

PCR을 이용한 미지 영역의 Cloning I

H. Nakayama

PCR은 기지서열의 일부를 primer로 제작하여 primer의 특이성으로 primer 사이의 영역을 증폭하는 방법이다. PCR은 기지유전자의 cloning에 널리 이용하고 있으며 미지유전자의 cloning을 위한 여러 가지 방법이 고안되어 실용화되고 있다. 대표적인 미지 유전자의 cloning 방법으로 1)3' -RACE법, 2)Degenerate PCR법, 3)AP-PCR법과 DD법, 4)5' -RACE법 등이 있다. 본 고에서는 미지의 유전자를 cloning하는 기본적인 원리와 3' -RACE, degenerate 법, DD법의 원리와 주의점에 대하여 소개한다. 다음 호(Life Science & Biotechnology 18호, 2001년 3월 1일 발간 예정)에는 5' -RACE법을 중심으로한 미지 유전자 cloning법에 대해 소개할 예정이다.

1. 일반적인 주의사항

1.1 Negative control를 만든다.

미지유전자의 cloning을 위한 PCR 대부분은 특정유전자를 증폭하는 PCR보다 특이성이 낮아 비특이적 증폭이 많이 일어난다.

비특이적 증폭에서 특이적 증폭만을 구별하는 간단한 방법은 없지만 특이적 증폭이 아닌 것을 알 수 있는 방법은 있다. 즉 한쪽의 primer만으로 증폭되는 것은 비특이적 증폭이다. RACE법이나 degenerate PCR법을 이용하여 미지 유전자를 분리하기 위해서는 반드시 양쪽의 primer 중 한쪽만을 포함하는 negative control을 두 종류 만들어 동시에 증폭하여 전기영동으로 비교해야 한다. 한쪽의 primer로 증폭이 되는 것은 비특이적 산물이며 negative control 실험은 특이적 산물을 선택할 수 있는 가장 간단한 방법이다. 흔히 PCR로 증폭산물을 subcloning하고 sequencing으로 확인하는데, sequencing 단계에서 양쪽에 같은 primer가 있음을 확인하면 처음부터 모든 실험을 다시 시작해야 하는 오류를 범하게 된다.

그림 1과 같이 lane 3, 4는 lane 2에 대한 negative control로 한쪽 primer만을 사용하였다. 그림 1 왼쪽의 화살표로 표시된 분자량이 큰 밴드는 lane 2 뿐만 아니라 lane 3에서도 증폭됨을 알 수 있다. 다행히 목적 산물(110 bp)이 lane 2에서만 확인되었지만 만약 목적 산물의 크기가 화살표 위치였다면 그것을 cloning하여도 양쪽 끝에 같은 primer를 갖는 부분만 얻게 된다.

이와 같이 비특이적인 background가 있고 목적으로 하는 DNA와 크기가 다른 경우는 전기영동을 이용한 크기 분화로 background를 줄일 수 있으므로 적절히 선택하기 바란다.

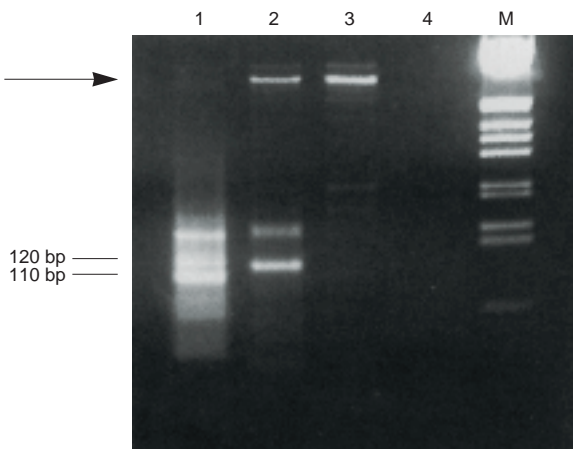


그림 1

lane 1 : 최초의 PCR(SP와 AP1로 증폭)

lane 2 : Sense, antisense 두 종류의 primer를 이용한 nested PCR(SP와 AP2로 증폭)

lane 3 : Sense primer(SP) control

lane 4 : Antisense primer(AP2) control

비특이적 증폭은 흔히 한쪽의 primer만으로 증폭이 일어나는 경우이며, lane 3, 4와 같이 한쪽의 primer만을 포함하는 negative control의 PCR을 통하여 목적 밴드가 양쪽의 primer에서 증폭된 것을 확인한다.

1-2 Size를 분획한다

PCR은 여러 종류의 DNA단편을 합성할 때 길이가 작을수록 증폭효율이 높은 경향이 있다. 또한 degenerate PCR과 같이 특이성이 낮은 primer로 PCR할 경우는 원하는 DNA와 다른 크기의 밴드만이 다량 증폭되는 경우도 가끔 있다. 이런 경우는 PCR산물을 전기영동한 다음 필요한 크기의 DNA만을 gel에서 추출한 후 주형으로 사용하여 다시 한번 PCR하는 것이 좋다.

그림 3은 한쪽의 nested primer를 이용하여 최종적으로 y bp 전후의 단편을 얻기 위하여 degenerate PCR한 결과이다. 최초 PCR에서는 x bp 부근에 단편이 증폭될 것으로 예상했지만, 실제로는 y bp 부근에 강한 비특이적 밴드가 검출되었으며 예상했던 x bp 부근에는 극히 적은 양의 흐린 밴드를 확인하였다(lane B).

최초 PCR에서 증폭된 비특이적 밴드는 primer P1을 양끝에 갖는 구조이므로(lane A) 단순히 nested PCR만으로 제거할 수 없고, 비특이적인 밴드만이 증폭되며 원하는 y bp 밴드는 증폭되지 않았다(lane C). 그러나 최초 PCR생성물을 전기영동한 후 예상했던 x bp 전후의 DNA를 gel에서 잘라내어(lane B) 정제하여 주형으로 사용한 nested PCR의 결과, 최초 PCR에서 증폭한 비특이적 산물이 제거되고 예상하는 band가 증폭되었다(lane D).

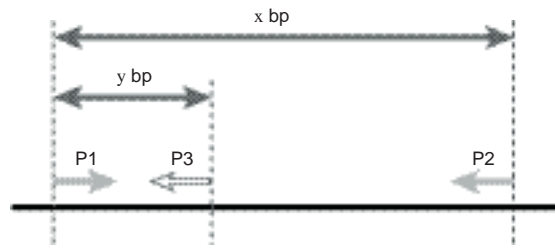


그림 2

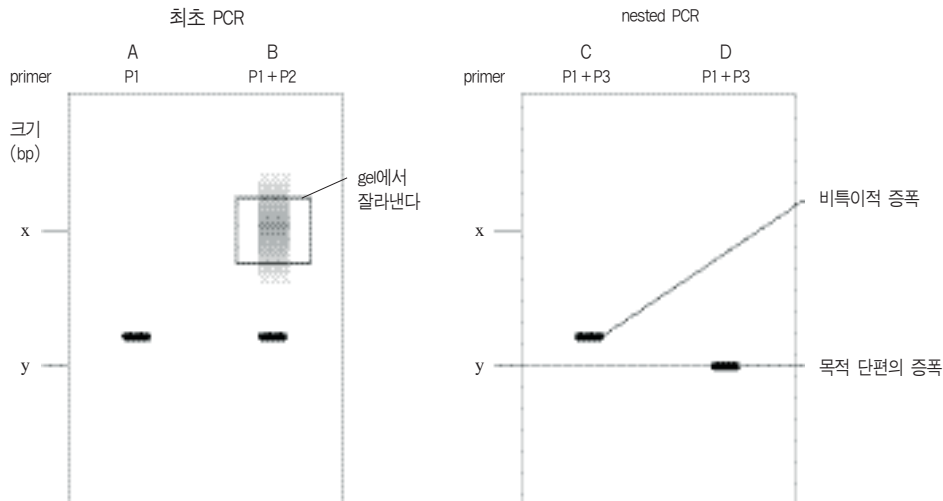


그림 3

C : P1+P2의 PCR산물 전체를 주형으로 한 nested PCR
D : Gel에서 잘라낸 DNA를 주형으로 한 nested PCR

1-3 PCR 결과 얻어진 단편의 판정법을 갖는다.

PCR에서 미지영역을 cloning할 때는 얻어진 clone이 의미가 있는 것인지를 판단할 수 있는 방법이 있어야 한다. 그림 4의 A와 같이 primer 외에는 모두 미지의 서열인 경우는 증폭된 단편이 비특이적 산물인지 특이적 산물인지 판단하기 어렵다. RACE 법이나 degenerate PCR법으로 B와 같이 신장방향에 어느 정도 기지의 서열이 남도록 디자인하면 얻은 단편이 특이적 산물인지 비특이적 산물인지 확인할 수 있다.

물론 본질적으로 그림 A와 같은 단편밖에 얻어지지 않는 AP-PCR과 같은 경우는 다른 분석방법이 있으므로 여기서는 언급하지 않겠다.

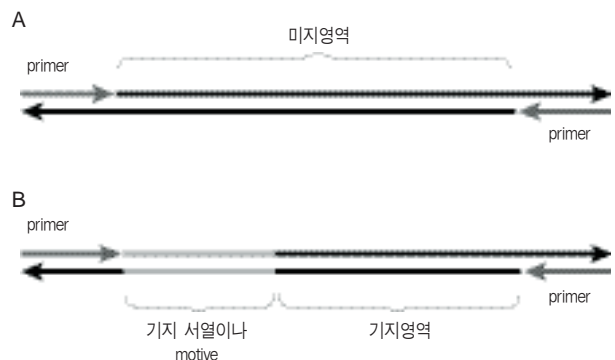


그림 4

2.3 - RACE법

2-1 3' - RACE법의 원리

RACE(Rapid Amplification of CDNA Ends)는 cDNA의 염기서열을 부분적으로 알고 있는 경우 기지영역의 염기서열정보를 바탕으로 cDNA 말단까지 미지영역을 cloning하는 PCR 방법이다. 미지영역이 mRNA의 5'인 경우를 5'-RACE, 3'의 경우를 3'-RACE라 한다. 그림 5에 3'-RACE법의 원리를 나타내었다.

5' 말단에 adaptor 서열*이 붙은 oligo(dT)를 primer로 사용하여 역전사 반응으로 1st strand cDNA를 합성한다. 완성된 1st strand cDNA 말단은 adaptor 서열을 포함하고 있으며 cloning을 목적으로 하는 cDNA는 미지영역이 기지서열과 adaptor 서열 사이에 끼어있게 된다. 기지서열의 일부를 sense primer로 사용하여 adaptor primer와 함께 PCR함으로써 미지영역을 증폭할 수 있다(이 sense primer를 유전자 특이적 primer, gene specific primer라는 의미로 GSP1이라고 줄여 쓰는 경우가 많다).

* 1 제한효소의 인식서열이 붙어있는 것이 많아 linker 서열이라고 부르기도 한다. 또한 이 서열을 갖는 primer를 linker primer라 한다.

목적 mRNA

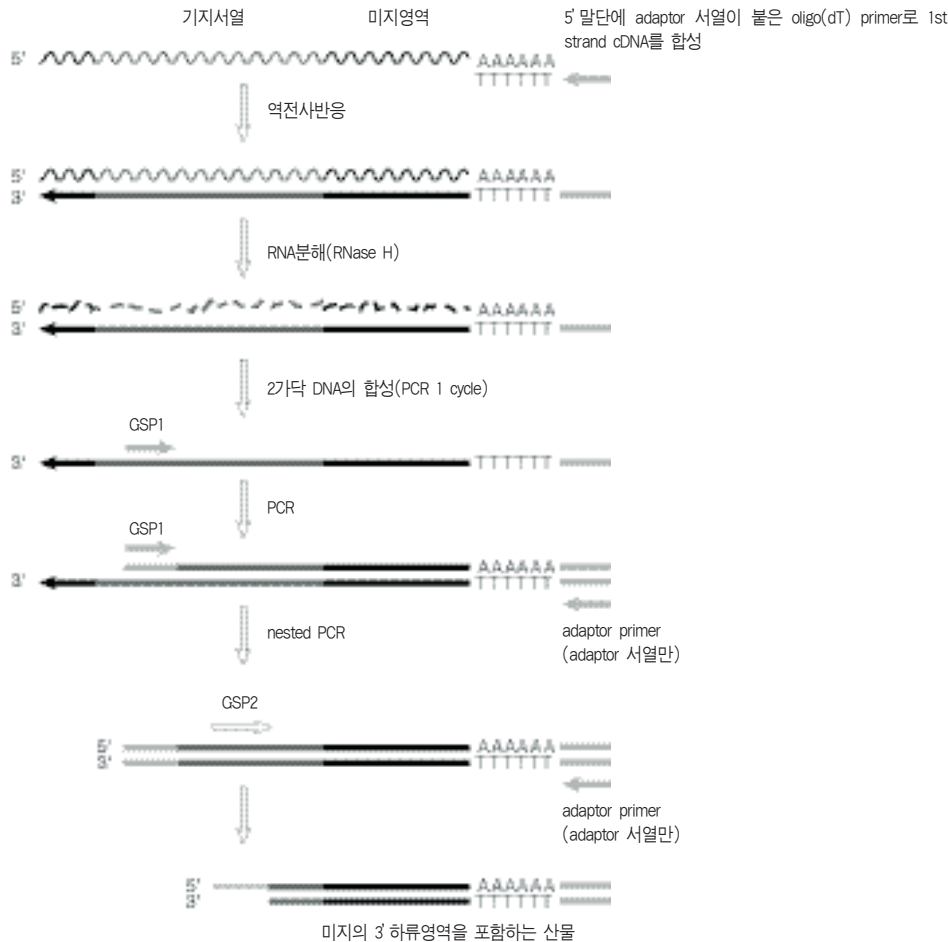


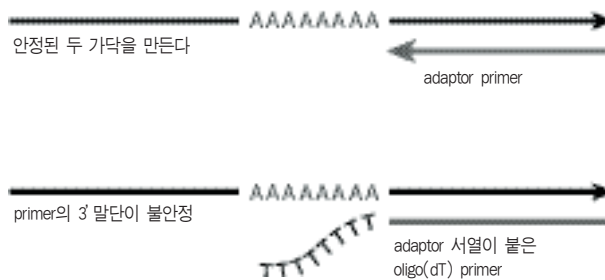
그림 5

하지만 1단계 PCR에서 사용한 두 개의 primer 중 한 쪽의 adaptor primer는 역전사반응으로 생성된 전 cDNA에 공통으로 존재하는 서열이므로 PCR 특이성은 GSP1에 의존적이다. 따라서 이 단계에서 얻어지는 생성물은 비특이적인 background가 많이 생기며 nested PCR로 background를 줄일 수 있다. GSP1의 하류 기지서열에 목적 DNA에 특이적인 sense primer GSP2를 디자인하여 GSP2와 adaptor primer로 nested PCR하여 증폭한 단편을 subcloning하여 sequencing으로 확인한다.

2-2. 3' - RACE법의 주의점

2-2-1 Adaptor primer에 대하여

그림 5에서는 3' -RACE PCR에 사용하는 antisense primer로 1st strand cDNA의 합성에 이용하는 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer가 아닌 adaptor 서열 primer를 사용했는데, 이는 단순한 Tm 계산상으로는 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer가 adaptor 서열에 oligo(dT)부분이 추가되어 있으므로 adaptor 서열로 된 primer보다 Tm이 높아 보이지만 실제로는 그렇지 않다. AT염기쌍은 GC염기쌍에 비하여 열 안정성이 낮아 oligonucleotide 전체로는 주형 DNA에 annealing되어 있지만 3' 말단의 oligo(dT)부분의 두 가닥은 불안정하다. 이로 인해 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer를 그대로 사용할 경우 PCR 효율이 떨어질 우려가 있으므로 충분한 Tm값(대개 60°C 이상)을 갖는 adaptor 서열을 디자인하여 adaptor 서열만으로 이루어진 primer로 PCR 하는 것이 좋다.



구체적인 예를 들어보자. BRL사의 3' -RACE Kit에 들어있는 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer (BRL사 Kit에서는 adaptor primer라는 명칭이다) 서열은 다음과 같다.

5' - GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T -3'

이 경우 PCR은 다음과 같은 adaptor primer를 이용하면 좋다.

5' - GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'

또한 Pharmacia의 Ready-To-Go first strand cDNA합성 Kit에는 아래와 같은 Not I용 adaptor 서열이 붙은 primer를 사용하고 있다.

5' - AAC TGG AAG AAT TCG CGG CCG CAG GAA (T)₁₈ -3'

이런 경우 다음과 같은 길이의 adaptor primer를 준비하면 3' -RACE는 가능하다.

5' - TGG AAG AAT TCG CGG CCG CAG -3'

2-2-2 두 개의 primer로 증폭되는 산물을 확인한다.

1-1 Negative control을 만든다에 기술한 대로 RACE산물은 때로 한쪽의 primer만으로 증폭되는 경우가 있으므로 subcloning 전에 한쪽 primer만을 갖는 negative control을 두 종류 만들어, 얻어진 산물이 양쪽 primer(adaptor primer와 GSP1 EH는 GSP2)로 증폭된 것인지 확인한다.

2-2-3 PCR 산물의 Size에 주의한다.

3' -RACE법은 mRNA 기저서열과 poly(A) 서열을 한번의 PCR로 증폭하는 방법이다. 기저서열은 아미노산을 코드하고 있는 번역영역(translated region)에 있는 것이 많지만 mRNA의 종류에 따라 번역영역 하류에 긴(때로는 수 kb에 달한다) 비번역영역(3' untranslated region : 3' UTR)을 갖는 것이 있다. 따라서 sense primer인 GSP1과 antisense primer인 adaptor primer가 너무 멀리 떨어져 있어 원하는 DNA의 증폭이 일어나지 않는 경우가 있다. 아무 것도 증폭되지 않거나 특이적 DNA가 적게 합성될 때는 subcloning하여 sequencing한 것 모두 원하지 않는 DNA가 될 수 있다. 이와 같은 경우 GSP2 하류에 GSP3를 디자인하여 두 번째 nested PCR을 하면 background는



많이 감소한다(모든 경우에 다 해당되지는 않는다). 또한 긴 단편을 증폭할 수 있는 *Taq*(*TaKaRa Ex TaqTM*, *TaKaRa LA TaqTM*)을 이용하여 RACE하는 것이 좋다.

2-2-4 PCR산물이 기저서열을 포함하도록 primer를 디자인한다.

앞서 기술한 대로 GSP2 하류에 최소 20염기 정도의 기저서열이 있도록 primer를 디자인한다. 증폭된 DNA 단편을 sequencing할 때 GSP2 서열 다음에 기저서열이 있으면 그 단편은 틀림없이 목적 DNA이다. 만약 GSP2서열 뒤에 전혀 다른 서열이 계속되는 경우는 GSP2가 잘못 annealing되어 증폭된 비특이적 산물을 cloning한 것이다.

2-2-5 보통 RT-PCR과 시약을 공용한다

3' -RACE에서 필요한 시약은 대부분 보통 RT-PCR에 사용하는 시약을 그대로 사용할 수 있다. 다른 것은 adaptor 서열을 부가한 oligo(dT) primer와 adaptor 서열로 된 adaptor primer이다. 만약 보유하고 있는 1st strand cDNA합성 kit이 cloning을 위한 adaptor 서열이 붙은 oligo(dT) primer라면 adaptor 서열로 된 adaptor primer만 합성하면 바로 3' -RACE 실험에 응용할 수 있다.

3. Degenerate PCR법

3-1 Degenerate PCR법의 원리

“Degeneracy”는 한 종류의 아미노산이 복수의 codon에 대응하는 현상을 말한다. Degeneracy로 인하여 어떤 특이한 아미노산 서열을 코드하는 유전자의 염기서열은 결정할 수 없지만 가능성이 있는 염기서열 모두를 포함하는 oligonucleotide를 합성할 수 있다.

예를 들어 proline-cystein-arginine(Pro-Cys-Arg)의 tripeptide를 생각해 보자. 이 아미노산 서열에 대응하는 codon은 아래 표와 같이 proline이 4종류, cystein이 2종류, arginine이 6종류로 $4 \times 2 \times 6 = 48$ 종류이다.

실제로 48종류의 codon의 조합으로 degenerate oligonucleotide를 합성할 때는 복수의 nucleotide에 대응하는 위치에서는 해당 amidite를 혼합하여 합성한다. 따라서 degenerate oligonucleotide의 조합의 종류는 codon의 조합보다 많아질 수도 있지만(64종류) 이 oligonucleotide 혼합물 중 한 종류는 tripeptide를 코드하는 유전자와 완전히 일치한다. 만일 조합의 수가 그다지 많지 않고 적당한 길이의 degenerate oligonucleotide를 디자인할 수 있다면 이 oligonucleotide는 비교적 특이성 높은 primer로서 작용할 것이다.

아미노산	Pro	Cys	Arg	
codon	CCA	TGC	AGA	
	CCC	TGT	AGG	
	CCG		CGA	
	CCT		CGC	
			CGG	
			CGT	
종류	4	2	6	→ $4 \times 2 \times 6 = 48$ 종류
nucleotide	CCN	TGY	MGN	
종류	4	2	2 4	→ $4 \times 2 \times 2 \times 4 = 64$ 종류

Nucleotides 혼합염기는 IUPAC에 따라 표기하였다.

이 같은 degenerate oligonucleotide를 primer로 사용하여 PCR을 하면 아미노산 서열정보를 바탕으로 그 단백질을 코드하는 유전자의 DNA 단편이 얻어질 가능성이 있다. 이와 같은 목적으로 디자인된 primer를 degenerate primer, PCR을 degenerate PCR이라고 한다. 이 방법은 기지의 아미노산 서열로부터 그 유전자를 cloning하는 기술이지만 현재는 풍부하게 축적된 핵산의 일차구조(염기서열) 정보를 기초로 유전자군을 검색할 때 널리 이용된다. 구체적인 예로 아래와 같이 두 개의 아미노산 서열이 있다.

단백질 1 : PCRWITHTAQANDPRIMERSAMPLIFIEDASPECIFIC-DNAFRAGMENT

***** *****

단백질 2 : PCRWITHR-EVERSETRANC-RIPTASEDETECTEDANRNAFRAGMENT



이 두 개의 단백질은 진화적으로 보존된 2개의 상동영역을 가지고 있고 상동성 조사시 아미노산이 공통인 부분을 asterisk(*)로 표시하였다(·표는 기능적으로 유사한 아미노산을 나타낸다). 이 공통영역중 상류 서열(PCRWITH)부터 sense degenerate primer를 디자인하고 하류 서열(NAFRAGMENT)에서 antisense degenerate primer를 디자인하였으며 primer 부위는 다음과 같다.

아미노산 1문자 표기	P	C	R	W	I	T	H	
아미노산 3문자 표기	Pro	Cys	Arg	Trp	Ile	Thr	His	
sense strand	CCN	TGY	MGN	TGG	ATH	ACN	CAY	
	4	2	2	4	3	4	2	
sense primer 부위	—————→							
sense primer	5'	CCN	TGY	MGN	TGG	ATH	ACN	CA -3'

아미노산 1문자 표기	N	A	F	R	A	G	M	E	N	T	
아미노산 3문자 표기	Asn	Ala	Phe	Arg	Ala	Gly	Met	Glu	Asn	Thr	
sense strand	AAY	GCN	TTY	MGN	GCN	GGN	ATG	GAR	AAY	ACN	
antisense strand	TTR	CGN	AAR	KCN	CGN	CCN	TAC	CTY	TTR	TGN	
조합	2	4	2	2	4	4	4	2	2	4	
antisense primer 부위	←————										
antisense primer					3'	CGN	CCN	TAC	CTY	TTR	TG -5'

두 개의 degenerate primer로 PCR을 실시하여 잘 될 경우 다음과 같은 상동영역을 갖는 새로운 제 3의 단백질 유전자를 얻을 수 있다.

단백질 1 : PCRWITH-TAQANDPRIMERSAMPLIFIEDASPECIFICCDNAFRAGMENT
 단백질 2 : PCRWITHREVERSETRANSCRIPTASEDETECTEDANR--NAFRAGMENT
 단백질 3 : PCRWITHDEGE-NE-RATEPRI-MERSGIVESMEANEWCNAFRAGMENT
 consensus : ***** * * *****

3-2 Degenerate PCR법의 주의점

3-2-1 Primer의 디자인

Oligonucleotide의 합성은 CPG column에 결합한 3' 말단의 nucleotide에서 시작하므로 degenerate primer의 3' 말단은 한 종류의 nucleotide여야 한다.*1

*1 아미노산 서열에서 염기서열을 찾으려면 아미노산 codon 대응표를 사용하면 편리하다.

또 degenerate primer서열의 종류는 가능하면 1,000개 정도까지를 기준으로 만드는 것이 좋다. Primer의 종류가 너무 많으면 primer 1종류 당 mol수가 적게 되어 특이성도 저하된다. Primer의 종류가 많은 경우는 inosin을 N(4종류의 염기)부분에 이용하면 어느 염기에도 강하게 결합하지 않고 두 가닥 DNA 형성을 저해하지도 않으므로 도움이 된다. Inosin을 이용하였을 때의 Tm계산 방법은 3-2-3을 참조한다.

3-2-2 증폭된 산물의 크기

Degenerate PCR로 얻어진 산물을 그대로 사용하는 경우는 없으며 대부분 그 산물을 기본으로 cDNA 해석영역 전체를 cloning 하는 방법을 많이 이용한다. 주로 아래 두가지 방법을 많이 사용한다.

- ① 얻어진 cDNA 단편을 probe로 cDNA library를 screening한다.
- ② Cloning된 영역의 염기서열 정보를 기본으로 5'-RACE, 3'-RACE한다.

목적하는 밴드의 크기는 아미노산으로 해서 30~300잔기 전후가 가장 좋다. 너무 작을 경우에는 반응에 무리가 있고, 너무 길 경우는 짧은 비특이적 산물과 구별하기 어렵고 degenerate primer로 인한 비특이적 증폭이 많이 일어나므로 100~1,000 bp가 적당하다.

3-2-3 Degenerate primer의 Tm

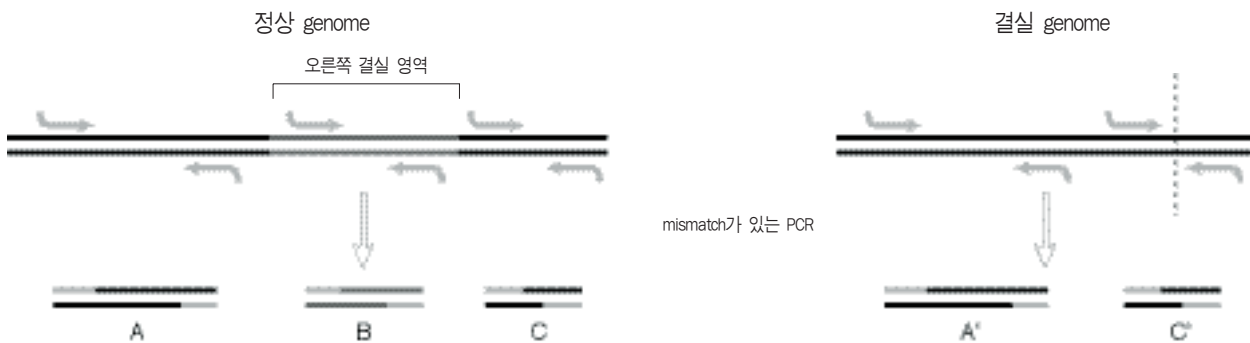
Degenerate primer의 annealing 온도는 primer에 포함되어 있는 서열 중 가장 낮은 Tm을 기준으로 한다. 또 inosin은 DNA의 두 가닥에 적극적으로 수소 결합(Tm을 높게 한다)을 하지 않고 두 가닥 형성을 방해(Tm을 낮게 한다)하지도 않으므로 Tm 계산시 고려하지 않아도 된다.

4. AP-PCR법과 DD법

AP-PCR(arbitrarily primed-PCR, 임의 서열 primer-PCR)은 앞서 설명한 방법과는 달리 비특이적인 PCR을 적극적으로 활용하는 방법이다. PCR 반응에서 낮은 온도에서 장시간 annealing하면 primer의 3' 말단의 짧은 homology부터 mismatch priming이 일어난다. 최초 몇 cycle을 mismatch priming이 일어나도록 저온에서 annealing하면 양쪽에 primer를 가지는 DNA단편이 생기므로 그 후 보통 PCR로 mismatch priming을 일으킨 DNA단편이 증폭된다. 이와 같은 방법으로 염기서열 정보가 없는 genome에서 다양한 길이의 DNA 단편을 얻을 수 있으며 고분해능의 변성 polyacrylamid gel로 분리한다. 만일 genome에 결실이 있으면 그 영역에서 유래하는 단편은 전기영동 밴드상에 결실로 확인되며 genome 일부에 중복이 있으면 특정 밴드가 두겹게 보인다.

Complexity 높은 genome DNA를 비교하여 genome 내에 적당한 copy수로 흩어진 반복서열을 probe로 사용하여 southern hybridization 하는 DNA fingerprinting법을 사용하지만 AP-PCR은 arbitrary primer의 priming부위를 “probe”로 한 DNA fingerprinting 방법을 사용한다. 단지 southern hybridization을 사용한 fingerprinting과 달리 밴드로 나타나는 DNA는 모두 말단에 primer 서열을 가지는 PCR 산물이므로 밴드를 바로 gel에서 회수하여 PCR로 증폭하고 해석할수 있는 점이 크게 다르다.

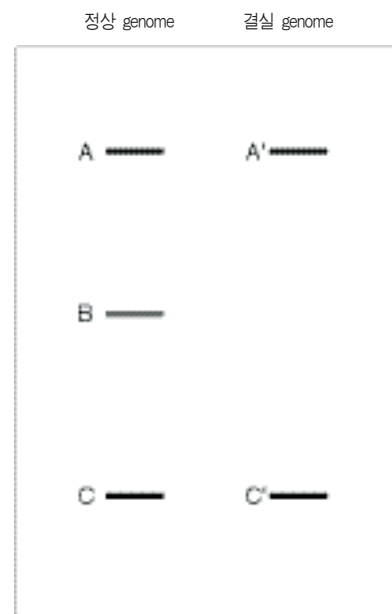
이 AP-PCR의 원리를 RT-PCR에 적용한 것이 DD법(differential display법)이며 기본적으로 AP-PCR과 다른 점은 없다. DD법은 아주 간단하고 흥미로운 유전자가 곧 얻어질 수 있을것 같아 많이 이용되고 있지만 false positive clone이 많이 나오는 등 어려운 점이 많다.



False positive 밴드가 생기는 이유는 무엇일까? DD법은 최종적으로 얻어진 밴드(PCR 생성물량)가 각각의 초기주형량을 반영하고 있다는 전제로 시작되는 실험 방법이다. DD법으로 실험한 후 전기영동에서 점차적으로 증가하는 많은 단편은 primer서열을 공통으로 가진다는 것 이외에는 길이, GC함량도 각각이다. 초기 주형량(mol수)이 다른 많은 산물이 섞여 있어 이 많은 단편을 동시에 증폭하기 위해서는 상당히 복잡한 competitive PCR을 해야 한다.

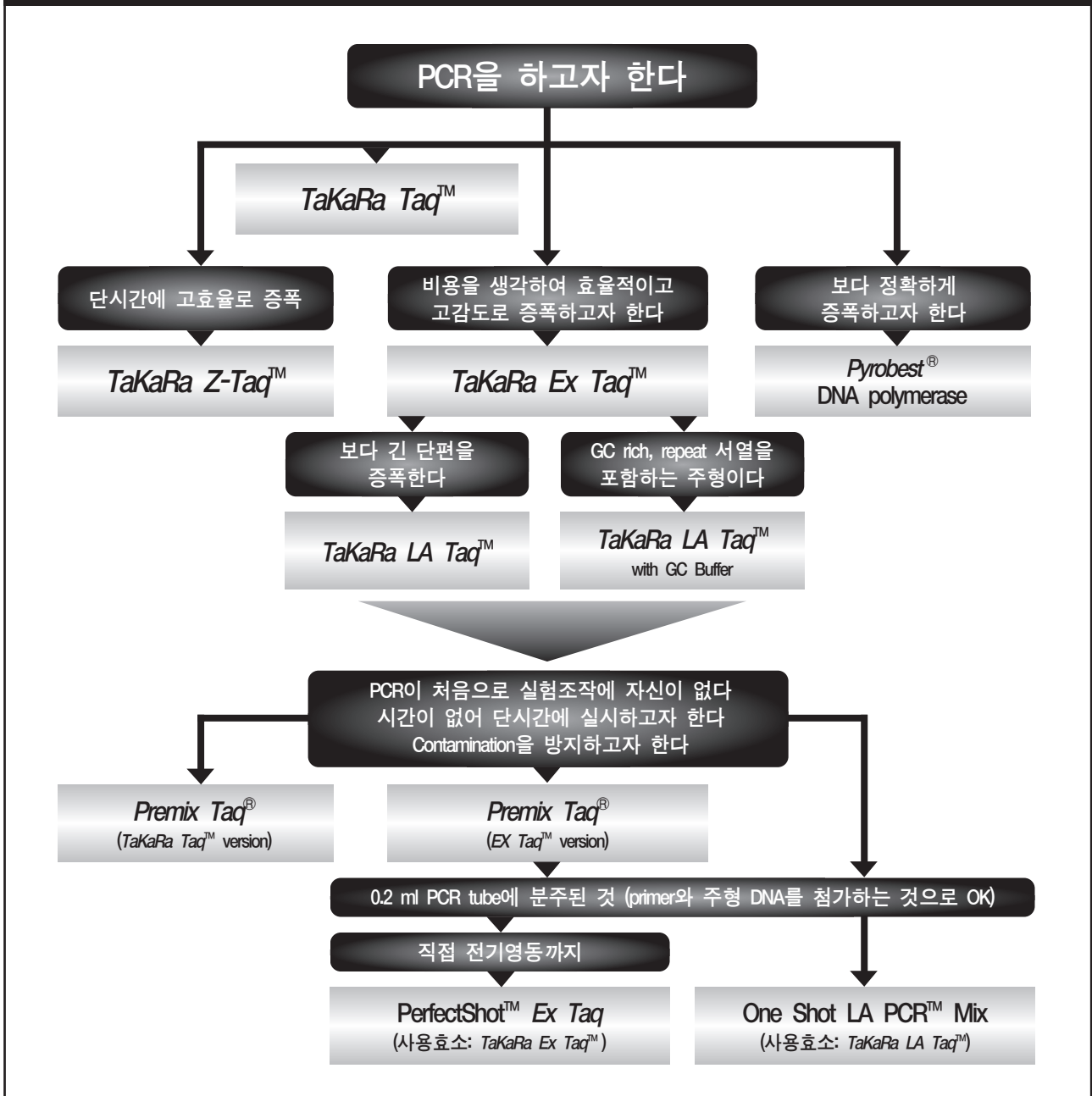
최종 생성물량이 초기 주형량을 반영한다는 DD법의 전제가 성립되기 위해서는 각 산물이 동시에 plateau 상태에 도달하여 증폭을 정지해야 하는 competitive PCR의 조건을 만족해야만 한다. 그러나 DD법으로 실험하는 여러 종류의 단편에서 모든 산물이 동시에 증폭되는 일은 거의 없으므로 false positive 밴드가 나오게 된다. 발현에 차이가 있는데도 불구하고 DD법에서는 검출되지 않는 false negative 밴드가 나올 수도 있지만 이런 경우 특별한 스크리닝법이 없어 모르고 지나칠 수도 있다.

이와 같이 PCR의 kinetics를 고려하면 DD법으로 false positive clone이 많이 나올 수 있으므로 스크리닝 과정을 통하여 positive clone이 고효율로 얻어지도록 해야 한다. 한번의 실험으로 유용한 clone이 얻어질 것이라는 생각으로 실험에 착수하는 것은 상당히 위험하므로 주의한다.



변성 polyacrylamid gel로 전기영동

TaKaRa PCR Enzymes 선택 가이드



■ 사용구분의 기준

증폭길이	TaKaRa Taq™ Pyrobest™ DNA Polymerase	<	TaKaRa Ex Taq™ TaKaRa Z-Taq™	<	TaKaRa LA Taq™
λ DNA					
양호하게 증폭	~6 kbp 정도		~20 kbp 정도		~35 kbp 정도
증폭가능 길이	~12 kbp 정도		~30 kbp 정도		~48 kbp 정도
human genomic DNA					
양호하게 증폭	~2 kbp 정도		~10 kbp 정도		~20 kbp 정도
증폭가능 길이	~4 kbp 정도		~20 kbp 정도		~30 kbp 정도
정확도(fidelity)	TaKaRa Taq™ < TaKaRa Ex Taq™ < TaKaRa LA Taq™ < Pyrobest™ DNA Polymerase < TaKaRa Z-Taq™				
증폭효율	TaKaRa Taq™ ≙ Pyrobest™ DNA Polymerase < TaKaRa LA Taq™ ≙ TaKaRa Ex Taq™ ≙ TaKaRa Z-Taq™				
반응속도	TaKaRa Z-Taq™이 TaKaRa Taq™ 보다 5배 더 빠르다				

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어질수록 필요한 주형 DNA의 양이 많아지고 또 PCR 조건도 엄밀해진다.