

높은 증폭효율을 겸비한 High-Fidelity PCR 효소 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase

PrimeSTAR[®] HS Polymerase는 Takara Bio에서 독자적으로 개발한 DNA polymerase로 매우 높은 정확성과 뛰어난 증폭효율을 가진다. 본 효소는 매우 강력한 3' → 5' exonuclease 활성을 가져, DNA 증폭에 있어서 뛰어난 교정능력 (proofreading)을 보이는 한편, Taq DNA Polymerase가 가진 탁월한 증폭효율도 겸비하고 있다. 본 고에서는 실제 적용예를 통하여 그 우수한 성능과 반응조건을 결정하는 방법에 대하여 소개하고자 한다.

■ 특징

- PCR에 있어서 최고 수준의 정확성을 제공한다.
- Taq DNA Polymerase의 높은 증폭효율을 나타낸다.
- GC-rich 서열에도 적용 가능하며, 높은 효율로 정확하게 증폭할 수 있다.
- Priming 효율이 높기 때문에 Annealing 시간을 짧게 설정할 수 있어 보다 특이성이 높은 증폭이 가능하다.
- 항체를 첨가한 Hot Start 용 PCR 효소이다.

■ 내용 (200 회 반응 분)

PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)	100 μ l
5 x PrimeSTAR [®] Buffer (Mg ²⁺ plus) [*] (5 x)	1 ml x 2
dNTP Mixture (2.5 mM each)	800 μ l

* Mg²⁺ 농도는 5 mM (5 x) 이다.

■ PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase와 각종 PCR 효소의 정확성 비교

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase와 3 종류의 PCR 효소를 이용하여 GC-rich한 *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA를 주형으로 하여 임의적으로 선택한 8 영역 (증폭 길이는 각각 약 500 bp)를 PCR 증폭하였다. 증폭산물을 각각 벡터에 클로닝하고 각 서열에 대해 여러 개의 클론의 염기서열을 확인하여 에러율을 산출하였다 (그림 1). PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase는 실제 해석한 약 25 만 염기 중에서 에러가 12 염기에 불과하였으며, rTaq에 비하여 10 배 높은 정확도 (fidelity)를 보였고, 정확도가 매우 높은 효소로 알려져 있는 *Thermococcus kodakaraensis* 유래의 DNA Polymerase, *Pyrococcus* 속 유래의 DNA Polymerase를 능가하는 높은 정확성을 보였다. 실제 기존의 정확도 측정 방법인 Kunkel & Cline 방법으로 계산하면 rTaq 보다 10 배 높은 fidelity로 나타나지 않는다. 하지만, 상기의 방법은 실제 염기서열을 해석하여 구한 값으로 실제 PCR에 가장 적합하게 정확도를 계산할 수 있는 가장 효율적인 방법이므로 고도의 정확도가 요구되는 실험에 사용하면 더 좋은 결과를 얻을 수 있다.

■ Annealing 시간에 따른 특이성 비교

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase에는 상온에서는 DNA Polymerase 활성 및 3' → 5' exonuclease 활성을 제어하는 단일항체 (monoclonal antibody)가 첨가되어 있기 때문에 Hot Start PCR을 통해 PCR 반응전의 mispriming과 primer dimer 형성이 억제되어, 반응의 특이성이 저하되는 것을 막을 수 있다. 또한, 본 효소는 특이적으로 높은 priming 효율을 가지고 있어 annealing 시간을 짧게 (5 초 또는 15 초) 설정하는 것으로 특이성 높은 증폭을 실현한 동시에 반응시간을 단축할 수 있다. 하나의 예로써 Human p53 유전자 0.5 kb 및 4 kb를 annealing 시간을 달리하여 PCR로 증폭한 결과를 그림 2에 나타내었다.

상세한 PCR 조건설정 에 대하여는 [PCR 반응조건 검토]를 참고한다.

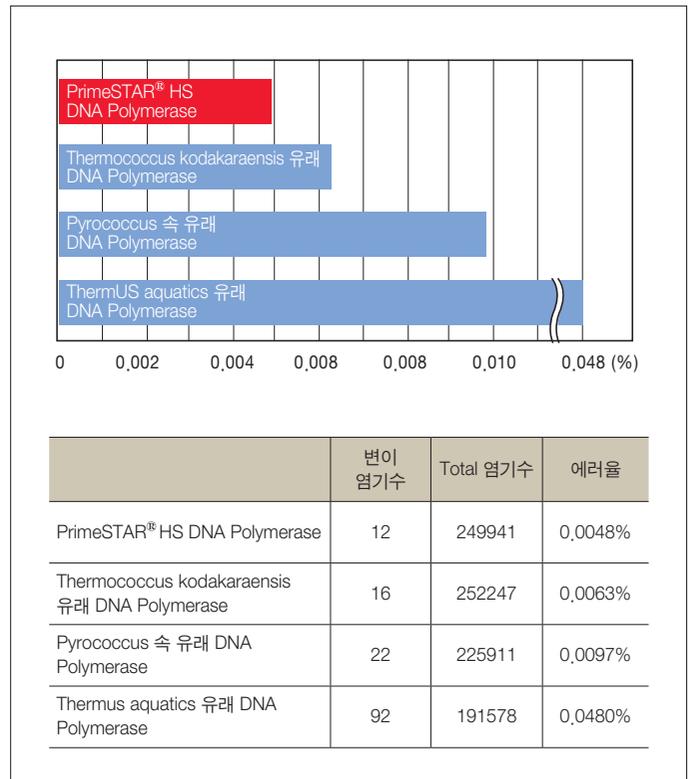


그림 1. PCR 증폭에 따른 에러율 비교
반응액 조성 및 PCR 조건은 각 효소의 추천 프로토콜에 따름 (50 μ l 반응액; 30 cycle).

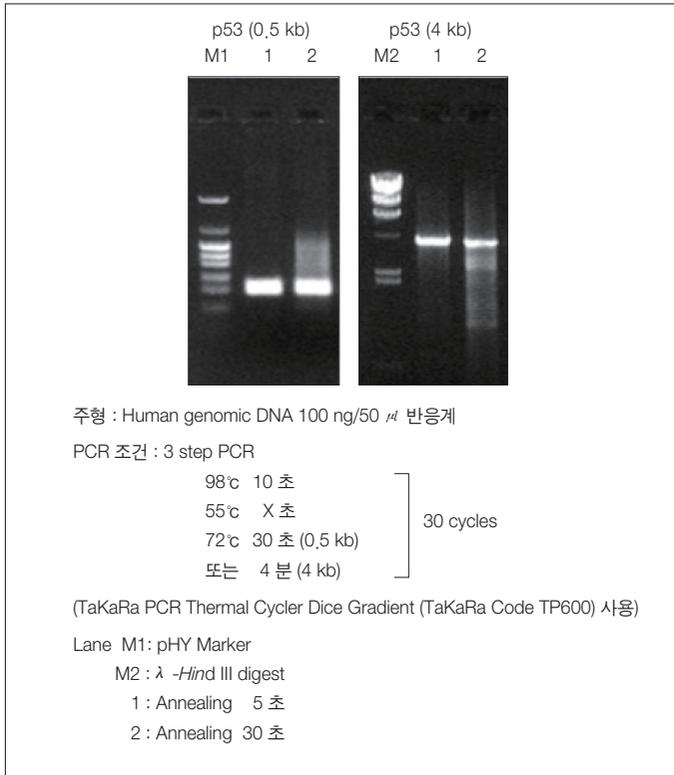


그림 2. Annealing 시간에 따른 특이성 비교

■ PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase와 제조사별 PCR 효소의 증폭 효율 비교

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase에서는 효소 자체가 가지고 있는 성능에 반응 버퍼를 고도로 최적화시켜서 폭넓은 주형을 대상으로 고감도의 PCR 증폭이 가능하다.

(1) Human DCLRE1A 유전자 2 kb를 대상으로 PCR 증폭

Human DCLRE1A 유전자 2 kb를 대상으로 하여 rTaq 및 타사의 High-Fidelity 효소와 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase의 반응성을 비교하였다 (그림 3).

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase는 양호한 반응성을 나타내며 rTaq 및 타사의 High-Fidelity 효소보다도 높은 특이성을 보였으며, 10 배 이상 높은 검출감도를 얻을 수 있었다.

(2) GC 함량이 높은 영역을 대상으로 한 PCR 증폭

Thermus thermophilus HB8 genomic DNA를 주형으로 이용해 GC-rich 영역 (증폭 길이 537 bp, GC 함량 약 70%)를 대상으로 rTaq 및 타사의 High-Fidelity 효소와 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase의 반응성을 비교하였다 (그림 4).

GC-rich 영역에서도 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase는 양호한 반응성을 보였으며, rTaq 및 타사의 High-Fidelity 효소보다도 높은 검출감도를 얻을 수 있었다.

또한, 이번 PCR 증폭에 있어서 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase의 에러율은 0.0056%로 높은 정확성을 유지하고 있었다.

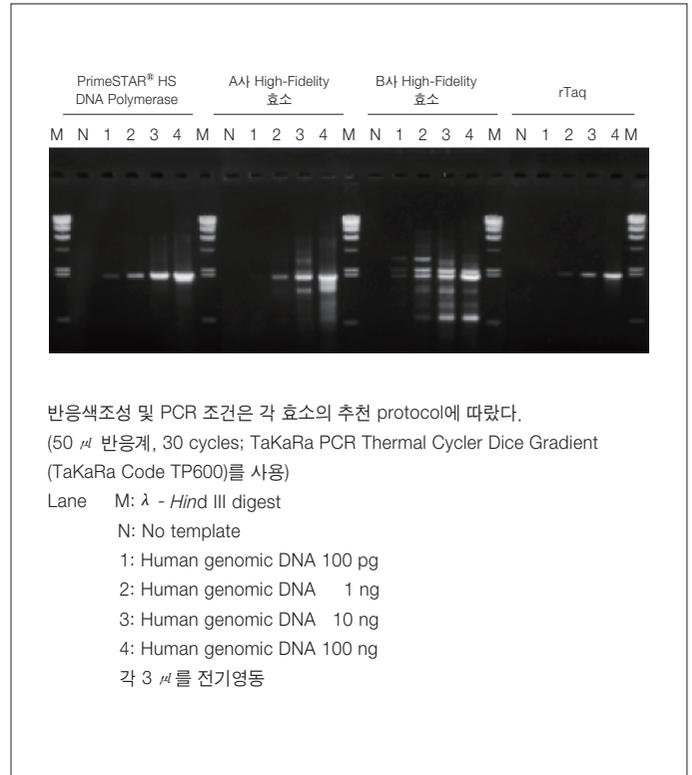


그림 3. PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase와 각 종 PCR 효소의 증폭효율 비교

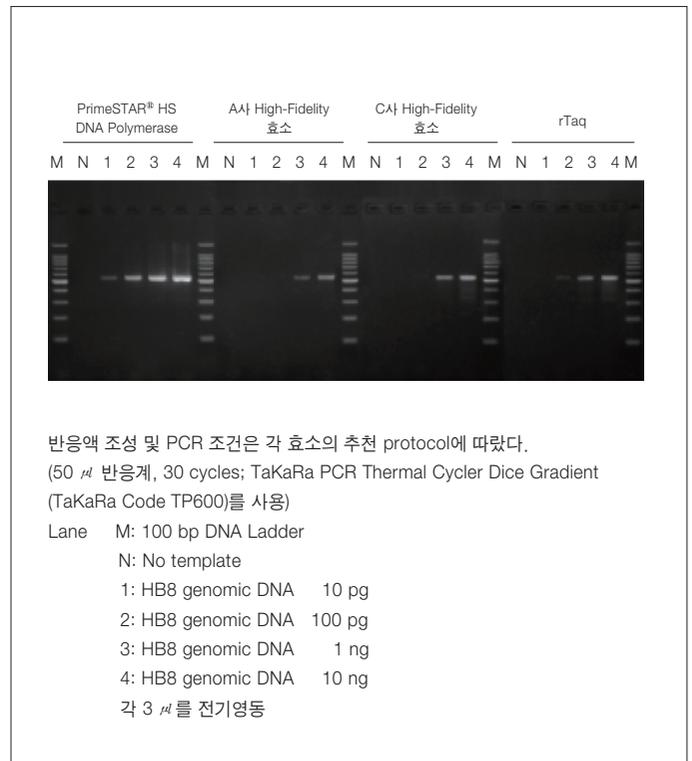


그림 4. GC-rich 영역에서의 반응성 비교

(3) 긴 단편 DNA의 PCR 증폭

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase는 정확도 및 증폭효율이 높을 뿐만 아니라 긴 단편 DNA의 증폭에도 적합하다. 여기서는 Human genome 및 대장균 genome을 주형으로 다양한 길이의 단편 증폭을 수행한 예를 제시하였다 (그림 5, 6).

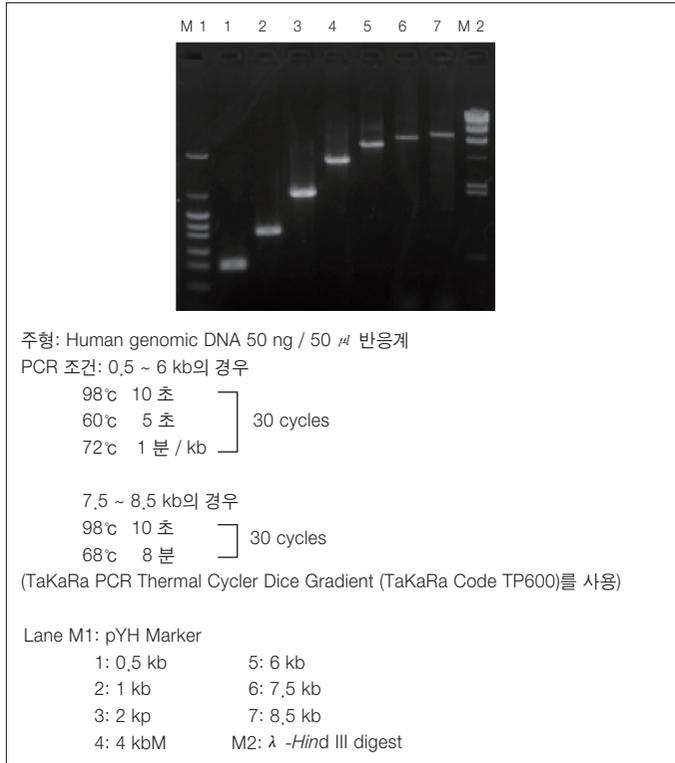


그림 5. PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase를 이용한 Human genomic DNA의 증폭

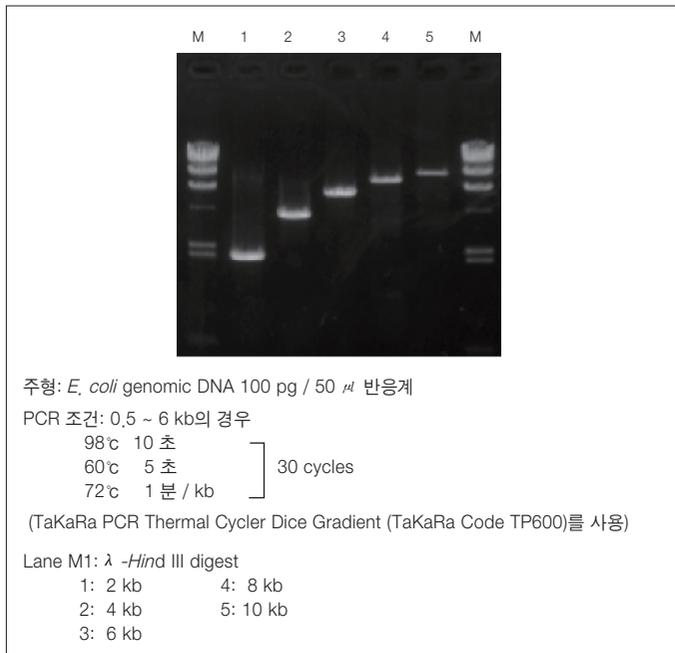


그림 6. PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase를 이용한 대장균 genomic DNA의 증폭

적어도 Human genomic DNA에서 8.5 kb, 대장균 genomic DNA에서는 10 kb의 증폭결과가 양호하여, 고차구조를 형성하기 쉬운 genomic DNA를 주형으로 한 경우에서도 긴 단편의 증폭이 효율적으로 수행된다는 것을 알 수 있었다.

■ PCR 반응조건 검토

[일반적인 PCR 반응액 조성 (Total 50 μ l)]

	사용량	최종농도
5 x PrimeSTAR [®] Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μ l	1 x
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 μ l	200 μ M each
Primer 1	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μ M
Primer 2	10 ~ 15 pmol	0.2 ~ 0.3 μ M
Template	< 200 ng	
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase (2.5 U / μ l)	0.5 μ l	1.25 U / 50 μ l
D,W	Up to 50 μ l	

PCR 반응액 조제는 실온에서도 가능하다. 다만, 효소 등 각 시약은 얼음 위에 두고 사용한다.

최적 주형 DNA 량은 다음과 같다 (50 μ l 반응계의 경우).

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

반응성이 저하되는 경우가 있으므로 필요 이상으로 주형 DNA량을 사용하는 것은 피한다.

[PCR 조건]

- 3 step PCR의 경우
 98 $^{\circ}$ C 10 초
 55 $^{\circ}$ C 5 초 또는 15 초
 72 $^{\circ}$ C 1 분 / kb } 30 cycles
- 2 step PCR의 경우
 98 $^{\circ}$ C 10 초
 68 $^{\circ}$ C 1 분 / kb } 30 cycles

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase를 이용한 증폭에서는 기본적으로 3 step PCR을 권장한다.

- 변성조건
 98 $^{\circ}$ C, 5~10 초를 추천하고, 94 $^{\circ}$ C 인 경우 10~15 초로 설정한다.
- Annealing 조건
 우선 55 $^{\circ}$ C로 기본조건으로 샘플에 맞는 조건을 검토한다.

- Annealing 시간
 Tm 값^{*}이 55 $^{\circ}$ C 이상의 경우 → 5 초로 설정
 Tm 값^{*}이 55 $^{\circ}$ C 미만의 경우 → 15 초로 설정
- * Tm 값 ($^{\circ}$ C) = 2 (NA + NT) + 4 (NC + NG) - 5

Annealing 시간은 primer의 길이가 25 mer 이하의 경우에 15 초를 적용하고, 25 mer를 초과하는 경우에는 5 초로 설정한다.

3 step에서 smear로 나타나는 경우 또는 Tm값이 70°C 이상의 primer를 사용하는 경우에는 2 step으로 반응 조건을 검토한다.

[적용예 : 동일 PCR 조건에서의 증폭]

Human genome을 주형으로 다양한 길이의 목적 유전자를 동일 PCR 조건으로 증폭하였다.

Template: Human genomic DNA 100 ng / 50 µl 반응계

PCR 조건: 98°C 10 초 } 30 cycles
68°C 8 분 }

(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa Code TP600)를 사용)

증폭결과 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase는 동일 PCR 조건에서도 0.5 kb부터 8.5 kb까지 다양한 크기의 목적 단편을 증폭하는 것이 가능하며, fidelity 또한 높은 특성을 가지고 있어 library로부터의 클로닝 등에 최적이다.

이와 같이 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase는 지금까지의 High-Fidelity 효소에 비하여 증폭효율이 좋고, 정확도도 높아 사용이 매우 편리한 효소이다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase	250 U/1,000 U	R010A/B
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase with GC buffer	250 U/1,000 U	R044A/B
PrimeSTAR [®] HS (Premix)	100 회 (50 µl PCR 반응 시)	R040A
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR [®]	20 회	6019
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice [®] Gradient	1 대	TP600
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice [®] Standard	1 대	TP650
λ -Hind III digest	100 µg	3403
pHY Marker	20 µg / 100 µg	3404A/B

*License Notice : [4], [5]

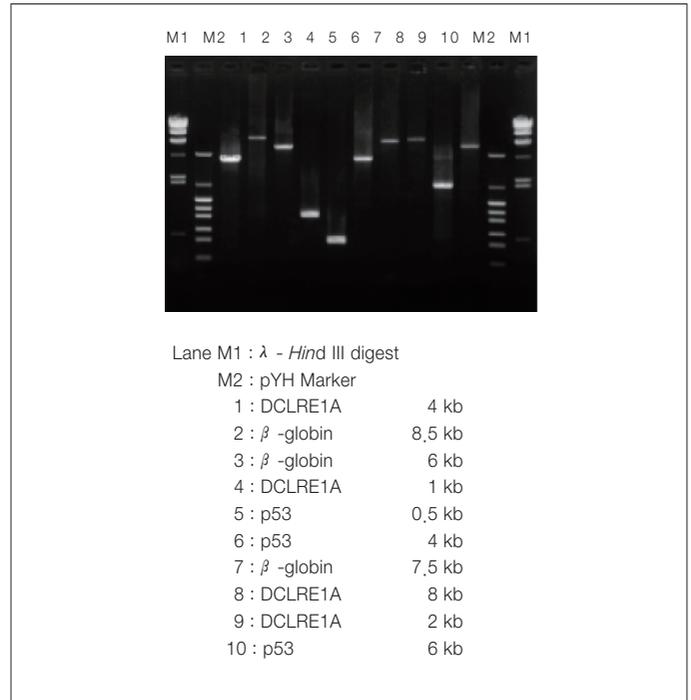


그림 7. 동일 PCR 조건 하에서 여러 가지 길이의 단편 증폭

초간단 A-tailing과 고효율의 2 x ligation mix가 만났다!!

Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR[®]

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymserase (TaKaRa Code R010A) 등의 α 형 DNA polymerase (Pyrobest, Pfu, Vent 등 포함)에 의해 증폭된 PCR 산물의 대부분은 효소가 가지는 강력한 3' → 5' exonuclease 활성에 의해 PCR 산물 양 말단이 평활화 되어 그대로 TA-cloning에 사용할 수 없다. 따라서 PrimeSTAR 시리즈에 의해 증폭된 PCR 산물을 TA-cloning에 이용하는 경우, 3' 말단에 dA를 추가할 필요가 있다. 이때 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR[®] (TaKaRa Code 6019)의 사용을 추천한다. 본 제품에는 PrimeSTAR[®] 시리즈에 의해 증폭된 산물의 3' 말단에 간편하게 dA를 추가하기 위한 A-overhang mixture 및 Mighty TA-cloning Kit가 포함되어 있어 PrimeSTAR[®] 시리즈 (Pfu 계열의 PCR 효소 포함)에 의한 증폭 산물 전용의 TA-cloning 시약으로 사용할 수 있다.

[제품의 구성]

A, A-overhang mixture		B, Mighty TA-cloning Kit ¹	
A-overhang enzyme	10 µl	pMD20-T vector (50 ng/µl)	20 µl
10× Buffer	20 µl	Ligation Mighty Mix ²	50 µl × 2
dATP	10 µl	Positive Control Insert ³	10 µl

¹ Mighty TA-cloning Kit 별도구매 시 TaKaRa Code 6028

² Ligation Mighty Mix 별도구매 시 TaKaRa Code 6023

³ 3' 말단에 dA overhang을 가지는 약 200 bp의 DNA fragment

(E. coli genome을 주형으로 TaKaRa Ex Taq[®] (TaKaRa Code RR001A)으로 증폭함) (10 ng/µl)

TaKaRa PCR 효소~ 똑똑하게 선택하자!

■ TaKaRa PCR 효소의 특징

<i>TaKaRa Ex Taq[®]</i> <i>TaKaRa Ex Taq[®] HS</i>	검출 감도, 증폭 효율이 매우 뛰어난 효소 <ul style="list-style-type: none"> • TaKaRa의 효소 중에서 가장 범용성의 높고 사용하기 편리한 효소이다. • Genome DNA, cDNA library, 역전사 산물, plasmid DNA 등 다양한 주형 또는 소량의 주형으로도 높은 효율로 증폭할 수 있다. 최적 반응 조건의 검토도 매우 간단하다. • Human genome DNA를 주형으로 ~20 kb 정도의 증폭이 가능하다.
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase	정확성을 중시하는 증폭에 최적인 효소 <ul style="list-style-type: none"> • 최고의 fidelity용 DNA polymerase로 증폭 효율이나 검출 감도가 매우 높다. • 효소인 TaKaRa Taq에 비해 우수하다. GC-rich인 주형의 증폭에도 적합하고 중요한 타겟의 cloning부터 일반적인 PCR 반응까지 폭넓게 이용할 수 있다. • Human genome DNA를 주형으로 ~ 8.5 kb 정도의 증폭이 가능하다.
<i>TaKaRa LA Taq[®]</i> <i>TaKaRa LA Taq[®] HS</i>	긴 단편 증폭에 최고의 효율을 나타내는 효소 <ul style="list-style-type: none"> • λ DNA를 주형으로 40 kb이상, Human genome을 주형으로 30 kb 정도까지 증폭이 가능하다. 긴 단편의 증폭에는 통상 shuttle PCR (2 step PCR)를 추천한다. • GC-rich, repeat 서열, 복잡한 2차 구조를 가지는 목적 서열에는 <i>TaKaRa LA Taq</i> with GC buffer가 효과적이다.
SpeedSTAR [®] HS DNA Polymerase	고속 PCR용으로 최적화된 효소 <ul style="list-style-type: none"> • 통상 「10 초/kb」의 extension 시간으로 증폭이 가능하기 때문에, 2 kb 증폭이 45 분 이내에 완료 가능하다 (TaKaRa Ex Taq에 비해 1/2 배). • 2 종류의 buffer를 첨부하고 있기 때문에 증폭 사이즈에 맞추어 선택 가능하다.
<i>TaKaRa Ex Taq[®]</i> <i>TaKaRa Ex Taq[®] HS</i>	가장 기본적인 효소 <ul style="list-style-type: none"> • λ DNA를 주형으로서 ~12 kb 정도, Human genome DNA를 주형으로서 ~3 kb 정도의 증폭이 가능하다. • 3' → 5' Exonuclease 활성을 가지지 않기 때문에 biotin 표지 dUTP나 DIG-dUTP를 이용한 증폭 등에 이용할 수 있다.

[PCR 효소의 사용기준]

1. 일반적인 PCR 효소

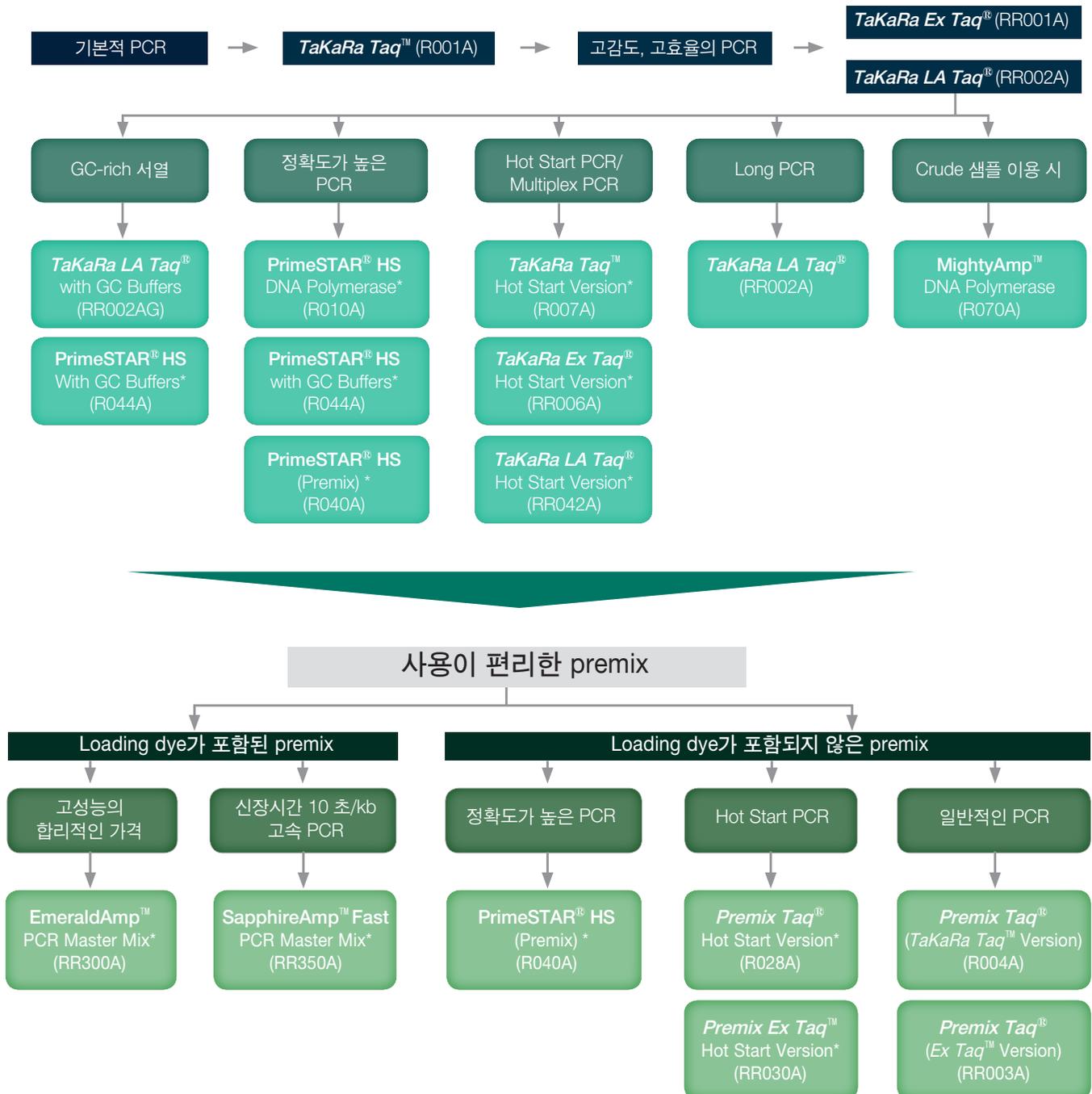
★ 5가 최고점

	증폭 효율	정확성	신장성	GC rich 서열 증폭	PCR 산물 말단형상	증폭 길이의 기준	
						λ DNA	Human genomic DNA
반응성이 중요한 PCR에 최적							
<i>TaKaRa Ex Taq[®]</i> <i>TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version</i>	★★★★★	★★	★★★★	★★	A염기 부가	~ 30 kb	~ 20 kb
<i>TaKaRa LA Taq[®]</i> <i>TaKaRa LA Taq[®] Hot Start Version</i>	★★★★★	★★	★★★★★	★★★★★		~ 40 kb	~ 30 kb
<i>TaKaRa LA Taq[®] with GC Buffer</i>	★★★	★★	★★★★★	★★★★★		-	-
<i>TaKaRa Taq[™]</i> <i>TaKaRa Taq[™] Hot Start Version</i>	★★	★	★★	★★		~ 12 kb	~ 3 kb
Cloning 등 정확성을 필요로 하는 PCR에 최적							
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase	★★★	★★★★★	★★★★	★★★	평활말단	~ 28 kb	~ 8.5 kb

2. 특화된 PCR 효소

	증폭효율	신장성	GC rich 서열 증폭	고속 PCR	Dye가 포함된premix	PCR 산물 말단 형상	증폭 길이의 기준
MightyAmp [®] DNA Polymerase	★★★★★	★★	★★★★★	★★	-	A염기 부가	2 kb 까지 최고의 반응성 human genomic DNA ~ 4 kb 증폭 확인
EmeraldAmp [®] PCR Master Mix	★★★★★	★★★★	★★★★★	★★	○		10 kb 까지 Colony PCR 확인~10 kb human genome
SapphireAmp [®] Fast PCR Master Mix	★★★	★★	★★	★★★★★	○		6 kb 까지 Colony PCR 확인 ~ 6 kb human genomic DNA 증폭 확인

TaKaRa PCR 효소 선택하기



*Hot Start 용 효소