

TaKaRa Hot Start PCR 시리즈

TaKaRa Taq™ Hot Start Version	TaKaRa Code R007A	250 U
TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version	TaKaRa Code RR006A	250 U
TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version	TaKaRa Code RR007A	250 U
Taq Antibody (항체단품)	TaKaRa Code 9002A	250 U

Taq DNA Polymerase는 실온에서도 꽤 높은 활성을 갖고 있으므로, PCR 최초 step에서 misannealing이 발생하여 그대로 신장반응이 진행될 경우 비특이적 산물이 생성될 가능성이 있다. 고온에서만 Taq DNA Polymerase가 활성화 되어 PCR의 특이성과 감도를 상승시키는 것을 Hot Start PCR이라 하며 이와 관련한 몇 가지 제품을 개발하였다. 본 고에서는 TaKaRa에서 새로 공급하는 항 Taq antibody를 이용한 Hot Start PCR용 제품과 실험예를 소개한다.

■ 항 Taq항체를 사용한 Hot Start PCR의 원리

항 Taq antibody는 Taq DNA Polymerase에 결합하여 그 활성을 저해하는 항체이다. 고온조건에서는 antibody가 변성되어 polymerase의 활성을 저해하지 않지만 Taq DNA polymerase에 항 Taq antibody를 첨가하면 PCR 반응 set up과 시작점에서 Taq DNA polymerase의 활성은 억제되며, 고온에서 항체가 변성된 후 반응이 활성화 된다(그림 1). 이 방법을 이용하면 PCR의 특이성과 감도는 훨씬 향상된다.

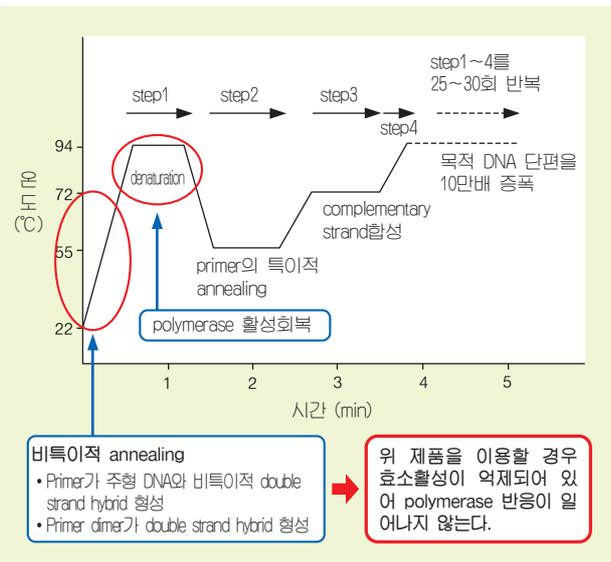


그림 1 항 Taq antibody를 사용하여 Hot Start PCR로 DNA 증폭

■ 특징

(1) TaKaRa Hot Start PCR용 제품은 네 종류로 용도에 맞추어 선택할 수 있다.

- (2) 항 Taq antibody를 사용한 Hot Start PCR로 Taq DNA polymerase를 활성화시키기 위한 특별한 조작이 필요없다. 기존 PCR조건 중 최초 열변성 step에서 항 Taq antibody는 실활되고 Taq DNA Polymerase가 활성화된다.
- (3) PCR의 증폭효율은 동일하며 PCR cycle을 시작하기 전에 mispriming나 primer dimer형성을 줄이는 효과가 있다.
- (4) 항 Taq antibody로 polymerase 활성 저해율은 약 90% 이상 (항 Taq antibody가 Taq DNA Polymerase와 결합한 형태에서 55°C, 10분간 반응한 경우)으로 항 Taq antibody를 열변성시키면 polymerase는 100% 활성이 회복된다(94°C, 30초간의 열처리 후, 55°C, 10분간 반응한 경우).

■ TaKaRa Hot Start PCR 시리즈 제품

항 Taq antibody와 TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™등을 조합한 제품이 있으며 각각 효소의 특징을 유지하면서 Hot Start PCR을 실시할 수 있다.

- **TaKaRa Taq™ Hot Start Version**
(TaKaRa Code R007A, R007B)
TaKaRa Taq™에 항 Taq antibody를 결합시킨 Hot Start PCR Version으로 가장 기본적인 제품이다.
- **TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version**
(TaKaRa Code RR006A, RR006B)
TaKaRa Ex Taq™에 항 Taq antibody를 결합시킨 Hot Start PCR Version이다. 감도, 증폭량, 증폭크기 (TaKaRa Taq™ Hot Start Version과 비교해 할 때) 에서 뛰어난 활성을 보인다.

• TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version

(TaKaRa Code RR007A, RR007B)

Real time PCR에 최적인 Hot Start PCR 제품이다. 항 Taq antibody체를 결합시킨 TaKaRa Ex Taq™과 real time PCR용으로 최적화된 전용 buffer를 사용하여 높은 효율을 보인다. Real time PCR에서 흔히 이용되는 ~500 bp 단편증폭에 유용하다. 특히 Smart Cycler®(TaKaRa Code SC100)를 사용할 경우 probe법과 interchelator법에 사용할 수 있다. PCR을 real time으로 monitoring 하는 경우 각종 probe(TaqMan™ Probe 등)나 SYBR® Green I (TaKaRa Code F50512, F50513)을 준비한다.

• Taq Antibody

(TaKaRa Code 9002A, 9002B)

TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™ 또는 TaKaRa Z-Taq™과 혼합하여 간단하게 Hot Start PCR을 할 수 있다.

■ 실험에 1 : 일반 PCR과 Hot Start PCR의 비교

고초균 genome DNA를 주형으로 1111 bp영역을 일반 PCR과 Hot Start PCR법으로 실험하여 결과를 비교하였다. 일반 PCR에서는 TaKaRa Taq™과 TaKaRa Ex Taq™을, Hot Start PCR에서는 TaKaRa Taq™ Hot Start Version과 TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version을 사용하였다.

【PCR 반응액 조제】

일반적인 PCR과 Hot Start PCR 반응액의 조성은 사용하는 효소액의 종류(항 Taq antibody 함유 유무)외에는 기본적으로 동일하며 아래에는 Hot Start PCR 경우를 나타낸다.

• TaKaRa Taq™ HS(5 units/μl) 또는 TaKaRa Ex Taq™ HS(5 units/μl)	0.25 μl
• 10× PCR Buffer 또는 10× Ex Taq Buffer	5 μl
• dNTP Mixture(2.5 mM each)	4 μl
• 고초균 genome DNA(50 ng/μl)	1 μl
• Primer 1 (10 μM)	1 μl
• Primer 2 (10 μM)	1 μl
• 멸균증류수	37.75 μl
Total volume	50 μl

TaKaRa Taq™ TaKaRa Ex Taq™에 Taq Antibody를 첨가하여 Hot Start PCR을 할 수 있다. 이 경우 각종 Taq DNA Polymerase에 같은 용량의 Taq Antibody를 혼합한 후 20~25°C에서 약 10분간 정치한 후 사용한다.

【Cycle 조건】

94°C	2분	} 36 cycles
↓		
94°C	30초	
55°C	30초	
72°C	2분	

【결과】

일반적인 PCR에서는 비특이적인 증폭산물이 생성되었지만(그림 2의 lane 2), TaKaRa Taq™ Hot Start Version, TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version을 사용한 Hot Start PCR에서는 비특이적인 증폭이 억제되었다(그림 2의 lane 1).

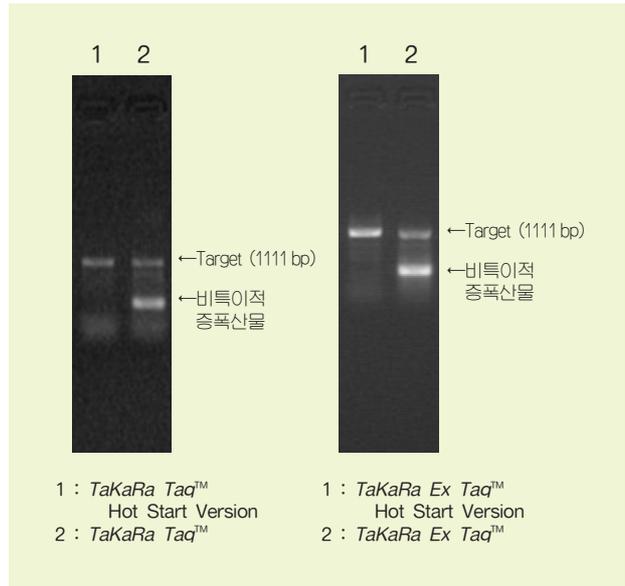


그림 2 일반적인 PCR과 Hot Start PCR의 비교

■ 실험에 : Real time PCR과 Hot Start real time PCR의 비교

λDNA(100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg)를 주형으로 300 bp 영역을 SYBR® Green I으로 통상의 real time PCR과 Hot start real time PCR을 하였다.

각 방법으로 증폭을 monitoring하고 용해곡선을 분석하여 결과를 비교하였다.

Real time PCR(R-PCR)은 Smart Cycler®을 사용하였다.

일반적인 R-PCR에서는 TaKaRa Ex Taq™을 Hot Start R-PCR에서는 TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version을 사용하였다.

【PCR 반응액 조제】

TaKaRa Ex Taq™을 사용한 경우

• TaKaRa Ex Taq™(5 units/μl)	0.25 μl
• 10× Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ free)	2.5 μl
• 25 mM MgCl ₂	3 μl
• dNTP Mixture(2.5 mM each)	3 μl
• Primer 1(15 μM)	0.5 μl
• Primer 2(15 μM)	0.5 μl
• SYBR® Green I (3,000배 희석액)*	2.5 μl
• Template	2 μl
• 멸균증류수	10.75 μl
Total volume	25 μl

TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version을 사용한 경우

• TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version (5 units/μl)	0.25 μl
• 10× R-PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	2.5 μl
• 250 mM Mg ²⁺ Solution for R-PCR	0.3 μl
• dNTP Mixture (10 mM each)	0.75 μl
• Primer 1 (15 μM)	0.5 μl
• Primer 2 (15 μM)	0.5 μl
• SYBR® Green I (3,000배 희석액)*	2.5 μl
• Template	2 μl
• 멸균증류수	15.7 μl
Total volume	25 μl

* : SYBR® Green I (제품원액)을 TE나 멸균증류수로 3,000배로 희석한 것(사용직전에 희석).

[Cycle 조건]

Smart Cycler®을 사용하여 다음과 같은 조건으로 real time PCR 하였다(그림 3).

Stage 1				Stage 2				Stage 3	
Hold				Repeat 40 times.				Melt Curve	
Temp	Secs	Optics	Offset	2-Temperature Cycle				Start	End
95	10	Off		Temp	Secs	Optics	Offset	60	95
				95	3	Off			
				68	16	On			

그림 3 R-PCR의 cycle 조건

[결과]

TaKaRa Ex Taq™을 사용하여 R-PCR한 경우와 TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version을 사용하여 Hot Start R-PCR한 경우의 증폭곡선을 비교한 결과, 전자(그림 4) 보다도 후자(그림 5)의 증폭이 빠른 cycle로 상승한다. 즉 증폭효율이 좋다는 것을 알 수 있다.

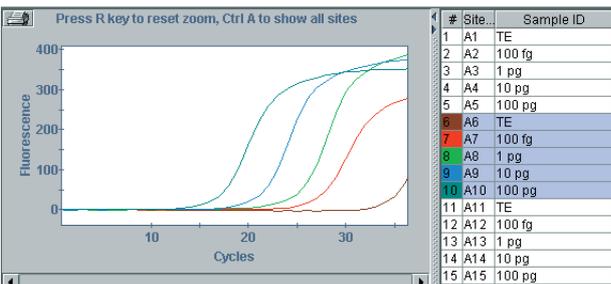


그림 4 일반적인 R-PCR의 증폭곡선

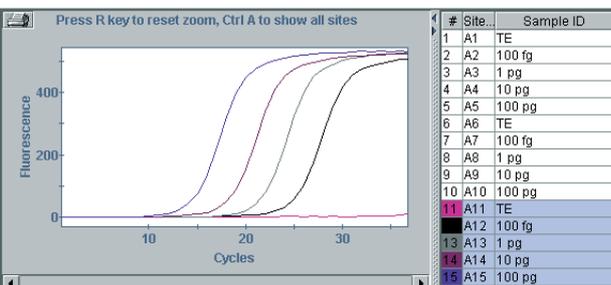


그림 5 Hot Start R-PCR의 증폭곡선

또한 Smart Cycler®에서의 용해곡선 분석 결과를 비교했을 때 TaKaRa Ex Taq™을 사용한 일반적인 R-PCR의 경우 목적하는 증폭산물 유래의 용해온도(약 87°C)의 peak 외에 비특이적 증폭산물 유래 용해온도의 peak가 확인되었지만(그림 6), TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version을 사용한 Hot Start R-PCR의 경우 목적 증폭산물 유래의 peak만 발견되었다(그림 7). 즉 증폭의 특이성면에서 TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version을 사용한 Hot Start R-PCR의 높은 증폭 특이성을 알 수 있다.

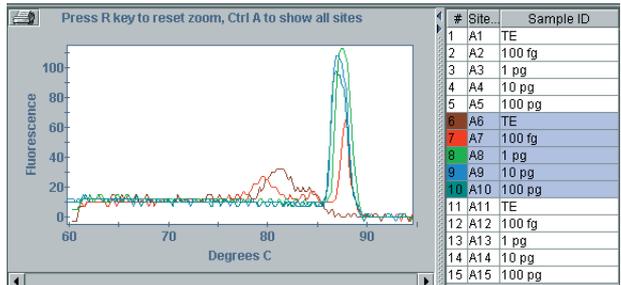


그림 6 일반적인 R-PCR의 경우 용해곡선

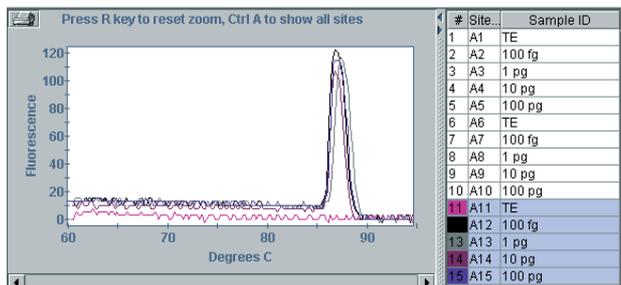


그림 7 Hot Start R-PCR의 경우 증폭곡선

Smart Cycler®

Real Time 모니터링이 가능한 정량 PCR 시스템

Smart Cycler®의 I-CORE™(인공지능 기법/생각 광학 반응) 모듈로 다양한 PCR에 유연하게 대응