

Takara Primer FAQ

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구개발센터 유전자해석센터 / 박 현정

Takara의 primer 정제 방법은 어떤 시스템입니까?

당사의 모든 합성 DNA는 DMT (dimethoxytrityl) ON 방식을 사용하는 자동합성기에 의해 합성됩니다. 합성 과정에서 생겨나는 minor sequence (n-1 mer, 한개 이상의 염기가 합성되지 않은 경우)를 제거하는 정제 방법에 따라 2가지로 구분하여 연구자의 사용 목적에 따라 선택하실 수 있습니다.

▶ High Quality PCR grade (Sep-PAK 정제)

일반적인 PCR, probe hybridization 등을 목적으로 하는 경우에 사용하며, 합성 중 사용되는 시약 잔여물, 염 (salt) 등을 제거하는 desalting 작업을 포함하며, 최종 합성 단계에서 5' 염기에 trityl기가 부착되어 보호되는 원리를 이용하여 major sequence만을 역상 cartridge column으로 정제하는 방법입니다. 5' trityl기가 부착되지 않은 minor sequence는 이 단계에서 대부분 제거 됩니다.

▶ High Quality Sequencing grade

Sequencing, cloning, site mutation 등을 목적으로 하는 경우와 합성 DNA의 길이가 40mer 이상인 경우에 HPLC 또는 PAGE 정제로 목적 단편만 선택적으로 정제하는 Seq grade를 권장합니다.

HPLC 정제는 5'의 trityl 보호기를 이용하여 Reverse Phase Column을 통과시켜 성공적으로 합성된 major sequence만을 분리하는 방법이고, PAGE 정제는 PCR grade로 1차 정제를 거친 후 polyacrylamide gel 상에서 다시 major sequence를 확인하여 분리하는 방법입니다.

각 방법의 특징과 원리는 다음과 같습니다.

	PAGE	RP-HPLC
정제원리	길이	Hydrophobicity
회수율	20-50%	40-70%
특징	Full-length product를 얻는 가장 좋은 방법 1 μmole scale 이하에 적당	소수성 잔기를 가진 modified oligo에 추천 (n-1)mer의 효과적인 제거에는 미비
권장사항	50 base 이상 모든 합성 DNA	-50 base 이하 비수식 primr로 Site-directed mutagenesis, Cloning, Gel-shift assays 등에 사용될 primer에 권장 - Biotin, DIG, Cy3, Cy5 등 수식합성 primer에 권장 - Phosphorothioate antisense oligos

“Salt free” oligo는 어떤 primer를 의미합니까?

당사에서 제작하는 모든 primer는 salt free 상태로 제공합니다. DNA를 화학적으로 합성하면 sodium, magnesium 등의 salt가 사용되며, primer 정제시 “desalting” 이라는 단계를 거쳐 대부분의 salt가 제거 됩니다. 일반적인 합성 DNA는 다음과 같은 단계를 거치게 되며, 이와 같은 과정을 일반적으로 “desalting” 과정이라고 합니다.

DNA synthesis-> cleavage from the solid support-> 암모니아 incubation으로 각 염기의 protecting group 제거

*일반적으로 이런 단계를 거치게 되면 crude한 산물 합성시 생성되는 부산물은 대부분 제거되고 base protecting group은 절단됩니다.

Primer에 salt가 존재한다는 것은 negative charge를 띤 DNA의 balance를 유지하기 위하여 positive charge의 암모늄이온이 필요하다는 것을 의미하며, oligo를 용해할 때 사용하는 buffer에 들어있는 salt에 비하면 무시할 정도로 낮은 농도입니다. 또한 oligo를 HPLC나 PAGE정제를 하면, positive 이온 (TEAA, Tris)에 노출되어, 역상 카트리지 방식으로 정제할 때 완벽히 제거됩니다.

당사에서 제작하는 모든 primer는 salt free 상태로 제공됩니다.

DNA chip용으로 50~70 mer를 사용하고자 하는데 어떤 정제 시스템이 좋은지?

50 base 이상인 합성 DNA는 PAGE 정제를 권장합니다. 합성하는 primer의 길이가 길어지면 길어질수록 full length로 합성된 산물의 양은 줄어들게 됩니다.

$$\text{Full length \% (Eff)} = \text{Coupling efficiency } (n-1), n = \text{염기수}$$

일반적으로 DNA synthesizer의 coupling efficiency는 99%이며, 40 mer oligo를 합성한다고 가정하면 68%가 full length이고 나머지 30%는 deletion 또는 truncation된 mutant입니다.

즉, 합성 길이가 길어지면 (n-1) mer의 확률이 상대적으로 증가하게 되므로, 분자량에 따른 PAGE 정제를 통하여 목적 major 단편만 선별하여 사용하면 그 확률을 최소화 할 수 있습니다.

% Full-Length Product Present after Synthesis				
Oligo Length	Eff			
	0,995	0,990	0,985	0,980
20-mer	91%	83%	75%	68%
50-mer	78%	61%	48%	37%
75-mer	69%	48%	33%	22%
100-mer	61%	37%	22%	14%

합성 DNA는 어떻게 녹여 어떤 상태로 보관해야 하나요?

합성 DNA는 상당히 안정한 산물로 동결 건조된 산물일 경우는 상온에서 몇 년 동안 안정합니다.

일단 oligo가 수화되면 nuclease에 의해 분해될 가능성이 있으며, 수화되었을 때는 다음과 같은 보관법을 권장합니다.

일반적으로 TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA)나 ddH₂O에 녹여 100 μM 농도의 stock solution으로 만들어 -20°C에 보관하며, 그 일부를 working solution으로 만듭니다. 보관기간을 연장 하기 위해서 stock solution을 여러 개의 tube로 만들면 오염을 예방할 수 있습니다.

합성 DNA는 낮은 pH(3), heat 등에 노출되면 oligo의 절단이나 depurination 등에 의해 분해될 가능성이 크고, RNA oligonucleotide는 높은 pH와 heat에 노출되면 alkaline hydrolysis에 의한 분해의 가능성이 높습니다.

합성 DNA 1 OD₂₆₀의 Mol 환산은 어떻게 하면 되는지?

일반적으로는 아래표를 기준으로 평균 중량수를 기준으로 nmol을 계산합니다.

Base 수	평균 분자량	평균 중량수 (μg/ml)	평균 mol수 (nmol/ml)
5	1,650	30	18.2
10	3,300	30	9.1
15	4,950	30	6.1
20	6,600	30	4.5
25	8,250	30	3.6
30	9,900	30	3.0

염기의 종류가 편중되어 있을 경우, nucleotide의 흡광도 계수를 사용하여 다음과 같이 계산합니다.

$$\text{중량수 } (\mu\text{g/ml}) = \frac{330 (\text{nucleotide의 평균 분자량}) \times \text{base 수}}{(15.2 \times \text{A수}) (7.4 \times \text{C수}) (11.5 \times \text{G수}) (8.3 \times \text{T수})}$$

$$\text{Mol수 } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{1}{(15.2 \times \text{A수}) (7.4 \times \text{C수}) (11.5 \times \text{G수}) (8.3 \times \text{T수})}$$

합성 DNA에 흔히 수식되는 형광 Dye의 종류와 측정파장은?

일반적으로 사용되는 형광 dye의 종류와 측정파장은 다음과 같습니다.

Dyes	Reported Values	
	Absorbance	Emission
Cy3™	552 nm	570 nm
Cy5™	643 nm	667 nm
6-FAM	492 nm	515 nm
HEX	535 nm	556 nm
JOE	520 nm	548 nm
ROX	585 nm	605 nm
TAMRA	565 nm	580 nm
TET	521 nm	536 nm
Texas Red	595 nm	615 nm
Rhodamin	548 nm	572 nm
Fluorescein	494 nm	518 nm

실험의 특성상 “g” 잔기가 많은 primer를 필요로 하는데 가능하니까?

“g”를 많이 포함하고 있는 oligonucleotide는 합성하기가 상당히 곤란합니다. 특히 4개 이상의 “g”가 연속적으로 연결되어 있으면 “guanine tetraplex”를 형성하여 aggregation이 일어날 가능성이 큼니다 (Poon and MacGregor (1998) *Biopolymers* 45:427-434).

이런 aggregation이 형성되면 complementary sequence와 hybrid가 저해됩니다. 만약 이와 같은 서열을 가진 primer를 꼭 사용해야 한다면 “g”의 일부를 Inosine(a universal base)으로 바꾸면 tetraplex 형성을 줄일 수는 있습니다.

Mixed bases (Mixture)의 IUB 표기법은?

A = Adenosine

C = Cytosine

G = Guanine

T = Thymidine

Inosine = I

B = C,G, or T

D = A,G, or T

H = A,C, or T

V = A,C, or G

R = A or G (puRine)

Y = C or T (pYrimidine)

K = G or T (Keto)

M = A or C (aMino)

S = G or C (Strong -3H bonds)

W = A or T (Weak -2H bonds)

N = aNy base.

합성 Primer 주문: 24시간 편리한 인터넷 주문 www.takara.co.kr로 클릭하세요.