

TaKaRa LA Taq[®]을 사용한 혈액에서의 direct PCR

혈액에는 효소 반응을 저해하는 물질이 많이 포함되어 있어 PCR 반응에 영향을 미치기 때문에 충분한 증폭 생성물을 얻을 수 없는 경우가 있다. 그래서 PCR에 혈액 시료를 바로 사용할 경우, 우선 혈액에서 DNA를 추출하는 조작이 필요하다.

본 고에서는 증폭 효율이 높은 PCR 효소를 사용하여 DNA를 추출하지 않고 혈액 시료를 직접 첨가하여 PCR 반응액에 응용한(direct PCR) 실험 예를 소개하고자 한다. 이 방법을 사용하면 혈액 시료에서 신속하고 간편하게 PCR을 실시할 수 있으며, 특히 TaKaRa LA Taq[®]를 사용하면 높은 증폭 효율로 direct PCR이 가능하다.

실험 예 1: 혈액에서의 direct PCR시, TaKaRa Ex Taq[®]과 TaKaRa LA Taq[®]의 증폭 효율 비교

혈액 시료를 그대로 사용하여 cytokeratin 19 영역(663 bp)에 대하여 TaKaRa Ex Taq[®]과 TaKaRa LA Taq[®]에서 direct PCR을 실시한 후 증폭 생성물을 전기영동하여 결과를 비교하였다.

【방법】

TaKaRa Ex Taq[®]

【반응액 조성】

혈액 시료	1 μ l
10 \times Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	4 μ l
Forward primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa Ex Taq [®] (5 U/ μ l)	0.25 μ l
H ₂ O	38.75 μ l
Total	50 μ l

TaKaRa LA Taq[®]

【반응액 조성】

혈액 시료	1 μ l
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	8 μ l
Forward primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa LA Taq [®] (5 U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	29.5 μ l
Total	50 μ l

시료 이외의 반응액을 조제한 후, 항응고제로서 EDTA를 첨가한 혈액 시료(EDTA 처리혈) 또는 Sodium Citrate을 첨가한 혈액 시료(Sodium Citrate 처리혈)를 각 반응계에 각각 1 μ l 첨가하였다. 이때, 혈액 시료는 비중이 크기 때문에 튜브 바닥에 가라앉지만 별다른 조작없이 그대로 PCR을 하였다.

【Cycle 조건】

94 $^{\circ}$ C, 2 분
↓
94 $^{\circ}$ C, 30 초
55 $^{\circ}$ C, 1 분
72 $^{\circ}$ C, 1 분 } 35 Cycle
↓
72 $^{\circ}$ C, 5 분

반응 종료 후, 반응액 5 μ l를 3% Nusieve[®] 3:1 Agarose에서 전기영동하여 증폭 생성물을 검출하였다.

【결과】

TaKaRa Ex Taq[®]에서도 증폭 생성물은 확인되었지만 TaKaRa LA Taq[®]에서 증폭 효율이 높은 것으로 확인되었다. 이는 EDTA나 Sodium Citrate을 처리한 혈액에서 어느 경우에도 동일한 경향을 나타내었다.

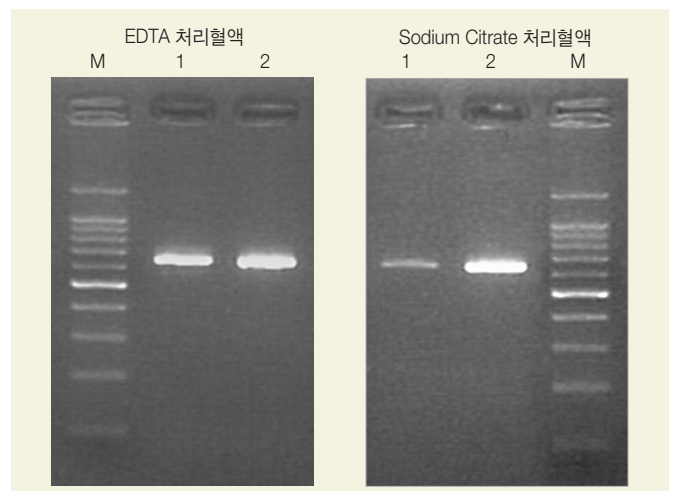


그림 1 TaKaRa Ex Taq[®]과 TaKaRa LA Taq[®] 반응의 증폭 효율 비교
1: TaKaRa Ex Taq[®] 반응
2: TaKaRa LA Taq[®] 반응
M: 100 bp DNA Ladder

실험 예 2: PCR 반응조건과 반응성의 검토

β -globin(262 bp) 증폭 반응에서 extension step의 시간과 반응성에 대하여 검토하였다.

【방법】

반응액 조성은 실험 예 1과 동일. 또한 primer로서 KM29, KM38을 사용하고 Sodium Citrate 처리혈액을 1 μ l 첨가하였다. 이후의 조작은 증폭조건을 아래와 같이 변경한 이외는 실험 예 1과 동일한 방법으로 실시하였다.

【Cycle 조건】

94 $^{\circ}$ C, 2 분
↓
94 $^{\circ}$ C, 30 초
60 $^{\circ}$ C, 50 초
72 $^{\circ}$ C, 50 초 또는 3 분 } 35 Cycle
↓
72 $^{\circ}$ C, 5 분

【결과】

TaKaRa Ex Taq[®], TaKaRa LA Taq[®] 양 반응 모두에서 extension step를 3분으로 설정하였을 때 더 많은 증폭 생성물을 얻을 수 있었다. Extension step 시간은 보통 PCR 반응에서는 1 분/kbp를 기준으로 설정하지만, 혈액에서 direct PCR을 실시할 경우는 extension step 시간을 길게 설정하는 것이 증폭 효율이 좋다.

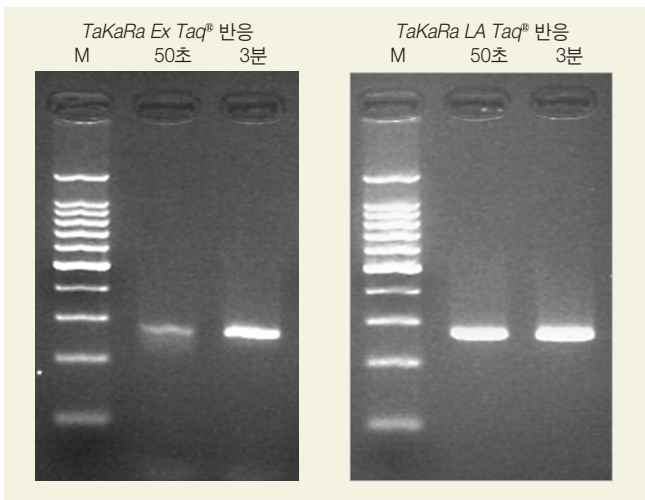


그림 2 Extension step 시간 검토
M: 100 bp DNA ladder

실험 예 3: 긴 쇠사슬 DNA의 direct PCR에서 TaKaRa Ex Taq[®] 와 TaKaRa LA Taq[®] 의 증폭 효율 비교

β -globin(408 bp)과 p53(2,744 bp)에 대하여 TaKaRa Ex Taq[®]와 TaKaRa LA Taq[®]을 이용한 direct PCR로 증폭 효율을 비교하였다.

【방법】

반응액 조성은 실험 예 1과 동일하다. EDTA 처리혈액을 1 μ l씩 첨가하

고, 이후의 조작은 증폭조건을 아래와 같이 변경한 이외에는 실험 예 1과 동일한 방법으로 실시하였다.

【Cycle 조건】

94 $^{\circ}$ C, 2 분
↓
94 $^{\circ}$ C, 30 초
60 $^{\circ}$ C, 50 초
72 $^{\circ}$ C, 8 분 } 33 Cycle

【결과】

TaKaRa LA Taq[®]으로 혈액 시료의 direct PCR로 2,744 bp을 증폭하였을 때 좋은 증폭성을 확인하였다.

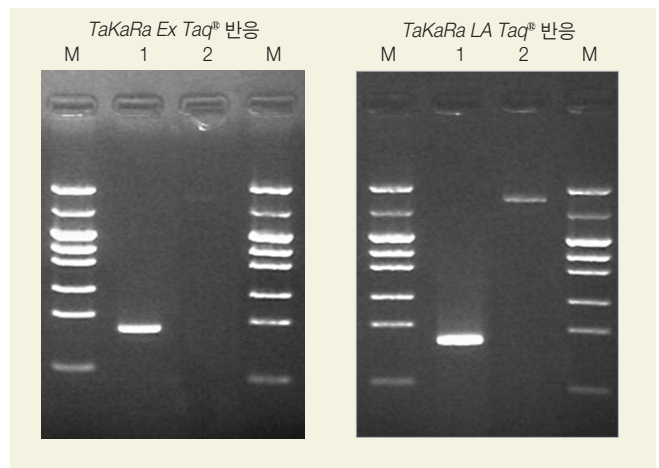


그림 3 긴 DNA의 direct PCR
1: β -globin(408 bp)
2: p53(2,744 bp)
M: PHY Marker

실험 예 4: 혈액 시료의 첨가량과 PCR 반응성

β -globin(408 bp)의 증폭 반응시, 반응계에 첨가하는 혈액 시료의 양과 반응성에 대하여 조사하였다.

【방법】

TaKaRa Ex Taq[®]

【반응액 조성】

혈액 시료	x μ l
10 \times Ex Taq Buffer(Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	4 μ l
primer GH20(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
primer GH21(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa Ex Taq [®] (5 U/ μ l)	0.25 μ l
H ₂ O	y μ l
Total	50 μ l

TaKaRa LA Taq[®]

[반응액 조성]

혈액 시료	x μ l
10× LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	8 μ l
primer GH20(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
primer GH21(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa LA Taq [®] (5 U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	y μ l
Total	50 μ l

EDTA 또는 Sodium Citrate 처리혈액을 각 반응액에 x μ l(1 μ l, 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l) 첨가하고 H₂O의 양(y)을 적절히 조정하여 총량을 50 μ l로 하였다. 이후의 조작은 증폭조건을 아래와 같이 변경한 이외에는 실험 예 1과 동일한 방법으로 실시하였다.

[Cycle 조건]

94 °C, 2 분
↓
94 °C, 30 초
60 °C, 50 초
72 °C, 3 분
} 33 Cycle

[결과]

EDTA 처리혈액의 경우, TaKaRa LA Taq[®]을 이용하였을 경우 반응성이 좋았으며, 50 μ l 반응에 혈액 10 μ l 첨가하였을 경우에도 증폭 생성물을 확인할 수 있었다.

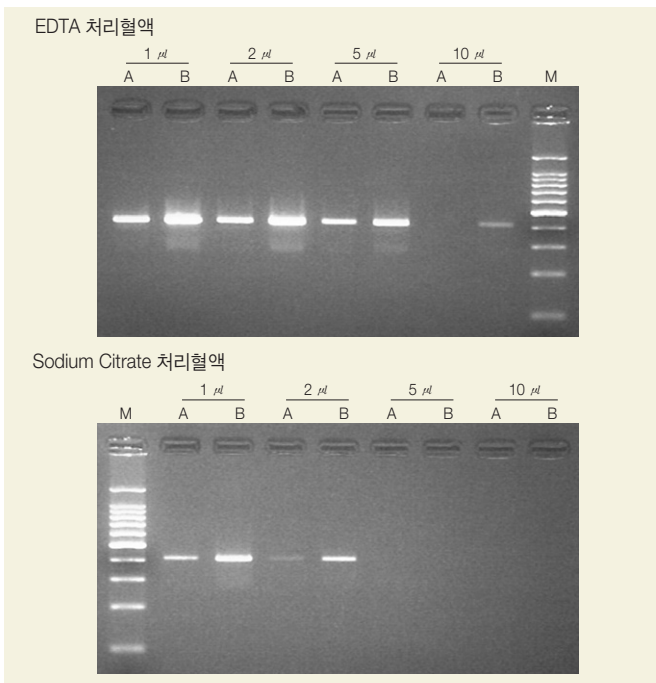


그림 4 혈액 시료의 첨가량 검토
A: TaKaRa Ex Taq[®] 반응
B: TaKaRa LA Taq[®] 반응
M: 100 bp DNA Ladder

Sodium Citrate 처리혈액의 경우에는 TaKaRa Ex Taq[®] 반응과 TaKaRa LA Taq[®] 반응 모두 50 μ l 반응에서 혈액 2 μ l를 첨가했을 때에도 증폭 생성물을 확인할 수 있었지만 TaKaRa LA Taq[®]을 이용하였을 경우 더 많은 증폭량을 확인하였다.

■ 실험 예 5: 항응고제 처리혈액의 반응액에서의 혼합 영향

β -globin(408 bp)의 증폭 반응에서 혈액 시료를 첨가만 한 경우와 첨가 후에 pipetting으로 혼합한 경우에 증폭 결과를 비교하고 혼합 영향을 조사하였다.

[방법]

반응액 조성은 실험 예 4와 동일하다. EDTA 또는 Sodium Citrate 처리혈액을 x μ l(1 μ l, 5 μ l) 첨가하고 H₂O의 양(y)을 조정하여 총량을 50 μ l로 하였다. 이 반응액을 혼합하지 않고 그대로 혈액 시료를 침전시킨 것과 천천히 5회 pipetting을 하여 혈액 시료를 반응액에 균일하게 혼합한 것을 조제한 후 실험 예 4와 동일한 조건에서 증폭반응과 증폭 생성물을 검출하였다.

[결과]

EDTA 처리혈액의 경우에는 pipetting으로 혼합하면 반응성이 감소하였다. 그러나 Sodium Citrate 처리혈액의 경우에는 TaKaRa Ex Taq[®], TaKaRa LA Taq[®] 모두 pipetting으로 혼합해도 반응성은 감소하지 않았다.

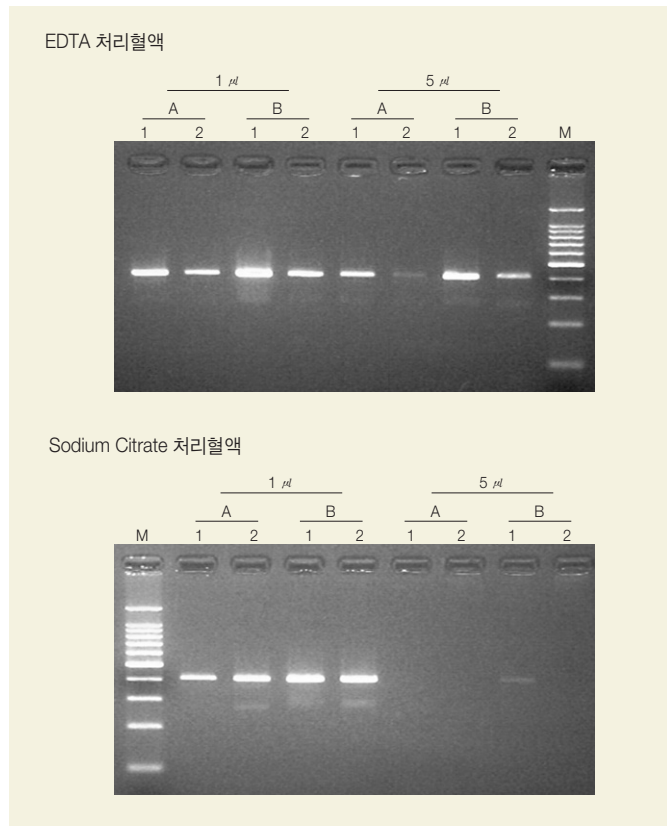


그림 5 혈액 시료의 pipetting 혼합 영향

A: TaKaRa Ex Taq[®]
B: TaKaRa LA Taq[®]
1: 혼합 없음
2: Pipetting 혼합
M: 100 bp DNA Ladder

실험 예6: GC rich 영역의 증폭

GC rich 영역을 혈액에서 direct PCR할 수 있는지 여부를 검토하였다.

[방법]

TFR promoter 영역(315 bp; GC 함량 73 %)의 direct PCR을 TaKaRa Taq[™], TaKaRa Ex Taq[®], TaKaRa LA Taq[®] 및 TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer 반응을 사용하여 실시하였다. TaKaRa Ex Taq[®], TaKaRa LA Taq[®]의 반응액 조성은 실험 예 1과 동일하다.

TaKaRa Taq[™]

[반응액 조성]

혈액 시료	1 μ l
10 \times PCR Buffer(Mg ²⁺ plus)	5 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	4 μ l
Forward primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa Taq [™] (5 U/ μ l)	0.25 μ l
H ₂ O	38.75 μ l
Total	50 μ l

TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer

[반응액 조성]

혈액 시료	1 μ l
2 \times GC Buffer I or II (5 mM Mg ²⁺ plus)	25 μ l
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	8 μ l
Forward primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Reverse primer(20 pmol/ μ l)	0.5 μ l
TaKaRa LA Taq [®] (5 U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	14.5 μ l
Total	50 μ l

EDTA 또는 Sodium Citrate 처리혈액을 각 반응액에 1 μ l 첨가하였다. 또한 실험 예 4와 동일한 조건에서 증폭반응과 증폭 생성물의 검출을 실시하였다.

[결과]

GC rich 영역에서도 TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer 반응을 사용하면 혈액에서 direct PCR이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

맺음말

이상과 같이 TaKaRa LA Taq[®]을 사용하면 TaKaRa Ex Taq[®] 보다 높은 효율로 혈액에서 direct PCR을 할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한 TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer를 사용하면 GC rich 영역도 혈액에서 direct PCR이 가능함을 확인할 수 있었다.

이와 같이 TaKaRa LA Taq[®]는 긴 단편의 증폭뿐 아니라, 시료 내에 PCR 반응을 저해하는 불순물이 혼합되어 있는 경우에도 탁월한 효과를 나타냄을 확인하였다.

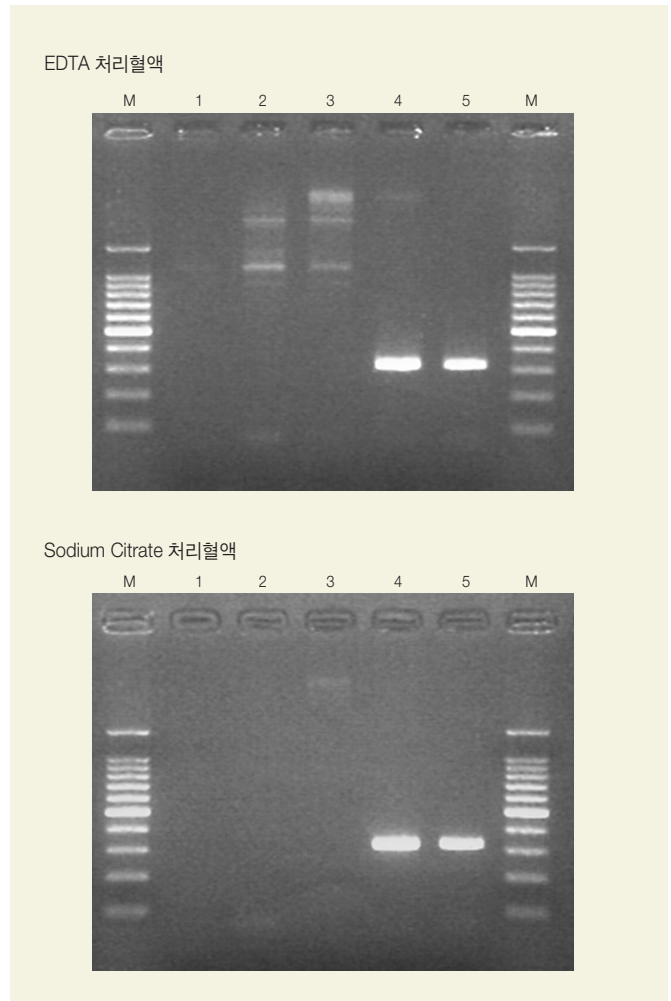


그림 6 혈액 시료에서의 GC rich 영역의 direct PCR

- 1: TaKaRa Taq[™] 반응
- 2: TaKaRa Ex Taq[®] 반응
- 3: TaKaRa LA Taq[®] 반응
- 4: TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer I 반응
- 5: TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer II 반응
- M: 100 bp DNA Ladder

본고에서 소개한 제품

- TaKaRa Ex Taq[®] TaKaRa Code RR001A/B/C
- TaKaRa LA Taq[®] TaKaRa Code RR002A/B
- TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer TaKaRa Code RR02AG/BG
- β -globin(human) Primer Set TaKaRa Code 3868