

PCR을 이용한 미지 영역의 Cloning II

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. 지난 호에서는 미지 영역을 cloning하는 기본적인 원리와 3'-RACE, degenerate법, DD법의 원리와 주의점에 대하여 소개하였다. 이번 호에는 5'-RACE법을 중심으로한 미지 영역 cloning법에 대해 소개한다.

1. 5'-RACE법

1-1 5'-RACE법의 원리

1-1-1 TdT를 사용한 5'-RACE법

5'-RACE는 mRNA의 서열의 일부를 알고 있을 때 5' 상류

의 미지영역을 cloning하기 위한 방법이다. 그림 1에 5'-RACE법의 원리도를 나타내었다. 우선 상류의 미지영역을 찾기 위해서 기지 서열을 토대로 한 특수 유전자인 anti-sense primer(GSP1)를 이용하여 역전사 반응을 한다. 그 후 cDNA와 두가닥을 이루고 있는 mRNA를 RNaseH로 분해하여 한 가닥의 1st strand cDNA를 만든다. 이 DNA는 5' 말단에 GSP1의 서열을 가지고 3' 말단에는 미지서열을 갖고 있다. 이 미지서열을 PCR로 증폭하기 위해서 1st strand cDNA의 3' 말단에 anchor서열을 부가해야 한다. 보통 Terminal Deoxynucleotidyl Transferase(TdT)로 nucleotide homopolymer를 anchor서열로 부가한다. Anchor서열을 부가한 후 anchor서열 3' 말단에 상보적인 nucleotide polymer를 갖는 adaptor primer인 anti-sense primer(GSP2*)를 사용하여 nested PCR로 5' 하류 미지영역을 포함하는 cDNA를 증폭한다.

*1 이때 유전자 특이적 primer인 GSP1을 사용하면 anti-sense primer를 사용하는 경우 보다 비특이적 증폭이 일어나기 쉽기 때문에 GSP2를 보다 상류측에 design하고 nested PCR하는 것이 좋다.

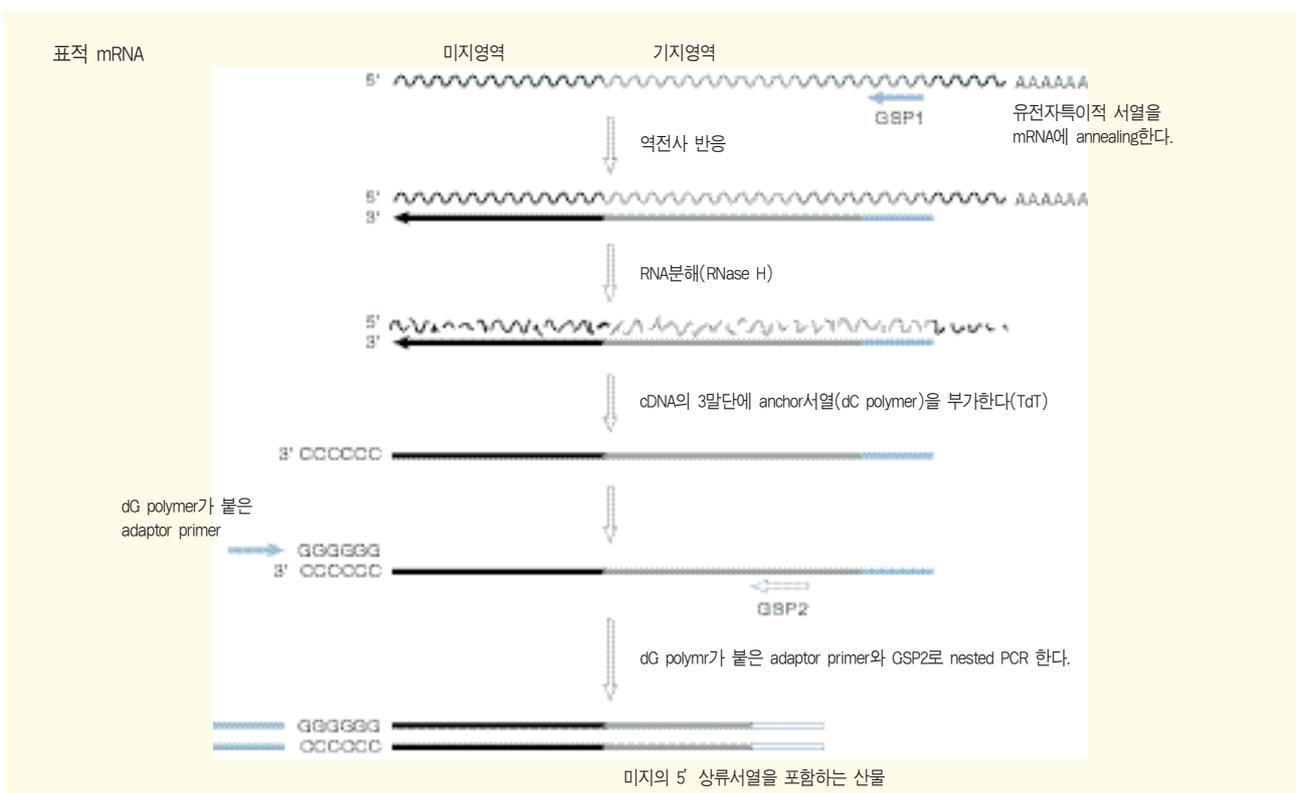


그림 1 5'-RACE법에 의한 미지 영역의 cloning

1-1-2 RNA ligase를 사용한 5'-RACE법

한가닥 핵산을 ligation 시키는 RNA ligase로 한가닥 oligonucleotide adaptor를 ligation하여 1st strand cDNA를 정제하는 방법이다.

「1-1-1의 TdT를 이용한 5'-RACE법」에서의 한가닥 1st strand cDNA를 정제하는 것은 유사하나 1st strand cDNA의 3' 말단에 anchor 서열로 nucleotide homopolymer를 추가하는 점이 다르다. 이때 사용하는 oligo-nucleotide adaptor는 1st strand cDNA와 ligation 할 수 있도록 5' 말단이 인산화 되어 있다. 그러나 adaptor끼리 결합한 concatemer 형성을 막기 위하여 3' 말단 OH를 제거하거나(dideoxy화) amino기로 바꾸는(amino화) 수식을 해야한다.*1

*1 5' 말단의 인산화와 3' 말단의 amino화는 oligonucleotide합성시에 할 수 있다. TaKaRa 홈페이지(www.takaracokr) 합성 DNA 수식란 참조

이 방법은 1-1-1의 TdT로 homopolymer anchor 서열을 추가하는 방법과 비교하면 여러 가지 잇점이 있다.

- ① Homopolymer를 이용하는 경우는 anchor 서열의 poly(G) 부분이 cDNA의 C가 풍부한 부분과 비특이적인 annealing이 일어나기 쉬워 양 말단에 anchor 서열을 가지는 비특이적 증폭이 일어나기 쉽지만 oligonucleotide adaptor를 ligation하여 보다 특이성이 높은 adaptor primer를 design할 수 있다.
- ② Ligation하는 oligonucleotide adaptor를 어느 정도 길게 디자인하면 adaptor측에도 nested primer를 설정할 수 있다 (Column : RNA ligase를 사용한 5'-RACE의 개량법 참조).

RNA ligase를 이용하여 5'-RACE 할 경우, RNA ligase는 한가닥 DNA의 ligation보다 효율이 높지 않고 조건도 까다롭다.

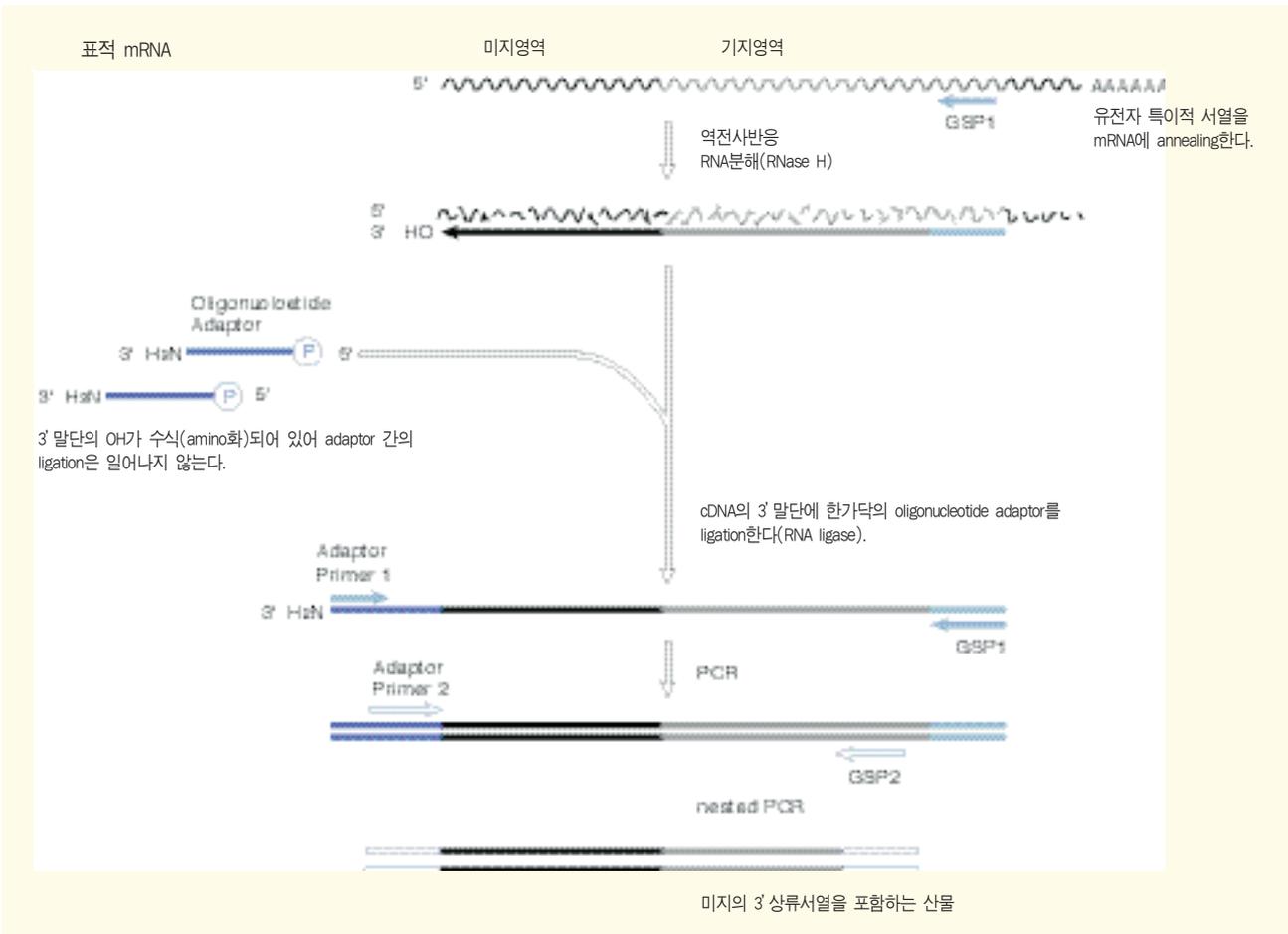


그림 2 RNA ligase를 사용한 5'-RACE법

[Column] RNA ligase를 이용한 5'-RACE법의 개량법

“Trends in Genetics”에 5'-RACE의 개량법이 소개되어 있다.

5'-RACE법의 개량법에서는 1st strand cDNA의 말단에 A와 같이 adaptor oligonucleotide를 RNA ligase로 ligation한다. 이 adaptor 서열은 B와 C, 두가지 primer를 합성하여 처음에 B와 GSP1으로 PCR을 하고, 다음에 GSP2와 C로 nested PCR을 한다. 이 방법으로 기존의 방법에 비해 특이적 산물의 증폭량이 증가한다고 보고되어 있다.

A: 3' -N₂N- CCGTTACAGCTGGAGGGATGTTGGGCTTAAGGATGp-5'

B: 5' - GGCAATGTCGACCTCCCTACAAC -3'

C: 5' - CTCCTACAACCCGAATTCCTAC -3'

* Zhi Chen : Simple modifications to increase specificity of the 5'-RACE procedure, Trends in Genetics 12 : 87-88, 1996

1-1-3 실제 5'-RACE법을 할 경우

3'-RACE는 보통 RT-PCR과 거의 유사하나 5'-RACE는 단계가 많고 복잡하다. 1st strand cDNA의 3' 말단에 anchor 서열을 부가하는 단계에서 1st strand cDNA 합성시에 사용한 primer(GSP1)가 남아 있으면 primer에 anchor서열을 부가하는 반응이 계속 일어나 이후 증폭단계에서도 다른 증폭은 일어나지 않는다. 따라서 1st strand cDNA 합성 후 반드시 고분자량의 cDNA를 정제하여 primer를 제거해야 한다. 또한 TdT와 RNA ligase를 사용하는 경우는 까다로운 조건설정을 해야한다. 미량의 cDNA를 정제하거나 TdT 방법 등을 이용하여 자신의 실험조건에 맞추고, 필요한 시약을 각각 구매하여 실험에 이용할 수 있지만 kit를 이용하는 것이 초심자에게는 안정적인 실험 결과를 얻을 수 있다. 본 고에서는 TaKaRa사의 5'-Full RACE CORE Set(TaKaRa Code 6122)를 사용한 5'-RACE법에 대하여 소개한다.

1-2 5'-RACE법의 주의점

1-2-1 양쪽 primer로 증폭된 것을 확인한다.

“PCR을 이용한 미지영역의 cloning I”(Life Science & Biotechnology 17호, p12-19 참조)의 일반적인 주의 사항에서 기술한 바와 같이 RACE의 산물이 가끔 한쪽 primer로만 증폭되는 경우가 있다. 특히 5'-RACE에서 사용하는 anchor 서열을 부가한 adaptor primer는 C잔기가 많은 서열로 비특이적인 annealing이 일어나기 쉬워 양쪽에 adaptor primer를 가진 비특이적 증폭 산물이 되기 쉽다. 그러므로 subcloning하기 전에 한쪽 primer만을 가진 negative control을 2종류 준비하여, 증폭된 밴드가 양쪽 primer (adaptor-adaptor, GSP1-GSP2)에 의해 증폭된 것을 확인하는 것이 좋다.

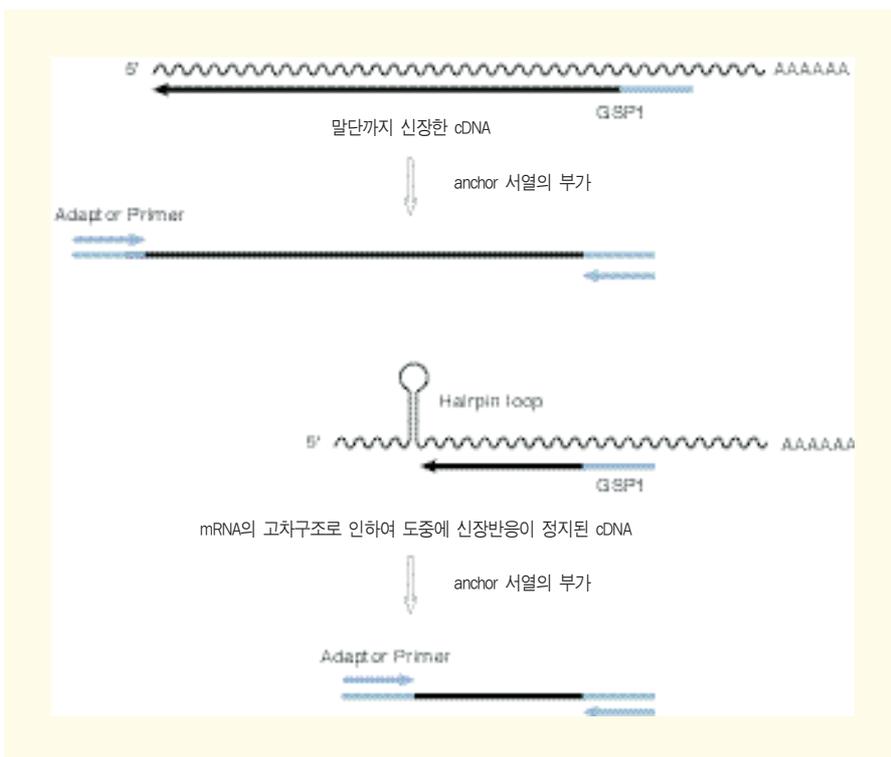


그림 3 5'-RACE법에 의해 증폭한 단편

1-2-2 PCR 산물의 크기에 주의한다.

5'-RACE는 mRNA의 기저서열에서 상류 미지영역의 1st strand cDNA를 PCR로 증폭하는 방법이다. 역전사효소로 1st strand cDNA 신장반응은 mRNA의 hairpin loop나 고차구조로 인하여 가끔 증폭 도중에 반응이 끝나 adaptor primer와 GSP2로 증폭된 DNA는 다양한 단편의 혼합물이 된다(그림 3 참조). PCR 반응에서는 짧은 단편이 먼저 증폭되기 쉬운 경향이 있어 짧은 cDNA단편이 증폭될 경우 완전한 길이의 단편이 증폭되지 못한 채 반응이 끝나버린다.

이와 같은 문제점은 일단 5'-RACE를 한 후 “PCR을 이용한 미지영역의 cloning I”(Life Science & Biotechnology 17호 p12-19참조)의 일반적인 주의 사항 중 “1-2 Size를 분획한다”에서 기술한 바와 같이 전기영동한 다음 agarose에서 고분자 DNA를 회수하여 다시 한번 PCR 한다.

또 한가지 방법은 일단 5'-RACE에서 상류영역을 cloning하는 것이다. 즉 상류영역의 염기서열을 조사한 후, 그 데이터를 기초로 새로운 primer를 합성하여 다시 한번 5'-RACE를 한다. 기저서열이 mRNA의 하류에 있고 상류에 이상한 길이의 기저서열이 존재하는 경우, 한 번의 5'-RACE로 완전한 길이의 cDNA를 얻는 것이 불가능하므로 후자의 방법이 더 현실적이다(그림 4 참조).

1-2-3 PCR산물이 기저서열을 함유하는 primer를 디자인한다.

“PCR을 이용한 미지영역의 cloning I”(Life Science & Biotechnology 17호, p12-19)을 참조한다.

1-2-4 Anchor primer에 대하여

A사의 anchor primer(anchor 서열을 부가한 adaptor primer)를 그림 5에 나타내었다. Anchor 부분은 dG homopolymer가 아닌 그 중간에 inosine을 함유하고 있으며 이는 anchor 부분의 Tm이 너무 높아지지 않도록 하기 위한 것이다. 일단 5'-RACE를 한 후 PCR산물을 전기영동하여 agarosegel에서 추출한 뒤 다시 한번 PCR한 경우는 anchor 서열을 포함하지 않는 adaptor 서열의 adaptor primer(A사 kit에서는 UAP로 명명)를 사용한다. Adaptor primer는 몇 번의 PCR로 부족한 경우가 있으므로 별도로 합성해 두는 것이 좋다. 이런 경우 kit의 UAP는 UDP cloning을 위하여 서열이 부가되어 있지만 T-vector를 사용하는 것이 불필요하므로 그림 5의 맨 아래부분에 있는 20잔기를 합성하는 것이 좋다.

1-3 5'-RACE 법의 실험예

본 고에서는 TaKaRa사의 5'-Full RACE CORE Set(TaKaRa Code 6122)를 이용한 5'-RACE법에 대하여 소개한다.

1-3-1 1st Strand cDNA의 합성

■ 반응액조성

poly(A) ⁺ RNA or Total RNA	0.5~5 μ g
10 \times RT Buffer	1.5 μ l
RNase Inhibitor(40 U/ μ l)	0.5 μ l
AMV Reverse Transcriptase XL(5 U/ μ l)	1 μ l
5' 말단 인산화 RT primer*(1 μ g/ μ l)	1 μ l
RNase free dH ₂ O	up to 15 μ l

*: RT-primer는 ligation에 필요하기 때문에 5'인산화한 것을 사용한다. 합성시에 인산화하여 두면 좋다. 또한 12~15 mer의 길이가 적합하다.

■ 실험순서

1. 상기 반응액을 조제한다.
2. TaKaRa Thermal Cycler MP or SP or PERSONAL에 세트하여 아래의 조건으로 반응한다.

30°C	10 min
50°C	30~60 min
80°C	2 min
4°C	

1-3-2 Hybrid RNA의 분해

■ 반응액조성

1st Strand cDNA 용액	15 μ l
5 \times Hybrid RNA Degeneration Buffer	15 μ l
dH ₂ O	45 μ l
Total	75 μ l

■ 실험순서

1. 상기 반응액을 조제한다.
2. RNase H를 1 μ l 첨가하여 30°C에서 1시간 반응한다.
3. 반응종료 후 에탄올로 침전한다.

1-3-3 Ligation 반응에 의한 한가닥 cDNA의 환상(concatemer)화

■ 반응액조성

5 \times RNA (ssDNA) Ligation Buffer	8 μ l
40% PEG #6000	20 μ l
dH ₂ O	up to 40 μ l

■ 실험순서

1. 상기 반응액을 조제한다.
2. Ethanol 침전으로 회수한 ss cDNA의 침전에 상기 반응액을 첨가하여 잘 혼합한다.
3. T4 RNA Ligase를 1 μ l 첨가하고 16°C에서 하룻밤(15~18시간) 반응한다.
4. 반응을 시작할 때까지 -20°C에서 보존.

1-3-4 PCR에 의한 증폭반응

PCR반응은 TaKaRa Taq™(TaKaRa Code No. R001), TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code No. RR001), TaKaRa PCR Amplification Kit(TaKaRa Code No. R011), TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1(TaKaRa Code No. RR013), Premix Taq™(TaKaRa Taq Version)(TaKaRa Code No. R004A), Premix Taq™(Ex Taq Version)(TaKaRa Code No. RR003),

One Shot LA PCR Mix(TaKaRa Code No. RR004) 중 어느 것을 사용할 수 있다. 통상적으로 TaKaRa Taq™을 이용한 반응으로 만족한 결과를 얻을 수 있으나 목표로 하는 단편이 긴 경우와 높은 증폭 효율을 원할 때는 TaKaRa Ex Taq™이나 TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1을 사용하는 것이 보다 양호한 결과를 얻을 수 있다.

<TaKaRa LA PCR Kit Ver. 2.1를 사용한 반응>

Ligation 반응이 끝난 시료를 TE buffer로 10배 희석하여 template로 사용하여 반응한다.

(1) 1st PCR 반응

■ 반응액조성

Template DNA	1 μ l
10 \times LA PCR Buffer II(Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	8 μ l
1st PCR용 Primer S1(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
1st PCR용 Primer A1(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa LA Taq™(5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	up to 50 μ l

■ 실험순서

1. 상기반응액을 조제한다.
2. TaKaRa PCR Thermal Cycler MP or SP or PERSONAL에 세트하여 아래의 조건으로 반응한다.

94°C,	3 min	} 25 Cycles
↓		
94°C,	30 sec	
50~65°C,	30 sec	
68~72°C,	0.5~5 min	

(2) 2nd PCR 반응

■ 반응액조성

1st PCR Solution*	1 μ l
10 \times LA PCR Buffer II(Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	8 μ l
2nd PCR용 Primer S2(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
2nd PCR용 Primer A2(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa LA Taq(5 U/ μ l)	0.5 μ l
dH ₂ O	up to 50 μ l

*1: 선명한 PCR 증폭산물을 얻기 위해서는 반응 용액, 10배, 100배 희석하여 각각 1 μ l을 2nd PCR용액에 첨가하여 3가지 PCR을 시행하면 좋다.

■ 실험순서

1. 상기반응액을 조제한다.
2. TaKaRa PCR Thermal Cycler MP or SP or PERSONAL에 세트하고 아래의 조건으로 반응한다.

94°C	30 sec	} 25~30 Cycles
50~65°C	30 sec	
68~72°C	0.5~5 min	

3. 반응종료 후 반응액의 일부를 전기영동하여 해석한다.

합성 DNA !!

TaKaRa라면 안심입니다.

1. 고품질

귀하의 소중한 실험을 위해 TaKaRa 합성 DNA는 정품의 시약 및 컬럼만을 사용합니다.

2. 신속

전국 어디서나 빠르고 정확한 택배서비스로 납품하여 드립니다.

3. 다양한 서비스

50 nmol, 200 nmol, 대량합성, 수식합성 등 고객이 원하는 대로 합성합니다.

4. 편리한 주문

지역별 전문대리점, e-mail 또는 인터넷을 이용하여 온라인으로 주문할 수 있습니다.

5. 믿을 수 있는 기술지원 서비스

언제 어디서나 무엇이든 전문가가 상의하여 드립니다.

50 nmol(2 OD 보증)
PCR Grade

1~17 mer → 25,000원
18~25 mer → 30,000원
26~35 mer → 35,000원

200 nmol(8 OD 보증)
PCR Grade

1~17 mer → 30,000원
18~25 mer → 35,000원
26~35 mer → 40,000원
36 mer 이상 → 2,000원/base

HPLC 정제료(최종 1 OD 보증), SEQ Grade
30,000원

서울, 경기, 강원, 충청, 대전

02-841-7530(서울)
031-286-8592(수원)
042-472-3669(대전)

(주)코아바이오시스템

부산·경남

051-245-6582

대한과학

대구·경북

053-959-3611

(주)브니엘

전주·전북

063-227-3700

삼화교역

광주·전남

062-672-7631

(주)진성에스엠알