

프라이머 중합체를 이용한 원위치 중합효소 연쇄반응 In situ PCR 방법의 개발

장진수¹ · 이재영*

¹독암연구소, 목포대학교 생물학과

효과적인 원위치 중합효소 연쇄반응 (*In situ* PCR)을 위해서는 증폭된 PCR 산물의 세포의 유출을 감소시켜야 한다. 이를 위한 한 방법으로 거대분자 PCR 산물을 합성시키기 위한 5'쪽에 서로 상보적인 꼬리서열을 가진 프라이머(꼬리 프라이머; tailed primer)가 사용되었으나 많은 PCR 횟수로 인해 시간의 낭비와 세포조직의 형태보존성이 저하되는 문제가 발생하였다. 따라서 PCR 조건을 가능한 최적화시키고, 최소의 PCR 횟수로써 세포의 유출을 막을 수 있는 방법이 필요하게 되었다. 이러한 방법의 일환으로 꼬리 프라이머를 이용하여 PCR 튜브 속에서 목표 핵산없이 프라이머 중합체(primer polymers)의 형성을 유도하였고, 이를 유리 슬라이드위에 고정시킨 Molt/LAV 세포들에 처리하여 20 회의 짧은 시간에서도 적절한 탐침을 할 수 있게 되었다. 이로 인해 프라이머 중합체의 원위치 중합효소 연쇄반응에서의 사용가능성을 타진하였다.

Key words □ high molecular weight products, *in situ* PCR, primer polymers

원위치 중합효소 연쇄반응(*in situ* PCR: ISPCR) 기술은 원위치 혼성반응(*in situ* hybridization: ISH)이 가지는 세포상에서의 특이성과 PCR의 고감성을 결합시킨 탐침 기술이다(13). 짧은 길이나 적은 수의 유전자를 가진 목표 핵산을 탐침하는데에 어려움이 있는 혼성반응(8)의 단점을 PCR(10, 16)의 높은 증폭력이 해결해 주었고, PCR이 가지는 목표 핵산의 오염에 따른 특이성 결여를 혼성반응 기술이 보완해 주었다. 이 기술로 단일 단위의 목표 핵산을 탐침할 수 있게 되었고(3, 5, 7, 14, 20), 또한 변형되어 여러 다양한 용도에 사용되었는데(1, 6, 17, 18, 21, 22), 현재 생물학 전 분야에 유용하게 사용되고 있다.

원위치 중합효소 연쇄반응의 원리는 조직의 절편이나 세포를 유리 슬라이드위에 고정시키고, 그 내부의 목표 핵산을 PCR로 증폭한 후 혼성반응 등으로 탐침하는 것이다. 그런데 PCR 용액의 주요 반응물들이 세포내로 들어가도록 하기위한 처리로 자칫하면 세포손상을 일으키어 증폭된 핵산들이 세포밖으로 유출되고, 이들이 인접세포들 내부로 침투하거나 세포외부에서 또 증폭되어 결국에는 가양성반응을 나타내게 된다(14). 이러한 PCR 생성물의 세포밖 유출을 막기위해 여러 방법들(4, 11, 13, 19)이 사용되었는데, 본 연구실에서는 인간 면역결핍 바이러스(HIV-1)에 감염된 두가지 현탁 배양세포들(Molt/LAV와 U1.1)에 꼬리 프라이머, 바이오틴이 결합된 dNTP, 아가로오스를 이용한 다중(concatemer) PCR로 각각 긴 길이의 PCR 생성물(high molecular weight product)(11)과 몸집이 큰 PCR 산물(12)을 만들어 내어, 이들에 의한 유출방지 가능성을 보고하였다. 그러나 이 방법들도

통상 50-60 회 정도의 긴 증폭시간이 소요되는 단점이 있고, PCR 초기에 짧은 초기 PCR 산물이 세포밖으로 유출되어 세포외부에서 계속 증폭이 되어 배경신호를 만들어내는 등 효율성이 크게 감소되는 현상을 보였다(11). 이를 극복하기 위해 이번 연구에서는 먼저 목표 핵산없이 꼬리 프라이머만의 PCR을 통하여 프라이머 중합체가 형성되는 지를 조사하고, 짧은 시간동안에 프라이머 중합체에 의한 원위치 중합효소 연쇄반응 효과를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 준비

튜브에서의 액상 PCR을 위해서 인간 면역결핍 바이러스의 염기서열을 가지고 있는 pBH10을 사용하였고, 증폭의 목표가 되는 부위는 gag이다(11).

원위치 중합효소 연쇄반응을 위해서 인간 면역결핍 바이러스에 감염된 Molt/LAV(9)와 감염되지 않은 Molt의 현탁 배양세포들이 사용되었고 이전의 보고들(2, 11, 12)에서 언급된 바와 같이 준비되었다. 실험재료로 쓰이기 위해 신선한 배양액에서 자라는 현탁 배양세포들은 PBS로 2번 세척되었고 원심분리(5분, 160 × g)하여 모아졌으며 유리슬라이드위에 놓여지고 건조된 후에 에탄올-빙초산의 혼합액 (3:1)으로 5분동안 고정되었다. 이후 100% 에탄올로 세척되었고 70% 에탄올 속에 냉장상태(4°C)로 보관되었다.

사용된 프라이머와 탐침서열

인간 면역결핍 바이러스의 gag 1551-1665 부위를 목표로

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (061) 450-2347, Fax: (061) 454-0267
E-mail: jaeyunglee@hotmail.com

SK38과 SK39이 프라이머로 사용되었고, 이들의 5'쪽에 서로 상보적인 결합을 할 수 있는 18개의 꼬리서열을 덧붙여 꼬리 프라이머를 만들어, 각각 TRSK38과 T'SK39이라 명명하였다. 탐침서열로는 ³²P로 방사능 표지된 SK19이 사용되었다. 이들의 DNA 서열과 결합위치는 다음과 같다.

SK38: 5'-ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT-3' (*gag* 1551-1578)

SK39: 5'-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC-3' (*gag* 1638-1665)

TRSK38: 5'-ccccaaacccaaaccccGTAC-SK38-3' (소문자표시는 꼬리서열이고 밑줄친 GTAC는 *Rsa*I 제한서열)

T'SK39: 5'-ggggtttggggtttgggg-SK39-3' (소문자표시는 TRSK38의 꼬리서열과 상보적인 결합을 할 수 있는 꼬리서열)

SK19: 5'-ATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC-3' (*gag* 1595-1635)

액상 PCR에 의한 프라이머 중합체의 형성과 그를 이용한 거

대분자 PCR 산물의 합성 (그림 1과 2): (I) 먼저 목표 핵산없이 꼬리 프라이머를 사용하여 40-50 회의 PCR을 수행함으로써 프라이머 중합체가 형성되는 지를 조사한다.

(II) 40 회에서 만들어진 프라이머 중합체를 프라이머로 사용하여 pBH10을 목표 핵산으로 10-20 회의 PCR을 수행하여 거대분자 PCR 생성물들의 형성여부를 조사한다. 이 과정은 실제로 세포들을 사용하기 전에, pBH10을 사용하여 프라이머 중합체에 의한 거대분자 PCR 생성물의 형성효과를 알아보려고 하는 것이다.

PCR 조건은 (A) 목표 핵산없이 PCR 용액 II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂), 5 μM 꼬리 프라이머, 250 μM dNTPs, 10 units의 Taq 효소를 섞어 총 50 μl 반응으로 수행하고, (B) 40 이나 50회 후에 pBH10 (100 만개)을 목표로 하여 (A)로부터의 40 μl의 프라이머 중합체 용액, PCR 용액 II, 250 μM dNTPs, 10 units의 Taq 효소를 섞어 총 50 μl 용액으로 10 이나 20 회의 PCR을 추가 수행한다. 최종 PCR 생성물 (10 μl)은 *Rsa* I 효소로 자르고 이를 아가로즈겔에서 분석한다. 이때 대조군으로 pBH10을 넣지않고 PCR을 수행한다. PCR 반응은 0.5

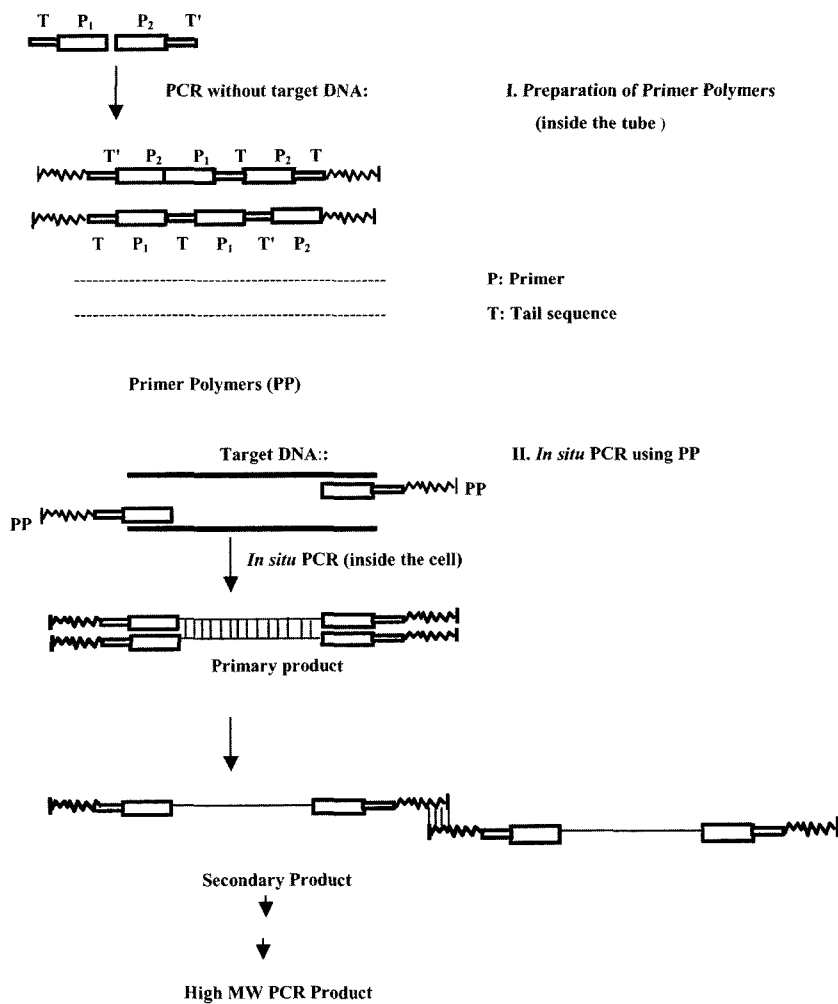


Fig. 1. Schematic diagram of Concatemer PCR using primer polymers leading to the synthesis of the high molecular weight PCR product.

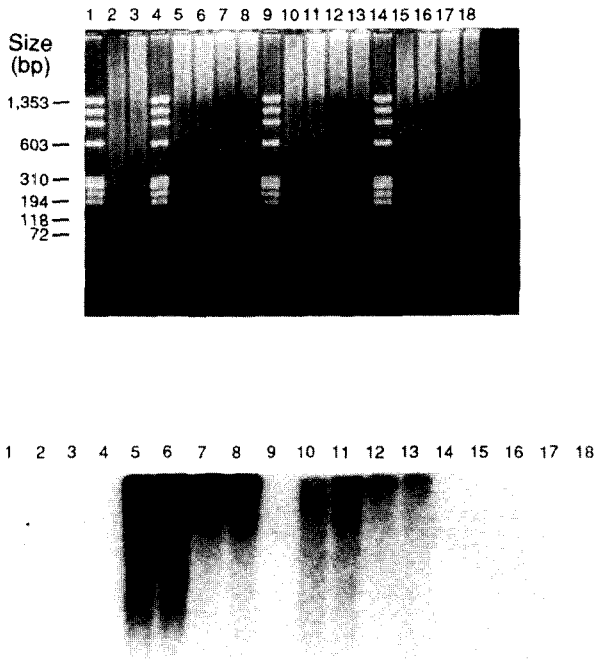


Fig. 2. PCR in solution using primer polymers. (Top) Without any target sequences, primer polymers were generated in 50 μ l reactions at 40 (lane 2) and 50 cycles (lane 3) using PCR buffer II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂), 10 units of Taq enzyme, and 0.5 μ M tailed primers. 10 μ l aliquots were withdrawn for the analysis in 2% agarose gel electrophoresis. With primer polymers from 40 cycles, further 10 (lane 5) or 20 cycles (lane 6) were continued upon addition of 10 μ l solution including one million copies of pBH10 target DNA, 10 units of Taq enzyme and PCR buffer II. Final amplicants of 10 μ l aliquots from 10 or 20 cycles were digested with *Rsa*I enzyme, respectively (lanes 7 and 8). Parallel reactions were performed with primer polymers from 50 cycles (lanes 10 - 13) as well as control reactions from 50 cycles without target DNA (lanes 15 - 18). The ruler on the right side of the gel was used to determine the relative distance of the bands from the gel slot and verify the targets in the Southern blot. (Bottom) The presence of the target sequences was verified by Southern blot of the gel using the internal probe SK19.

ml의 튜브속에서 수행되었고, DNA 증폭기(Perkin-Elmer Cetus)가 사용되었다.

써던 블롯, 혼성 반응과 자가 방사성 사진술

전기영동 겔상의 증폭된 DNA는 이미 언급된 것처럼(15), 나이트로셀룰로즈 종이에 옮겨지고 전혼성 반응 (prehybridization) 과 혼성 반응을 58°C에서 각각 3시간, 하룻밤동안 수행한다. 블롯은 상온에서 3번 세척이 되는데 각각 한번씩, 2xSSC, 0.1% SDS에서 10분간, 1xSSC, 0.1% SDS에서 5분간, 0.1xSSC에서 1 분간 세척되고 상온에서 말린다. 마른 블롯은 -70°C에서 Kodak

Diagnostic Film X-OMAT™AR (Kodak, Rochester, NY)로 하룻 동안 노출되고, 그 후 빼낸 필름은 Konica QX-60A automatic x-ray film processor (Konica, Tokyo, Japan)를 통해 현상이 된다.

현탁 배양세포들의 PCR을 위한 준비 및 PCR

70% 에탄올 (4°C)에 보관된 유리슬라이드 위의 Molt/LAV와 Molt 세포들 (1.0 x 10⁶ 개)을 PBS로 세척하고 상온건조시킨다. 슬라이드상의 세포들 주위에 고무개스킷을 고정시키고 그 안에 40, 50 회의 액상 PCR을 통해 얻어진 100 μ l의 프라이머 중합체를 넣고 45°C에서 3시간동안 배양시킨다(PCR 전처리). 다른 100 μ l의 프라이머 중합체는 PCR용액 II와 섞고, 최종적으로 예 열된 5% SK GTG 아가로오스와 동량으로 섞는다. 이 최종 혼합물을 액상 PCR 용액이 제거된 개스킷안에 붓고 그 위를 비닐 랩으로 덮고, 이 슬라이드를 증폭기의 금속블록위에 위치시킨 후 10, 20회의 PCR을 수행한다. 뒤이은 PCR 후고정(post-PCR fixation), 원위치 혼성반응, 현상인화는 그 이전처럼(11) 수행한다. 대조구로서는 Taq 효소를 첨가하지 않은 경우, 프라이머 중합체 대신 꼬리 프라이머만으로 처리를 한 경우가 포함되었다(Fig. 3). PCR 조건은 액상 PCR에서와 동일하게 수행되었다.

결과 및 고찰

프라이머 중합체의 형성

종래의 꼬리 프라이머를 통한 원위치 중합효소 연쇄반응에서 거대분자(high MW products)를 얻기 위해서는 보통 50-60 회의 증폭이 필요하였는데, 더 짧은 횟수로 긴 길이의 증폭산물을 얻기 위하여 프라이머 중합체(PP)를 고안하게 되었다. PP의 형성원리(Fig. 1-I)는 PCR에서 흔히 볼 수 있었던 프라이머들간의 비특이적인 증폭 현상을 이용하여, 목표 핵산없이 꼬리 프라이머들로만 서로간에 head-to-head 혹은 head-to-tail, tail-to-tail등의 방향으로 비특이적이고 무작위적으로 연결이 되고, 증폭이 되어 세포 내로, 또 핵안으로 들어갈 수 있는 가능한 최대크기의 pp를 튜브안에서 미리 만드는 것이다. 따라서 이들 pp가 세포내로 들어가 5'쪽의 프라이머에 의해 목표 부위에서 증폭을 하고, 이 증폭 산물들이 다시 프라이머로 작용하거나 서로간에 꼬리 서열에서 상보적인 결합을 하여 다시 증폭이 된다면 짧은 시간안에 아주 긴 길이의 거대분자들이 세포 내부에 만들어지게 되어 외부로 유출되지 않을 것이다(Fig. 1-II).

실제로 그림 2에서 보는 바와 같이 꼬리 프라이머만에 의한 PCR 결과, 50 회(lane 3)에서 더 긴 길이의 고분자 증폭산물인 pp가 만들어졌다. 또한 이들 pp에는 써던 블롯에 의해서 목표핵산이 없음을 확인하였다(위, 아래 사진의 lane 2와 3). 40과 50 회의 PCR로부터 만들어진 pp에 pBH10을 첨가하고 각각 10 (lane 5와 10), 20 회(lane 6과 11) 더 증폭시켰을 때 40 회로부터 pp가 더 많은 양을 가진 다양한 길이의 거대분자를 만드는 것으로 보인다(lane 5와 6). 그런데 모든 pp가 목표 핵산이 들어 있는 거대분자를 만드는 것은 아니고, 그의 맨끝 3'쪽에 꼬리 프라이머의 SK38과 SK39 서열이 붙어 있는 일부의 pp만이 그에

상보적인 목표 핵산 부위에 붙어서 5'쪽은 길게 늘어진 서열을 가지는 프라이머로서의 역할을 하게 된다. 이후 10, 20 회의 추가적인 다중 PCR에 의해 더 긴 길이의 거대분자를 형성하게 된다 (Fig. 1-II). 또한 대조구로서 pBH10을 넣지않고 추가 PCR을 수행하면 (lane 15와 16), 목표 핵산없이 pp간에 비특이적 증폭이 일어나 유사한 거대분자가 형성되지만 써던 블롯에 의하여

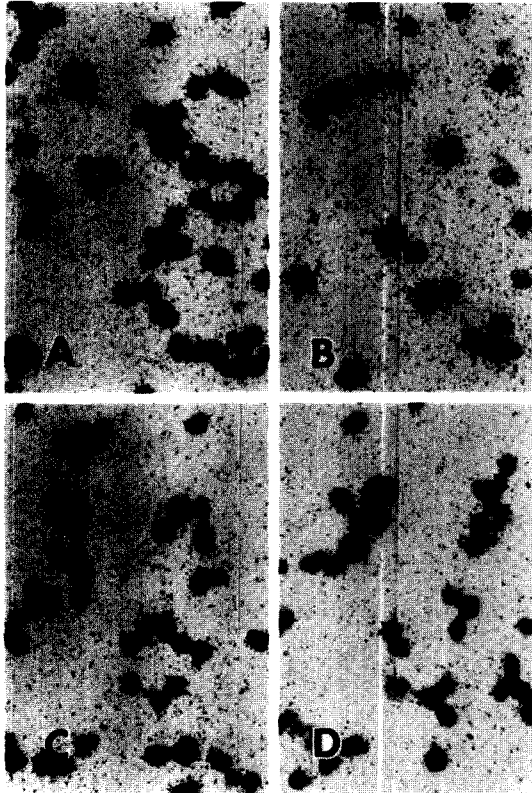


Fig. 3. Primer polymers for *in situ* PCR. Primer polymers (100 μ l) generated from 40 or 50 cycles of amplification without the addition of target using PCR buffer II (10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4.5 mM MgCl₂, 10 units/ 50 μ l reaction of Taq enzyme) with 5 μ M tailed primers were used in pre-PCR incubation. Upon the completion of pre-PCR incubation, solution of primer polymers was removed from the gasket and another aliquot of primer polymers (100 μ l) without the addition of tailed primers was mixed in 2.5% SK GTG agarose and applied to Molt/LAV cells on the slide. PCR buffer II with 5 μ M tailed primers was applied to Molt/LAV cells with Taq (panel C) and PP from 40 cycles (100 μ l) were also applied to Molt/LAV cells without Taq enzyme on a separate slide in a parallel reaction. Cycler was programmed for these two slides to 20 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 2 min, and extension at 72°C for 1 min. After 20 cycles, the slide containing the amplified samples with pp from 40 (panel A) and 50 cycles (panel B) was removed from the cycler. Another slide containing the amplified products with tailed primers (panel C) and a negative control of pp from 40 cycles (panel D) without Taq enzyme was also removed for further treatments. Two slides were treated for the following post-PCR fixation, ISH, and autoradiography. Cells were counterstained with Giemsa and photographed with the final magnification of x300.

목표 핵산이 없음을 확인하였다. 이 거대분자들을 *Rsa* I로 분해했을 때 (lane 7, 8과 12, 13), 불완전분해가 일어나 아주 긴 길이의 거대분자는 남고 중간 길이의 거대분자들은 *Rsa* I site에서 잘려져나가 72 bp보다 약간 작은 길이의 밴드로 나타나게 되었다 (겔 사진의 lane 7, 8, 12, 13, 17, 18). 이로써 거대분자는 꼬리 프라이머에 의해 형성된 거대분자임이 확인되었다. 또한 원 위치 증합효소 연쇄반응에서 pp의 효과를 알아보기 위해서는 먼저 세포와 핵속으로 들어갈 수 있을 만큼의 길이를 가진 pp를 만들어야 하는데, 액상 PCR의 결과로부터 40 회의 pp (Fig. 2의 lane 2)가 50 회로부터의 pp (Fig. 2의 lane 3)보다 더 많고 다양한 길이의 거대분자 (lane 5 와 6)를 만들어냄을 알게 되었다. 따라서 이들 pp의 세포내로의 이동 및 원위치 증합효소 연쇄반응에 어느 pp가 더 효율적인 지를 조사하기로 하였다.

프라이머 증합체를 이용한 원위치 증합효소 연쇄반응

이 두 종류의 pp (Fig. 2의 lane 2와 3으로 부터의)를 슬라이드 위의 Molt/LAV 세포에 위치시키고 10 회, 20 회의 추가 PCR을 수행하였다 (Fig. 3의 패널 A와 B). 이 결과 10 회 (결과 제시 안함)에서 보다는 20 회의 추가 PCR에서, 40 회에서의 pp (패널 A) 보다는 50 회에서의 pp (패널 B)가 더 좋은 결과를 내었다. 예상컨대, 액상 PCR에서는 50 회에서의 pp (Fig. 2의 lane 3)가 그 양이 더 많아서 세포로 들어가기에 적당한 길이의 pp도 더 많을 것으로 추측이 되고 이들중 일부의 pp가 추가 PCR로 인해 진정한 거대분자를 만드는 것으로 예상된다.

또한 대조구로서 Taq 효소와 꼬리 프라이머로 20 회의 PCR을 수행하여 (패널 C), pp가 꼬리 프라이머보다 더 효과적으로 많은 신호를 나타내 줄 수 있음을 보였다. 또한 40 회로부터의 pp를 첨가하여 Taq 효소없이 20 회의 PCR을 수행하였는데 (패널 D), pp속에 남아있던 Taq 효소로 인해 어느 정도의 신호는 보이나 비교적 적은 수준의 배경신호를 나타내 주었다.

따라서 목표 핵산없이 미리 프라이머 증합체를 만들어 놓고 목표 세포들이나 조직들이 준비되면 비교적 짧은 시간의 PCR로 적당한 대조구를 사용한 원위치 증합효소 연쇄반응을 수행할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 한국학술진흥재단 연구비 지원 (KRF-2002-070-C00073)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Andras, S.C., J.B. Power, E.C. Cocking, and M.R. Davey. 2001. Strategies for signal amplification in nucleic acid detection. *Mol. Biotechnol.* 19, 29-44.
2. Auh, C-K., J-S. Chang, and J.Y. Lee. 2003. *In situ* PCR on the glass slide using the conventional DNA thermal cycler. *Kor. J. Microbiol.* 39, 197-200.
3. Bagasra, O., T. Seshamma, and R.J. Pomerantz. 1993. Polymerase

- chain reaction *in situ*: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and specific genes. *J. Immunol. Meth.* 158, 131-145.
4. Chiu, L.P., S.H. Cohen, D.W. Morris, and G.W. Jordan. 1992. Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 333-341.
 5. Embretson, J., M. Zupancic, J. Beneke, M. Till, S. Wolinsky, J.L. Ribas, A. Burke, and A.T. Haase. 1993. Analysis of human immunodeficiency virus-infected tissues by amplification and *in situ* hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 357-361.
 6. Goodman, A.D., D.J. Mock, J.M. Powers, J.V. Baker, and B.M. Blumberg. 2003. Human herpesvirus 6 genome and antigen in acute multiple sclerosis lesions. *J. Infect. Dis.* 187, 1365-1376.
 7. Gosden, G. and D. Hanratty. 1993. PCR *In Situ*: A rapid alternative to *in situ* hybridization for mapping short, low copy number sequences without isotopes. *BioTechniques* 15, 78-80
 8. Harper, M.E., L.M. Marselle, R.C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 772-776.
 9. Kikukawa, R., Y. Koyanagi, S. Harada, N. Kobayashi, M. Hatanaka, and N. Yamamoto. 1986. Differential susceptibility to the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus in cloned cells of human leukemic T-cell line Molt-4. *J. Virol.* 57, 1159-1162.
 10. Laure, F., V. Courgnaud, C. Rouzioux, S. Blanche, F. Veber, M. Burgard, C. Jacomet, C. Griscelli, and C. Brechot. 1988. Detection of HIV DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* 2, 538-541.
 11. Lee, J.Y., J-K. Auh, and G.W. Jordan. 2002. Evaluation of several parameters of *in situ* polymerase chain reaction (ISPCR) to reduce the leakage of amplifiants from the cells. *J. Microbiol.* 40, 70-76.
 12. Lee, J.Y. 2001. Methods of *in situ* PCR to retain the amplification products inside the cells. *Kor. J. Microbiol.* 37, 294-298.
 13. Komminoth, P. and A.A. Long. 1993. *In situ* polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virchows Archiv. B. Cell. Pathol.* 64, 67-73.
 14. Komminoth, P., A.A. Long, R. Ray, and H.J. Wolfe. 1992. *In situ* polymerase chain reaction detection of viral DNA, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytospins. *Diagn. Mol. Pathol.* 1, 85-87.
 15. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Southern transfer, p 382-389. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor laboratory.
 16. Mullis, K.B. and F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
 17. Nuovo, G.J. 2001. Co-labeling using *in situ* PCR. A review. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1329-1340.
 18. Nuovo, G.J. 2000. *In situ* strand displacement amplification: An improved technique for the detection of low copy nucleic acids. *Diagn. Mol. Pathol.* 9, 195-202.
 19. Nuovo, G.J., F. Gallery, P. MacConnell, J. Becker, and W. Bloch. 1991. An improved technique for the *in situ* detection of DNA after polymerase chain reaction amplification. *Am. J. Pathol.* 139, 1239-1244.
 20. Spann, W., K. Pachmann, H. Zabnienska, A. Pielmeier, and B. Emmerich. 1991. *In situ* amplification of single copy gene segments in individual cells by the polymerase chain reaction. *Infection* 19, 242-244.
 21. Staskus, K.A., L. Couch, P. Bitterman, E.F. Retzel, M. Zupancic, J. List, and A.T. Haase. 1991. *In situ* amplification of visna virus DNA in tissue sections reveals a reservoir of latently infected cells. *Micro. Pathog.* 11, 67-76.
 22. Urbanczyk-Wochniak, E., M. Filipecki, and Z. Przybecki. 2002. A useful protocol for *in situ* RT-PCR on plant tissues. *Cell. Biol. Biol. Lett.* 7, 7-18.

(Received March 2, 2004/Accepted May 24, 2004)

ABSTRACT : Development of *In situ* PCR Method Using Primer Polymers

Jin-Soo Chang¹ and Jae Yung Lee* (¹Mogam Biotechnology Research Institute, Yongin 449-910, Korea, Department of Biology, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea)

Reduction in the leakage of the amplified PCR product out of cell is required for effective *in situ* PCR. For this purpose, primers with complementary tail sequences at their 5' sides were utilized to synthesize high molecular weight PCR products, but it is time-consuming and causes deterioration of cellular appearance with many PCR cycles. Therefore, it is required to optimize the PCR condition with minimal PCR cycles. To achieve the purpose, primer polymers were made without the target DNA in tube from nonspecific amplification with tailed primers and treated onto the fixed Molt/LAV cells on the glass slide for the 20 cycle-*in situ* PCR, in which the appropriate target signals were observed for the possible use of primer polymers in *in situ* PCR.