitis B virus DNA amplified by PCR program denatured at 94°C, annealed at 60°C and extended at 60°C(lane 1), by PCR program denatured at 94°C, annealed at 60°C and extended at 37°C(lane 2), by Reference PCR program(lane 3) and Marker DNA(lane 4).

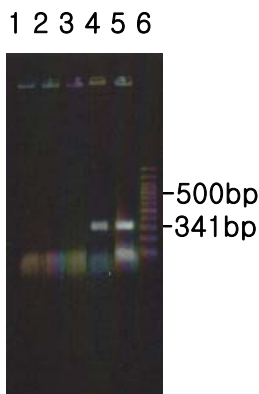


Fig. 5. PCR products of hepatitis B virus DNA amplified by Reference PCR program for 0 cycle(lane 1), 5 cycles(lane 2), 10 cycles(lane 3) 20 cycles(lane 4) 30 cycles(lane 5) and marker(lane 6).

PCR의 반응회수에 의한 DNA 증폭도를 비교하기 위하여 기준 조건에서 30회 반응, 20회 반응, 10회 반응, 5회 반응 동안 증폭한 결과 30회 반응과 20회 반응 동안 증폭한 결과는 감광 사진에서 확인할 수 있었으나 10회 반응과 5회 반응 동안 증폭한 결과는 확인할 수 없었다(Fig. 5)

또 각 증폭한 반응회수별 DNA 농도를 260nm에서 비색 정량한 결과 5 회 반응에서 증폭한 PCR 생성물에서는 DNA를 정량할 수 없었다(Table 1).

Table 1. Concentration of DNA amplified by PCR method

Cycles	5	10	20	30
Concentration ug/ml	nondetectable	30×10^{-6}	75×10^{-3}	72

IV. 고 찰

B형 간염 바이러스에 의한 감염을 진단하기 위하여 혈액내의 B형 간염 바이러스 DNA를 PCR에 의하여 증폭 확인하는 방법이 개발되어 사용된다. 검체내의 DNA가 PCR에 의하여 증폭되기 위하여 검체내의 target DNA, 시발체 I and II, Taq DNA 중합효소 그리고 PCR 혼합시약이 필요하다. 환자 혈청의 B형 간염 바이러스 DNA의 존재와 PCR 시약들의 기능을 확인한 결과 341bp의 B형 간염 바이러스 DNA가 증폭되었다. 이 결과는 시발체 I과 시발체 II를 재조할 때 계획한 DNA크기와 일치하며 병원에서 B형 간염 진단에 활용하는 크기와 일치하는 결과이다. 변성 반응 온도를 72°C 또는 60°C로 변화시키면 감광사진에 증폭된 DNA를 확인 할 수 없는 것은 DNA의 변성이 낮은 온도에서는 잘 일어나지 않는 것을 의미한다. 이 결과는 Saiki 등(1988)이 94-95°C에서 이중나선 DNA가 완전히 단일가닥으로 변성된다는 보고와 유사한 결과이다. 결합 온도를 37°C로 변화시키면 증폭된 DNA를 확인할 수 없었고 결합 온도가 72°C 일 때 60°C 보다 DNA 증폭도가 높게 나타난 것은 Foukes 등(1988)이 최적 결합 온도는 72°C이며 37°C 이하에서는 결합 되지 않는다는 보고와 일치한다. 연장 온도를 37°C와 60°C로 변화 시키더라도 72°C와 유사한 결과를 나타내는 것은 연장반응 온도가 37-72°C내에서는 DNA 증폭도에 현저하게 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 이 결과는 연장 온도가 65-85°C를 유지하는 것이 좋다는 보고(Foulkes 등, 1988; Kima과 smithies, 1988; Oste, 1988)와 상이한 결과이나 holding 온도를 72°C로 유지한 것이 다른 조건이다.

간염환자의 혈청으로부터 B형 간염 바이러스의 존재를 PCR에 의하여 증폭한 후 감광사진에서 확인할 수 있는 반응회수는 20 반응회수 이상으로 나타났고 증폭된 DNA를 정량할 수 있는 반응 회수는 10회 반응 이상으로 나타났다(Table 1). 이 결과는 감광사진에 의하여 확인할 수 없는 PCR 생성물도 증폭된 DNA를 정량할 필요성을 나타내고 있다.

V. 결 론

B형 간염 바이러스 양성인 환자 혈청으로부터 분리한 B형 간염 바이러스 DNA를 기준 PCR방법(변성 94°C 30초, 결합 60°C 1분, 연장 72°C 1분)에 의하여 증폭한 결과

와 변성 온도, 결합 온도, 그리고 연장 온도가 다른 방법에서 증폭한 결과를 비교하였다. 기준 방법에 의하여 341bp의 B형 간염 바이러스 DNA가 증폭되었고 변성 온도가 94°C에서 72°C 또는 60°C로 변화시키면 증폭되지 않았다.

결합 온도가 37°C에서는 증폭되지 않았으며 72°C에서는 증폭되었으나 60°C보다 작은 양이 증폭되었다. 연장 온도를 37°C 또는 60°C를 유지하여도 72°C에서 증폭한 결과와 유사하게 증폭되었다. 기준 PCR 방법에 의하여 반응 회수에 다른 DNA 증폭정도를 비교한 결과 20 cycle 동안 증폭한 DNA는 감광사진에서 확인할 수 있었으나 10회 반응 이하 증폭한 결과는 확인할 수 없었다. 각 반응 회수 동안 증폭한 PCR 생성물의 DNA농도를 정량한 결과 72 $\mu\text{g/ml}$ (30회 반응), 75 $\times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ (20회 반응), 30 $\times 10^{-6}$ $\mu\text{g/ml}$ (10회 반응)이었으나 5회 증폭한 생성물에서는 정량 되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550-1557, 1976
2. Engelke DR, Hoener PA, Collins FS. Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 85:544-548, 1988
3. Erlich HA, Gelfand DH, Saiki RK. Specific DNA amplification. *Nature* 331:461-463, 1988
4. Farr CJ, Saiki RK, Erlich HA, McCormick F, Marshall CJ. Analysis of RAS gene mutations in acute myeloid leukemia by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci* 85:1629-1633, 1988
5. Foulkes NS, Pandolfi de Rinaldis PP, Macdonnell J, Cross NCP, Luzatto L. Polymerase chain reaction automated at low cost. *Nucleic Acids Res* 16:5687-5688, 1988
6. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci* 85:7652-7656, 1988
7. Kim HS, Smithies O. Recombinant fragment assay for

- gene targetting based on the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 16:8887-8903, 1988
8. Krawetz SA, Pon RT, Dixon GH. Increased efficiency of the Taq polymerase catalyzed polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17:819, 1989
 9. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238, 1989
 10. Li H, Gyllensten UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335: 414-417, 1988
 11. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350, 1987
 12. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn G, Erlich HA. Specific enzymatic enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:263-273, 1986
 13. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-623, 1988
 14. Oste C. Polymerase chain reaction. *Bio Techniques* 6:162-167, 1988
 15. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354, 1985
 16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988b