

높은 증폭 효율을 겸비한 High-Fidelity PCR 효소!!

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

Library에서 클로닝하기 위해서는 DNA를 증폭할 때 높은 정확도가 요구된다. 당사는 그러한 요구에 맞춰 세계 최고 수준의 정확도를 가진 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase를 독자적으로 개발하여 판매하고 있다. PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase는 매우 강력한 3'→5' exonuclease 활성, DNA 증폭에서 proofreading 기능, Taq DNA Polymerase에 비해 매우 뛰어난 증폭 효율을 갖고 있다. 본 고에서는 효소의 실제 반응 예를 통하여 성능과 반응 조건을 설정하는 방법에 관하여 소개하고자 한다.

특징

- (1) PCR에서 최고 수준의 정확성을 제공한다.
- (2) Taq DNA Polymerase보다 효율 높은 증폭이 가능하다.
- (3) GC rich sequence에도 고효율로 정확한 증폭이 가능하다.
- (4) Priming 효율이 높아 annealing 시간을 짧게 설정하여 특이성이 높은 증폭이 가능하다.
- (5) 항체를 첨가한 Hot Start PCR용 효소이다.

내용(200회 반응분)

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase(2,5 U/ μ l)	100 μ l
5× PrimeSTAR™ Buffer (Mg ²⁺ plus)*(5×)	1 ml×2
dNTP Mixture(2,5 mM each)	800 μ l

* Mg²⁺ 농도: 5 mM(5×)

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase와 각 회사 PCR 효소와의 증폭효율 비교

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase는 효소의 성능과 반응 buffer를 최적화하여 다양한 template에서 고도의 증폭이 가능하다.

(1) Human DCLRE1A 유전자 2 kbp PCR 증폭

Human DCLRE1A 유전자 2 kbp를 증폭하기 위하여 *rTaq* 및 타사 High-Fidelity 효소, PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase의 반응성을 비교하였다(그림 1).

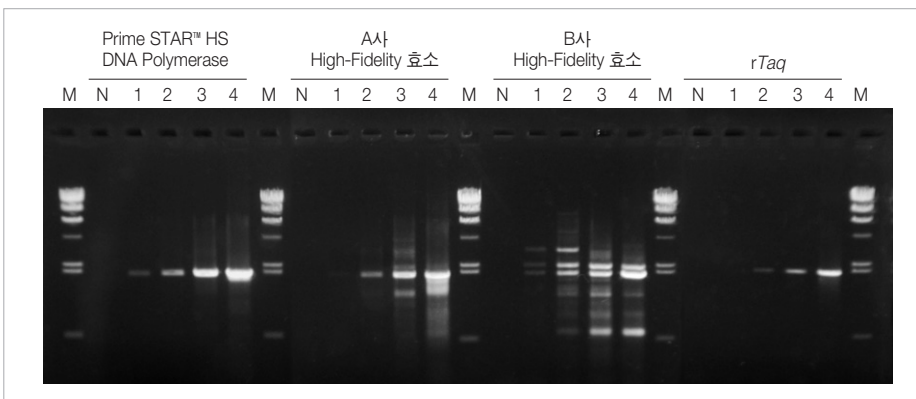


그림 1 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase와 각종 PCR 효소와의 증폭 효율 비교

반응액 조성 및 PCR 조건은 각 효소의 표준 프로토콜에 따랐다.

(50 μ l 반응, 30 cycles : TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient 사용)

Lane M : λ -Hind III digest

N : No template

1 : Human genome DNA 100 pg

2 : Human genome DNA 1 ng

3 : Human genome DNA 10 ng

4 : Human genome DNA 100 ng

각 3 μ l씩 전기영동

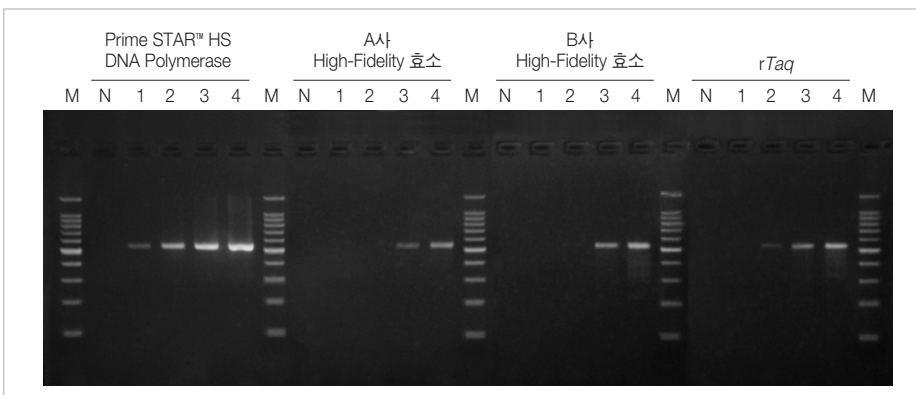


그림 2 GC rich한 영역에서의 반응성 비교

반응액 조성 및 PCR 조건은 각 효소의 표준 프로토콜에 따랐다.

(50 μ l 반응, 30 cycle : TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient를 사용)

Lane M: 100 bp DNA ladder

N: No template

1: Template DNA 10 pg

2: Template DNA 100 pg

3: Template DNA 1 ng

4: Template DNA 10 ng

각 3 μ l씩 전기영동

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase는 양호한 반응성을 나타내고 *rTaq* 및 타사 High-Fidelity 효소보다도 특이성이 높아 10배 높은 검출 감도를 나타내었다.

(2) GC 함량이 높은 영역을 목적으로 한 PCR 증폭

Thermus thermophilus HB 8 genomic DNA를 template으로 GC rich 영역(증폭 사이즈 537 bp, GC 함량 약 70%)을 목적으로 *rTaq* 및 타사 High-Fidelity 효소와 반응성을 비교하였다(그림 2).

GC rich 영역에서도 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase는 좋은 반응성을 나타내며, *rTaq* 및 타사 High-Fidelity 효소보다 더 높은 검출감도를 나타내었다.

또한 이 증폭에서 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase의 에러율은 0.0056%이며 높은 정확성을 유지하고 있었다.

(3) 긴 단편 DNA의 PCR 증폭

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase는 Fidelity나 증폭효율이 높을 뿐 아니라 긴 단편 DNA의 증폭에도 적합하다. 여기서는 Human genome 및 대장균 genome을 template으로 각종 다양한 크기의 증폭 예를 나타내고 있다(그림 3, 4).

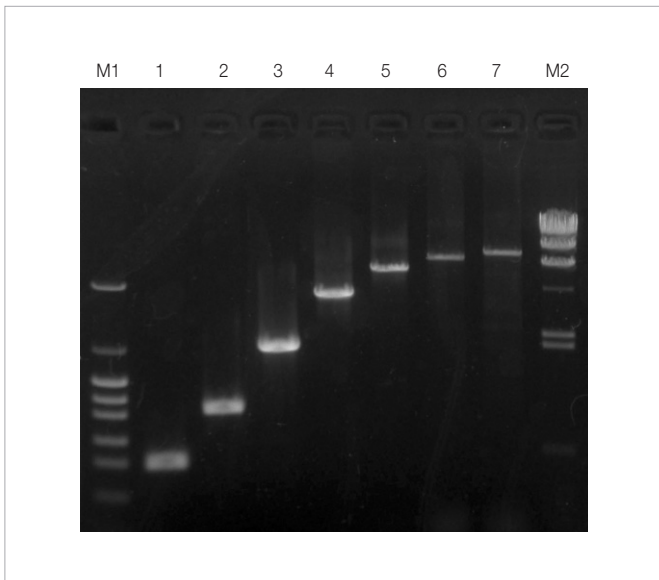


그림 3 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase를 사용한 Human genome DNA의 증폭
Template : Human Genomic DNA 50 mg/50 µl 반응

PCR조건 : 0.5~6 kbp인 경우
 98℃ 10초
 60℃ 5초
 72℃ 1분/kb } 30 cycle

7.5~8.5 kbp인 경우
 98℃ 10초
 68℃ 8분 } 30 cycle

Lane M1: pHYMarker 3: 2 kbp 6: 7.5 kbp
 1: 0.5 kbp 4: 4 kbp 7: 8.5 kbp
 2: 0.5 kbp 5: 6 kbp M2: λHind III digest

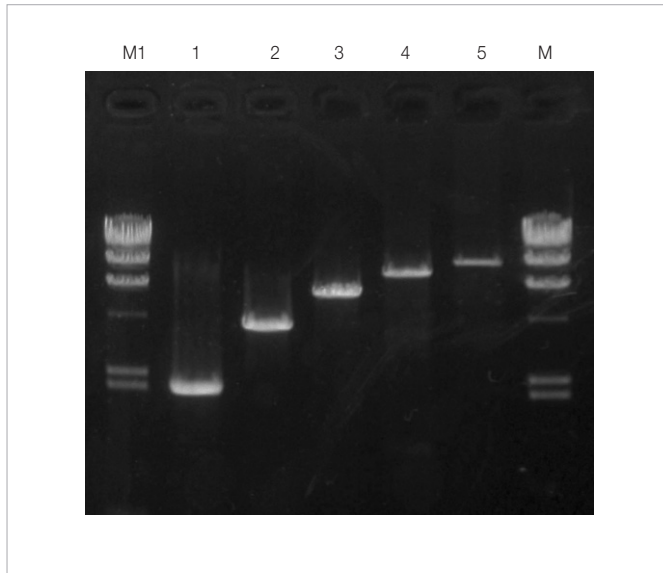


그림 4 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase를 사용한 대장균 genome DNA의 증폭
Template : E. coli genomic DNA 100 pg/50 µl 반응

PCR 조건: 98℃ 10초
 60℃ 5초
 72℃ 1분/kb } 30 cycle
 (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice 사용)
 Lane M1: λ-Hind III digest 3: 6 kbp
 1: 2 kbp 4: 8 kbp
 2: 4 kbp 5: 10 kbp

적어도 Human genome에서 8.5 kbp, 대장균 genome에서는 10 kbp까지 증폭되었으며, 고차 구조를 취하기 쉬운 genome을 template으로 한 경우에도 고효율로 긴 단편의 증폭이 가능하다.

반응조건을 설정하는 방법

[일반적인 PCR 반응액 조성(Total 50 µl)]

	사용량	최종농도
5× PrimeSTAR™ Buffer(Mg ²⁺ plus)	10 µl	1×
dNTP Mixture(2.5 mM)	4 µl	200 µM each
primer1	10~15 pmol	0.2~0.3 µM
primer2	10~15 pmol	0.2~0.3 µM
Template	<200 ng	
PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase(2.5 U/µl)	0.5 µl	1.25U/50µl
ddH ₂ O	up to 50 µl	

PCR 반응액의 조제는 실온에서도 가능하다. 단, 효소 등의 시약은 얼음 위에 두고 사용하기 바란다. 최적 template DNA양은 다음과 같다(50 µl 반응의 경우).

- Human genomic DNA의 경우 5~200 ng (<200 ng)
- E. coli genomic DNA의 경우 100 pg~100 ng
- λDNA의 경우 10 pg~10 ng
- Plasmid DNA의 경우 10 pg~1 ng

필요 이상의 template DNA를 사용하는 것은 오히려 반응성이 저하하는 경우가 있으니, 주의하기 바란다.

[PCR 조건]

- 3 step PCR의 경우
 - 98℃ 10초
 - 55℃ 5초 혹은 15초
 - 72℃ 1분/kb
 30 cycle
- 2 step PCR의 경우
 - 98℃ 10초
 - 68℃ 1분/kb
 30 cycle

Prime STAR™ HS DNA Polymerase를 사용할 경우 기본적으로 3 step PCR을 권장한다.

- denaturation조건
 - 98℃, 5~10초를 추천한다. 94℃에서 하는 경우는 10~15초로 설정하기 바란다.
- annealing 온도
 - 우선 55℃로 시험하기 바란다.
- annealing 시간
 - Tm값(아래 식*으로 계산)이 55℃ 이상인 경우
 - 5초로 설정
 - Tm 값(아래 식*으로 계산)이 55℃ 미만인 경우
 - 15초로 설정

* : $Tm \text{ 값}(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{NA} + \text{NT}) + 4(\text{NC} + \text{NG}) - 5$

Primer의 길이가 25 mer 이하인 경우에 적용하고, 25 mer를 넘는 경우에는 annealing 시간을 5초로 설정하기 바란다.

3 step에서 smear한 band가 나오거나, Tm 값이 70℃ 이상인 primer를 사용하는 경우에는 2 step에서의 시험하기 바란다.

[반응 예 : 동일한 PCR 조건에서 증폭]

Human genome을 template로 여러 가지 길이의 목적 유전자를 동일 PCR 조건에서 증폭하였다.

Template : Human genomic DNA 100 ng/50 μl 반응

PCR 조건 : 98℃ 10초
68℃ 8분 30 cycle

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient 사용)

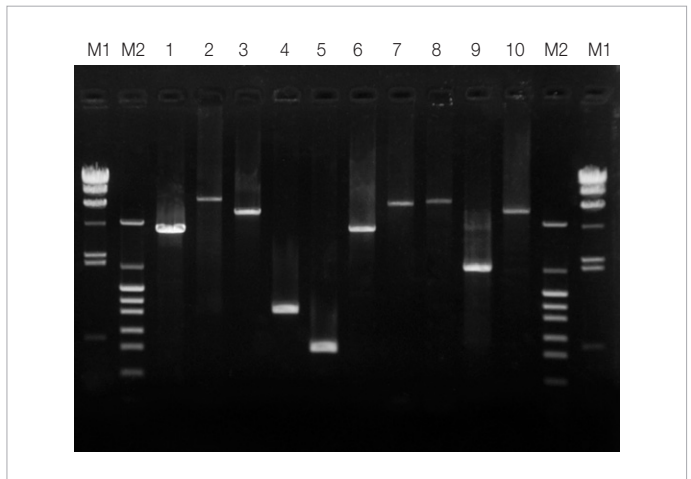


그림 5 동일 PCR 조건 하에서의 여러 가지 사이즈의 증폭

동일 PCR 조건에서 0.5 kbp에서 8.5 kbp까지의 다양한 길이의 목적 유전자 증폭이 가능하다. 본 효소는 높은 Fidelity도 겸비하고 있으며 library로부터의 클로닝에 최적이다.

이상과 같이 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase는 지금까지의 High-Fidelity 효소와 비교하여 증폭 효율이 좋고 Fidelity도 매우 높아 사용하기 편리한 효소이다. 본 효소를 사용하여 기존에 PCR로 어려움이 있는 연구자에게 좋은 실험결과가 나왔으면 한다.

관련제품

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase를 사용하여 증폭한 PCR 산물은 평활말단이다. 따라서 PCR 산물을 그대로 혹은 필요에 따라 인산화 하여 평활말단 벡터에 클로닝 할 수 있다(T-vector 클로닝은 불가능하다).

평활말단 벡터에 클로닝 하는 경우, 별도로 판매하는 Mighty Cloning Kit(Blunt End)(TaKaRa Code 6027)의 사용을 권장한다.

본 kit는 PCR 산물을 정제하지 않고 말단 평활화와 인산화를 1 step으로 할 수 있다. 반응 후 Micropure™-EZ로 단백질을 제거하여 ligation에 사용한다. Ligation 시약으로 평활말단 ligation에 뛰어난 Ligation Mighty Mix를 사용하기 때문에 탈인산화 평활말단 벡터에의 간편하고 고효율로 클로닝이 가능하다.

PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase

High Fidelity ↑ High Amplification ↑

- 높은 정확도
- 높은 증폭효율
- Library에서 cloning에 최적
- 비특이적 증폭을 최소화한 Hot Start PCR
- 5초만에 Annealing

TAKARA