대한의생명과학회지: 제2권 제2호 1996
Korean J. Biomed. Lab. Sci.
Vol. 2, No. 2, p.241~247, December, 1996

G+C 함량이 높은 Primer를 사용하는 중합효소 연쇄반응에서 변성제가 미치는 영향

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과, 동해전문대학 간호과*

김종배† · 안준환* · 엄용빈 · 김영미

국문초록: G+C 함량이 높은 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응을 실시하는 경우 높은 annealing 온도로 인하여 특이 염기서열의 합성정도가 매우 미약하게 나타나는 경우가 많이 있다. 이와 같은 문제점을 보완하기 위하여 glycerol, formamide 및 dimethyl sulfoxide (DMSO) 등의 변성제를 반응용 완충액에 첨가하고 중합효소 연쇄반응을 실시하여 그 결과를 비교 검토하였다. G+C 함량이 낮은 *Borrelia burgdorferi*의 Ly1 유전자의 primer set인 Bb 679와 Bb 680를 이용한 중합효소 연쇄반응에서는 변성제 첨가에 따른 합성 DNA의 양의 변화가 뚜렷하지 않았다. 그러나 G+C 함량이 높은 primer set인 *Mycobacterium paratuberculosis*의 IS900 유전자의 IS900/150C와 IS900/921를 이용한 중합효소 연쇄반응을 유도한 경우에는 변성제를 첨가함에 따라 합성된 DNA의 양의 증가가 뚜렷하였으며, 2.5% glycerol과 1.25% formamide를 혼합 첨가한 경우와 또는 2.5% DMSO를 반응용 완충액에 첨가하였을 때 비특이적인 증폭비율이 낮아 특이 염기서열의 합성 결과가 양호한 것으로 나타났다.

서 론

중합효소 연쇄반응은 최근에 개발된 분자생물학적인 기법의 하나로서, DNA의 어떤 특정 염기서열을 표적 염기서열로 하여 이것의 5' 및 3' 양끝 부분 DNA 가닥에 상보적인 염기 서열을 가진 두 종류의 forward 및 reverse oligonucleotide primer를 합성한 다음, 시험관 내에 검체 DNA, primer, dNTP 및 *Taq* DNA polymerase를 반응시켜 온도 변화에 의한 annealing, DNA polymerization, denaturation cycle을 반복시킴으로써 검체 DNA에 존재하는 표적 염기서열을 2^n 배로 증폭시키는 DNA 합성법이다. 따라서 이론상으론 검체내에 단 한 가닥의 특정 염기 서열이 존재하는 경우에도 중합효소 연쇄반응을 이용하여 검색이 가능한 정도까지 증폭이 가능하므로, 원인체의 분리가 어려운 Lyme borreliosis[6,12]와 같은 미생물에 의한 감염증의 진단법으로 점차 응용 범위를 넓혀가고 있는 진단 방법이라 할 수 있다.

그러나 이와 같은 중합효소 연쇄반응을 이용하여 임상질환을 진단함에 있어 그 결과가 일정하게 나타나지 않는 경우가 가끔 보고되고 있으며[9,10], 검체 내에 대상으로 하는 DNA에 비하여 절대적으로 많이 존재하고 있는 숙주의 체세포 DNA의 존재 등도 중합효소 연쇄반응을 억제하여 위음성의 결과가 초래될 수 있다[2]고 보고된 바 있다. 이와 같은 결과는 특히 G+C 함량이 높은 primer를 이용하는 경우 두드러진 것으로 알려져 있다. 그러므로 중합효소 연쇄반응을 진단에 응용하기에 앞서 특정 염기 서열을 대상으로 하는 중합효소 연쇄반응의 조건을 각각의 DNA에 따라 최적화를 하여야할 필요가 있다.

중합효소 연쇄반응의 성패를 좌우하는 것으로 알려진 조건 중에는 denaturation 및 annealing 온도, 중합효소 연쇄반응에 이용하는 완충액 내의 Mg^{++} 이온 농도 등이 매우 중요하다. 중합효소 연쇄반응의 특이도를 향상시키기 위하여는 실험에 사용하는 각각의 primer가 대상으로 하는 DNA에 효과적으로 annealing이 될 수 있는 해리온도(dissociation temperature, Td) 중에서 낮은 온도를 annealing 온도로 하여야만 한다. 이와 같은 해리온도보다 높은 온도를 annealing 온도로 정

*논문접수 1996년 9월 19일, 수정재접수 1996년 11월 2일.
†별책요청저자

하여 중합효소 연쇄반응을 실시하는 경우에는 Mg^{++}의 농도가 정상적인 경우보다 낮아야 하지만, 이와 반대의 경우에는 정상적인 조건에서 보다 DNA의 denaturation 정도가 훨씬 심하므로 이를 방지하기 위하여 이중나선구조의 DNA를 안정화하는 데 필요한 Mg^{++}이 훨씬 높은 농도로 존재하여야 함은 당연하다고 할 수 있다. 이런 까닭에 Mg^{++}의 농도는 중합효소 연쇄반응의 대상으로 하는 특이 염기서열의 합성정도와 특이도를 좌우하는 중요한 조건의 하나로 밝혀져 있다[7].

그런데 G+C 함량이 높은 primer를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하여야만 하는 경우에는 이와 같은 반응의 조건을 조정하여도 그 결과가 기대에 미치지 못하는 경우가 많이 있으며, 이것은 G+C 함량이 높은 primer의 경우 T_m이 높기 때문에 중합효소 연쇄반응에서의 annealing 온도를 높이 설정하여야 하며, 따라서 중합효소 연쇄반응은 그 특이도는 유지되지만 대상으로 하는 특이 염기서열의 합성정도가 미약할 수 밖에 없다. 이를 극복하기 위하여 annealing 온도를 낮추면 대상으로 하는 특이 염기서열의 합성정도는 증가하지만, 특이도가 감소하여 대상으로 하는 DNA의 합성되는 것외에 다른 DNA도 같이 합성되는 경향이 있다.

본 실험에서는 G+C 함량이 높은 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응을 실시함에 있어 annealing 온도를 고정하여 특이도를 일정하게 유지하면서, 일반적으로 중합효소 연쇄반응의 특이도 및 대상으로 하는 염기서열의 합성정도를 증가시키는 물질로 알려진 glycerol[11], DMSO[1] 등을 중합효소 연쇄반응의 반응용 완충액에 첨가하고 중합효소 연쇄반응을 실시하여 그 결과를 비교 검토함으로써 증폭대상인 특이 DNA의 합성이 증가되는 조건을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

Template DNA의 분리

본 실험에서 사용한 표적 DNA는 세균체를 집균한 다음 proteinase K (100μg/ml)와 1% sodium dodecyl sulfate(SDS)를 처리하여 용균시킨 후 phenol/chloroform으로 단백질을 제거하였다. 이것을 ethanol을 이용하여 침전시킨 다음 오염된 RNA는 50μg/ml의 RNase를 처리하여 순수한 DNA를 추출하는 통상적인 핵산 추출법에 따라 시행하였다. 또 필요에 따라서는 시판중인 DNA 분리용 kit (QIAamp Tissue kits, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.)를 이용하기도 하였다.

Oligonucleotide primer

G+C 함량이 낮은 primer set로는 *Borrelia burgdorferi*의 chromosome에 위치하고 있는 Ly1 유전자의 primer set인 Bb 679(5' GAAATGGTCA AAGTAAGCGG AATT 3')와 Bb 680(5' TCTGTAAACT AATCCCACCT AAAAT 3')을 이용하였다[3].

한편 G+C 함량이 높은 primer set로는 *Mycobacterium paratuberculosis*의 IS900 유전자의 primer set인 IS900/150C(5' CCGCTAATTG AGAGATGCGA TTGG 3')와 IS900/921 (5' AATCAACTCC AGCAGCGCGG CCTCG 3')를 이용하였다[14].

중합효소 연쇄반응의 조건

중합효소 연쇄반응은 반응용 완충액에 변성제를 첨가한 경우와 이를 첨가하지 않은 대조로 나누어서 실시하였다. 즉, 50μl의 완충액을 1.25 U *Taq* DNA polymerase(Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, U.S.A.), 20mM Tris-HCl(pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 최종농도가 각각 200μM이 되도록 희석한 dATP, dCTP, dTTP와 dGTP, 100 pmol의 forward 및 reverse primer, 그리고 대상으로 하는 표적 DNA가 100 ng이 되도록 혼합 조정한 후 thermal cycler (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., U.S.A.)에서 표적 DNA의 증폭을 시도하였다.

이 때 사용한 중합효소 연쇄반응의 시간과 온도는 다음과 같다. Bb 679와 Bb 680 primer를 이용한 경우 94℃에서 150초간 최초 denaturation 이후, 94℃에서 45초간 denaturation, 41℃에서 30초간 annealing, 그리고 72℃에서 45초간 extension하는 과정을 40회 반복하였으며 마지막 extension은 72℃에서 15분간을 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다. 한편 IS900/150C와 IS900/921를 사용하는 중합효소 연쇄반응의 경우에는 94℃에서 150초간 최초 denaturation 이후, 94℃에서 30초간 denaturation, 50℃에서 45초간 annealing, 그리고 72℃에서 30초간 extension하는 과정을 35회 반복하였으며 마지막 extension은 72℃에서 15분간을 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다.

본 실험에 사용한 변성제는 glycerol, formamide,

및 DMSO를 단독으로 또는 혼합하여 반응용 완충액에 첨가하고 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 중합효소 연쇄반응이 끝난 후 생성된 생성물을 2% agarose gel을 이용하여 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하여 검사하였다.

결 과

G+C 함량이 낮은 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응에서 변성제의 효과

본 실험에서 사용한 G+C 함량이 낮은 *Borrelia burgdorferi*의 chromosome에 위치하고 있는 Ly1 유전자의 primer set인 Bb 679와 Bb 680를 이용한 중합효소 연쇄반응의 결과는 그림 1에서와 같이 나타났다. 즉, 5% glycerol과 2.5% formamide를 혼합 첨가한 경우(lane 2) 또는 5% DMSO를 첨가하고 중합효소 연쇄반응을 유도한 경우(lane 3) 모두에서 변성제를 첨가하지 않은 대조(lane 4)에 비하여 합성된 DNA의 양의 변화가 뚜렷하지 않아, 이들 변성제의 중합효소 연쇄반응에서의 효과를 확인하기 어려웠다.

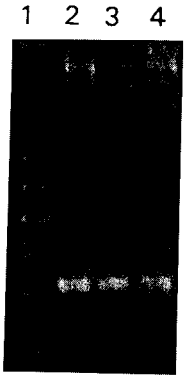

Fig. 1. Effects of denaturants on the PCR amplification using G+C-low primer set. A 224 bp region of Ly1 chromosomal gene of B. *burgdorferi* was amplified in reaction mixture with or without denaturants. The reaction products were analyzed on 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. Lane 1, molecular weight marker of *HinfI* digested pBH20; lane 2, 5% glycerol and 2. 5% formamide in reaction buffer; lane 3, 5% dimethylsufoxide in reaction buffer; lane 4, control reaction buffer without denaturants.

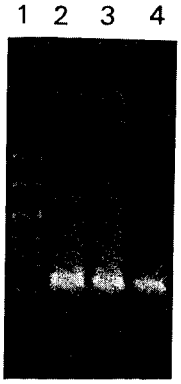

Fig. 2. Effects of denaturants on the PCR amplification using G+C-rich primer set. A 229 bp region of IS 900 gene of *M. paratuberculosis* was amplified in reaction mixture with or without denaturants. The reaction products were analyzed on 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. Lane 1, molecular weight marker of *HinfI* digested pBH20; lane 2, 5% glycerol and 2. 5% formamide in reaction buffer; lane 3, 5% dimethylsufoxide in reaction buffer; lane 4, control reaction buffer without denaturants.

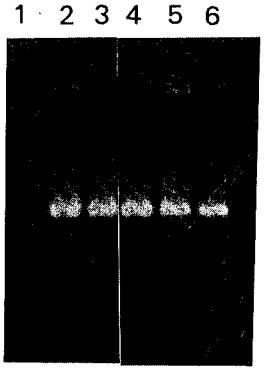

Fig. 3. Effects of denaturant concentration on the PCR amplification using G+C-rich primer set. A 229 bp region of IS 900 gene of *M. paratuberculosis* was amplified in reaction mixture with or without denaturants. The reaction products were analyzed on 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. Lane 1, molecular weight marker of *HinfI* digested pBH20; lane 2, 2.5% glycerol and 1. 25% formamide in reaction buffer; lane 3, 2.5% dimethylsufoxide in reaction buffer; lane 4, 5% glycerol and 2.5% formamide in reaction buffer; lane 5, 5% dimethylsufoxide in reaction buffer; lane 6, control reaction buffer without denaturants.

G+C 함량이 높은 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응에서 변성제의 효과

본 실험에서 사용한 G+C 함량이 높은 *M. paratuberculosis* IS900 유전자의 primer set인 IS 900/150C와 IS900/921를 이용한 중합효소 연쇄반응의 결과는 그림 2에서와 같이 나타났다. 즉, 5% glycerol과 2.5% formamide를 혼합 첨가한 경우(lane 2) 또는 5% DMSO를 첨가하고 중합효소 연쇄반응을 유도한 경우(lane 3) 모두에서 변성제를 첨가하지 않은 대조(lane 4)에 비하여 합성된 DNA의 양의 증가가 뚜렷하였다.

변성제의 농도에 따른 중합효소 연쇄반응에서 효과

G+C 함량이 높은 *M. paratuberculosis* IS900 유전자의 primer set를 이용한 중합효소 연쇄반응에서 변성제의 최적 농도를 확인하기 위하여 반응용 완충액에 첨가한 변성제의 농도를 달리하여 중합효소 연쇄반응을 실시하고 그 결과 생성되는 DNA의 양을 비교 조사하였다.

그림 3에서와 같이 5% glycerol과 2.5% formamide를 혼합 첨가한 경우(lane 4) 또는 5% DMSO를 첨가하고 중합효소 연쇄반응을 유도한 경우(lane 5) 대조에 비하여 대상 DNA의 합성량은 매우 증가된 것으로 나타났으며, 변성제의 농도를 반으로 줄여서 2.5% glycerol과 1.25% formamide의 혼합첨가 또는 2.5% DMSO를 반응용 완충액에 첨가한 경우(lane 2, lane 3)에도 대상으로 하는 DNA 생성량은 그다지 감소하지 않는 것으로 나타났다. 그러나 5% glycerol과 2.5% formamide를 첨가한 경우와 5% DMSO를 첨가하였을 때는 비특이적으로 생성되는 DNA의 합성비율은 증가하는 것으로 나타났다. 한편 변성제의 농도를 반으로 줄여서 반응용 완충액에 첨가한 경우(lane 2, lane 3)에는 비특이적으로 생성된 DNA의 양은 현저히 감소하여 아무 것도 첨가하지 않은 (lane 6) 대조와 비특이적 DNA 합성에 있어 큰 차이를 보이지 않았다.

고 찰

중합효소 연쇄반응에서의 특이도와 생성량을 최적화하기 위한 조건의 하나로 primer의 효과적인 annealing을 유발하기 위한 target DNA의 완전한 변성이 필수적이다. 그런데 이와 같은 DNA의 변성과정에서 annealing 온도가 너무 높으면 특정 DNA 염기와 primer의 결합이 불충분하여 중합효소 연쇄반응의 DNA 합성량이 감소한다[10]. 이와 반대로 annealing 온도가 너무 낮으면 DNA 합성량은 증가하지만 비특이적인 반응의 비율이 상승하여 중합효소 연쇄반응의 특이도가 현저히 감소한다. 이와 같은 관점에서 볼 때, G+C 함량이 높은 primer를 이용해야만 하는 경우 이들 primer의 높은 T_m 수치[15] 때문에 많은 문제가 야기될 수 있다. Holm 등[4]은 이와 같이 G+C 함량이 높은 primer를 이용하는 중합효소 연쇄반응의 경우 일반적으로 사용하는 KCl이 함유된 반응용 완충액을 NaCl이 함유된 완충액으로 교환하면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있다고 하였다.

또한 중합효소 연쇄반응에 있어서 반응용 완충액에 적절한 농도의 glycerol, Tween 20 - NP40 혼합제, DMSO 등의 변성제 또는 계면활성제 등을 첨가하면[11,16] DNA 가닥간에 intra- 또는 inter-strand reannealing이 감소함으로써[13] 중합효소 연쇄반응의 특이도가 높아지는 것으로 알려지고 있다.

본 실험에서는 중합효소 연쇄반응을 실시함에 있어 annealing 온도를 고정하고 반응용 완충액에 몇 종류의 변성제를 첨가하여 그 효과를 비교 검토 하였다.

본 실험에서 사용한 G+C 함량이 낮은 Ly1 유전자의 primer set인 Bb 679와 Bb 680를 이용한 중합효소 연쇄반응의 결과 변성제 첨가로 인한 합성된 DNA의 양의 변화가 뚜렷하지 않았으나, G+C 함량이 높은 IS900 유전자의 primer set인 IS900/150C와 IS900/921를 이용한 중합효소 연쇄반응 결과는 합성된 DNA의 양의 증가가 뚜렷하여 대조를 이루었다(그림 1 및 그림 2 참조). 또한 이와 아울러 연쇄반응용 완충액에 변성제를 첨가한 IS900 유전자의 중합효소 연쇄반응의 경우 비특이적 반응의 정도도 다소 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 일반적으로 annealing 온도를 낮추면 대상으로 하는 특이 염기서열의 합성정도는 증가하지만, primer의 비특이적 결합[5] 때문에 특이도가 감소하여 대상으로 하는 DNA의 합성되는 것외에 다른 DNA도 같이 합성되는 현상과 유사한 까닭에 기인하는 것으로 생각된다.

또, G+C 함량이 높은 IS900 유전자의 primer set인 IS900/150C와 IS900/921를 이용한 중합효소

연쇄반응에서 변성제의 최적 농도를 확인하였던 바 2.5% glycerol과 1.25% formamide를 혼합첨가 또는 2.5% DMSO 단독 첨가한 경우에 증폭대상 DNA 생성량은 대조에 비하여 현저히 증가하였으나, 비특이적으로 생성되는 DNA의 합성비율은 증가하지 않아 특이도가 감소하지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로부터 G+C 함량이 높은 primer를 이용한 중합효소 연쇄반응시 2.5% glycerol과 1.25% formamide를 혼합 첨가한 경우 또는 2.5% DMSO 단독 첨가한 경우에 가장 뚜렷한 변성제의 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

이상의 결과로 보아 본 실험의 결과는 G+C 함량이 높은 primer를 사용하는 중합효소 연쇄반응시 나타날 수 있는 문제점을 해결할 수 있는 방안 중 하나로 판단된다. 즉, 높은 annealing 온도로 인한 대상 DNA의 미약한 합성량을 특이도를 일정하게 유지하면서도 변성제를 반응용 완충액에 일정량을 첨가함으로써 극복할 수 있었다. 앞으로 보다 다양한 종류의 G+C 함량의 높은 primer를 사용하는 중합효소 연쇄반응계에서 각각의 변성제 또는 계면활성제의 효과를 체계적으로 조사한다면 G+C 함량이 높은 DNA를 이용하는 중합효소 연쇄반응의 여러 문제를 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Bachmann B, Luke W, and Hunsmann G(1990): Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res,* 18: 1309.
2. Cogswell FB, Bantar CE, Huges TG, Gu Y, and Philipp MT(1996): Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. *J Clin Microbiol,* 34(4): 980-982.
3. Goodman JL, Jurkovich P, Kramber JM, and Johnson RC(1991): Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active lyme disease. *Infect Immun,* 59(1): 269-278.
4. Holm T, Terry C, and George M(1991): In vitro amplification of a set of VNTR loci for forensic science. *Crime Lab Dig,* 18: 187-189.
5. Hung T, Mak K, and Fong K(1990): A specific enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res,* 18: 4953.
6. Maiwald M, Stockinger C, Hassler D, Doeberitz KM, and Sonntag HG(1995): Evaluation of the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples by polymerase chain reaction. *Infection,* 23(3): 173-179.
7. Oste C(1989): Optimization of magnesium concentrations in the PCR reaction. *Amplifications,* 1: 10-11.
8. Philipp MT, Aydintug MK, Bohm RP, Cogswell FB, Dennis VA, Lanners HN, Lowrie Jr. RC, Roberts ED, Conway MD, Karacorlu M, Peyman GA, Gubler DJ, Johnson BJB, Piesman J, and Gu Y(1993): Early and early disseminated phases of Lyme disease in the rhesus monkey: a model for infection in human. *Infect Immun,* 61: 3047-3059.
9. Roberts ED, Bohm RP, Cogswell FB, Lanners HN, Lowrie RC, Povinelli L, Piesman J, and Philipp MT(1995): Chronic Lyme disease in the rhesus monkey. *Lab Invest,* 72: 146-160.
10. Rychlik W, Spencer WJ, and Rhoads RE(1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res,* 18: 6409.
11. Smith TK, Long CM, Bowman B, and Manos MM(1990): Using cosolvents to enhance PCR amplification. *Amplifications,* 5: 16-17.
12. Stedingk LV, Hanson IO, Asbrink E, and Hovmark A(1995): Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burdorferi* DNA in skin lesion of early and late lyme borreliosis. *Eur J Clin Microbiol,* 14(1): 1-5.
13. Varadaraj K, and Skinner DM(1994): Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene,* 140: 1-5.
14. Vary PH, Anderson PR, Green E, Hermon-Taylor J, and McFadden JJ(1990): Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J Clin Microbiol,* 28(5): 933-

937.

15. Wallace RB, and Miyada GC(1987): Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol,* 152: 432-442.
16. Winship PR(1989): An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethylsulfoxide. *Nucleic Acid Res,* 17: 1266.

=Abstract=

Effects of Denaturants on the Conditions of Polymerase Chain Reactions with G+C-rich Primers

Jong-Bae Kim†, Joon-Hwan Ahn*, Yong-Bin Eom and Young-Mi Kim

Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University, Wonju, 220-710, Korea

**Nursing Department, Tong Hae Junior College, Tonghae, 240-150, Korea*

Poor yields of amplified DNAs could be resulted in polymerase chain reaction(PCR) processes with G+C-rich DNA primers because of their high T_m values. To maximize the yields of amplification in PCR processes with G+C-rich primers, we compared the yields of amplified DNA fragments according to the concentrations of specific denaturants added to the reaction mixture of PCR system. With addition of the mixture of 2.5% glycerol and 1.25% formamide, or 2.5% dimethyl sulfoxide to the reaction cocktail, respectively, remarkable increases in the yields of amplified DNA fragments were not observed in the PCR systems with G+C-low primers of Lyl chromosomal gene from *Borrelia burgdorferi* but observed in the PCR system with G+C-rich primers of IS900 gene from *Mycobacterium paratuberculosis*. Although we were not practically able to discriminate the yields of PCR DNAs according to the concentrations used in this study, addition of the mixture of 5% glycerol and 2.5% formamide, or 5% DMSO tended to increase the production of extra bands.

Key Words: Denaturants, PCR, G+C-rich primer

[Korean J. Biomed. Lab Sci., 2(2): 241~247, December, 1996]

†Corresponding author