



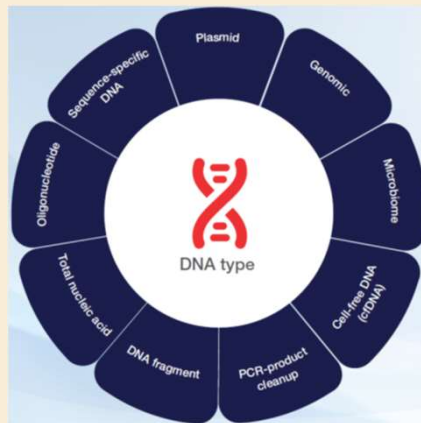
Nucleic acid 추출

1. Nucleic acid extraction

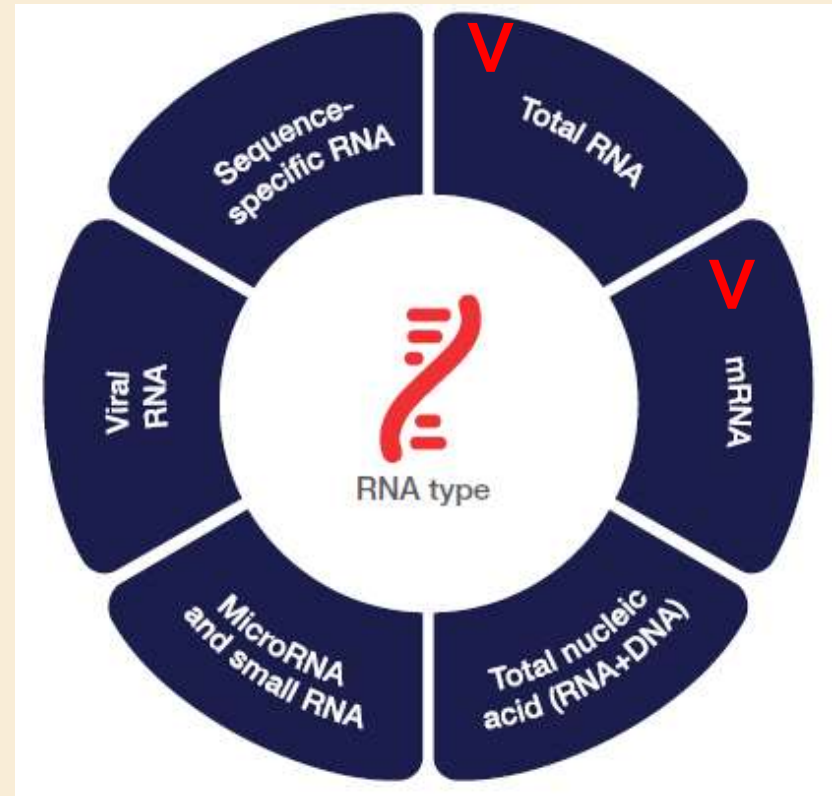
(1) DNA extraction

(2) RNA extraction

Nucleic acid extraction



- gDNA, plasmid DNA ...






- Total RNA, transcriptome RNA, mRNA, miRNA, sequence specific RNA, viral RNA ...

Nucleic acid extraction method

- 핵산 추출법은 시료의 상태type과 양에 따라 선택한다.
- 추출한 핵산의 순도는 downstream application의 결과에 크게 영향을 미친다.
- 좋은 NA 추출법
 - High recovery
 - Low impurity : 단백질 등
 - (빠른 extraction time)
- Downstream experiments:
 - PCR & qPCR / Cloning / Sequencing / Transfection / Gene therapy / vaccine (*in vivo*)
 - NGS, microarray ...

Nucleic acid extraction method

- 핵산 추출법은 시료의 상태type과 양에 따라 선택한다.
- 추출한 핵산의 순도는 downstream application의 결과에 크게 영향을 미친다.

종류	Organic Reagent	Column	Magnetic beads ³
			
특징	<ul style="list-style-type: none"> • DNazol /Trizol 등 • 유기용매/detergent 필요 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit • Silica/membrane column 또는 plate 	<ul style="list-style-type: none"> • Kit • Magnetic bead
	<ul style="list-style-type: none"> • Require alcohol precipitation • Cost effect • 오랜 추출 시간(30-60분) 	<ul style="list-style-type: none"> • Fast, convenient • Cost effect • High yield & purity 	<ul style="list-style-type: none"> • Scalable, flexible format • High quality prep • Sample type에 구애 받지 않는, 다양한 application에 적용

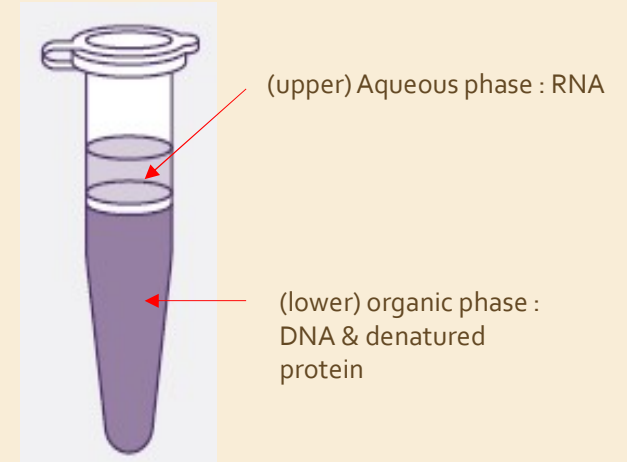


3. Merck Milipore, Estapor magnetic microsphere

Method of NA extraction

Organic reagent extraction-Trizol extraction

- Trizol :
 - mixture of guanidine thioacyanate and phenol
 - Storage: 15~30 °C
- Sample preparation
 - tissue sample : 1ml of Trizol per 50-100mg tissue
 - Cultured cell
 - Monolayered cell :
 1. Wash cells twice with cold PBS
 2. Use 1ml of Trizol per $1 \times 10^5 \sim 10^7$ cells in 10cm^2 of culture plate surface area (= 3.9ml per 10cm round plate or 7.5ml per T75 flask).
 - Suspension cell :
 1. Cell harvest by centrifugation
 2. lyse in Trizol using 1ml per $5 \sim 10 \times 10^6$ animal, plant, yeast cells 또는 1×10^7 bacterial cells



배양세포cultured cell로부터 RNA 추출

추출하고자 하는 시료의 상태(동물조직 tissue, 식물 잎/뿌리/줄기/씨앗, 생체 시료 등)에 따라 추출 조건은 달라질 수 있습니다.

1. 세포 배양 방식에 따라 1) 또는 2)를 수행한다.

1) 부착형 세포

- ① 플라스크flask 또는 페트리 디쉬petri dish에 배양한 세포를 1X PBS buffer 10ml로 세척한다.
- ② 세척한 PBS는 흡입기suction pump를 이용해 완전히 제거한다 → 1~2 과정 2회 반복
- ③ 배양 접시에 새로운 PBS 3~4ml를 가한다.
- ④ cell scraper를 이용하여 배양접시 바닥의 세포를 모두 긁어 낸다.
- ⑤ 또는 Trizol을 사용하여 lysis & homogenize

2) 부유형 세포

- ① 배지와 세포를 파이펫을 이용하여 모두 취하여 새로운 conical tube에 넣는다.

4. 1)~④ 또는 2)의 용액을 모두 취해서 15mL conical tube 또는 2mL EP tube에 넣고 원심분리한다 (400g에 5min, 4℃).

5. 상층액을 제거하고 펠렛pelle을 얻은 후

1) 상업용 kit를 이용하는 경우 사용자 매뉴얼에 따라 RNA를 추출한다.

2) Manual 추출인 경우 Trizol에 lysis/homogenization 후 사용자 매뉴얼에 따라 추출한다.

6. 추출한 RNA는 DEPC처리한 멸균 3차 증류수에 녹인 후

7-1. spectrophotometer를 이용하여 정량한다.

7-2. -20 또는 -80℃에 보관한다.

Trizol을 이용한 tissue로부터의 RNA 추출

- <https://www.thermofisher.com/kr/en/home/brands/product-brand/trizol.html>



Troubleshooting_TRizol

Q. 시료에 Trizol을 넣고 homogenization을 했는데도, 덩어리 물질 insoluble material 이 보입니다. 어떻게 해야 하나요?

A.

[For RNA isolation only]

- 5 분 정도 실온에서 incubation한 후 원심 분리합니다.
- 투명액층 supernatant과 젤리 같은 pellet이 보이면, supernatant는 제거하고 이후 과정을 진행합니다.

[For RNA and DNA isolation]

- 5 분 정도 실온 방치후에도 덩어리 물질이 많이 보인다면,
- polypropylene mesh를 사용하여 걸러줍니다.

Troubleshooting_TRizol

Q. Trizol과 chloroform을 넣고 층분리 하는 과정에서 상층액이 투명하지 못하고 노르스름하거나 분홍색을 띄고 있습니다. 원인이 무엇인가요?

A. RNA가 투명하지 못한 수용액층에서 추출될 경우 DNA contamination을 유발할 수 있습니다.

1. 표피시료skin sample를 사용할 때 많이 보이는 현상입니다. 시료에 포함된 지방fat이 원심분리동안 fat micelle을 만들어 뽕뽕 뜨는 것입니다. skin sample의 micelle은 보통 멜라닌 색소melanin pigment를 포함하는 경우가 많은데, 이것이 수용액층에서 색깔로 나타나는 것입니다.

이러한 경우 시료에 Trizol을 처리하고 클로로포름을 추가하기 전에 원심분리 해줍니다. 지방은 수용액층 위에 얇게 뜨게 되는데, 파이펫으로 제거해줍니다.

2. 시료에 혈액 성분이 많이 남아 있을 때 헤모글로빈의 철분iron때문에 수용액층이 혼탁cloudy하거나 노르스름하게 보입니다.

3. 원심분리기가 4C로 차갑게 식어있지 않을 경우, organic phase가 보통 추출했을 때 보다 더 적갈색으로 보일 수 있습니다. 이 유기용매층의 적갈색 색소가 수용액층의 색 변화에도 영향을 미쳐 노랑거나 주황색으로 보이게 합니다.

4. 시료와 Trizol의 섞임 비율이 1:10 이상일 경우 분홍색 수용액층이 나타날 수 있습니다(Over-dilution of the sample)

5. 시료에 염salt이나 단백질protein이 너무 많은 경우 → premature phase separation을 야기할 수 있으므로 TRizol을 조금 더 넣어줍니다.

Troubleshooting_TRizol

Q. RNA를 정량 했더니 A260/A280 ratio가 높게 나옵니다. 왜 그럴까요?

A. Degraded RNA 즉, RNA가 깨지면 260 nm에서의 흡광도 값은 증가합니다.

Q. TRizol Reagent를 이용하여 total RNA를 추출했을 때 가장 이상적인 A260/A280 ratio는 얼마인가요?

A. 높은 A260/A280 ratio는 항상 최상의 순도의 핵산을 추출했음을 의미하지는 않습니다.

그러나, 낮은 A260/A280 ratio (<1.7 for RNA)는 추출과정 중에 오염이 있었을 것이며, 즉 이후 실험에 사용하기 적합하지 않다는 것을 의미합니다.

- A260/A280 ratio

- 1.8 < → pure NA
- < 1.7 → contamination w/residual phenol, guanidine, other reagent...

Troubleshooting_TRIzol

Q. A260/A280 ratio 가 1.65 보다 낮게 나왔습니다. 왜 그럴까요? π—π

A.

1. Sample과 TRIzol Reagent의 비율이 너무 낮았다. Trizol 용액을 너무 작게 썼다.
2. Pipette homogenization 후 실온에서 5분 정도 incubation이 부족했다. → nuclear protein이 응집되지 못함
3. 최종 추출 RNA pellet이 TE buffer/DEPC-treated DW에 충분히 녹지 않았다 → RNA pellet의 overdry 때문.
(정상 pellet: 투명, over dried pellet: 흰색) : 55~60 C에서 15 분 정도 파이펫으로 섬세하게 섞어서 완전히 녹여준다.
4. 낮은 온도에서 원심분리를 수행했다. → phenol contamination

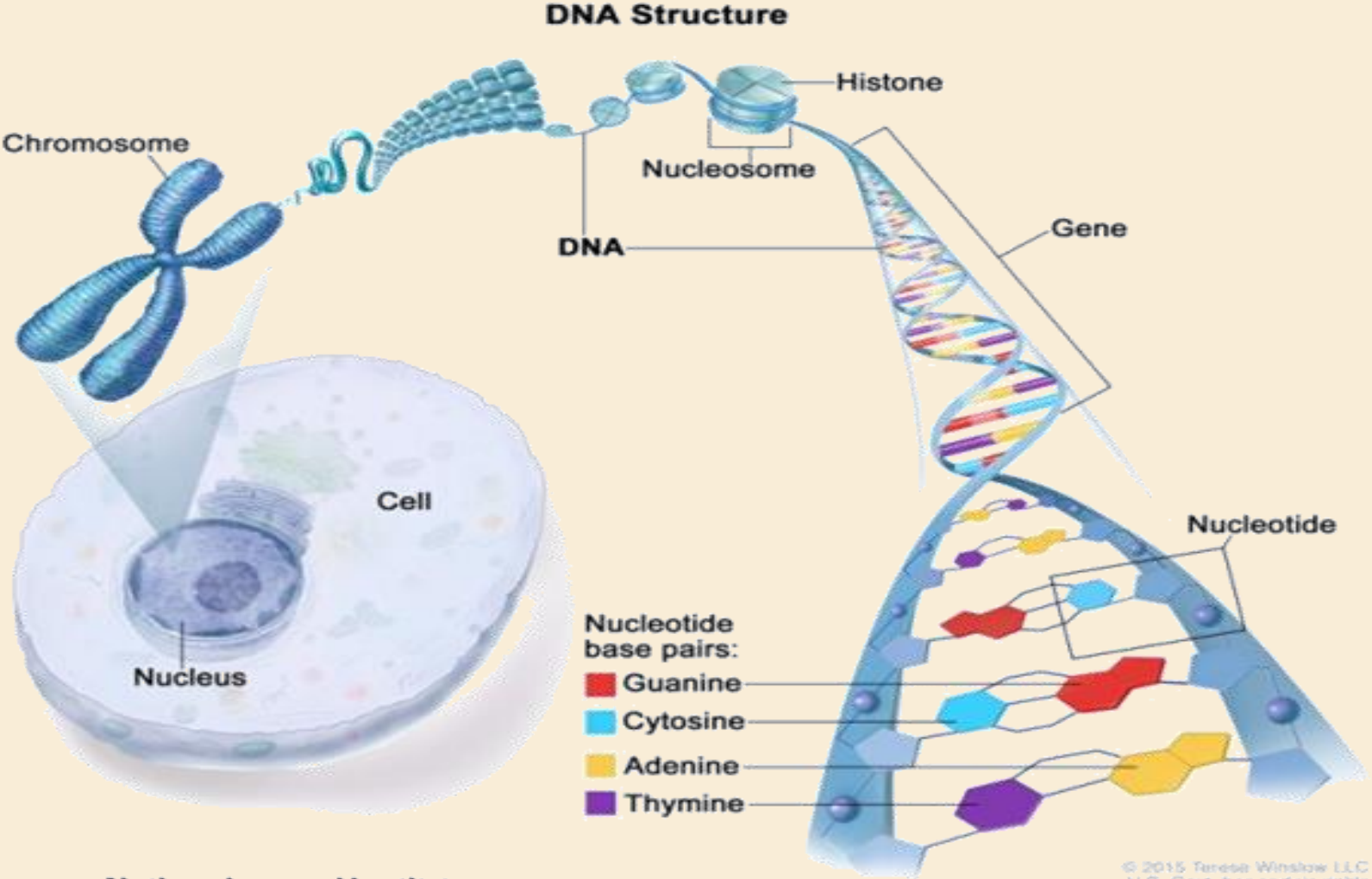
phenol은 실온에서는 친수성의 성향을 띠기 때문에 수용액층으로 phenol이 섞여 들어갈 수 있습니다. Phenol의 흡광 파장인 270 nm에서 측정해서 흡광도가 있으면 ethanol precipitation을 수행하여 residual phenol을 제거합니다.
5. 제거되지 못한 chloroform → reprecipitate.
6. A260/A280 ratio가 측정 기기에 따라 다른 값이 나옵니다. → Spectrophotometer의 고장



PCR 이론

1. DNA replication의 기본 원리
2. Reverse Transcription
3. PCR의 기본 원리

DNA Replication



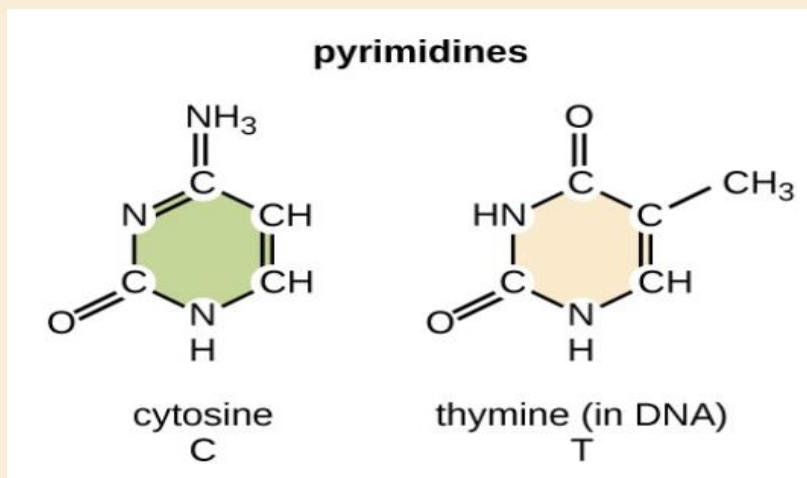
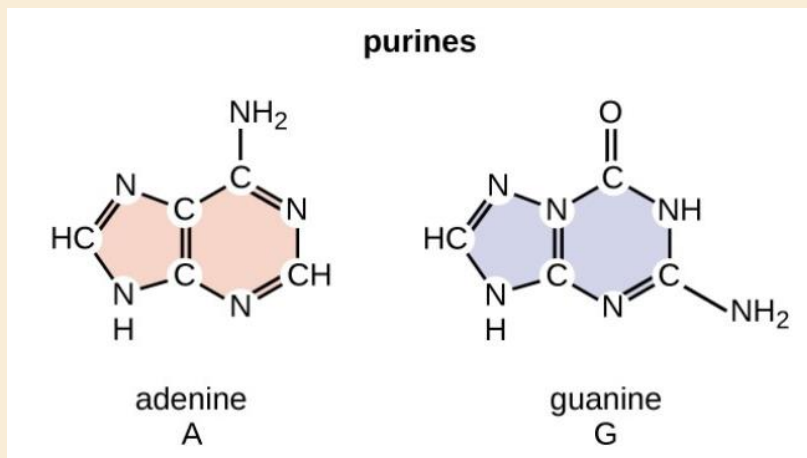
source : National cancer institute

© 2015 Terese Winslow LLC
U.S. Govt. has certain rights

DNA의 구조

DNA structure video:

<https://dnlc.cshl.edu/resources/3d/23-dna-unzip.html>



Nucleotide: A,T,G,C,U
Nucleic acid: DNA, RNA

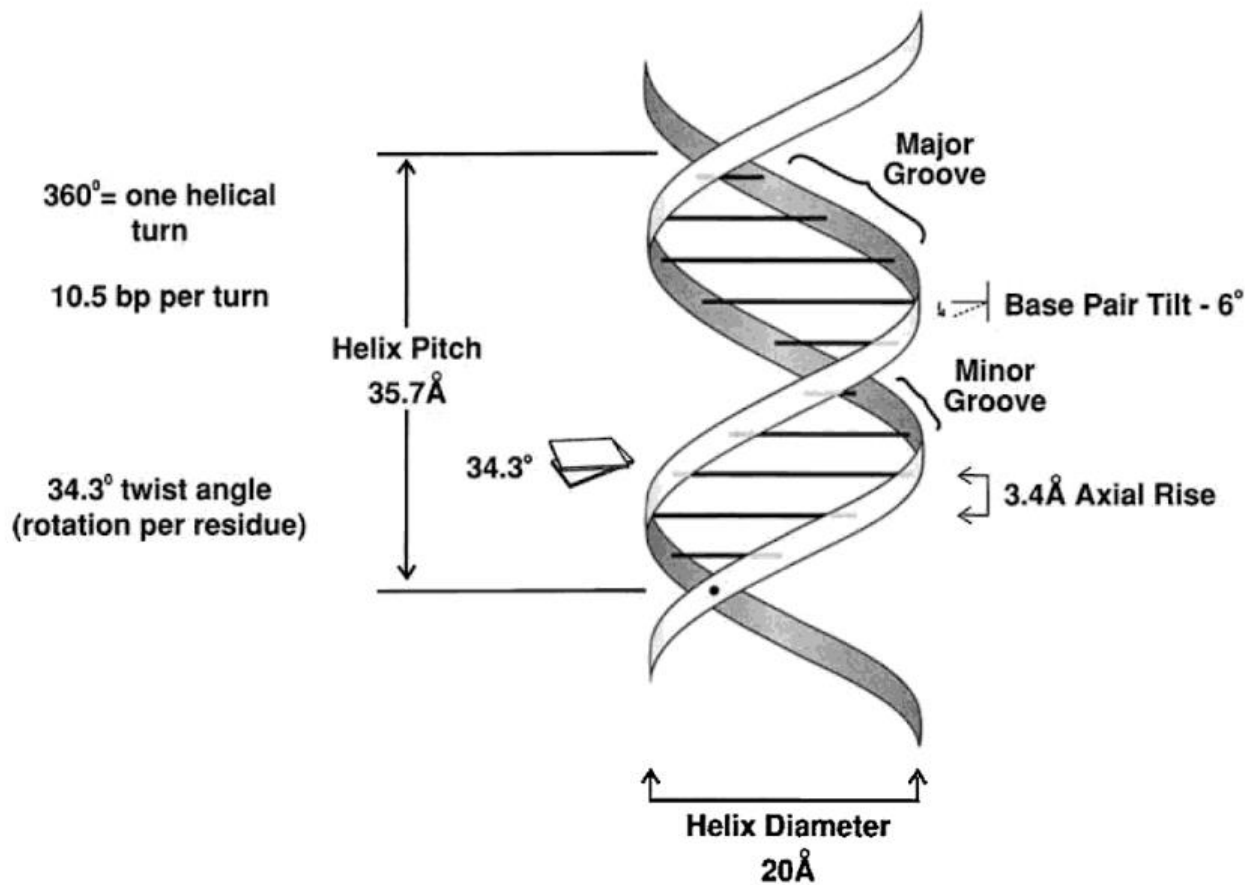
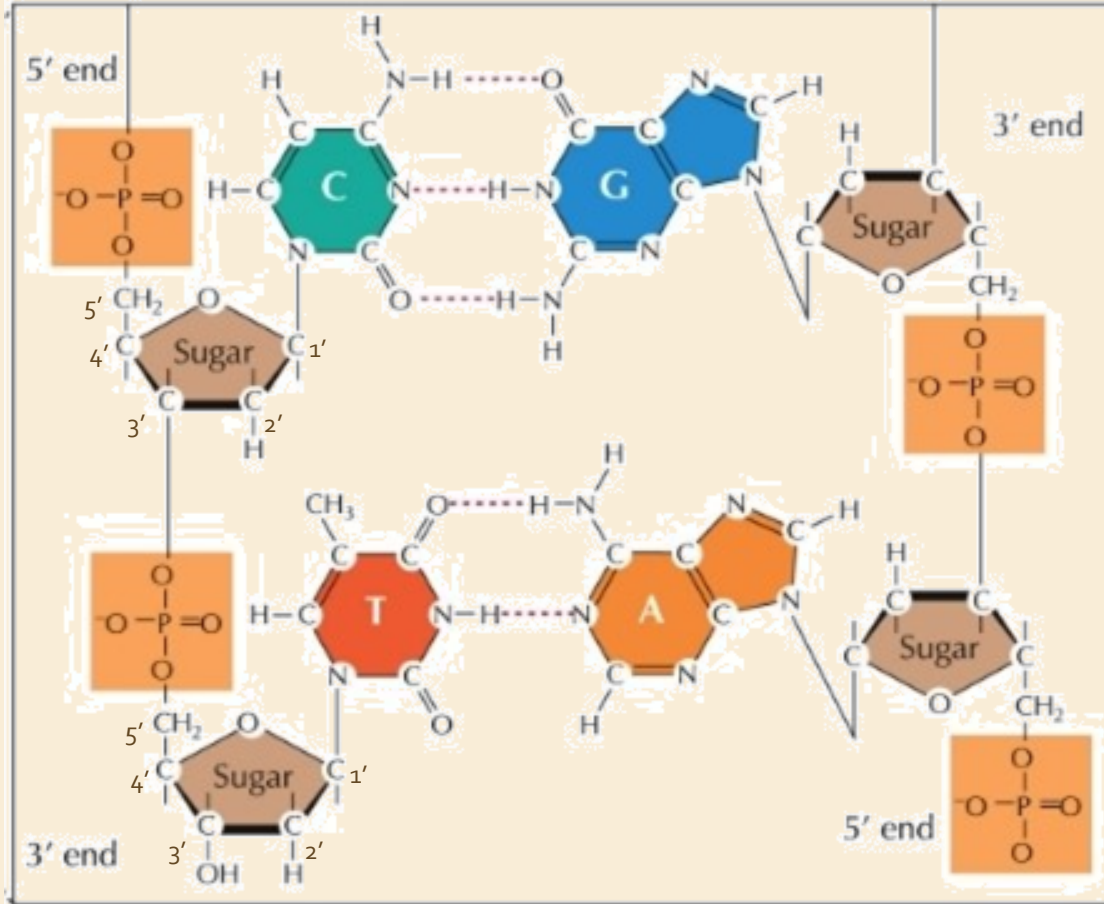


Figure 1.12 The DNA double helix in solution: structural parameters. The Watson-Crick double helix is composed of about 10.5 base pairs per helical turn. Since 360° constitutes one helical turn, there would be a 34.3° twist angle or rotation per residue between adjacent base pairs (see Table 1.4). The helix pitch or length per helical turn is 35.7 \AA . The axial rise or distance between two planar base pairs is 3.4 \AA . The base pair tilt or deviation from the horizontal plane of the bases is about -6° . The helix diameter or the width of the helix is about 20 \AA . Note the positions of the minor groove and the major groove.

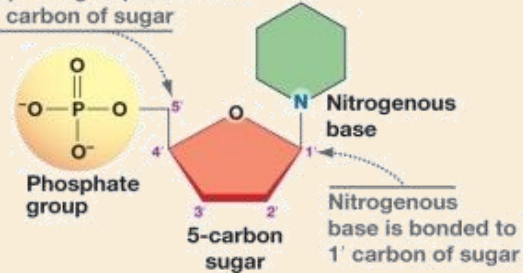
Polynucleotide



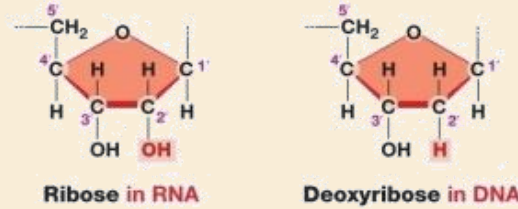
THE CELL, Fourth Edition, Figure 4.5 (Part 2) © 2000 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

(a) Nucleotide

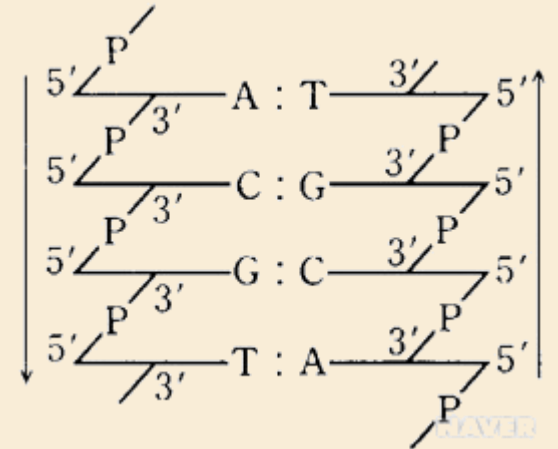
Phosphate group is bonded to 5' carbon of sugar



(b) Sugars



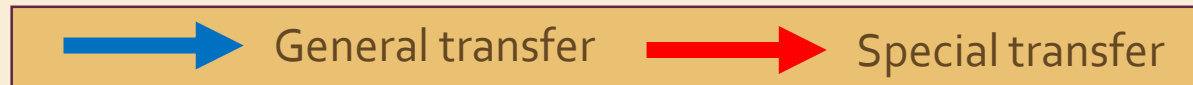
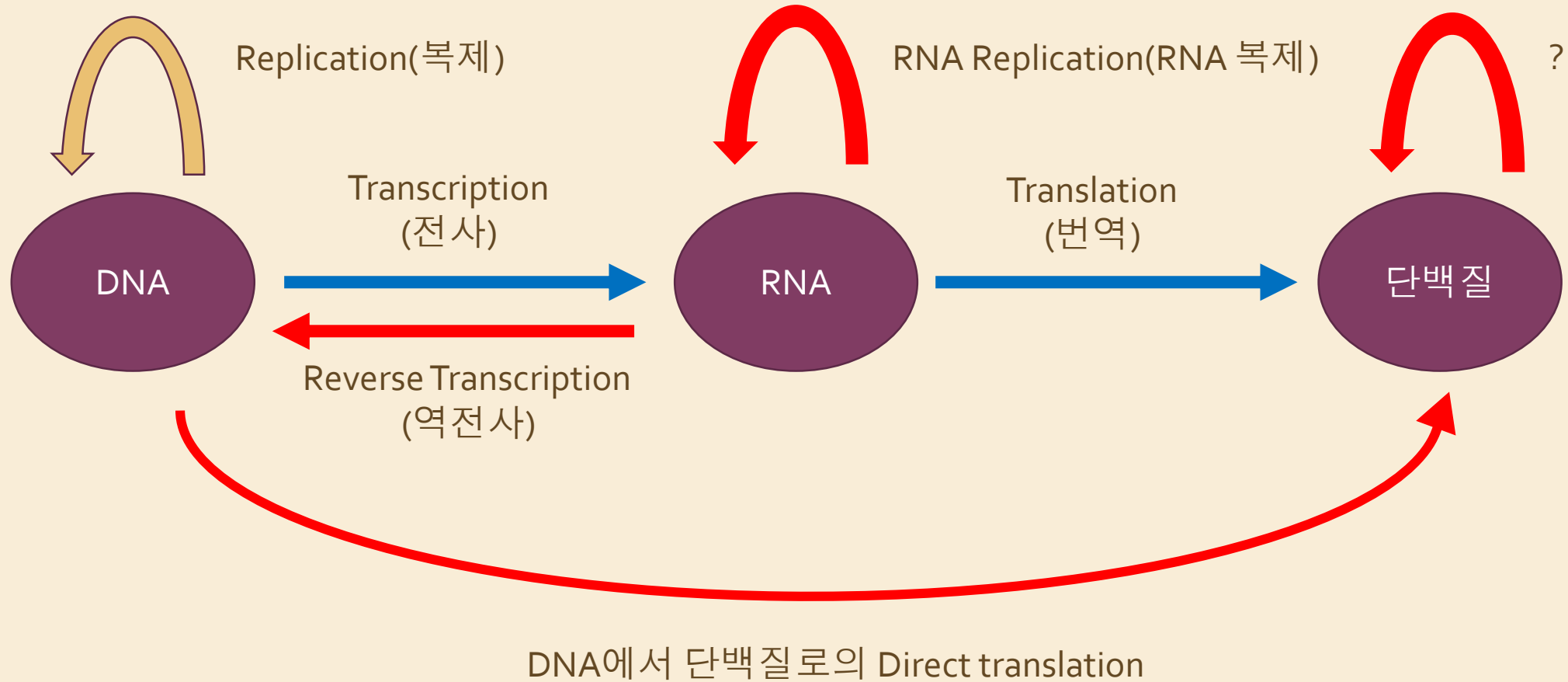
© 2011 Pearson Education, Inc.



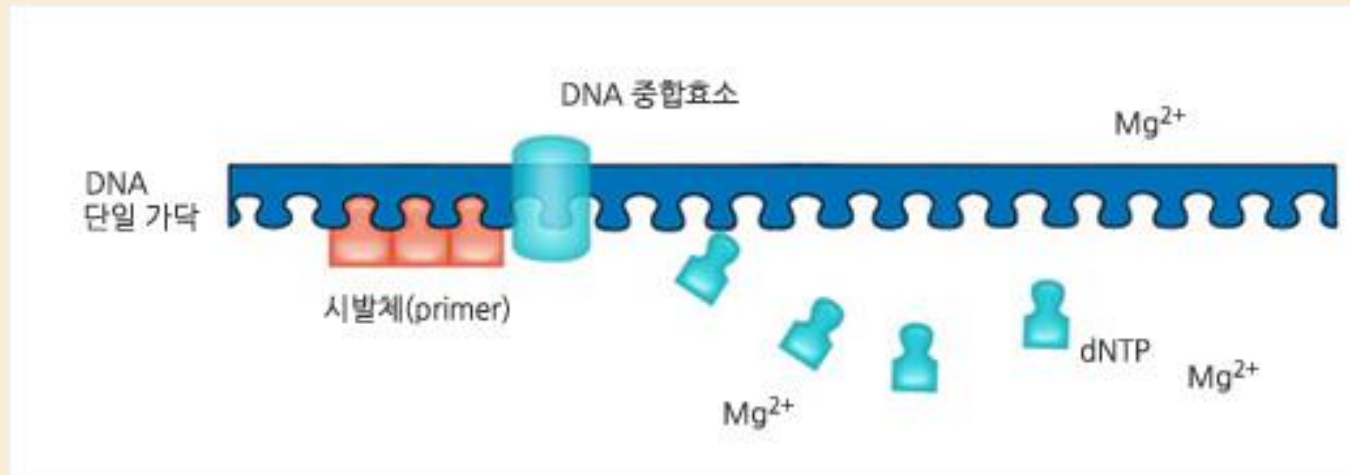
- A-T 결합은 이중결합
- C-G결합은 삼중결합

→ G-C결합의 비율은 primer 디자인 시 중요 고려사항

Central Dogma of molecular biology



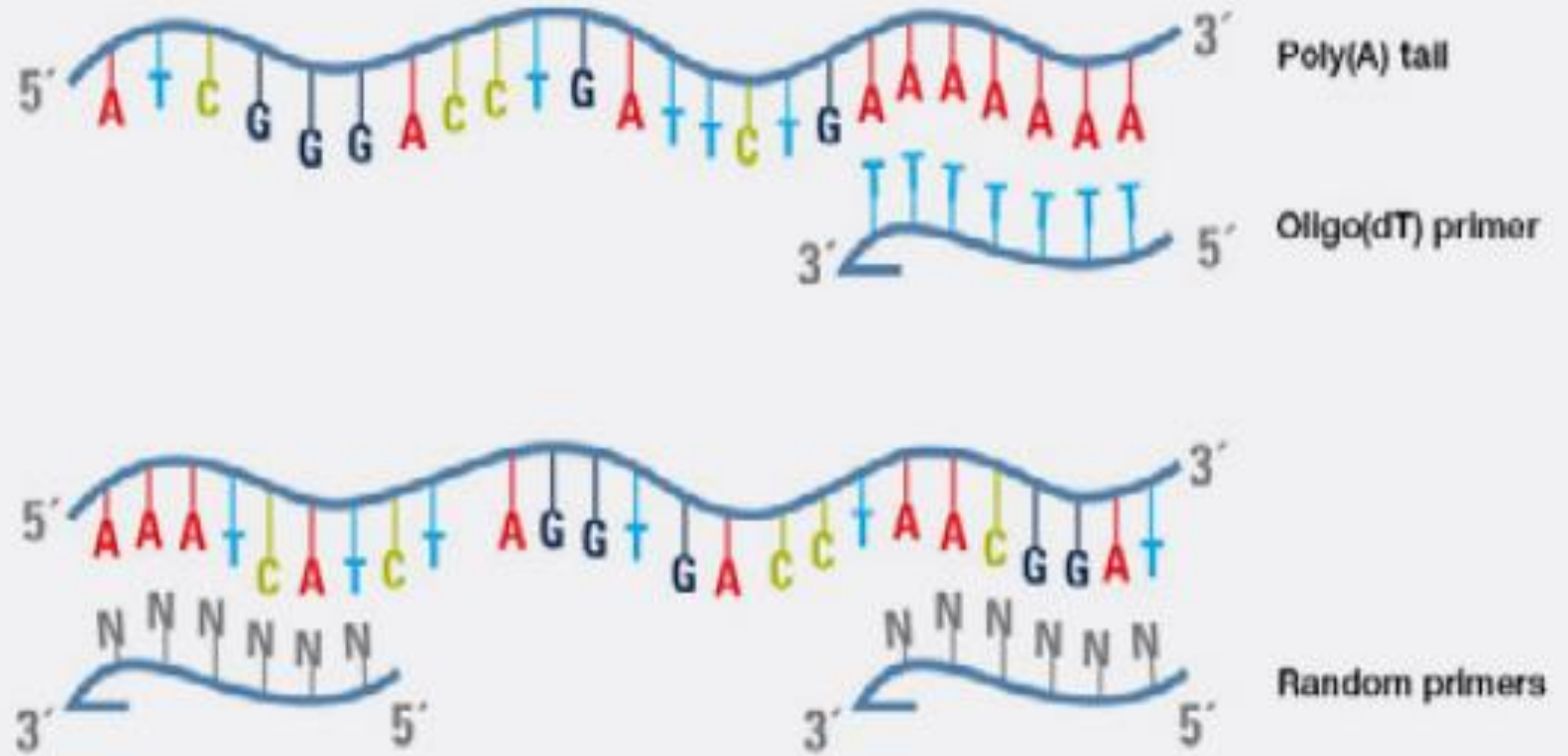
Replication process



- DNA template: 증폭 대상이 되는 DNA
- Primers : 증폭할 부분을 잡는 짧은 염기서열
- Taq polymerase : 열에 특별히 강한 DNA 합성 효소
(Taq polymerase : *Thermus aquaticus* 라는 온천에 사는 세균의 DNA polymerase, 72°C가 최적온도, 94°C에서도 안정함)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) : 유전자를 합성하는 재료가 되는 각 뉴클레오티드 염기들
- MgCl⁺² : MgCl⁺²은 dNTP와 복합체를 형성하여 효소활성, primer annealing 등에 관여

primer

Two most common primers used in reverse transcription



역전사 Reverse transcription

- 역전사효소 reverse transcriptase에 의해 complementary DNA (cDNA)를 합성하는 과정
- 단일 가닥 RNA single stranded RNA가 cDNA의 합성과정에서 주형 template으로 역할
- cDNA는 PCR amplification, cDNA library construction, RNA sequencing, 그 외 과정에서 template로 역할
- 적절한 reverse transcriptase를 선택하는 것은
 - 시료 내 low-abundance RNA의 증폭에 중요
 - high yield의 full-length cDNA 확보에 중요

Summary

- DNA replication
 - 체세포분열 mitosis 과정 중 진행
 - 진행 세포의 세포 주기 과정 중, 세포 하나가 두 개의 딸세포로 분열
 - 엄마세포와 동일한 유전체 정보 보유
- Transcription
 - DNA의 특정 부분의 유전정보가 RNA polymerase와의 작용에 의해 RNA(특히 mRNA)로 전달되는 과정
 - 단일 가닥의 DNA로부터 복사된 유전정보는 RNA에 상보적인 염기서열로 전달
 - RNA 합성 이후 풀렸던 DNA는 다시 두 가닥의 DNA로 원상 복귀
- Reverse Transcription
 - RNA로부터 reverse transcriptase라는 효소와의 작용에 의해 cDNA를 만드는 과정
 - Primer 부착부위 사이의 multiple amplification

PCR(Polymerase Chain Reaction)

- 중합효소 연쇄반응

- DNA의 원하는 부분을 복제하기 위함, 대량으로 증폭하는 기술

- 캐리 멀리스(Kary B. Mullis)에 의해 1983년 고안.

중합효소를 Klenow polymerase로 사용하는 PCR이 처음 공식 발표.

그러나 열에 약했기 때문에 매 주기마다 효소를 새로 넣어 주어야 했고 생성물의 최대 길이는 400bp에 불과.

- 1988년에 DNA 중합효소로 *Thermophilus bacteria*(극호열균)으로부터 DNA Polymerase인 *Taq*를 사용하여 효율을 높임

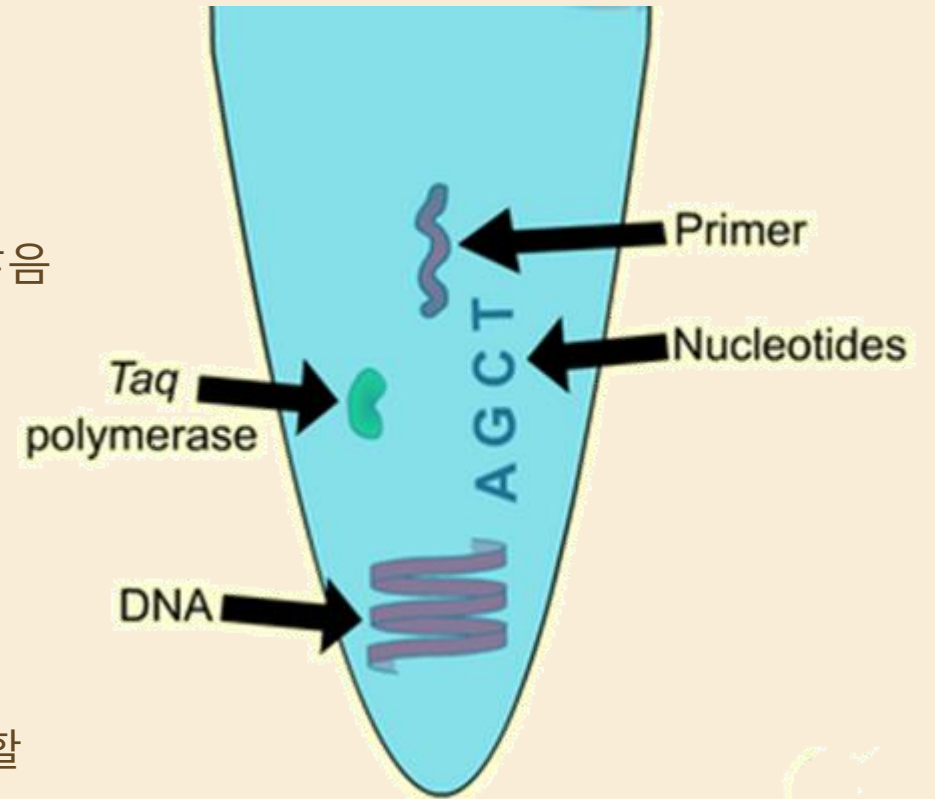


PCR이란?

- DNA 분자의 단일부위가 여러 번 복제되어, DNA 단편이 증폭되는 원리
- PCR은 매우 간단하면서 감도가 높고 응용범위가 넓어 현대 생명과학에서 가장 중요한 테크놀로지 중의 하나
 - cloning, gene expression analysis, genotyping, sequencing, mutagenesis
 - 유전질환 진단, 감염성 질환 진단, 암, 농업생명공학, 과학수사기법, DNA 칩 등
- PCR은 유전자 클로닝 보다 신속한 기술이면서 훨씬 덜 복잡하고, 하나의 분자로 부터 수백만 개의 복사본을 증폭시킬 수 있음
- → PCR의 개발은 유전학 연구의 새로운 지평을 연 선구자적 기술

PCR: Chemical Components

- Template DNA
 - Target region은 sequence를 알고 있어야 함
- *Taq* Polymerase
 - Thermal stable DNA polymerase → 고온에서도 inactivation되지 않음
- Primer
 - sequence-specific, Forward & Reverse, 20-30 bases
- dNTPs(Deoxynucleotide triphosphates)
 - 유전자 합성 재료인 뉴클레오티드 염기(dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- Buffer : 효소 활성화에 필요한 환경 제공, pH가 급하게 변하는것을 막는 역할
- $MgCl_2$:
 - enzyme cofactor. dNTP와 복합체를 형성하여 효소활성을 도움.
 - primer annealing 등에 관여





PCR 이론

1. DNA replication의 기본 원리
2. Reverse Transcription
3. PCR의 기본 원리

Remind

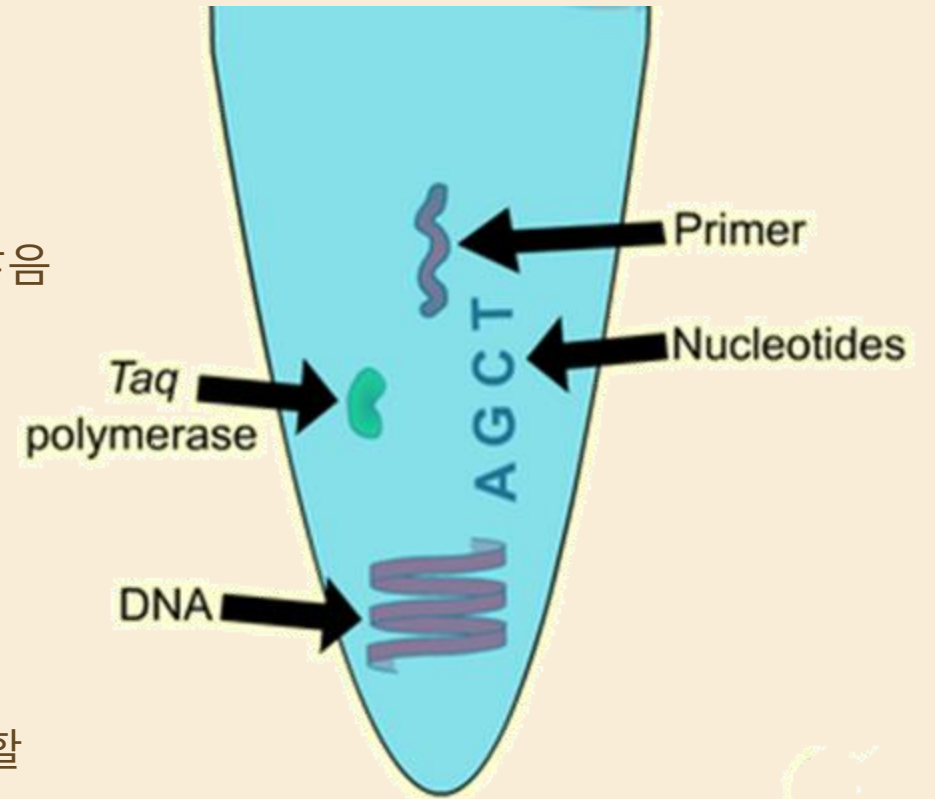
- DNA replication
 - 체세포분열 mitosis 과정 중 진행
 - 진행 세포의 세포 주기 과정 중, 세포 하나가 두 개의 딸세포로 분열
 - 엄마세포와 동일한 유전체 정보 보유
- Transcription
 - DNA의 특정 부분의 유전정보가 RNA polymerase와의 작용에 의해 RNA(특히 mRNA)로 전달되는 과정
 - 단일 가닥의 DNA로부터 복사된 유전정보는 RNA에 상보적인 염기서열로 전달
 - RNA 합성 이후 풀렸던 DNA는 다시 두 가닥의 DNA로 원상 복귀
- Reverse Transcription
 - RNA로부터 reverse transcriptase라는 효소와의 작용에 의해 cDNA를 만드는 과정
 - Primer 부착부위 사이의 multiple amplification

PCR이란?

- DNA 분자의 단일부위가 여러 번 복제되어, DNA 단편이 증폭되는 원리
- PCR은 매우 간단하면서 감도가 높고 응용범위가 넓어 현대 생명과학에서 가장 중요한 테크놀로지 중의 하나
 - cloning, gene expression analysis, genotyping, sequencing, mutagenesis
 - 유전질환 진단, 감염성 질환 진단, 암, 농업생명공학, 과학수사기법, DNA 칩 등
- PCR은 유전자 클로닝 보다 신속한 기술이면서 훨씬 덜 복잡하고, 하나의 분자로 부터 수백만 개의 복사본을 증폭시킬 수 있음
- → PCR의 개발은 유전학 연구의 새로운 지평을 연 선구자적 기술

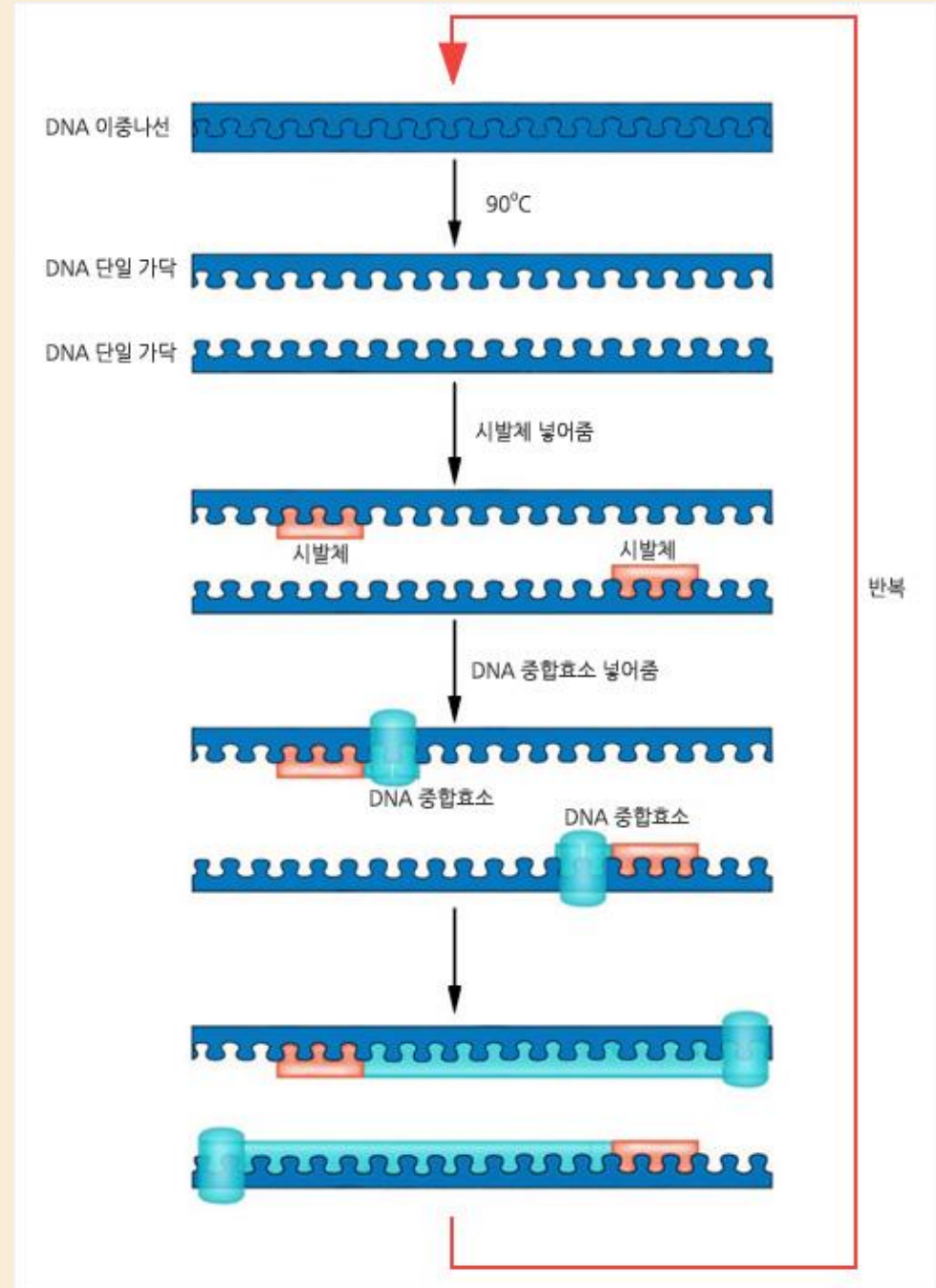
PCR: Chemical Components

- Template DNA
 - Target region은 sequence를 알고 있어야 함
- Taq Polymerase
 - Thermal stable DNA polymerase → 고온에서도 inactivation되지 않음
- Primer
 - sequence-specific, Forward & Reverse, 20-30 bases
- dNTPs(Deoxynucleotide triphosphates)
 - 유전자 합성 재료인 뉴클레오티드 염기(dATP, dTTP, dCTP, cGTP)
- Buffer : 효소 활성화에 필요한 환경 제공, pH가 급하게 변하는것을 막는 역할
- MgCl₂ :
 - enzyme cofactor. dNTP와 복합체를 형성하여 효소활성을 도움.
 - primer annealing 등에 관여



PCR process

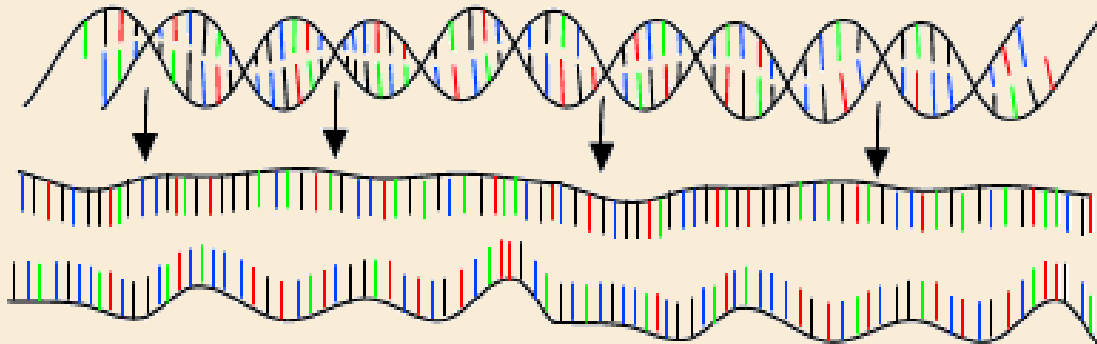
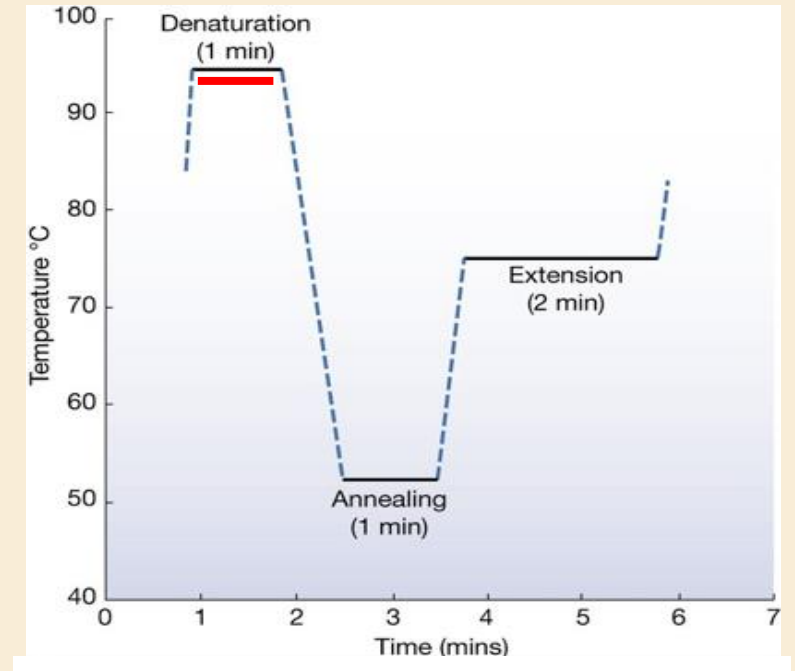
- 1단계 : DNA Denaturation Step
 - DNA double strand 분리 ($92^{\circ}\text{C}\sim 95^{\circ}\text{C}$)
 - $90^{\circ}\text{C}\sim 96^{\circ}\text{C}$ 로 가열하여 dsDNA를 ssDNA로 분리
- 2단계 : Annealing Step
 - DNA Primer가 DNA에 결합하는 단계
 - $50^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ 에서 진행, 30sec~1min
- 3단계 : Extension Step
 - DNA Polymerase에 의해 DNA복제가 일어나는 단계
 - $70^{\circ}\text{C}\sim 74^{\circ}\text{C}$ 에서 시행, 1min ~ 1min 30sec



1단계 : DNA Denaturation Step

1. Denaturation of dsDNA template

- Temperature : 92~95°C
- Double stranded DNA → Single stranded DNA
 - DNA polymerase는 single strand DNA를 기질로 하는 효소
 - 고온에서 single strand DNA로 풀어주는 과정이 필요



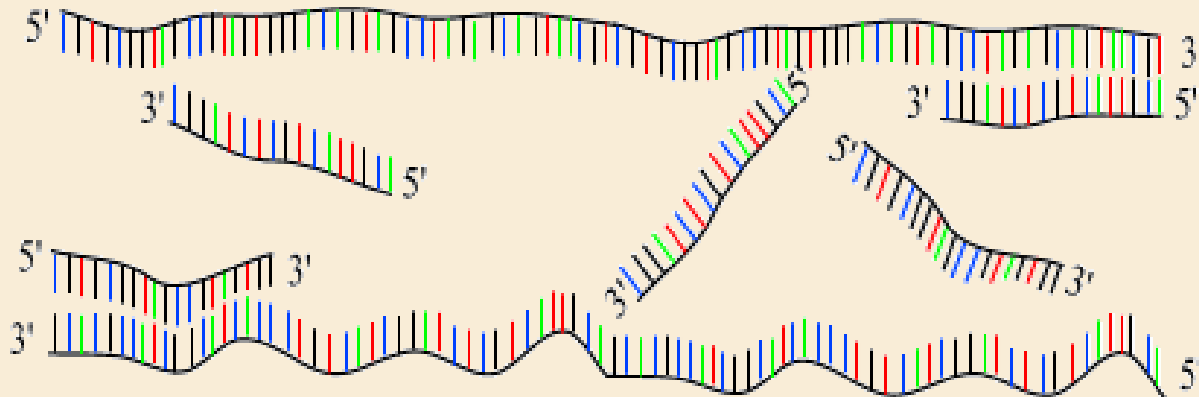
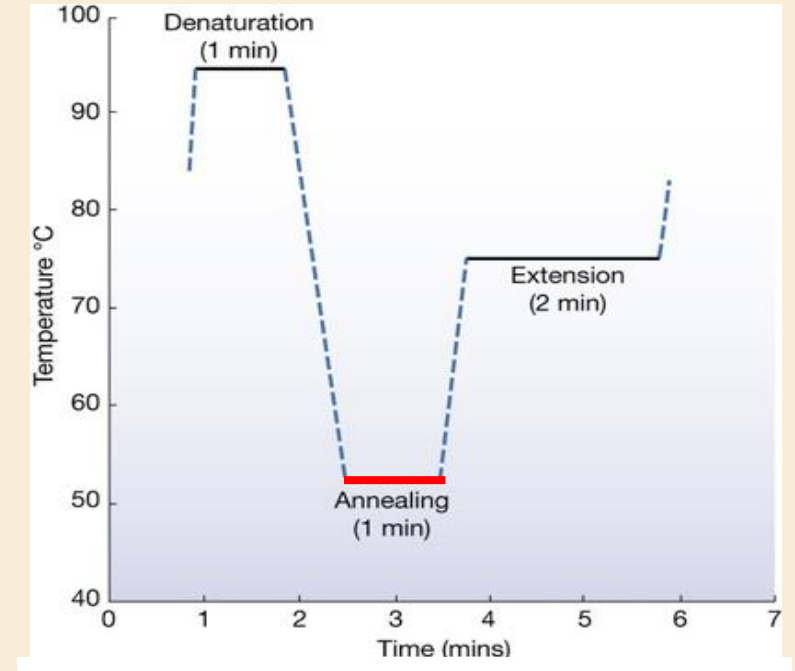
Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

2단계 : Annealing Step

2. Annealing of primers

- Temperature : 50~65°C
 - Primer가 상보적 서열을 갖는 DNA 특정 부위에 결합
 - 낮은 온도에서는 서열이 완벽히 일치하지 않아도
 - 즉, 일정 부분 mismatch가 있어도 template와 primer binding
- 비교적 높은 annealing temp.로 primer와 template간의 비특이적 결합을 낮춤



Step 2 : annealing

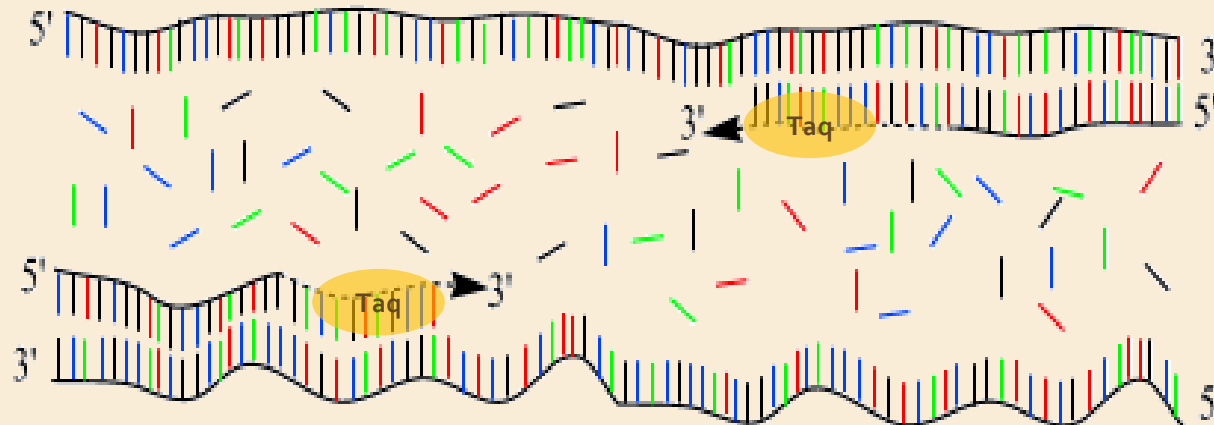
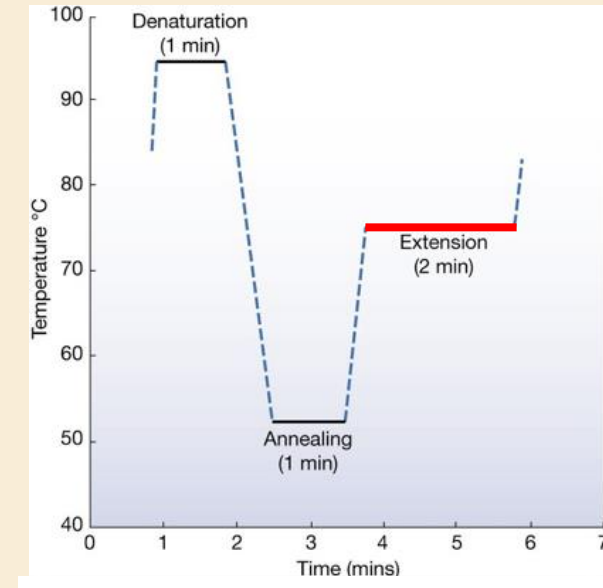
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

3단계 : Extension Step

3. Extension of dsDNA molecules

- Temperature : 70~74°C
- Holding Time : 0.5min ~ 3min
- *Taq* polymerase 활성화activation
 - double-stranded site (template + primer) 인식 → extend

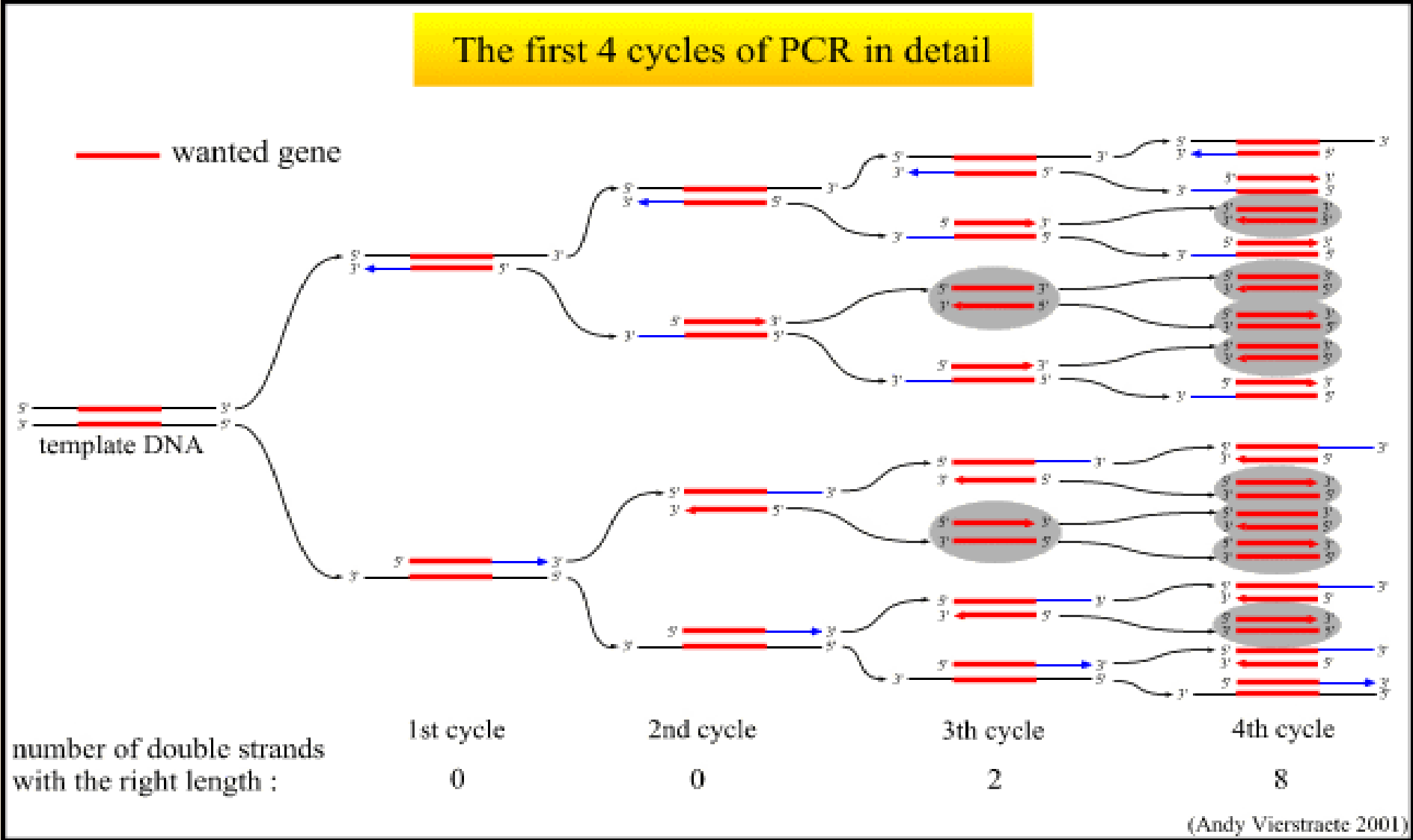


Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

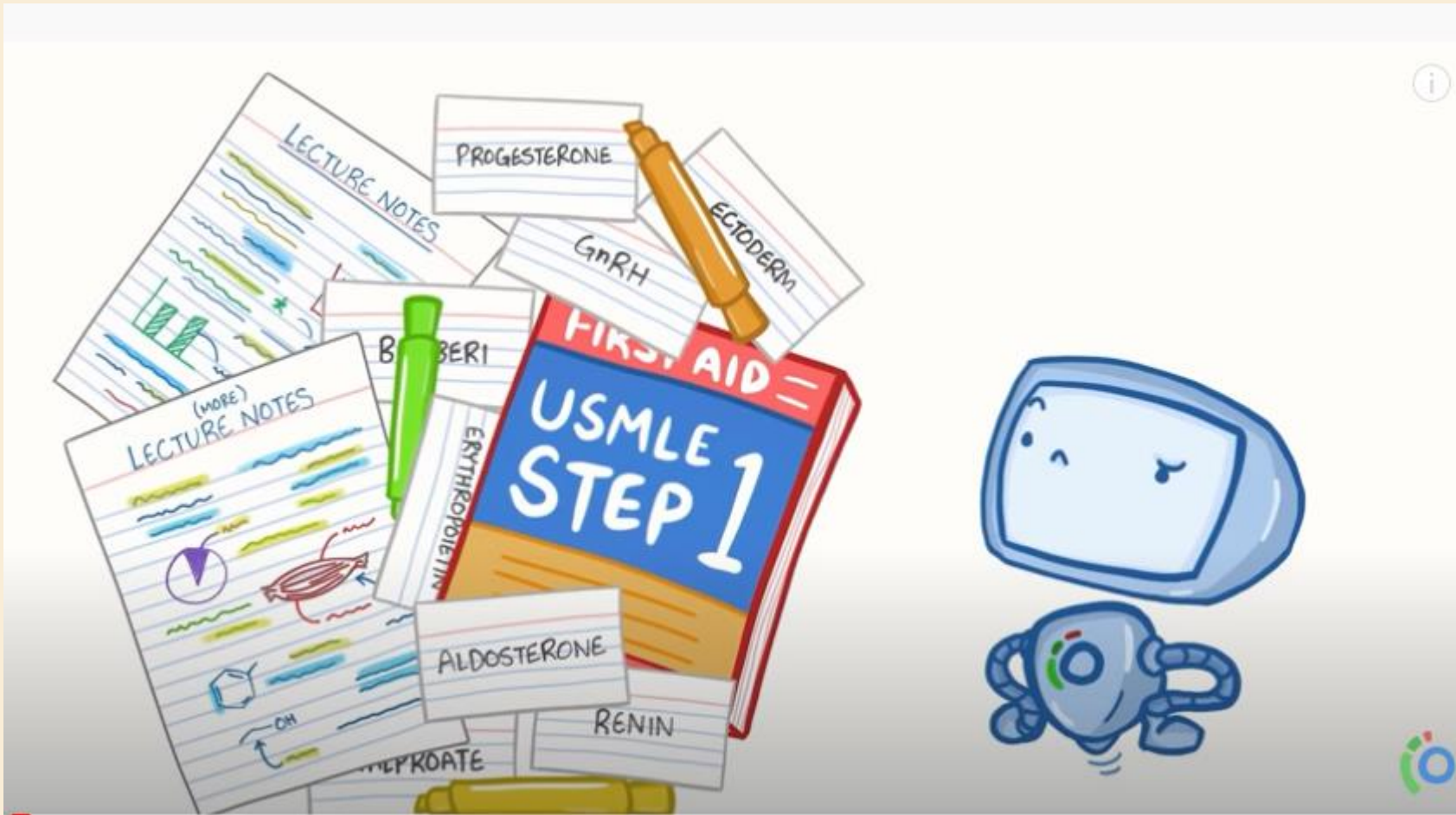


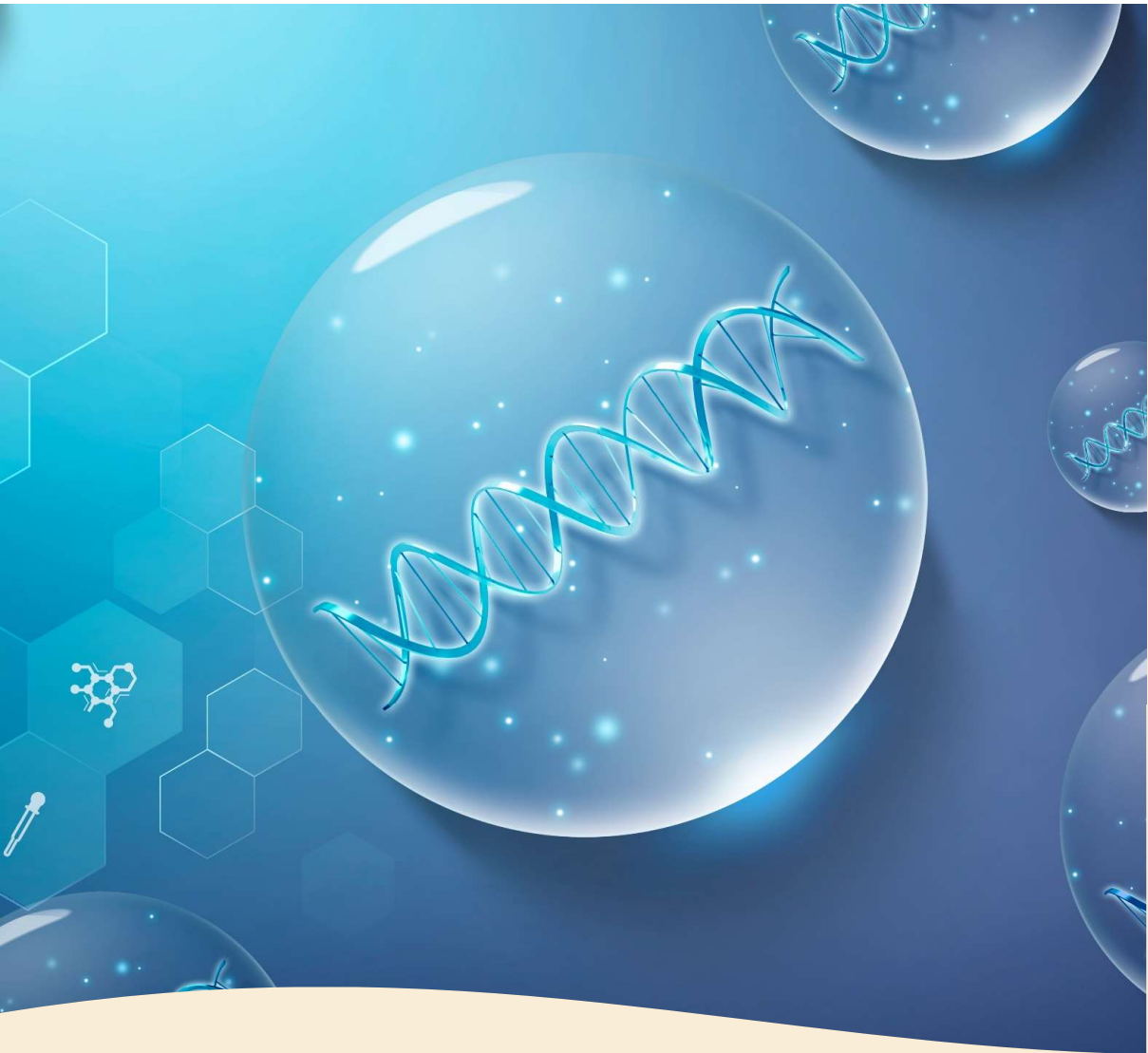
PCR process



PCR process

- <https://youtu.be/gubLAtn2o4s>
- Osmosis Prime: <http://osms.it/more>

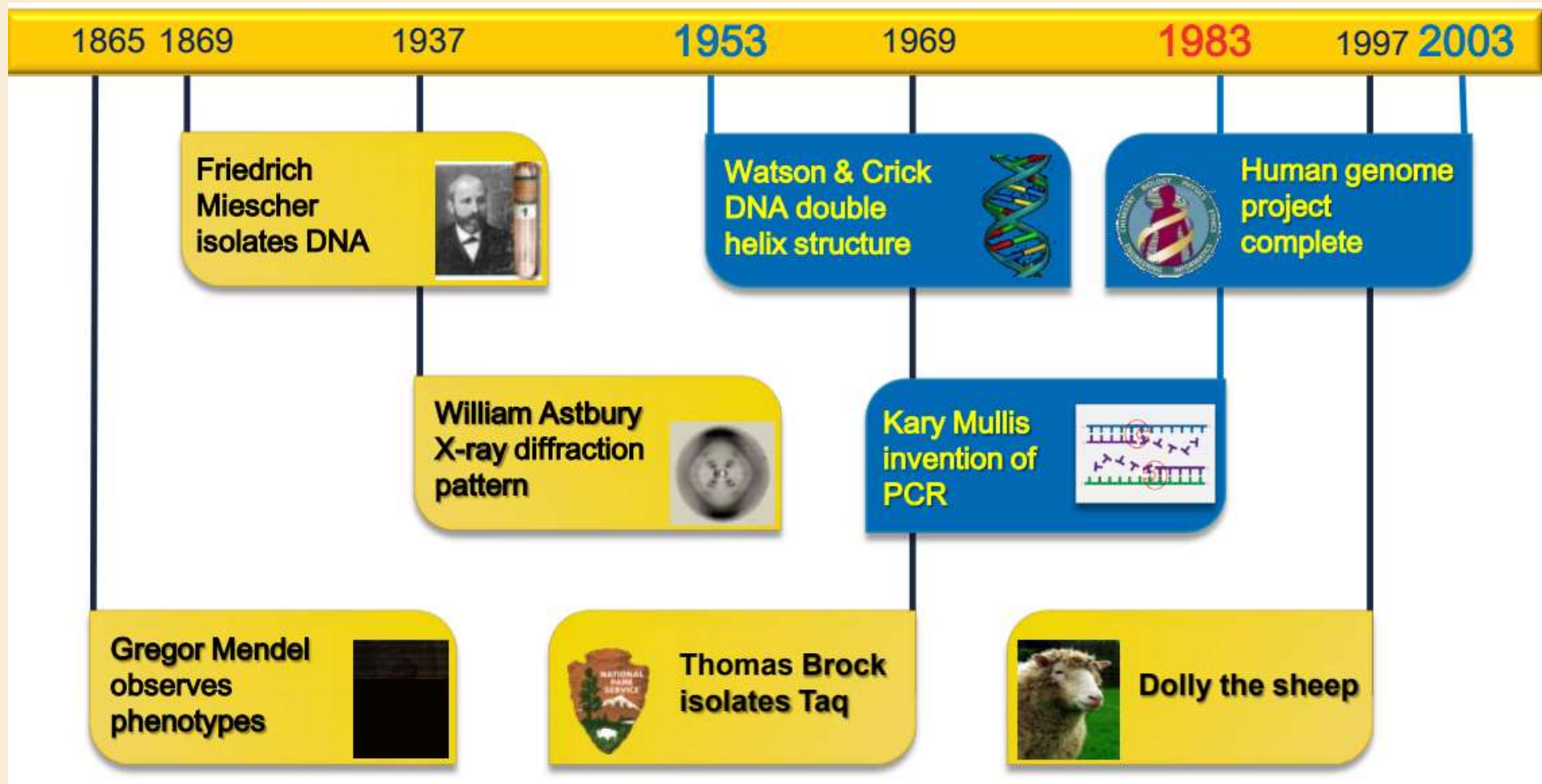




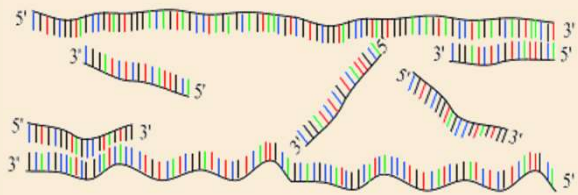
PCR 이론

1. PCR의 종류
 - (1) End-point PCR
 - (2) Real-time PCR

Molecular analysis의 역사



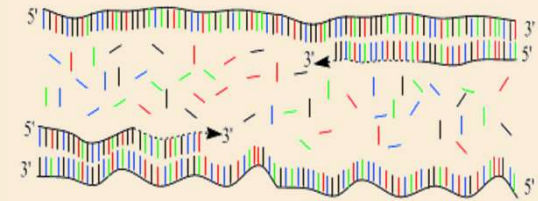
PCR_summary



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's

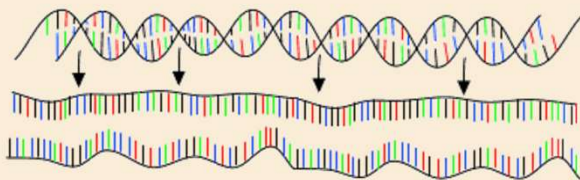
(Andy Vierstraete 1999)

Annealing of primers

·Primers bind to their complementary sequences

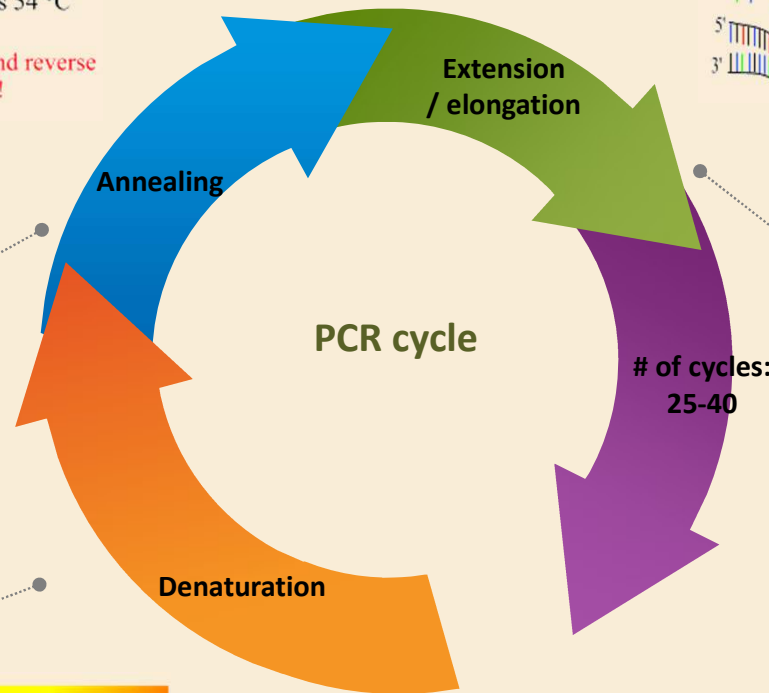
Denaturation of dsDNA template

·Double strand → Single strand DNA



Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C



Extension of dsDNA molecules

·DNA polymerase binds to the annealed primers and extends DNA at the 3' end of the chain

실험과정 workflow

Prepare the PCR mix

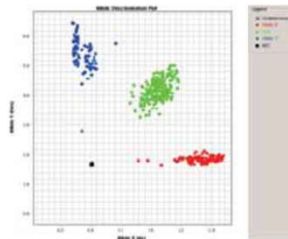


Perform the PCR



Read the plate

Analyze the results



Sample로부터 RNA/DNA 추출

cDNA 합성

Sequence specific primer 제작

PCR component mixture 제작

ePCR

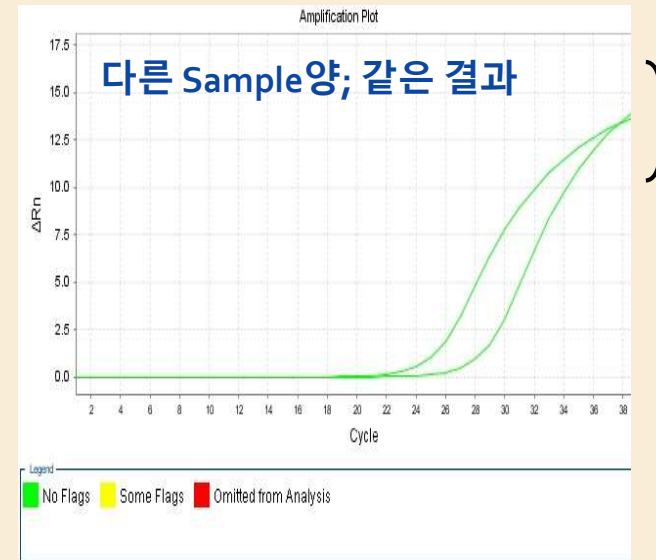
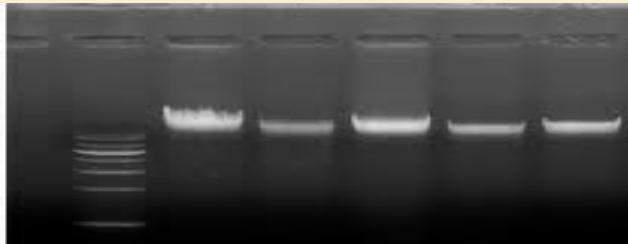
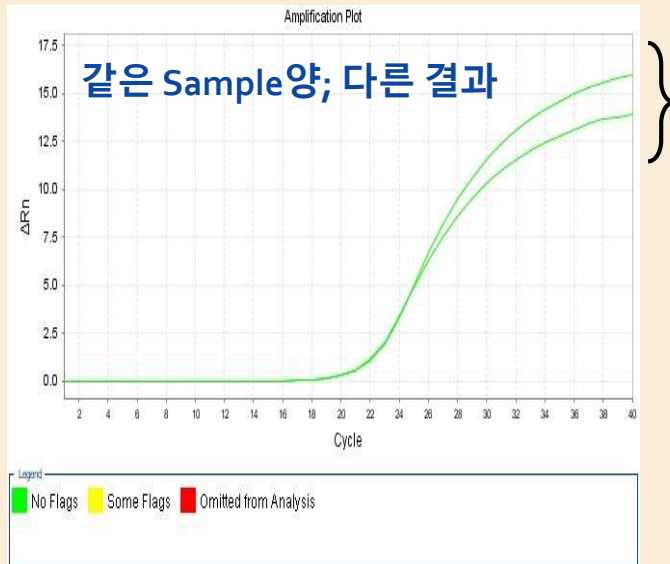
전기영동

qPCR

S/W analysis

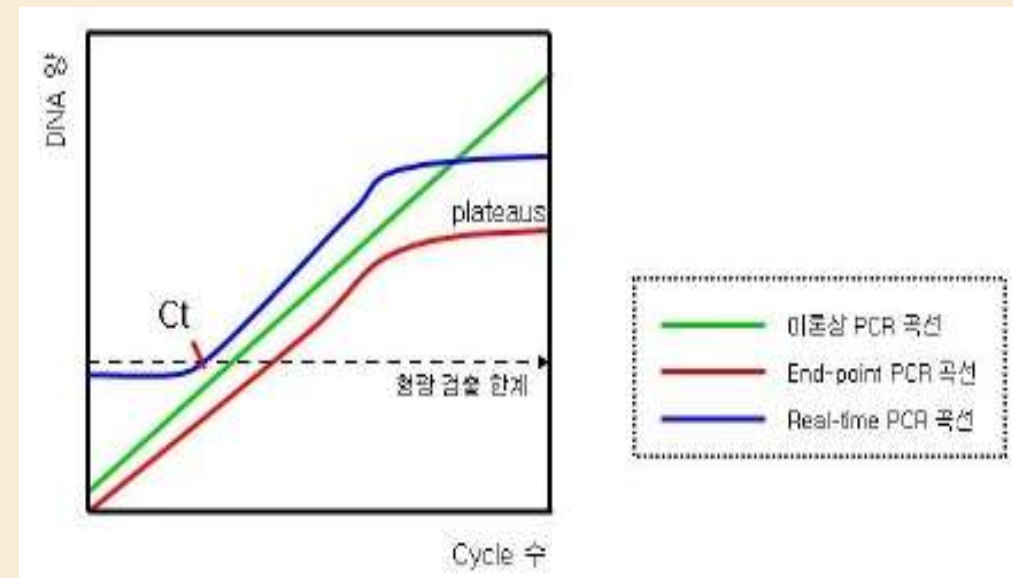
ePCR

- PCR은 이론적으로 2^n 으로 DNA를 증폭하지만 일정 시간이 지나면 1) enzyme 활성저하, 2) dNTP 고갈 등으로 더 이상 증폭이 일어나지 않음 → 최종 산물의 비교만으로 sample 양에 비례한 정량 PCR 불가능



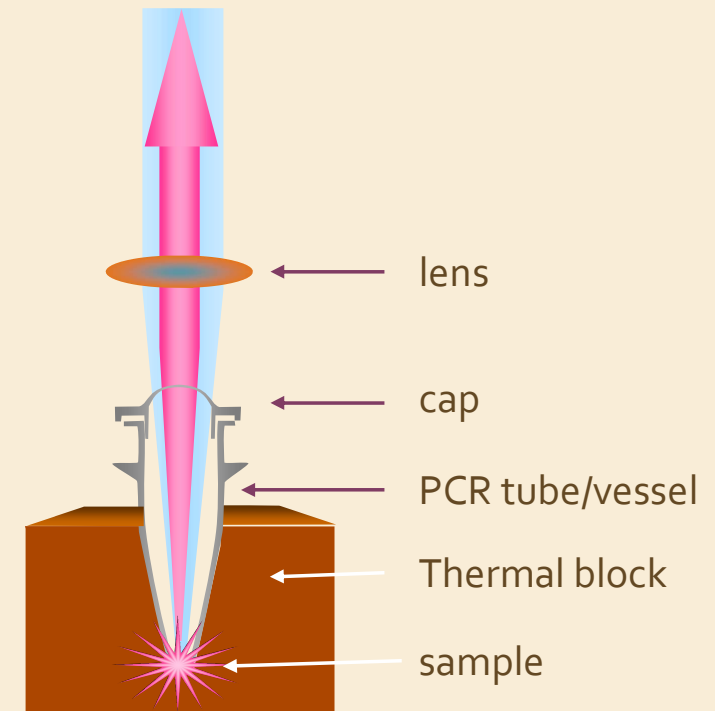
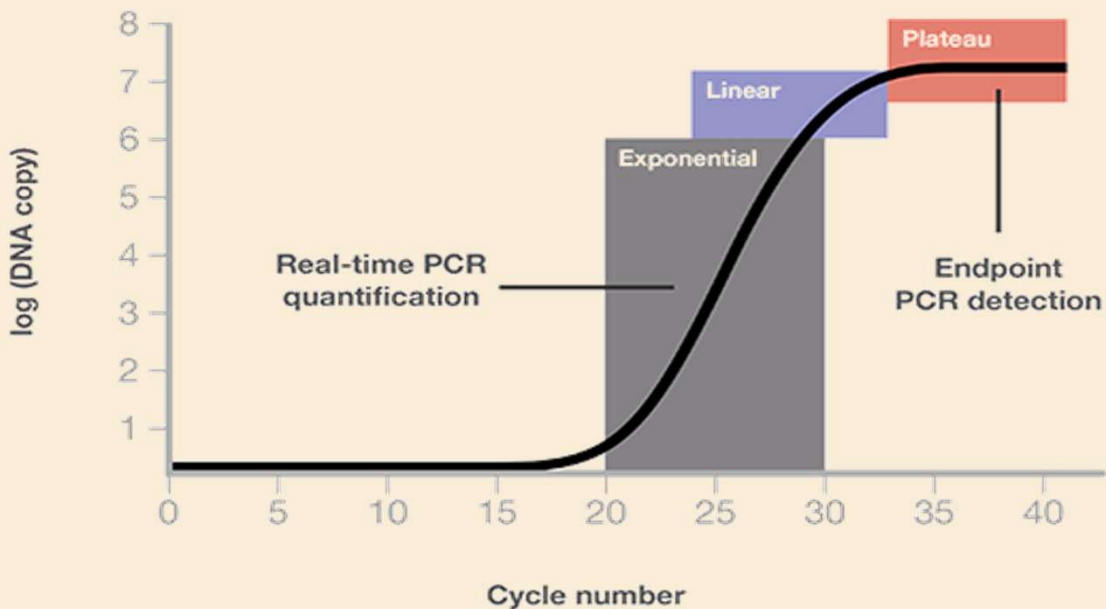
Real Time PCR

- 증폭 산물에 형광을 붙여, cycle 마다 실시간으로 변화하는 형광량을 측정하여 sample 변화 값을 모니터링하고 분석하여 정량이 가능하도록 한 PCR
- 장점
 - 각 cycle 마다 증폭된 PCR 산물의 양을 정확하게 측정
 - High sensitivity & precision
 - High throughput
 - Multiplex analysis
 - 2개 이상의 형광프로브Probe 사용
 - 여러 target 부위를 동시 확인 가능



qPCR system

- Thermal Block (PCR Block)
- 광원 Light source
- 검출모듈 detection module
- 필터 filter



ePCR vs qPCR

- End-point PCR(= endpoint assay)
 - 특정 cycle이 모두 완료된 후(PCR이 끝난 후) PCR product의 증폭량을 검출
- Real-time PCR(=qPCR)
 - PCR이 진행되는 과정동안 실시간으로 증폭과정을 모니터링할 수 있음
 - PCR 과정 동안 분석데이터 수집 가능
 - real-time PCR 결과는 target이 처음 검출된 순간 이후부터 모니터링이 가능
→ Target gene의 copy수가 높을수록 빠른 검출이 가능

ePCR

정성분석 (qualitative analysis)
간단한 결과(+/-)

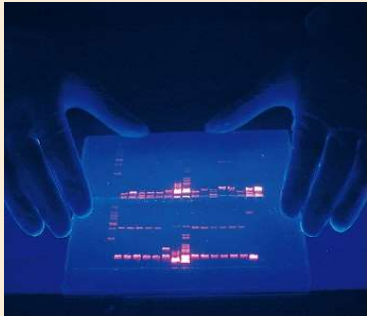
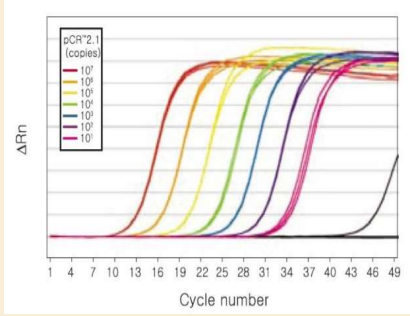
PCR product 검출
Genotyping
Pathogen 검출

qPCR

정량분석 (quantitative analysis)
다양한 분석 결과


절대/상대정량
Gene expression
SNP
miRNA & small RNA

ePCR vs qPCR

	End point PCR	Real time PCR
분석	End point	Logarithmic Phase
Application 차이	정성분석 (Band의 Intensity로 발현 유무 확인)	정량분석 (발현 양을 수치로 확인 가능) 민감도 높고 정확한 실험이 필요할 때
특징	간편하고 쉬움 전기영동 <ul style="list-style-type: none"> target gene의 유무 비특이적 증폭 유무 	별도의 형광시약 필요 실시간 모니터링
데이터		

PCR plasticware

- Learn how to seal a Thermo Scientific PCR plate
- <https://youtu.be/250On6W5gU0>

A blurred background image of a laboratory setting, likely a PCR workstation. The text is overlaid on this background.

Learn how to seal a
Thermo Scientific PCR plate



Detection chemistry

1. SYBR Green
2. TaqMan probe

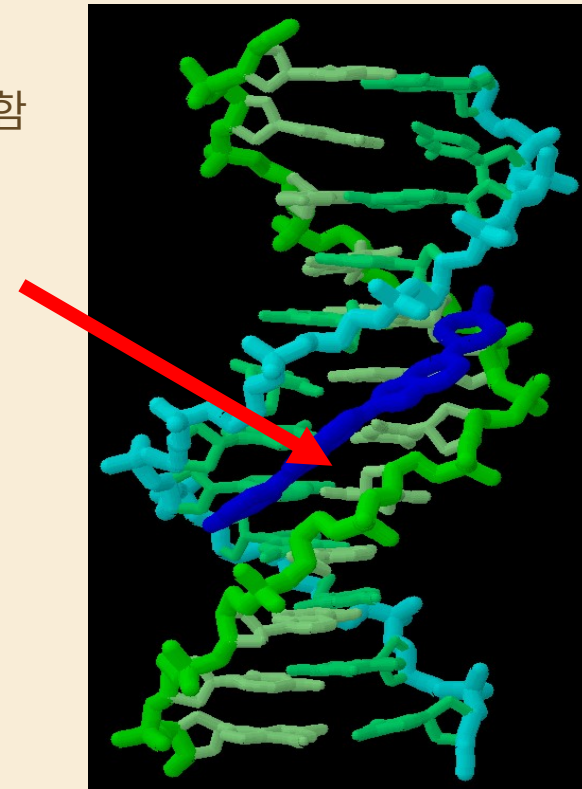
Detection chemistry

- SYBR Green Dye Chemistry (Generic dye based)
 - high specific, dsDNA에 binding
 - PCR분석 동안 축적된 dye의 양(PCR product의 양)을 측정
 - 모든 dsDNA를 측정 → non-specific reaction product도 검출
 - 정확한 결과 측정을 위하여 세심한 method setting이 필요
- TaqMan[®] Chemistry (Probe based)
 - 형광프로브 fluorogenic probe를 사용
 - PCR분석 동안 축적된 특정 PCR product를 검출
 - fluorogenic 5' nuclease assay

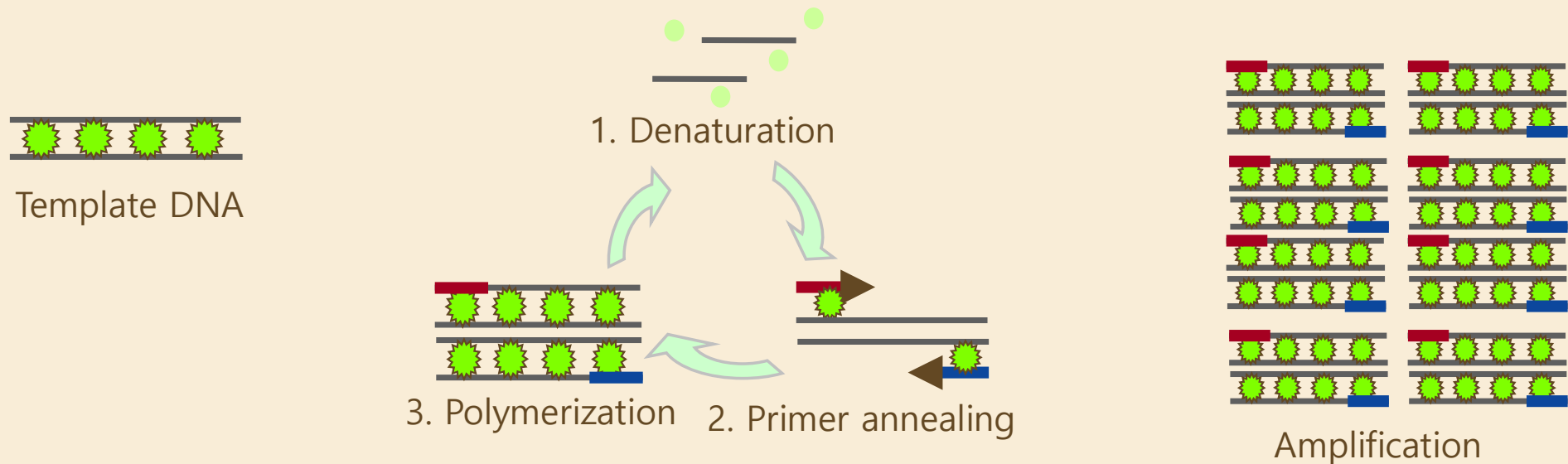


SYBR Green

- Double strand DNA에 결합한 형광을 측정함으로써 PCR 증폭산물을 측정
- Minor Groove에 결합
- dsDNA에 붙을 때에만 형광을 발산 → 결합하지 않은 Dye는 signal을 내지 못함
- PCR cycle동안 생성된 double stranded New copy에 binding
- Fluorescence intensity : dsDNA 상태의 PCR product 생산량 모니터링
- 프로브를 필요로 하지 않음 : reduces assay setup & running costs
- Sequence non-specific binding을 하기 때문에 미세 정량분석 부적합 (false positive signals 발생)
- Melting Curve 분석 : Nonspecific한 증폭 여부 확인



SYBR Green dye_summary



- dye가 모든 dsDNA에 결합한다는 점에서 특이성이 다소 떨어진다. primer dimer의 의한 신호 및 비특이적으로 생성된 PCR 산물 모두 검출이 되게 되어 잘못된 형광 신호를 검출하게 된다. primer의 디자인 및 시약의 품질이 이러한 비특이적인 산물이 나타나는 것을 방지해야 한다.
- DNA binding dye의 가장 큰 장점은 melting curve 분석이 가능하여 실험의 특이성을 확인할 수 있다는 것이다.

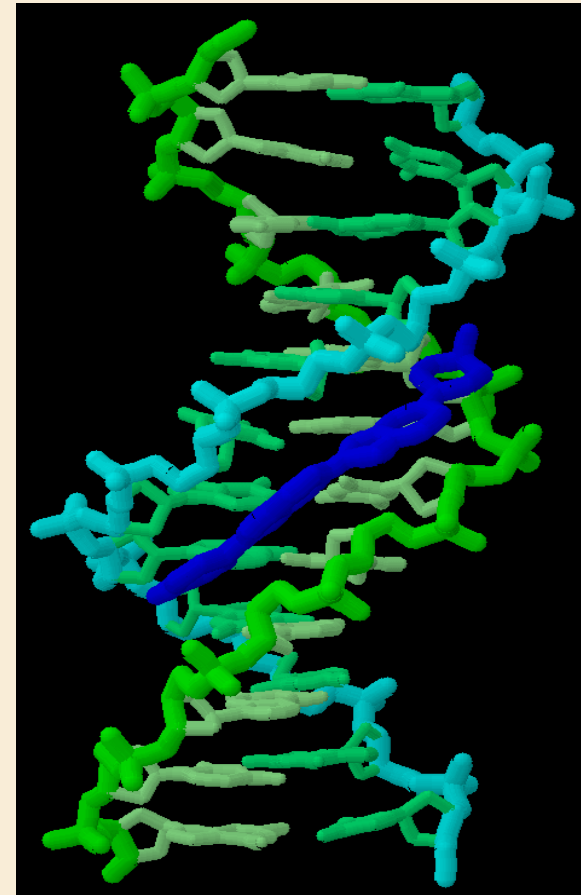


Detection chemistry

1. SYBR Green
2. **TaqMan probe**

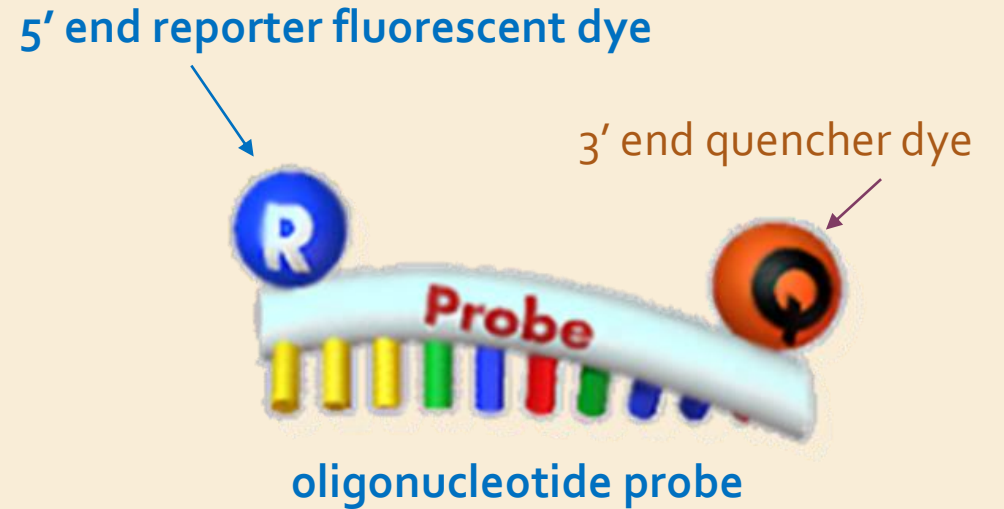
SYBR Green

- Double strand DNA에 결합한 형광을 측정함으로써 PCR 증폭산물을 측정
- Minor Groove에 결합
- dsDNA에 붙을 때에만 형광을 발산 → 결합하지 않은 Dye는 signal을 내지 못함
- PCR cycle동안 생성된 double stranded New copy에 binding
- Fluorescence intensity : dsDNA 상태의 PCR product 생산량 모니터링
- probe를 필요로 하지 않음 : assay setup & running costs 절감
- Sequence non-specific binding을 하기 때문에 미세 정량분석 부적합 (false positive signals 발생)
- Melting Curve 분석 : Nonspecific한 증폭 여부 확인

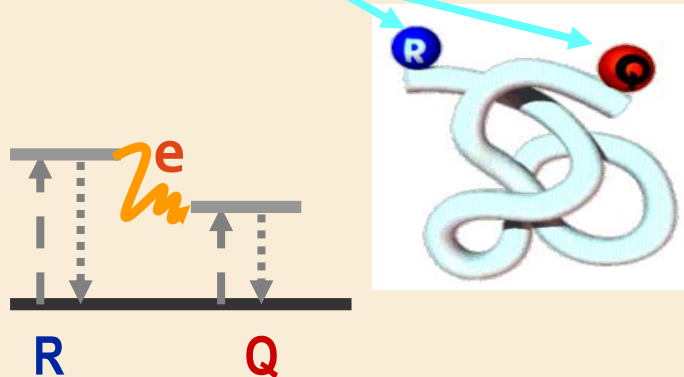


TaqMan[®] Probe

- target DNA 염기서열에 결합
 - 고비용이나, 검출 특이성이 높다.
- 두 가지 형광 dye 결합
 - 5' 말단 - R: Reporter dye
 - 3' 말단 - Q: Quencher dye
- Probe는 PCR반응을 저해하면 안됨
 - 3' terminal blocked : polymerase에 의해 증폭X



external light energy



fluorescence resonance energy transfer(FRET)



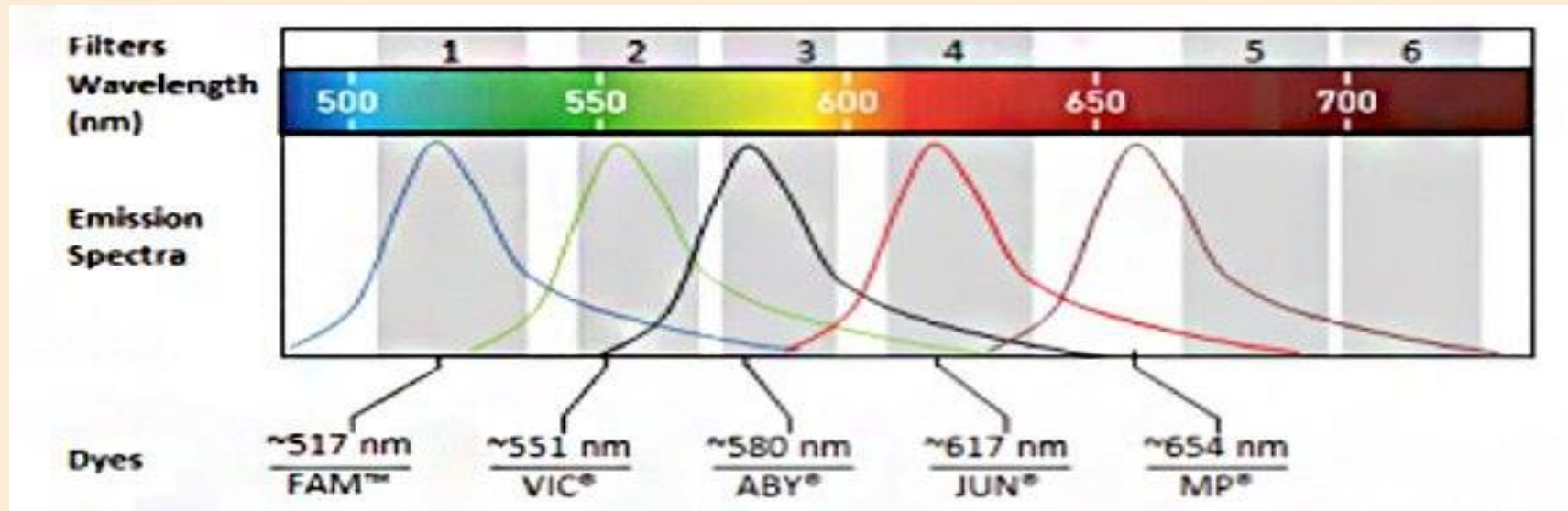
TaqMan probe dye

Reporter dye

FAM
JOE
TET
HEX
VIC

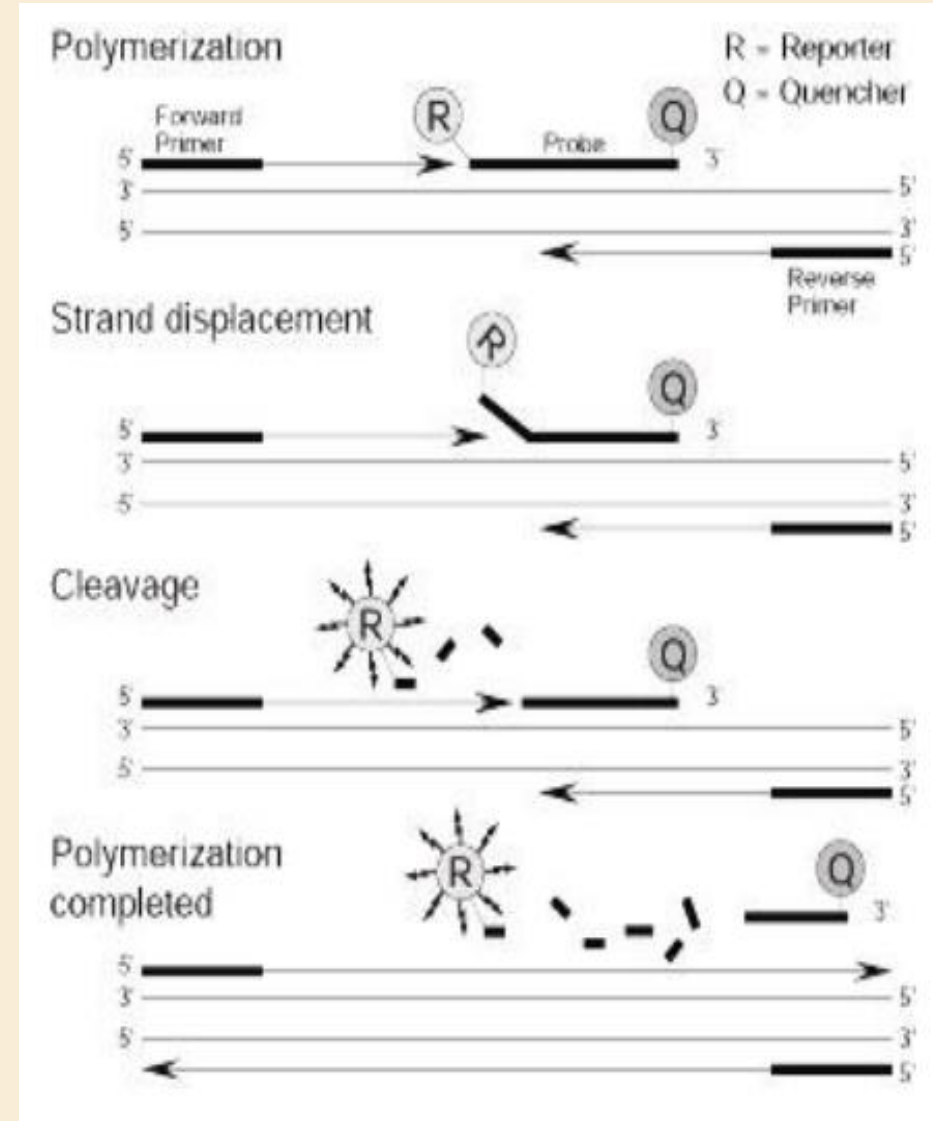
Quencher dye

DABCYL
TAMRA
ROX
BHQ



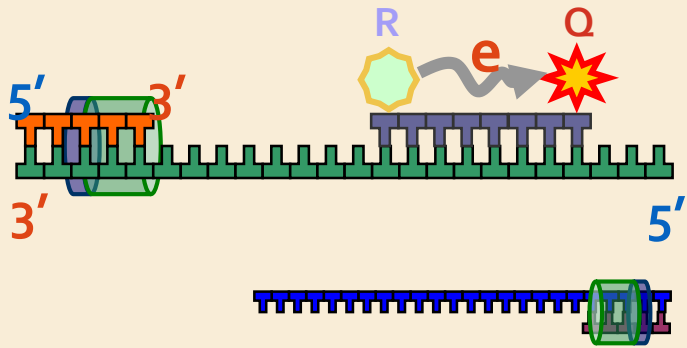
TaqMan[®] probe 작용 원리

- Probe의 기본 상태
 - FRET 현상으로 reporter dye의 fluorescence emitting이 근접한 quencher dye에 의해 억제
- Primer site의 downstream 부근에 probe annealing
 - Taq DNA polymerase의 5' nuclease activity에 의해 probe cleavage 발생
- cleavage of the probe
 - reporter dye와 quencher dye의 분리 → reporter dye signal의 증가
- Polymerization
 - Target strand로부터 probe 제거 → primer extension → new strand
- 각 cycle마다 Probe로부터 reporter dye 완전 분리
 - 생성된 amplicon에 따라 fluorescence intensity 증가

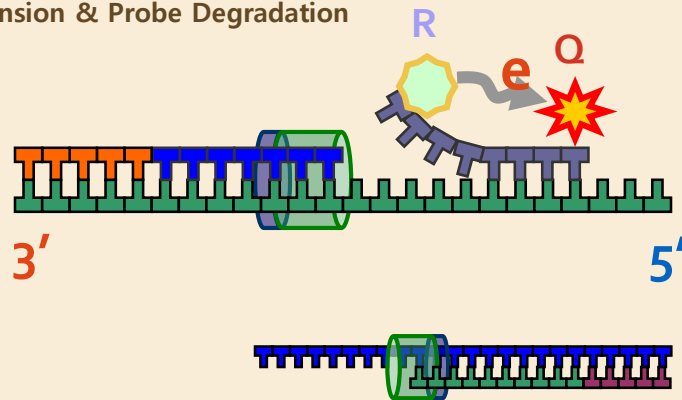


Taq Polymerase Activity: 5'-Nuclease

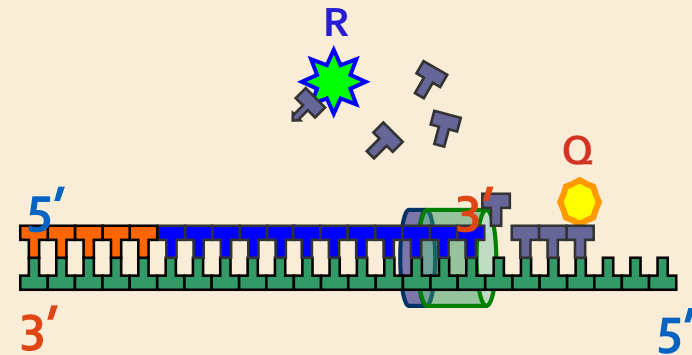
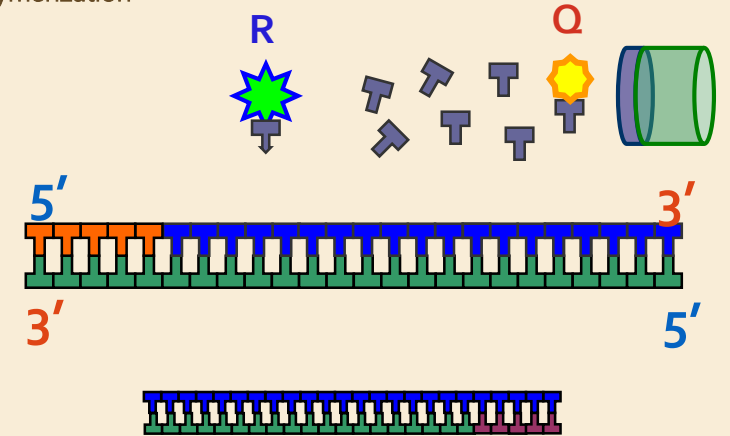
1. Denaturation & Annealing



2. Primer Extension & Probe Degradation

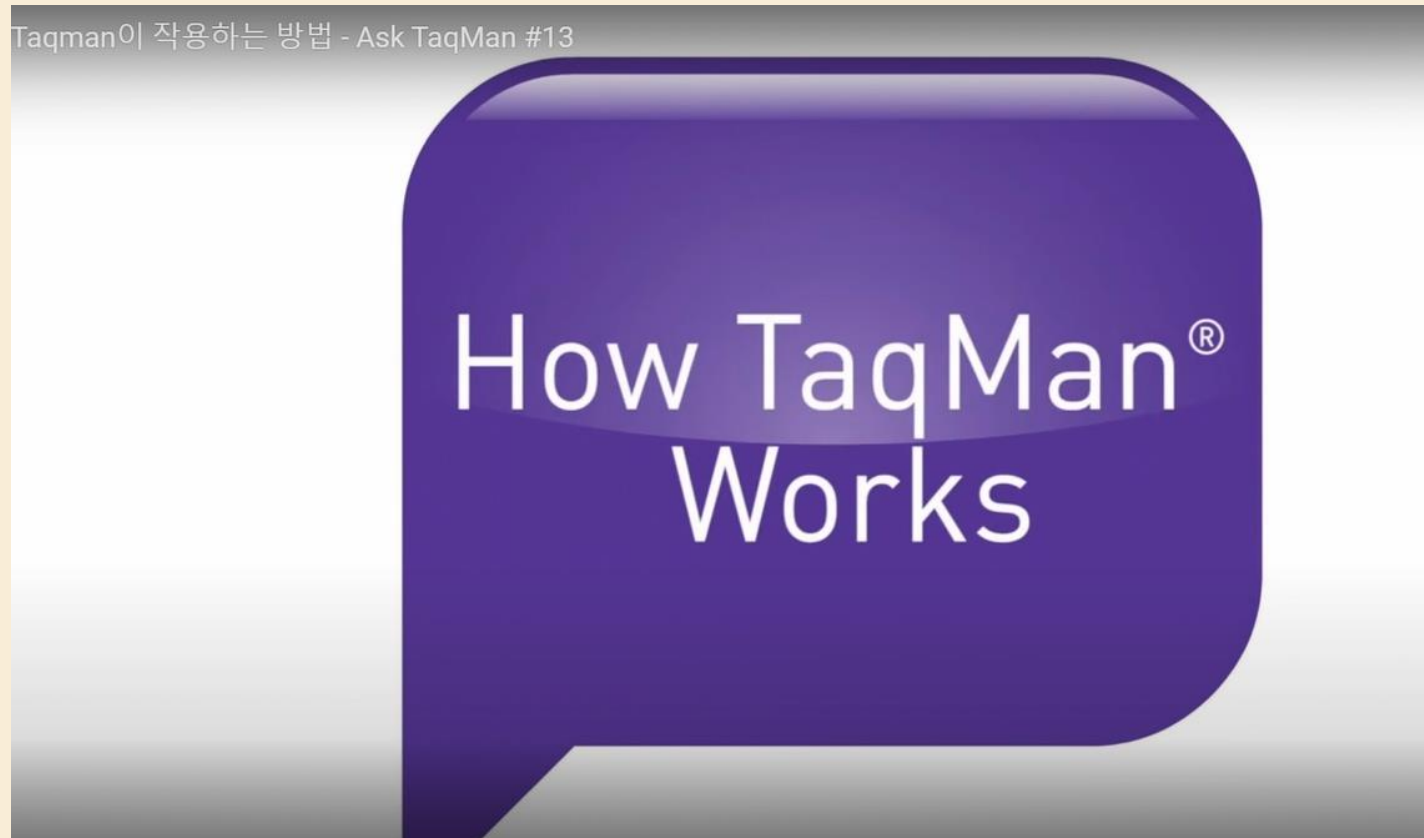


3. Polymerization



TaqMan[®]이 작동하는 방법

- Ask TaqMan #13, Thermo Fisher Scientific
- <https://youtu.be/LlyewnZ-tZ4>



TaqMan[®]의 장단점

[장점]

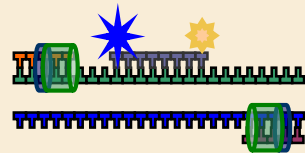
- probe 와 target의 Specific hybridization
- Probe에 다양한 색깔의 reporter 형광 라벨을 붙일 수 있음
 - 한 개의 반응 tube에서 두 개 이상의 sequence에 대한 amplification 가능
 - multiplex analysis
- Post-PCR processing이 필요 없음 → assay labor & material cost 절감

[단점]

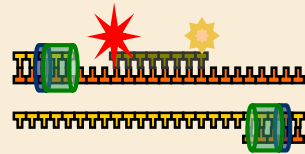
- Sequence별로 probe를 각기 제작해야 함

Multiplex Assay

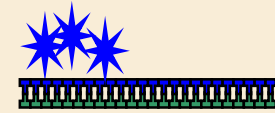
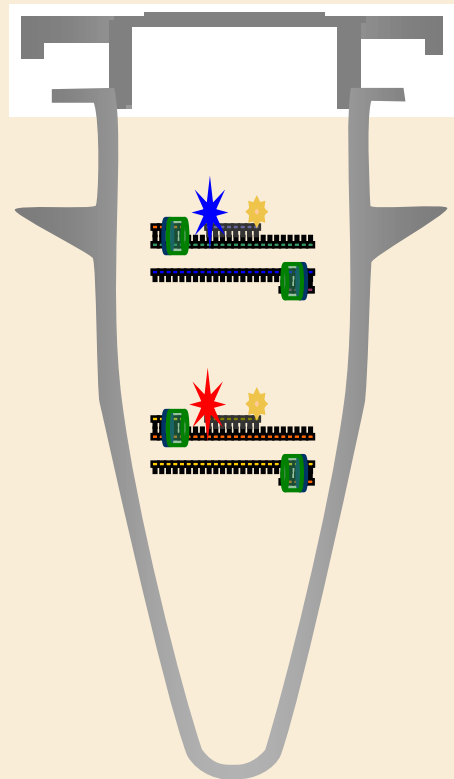
- 단일 PCR tube 안에서 하나 이상의 primer-probe set가 mixture로 동시에 존재, PCR 반응을 하는 것



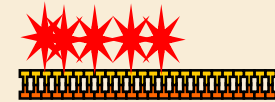
Blue Gene



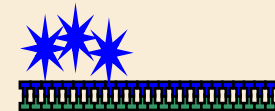
Red Gene



Blue Gene Only



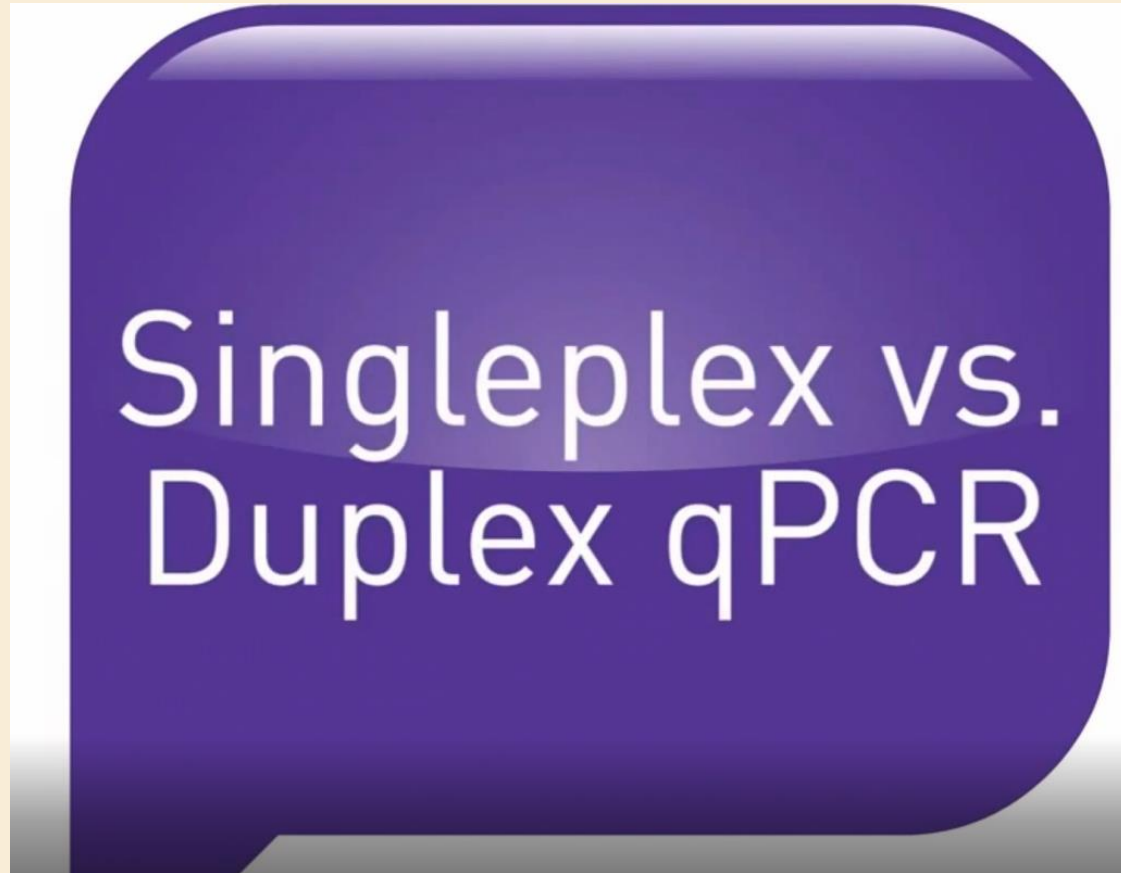
Red Gene Only



Blue Gene vs. Red Gene is 3 vs. 5

Singleplex VS multiplex qPCR

- Singleplex vs duplex qPCR, Thermo Fisher Scientific
- <https://youtu.be/MDTY04uoVeg>



SYBR vs TaqMan probe_summary

	SYBR Green	TaqMan Probe
Sensitivity	+	+++
Specificity	+	+++
Multiflex	N/A	++
Melting Curve analysis	+++	N/A
Ease of primer & probe design	+++	+
Cost effectiveness	+++	+



qPCR 단어정리

1. qPCR의 응용 분야
2. qPCR plot 용어의 이해
3. 정량법의 이해



qPCR 단어정리

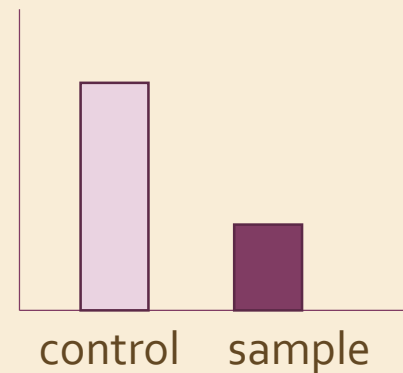
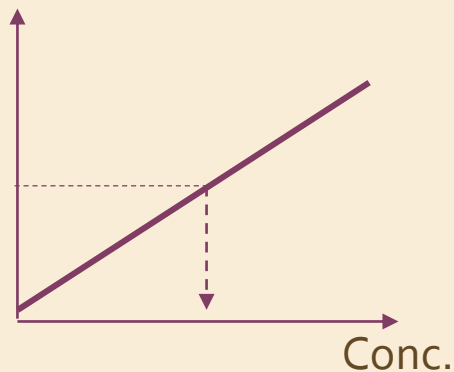
1. qPCR의 응용 분야
2. qPCR plot 용어의 이해
3. 정량법의 이해

qPCR 응용분야

- **감염증 검사** infectious disease research
 - human virus 등
- **식중독균 검사** food pathogen detection
 - 한 번의 분석으로 여러 균 종 검출
- **제약/화장품 공정 분석** Pharmaceutical analysis & Qualification
 - 제약/화장품/개인위생용품생산 공정 중 Mycoplasma, virus, 기타 오염물질 분석
- **줄기세포stem cell/암세포cancer, tumor cell 기작 연구**
 - Stem cell 확인, 줄기세포의 분화, 유전자 조절gene regulation 연구
 - Cancer 및 유전질환 연구를 위한 마커marker 탐색
- **약물유전체학** Pharmacogenomics
 - ADME & CYP target 약물민감도 검사, 태아의 산전/산후 검사 등
- **식물/농업분야 바이오산업** plant/agricultural biotechnology
- 유전자 발현 조사 **gene expression, genotyping, sequencing** 등

정량분석 Quantitation Assay

- 정량분석 Quantitation Assay (= real-time PCR assay)
 - PCR 증폭동안 생성된 핵산nucleic acid(DNA, cDNA, RNA)의 양을 측정하는 것
- 절대정량 Absolute vs 상대정량 Relative Quantitation
 - **절대정량** : 표준검량곡선을 이용하여 target gene의 발현양을 계산
 - **상대정량** : 대조시료reference sample의 유전자 발현 정도를 기준으로 target gene의 발현정도를 비교 분석
 - Reference sample : non-treated sample, control sample



정량분석 Quantitation Assay



- **Amplicon**

- PCR 증폭과정에서 생성된 짧은 DNA segment

- **NTC** (no template control)

- template를 포함하지 않은 시료로 amplification quality 검증용으로 사용

- Nucleic acid **target** (=target template)

- 증폭하고자 하는 DNA 또는 RNA sequence

- **Passive reference**

- Internal reference로 작용하는 dye
- 데이터분석 동안 Reporter dye의 시그널을 표준화하고, well-to-well optical variation을 보정
- ROX dye

- **Unknown**

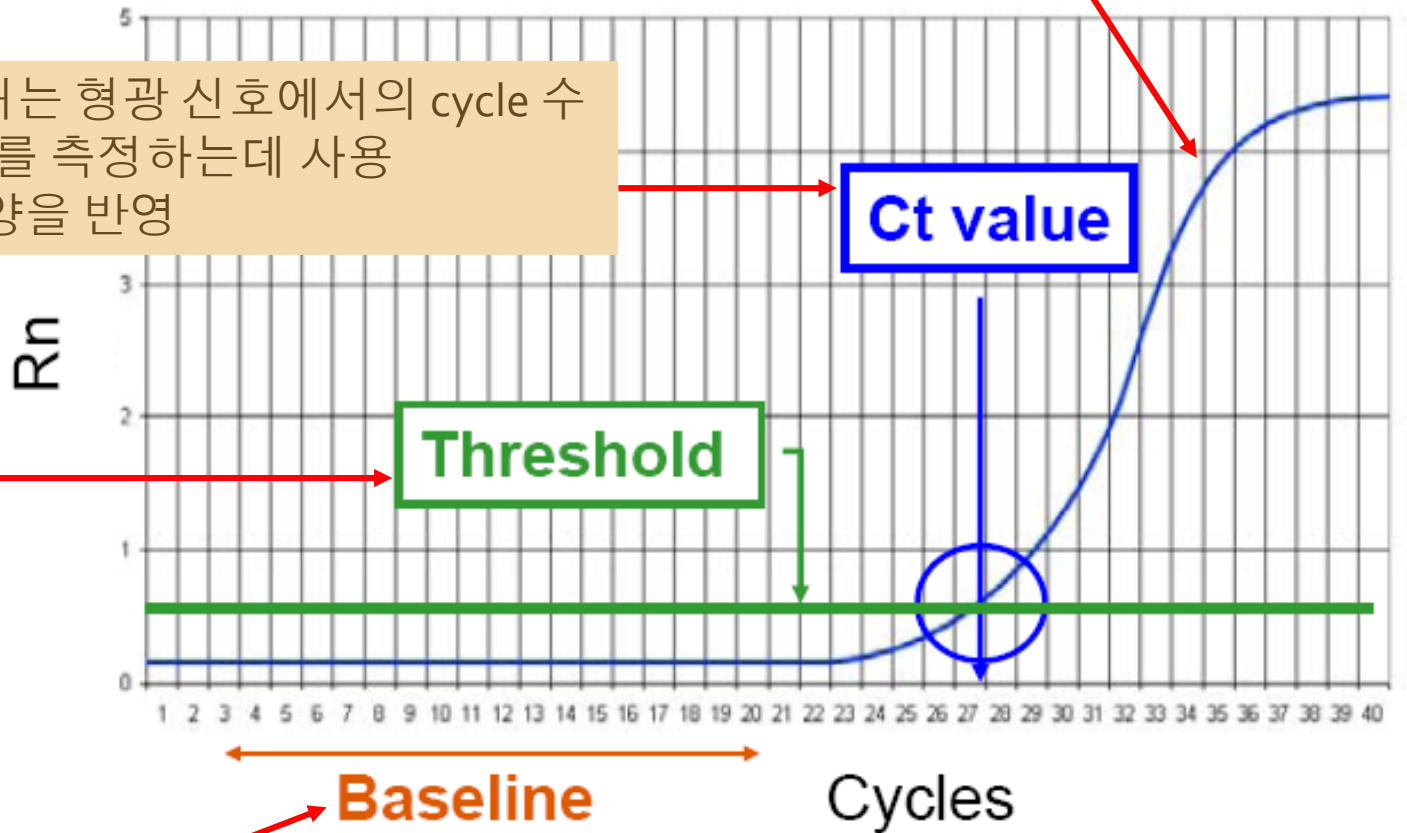
- 미지 농도의 template를 가지고 있는 sample
- 정량하고자 하는 sample을 의미

정량분석 Quantitation Assay

Amplification plot : cycle수 대비 형광신호를 그래프로 그린 것

- threshold와 접점을 나타내는 형광 신호에서의 cycle 수
- 최초의 DNA copy number를 측정하는데 사용
- Ct 값은 최초 template의 양을 반영

- 증폭이 활발한 구간
- 일반적으로 baseline의 표준편차에서 10배 정도 되는 신호의 수준



- PCR 반응 초기 cycle의 신호
- 일반적으로 3에서 15 cycle 정도
- 형광 신호의 변화가 크게 나타나지 않음

정량분석 Quantitation Assay

[active reference]

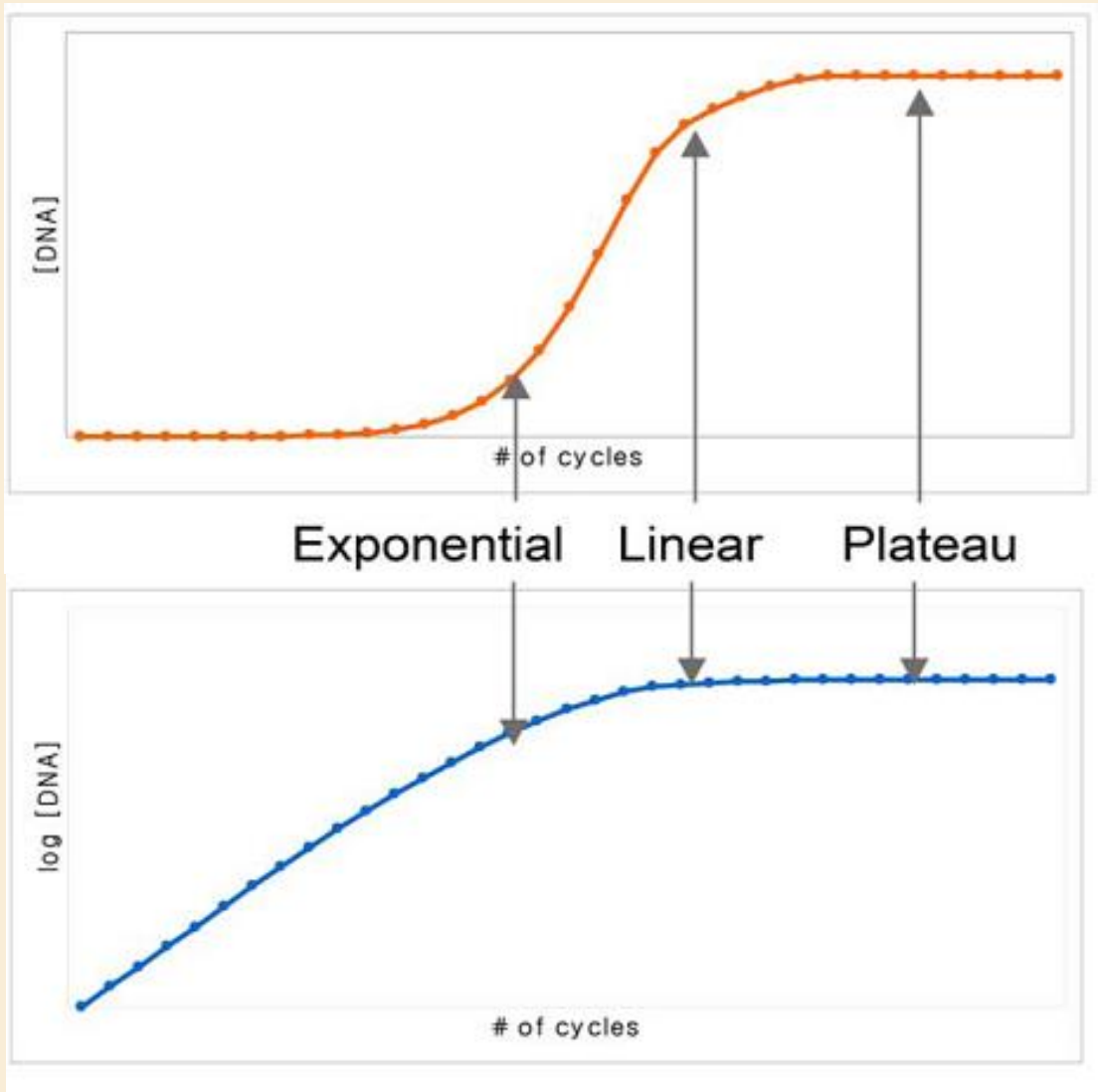
- **Endogenous control**

- 상대 정량으로 target gene의 발현양을 비교할 때, 시료에 따라 값이 크게 변하지 않는 gene의 발현양으로 sample 자체에 포함된 gene 또는 sequence
- housekeeping gene, maintenance gene, normalizer, reference gene, internal control gene이라고 부름
- β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), ribosomal RNA (rRNA), 기타 RNA 등

- **Exogenous control**

- 각 sample에 알고 있는 농도만큼 추가해준 RNA 또는 DNA
- internal positive control (IPC)로써 작용
- sample extraction이나 cDNA합성 시 발생할 수 있는 efficiency를 normalization

Phase of PCR



- **Exponential phase**

- PCR component들이 충분히 존재하여 각 cycle마다 정확히 doubling으로 amplicon이 생성되는 시기
- very precise and specific

- **Linear phase**

- Component의 양이 대부분 소진되어 PCR반응이 천천히(감소) 일어나는 구간

- **Plateau phase**

- PCR reaction이 일어나지 않는 구간
- PCR product가 더 이상 생성되지 않으며, 역으로 분해가 시작(될 수도 있음)



PCR의 운용과 DNA 확인하기

실험과정 workflow

Prepare the PCR mix



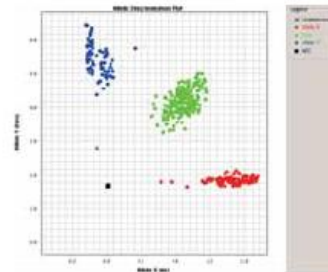
Perform the PCR



Read the plate



Analyze the results



Primer 제작

- Web tool

NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Primer3 : <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Primerbank : <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>

Primer 제작

1. Target gene의 seq. 검색 (NCBI 홈페이지 접속)

- (1) Nucleotide 카테고리에서 target gene 입력, 이때 mRNA/organism(사람/쥐/당나귀 등)으로 검색 조건 한정 후 검색
- (2) Variant > CDS 클릭 후 단백질로 translation되는 부분의 염기서열 복사 또는 FASTA
- (3) BLAST > nucleotide BLAST로 이동 → CDS에서 복사한 seq. 붙여넣기 → BLAST : variant별 공통 seq. 검색 후 복사
또는 pick primer
- (4) Web의 primer design tool에서 공통 seq 붙여넣기 → submit

2. 획득한 F/R primer seq.로 제작업체에 의뢰

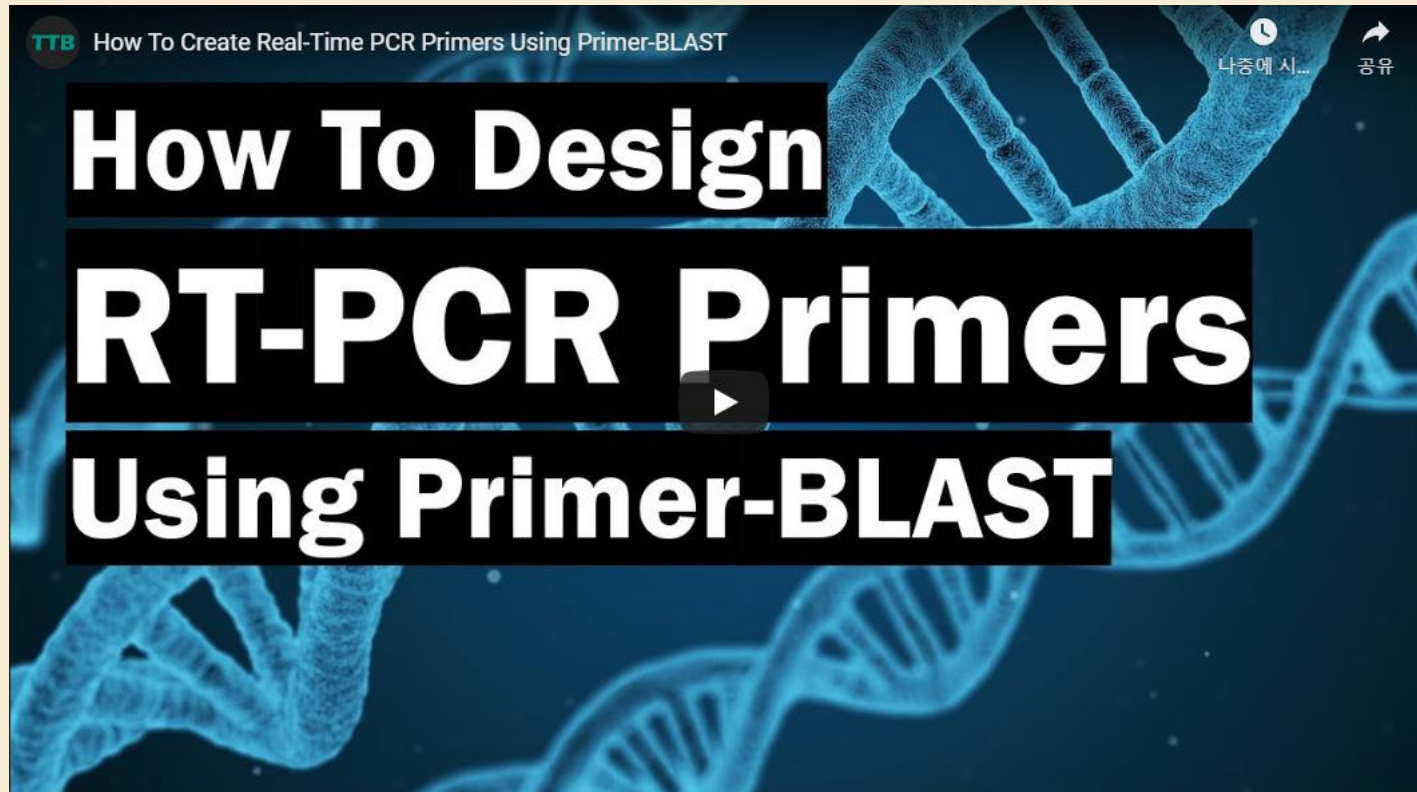
- (1) 의뢰한 prime는 농도에 맞게 TE buffer 또는 3차 증류수에 녹여 사용

Primer 제작 시 고려사항

1. primer 길이: 보통 20~25mer, binding specificity 높으려면 30mer 이상
2. 제작한 primer끼리 annealing하지 않게 seq. 구성
 - * Self complementarity : score가 높을 수록 dimer 생성확률 높음
3. GC ratio : 50% 미만으로
4. T_m (melting temp.):
 - dsDNA가 ssDNA가 되는 온도의 중간값
 - T_m이 높을수록 template결합도 가 높다는 의미
 - annealing temp가 2-3℃ 낮아야 결합 정확도 증가

NCBI BLAST를 이용한 primer 제작

- <https://toptipbio.com/real-time-pcr-primer-blast/>
- “How To Create Real-Time PCR Primers Using Primer-BLAST”, Top Tip Bio



PCR mix 준비

- PCR premix:
(Taq polymerase, dNTP, reaction buffer w/ MgCl₂, loading dye)
- Sample: 1~10ng DNA (1 또는 5uL)
- Primer(10pmol/ul) : Forward/Reverse
- DW: variable
- total volume: 50uL

PCR premix	25uL
DNA template(1ng/uL)	1uL
Primer(10pmol/uL), F+R	0.5uL/each
DW	23uL
Total volume	50uL

PCR 조건

stage	step	temp	time
holding	DNA polymerase activation	95 °C	10 min
Cycling(25-30 cycles)	denaturation	95 °C	15 sec
	Annealing	60(55) °C	30 sec
	Extension	72 °C	30 sec
holding	Final extension(option)	72 °C	3 min
storage		4 °C	∞



아가로스젤 전기영동
agarose gel
electrophoresis

전기영동 electrophoresis

[원리]

- ❖ DNA, RNA나 단백질은 고유의 전하를 띠고 있고, 어떤 전기장 상태에 놓이게 되면 하전량에 따라 이동할 수 있다.
- ❖ DNA backbone의 phosphate group은 수용액 상태에서 음전하를 띠고 있으며 전기장(electric field)에 놓이게 되면 양의 전극 쪽으로 서로 다른 속도로 이동한다.

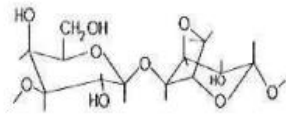
[이동에 영향을 미치는 요인]

- ❖ DNA 분자의 크기가 클수록 / Agarose의 농도가 높을수록 느리게 이동
- ❖ 걸어주는 전압이 높을수록 빠르게 이동
 - ❖ 50~150V. 보통 100V 15~25분
- ❖ DNA 형태/구조에 따라 이동속도가 다르다.
 - ❖ 속도: open circular DNA < linear DNA << supercoiled DNA
- ❖ EtBr (Ethidium bromide)의 첨가 여부, 전기영동 완충용액 running buffer의 성분과 이온강도에 따라 속도는 달라질 수 있다.

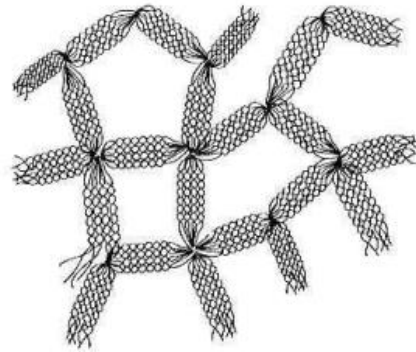
Agarose gel을 이용한 전기영동



그림 12-1. 핵산을 분리하기 위한 전기영동 (주로 아가로오스 겔에서 사용)



(a)



(b)

그림 12-2. 아가로오스의 화학적 구조(a)와 겔을 형성할 때 만들어지는 중합체의 구조(b).



www.thermofisher.com/egel

전기영동 electrophoresis

[전기영동 완충용액 running buffer]

- ❖ TAE 버퍼 (TAE buffer: Tris base, Acetic acid, EDTA buffer)와 TBE 버퍼 (Tris base, boric acid, EDTA buffer)를 많이 씀
- ❖ 양이온cation의 Tris(pH 11) : (-)인 DNA를 양극 쪽으로 이동시키기 위한 양전하의 역할
- ❖ 아세트산acetic acid(pH 4.3) : Tris base로 인한 DNA 변성을 막기 위한 용도 → buffer 내에서 Tris-acetate 형성(pH 8.0)
- ❖ 붕산Boric acid(pH 5.1)
- ❖ EDTA :
 - ❖ DNA 분해 효소(DNase)의 조효소coenzyme의 금속 이온metal ion (Mg^{2+})을 제거하여 효소의 불활성화inactivation 유도
 - ❖ 금속 이온을 조효소로 사용하는 효소 모두에 작용하여 전기영동 동안 DNA 보호
 - ❖ 특히 제한효소restriction enzyme 처리한 DNA의 전기영동을 하는 경우 DNA가 크기별로 이동할 수 있게 도움

전기영동 electrophoresis

[running buffer의 선택]

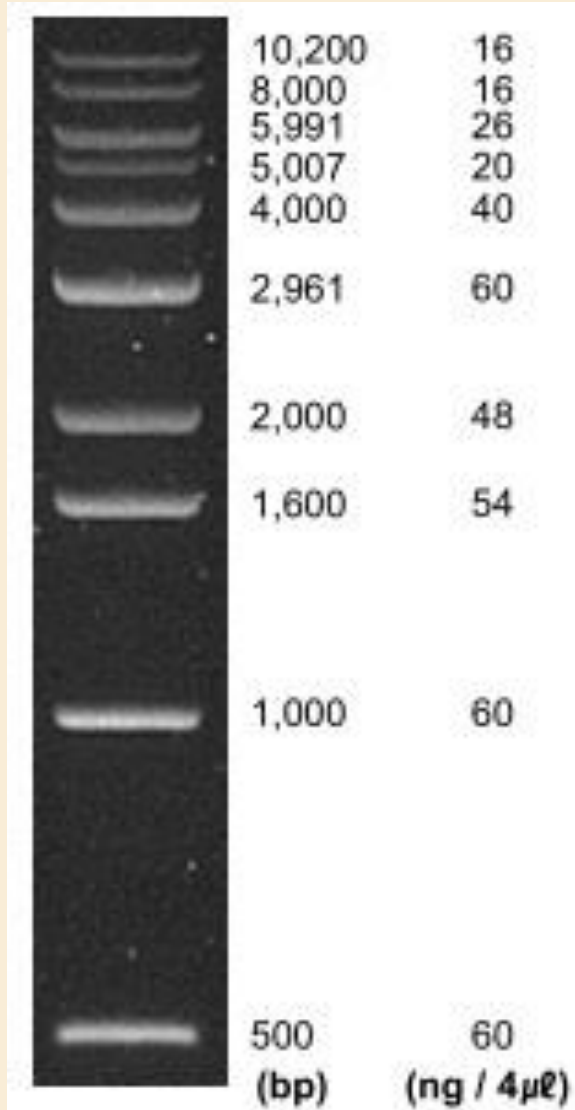
	TAE	TBE
가격	TBE보다 싸다	
Buffering capacity	O	◎ : 장시간 전기영동에 유리
DNA size	<ul style="list-style-type: none">• 15,000bp 이상• DNA 회수에 적합	<ul style="list-style-type: none">• 1,000bp 이하• 비회수용 DNA: Salt로 낮은 회수율
Gel image	O	◎ : 더 깨끗한 band

전기영동 electrophoresis

❖ DNA size 별 Agrose 농도의 선택

아가로오스 농도 (% W/V)	DNA의 분리범위 (kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

DNA ladder



- 전개한 DNA의 크기를 알아보기 위한 목적
- DNA의 크기에 맞는 ladder 선택하여 사용
- 1kb DNA ladder : 0.5 ~ 10 Kb size range 내의 dsDNA의 size를 구분하는 경우에 사용(예: gDNA)
- 냉장/냉동 보관 없이 상온에서 보관(6개월 이내)

전기영동 electrophoresis

[순서]

1. 100ml의 1X TAE(또는 TBE) buffer와 LE agarose gel powder를 계량하여 1~1.5%의 gel 농도가 되도록 200mL 삼각 플라스크에 담는다.
 - pre-staining의 경우 staining dye도 함께 넣는다.
2. 전자레인지에서 파우더가 완전히 녹을 때까지 끓여준다.
3. 미지근한 정도(50~60°C)까지 상온에서 식힌 후 gel casting
 - (1) gel tray에 액상의 agarose gel을 기포가 생기지 않도록 천천히 붓고
 - (2) Gel tray와 직각이 되도록 맞추어 comb을 꽂은 후 굳힌다.
 - (3) Gel이 굳으면 찢어지지 않게 조심히 comb을 빼고 전기영동수조로 옮겨 담는다.
4. Buffer는 gel을 충분히 덮으면서 약 1~2mm 정도 위로 올라오는 부피를 붓는다.
 - 너무 많이 부으면 buffer로 인한 저항이 커져 DNA 이동속도가 떨어짐

전기영동 electrophoresis

5. Loading dye와 DNA 섞어서 loading sample 준비한다.

DNA (1uL) + 6X loading dye (1uL) + DW (2uL) → 총 4uL

❖ loading dye란?

- ❖ 순수 DNA는 running buffer보다 밀도가 작아서 well 안에 잘 들어가지 않음
- ❖ 무게를 줄 수 있는 고분자 화합물 첨가하여 안전성 있게 이동
- ❖ 시료를 염색시켜 DNA가 gel 상에서 어디까지 진행했는지 확인

- ❖ dye 종류 : DNA size에 따라 선택
 - 브로모페놀 블루 Bromophenol blue : 400-500bp의 linear DNA와 전기영동 시 비슷하게 이동

전기영동 electrophoresis

6. Gel staining 후 illuminator에서 band 확인

[Gel staining dye의 종류]

(1) EtBr

- 1) DNA의 염기 사이로 끼어드는 성질
- 2) DNA 염기와 결합하면 유리free 상태보다 형광이 20배 증가
- 3) UV illuminator
- 4) DNA가 길수록, DNA 농도가 높을수록 강한 밝기

(2) SYBR

- 1) Minor Groove에 결합
- 2) dsDNA 에 붙을 때에만 형광을 발산가능

DNA ladder

- <https://youtu.be/MhGp0DY7i2g>
- “Tips and Tricks for Successful DNA electrophoresis”, Thermo Scientific

How To Achieve Successful DNA Electrophoresis

Thermo Scientific™ DNA Ladders

Perfect migration for accurate sizing and quantification

전기영동 electrophoresis

- <https://youtu.be/vq759wKCCUQ>
- "Agarose Gel Electrophoresis", Bio-Rad Laboratories

Agarose Gel Electrophoresis

Biotechnology Explorer™

BIO-RAD