

High Fidelity PCR 효소

PrimeSTAR 시리즈의 다양한 적용성

Takara는 연구자의 다양한 요구에 대응할 수 있는 각종 PCR 효소들을 지속적으로 개발하고 있다. 그 중에서도 PrimeSTAR 시리즈는 높은 정확성과 뛰어난 증폭 효율을 가지고 있어 사용하기 쉬운 high fidelity PCR 효소로 많이 알려져 있다. 본 고에서는 반복서열이 많은 부분을 증폭하거나 긴 단편의 특정 부위에 특이적인 변이를 도입하는 것과 같은 다양한 PrimeSTAR 시리즈의 적용성을 설명하고자 한다.

실험에 1 : GC rich target 증폭시 정확성 비교

Takara에서는 PCR 효소의 정확성을 검증하기 위해서, 복수의 증폭 산물을 시퀀싱하여 에러율을 비교하는 실제에 가장 가까운 확인 방법을 채택하고 있다. 증폭 타겟 서열은 변이가 되기 쉬운 GC rich 영역으로 선택하였다. 그림 1은 정확성 비교 자료이다.

방법

GC rich 서열로 에러가 나타나기 쉬운 *Thermus thermophilus* HB8 게놈 DNA를 주형으로 임의로 선택한 10개 영역(증폭사이즈는 약 500 bp)을 다양한 PCR 효소로 증폭하였다(반응액 조성 및 PCR 조건은 각 효소의 추천 프로토콜을 사용). 증폭 산물을 vector에 클로닝하여, 각 서열에 대해 여러 개의 클론을 선택하여 시퀀싱 분석을 통해 염기 서열을 확인하였다. 해석한 총 염기수에 대한 에러 염기수로 mutation frequency를 구했다.

결과

PrimeSTAR 시리즈 효소들로 증폭한 PCR 산물 약 50만 염기를 시퀀싱한 결과, 에러가 10~30 염기에 불과하였다. 이는 대표적인 high fidelity PCR 효소인 *Pfu* DNA polymerase 보다 정확성이 높은 결과였다(그림 1).

실험에 2 : 반복 서열 (repeated sequence) 정확성 비교

방법1

-(GA)₈- 혹은 -(CA)₈- 의 반복서열을 포함한 500 bp 단편(λ DNA 유래 서열에 반복서열을 삽입)을 다양한 PCR 효소로 각 효소의 추천 프로토콜에 따라서 증폭하였다. 증폭산물을 vector에 클로닝하고 각 서열마다 여러 개의 클론을 선택해 시퀀싱하여 염기서열을 확인하였다. 반복서열에 생긴 결손deletion, 삽입insertion 등을 판단하여 에러율을 구하였다.

방법2

-T₂₆- 의 반복서열을 포함한 555 bp (인간 게놈 유래 서열을 플라스미드에 클로닝) 단편을 이용하여 방법 1과 같이 다양한 PCR 효소로 증폭하여 클로닝한 후 복수 클론을 시퀀싱으로 분석하여 'T'의 수를 카운팅하였다.

결과

반복서열의 복제에러는 효소의 주형 인식시에 나타나는 슬리핑slipping에 의한 것이므로, 교정활성proofreading activity (3'→5' exonuclease 활성)으로는 고칠 수 없다. 따라서 교정활성이 있고 높은 정확성을 갖고 있는 α 형 DNA polymerase라도 반복서열의 증폭시에는 교정활성이 없는 *Taq* DNA polymerase와 비교하여 정확성이 우수하다고는 할 수 없다.

이 결과를 보면 독자적인 신장인자를 포함시켜 효소의 진행성 processivity를 크게 향상시킨 PrimeSTAR Max와 PrimeSTAR GXL이 반복서열의 증폭에 정확성이 뛰어난 것을 알 수 있다(표 1, 그림 2).

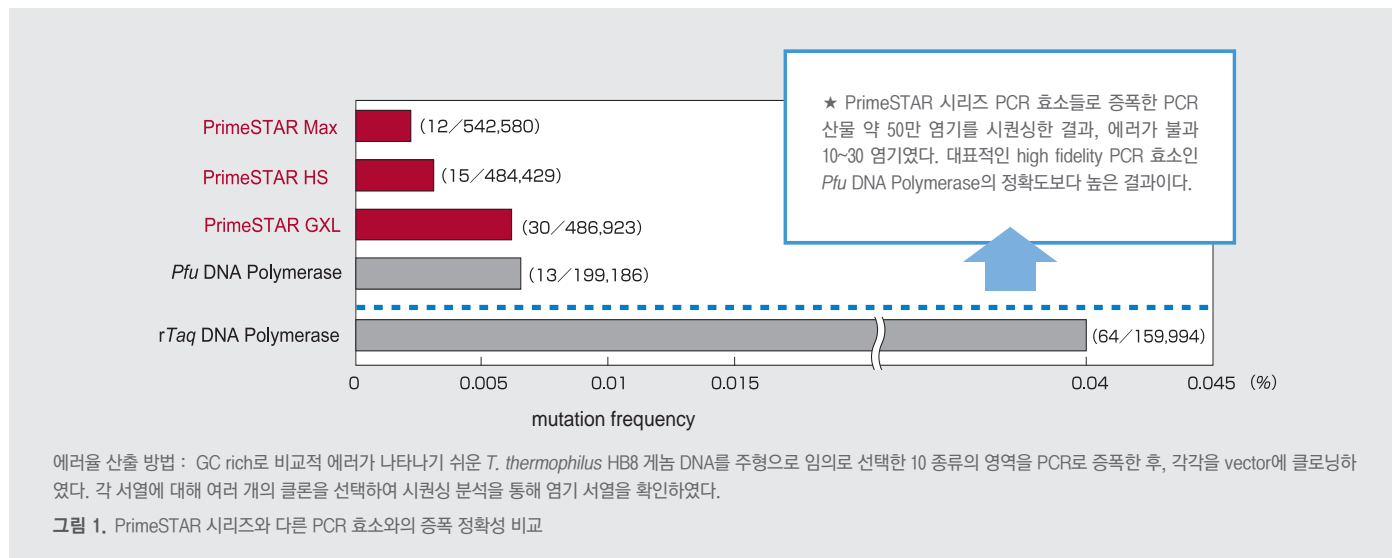
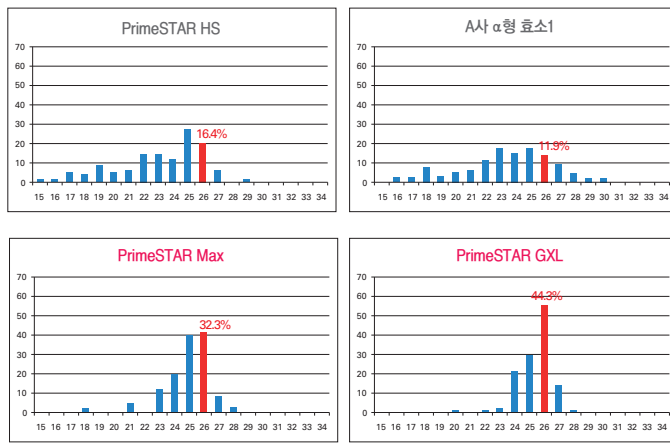


표 1. 각종 PCR 효소의 반복서열[-(GA)₈-, -(CA)₈-]에 대한 정확성

	전체 클론수	(GA) ₈ 반복서열의 결손, 삽입			변이 클론수	변이 클론비율
		(GA) 2개 결손	(GA) 1개 결손	(GA) 1개 삽입		
Taq	261	3	21	2	26	10.00 %
PrimeSTAR HS	250	5	25	2	32	12.80 %
PrimeSTAR Max	201	0	5	0	5	2.49 %
PrimeSTAR GXL	167	0	4	0	4	2.40 %
A사 α형 효소1	131	2	15	1	18	13.74 %
A사 α형 효소2	172	2	15	9	26	15.12 %

	전체 클론수	(CA) ₈ 반복서열의 결손, 삽입			변이 클론수	변이 클론비율
		(CA) 2개 결손	(CA) 1개 결손	(CA) 1개 삽입		
Taq	269	0	12	2	14	5.20 %
PrimeSTAR HS	253	1	8	3	12	4.74 %
PrimeSTAR Max	212	0	3	1	4	1.89 %
PrimeSTAR GXL	167	0	3	0	3	1.80 %
A사 α형 효소1	131	0	8	1	9	6.87 %
A사 α형 효소2	179	1	7	10	18	10.06 %

(당사 비교 데이터)



(당사 비교 데이터)

Y축 : 클론수 X축 : T의 수, 숫자(빨간색)는 T₂₆ 클론 비율

그림 2. 각종 PCR 효소를 이용한 반복서열 [T₂₆] 증폭의 정확도

T₂₆ 반복서열을 포함한 555 bp (인간 게놈 유래 서열을 플라즈미드에 클로닝)를 다양한 PCR 효소로 증폭한 후 클로닝하여, 시퀀싱을 통해 각 클론의 T의 개수를 카운트하였다. PrimeSTAR GXL과 PrimeSTAR Max를 사용한 결과에서 유의성 있는 T₂₆ 클론의 비율이 나타났다.

실험예 3 : PrimeSTAR GXL을 이용한 긴 단편으로 변이 도입

방법

인간 *Dystrophin* 유전자 13.5 kb를 pUC 118에 클로닝한 플라즈미드 10pg을 주형으로, *Dystrophin* 유전자의 215번째 프로린proline을 글루타민glutamine으로 변환하는 변이도입 프라이머와 PrimeSTAR GXL을 이용해 플라즈미드 전체(약 16.6 kb)를 증폭하는 PCR 반응을 하였다(50 μl 반응). 그 증폭산물 2 μl를 직접 *E. coli* JM109 competent cell 100 μl에 첨가해 일반적인 방법에 따라 형질전환하여, 1/10 양을 선택 플레이트(LB+Amp)에 플레이팅했다. 형성된 콜로니 15개 중, 임의로 4개를 선택

하여 플라즈미드를 추출하여, insert 13.5 kb 전체를 시퀀싱 분석으로 서열을 확인하였다.

결과

시퀀싱 분석 결과, 4개의 클론 모두 올바르게 변이가 도입되었음을 확인하였다. 그 중 2개 클론에서는 변이도입 사이트 이외의 변이는 전혀 없었고, 다른 2개의 클론도 각각 1개의 점돌연변이point mutation만 존재할 뿐이었다. PrimeSTAR GXL을 이용하면, 긴 단편을 PCR로 증폭할 때 증폭된 부위에 원치 않는 돌연변이가 발생없이 목적 부위에만 간단하고 효율적으로 변이를 도입할 수 있는 것이 증명되었다(그림 3).

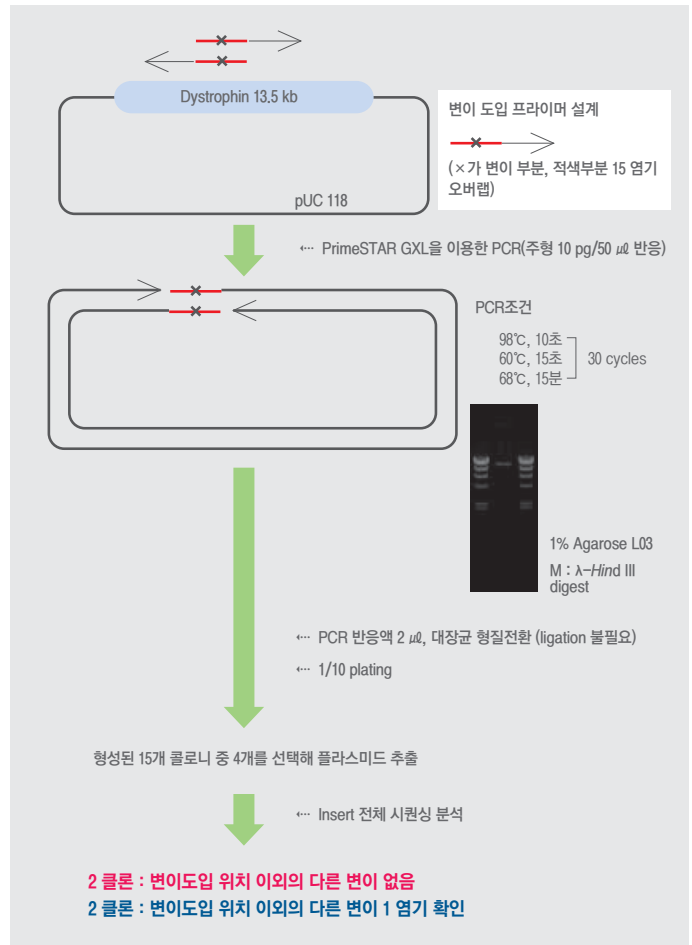


그림 3. PrimeSTAR GXL을 이용한 인간 *Dystrophin* 유전자(13.5 kb)로 변이도입

실험예 4 : GC rich 타겟 증폭시 각종 High Fidelity PCR 효소와의 반응성 비교

방법

인간 게놈 DNA 및 *T. thermophilus* HB8 게놈 DNA를 주형으로 증폭 영역의 GC 함량이 70% 전후의 4 종류 GC rich 타겟을 PrimeSTAR GXL과 타사 high fidelity PCR 효소를 이용하여 증폭하여, 각 효소의 반응성을 비교하였다. 반응액 조성고 PCR 조건은 각 효소의 추천 프로토콜에 따랐다.

결과

PrimeSTAR GXL은 타사 high fidelity PCR 효소보다 높은 반응 특이성

으로 효율적인 타겟 증폭이 가능하였다(그림 4). 비특이적인 증폭이 일어나기 쉬운 GC rich한 타겟에서도 PrimeSTAR GXL을 이용하면 특별한 버퍼나 반응 조건 최적화 등의 추가적인 조건 설정과정 없이, 특이성 높은 증폭이 가능하다.

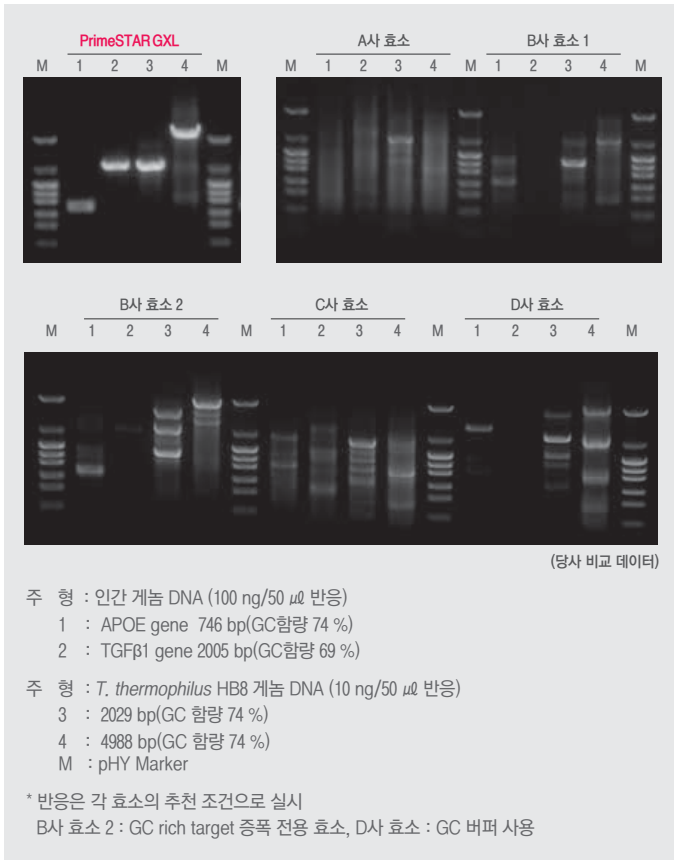


그림 4. GC rich 타겟에 대한 PrimeSTAR GXL과 타사 high fidelity PCR 효소와의 반응성 비교
 PrimeSTAR GXL은 여러 가지 GC rich 타겟을 가장 효율적으로 증폭하였다.

실험예 5 : PrimeSTAR GXL을 이용한 고속 PCR

PrimeSTAR GXL은 신장시간이 1분/kb를 표준 프로토콜로 가이드하고 있지만, 효소 양을 2배로 늘려 사용하면, 신장시간을 크게 줄인 고속 PCR(10초/kb)이 가능하다.

방법

인간 게놈 DNA를 주형으로 고속 PCR 프로토콜을 이용하여 다양한 사이즈의 타겟을 증폭하였다. 여러 농도의 HL60 세포 유래 total RNA를 역전사시켜 얻은 cDNA를 주형으로 TFR 유전자(4 kb)를 고속 PCR 프로토콜로 증폭해 감도 및 주형량에 따른 검출을 확인하였다.

결과

인간 게놈 DNA를 주형으로 한 반응에서는 20 kb까지 증폭을 확인할 수 있었다(그림 5). 또한 cDNA를 주형으로 하는 반응에서는 표준 프로토콜과 동등한 증폭과 주형량 검출감도를 유지하면서 반응 시간을 1/2 이하로 줄일 수 있었다(그림6).

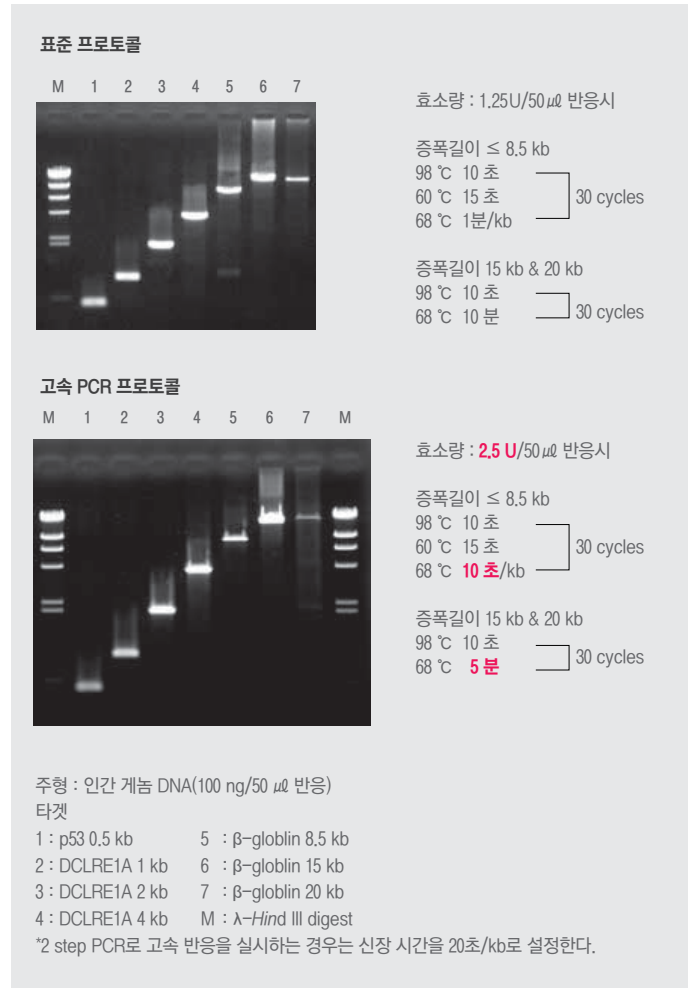


그림 5. 인간 게놈 DNA를 주형으로 한 표준 프로토콜과 고속 PCR 프로토콜의 비교 (1)



그림 6. cDNA를 주형으로 한 표준 프로토콜과 고속 프로토콜의 비교 (2)

정리

위와 같이 PrimeSTAR GXL이나 PrimeSTAR Max는 특히 일반 PCR 효소로는 증폭 효율이 떨어지는 반복서열의 증폭에 대해서도 높은 증폭 효율과 정확성을 나타냈다. 이것은 다른 high fidelity PCR 효소에는 없는 뛰어난 특징이다. 그와 더불어 PrimeSTAR GXL은 긴 단편 증폭에서도 높은 정확성과 높은 증폭 효율을 나타내었다. PrimeSTAR 시리즈의 PCR 효소들은 기존의 high fidelity PCR 효소를 뛰어넘는 정확성과 긴 단편이나 증폭이 어려운 반복서열도 무난히 증폭할 수 있는 우수한 증폭 효율 두 가지를 모두 겸비한 최적의 PCR 효소이다.

License Notice [M54, L15, P1]

PrimeSTAR 시리즈와 관련 제품

Code	제품명	용량
R050A	PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	250 U
R045A	PrimeSTAR Max DNA Polymerase	100 회 (50 µl 반응기준)
R010A	PrimeSTAR HS DNA Polymerase	250 U
R040A	PrimeSTAR HS(Premix)	100 회 (50 µl 반응기준)
R044A	PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer	250 U
6027	Mighty Cloning Reagent Set(Blunt End)	20 회
6019	Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR	20 회

「정확한」 PCR을 위한 최상의 라인업!

PrimeSTAR® DNA Polymerase Series

목적에 맞는 PCR 효소 선택은 PCR 효율 극대화의 기본 조건입니다. 이제 High Fidelity(HF) DNA Polymerase도 목적에 맞게 골라 사용하세요.

01. HF DNA Polymerase의 기본

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Code R010)

02. 「Long PCR」이 가능한 HF DNA Polymerase

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code R050)

03. 「High Speed PCR」이 가능한 HF DNA Polymerase

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Code R045)



PrimeSTAR® Series 특징 비교

	Accuracy	GC or AT rich	Speed	Range of template quantity	Target length (human genome)	Blunt or 3'A end
PrimeSTAR HS	★★★★★	★★★	★★	★★	≤8.5 kb	Blunt
PrimeSTAR Max	★★★★★	★★★	★★★★★	★★★(★)*	≤6 kb	Blunt
PrimeSTAR GXL	★★★★★	★★★★★	★★★★★	★★★★★	≤30 kb	Blunt

* Extension time : 1 min/kb 사용시