안지오텐신전환효소의 mRNA 정량분석을 위한 정량적 역전사 PCR 방법의 개발*

삼성의료원 심혈관센터, 임상의학연구센터, 삼성생명과학연구소
허정은 · 김덕경 · 최윤혁 · 류재춘 · 주신배 · 권현철 · 박승우
김준수 · 이상훈 · 홍경표 · 박정의 · 이원로

= Abstract =

Development of Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for the Measurement of Angiotensin Converting Enzyme mRNA

Jeong-Eun Huh, M.S., Duk-Kyung Kim, M.D., Yoon-Hyuk Choe, Ph.D., Jae-Choon Ryu, M.D., Shin-Bae Joo, M.D., Hyeon-Cheol Gwon, M.D., Seung-Woo Park, M.D., June Soo Kim, M.D., Sang-Hoon Lee, M.D., Kyung-Pyo Hong, M.D., Jeong-Euy Park, M.D., Won-Ro Lee, M.D.

Cardiovascular Institute, Samsung Medical Center, Center for Clinical Research, Samsung Biomedical Research Institute, Seoul, Korea

Background : The analysis of ACE gene expression is vital to study the role of angiotensin converting enzyme (ACE) in the pathogenesis of cardiovascular disease. Traditionally, levels of individual mRNA expression have been analyzed by semiquantitative Northern blotting, which requires a large quantity of tissue. Therefore, gene expression of a little biopsy specimen from the human heart or atherectomy specimen from the blood vessel cannot be measured easily. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) is very effective, sensitive and rapid method of detecting the expression of mRNA, but it is only used in qualitative analysis. Therefore, we established the method of quantitative RT-PCR (QRT-PCR) using recombinant RNA template as internal standard to measure the expression of ACE.

Method : Recombinant RNA (rcRNA) was designed to yield PCR product which differs in size by about 200bp from that of the target RNA. Initially, spacer gene, which was composed of ACE sense primer, antisense primer, T7 promoter and poly (dT) tail with glutathione transferase (GSTM) gene of 180bp in the middle, was constructed. Then, standard rcRNA was obtained by in vitro transcription. Target RNA was mixed with rcRNA and amplified by PCR, together with ^{32}P-dCTP. PCR products were analyzed by gel electrophoresis. For quantitation, either gel was cut and radioactivity was counted or gel was dried and exposed to X-ray film and density was measured using image densitometer. We carried out semiquantitative RT-PCR to study the modulation of ACE expression in vascular smooth muscle cell (VSMC) by dexame-thasone and basic FGF (bFGF).

*본 논문은 과학기술처 생명공학기술 개발사업 연구비 (B-02-04-02)와 삼성생명과학연구소 연구비 (C95-003-2)의 보조로 이루어 졌음.

Result : The size difference of PCR products from the standard RNA and the extracted target RNA was matched as designed. By using QRT-PCR, there was 1.7×10^8 ACE mRNA molecules in 1ng of rat lung total RNA. bFGF and dexamethasone upregulated ACE mRNA expression in cultured VSMC.

Conclusion : These results suggest that RT-PCR using rcRNA as internal standard is a very useful method for quantitation or semiquantitation of ACE mRNA from a small amount of tissue or cultured cells. Expression of ACE in VSMC can be modulated by various stimuli such as basic FGF and dexamethasone. QRT-PCR could be widely used in the studies of expression of specific human genes.

KEY WORDS : Quantitative reverse transcription-PCR · Angiotensin converting enzyme · RNA · Gene expression.

서 론

Renin - angiotensin system(RAS)은 과거 전형적인 endocrine system의 하나로서 마지막 작용물질인 angiotensin II를 통하여 여러 기관에 작용하여 혈관수축, 염분과 수분 항상성(salt and volume homeostasis) 등에 관여하는 것으로 알려져 왔으나 최근 RAS의 국소조직 내에서의 autocrine, paracrine 작용이 동맥경화, 심근비대와 같은 심혈관질환의 병태생리에 중요한 역할을 함이 알려지게 되었다[1].

Angiotensin 생합성의 첫 번째 단계는 간에 많이 존재하는 angiotensinogen으로부터 renin에 의하여 decapeptide인 angiotensin I의 생성이다. Angiotensin I은 angiotensin converting enzyme(ACE)에 의하여 RAS의 생리작용을 나타내는 작용물질인 octapeptide, angiotensin II로 변환된다. 이렇게 하여 생성된 angiotensin II는 세포 표면의 angiotensin receptor와 결합하여 생리작용을 나타낸다.

Angiotensin converting enzyme(ACE)이 RAS의 enzymatic cascade, 즉 angiotensin II 생성의 rate limiting step은 아니지만 ACE 억제제를 투여하여 ACE 활성도가 억제되면 angiotensin II의 생산이 줄어들게 된다. 따라서 tissue RAS가 local tissue 내의 angiotensin 형성에 중요한 역할을 한다면 심혈관계 조직 내의 ACE 활성도가 국소 angiotensin II의 최종농도를 조절한다고 말할 수 있으며, 따라서 동맥경화나 심실비대에서 혈관벽이나 심근의 ACE 발현이 증가된다면 angiotensin I으로부터 angiotensin II의 생성이 증가되어 angiotensin II가 혈관벽세포나 심장세포의 angiotensin receptor와 결합하여 그 약리작용을 나타낼 것이다.

심혈관계질환의 병태생리에 미치는 ACE의 역할 연구를 위하여는 ACE 유전자의 발현에 대한 연구가 필수적이다. 종래에 ACE mRNA의 정량을 위하여 사용되던 Northern blotting 방법은 많은 양의 조직이 필요하여 인체의 심장이나 혈관으로부터 얻는 소량의 샘플로부터는 ACE mRNA 발현의 정량적 측정이 어려웠다. 역전사-PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction ; 이하 RT - PCR이라 약함)은 적은 양의 RNA를 증폭시킬 수 있는 위력적인 방법이나 단지 정성적인 비교가 가능할 뿐이다. 따라서 본 연구진은 ACE 유전자 발현의 정량적인 측정을 위하여, 또한 다른 유전자의 mRNA 정량에도 공통적으로 쓰일 수 있는 보편적인 방법의 개발을 위하여 재조합 RNA (recombinant RNA ; 이하 rcRNA라 약함)를 internal standard로 사용하는 정량적 RT - PCR(Quantitative RT - PCR ; 이하 QRT - PCR이라 약함)의 방법을 개발하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. QRT-PCR을 위한 표준 RNA의 제작 및 primer 합성

Heuvel등의 방법을 변형하였다[2]. Internal standard로 쓰일 ACE primer의 염기서열을 갖는 rcRNA를 만들기 위하여 180bp의 GSTM(glutathione transferase) 유전자를 중간에 포함하고 앞뒤로 ACE specific primer sequence와 T7 promoter, poly(dT) tail을 갖는 spacer gene을 만들었다. 여기에 쓰이는 recom -

binant PCR primer의 구조를 살펴보면 다음과 같다(Fig. 1). 5′-primer는 5′-(T7 promoter sequence)-(ACE 5′ primer sequence)-(GSTM 5′ primer sequence)-3′, 3′-primer는 5′-(poly dT)-(ACE 3′ primer sequence)-(GSTM 3′ primer sequence)-3′의 구조를 갖는다. Target RNA를 ACE primer로 증폭시키면 436bp의 크기를 갖도록 합성하였고, spacer gene의 경우는 ACE primer로 증폭되어지면 222bp의 크기가 되도록 만들어 약 200bp의 차이가 나므로, electrophoresis gel에서 쉽게 구별할 수 있도록 제조하였다(Fig. 2). 인간 genomic DNA를 recombinant PCR primer로 PCR하여 spacer gene을 만들었고 PCR 반응은 94℃에서 1분간 가열하여

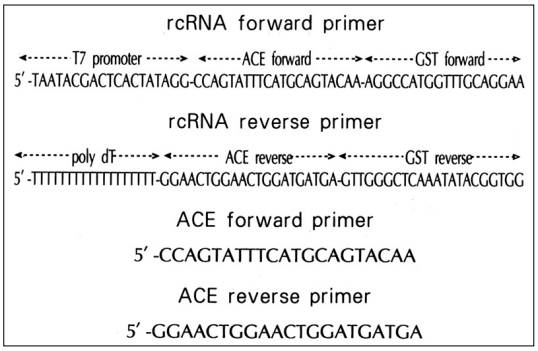

Fig. 1. Recombinant PCR primer and ACE primer sequences.

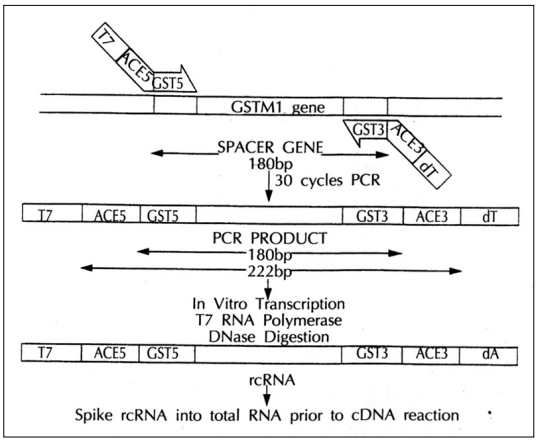

Fig. 2. Scheme for the synthesis of rcRNA internal standard.
Abbreviations : T7 = T7 promoter sequence, ACE5 = ACE sequence forward primer, GST5 = Spacer gene forward primer, GST3 = Spacer gene reverse primer, ACE3 = ACE sequence reverse primer, dT = d(T) 18 tail, dA = d(A) 18 tail

denaturation 시키고, 60℃에서 1분간 annealing후 72℃에서 1분 30초간 extention 시켜 35회 반복하였다. 이를 glass milk(BIO 101 kit, Boehringer Mannheim)로 순수분리 후, T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription(Riboprobe in vitro transcription system, Promega, USA) 시켜 rcRNA를 완성시켰고, 분광광도계상 광학밀도를 이용하여 정량하였다.

2. 배양된 세포나 조직에서 total RNA의 분리

Total RNA는 acid guanidinium isothiocyanate-phenol-chloroform을 이용한 단일단계방법으로 추출하였다[3]. 세포를 cold PBS로 두번 세척한 후, 4M guanidinium isothiocyanate와 25nM sodium citrate (pH7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol 등으로 구성된 변성용액(denaturing solution)을 세포 배양용기에 넣어 세포를 용해시킨 후, 용해된 세포를 1.5ml 미소튜브로 옮겼다. 이 튜브에 50ul의 2M sodium acetate(pH4.0), 500㎕의 water-saturated phenol(pH4.2), 170㎕의 chloroformisoamyl alcohol (49 : 1)을 섞고 10초 이상 잘 섞어 주었다. 4℃에서 15분간 12,000rpm으로 원심분리를 한 후, 수양층(aqueous phase)을 새튜브에 옮겼고, 위의 방법을 2회 반복 한 후 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 다음, 16시간 이상 -20℃에서 보관하였다. 4℃에서 12,000rpm으로 30분간 원심 분리한 후, 상층액을 버리고 원침하여 얻은 RNA pellet을 75% ethanol로 2회 세척한 후, 실온에서 공기 건조시켰고, 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수에 녹여 사용 시까지 -70℃에 보관하였다. 조직에서 RNA를 분리하고자 할 경우 멸균된 막자사발로 잘 분쇄한 후 변성용액을 넣고 homogenization 한 후 위와 동일한 방법으로 RNA를 추출하였다. 분리되어진 RNA는 1.5% formamide denatured agarose gel에서 전기영동하여 RNA의 integrity를 확인하였다.

3. QRT-PCR을 위한 역전사(reverse transcription) 및 PCR

1ug의 total RNA와 량을 알고 있는 표준 RNA를 같은 튜브안에 섞은 후 MMLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 넣고 37℃에서 60분간 반응시켜 각각을 single stranded cDNA로 역전사 시켰고, 99℃

에서 5분 동안 역전사효소를 비활성화 시킨 후, 5℃에서 방치하였다. 이렇게 만들어진 cDNA를 2배씩 계대희석하였고, 10mM Tris(pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl 2, 200μM의 dNTP와 25pmol씩의 sense primer와 antisense primer가 포함된 용액에서 PCR하였다. Hot start 방법을 이용하여 반응액을 95℃에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, 85℃에서 5분간 유지시키면서 2.5unit의 Taq DNA 중합효소(Boehringer Mannheim, FRG)를 따로 첨가하였다. PCR 반응은 95℃에서 1분간 가열하여 denaturation 시키고, 58℃에서 1분간 annealing후 72℃에서 1분 30초간 extention 시켰고, PCR cycle 수를 조절하여 amplification의 exponential phase 기간내에서 DNA 산물을 얻도록 하였다. 음성대조군으로는 cDNA 합성시 RNA대신 증류수를 넣어 PCR을 시행하였다.

4. PCR 산물의 정량

PCR 반응액에 0.02uCi/ul의 32P-dCTP를 첨가하여 PCR 반응 후 2% agarose gel 또는 6% polyacrylamide gel에 전기영동하였다. PCR 산물의 정량은 gel을 건조시킨 후 x-ray film에 노출시켜 densitometer를 이용하여 해당 band의 감광 정도를 측정하거나, 해당 band를 짤라내어 speedvac을 이용하여 건조시킨 후 scintillation 용액을 넣고 beta counter (Beckman LS5801, Palo Alto, CA)로 radioactivity를 측정하였다. RNA를 첨가하지 않고 RT-PCR의 모든 과정을 거친 산물을 동시에 전기영동하여 background를 측정하여 빼어 준 후 target RNA와 rcRNA의 크기 차이에 따른 ^{32}P-dCTP의 incorporation 차이를 보정하기 위하여 G/C 양을 계산하여 rcRNA의 측정값에 2.6을 곱하였다.

5. Rat의 대동맥에서 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cell ; VSMC)의 배양

Male Sprague-Dawley rat(6wk old)로부터 흉부대동맥을 떼어 낸다. 혈관 주위의 loose connective tissue를 제거한 후 enzyme dissociation mixture (DM EM/F12 medium, 1mg/ml type 2 collagenase, 0.25 mg/ml elastase, 1mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2mg/ml bovine serum albumin)에 담아 37℃에서 10분간 반응시킨 후 혈관내벽세포를 제거하였고 adventitia와 media의 분리를 용이하게 하였다. Dissecting microspcopy 하에서 fine forceps을 이용하여 adventitia를 media와 박리한 후 media를 VSMC 배양에 사용하였다. Media를 2 3mm의 크기로 잘게 자른 후 enzyme dissociation mixture에 담아 gyratory shaker내에서 37℃에서 60분간 반응시켰다. VSMC이 분리되어 enzyme dissociation mixture가 현탁해지면 fetal bovine serum을 최종농도가 20%되도록 첨가하여 enzyme을 비활성화 시킨 후 소독된 gauze로 걸러 digestion되지 않은 찌꺼기를 제거하였다. 4℃에서 1000rpm으로 5분간 원심분리 후 세포배양액(DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, 100mg/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin)에 재부유시켜 25cm^2 세포배양 flask에 2 5 $\times 10^3$ 세포/cm^{2}의 농도로 plating하였다.

세포는 37℃ humidified 5% CO 2/95% air 환경에서 키우며 24 48시간 후 첫 배양액을 교환하여 주고 그후로는 48 72시간 간격으로 배양액을 교환하여 주었다. 세포들을 1 : 3 1 : 5의 비율로 계대 배양하였으며 5 10번 계대한 후의 세포를 실험에 사용하였다. 6 well plate 에 분주된 세포들이 confluence 상태에 도달하면 defined serum-free medium(DSF ; DMEM/F12 medium containing insulin 5×10^{-7} M, transferrin 5mg/ml, ascorbic acid 0.2mM)로 배양액을 교환 후 48시간 배양하여 quiescent 상태로 만든 후 실험에 사용하였다. VSMC은 이러한 상태에서 quiescent, noncatabolic, differentiated 상태를 유지하며 VSMC에 특이한 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있다[4].

6. VSMC의 ACE mRNA 발현의 반정량적 RT-PCR(semiquantitative RT-PCR ; 이하 SQRT-PCR이라 약함

6 well plate에 VSMC을 배양하여 세포가 confluent한 상태에 도달하면 DSF로 배양액을 갈아주고 48 72시간 후 bFGF와 dexamethasone를 첨가하여 12시간 세포를 자극한 후 RNA를 추출하여 ACE mRNA의 발현을 반정량적인 방법으로 조사하였다. 1μg의 RNA를 rcRNA 50pg과 혼합하여 QRT-PCR를 시행하여 rcRNA/target RNA ratio를 구하였고 DSF 조건에서의 ACE mRNA 발현을 1로하여 비를 구하였다. 각 군간의 통계처리는 Mann-Whitney U test를 이용하였다.

결 과

1. 표준 RNA의 합성 및 이를 이용한 RT-PCR

인간 genomic DNA로부터 합성한 spacer gene 및 이를 역전사시켜 만든 표준 RNA(rcRNA)를 이용하여 RT-PCR한 결과 그 크기는 처음 설계한 259bp와 222bp와 일치하였다(Fig. 3A). Rat 폐 RNA와 표준 RNA를 섞어 동일한 튜브에서 역전사 시키고 PCR을 시행하여 Fig. 3B의 결과를 얻었다. 표준RNA로부터 얻은 생성물과 rat의 폐에서 얻은 생성물의 크기의 차이는 약 200bp로 처음 설계한 것과 일치하였으며 전기영동 상에서 구별이 용이하였다.

2. PCR cycle 수에 따른 변동

PCR은 cycle 수가 증가할 수록 여러 가지 억제 작용에 의하여 PCR의 생성물이 exponential 하게 증가하지 않게 된다. 따라서 QRT-PCR을 위하여는 PCR 생성물이 exponential 하게 증가하는 cycle을 선택하여야 한다. Fig. 4에서 1μg의 rat 폐 RNA와 20pg의

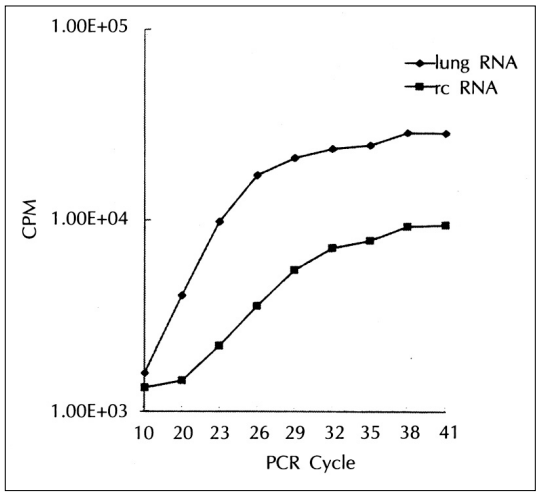

Fig. 4. Graph showing RT-PCR of target RNA and rcRNA. Total RNA from rat lung 1 μg and rcRNA 20 pg were coamplified for various numbers of PCR cycles.

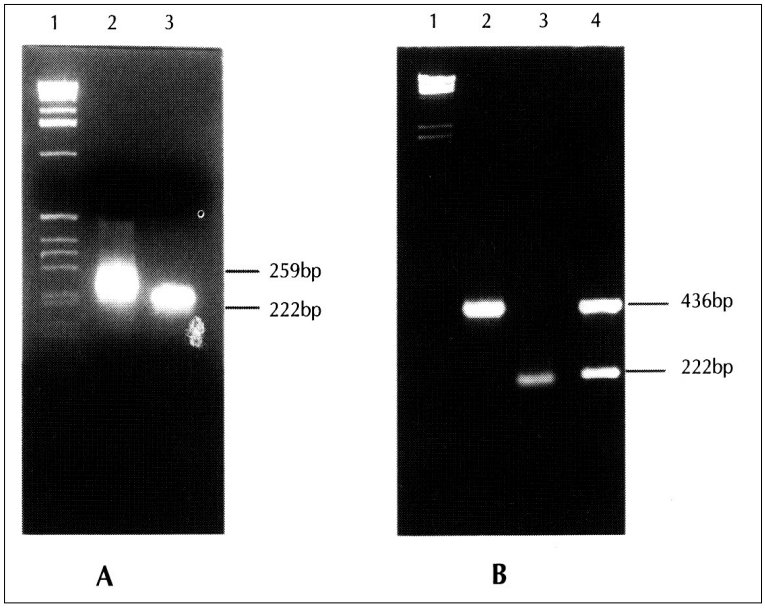

Fig. 3. Generation of recombinant spacer gene and recombinant standard RNA.
A : Generation of recombinant spacer gene and its reverse-transcription PCR with ACE primers. Lane 1 ; 1kb DNA ladder. Lane 2 ; Genomic DNA was PCR-amplified with recombinant PCR primers of spacer gene. The band corresponds to the expected size of 259 bp. Lane 3 ; Recombinant spacer gene was *in vitro* transcribed and resultant recombinant RNA was reverse-transcribed and PCR-amplified with ACE primers. The band corresponds to the expected size of 222 bp.
B : Reverse-transcription PCR of target RNA and rcRNA. Lane 1 ; Lambda/HindIII DNA size marker. Lane 2 ; Rat lung total RNA was reverse-transcribed and PCR-amplified with ACE primers. The band corresponds to the expected size of 436 bp. Lane 3 ; Recombinant RNA was reverse-transcribed and PCR-amplified with ACE primers. The band corresponds to the calculated size of 222 bp. Lane 4 ; Rat lung total RNA and reco-mbinant RNA were mixed, reverse-transcribed and PCR-amplified with ACE primers.

rcRNA를 섞어 PCR을 시행하면서 ^{32}P - dCTP를 첨가하여 반응시킨 후 gel을 전기영동시켜 각 band를 짤라 beta - counter로 방사능을 측정한 결과 주어진 조건에서 약 35cycle이 지나면 PCR 생성물의 생산이 plateau에 도달하는 것을 알 수 있었다. 이후의 실험은 32cycle에서 시행하였다.

3. 목표 RNA와 표준 RNA의 등전점

1ng의 rat 폐 RNA와 함께 1ng의 표준 RNA를 1/3씩 희석한 각기 다른 양의 표준 RNA를 넣고, 각각의 튜브에서 역전사 반응이 일어나게 한 후 cDNA를 PCR로 증폭하였다(Fig. 5). 표준 RNA의 크기가 222bp이므로 한 개의 RNA 염기 1mole을 645g으로 계산하면 표준 RNA 1ng은 2.15×10 9 molecule이었다. 최종적으로 표준 RNA와 폐 RNA로부터 얻어진 PCR 산물의 동위원소 활성도의 비를 첨가된 표준 RNA의 분자수에 대하여 이중 로그 스케일 그래프에 plot한 후 선형회귀직선을 그리고 폐 RNA와 표준 RNA의 양이 동일한 지점, 즉 등전점(equimolar point)를 구한 결과 rat의 폐 RNA 1ng 중에는 1.7×10^8개의 ACE mRNA가 존재함을 알 수 있었다.

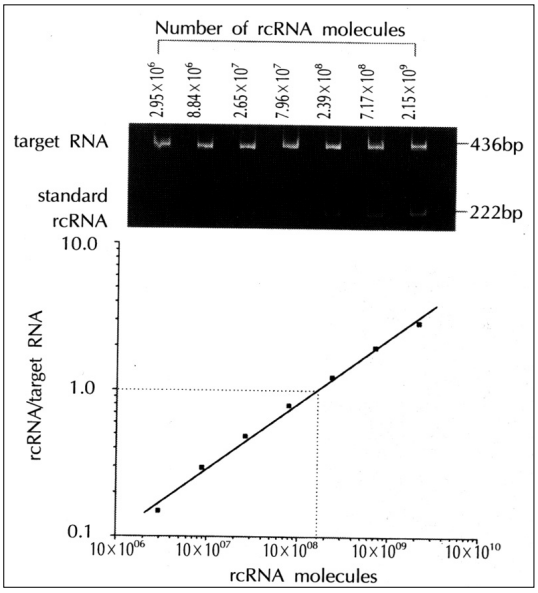

Fig. 5. Quantitation of ACE RNA molecules from rat lung.
A : Varying copy numbers of synthetic recombinant RNA(rcRNA) molecules were coreverse transcribed with constant amount of the target RNA (rat lung 1 ng). After reverse-transcription, the cDNA reaction mixture was amplified using ACE primers. PCR products were electrophoresed in 6% polyacrylamide gel and bands were visualized by ethidium bromide staining. B : To determine the competition equivalence point, each bands were cut and radioactivity was counted. The ratio of radioactivity of the PCR product bands from recombinant RNA and target RNA was plotted against the number of recombinant RNA molecules added. As shown, the equimolar point(horizontal dashed line), corresponds to 1.7 $\times10^8$ molecules of recombinant RNA, which means that 1 ng of rat lung RNA con-tains 1.7×10^8 molecules of ACE RNA.

4. 배양된 VSMC에서 ACE mRNA 발현의 반정량적 측정

배양된 VSMC에 bFGF와 dexamethasone의 농도를 달리하여 12시간 동안 활성화시킨 후 RNA를 분리하였다. 역전사 PCR을 시행하여 ACE mRNA 발현을 SQRT - PCR의 방법으로 반정량하였다. DSF로 처리한 VSMC에 비하여 bFGF와 dexamethasone에 의하여 ACE mRNA의 발현이 현저히 증가하였으며(DSF와 비교하여 bFGF 10ng ; 8.5배 증가, $p<0.05$, bFGF

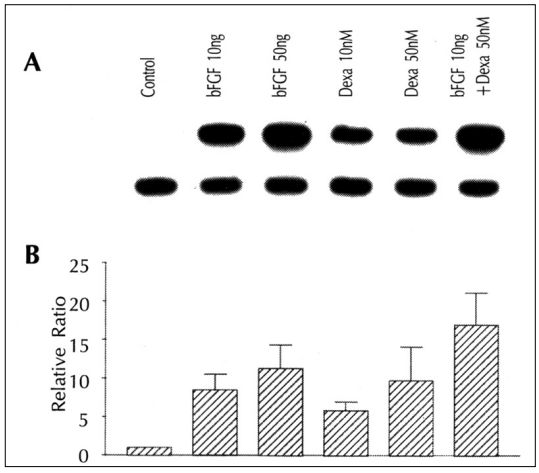

Fig. 6. Semiquantitative analysis of the modulation of ACE expression by basic FGF and dexamethasone.
A : Growth-arrested vascular smooth muscle cells were stimulated with basic FGF and dexamethasone for 12 hours. 1 μg of total RNA and 50pg of recombinant RNA was reverse-transcribed and PCR-amplified with ACE primers. PCR products were electrophoresed in 2% agarose gel. Gel was dried and exposed to x-ray film. B : Density of each bands was measured using densitometer. Ratio of target RNA to rcRNA was calculated. The value of negative control was normalized to 1 arbitrary unit for quantitative comparisons. The values given are the mean±SEM for four separate samples.

50 ng ; 11.3배 증가, $p<0.05$, dexamethasone 10 nM ; 5.8배 증가, $p<0.05$, dexamethasone 50nM ; 9.7배 증가, $p<0.05$), bFGF 10ng과 dexamethasone 50nM 두 가지를 혼합하여 자극하였을 때(17.0배 증가) 각각을 따로 자극하였을 경우보다 상승하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$) (Fig. 6).

고 찰

현재까지 유전자 발현의 정량은 Northern blotting이나 dot blotting의 방법이 많이 사용되었다. 그러나 이들 방법들은 많은 량의 RNA가 필요하므로 적은 량의 세포나 조직에서 mRNA를 측정하기에는 충분하지 않고 반정량적 측정만이 가능하다. mRNA 발현을 알아보는 다른 방법인 in situ hybridization도 하나의 세포에서만 mRNA 발현이 측정되며 정량은 불가능하다.

특정 mRNA의 존재 여부를 알아내는 정성적 방법으로서 RT-PCR법이 기존의 Northern blotting법 보다 민감도가 뛰어난 것은 이미 알려진 사실이다. 그러나 이를 정량적 방법으로 이용하기에는 여러 가지 어려움이 있다. 그 중에서 가장 큰 이유는 세포 또는 조직 속에 존재하는 핵산의 template가 100만배 이상으로 증폭되므로 증폭의 첫 번째 단계부터 반응 조건의 미세한 차이, 예를 들면 Mg^{++}나 deoxynucleotides의 농도, 온도, cycle 횟수 등에 영향을 받아 최종 산물의 양이 크게 달라져 잘못된 결과를 얻게 된다[5]. 그러므로 PCR을 시행한 후 그 생성물을 전기영동 상의 세기만으로 결과를 서로 비교할 수 없다.

이러한 개념 하에 RT-PCR 시에 internal standard를 첨가하여 mRNA를 정량적으로 측정하는 방법들이 개발되었다. 첫째, 세포나 조직에 항상 풍부하게 존재하는 betaactin 이나 GAPDH 등의 mRNA를 이용하거나, 또는 측정하고자 하는 RNA와 무관한 RNA를 이용한 방법들이 있다[6,7]. 그러나 이 방법들은 목표 RNA와 표준 RNA가 서로 다른 primer를 필요로 하기 때문에 PCR을 시행할 때 증폭의 효율이 달라질 수 있는 문제점이 있다. 둘째, internal standard로 목표 RNA와 같은 PCR primer를 사용하나 cDNA로부터의 PCR product의 크기가 목표 RNA의 PCR product의 크기와 다르게 디자인한 cDNA를 사용하는 방법이 이용되어 왔다[8]. 그러나 이 경우 PCR 시 목표 RNA만을 역전사시켜 cDNA로 합성하므로, 목표 RNA가 역전사 단계에서 일어날 수 있는 효율 변동을 배제하지 못하는 단점이 있다. 따라서 internal standard가 정량분석을 위한 기준이 되는 척도로서 사용되기 위하여는 첫째, 목표 RNA와 표준 RNA에 대한 반응이 역전사의 첫단계부터 동일한 시험관내에서 이루어져야만 하고, 둘째, 역전사 후에 생성된 cDNA가 PCR에 의하여 증폭될 경우 같은 primer를 공유할 수 있어야 하는 점을 들 수 있다.

따라서 위의 두조건을 모두 만족시키기 위하여 rcRNA를 internal standard로 사용하는 방법이 개발되었다. 1989년 Wang등[9]이 발표한 PCR 방법은 표준 RNA로 목표 RNA를 정량할 수 있게 제조하였다. 이 방법은 표준 RNA를 만들기 위하여 증폭시키려는 sense primer와 antisense primer들의 염기서열을 일렬로 연결하여 합성 DNA 조각을 만든 뒤 plasmid에 cloning한 후, T7 RNA 중합효소를 이용하여 *in vitro* transcription 시킨다. 이 표준 RNA를 목표 RNA에 계대 희석하여 섞은 후 역전사와 PCR을 시행하여 목표 RNA와 표준 RNA간에 반응이 경쟁적으로 일어나 정확한 정량을 할 수 있는 방법이다. 이 방법의 특징은 여러 가지의 목표 RNA들을 정량할 때에 한 가지 표준 RNA 만으로 정량이 가능하다는 점이다. 그러나 위와 같은 유전자재조합의 방법으로 합성 DNA를 만드는 방법은 시간이 많이 걸리며 어려우므로 보다 간편하며 서로 다른 여러 가지 목표 RNA에 일반적으로 널리 쓰일 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

본 실험에서는 위에 제시된 QRT-PCR의 여러 가지 문제점들을 보완하기 위하여 Wang등이 발표한 PCR방법을 기초로한 Heuvel등[2]의 방법을 변형하였다. 즉, genomic DNA로부터 목표 RNA의 PCR primer 염기서열을 갖는 spacer gene을 만들어, 이를 T7 RNA polymerase를 이용하여 *in vitro* transcription시켜 rcRNA를 완성하여 표준 RNA로 사용하였다. 이 표준 RNA는 PCR 수행시 competitor로서 작용하므로 정량분석을 위한 기준이 되는 역할을 갖는다. 목표 RNA와 표준 RNA에 대한 반응이 역전사의 첫 단계부터 동일하게 이루어져서 역전사 반응의 효율 변동을 최소로 하였고, 역전사 후에 생성된 cDNA가 PCR에 의하여 증폭될 경우 같은 primer를 공유하게 제조되

어 증폭의 효율이 달라질 수 있는 문제점을 극복하였으며, PCR시 ^{32}P-dCTP를 첨가하여 동위원소 치를 측정하여 적은 량의 mRNA 발현도 민감하게 정량할 수 있었다.

Rat의 폐로부터 추출된 목표 RNA와 계대 희석된 서로 다른 양의 표준 RNA를 섞어 각각의 튜브에서 역전사 반응이 일어나게 한 후 cDNA를 PCR로 증폭시켰을 경우 역전사가 여러개의 튜브에서 일어나므로 효율 변동이 있을 수 있었겠으나 실제적으로는 목표 mRNA의 양과 표준 RNA의 양이 동일한 지점, 즉 등전점으로부터 ACE mRNA의 molecule 수를 쉽게 구할 수 있었다.

본 실험에서는 정량을 위하여 PCR 시행시 동위원소를 더 해주어 증폭시켰다. 그러나 매번 정량할 때 동위원소를 사용하는 불편함을 해결하기 위하여 ethidium bromide로 염색된 agarose gel을 polaroid film에 노출시켜 현상한 사진을 densitometer로 정량하는 방법을 시도해 보았는데, 불투명한 사진의 경우 빛을 투과하지 못하고 반사되어 gel상에서 희미한 band는 측정하지 못하는 단점이 있어 정확한 정량이 불가능하였다.

그러나 실제로 어떤 유전자의 발현 변동을 보기 위하여 각각의 sample마다 정확한 mRNA의 molecule의 수를 계산하지 않고 주어진 조건에서 mRNA 발현의 정도를 비교하기만 하여도 될 경우가 많다. 실제로 기존의 Northern blotting이나 RNAse protection assay 등은 반정량적인 비교를 하는 것이다. PCR의 경우 앞에서 언급한 바와 같이 단지 PCR 상의 band의 세기를 비교하거나 housekeeping gene을 같이 PCR하는 것보다는 같은 PCR primer를 이용하여 본 연구에서와 같이 반정량적으로 비교하는 것이 더욱 정밀한 방법이다. 비록 정확한 정량은 할 수 없어도 적은 양의 RNA를 이용하여 간편하게 빠른 시간 안에 시행할 수 있어 특히 RNA의 발현량이 적은 ACE와 같은 경우 적합한 방법이다.

bFGF와 dexamethasone은 VSMC에서 ACE mRNA의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으며[10,11] 본 연구에서도 동일한 결과를 보여 본 연구의 반정량적인 방법이 유용하게 사용될 수 있음을 보여주었다.

결론적으로 본 연구의 정량적, 반정량적인 역전사 PCR방법은 배양세포뿐만 아니라 심혈관질환의 환자로부터 얻을 수 있는 적은 량의 조직과 다른 인체조직에서 발현되는 ACE mRNA의 정량에 널리 사용될 수 있을 뿐 아니라 다른 유전자의 mRNA 발현을 정량하는데 일반적으로 쓰일 수 있는 유용한 방법이다.

요 약

연구배경 :

심혈관계질환의 병태생리에 미치는 Angiotensin Converting Enzyme(ACE)의 역할 연구를 위하여는 ACE 유전자 발현에 대한 연구가 필수적이다. 종래에 ACE mRNA의 정량을 위하여 사용되던 Northern blotting 방법은 많은 양의 조직이 필요하여 인체의 심장이나 혈관으로부터 얻는 소량의 sample로는 ACE mRNA 발현의 정량적 측정이 어려웠다. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)은 적은 양의 RNA를 증폭시킬 수 있는 매우 위력적인 방법이나 단지 정성적인 비교가 가능할 뿐이다. 따라서 본 연구진은 ACE 유전자 발현의 정량적인 측정을 위하여, 또한 다른 유전자의 RNA 정량에도 공통적으로 쓰일 수 있는 보편적인 방법의 개발을 위하여 recombinant RNA(rcRNA)를 internal standard로 사용하는 Quantitative RT-PCR(QRT-PCR)의 방법을 개발하였다.

방 법 :

ACE primer의 염기서열을 갖으며 ACE RT-PCR 생성물 보다 약 200bp 작은 rcRNA를 만들기 위하여, 180bp의 GSTM(glutathione transferase) 유전자를 중간에 포함하고 앞뒤로 ACE specific primer sequence와 T7 promoter, poly(dT) tail을 갖는 spacer gene을 만든 후, 이로부터 in vitro transcription시켜 rcRNA를 만들어 internal standard로 사용하였다. PCR 시행시 32P-dCTP를 더해 주어 증폭시킨 뒤 전기영동을 한 후 PCR band에 맞는 크기의 gel를 잘라서 건조시킨 후 그 동위원소 활성도를 측정하였다. 다른 방법으로는 전기영동된 agarose gel을 가열하지 않고 진공상태에서 건조시켜 gel을 x-ray film에 노출시키고 현상한 후 densitometry를 이용하여 측정하였다.

결 과 :

1) PCR 시행 후 목표 RNA와 표준 RNA의 생성물의 크기는 처음 설계한 primer의 크기와 일치하였다.

2) Rat 폐 total RNA 1ng 중에는 1.7×10^8개의

ACE mRNA 분자 수가 존재하였다.

3) VSMC의 ACE mRNA 발현은 bFGF나 dexa - methasone에 의하여 증가되었다.

결 론 :

1) Spacer gene을 이용한 QRT - PCR 방법은 적은 양의 조직이나 세포로부터 mRNA의 양을 정량할 수 있는 유용한 방법이다.

2) VSMC의 ACE 유전자 발현은 여러 조절 물질에 의하여 변동된다.

3) 표준 RNA를 이용한 역전사 PCR 방법은 다른 유전자의 발현 연구에도 일반적으로 쓰일 수 있다.

References

1) Dzau VJ : *Vascular angiotensin pathway : a new therapeutic target. J Cardiovasc Pharmacol 10(Supp. 7) : S9-16, 1987*
2) Heuvel JPV, Tyson FL, Bell DA : *Construction of recombinant RNA templates for use as internal standards in quantitative RT-PCR. BioTechniques 14 : 395-398, 1996*
3) Chomczynski P, Sacchi N : *Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanatephenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162 : 156-159, 1987*
4) Owens GK, Thomson LG : *Expression of smooth muscle specific isoactin in cultured vascular smooth muscle cells : relationship between growth and cytodifferentiation. J Cell Biol 102 : 343-352, 1986*
5) Siebert PD, Larrick JW : *PCR mimicks : Competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. BioTechniques 14 : 244, 1993*
6) Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A : *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. Nature 333 : 858, 1988*
7) Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z : *Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo : Analysis by mRNA phenotyping. Science 241 : 708, 1988*
8) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF : *Analysis of cytokine mRNA and DNA : detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 87 : 2725-2729, 1990*
9) Wang AM, Dolye MV, Mark DF : *Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA, 86 : 9717-9721, 1989*
10) Fishel RS, Thourani V, Eisenberg SJ, Shai SY, Corson MA, Nabel EG, Berstein KE, Berk BC : *Fibroblast growth factor stimulates angiotensin converting enzyme expression in vascular smooth muscle cells. Possible mediator of the response to vascular injury. J Clin Invest 95 : 377-387, 1995*
11) Fishel RS, Eisenberg S, Shai SY, Redden RA, Bernstein KE, Berk BC : *Glucocorticoids induce angiotensin-converting enzyme expression in vascular smooth muscle. Hypertension 25 : 343-349, 1995*