

# Primer-Pool법 (New ASIN; ASIN like): 중단편 염기서열 해석의 새로운 전략

다카라코리아바이오메디칼(주) 연구개발센터 / 윤 경욱

Primer-walking법은 shotgun법과 비교하여 redundancy가 낮으며 대용량의 컴퓨터가 불필요한 이점이 있는 반면, sequencing 반응시에 반드시 specific primer의 설계 및 합성이 필요하여 해석 속도면에서 shotgun-sequence를 따라가지 못하는 것이 현실이다. 그에 반해 ASIN (Amplification of Sequences of the Interlaced Nested)법은 primer-walking법에 이용되는 primer를 primer-library에서 선택하는 방식을 이용하기 때문에 해석속도 향상과 비용절감 효과가 있어 새로운 염기서열 해석법으로 주목 받고 있다.

Genome DNA의 염기서열 결정에는 whole-genome-shotgun 방식이 현재 주로 이용되고 있다. Genome 전체를 단편화하여 DNA sequencer로 말단부터 서열을 결정한 후, 적절한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 전체를 하나로 연결하는 방법이다. 이와 같은 방법을 이용하여 미국의 TIGR 연구그룹은 1995년 약180만개의 염기쌍인 인플루엔자균의 전체 염기서열을 결정하였다. 그후, 미국의 PE사는 유전자해석을 전문으로 수행하는 Celera사를 설립하여, 1999년 약 1억6500만개의 염기쌍인 초파리의 전체 염기서열을 결정하였다. 하지만 Celera사는 초파리 게놈의 전체의 10배 이상에 달하는 18억개 이상의 염기쌍을 해석해야만 했다. 또 하나의 방법으로 이용되고 있는 것이 custom primer walking법이다. 이 방법은 이미 밝혀진 염기서열정보를 다음 단계의 염기서열해석의 개시점으로 이용하여 순차적으로 미지의 염기서열을 결정하는 방법이다. 이와 같은 방법을 이용하려면 각 해석 단계에서 specific primer 합성이 필수적으로 이루어져야 하기 때문에 genome 전체를 해석하기에는 불필요한 비용과 시간이 많이 소요되어 비현실적이다.

이와 같은 문제점을 극복하기 위한 새로운 genome DNA의 염기서열 해석법이 New ASIN법이다. ASIN법은 방법론적으로는 primer walking법의 일종이나, 사용되는 primer가 다양한 염기서열에 대응할 수 있도록 합성된 것으로 primer-library로부터 적절한 primer를 선택할 수 있게 설계한 점이 종래의 방법과의 차이점이라 볼 수 있다. 이론상 primer를 합성할 경우 그 수는 천문학적인 숫자가 되어 ASIN법에서는 primer-library속의 primer의 숫자를 400여개까지 낮춰 염기서열을 해석하도록 설계한 것이 특징이다. ASIN법의 기본원리에 대해 설명하면 다음과 같다. 1차 PCR은 primer-library에서 target 서열과 일치하는 primer (6 mer)를 선택하여 vector의 fixed primer와 PCR을 수행 한다.

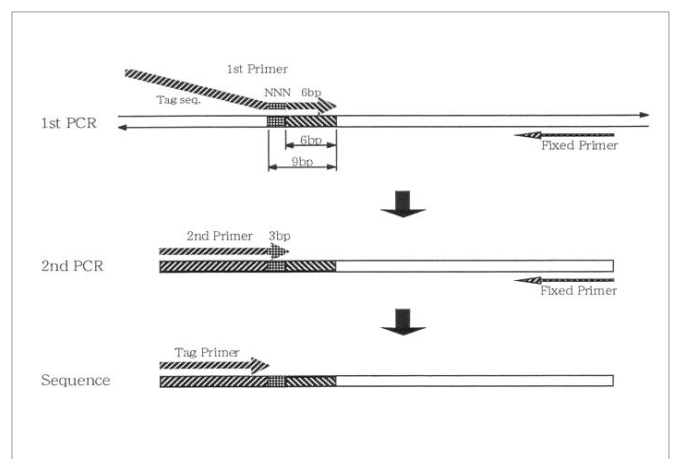


그림 1 ASIN법의 원리

2차 PCR은 3' 쪽의 3 bp(1st primer의 NNN서열)가 target 서열과 특이적으로 반응하도록 설계한 2nd primer로 PCR하여 특이성을 향상시키고, 증폭된 2차 PCR 산물은 Tag 서열로 sequence하여 염기서열을 해석하는 것이 기본원리이다. 하지만, 초기의 ASIN법은 2차 PCR 증폭 산물의 특이성이 높지 않은 것으로 나타났으며, PCR로 증폭 가능한 길이에 한계가 있어 size가 큰 insert의 서열결정에는 여러 가지 어려움이 따르는 것으로 나타났다. 또한 해석된 서열로부터 primer를 선택한 후 수백 bp단위로 순차적으로 서열을 결정하는 방법으로 염기서열 해석속도를 향상 시키는 점에서도 한계가 있었다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 TaKaRa에서는 기존의 ASIN법에 근본을 둔 새로운 염기서열 해석법을 개발하여 Primer-pool법이라 명명하게 되었다.

이와 같이 ASIN법은 1차 및 2차에 걸쳐 PCR을 수행하며 448개의 primer로 구성된 primer-library를 이용하였으나, Primer-pool법에서는 한번의 PCR 반응에서 선택성을 높이기 위해 (PCR 산물을 single band로 얻기 위해) specific primer의 3' 쪽을 NNG-6S (S는 specific 서열)의 구조로, 5' 쪽은 sequencing용 Tag 서열 16 mer로 설계하였다. 이와 같이 설계된 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과 선택성을 크게 향상 시킬 수 있었다 (그림 2).

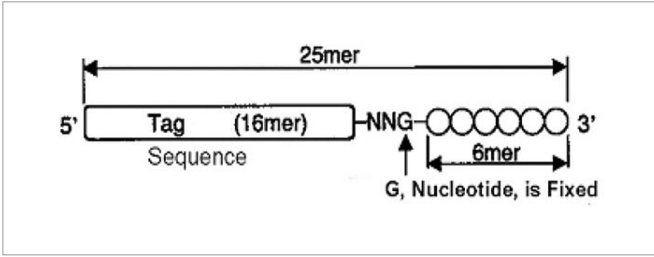


그림 2 Primer-pool의 primer 구조

또한 Primer-library를 구성하고 있는 448개의 primer를 Tm값, Tag 서열과의 상관성 및 primer dimer를 형성하지 않는 조건 등으로 재분류하여 94개까지 primer의 숫자를 줄여 96 well type의 PCR 반응에 적합하도록 재설계 하였다. 재설계된 primer-library를 이용하여 실험한 결과 수 kb까지의 PCR 산물을 얻었으며 그 중 single band로 얻어진 PCR 산물을 선택하여 sequencing을 실시한 결과, 한번의 반응으로 수 kb까지 해석이 가능하였다. 현재까지는 plasmid clone을 target으로 실험하여 한번의 반응으로 전체 서열의 50%이상을 밝혀내는데 성공하였다 (그림 3).

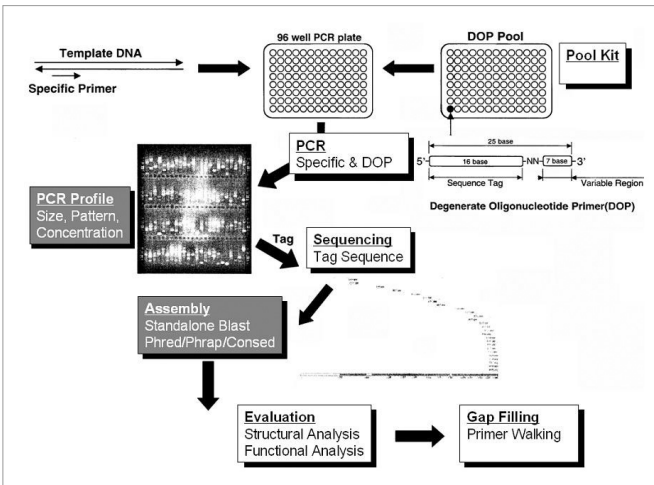


그림 3 Primer-pool법의 모식도

## 실험 예

### 1) 실험 (그림 4)

- Template명: pUC118E6
- Insert 길이: 6.1 kb
- Sequencing size: 3,758 kb

### 2) 실험 (그림 5)

- Template명: pYES2
- Insert size: 5,856 kb
- Sequencing size: 3,117 kb

실험 1) 및 실험 2)의 결과를 보면, 실험 1)에서는 5개의 gap이 나타났으며 실험 2)에서는 4개의 gap이 나타났다. 하지만 94개로 구성된 primer-library를 사용하여 한번의 반응으로 insert 길이에 대비하여 약50% 이상의 염기서열을 해석하였으므로 ASIN법의 단점으로 나타났던 염기서열 해석에 소요되는 속도는 크게 향상되었다. 위와 같은 반응은 48시간 이내

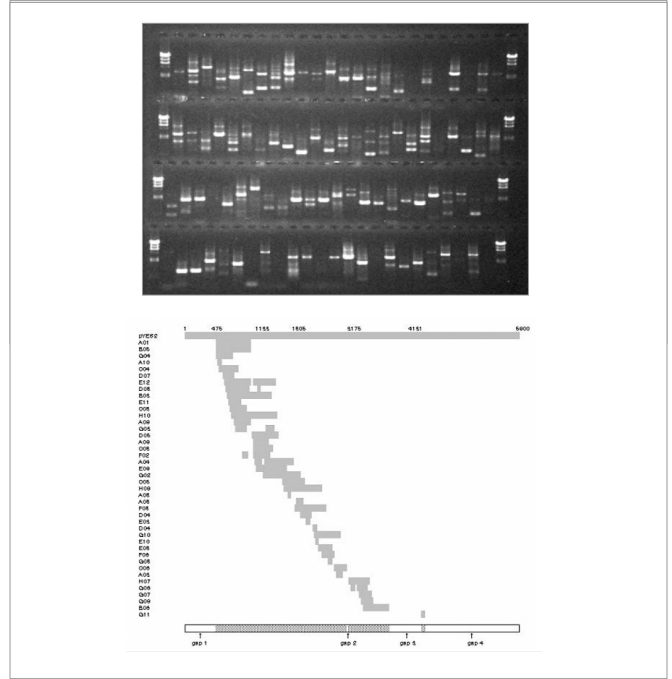


그림 4 1차 PCR 결과의 전기영동 결과 및 염기서열 분석 결과

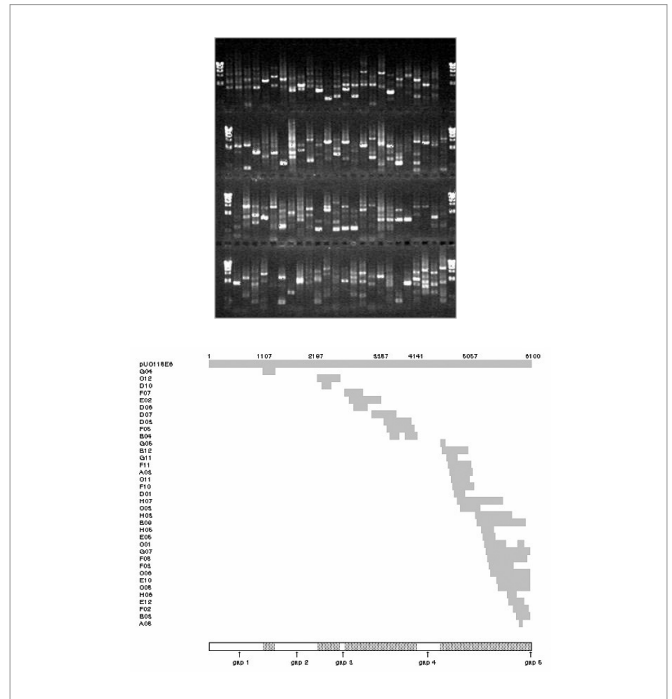


그림 5 1차 PCR의 전기영동 결과 및 염기서열 분석 결과

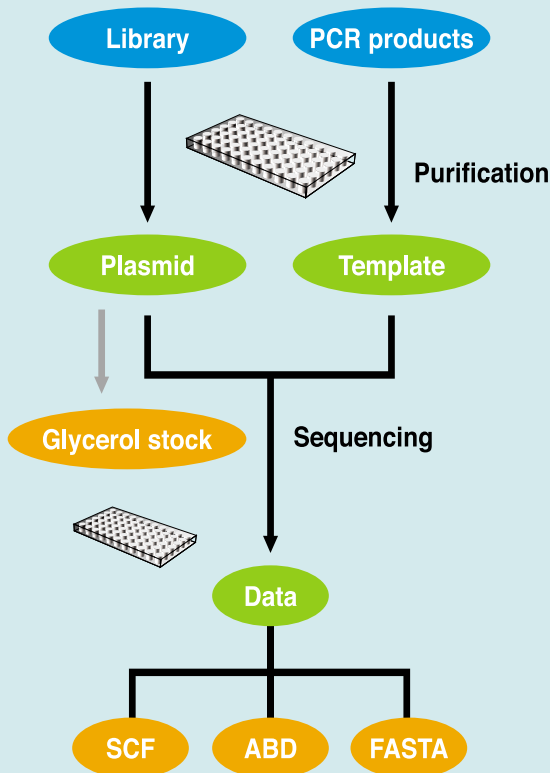
에 완료되어 primer walking법 보다 소요 시간을 5배 이상을 단축 시킨 결과이다.

Primer-pool법은 현재 다양한 template에 대한 유용성의 평가가 진행되고 있으며 genome DNA의 염기서열 해석 분야에 응용을 목표로 지속적인 연구를 하고 있다. 다카라코리아 연구개발센터에서는 올해 안에 custom service 개시를 하기 위하여 준비 중에 있다. 또한 Primer-pool법에 이용되는 primer-library set를 Kit으로 상품화 하여 내년 상반기에 보다 많은 연구자들에게 편리한 tool을 제공할 계획이다.

# Perfect Takara Sequencing

High quality, Rapid sequencing, all type sample

- 01 **기본서비스**  
Highthroughput을 위한 MegaBACE와 ABI 377을 상호 보완 운영함으로써  
어떤 시료도 완벽하게 분석
- 02 **분석대상시료**  
Library, Plasmid DNA, PCR product, BAC, Cosmid, Genome
- 03 **sequencing capacity**  
평균 500 bp이상, phred score 16 이상 보증
- 04 **데이터 전송**  
Sequence data [chromatograms (scf, abd), pdf], text (fasta)



## 표준 분석비용

시료수	비용
1~96 개	9,000원
96 개 이상	6,000원

## 기타서비스

Plasmid Prep	3,000원
PCR 산물 정제	2,000원
Homology search	무료



## Takara

다카라코리아바이오메디칼(주) 유전자해석센터  
437-020 경기도 의왕시 왕곡동 374-4  
TEL. 031-459-6967 FAX. 031-456-6963  
URL www.takara.co.kr E-mail tkbio@takara.co.kr

# 인공 합성 유전자 제작 서비스

일반적으로 합성하기 어려운 긴 서열의 유전자를 **유전공학적 방법**으로 **최고의 품질**로 정확하게 합성하여 드립니다.

## >서비스 내용

- 염기서열 정보를 가지고 100 bp ~ 6 kbp의 긴 dsDNA를 유전공학적 방법으로 제작합니다.

## >가격

- 1 염기당 8,000원

## >Option

- Expression vector에의 subcloning, 핵외 유전자 대량 정제 등은 문의 해주시기 바랍니다.

## >주문하기 전에

- 제공하신 염기서열 정보에 따라 Oligo DNA Assemble법을 사용하여 합성된 dsDNA를 pUC(or pBlueScript) vector에 cloning하여 제공합니다.
- 얻어진 clone에 대해서 sequencing을 수행하여 서열을 확인하여 드립니다.
- 제공해 주신 염기서열 정보와 비교하여 mismatch가 확인된 부위에 대해서는 Site directed mutagenesis 등의 방법으로 변이수정을 실시합니다.
- Option으로서는 제공받은 expression vector에의 subcloning을 수행하여 드립니다.

## >주문에 대해서

- 주문서에 필요사항을 기입하신 후, 염기서열 정보와 함께 보내 주십시오.
- 지정된 vector 이외에 다른 vector의 사용을 희망하시는 경우에는 희망하는 vector도 함께 보내 주시기 바랍니다.
- E-mail로 염기서열을 보내주셔도 주문이 가능합니다.

