

고도의 정확한 증폭을 자랑하는 PCR 효소

Pyrobest[®] DNA Polymerase를 더욱 효율적으로 사용하기 위하여

Pyrobest[®] DNA polymerase는 *Pyrococcus sp.* 유래의 초내열성 DNA polymerase로 3'→5' exonuclease(proof reading) 활성을 가져, 높은 정확성을 필요로 하는 증폭반응에 매우 적합하다.

본 고에서는 *Pyrobest*[®] DNA polymerase를 사용할 때의 요령과 주의사항에 대해 소개하여 본 제품의 보다 효율적인 이용방법을 제시하고자 한다.

정확성(Fidelity) 비교

GC rich한 *Thermus thermophilus* HB8 genome DNA 10 ng를 주형으로 *Pyrobest*[®] DNA polymerase와 T사 DNA polymerase를 이용하여 10개 영역(Target 1~10, 각 500 bp 정도)을 PCR로 증폭하고, 각 PCR 단편을 클로닝하였다. 다수의 clone에서 임의로 12개씩 선택하여, 그 염기서열을 분석하고 mutant frequency를 통하여 정확성을 비교하였다.

【PCR 조건】

96 ℃ 2분
98 ℃ 5초
68 ℃ 30초

30 Cycle

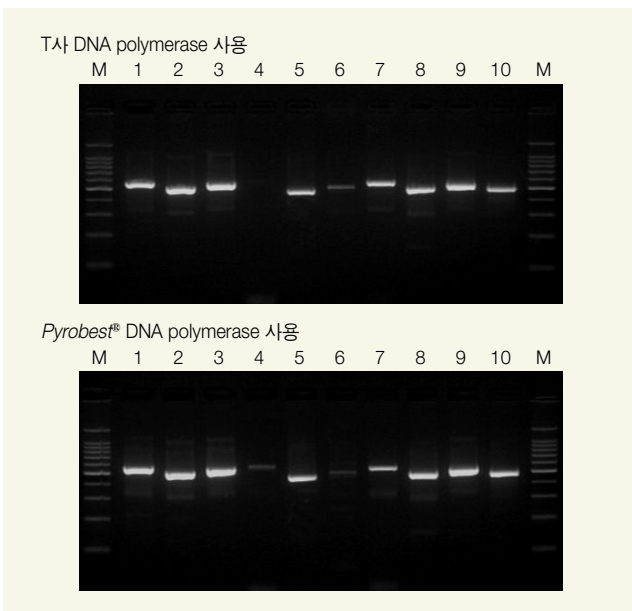


그림 1 증폭산물의 전기영동 사진
PCR 산물(50 µl)의 일부(5 µl)를 3% NuSieve[®] 3:1 Agarose에서 전기영동하였다.
M : 100 bp DNA ladder(TaKaRa Code 3410)
Lane : 1~10 : Target 1~10

【결과】

각 PCR 산물의 전기영동 사진을 그림 1에, 양 효소에 의한 PCR 산물의 mutant frequency를 표 1에 나타내었다.

표 1 Fidelity 비교

DNA polymerase	Mutation수	서열 분석한 전체 염기수	Mutant frequency
T사	5	41752	0.012%
<i>Pyrobest</i> [®]	4	49952	0.008%

Pyrobest[®] DNA polymerase는 T사 DNA polymerase에 비해 동등 이상의 반응성과 높은 정확성을 나타내었다.

증폭 성능 비교

Pyrobest[®] DNA polymerase 또는 T사 DNA polymerase를 이용해 주형량에 변화를 주어 λDNA 또는 *E. coli* JM109 게놈 DNA의 다양한 길이의 영역을 타겟으로 PCR 증폭해, 양 효소의 증폭 성능을 비교하였다.

98 ℃ 10초
68 ℃ 2분(2 kb의 경우)
또는 4분(4 kb의 경우)
또는 10분(8 kb의 경우)

30 Cycle

【결과】

효소의 증폭 성능을 비교하기 위해 전기영동으로 검출 가능한 증폭산물의 최소 주형량(검출한계)을 조사한 결과를 그림 2에 나타내었다. 결과와 같이 *Pyrobest*[®] DNA polymerase는 T사 DNA polymerase와 동등 이상의 증폭 성능을 지니고 있음이 확인되었다. 특히 λDNA의 2 kb, *E. coli* DNA의 2 kb 영역의 증폭에서는 *Pyrobest*[®] DNA polymerase의 증폭 성능이 현저히 높음을 알 수 있었다.

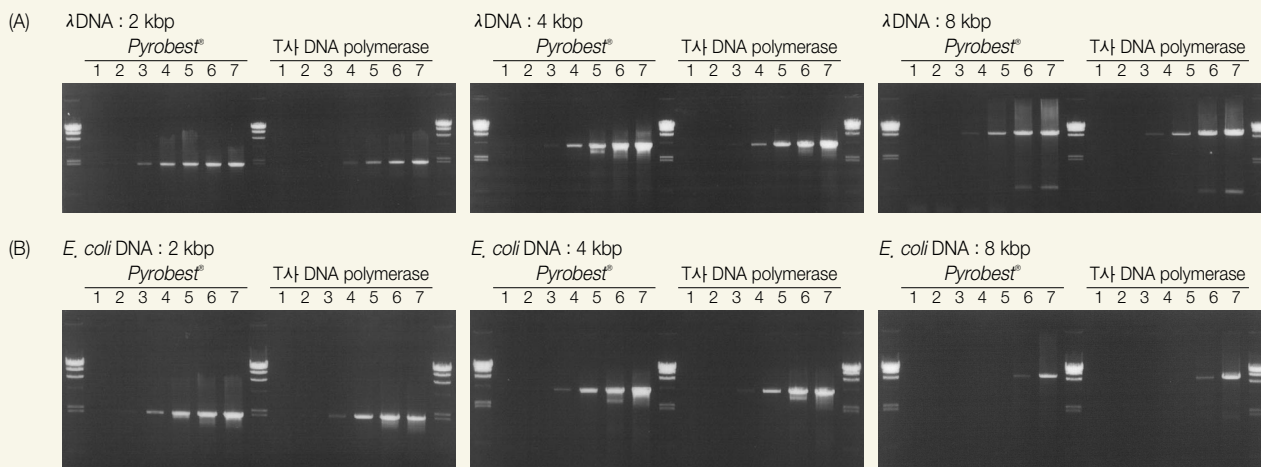


그림 2 Pyrobest® DNA Polymerase와 T사 DNA Polymerase의 증폭 성능 비교
주형량을 바꿔 PCR 증폭을 실시하며, PCR 산물을 전기영동으로 관찰한 결과를 나타낸다. Band가 관찰되는 최소 주형량으로부터 양 효소의 증폭 성능을 비교하였다.
(A) λDNA(주형량) Lane 1 : 1fg ; 2 : 10fg ; 3 : 100fg ; 4 : 1pg ; 5 : 10pg ; 6 : 100pg ; 7 : 1ng.
(B) E.coli DNA(주형량) Lane 1 : 500fg ; 2 : 5pg ; 3 : 50 pg ; 4 : 500pg ; 5 : 5ng ; 6 : 50ng

Pyrobest® DNA polymerase 사용시의 주의사항

Pyrobest® DNA polymerase의 성능을 최대한 발휘하기 위해서는 3'→5' exonuclease 활성에 의한 primer 및 증폭산물에 대한 영향을 고려할 필요가 있다. 반응이 잘 이루어지지 않을 경우는 아래의 상황을 확인하기 바란다.

(1) 반응액 조제

- 1) 반응액은 가급적 얼음위에서 제조한다.
- 2) Pyrobest® DNA Polymerase는 dNTP mixture를 첨가한 후에 넣는데, 이는 dNTP가 존재하지 않을 경우, 3'→5' exonuclease 활성에 의해 primer가 분해 될 우려가 있기 때문이다.

[반응액 조제방법 예]

- ① 얼음위에서 H₂O→10× Pyrobest® Buffer II→dNTP mixture→Pyrobest® DNA Polymerase의 순서대로 혼합하여 master mix를 조제하고, PCR tube에 분주한다.
- ② 각각의 tube에 주형 DNA를 첨가한다.
- ③ Forward primer와 reverse primer를 첨가한다.
- 3) Primer 농도를 비교적 높게(최종 농도 0.2~2 μM) 설정하거나, primer의 길이를 일반적인 것 보다 길게(25~30 mer) 설계하면 반응성이 좋아지는 경우가 있다.
- 4) 반응액을 조제한 후에는 가능한 빨리 반응을 시작한다.

(2) PCR 조건

- 1) 일반적인 Taq계 효소를 사용한 경우에 자주 이용되는 PCR 반응의 final extension 단계(예를 들면 72 °C, 10분)는 특별히 필요하지 않다. 오히려 smear 현상 등의 원인이 될 수 있다.
- 2) 불필요하게 긴 annealing, extension은 피한다(대부분의 경우 extension은 1분/1kb로 충분하다).

- 3) 사용하는 primer의 T_m값에도 좌우되지만, 기본적으로 2단계 PCR을 권장한다. 2단계 PCR에서 반응성이 나쁠 경우는 3단계 PCR을 사용한다.

【실시에】

Pyrobest® DNA Polymerase를 이용한 2단계 PCR로 human genomic DNA를 주형으로 2~8 kbp 영역을 증폭한 예를 아래에 나타내었다.

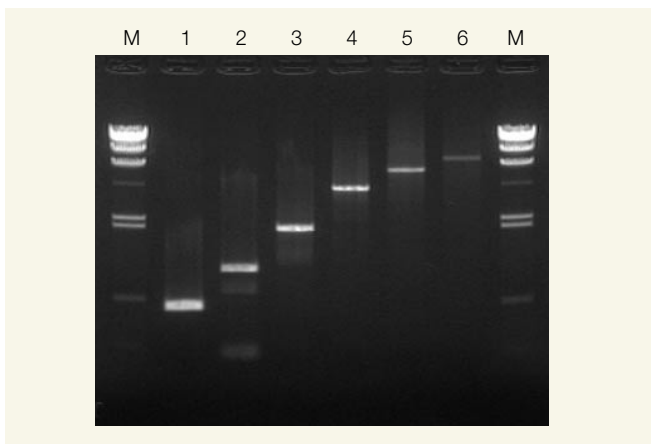


그림 3 Pyrobest® DNA Polymerase에 의한 human p53 gene의 증폭
Human genomic DNA 100 ng를 주형으로, 아래의 반응 조건에서 human p53 유전자 영역의 0.5~8 kb를 증폭하였다.
[PCR 조건] 98 °C 10초
68 °C X분* 30 Cycle
* : 1분/1 kb로 설정
[증폭 사이즈] Lane 1 : 0.5 kb, 2 : 1 kb, 3 : 2 kb, 4 : 4 kb, 5 : 6 kb, 6 : 8 kb,
M : λ- Hind III digest(TaKaRa Code 3403)

(3) PCR 산물의 클로닝

Pyrobest® DNA Polymerase를 이용해 증폭한 PCR 산물의 대부분은 blunt end이다. 따라서 PCR 산물을 그대로(필요에 따라 인산화하여) blunt end 벡터에 클로닝할 수 있다.