대한진단검사의학회지 제26권 제3호 2006
Korean J Lab Med 2006;26:217-22

실시간 중합효소연쇄반응검사와 아가로오스겔 전기영동에 의한 중합효소연쇄반응물의 정량검사 비교

이미경 · 김혜련

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel Electrophoresis for DNA Quantification

Mi-Kyung Lee, M.D. and Hye-Ryoun Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Background : Real-time polymerase chain reaction (PCR) is generally regarded as a very accurate and time-saving method, but it is expensive to run. We evaluated the reliability of an inexpensive and a researcher-friendly gel electrophoresis-based PCR method for the quantification of mRNA, and the results were compared with those obtained by real-time PCR.

Methods : We compared the results of relative quantification for MMP-1 measured by real-time PCR and by ethidium bromide stained-agarose gel electrophoresis after end-point PCR.

Results : There was significant but very weak correlation between real-time PCR and end-point PCR for relative quantification of MMP-1 (r=0.16, P<0.01).

Conclusions : Our results suggest that the use of the gel electrophoresis-based end-point PCR is inappropriate for quantifying mRNA. Therefore, in order to confirm the result of relative quantification by end-point PCR, the newly established real-time PCR method or northern hybridization should be applied. *(Korean J Lab Med 2006;26:217-22)*

Key Words : *mRNA quantification, Real-time PCR, End-point PCR, Agarose gel electrophoresis*

서 론

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 주형 DNA를 10^6에서 10^7배로 증폭시켜 민감하게 검출할 수 있는 방법으로, 1984년 Mullis와 Faloona에 의해 개발되어 의학을 포함한 생명과학 전 분야와 식품, 환경 등의 다양한 분야에서 널리 활용되고 있으며[1], 역전사(reverse transcription, RT) 반응과 함께 활용함으로 유전자 발현(gene expression) 연구에도 많이 시도되고 있다. 즉, 전사량을 알기 위한 mRNA 측정에는 일반적으로 노던블로팅(Northern blotting)과 인시튜 잡종형성(in situ hybridization)[2], RNase protection assay[3], cDNA microarray[4] 및 RT-PCR 등의 5가지 방법이 사용되고 있으며, 이 중 RT-PCR은 세포수가 적은 검체나 유전자 발현이 낮은 경우에도 측정이 가능하여 가장 예민하고 다양하게 적용할 수 있는 방법으로 평가되고 있다[5, 6]. 따라서 PCR 산물의 정확한 정량과 보다 신속하고 간편한 결과 확인에 대한 요구가 증가하고 있으나, PCR 반응의 끝점(end-point) 산물을 검출하는 기존의 PCR은 정량시 예민도가 떨어지거나 PCR 후에 많은 시간과 추가 과정이 요구되기도 하며, 이로 인한 오염의 가능성 등으로 인해 제한이 있었다[7]. 최근 PCR의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광의 검출과 정량을 통해 PCR시 지수기(exponential phase) 범위 내에서 증폭산물을 측정하는 실시간(real-time) PCR 방법이 도입되어, 기존 RT-PCR에서 PCR 후의 복잡한 검사 과정을 줄이고 폐쇄관

접 수 : 2005년 11월 22일 **접수번호 :** KJLM1907
수정본접수 : 2006년 3월 20일
게재승인일 : 2006년 4월 18일
교 신 저 자 : 이 미 경
우 140-755 서울시 용산구 한강로 3가 65-207
중앙대학교 용산병원 진단검사의학과
전화 : 02-748-9837, Fax : 02-797-3471
E-mail : cpworld@cau.ac.kr

*본 논문은 2005학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

분석 하에서 실시간으로 증폭산물을 정확하게 분석하게 되었다[5, 8]. 그러나 아직까지는 실시간 중합효소연쇄반응 검사의 도입과 검사 수행시 사용하여야 하는 전용 시약과 소모품의 구입에 많은 비용이 필요하므로, 실시간 중합효소연쇄반응 검사장비가 없는 실험실에서의 사용이 제한적이다.

이에 본 연구에서는 실시간 중합효소연쇄반응 검사장비가 없는 실험실이나 보유하고 있더라도 고가의 전용시약 사용에 제한이 있는 경우, 기존 PCR을 사용하여 PCR 후 전기영동과 브롬화에티듐(ethidium bromide, EtBr) 염색만으로 측정한 유전자 발현 반정량 결과를 어느 정도 신뢰할 수 있는지를 평가하고자 하였다. 이를 위하여 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 유전자의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자에 대한 상대정량을 실시간 중합효소연쇄반응을 시행하여 얻은 결과와 실시간 중합효소연쇄반응 후의 끝점(end-point) PCR 산물을 아가로오스겔(agarose gel)에 전기영동한 후 농도계측(densitometry)의 원리에 의하여 반정량하여 얻은 결과를 비교분석 하였다.

대상 및 방법

1. 시발체 합성과 표준곡선(standard curve) 준비

성숙 흰쥐(rat)의 MMP-1과 GAPDH 유전자를 증폭할 수 있는 시발체는 Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 프로그램을 이용하여 고안하였다(Table 1).

표준곡선에 필요한 genomic DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 추출한 후, 각각의 유전자들을 PCR로 증폭하였다. 이때의 PCR 반응액은 시발체 각각 0.5 μM, dNTP 250 μM, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, *Taq* DNA polymerase (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN, USA), 0.5 unit, DNA 주형(template) 4 μL에 멸균 증류수를 첨가하여 총 20 μL로 만들었다. PCR은 자동온도조절기(GeneAmp PCR system 9700, Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)를 이용하여 94℃에서 5분간 전 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 55℃에서 30초 및 72℃에서 30초씩 35회 증폭하고 마지막으로 72℃에서 10분 동안 연장반응 시켰다. 각각의 증폭산물은 2% 아가로오스겔에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 자외선하에서 증폭산물을 확인하였으며, QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제한 후 4 μL씩 분주하여 -75℃에 보관하다가 real-time PCR시 10배씩 연속적으로 희석하여(MMP-1; 7×10^{-6}-7×10^{-9}, GAPDH; 9×10^{-6}-9×10^{-9}) 표준곡선을 위한 주형으로 사용하였다.

Table 1. Primers used for PCR

Primers		Oligonucleotide sequence (5′-3′)	Product size (bp)
MMP-1	Forward	TGGGATTTCCAAAAGAGGTG	121
	Reverse	ACGTGGTTCCCTGAGAAGA	
GAPDH	Forward	AATGTATCCGTTGTGGATCTGA	122
	Reverse	AGCCCAGGATGCCCTTTA	

Abbreviations: See text.

2. 총 RNA 분리

총 RNA는 30마리의 성숙 흰쥐의 대퇴골 골절부 가골 부위로부터 RNAqueous™-4PCR (Ambion, Austin, TX, USA)을 사용하여 추출하였으며, 추출된 RNA 용액에 남아있을 DNA 제거를 위하여 DNase I (2 units/μL)과 완충액을 가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다.

3. cDNA 합성

cDNA 합성을 위한 역전사는 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche Diagnostic Corp.)을 사용하여 시행하였으며, 총 RNA 10 μL와 10×반응완충액(100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8.3) 5 μL, 25 mM $MgCl_2$ 10 μL, dNTP mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 각각 10 mM) 5 μL, random primer $p(dN)_6$ 5 μL, RNase inhibitor 2.5 μL, AMV reverse transcriptase 2 μL에 DEPC-처리 멸균 증류수를 첨가하여 총 50 μL로 만들었다. 역전사 반응은 자동온도조절기(GeneAmp PCR system 9700)에서 25℃에서 10분, 50℃에서 60분간 반응시키고 역전사 효소의 불활성화를 위해 99℃에서 5분간 반응시켰다.

4. 실시간 중합효소연쇄반응 검사

실시간 중합효소연쇄반응 검사는 ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)을 사용하여 시행하였다. PCR 반응액은 2×SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μL, 시발체 각각 320 nM, DNA 주형 2 μL를 넣고 멸균 증류수를 첨가하여 총 25 μL가 되게 하였고, 50℃에서 2분, 95℃에서 10분간 반응시킨 후 95℃에서 15초, 60℃에서 1분씩 40회 반응시키는 조건으로 증폭하였다. 이때 SYBR Green I은 PCR로 합성된 이중나선 DNA에 결합하여 형광을 나타내게 되므로, 반응이 진행됨에 따라 발생하는 형광 신호를 각 주기마다 감지하여 유전자 증폭 양상을 실시간으로 분석함으로 증폭 산물의 생성량을 측정하게 된다. 즉 증폭의 초기에는 형광의 증가가 감지되지 않으나 일정 주기가 지나면 축적된 형광량이 비로소 기기에 감지되기 시작하는데, 이렇게 형광량이 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 주기수를 역치 주기(C_T, threshold cycle)로 명명하고 있다. 그러므로 분석하고자 하는 검체에서 대상 유전자의 C_T값을 측정하면, 농도를 알고 있는 대상 유전자의 증폭 산물을 단계적으로 희석하여 PCR을 시행한 검체로부터 그려진 표준곡선을 이용하여 대

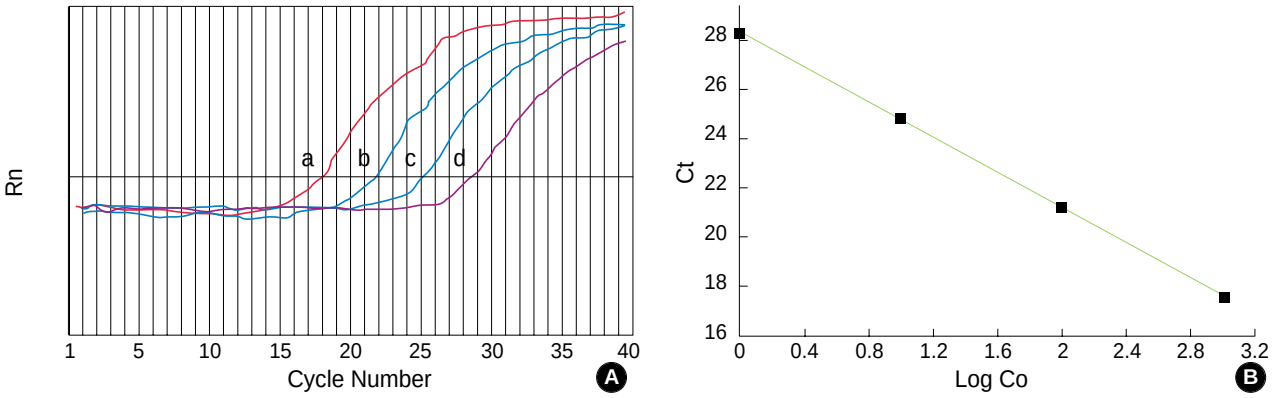

Fig. 1. (A) Generation of an external standard curve for real-time PCR (a: 7×10^{-6}, b: 7×10^{-7}, c: 7×10^{-8}, d: 7×10^{-9} ng/μL). The graph shows the interrelationship between log F (fluorescence) and the amplification cycle; background levels are indicated by the horizontal line. The cycle at which the sample fluorescence crosses the background line is set as the threshold cycle (C_T). (B) Standard curve of MMP-1 for real-time PCR. The graph shows the regression curve resulting from threshold determinations for the serially diluted MMP-1 PCR products.

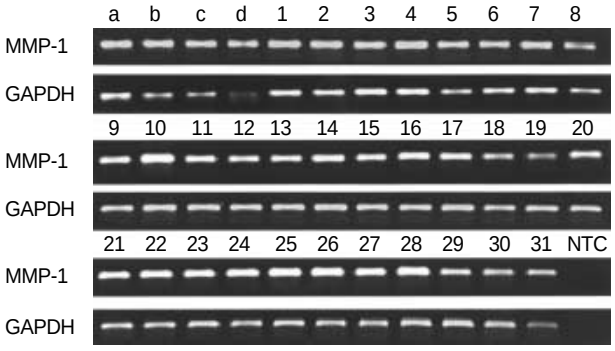

Fig. 2. Quantification of MMP-1 mRNA by RT-PCR and ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis. Quantification of MMP-1 and GAPDH was accomplished using densitometry of the dye binding intensity of UV-irradiated PCR products. A standard curve was calculated with four values (a, b, c, d) ranging from 7×10^{-6} to 7×10^{-9} ng/μL (MMP-1) or 9×10^{-6} to 9×10^{-9} ng/μL (GAPDH) PCR product and serves for the quantification of other samples. Expression of MMP-1 was normalized to that of GAPDH expression in the same sample.
Abbreviation: NTC, no template control.

상 유전자의 PCR 증폭산물의 양을 산출할 수 있었다(Fig. 1). 또한 증폭이 끝난 PCR 산물의 해리곡선(dissociation curve) 분석을 시행하여 증폭 산물의 융해 온도를 확인함으로써 유전자 증폭 시 단일 산물이 증폭됨을 확인하였다.

5. 아가로오스겔 전기영동에서 끝점 PCR 산물의 정량

증폭이 끝난 PCR 산물을 2% 아가로오스겔에 전기영동 한 후 1 μg/mL EtBr로 염색하고, Image system (ChemiDoc XRS system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)의 Quantity One 프로그램을 사용하여 자외선(UV) 투시 하에서 방출되는 형광강도를 측정하였다. 이때 농도를 알고 있는 각 유전자의 증폭 산물을 10배씩 연속적으로 희석하여(10^{-6}-10^{-9}) PCR을 시행한 결과로부터 그려진 표준곡선을 이용하여 PCR 증폭산물을 정량검사하였다(Fig. 2).

6. MMP-1 유전자의 상대정량

실시간 중합효소연쇄반응과 아가로오스겔 전기영동에 의한 대상 유전자 발현은 PCR 간의 변이를 보상하기 위하여 기준 유전자(GAPDH)에 대한 대상 유전자(MMP-1)의 비율을 계산하여 상대 정량하였다.

결 과

MMP-1과 GAPDH 정량을 위한 표준곡선의 직선식은 real-time PCR에서는 $y=-3.55x+28.36$, $r^2=1.00$ (MMP-1)와 $y=-3.27x+25.87$, $r^2=0.99$ (GAPDH)이었고, end-point PCR에서는 $y=0.129x-178$, $r^2=0.86$ (MMP-1)과 $y=0.239x-620$, $r^2=0.89$ (GAPDH)이었다.

실시간 중합효소연쇄반응과 끝점 PCR 산물의 아가로오스겔 전기영동에 의한 MMP-1과 GAPDH 유전자에 대한 정량값은 상관계수가 각각 $r=0.33$과 $r=0.35$로 낮은 상관관계를 보였다. 기준 유전자로 이용한 GAPDH 유전자에 대한 대상 유전자의 비율을 계산하여 얻은 MMP-1 유전자의 상대정량 값의 두가지 정량 방법 간의 상관계수가 $r=0.16$으로 매우 낮은($P<0.01$) 상관관계를 나타내었다(Table 2, Fig. 3).

고 찰

mRNA 정량을 통한 유전자 발현연구에서 RT-PCR에 의한 유전자 정량은 mRNA의 작은 변화까지 검출할 수 있어 유용한 방

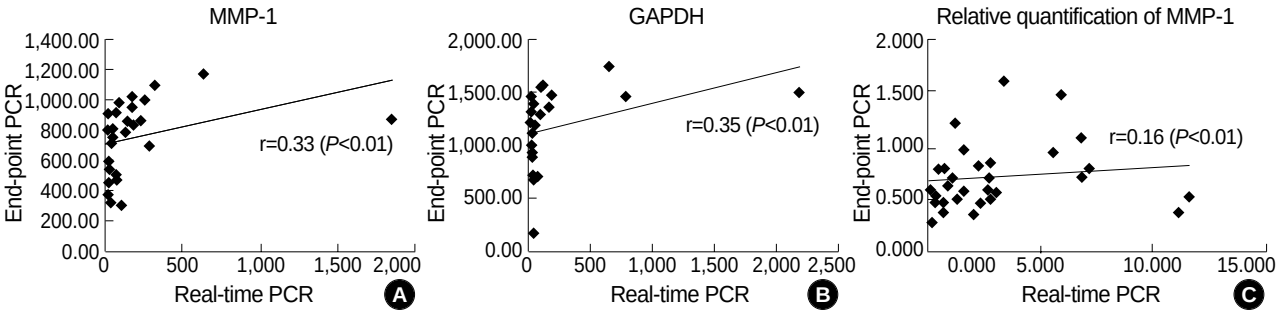

Fig. 3. Comparison between real-time PCR and end-point PCR in (A) MMP-1 mRNA (B) GAPDH mRNA (C) relative quantification of MMP-1 (MMP-1 mRNA/GAPDH mRNA).

Table 2. Comparison between real-time PCR and end-point PCR for relative quantification of MMP-1 mRNA

Sample No.	MMP-1		GAPDH		Relative quantification	
	Real-time	End-point	Real-time	End-point	Real-time	End-point
1	133.34	785.93	50.11	1,390.91	2.661	0.565
2	41.27	806.59	110.25	1,559.97	0.374	0.517
3	173.13	956.55	25.3	1,384.62	6.843	0.691
4	229.86	852.65	2167.76	1,509.51	0.106	0.565
5	21.95	450.22	10.93	1,333.75	2.008	0.338
6	16.94	581.85	7.12	1,295.86	2.379	0.449
7	42.05	731.35	46.99	1,204.99	0.895	0.607
8	4	366.79	5.74	1,021.11	0.697	0.359
9	58.85	751.50	21.29	884.75	2.764	0.849
10	628.74	1,157.66	777.14	1,455.70	0.809	0.795
11	142.39	858.29	88.25	1,545.09	1.613	0.555
12	21.56	548.06	56.76	1,169.34	0.380	0.469
13	19.55	591.42	14.88	1,211.33	1.314	0.488
14	1840.96	874.13	651.64	1,743.09	2.825	0.501
15	11.58	812.12	10.82	1,174.49	1.070	0.691
16	18.23	917.67	8.04	1,131.10	2.267	0.811
17	178.95	829.85	65.84	1,181.92	2.718	0.702
18	80.01	471.76	6.88	928.17	11.629	0.508
19	29.31	323.95	40.39	719.10	0.726	0.450
20	281.63	699.46	93.55	1,290.77	3.010	0.542
21	34.53	565.73	69.37	709.57	0.498	0.797
22	68.08	910.43	41.18	933.42	1.653	0.975
23	44.23	760.76	181.94	1,479.11	0.243	0.514
24	85.67	979.26	15.53	1,043.86	5.516	0.938
25	257.68	1,002.67	35.68	1,290.96	7.222	0.777
26	174.44	1,015.18	29.45	687.77	5.923	1.476
27	46.43	808.28	36.01	670.16	1.289	1.206
28	315.7	1,098.05	46.06	1,014.53	6.854	1.082
29	74.97	508.23	6.74	1,454.64	11.123	0.349
30	25.82	378.27	169.32	1,365.38	0.152	0.277
31	99.87	299.56	29.7	185.33	3.363	1.616

Abbreviations: See text.

법이지만 재현성이 낮은 것이 문제로 알려져 있어, 검체 처리와 RNA 추출, cDNA 합성을 위한 역전사 반응, PCR 및 PCR 산물의 정량 등 각 단계별 엄격한 정도관리가 요구되고 있다[9]. 본 연구에서는 PCR 산물의 정량시 실시간 중합효소연쇄반응 검사와 끝점 PCR 후 전기영동에 의한 유전자 정량결과를 비교하기 위하여, 검체 처리에서 PCR까지 동일한 검체로 시행한 후 결과를 비교하여 보았다. 대상 유전자인 MMP-1과 기준 유전자인 GAPDH 유전자에 대한 정량 값이 두 방법간에 모두 낮은 상관관계를 보여, 이들 유전자의 정량 값을 이용한 MMP-1 유전자의 상대정량 값 역시 두 방법간에 매우 낮은 상관관계를 보였다.

MMP-1 유전자 상대정량시 본 연구결과에서 얻은 실시간 중합효소연쇄반응과 끝점 PCR 후 전기영동에 의한 유전자 정량 값이 차이를 보일 수 있는 가능성에 대하여 검토하여 보았다. 첫째, PCR은 대상 유전자의 증폭 효율에 따라 반응단계를 크게 세 부분으로 나눌 수 있다. 즉, PCR의 매 주기마다 정확하게 PCR 산물이 배가되는 반응 초기로 100%의 반응 효율을 보여 매우 특이적이고 정확한 반응단계인 지수기 혹은 로그기와 반응성분들이 소모되어 반응이 느려지거나 일부 증폭산물이 분해되기 시작하여 반응의 효율도가 검체마다 매우 다양하게 나타날 수 있는 선형기(linear phase), 그리고 반응성분들의 소모가 진행되고 반응 부산물에 의한 합성반응의 저해 등으로 반응의 효율이 감소하여 증폭반응이 중단되거나 증폭산물의 분해가 나타날 수 있는 편평기(plateau phase) 또는 끝점기(end-point phase)가 있다[10, 11]. 따라서 끝점 PCR의 경우 편평기에서 측정을 하게 됨으로 PCR 반응의 효율이 감소되어 증폭반응이 중단되거나 증폭산물의 분해가 나타나 PCR 증폭산물이 정확하게 초기의 주형량을 반영하지 않았을 가능성이 있다. 둘째, mRNA 정량시 검사내 정밀도가 기존의 RT-PCR에서 끝점 PCR 산물을 전기영동하여 EtBr로 염색하고 농도계측의 원리로 정량한 경우(CV＝44.9%)가 SYBR green I을 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 얻은 정량값(CV＝14.2%)보다 낮았다는 보고도 있어[12], 끝점 PCR에 의한 정량이 실시간 중합효소연쇄반응에 비해 변이가 크다는 점이 가능한 원인으로 생각된다. 셋째, DNA 정량 시 측정 가능한 동적범위(dynamic range)의 차이를 생각 수 있다. 일반적으로 기존의 끝점 PCR 후 EtBr로 염색하여 정량하는 방법에 비해 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 정량방법이 동적범위가 크다고 알려져 있다[12]. EtBr은 두 가닥 DNA의 인접한 염기쌍 사이에 삽입할 수 있는 방향성의 평면구조를 가지고 있고[13], DNA 염기 구성의 차이에 영향을 받지 않으면서 DNA에 결합하면 형광이 증가되는 능력이 있어,

DNA를 확인하는 방법으로 많이 사용되고 있다. 그러나 아가로오스겔에서의 해상도는 약 10배 이상의 차이가 있어야 감별이 가능한 정도이다.

끝점 PCR에 의한 증폭산물을 측정하는 방법에는 EtBr이나 SYBR green과 같은 DNA 삽입 형광색소를 사용하거나 결합된 방사능 측정[14], 써던블롯과 같은 보합반응을 이용한 방법, 형광이나 발광을 내는 효소에 결합시킨 고체상을 이용하는 방법[15, 16], 그리고 고성능액체크로마토그래피(HPLC)[17]나 모세관 전기영동[18] 등이 있다. 이들 방법 중 PCR 후 아가로오스겔에 전기영동하여 EtBr로 염색하는 것은 기존 검사실에서 친숙한 방법으로 간편하고 경제적이어서[19, 20], 현재 PCR 산물의 정량을 위한 방법 중 가장 신뢰할 수 있는 방법으로 생각되고 있는 실시간 중합효소연쇄반응 검사 결과와 상관성이 좋으면 실시간 중합효소연쇄반응 검사장비가 없는 검사실에서도 이 방법을 이용하여 어느 정도 신뢰성 있는 예비실험 결과를 얻을 수 있으므로 PCR 산물의 정량을 통한 유전자 발현연구에 쉽게 접근할 수 있을 것으로 기대되어 본 연구를 시도하였다. 그러나 본 연구에서 끝점 PCR 결과가 초기 주형량을 정확하게 반영하는 것으로 알려져 있으며 노던블롯법과도 우수한 상관을 보인다고 보고된[21] 실시간 중합효소연쇄반응 검사 정량 값과 매우 낮은 상관관계를 보여, 끝점 PCR 후 전기영동과 EtBr 염색을 통한 mRNA 정량은 정확한 결과를 얻기 어려울 것으로 생각되므로 기존의 끝점 PCR에 의한 유전자 정량결과는 실시간 중합효소연쇄반응 검사나 노던블롯법으로 검증하는 과정이 필요할 것으로 사료되었다. 또한 유전자 발현연구 시 mRNA의 작은 변화까지도 검출할 수 있다고 알려진 RT-PCR에서 실시간 중합효소연쇄반응 검사 결과의 신뢰도를 높이기 위하여 PCR 효율이나 표준곡선의 제조 등 각 단계별 정도관리와 실시간 중합효소연쇄반응 검사에 의한 상대정량 값의 통계학적인 차이가 유전자 발현에 미치는 기능적 차이를 확인하는 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

요 약

배경 : 최근 PCR의 매 주기마다 증폭산물을 측정하는 실시간(real-time) PCR 방법이 도입되어, 증폭산물을 정확하게 분석하게 되었다. 그러나 실시간 중합효소연쇄반응 검사 도입과 검사 수행시 사용하여야 하는 전용 시약과 소모품의 구입에 많은 비용이 필요하므로, 실시간 중합효소연쇄반응 검사 장비가 없는 실험실에서의 사용이 제한적이다. 이에 본 연구에서는 기존의 끝점 PCR을 사용하여 전기영동과 브롬화에티듐(EtBr) 염색만으로 신뢰할 수 있는 유전자 발현 연구를 수행할 수 있는지를 실시간 중합효소연쇄반응 검사법과의 비교분석을 통하여 평가하고자 하였다.

방법 : 실시간 중합효소연쇄반응 검사를 시행하여 얻은 정량값과 실시간 중합효소연쇄반응 검사 후의 끝점 PCR 산물을 아가로오스겔에 전기영동한 후 브롬화에티듐으로 염색하고 자외선 투시하에서 방출되는 형광강도를 측정하여 정량한 결과로 각각 MMP-1 유전자의 상대정량을 시행하여 비교하였다.

결과 : 실시간 중합효소연쇄반응 검사와 끝점 PCR 산물의 아가로오스겔 전기영동에 의한 MMP-1유전자의 상대정량 값은 상관계수가 $r=0.16$ ($P<0.01$)으로 매우 낮은 상관관계를 나타내었다.

결론 : 끝점 PCR 후 전기영동과 브롬화에티듐 염색을 통한 mRNA 정량은 정확한 결과를 얻기 어려울 것으로 생각되므로, 기존의 끝점 PCR에 의한 유전자 정량결과는 실시간 중합효소연쇄반응 검사나 노던블롯법으로 검증하는 과정이 필요할 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1987;155: 335-50.
2. Parker RM and Barnes NM. mRNA: detection by in situ and northern hybridization. Methods Mol Biol 1999;106:247-83.
3. Hod Y. A simplified ribonuclease protection assay. Biotechniques 1992;13:852-4.
4. Clarke PA, te Poele R, Wooster R, Workman P. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. Biochem Pharmacol 2001;62:1311-36.
5. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 2000;25:169-93.
6. Wang T and Brown MJ. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. Anal Biochem 1999;269:198-201.
7. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5′→ 3′ exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7276-80.
8. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 1993;11:1026-30.
9. Ovstebo R, Haug KB, Lande K, Kierulf P. PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation. Clin Chem 2003;49:425-32.
10. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res 1996;6:986-94.
11. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques 1997;22:130-1, 134-8.
12. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed

MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem 2000;285:194-204.
13. Heath PJ, Clendenning JB, Fujimoto BS, Schurr JM. Effect of bending strain on the torsion elastic constant of DNA. J Mol Biol 1996;260:718-30.
14. Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. PCR Method Appl 1995;4:234-8.
15. Hall LL, Bicknell GR, Primrose L, Pringle JH, Shaw JA, Furness PN. Reproducibility in the quantification of mRNA levels by RT-PCR-ELISA and RT competitive-PCR-ELISA. BioTechniques 1998;24:652-8.
16. Siddiqi AM, Jennings VM, Kidd MR, Actor JK, Hunter RL. Evaluation of electrochemiluminescence- and bioluminescence-based assays for quantitating specific DNA. J Clin Lab Anal 1996;10:423-31.
17. Hayward-Lester A, Oefner PJ, Sabatini S, Doris PA. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. Genome Res 1995;5:494-9.
18. Borson ND, Strausbauch MA, Wettstein PJ, Oda RP, Johnston SL, Landers JP. Direct quantitation of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis. Biotechniques 1998;25:130-7.
19. Huber R, Kunisch E, Gluck B, Egerer R, Sickinger S, Kinne RW. Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun protooncogene mRNA and analysis of junB mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients. Z Rheumatol 2003;62:378-89.
20. Bradford WD, Cahoon L, Freel SR, Hoopes LL, Eckdahl TT. An inexpensive gel electrophoresis-based polymerase chain reaction method for quantifying mRNA levels. Cell Biol Educ 2005;4:157-68.
21. Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. J Clin Microbiol 2004;42:2085-93.