

Product News Letter 3호



User's Guide for Polymerase Chain Reaction

- ✓ PCR의 원리
- ✓ PCR의 활용
- ✓ PCR의 종류
- ✓ PCR의 구성요소
- ✓ PCR의 세팅시 고려사항
- ✓ 표준반응 예시
- ✓ 자주하는 질문
- ✓ Trouble shooting



고객상담전화

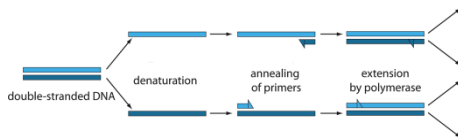
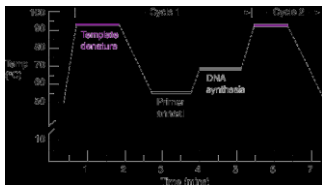
042-581-8448

(주)엘피스바이오텍은 단백질
전문 생명공학 기업입니다

PCR의 원리

PCR (Polymerase Chain Reaction)은 특정 DNA 조각을 증폭하는 방법으로서 현대 분자생물학의 가장 핵심적인 기술 중 하나입니다.

PCR은 Denaturation, Primer Annealing, Strand Extension의 세가지 단계로 이루어지며 세단계가 한번 반복될 때마다 처음 양의 2배로 DNA 양이 증폭됩니다 (아래의 그림 참조). 이를 1회 cycle이라 하고 총 cycle의 수는 초기에 첨가되는 기질의 양에 따라 적절히 조절되어야 합니다.



Denaturation은 이중가닥인 DNA가 열에 의해 단일가닥으로 풀어지는 과정을 말하며 보통은 94-95°C의 온도에서 이루어집니다. 온도가 떨어지면서 (50-65°C) DNA 기질에 상보적인 primer가 결합하게 되고 다시 온도를 올려 초고열성 DNA 중합효소인 Taq의 최적 활성온도 (68-72°C)가 되면 annealing 단계에서 결합된 primer의 3'-OH에서부터 dNTP가 하나씩 첨가되며 DNA 합성이 이루어지게 됩니다. PCR에서 primer가 필요한 이유는 DNA 중합효소는 primer-dependent, DNA 중합활성을 가지기 때문입니다. 1회 cycle에서 합성된 DNA는 다음 cycle에서는 PCR 반응의 기질로 이용이 됩니다.

PCR cycle수를 n 회라 가정했을 때 최종 합성량은 초기량 대비 $(2 \times e)^n$ 배 증가하게 됩니다. 2는 1회 cycle로 증폭되는 양이지만 여기에는 PCR의 효율 (e)을 곱해주어야 합니다. PCR의 효율은 PCR이 진행되는 buffer 조건, dNTP의 양, primer의 양적 고갈, DNA 중합효소의 활성도 등에 의해 영향을 받으며, 보통은 0.8-0.9 정도입니다. 또한 일정한 cycle이 진행된 후에는 더 이상 DNA의 양이 증가하지 않는 단계에 이르게 되는데 이를 saturation stage라고 합니다.

다음은 PCR을 수행하기 위한 전형적인 온도세팅과 cycle 조정의 예입니다.

Initial Denaturation	95°C	3 min	
Denaturation	95°C	30 sec	
Primer Annealing	Tm-4°C	30 sec	25-35 cycles
Extension	72°C	30-60 sec/1 kbp	
Final Extension	72°C	1 - 10 min	

PCR에 사용하는 중합효소에 따라 extension 시간은 임의로 조절이 가능합니다. 일반적인 효소의 경우 1 kbp 증폭에 30-60초 정도의 시간을 주지만 특수하게 조작된 효소의 경우에는 1 초의 extension 시간만으로도 충분히 증폭이 일어날 수 있습니다.

PCR로 증폭하여 합성한 DNA는 agarose 전기영동 후 염색하여 관찰하거나 또는 형광 표지후 기계적인 방법을 통해 확인할 수도 있습니다.

PCR의 활용

PCR은 유전자 조작을 필요로 하는 분자생물학적 실험에는 물론 병원성 미생물의 검출에 이르기 까지 다양한 분야에서 활용되고 있습니다. PCR의 활용 영역은 분자생물학, 의학학, 농축산학, 해양생물학, 고생물학, 법의학에 이르기 까지 광범위하며 PCR에 기반을 둔 다양한 기법들이 각 분야의 특성에 맞게 개발되어 활용되고 있습니다. 특히 최근에 각광을 받고 있는 각종 병원성 미생물의 실시간 진단 방법은 실험실에서 수일을 요하던 진단을 단 몇 시간 만에 가능하게 해줌으로써 오랫동안 부동의 영역을 지켜 왔던 면역진단의 자리를 조금씩 대체하고 있는 상황입니다.

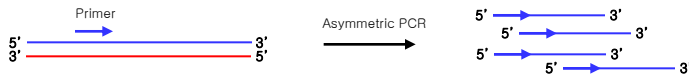
한 두 copy의 유전자 조각만 있으면 PCR은 놀라운 증폭효과로 그 결과를 바로 알 수 있는 장점으로 인해 유전자 연구의 스케일을 혁신적으로 줄였으며 번거로운 실험과정을 생략하게 해줌으로써 동시다중 연구 (high-throughput)를 가능하게 하고 있습니다. 수만 개의 유전자 조각을 이용해서 동시에 다양한 유전자를 검사할 수 있는 칩 기반 기술 역시 PCR을 활용한 좋은 예라 할 수 있습니다.

또한 최근에는 현장진단을 위한 휴대용 PCR 장비의 개발이 가속화되면서 범죄현장이나 감염성 질환의 현장진단을 통해 위기상황에 신속히 대처할 수 있는 여건이 만들어지고 있습니다. 여기에 더해 각종 PCR 기법에 적합한 다양한 PCR master mix제품들이 경쟁적으로 개발되면서 신속하고 정확하며 간단하게 유전자를 증폭하여 진단할 수 있는 여건이 조성되고 있습니다.

PCR은 오래된 실험방법 중 하나이지만 연구자의 아이디어 하나로도 전혀 새로운 기술이 개발될 만큼 중요한 기반기술이며 앞으로의 활용가치가 무궁무진한 핵심기술이라 할 수 있습니다.

PCR의 종류

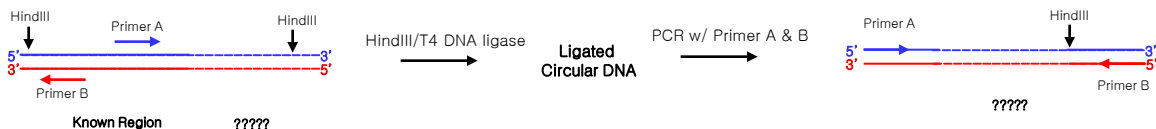
Asymmetric PCR: Primer의 농도를 달리하거나 또는 한쪽 primer만 사용하는 방식의 PCR로서 최종산물은 single strand DNA가 됩니다. Single strand probe를 제조하거나 또는 염기서열분석용 DNA를 준비하는데 도움이 됩니다.



cDNA synthesis from RNA or mRNA: cDNA는 mRNA를 기질로 상보적으로 역전사되어 합성된 DNA를 의미합니다. 역전사효소 (reverse transcriptase)가 사용되며 이는 RNA-dependent DNA polymerase로서 주로 AMV나 MMLV와 같은 RNA virus에 존재하는 역전사효소가 이용됩니다. 역전사효소가 RNA로부터 cDNA를 합성하는 과정에서는 RNA에 상보적인 DNA 조각을 필요로 하는데, random hexamer, oligo d(T), 또는 증폭하고자 하는 유전자의 anti-sense primer 등이 이용됩니다.



Inverse PCR: 표준 PCR은 알려진 서열을 기본으로 디자인된 한쌍의 primer를 이용하고 있습니다. 그러나 일부의 서열만 알려져 있고 나머지 서열이 알려져 있지 않은 경우에 미지의 부분을 분석하고자 하는 목적으로 사용되는 것이 inverse PCR이며 또는 inverted PCR이라 합니다. Inverse PCR에서는 기질 DNA를 제한효소로 절단하고 이를 다시 DNA ligase를 이용하여 접합한 후 생성된 circular DNA를 기질로 PCR을 수행하는 과정을 거치는데, PCR에 사용되는 primer는 서로 반대방향을 향하게 됩니다.

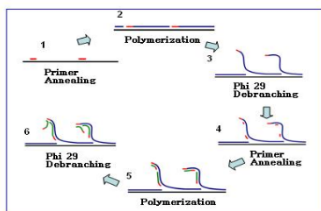


Isothermal PCR: 표준 PCR의 경우 고가의 cyclor 장비와 반응시 오염의 우려, 여러 온도를 거치는 번거로움 등의 제한이 있습니다. 그래서 이러한 문제를 해결하기 위해, 등온 PCR 방법이 고안되었으며, 특이적 기능을 가지는 polymerase의 발견으로 현실화 되고 있으며, 다음과 같은 방법들이 이용되고 있습니다.

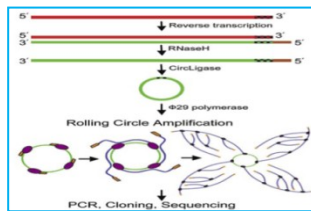
- **LAMP (Loop-mediated isothermal amplification):** LAMP 방법은 단순하고 빠른 등온 증폭 방법으로 strand displacement DNA synthesis 기능을 가지는 Bst DNA polymerase를 이용한 방법입니다. 두 쌍의 특이적 primer를 이용하여 loop을 형성한 후 계속적으로 증폭시키는 방법입니다. 고가의 장비없이 특정 DNA를 one-step으로 증폭할 수 있어, 기초 과학뿐만 아니라 여러 임상적 샘플에서 진단 및 검출 방법으로 이용되고 있습니다.

- **NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification):** Isothermal transcription-based amplification 방법입니다. 즉 RNA나 DNA로부터 RNA를 합성하는 등온 PCR 방법의 하나입니다. 이 방법은 reverse transcriptase, RNase H, T7 DNA dependent RNA polymerase의 세 가지 효소를 이용하여, RNA를 증폭하는 방법입니다. 임상적으로 RT-PCR 방법보다 더 효과적으로 genomic DNA가 섞인 샘플에서 RNA를 증폭할 수 있는 방법입니다.

- **MDA (Multiple displacement amplification):** MDA 방법은 strand displacement DNA synthesis 기능을 가지는 bacteriophage phi29 DNA polymerase를 이용하는 등온 증폭 방법으로서, modified 된 random primer를 사용하여 전체 게놈을 높은 fidelity를 유지하며 증폭할 수 있는 방법입니다. 매우 적은 양의 (1-10 copies) 인간 게놈을 약 20-30 µg 까지 증폭시킬 수 있는 유용한 방법으로 임상적 샘플이나 회귀 샘플을 이용한 실험에 매우 유용한 방법입니다.



MDA



RCA

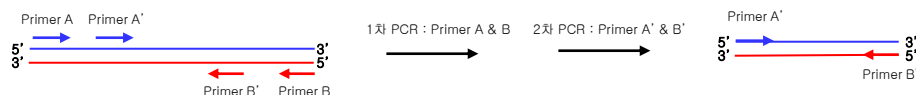
- **RCA (Rolling circle amplification):** RCA 방법은 대표적인 등온 증폭 방법으로 일정 온도에서 circular 형태의 DNA를 증폭할 수 있는 방법입니다. Bacteriophage phi29 DNA polymerase를 이용하여, polymerase가 circular 형태의 DNA에 결합된 primer를 시작으로 합성이 일어나며, 계속해서 DNA를 따라 증폭이 일어나는 방법으로 다른 등온 방법에 비해 최적화 조건이 거의 필요 없는 방법입니다. 증폭 산물은 target DNA에 붙어 있는 형태로 나오기 때문에, 세포나 조직에서의 분석에서 특이적 signal을 필요로 하는 실험에 유용할 수 있는 방법입니다.

그 밖에, DNA polymerase와 ligase를 이용한 LCR (Ligase Chain Reaction), replication fork mechanism을 이용한 HDA (Helicase Dependent Amplification), multiple ramification (branching) 방법을 이용한 최신 방법인 RAM (Ramification Amplification) 방법들이 있습니다.

Multiplex PCR: Multiplex PCR은 한 쌍 이상의 primer 조합을 이용하여 여러 개의 유전자를 동시에 증폭하는 방식의 PCR입니다. 하나씩 하는 표준반응과 비교하여 시간적으로는 물론 비용적으로도 장점이 있는 방법입니다만, 각 유전자의 PCR 조건을 일치시켜야 하며 또한 증폭 절편의 크기가 다르도록 디자인함으로써 전기영동분석에 지장을 주지 말아야 합니다. Multiplex PCR은 유전자 다형현상을 분석하는데 유용한 방법이지만 PCR 조건의 최적화에 많은 신경을 써야 하는 방법입니다.

Multiplex RT-PCR: Multiplex RT-PCR은 multiplex PCR과 원리는 같지만 사용하는 목적에 있어서 다소 차이를 가지고 있습니다. mRNA의 양적비교를 하기 위해서 두 가지 이상의 mRNA를 동시에 증폭하여 그 양적 비율을 확인하기 위한 일종의 semi-quantitative 전략으로 개발되었습니다. Internal control 유전자로서 actin이나 GAPDH와 같이 실험군에 따라 양적 차이가 미미한 유전자를 실험하고자 하는 target 유전자와 함께 동시에 증폭하는 방법과 동일 유전자에서 일부분을 deletion하여 인위적으로 PCR 반응에 넣어준 후 PCR을 하는 competitive PCR을 모두 포함합니다. 하지만 multiplex PCR과 비교하여 mRNA의 양은 조직간 또는 유전자간 현저한 차이를 보이므로 정확히 두 유전자 band를 PCR의 log 증폭 phase에서 동시 검출하기 위한 조건을 확립하는데 어려움이 있을 수도 있습니다. Real-time PCR이 개발되기 이전에 비교정량 실험을 위해 많이 애용되던 방법이었습니다.

Nested PCR: 하나의 유전자를 증폭하기 위해 한 쌍 이상의 primer를 사용하는 방법입니다. 일차 PCR을 한 후 PCR 산물의 내부에 존재하는 또 다른 서열을 primer로 설정하여 일차 PCR 산물을 기질로 2차 PCR을 수행하는 방법으로서 표준 PCR에 비해 4개의 primer를 사용하므로 증폭의 특이성을 높일 수 있습니다. 일차 PCR 산물에 비해 2차 PCR 산물의 크기가 적으며, 이 방법은 극미량 존재하는 유전자를 증폭하는데 유용합니다.



Nested RT-PCR: 원리는 nested PCR과 같으며 다만 RNA를 초기 기질로 사용한다는 점이 다릅니다.

Semi-nested PCR: Nested PCR과 동일한 개념이지만 2차 PCR의 primer 중 최소 하나는 1차 PCR에서 사용한 것을 사용하는 방법을 지칭하고 있습니다.

qRT-PCR: 정량목적의 RT-PCR을 의미하며, real-time PCR이 개발되기 이전에 많이 사용되던 방법으로서 샘플에 존재하는 mRNA의 copy수를 정확히 수치화할 수 있는 장점이 있습니다. 보통은 특정 target mRNA의 deletion mutant transcript를 샘플에 농도별로 첨가한 후 wild-type과 외부에서 넣어준 mutant와의 증폭을 경쟁적으로 유도한 후 두 비율을 계산하여 회귀곡선을 그려주고 미지 샘플의 농도를 계측하는 방법으로 사용하고 있습니다.

Real-time PCR: PCR 과정 중 실시간 증폭되는 산물의 양을 수치화함으로써 샘플에 존재하는 기질의 초기량을 정확히 정량화 할 수 있는 가장 진보된 방법입니다. 일반 PCR이 최종 증폭후의 증폭산물만을 검출할 수 있는 반면 real-time PCR은 실시간으로 각 cycle에서의 PCR산물을 정량 한다는 점이 다릅니다. 증폭산물의 검출은 PCR 반응에 첨가하는 형광물질을 이용하고 있습니다. 실험 방법에 따라 증폭되는 DNA의 양을 직접 측정하는 방식과 (SYBR green 이나 Evergreen과 같은 DNA binding dye를 이용), probe DNA 조각을 첨가하여 생성되는 형광을 수치화하는 Taqman 방식이 있습니다.

★★ Real-time PCR의 정량화 방법: 3 가지의 정량 방법이 있습니다.

- Standard curve method: 기존의 정량이 알려진 기질의 각 cycle에서의 형광값을 이용하여, 알고자 하는 샘플의 증폭 형광 세기를 비교하여 절대적 양을 측정하는 방법입니다.
- Pfaffl method: target 유전자의 발현을 기준 유전자의 발현과 비교하여 상대적 발현량을 계산하는 방법으로 각 primer의 real-time PCR의 효율과 cycles 차이를 이용하여 상대적 발현량을 계산하는 방법입니다. 발견자의 이름을 딴 방법으로 현재는 많이 이용되지 않고 있습니다.
- Delta-delta Ct method: 가장 쉬운 방법으로 가장 널리 사용되는 방법입니다. 다만 확실성이 떨어지는 단점이 있습니다. 각 primer의 효율성이 동일하다는 가정과 다른 보정 작업 없이 기준 유전자가 동일하게 발현한다는 가정으로 상대적 값만을 계산하는 방법입니다.

$$\text{Equation} = 2^{-(\Delta Ct \text{ target} - \Delta Ct \text{ control})}$$

ex) 두 샘플에서 기준 유전자 (GAPDH)의 Delta ΔCt value (비교 샘플 Ct - 기준 샘플 Ct) = 10 이고, 비교 유전자의 Delta ΔCt value가 8인 경우, 해당 유전자는 기준 샘플에서보다 비교 샘플에서 $2^{-(8-10)} = 4$ fold 더 발현되었다는 계산이 됩니다.

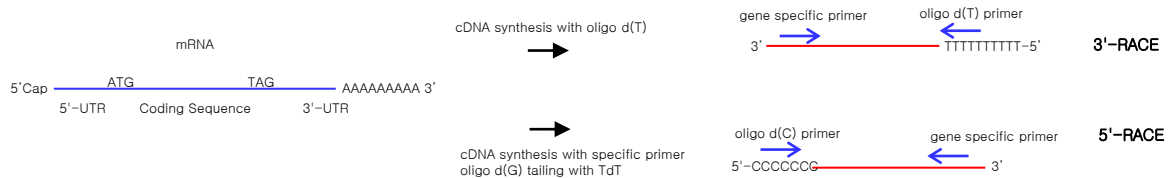
Real-time RT-PCR: RNA로부터 역전사효소를 이용하여 합성한 cDNA를 PCR에 이용한다는 점 외에는 원리나 검출방법은 real-time PCR과 동일합니다.

Reverse Transcription PCR (RT-PCR): 역전사 효소를 이용하여 RNA로부터 cDNA 합성한 후 PCR을 하는 방법입니다. 보통 RT-PCR이라 합니다

Universal PCR: 5' 부분에 adaptor 서열이 있으며 3' 부분은 degenerate인 (degenerate는 4개 염기가 무작위로 섞인 것을 의미합니다) primer를 이용하여 PCR을 하는 방법으로서 최종 산물은 한가지 크기의 DNA가 아니라 다양한 크기로 다양한 서열의 DNA가 됩니다. Differential display PCR이 대표적인 universal PCR입니다.

PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism): Single stranded DNA는 염기서열 중 하나의 변화 (point mutation, deletion 또는 insertion)만 있어도 전기영동속도가 달라져 이동거리 차이가 발생하게 됩니다. 이와 같은 원리를 이용해 PCR을 하고 그 산물을 denature한 후 전기영동상의 거리로서 유전자의 돌연변이를 검사하는 방법이 PCR-SSCP입니다.

RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) : mRNA는 기능적으로 단백질을 coding하는 CDS와 5'-UTR (untranslated region), 그리고 downstream으로 3'-UTR로 구성됩니다. 5'-UTR은 mRNA의 시작인 5'-cap으로부터 단백질의 start codon인 ATG 이전까지를 의미하며 3'-UTR은 stop codon으로부터 poly(A) addition signal을 지나 poly(A) tail 까지를 의미합니다. mRNA의 양쪽 끝부분을 해독하기 위해 이 부분들을 특이적으로 증폭하는 방법이 RACE-PCR로서 어느 쪽이냐에 따라 5'-RACE 그리고 3'-RACE라고 합니다. 지금까지 다양한 방법의 RACE법이 소개되었지만 3'-RACE에서는 일반적으로 down stream primer로서 oligo(dT) primer를 쓰고 up stream primer로서 유전자에 특이적인 서열을 쓰는 방법이 공통적입니다. 그러나, 5'-RACE의 경우에는 다양한 방법이 개발되었는데, mRNA를 주형으로 reverse transcription과정으로 합성한 일차 single strand cDNA의 끝에 terminal deoxynucleotidyl transferase를 사용하여 poly(A) 혹은 poly(C) tail을 인위적으로 만들어 주던 것이 시초였습니다.



이외에도 다양한 방법의 RACE 방법들이 소개되었으며 또한 키트로써 판매되는 제품도 어렵지 않게 찾아볼 수 있습니다. 어떤 방법을 사용하느냐는 실험자가 선택할 몫이며 사용하기 편하고 한번이라도 손이 덜 가는 방법이 가장 좋은 방법이라 할 수 있습니다. 저는 개인적으로 "SMART cDNA 합성방법"을 가장 선호하고 있습니다.

ISPCR (In Situ Polymerase Chain Reaction) : In situ hybridization (ISH)은 세포나 조직에서 DNA나 RNA의 위치를 확인하는 방법으로서 ISPCR은 PCR로 원래의 target gene을 증폭함으로써 ISH의 민감도를 고도로 높은 방법입니다. ISPCR의 원리는 일반적인 PCR 방법과 동일하지만 일반 PCR과 다른 점은 slide glass위에서 PCR이 이루어진다는 점으로서 이에 적합한 기계를 사용해야만 합니다.

DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcriptase PCR): 유전자 발현은 발생, 분화 등 생명체의 탄생과 소멸 그리고 유지과정에 따라 특이적으로 나타나며 이 과정에서 발현되는 특정 유전자들을 찾아내기 위한 방법으로 개발된 것이 DDRT-PCR입니다. 이전까지는 주로 subtractive hybridization이나 differential hybridization 방법이 사용되었지만 PCR 방법이 보편화되면서 DDRT-PCR이 기존의 방법을 대체해 왔습니다.

DDRT-PCR은 oligo d(T)와 10-12 base 정도의 비교적 짧은 primer를 각각 down-stream, up-stream primer로 채택하고 낮은 annealing 온도조건에서 PCR을 함으로써 up-stream primer와 조금이라도 상동성이 있으면 증폭이 되도록 해서 한번의 PCR로 다른 size의 다양한 PCR 산물들이 나오게 하고 이를 전기영동한 후 실험군 간에 차이가 나는 PCR 산물을 찾아내는 방식입니다. 이는 기존의 방법들과 비교하여 분명 장점을 가지고 있지만 특이성이 낮아 최근에는 이를 이용하는 빈도가 점차 낮아지고 있는 추세입니다.

RAPD PCR (Random Amplified Polymorphic DNA): RAPD PCR은 생명체의 계통 유전학적 유사성의 정도를 판별할 때 사용합니다. 일반적인 PCR과 달리 짧은 primer를 사용함으로써 생긴 다양한 PCR 산물들을 전기영동상에서 비교하는 방식으로, band의 pattern 유사성으로 중간 관계를 찾는 방법입니다. 유사성이 많을수록 band의 pattern이 비슷하고 중간 차이가 클수록 상이한 band들이 나타나는 방식으로 중간 차이를 확인하는 방법입니다.

Hot Start PCR: Thermostable DNA polymerase는 반드시 고온에서만 활성을 가지는 것은 아닙니다. 비교적 낮은 온도에서도 활성을 가지므로 처음 PCR cycle에서 온도가 상승하는 과정 동안 활성을 보여 extension이 일어날 수 있습니다. 이때 primer는 일차 denaturation과정을 거치지 않았으므로 비특이적으로 결합한 primer로부터 비특이적인 산물이 합성될 가능성이 많아져 최종적으로 원하지 않는 결과물들이 생성될 가능성이 높아집니다. 그러한 결과는 비특이적 band로 나타나게 되는데, 이를 줄이는 방법으로써 PCR 반응액의 온도가 denaturing 온도에 도달했을 때, Taq 효소만을 별도로 첨가해 주는 방식이 처음 개발되었고 이를 Hot Start PCR이라 부르게 되었습니다. 이러한 방식을 사용했을 경우, 초기 denaturing으로 온도가 상승하는 과정에서는 DNA의 중합이 이루어지지 않고, PCR 반응액은 설정해 놓은 annealing 온도 이하로 떨어지지 않으므로 그만큼 비특이적 산물의 생성을 억제하게 되고, 원하는 산물만을 얻게 됩니다.

Touchdown PCR: 최적의 annealing 온도와 primer의 melting point를 결정하기 위한 pilot PCR의 하나라 할 수 있습니다. PCR cycle에서 매 1 cycle 마다 annealing temperature을 1℃씩 낮추며 결과적으로 나타나는 합성산물의 양을 확인하여 melting point를 유추할 수 있습니다. Annealing 온도가 melting point 보다 높게 설정된 경우, PCR 증폭이 일어나지 않는 점을 이용해 증폭이 일어나는 온도와 일어나지 않는 정확한 온도를 계산함으로써 primer의 melting point (GC content 계산에 의한 것이 아닌 실제 PCR 조건에서의 최적 온도)를 확인할 수 있습니다.

Long PCR: PCR 산물의 길고 짧음에 따라 PCR을 구분하는 다소 주관적인 용어입니다만 보통 5kbp 이상을 증폭할 때 편의상 부르는 용어입니다.

Megaprimering PCR: PCR primer가 크거나 또는 1차 PCR 산물을 새로운 PCR의 primer로 사용하는 것처럼 일반적으로 사용하는 primer의 크기에 비해 그 크기가 큰 경우를 의미합니다. 이때 primer는 작게는 100 base에서 부터 크게는 수 kilobase가 될 수도 있습니다.

Gradient PCR: 최신의 PCR 기계에는 각 well의 온도를 달리 설정할 수 있는 gradient라는 기능이 있습니다. 이러한 기능을 이용해 각 PCR tube에 다른 annealing 온도설정을 하여 최적의 PCR 온도조건을 찾을 수 있습니다.

이상에서 다양한 PCR용어와 기법들을 살펴보았지만 변하지 않는 근본적인 원리는 primer의 결합과 Taq에 의한 DNA 중합입니다. 누구나 사용할 수 있는 새로운 용어를 창조하고픈 마음은 연구자라면 한번쯤은 가져 봤을 적 하지만, 솔직히 헛갈릴 만큼 용어가 많은 것 또한 사실입니다. PCR을 처음 접하는 초보에게는 분명 어려운 용어들이 수 있지만 PCR의 기본 원리만 잊지 않는다면 제목만으로도 이 PCR이 무엇을 위한 것이고 어떤 방법인지 어렵지 않게 파악할 수 있을 것입니다. PCR의 근본목적은 DNA의 증폭이며, 어떻게 어떤 목적으로 증폭하느냐에 따라 다양한 기법이 사용되고 있으며 이를 구분하기 위해 독특한 명칭을 부여하고 있는 것입니다.

PCR의 구성요소

PCR을 구성하는 요소는,

- 1) **Template (주형)** : DNA 또는 RNA로부터 역전사 반응으로 얻은 cDNA가 되며 single strand와 double strand 여부에 무관합니다.
- 2) **Primer** : 주형에 상보적인 single strand nucleic acid입니다. 주로 화학합성에 의해 만들어지며, 16 base에서 길게는 100 base까지 다양한 길이의 primer가 사용될 수 있습니다.
- 3) **Buffer (완충용액)** : 증폭반응에 최적인 pH와 염(salt) 농도를 제공합니다.
- 4) **dNTP** : 합성되는 DNA의 building block이 되는 기질입니다. dATP, dCTP, dGTP, dTTP의 네가지 deoxynucleotide가 mix 형태로 사용됩니다. PCR의 종류와 목적에 따라 변형 nucleotide가 사용되기도 합니다.
- 5) **Mg²⁺ ion** : Taq 효소의 안정적인 활성을 위한 2가 이온으로서 MgCl₂ 또는 MgSO₄의 형태로 첨가되며 Taq의 종류에 따라 최적의 농도가 다릅니다.
- 6) **Taq (증폭효소)** : 내열성 DNA중합효소로서 70-80°C에서 최적 활성을 가집니다. 발견된 균주의 이름에 따라 명명되는 것이 일반적입니다. Taq 그리고 Pfu 등 다양한 효소들이 있으며 효소들마다 고유한 특성이 있습니다.
- 7) **Additive (첨가물)** : 주형의 상태나 조건에 따라 최적의 PCR산물을 얻기 위해 첨가되는 물질들로 BSA와 같은 단백질성 물질이나 DMSO, betaine, non-ionic detergent 등의 화학물질이 있습니다.
- 8) **Temperature Cycler (증폭장치)** : PCR은 Denaturing, Annealing, Extension의 세가지 다른 온도의 반복에 의해 이루어집니다. 주형 DNA의 수소결합을 떨어뜨려 single strand로 만들어주는 과정, primer가 주형에 특이적으로 붙는 과정, 그리고 Taq 효소에 의해 primer로 부터 dNTP를 이용해 새로운 DNA 가닥을 합성해 주는 과정으로 이루어 집니다. 이는 온도의 증감을 반복적으로 해주는 장치를 통해 이루어지며 이를 PCR machine 또는 cycler라고 합니다.
- 9) PCR Tube

Taq의 선택 Guide

1. 증폭량이 중요한 경우 : 일반적인 rTaq plus, HiPi 또는 HiPi plus
2. 긴 DNA를 증폭하고자 하는 경우 : HiPi Plus 또는 HiPi super
3. 정확한 서열 유지가 필요한 경우 : Pfu plus
4. 전체적인 시간을 줄이고 싶은 경우 : rTaq plus
5. 특이성이 중요한 경우 : HiPi plus 또는 rTaq plus HOT
6. 간편한 반응을 필요로 하는 경우 : 각종 master mix 사용

PCR 반응의 조절 Tip

1. 증폭량이 많아야 하는 경우 : 증폭효율이 높은 Taq 선정, Cycle 수를 늘림
2. 긴 DNA를 증폭하고자 하는 경우 : Extension time을 늘림, Q buffer 첨가
3. 정확한 서열 유지가 필요한 경우 : Fidelity가 높은 효소 사용, Cycle 수를 최소화함, dNTP의 농도를 줄임
4. 전체적인 시간을 줄이고 싶은 경우 : rTaq plus, HiPi super, Pfu super의 사용
5. 특이성이 중요한 경우 : Hot start Taq 사용, Q buffer 첨가, 가능한 높은 annealing 온도를 사용

PCR 반응 최적화시 고려사항

Genomic DNA나 cDNA 처럼 다양한 유전자 DNA들의 혼합물에서 특이적인 서열을 갖는 유전자 조각만을 증폭하기 위해서는 다음과 같은 사항들을 사전에 신중히 검토해야 합니다.

1. Primer

- Primer의 길이** : primer의 길이는 증폭하고자 하는 유전자 조각의 크기와 primer의 GC 함량 그리고 주형으로 사용할 샘플의 복잡성 (complexity)에 따라 임의의 크기로 조정이 가능합니다. 보통 18-24 base 정도의 길이가 적합합니다.
- Primer의 특이성** : 샘플로 사용하는 주형에는 다양한 base 조합을 갖는 DNA 조각들이 혼재해 있습니다. Primer로 사용하고자 하는 서열이 증폭할 유전자에만 특이적으로 존재하는 서열인지 Blast search를 통해 확인해야 합니다.
- Primer의 구조** : primer의 내부에서 또는 primer 쌍끼리 이차구조를 형성하면 primer dimer 형성이 많아지고 결과적으로 PCR 증폭효율이 감소하게 됩니다. 디자인한 primer가 dimer 또는 loop를 형성하는지 미리 점검해 봐야 합니다.
- Primer의 GC 함량과 melting point** : primer의 GC 함량은 40-60%가 적합하며 이에 따른 Tm (melting point) 값은 50-75°C가 적합합니다.
- Primer간 Tm 차이** : primer간의 Tm 값 차이는 최적의 annealing 효율을 위해 5°C 미만인 것이 좋습니다.
- Primer 내부의 GC구조** : DNA 중합은 primer의 3'-OH에서 부터 시작되며 주형 DNA에 annealing 됨과 동시에 진행이 됩니다. 따라서 비특이적 증폭의 시작을 줄이기 위해 primer의 3' 부위에는 가능한 GC 또는 GC의 반복서열을 넣지 않는 것이 좋습니다.
- Primer의 농도** : primer stock은 보통 100 pmol - 1 nmol/μl로 정제수에 녹여 냉동보관하며 10 pmol/μl의 working 농도로 희석해 사용합니다. 20 μl 반응에서 primer는 5 pmol의 농도로 첨가하여 사용하는 것이 일반적입니다.

2. PCR Cycle

- Initial Denaturation** : 초기 denaturation은 94-95°C의 온도에서 이루어지며 주어지는 시간은 샘플과 Taq의 특수성에 따라 달라질 수 있지만 보통 3-5분의 시간이면 충분합니다. Hot start Taq를 사용하는 경우에는 Taq의 활성 회복이 초기 denaturation 시간 동안 이루어지는 경우가 많으므로 제조사의 권장 시간을 반드시 따라야 합니다.
- Denaturation** : cycle이 진행되는 중간의 denaturation은 94-95°C의 온도에서 이루어지며, 시간은 임의로 조정이 가능하고 최소 10초 이상을 주면 됩니다. 표준반응에서는 30초를 권장하고 있습니다.
- Annealing** : primer annealing은 primer의 Tm 값을 기준으로 2-4°C 낮은 온도로 수행하는 것이 좋으며 두 primer간의 Tm 값 차이가 큰 경우에는 Tm 값이 낮은 primer를 기준으로 정해야 합니다. 표준반응에서는 30초의 시간을 권장하고 있습니다.
최적의 PCR 증폭을 위해서 고려해야 하는 사항 중 가장 중요한 항목으로서 primer의 품질, 주형의 상태와 더불어 PCR 실패의 가장 큰 원인이기도 합니다. Tm 값과 실제의 최적 annealing 온도는 primer마다 다를 수 있으므로 본 실험에 앞서 다양한 온도조건 (45-68°C)에서의 증폭효율을 테스트해 보는 것이 좋습니다.
- Extension** : DNA 중합이 이루어지는 온도는 72°C입니다. 하지만 실험의 목적이나 증폭산물의 크기에 따라 68-74°C까지 다양한 온도로 사용할 수 있습니다. 주어지는 시간은 사용하는 중합효소의 활성을 고려해서 결정해야 하며 표준반응에서는 1 kbp 당 30초-1분의 시간을 권장하고 있습니다.
- Final Extension** : PCR을 끝내기 전 최종적으로 extension이 덜 된 산물의 증폭을 완료하기 위한 과정으로서 생략해도 큰 문제는 없습니다. PCR 산물에 A tailing을 하여 TA cloning을 하고자 한다면 최소 5 분 정도의 시간을 주어야 합니다. 그 외에는 생략 가능한 불필요한 과정입니다.
- PCR Cycle 수** : PCR에서 cycle수는 최종산물의 양에 따라 임의로 조정이 가능합니다. 한 cycle 후의 DNA 양은 대략 이전 cycle의 2배 가량이 되기 때문에 PCR을 수행한 후 PCR 산물의 양이 적어 보인다면 2-5 cycle을 더해주기만 하면 됩니다. Genomic DNA와 같이 유전체상에 한 유전자가 한 copy 씩만 있는 것과 달리 RT-PCR에서 cDNA는 mRNA의 발현정도에 따라 샘플간 그리고 조직간 차이가 많이 나기 때문에 모든 유전자에 동일한 cycle수를 적용하는 것은 옳지 않습니다. 최적의 증폭량이 될 수 있도록 PCR cycle 수를 늘리거나 줄이는 방법을 사용해야 합니다. 또한 사용하는 중합효소에 따라 중합활성이 달라지므로 같은 샘플이라 할지라도 사용할 중합효소의 특성을 고려하여 PCR cycle 수를 설정해야 합니다. 일례로서 GAPDH는 RT-PCR에서 15 cycle로도 충분히 검출이 되지만 45 cycle을 주더라도 거의 확인이 되지 않는 유전자도 많습니다.

3. 주형 DNA

주형 DNA의 양은 중합효소의 활성도와 설정한 PCR cycle 수 그리고 검출하고자 하는 유전자의 copy 수를 총체적으로 고려하여 결정해야 합니다. Genomic DNA인 경우에는 보통 1-100 ng의 DNA가 주형으로 첨가되며 cDNA인 경우에는 0.1-10 ng 정도가 첨가됩니다. PCR에 사용되는 주형 DNA는 깨진 상태만 아니라면 정제도에 크게 영향을 받지는 않습니다. 조직 조각이나 cell 등도 PCR에 직접적인 주형으로 사용될 수 있습니다. Plasmid나 또는 PCR 증폭 산물처럼 단일 서열인 경우에는 0.1-10 ng 정도의 양을 PCR에 사용하되 PCR cycle 수를 하향 조정해야 합니다. PCR이 실패하는 이유 중 가장 큰 부분을 차지하는 것은 주형 DNA의 상태입니다. DNA가 완전히 깨져 있거나 또는 샘플에 증폭하고자 하는 표적 DNA가 존재하지 않는다면 PCR은 되지 않습니다.

4. PCR 증폭의 목적과 이에 적합한 중합효소의 선택 그리고 PCR 세팅

PCR 증폭의 목적이 단순 확인인지 아니면 정확한 서열유지가 필요한 cloning 작업의 재료준비인지에 따라 PCR 조건과 중합효소의 종류는 달라져야 합니다. 일반적인 Taq 중합효소는 에러율이 높은 반면 증폭효율은 좋습니다. 반면 Pfu 계열의 증폭효소는 에러율은 적은 반면 증폭효율이 떨어지는 상반되는 특성을 가지고 있습니다. 따라서 서열분석이나 발현을 위한 DNA 준비에 일반 Taq를 사용하는 것은 바람직하지 않습니다. PCR의 목적에 상관없이 동일한 효소 그리고 동일한 조건을 사용하는 것 또한 옳은 실험 접근법이라 할 수 없습니다.

효소의 특성표를 참조하여 나의 실험목적에 맞는 중합효소를 선택해 사용하는 것은 수백 번 강조해도 지나침이 없습니다.

표준반응 예시

1. 준비물

- DNA 증폭효소 : 예) rTaq plus 또는 Pfu Plus, 5 unit/ μ l
- 10 x PCR Buffer : 2.5 mM $MgCl_2$ 포함
- dNTP mix : 2.5 mM each
- Template DNA : RT products, genomic DNA, plasmid DNA 등
- Primer mix : 10 pmol/ μ l mix
- DW : 3 차
- 0.2 ml PCR tubes

2. PCR mix (20 μ l 반응시)

- 2 μ l 10x PCR buffer
- 1.6 μ l dNTP mix (2.5 mM each)
- 1 μ l primer mix (10 pmol/ μ l)
- 1 μ l template DNA (RT의 경우 1/20 (초기 RNA양이 1 μ g인 경우), gDNA의 경우 1-100 ng, plasmid DNA의 경우 1-10 ng)
- 14.2 μ l DW
- 1 unit/0.2 μ l rTaq plus 또는 Pfu plus

total 20 μ l

* 주의 사항 : - 상온에서의 비특이적 증폭을 막기 위해 얼음 위에서 mix를 제조하는 것이 좋음

- Taq 효소는 mix의 맨 마지막에 첨가해야 함
- Template DNA의 첨가량은 증폭하고자 하는 target 유전자의 copy수를 고려하여 결정해야 함
- PCR 반응 volume이 다른 경우, 구성물들을 비례하여 줄이거나 늘려야 함
- Sample만 다르고 반응이 동일한 경우, template DNA만 제외하고 모든 성분이 포함된 master mix를 만들어 분주하여 실험에 사용하여도 상관없으나 master mix의 장기보관은 가능하지 않음

3. PCR cycler의 설정

- 다음과 같이 PCR cycle수와 온도를 설정합니다.
- Primer annealing 온도는 primer의 T_m 계산값을 기준으로 4°C 정도 아래로 설정합니다. 단 최적의 증폭조건은 primer의 상태, template의 상태에 따라 달라지므로 본 실험에 앞서 다양한 annealing 온도조건을 테스트해 봐야 합니다.

Initial Denaturation	95°C	3 min	
Denaturation	95°C	30 sec	
Primer Annealing	$T_m-4^\circ C$	30 sec	25-35 cycles
Extension	72°C	30-60 sec/1 kbp	
Final Extension	72°C	1 - 10 min	

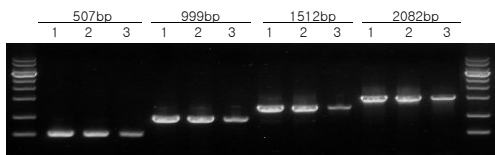
* 주의 사항 : - Denaturing 온도는 94°C 또는 95°C를 사용해도 무방합니다.

- 사용하는 증합효소가 Hot start 인 경우 반응시간이 일반적인 효소와는 다를 수 있습니다. 반드시 제조사의 설명을 확인해야 합니다.
- Extension 시간은 사용하는 증합효소에 따라 달라질 수 있습니다. 특수제품이 아닌 경우 반응시간은 target DNA의 크기를 고려하여 설정해야 합니다.
- Cycle의 마지막 extension은 TA cloning을 하기 위하여 아니라면 설정하지 않아도 무방합니다.
- Cycle 수는 target 유전자와 template의 양에 따라 조절해야 합니다. 가령 RT-PCR에서 internal control로 많이 사용하는 GAPDH는 10-15 cycle부터 검출이 가능하지만 그보다 copy수가 적은 것들은 30에서 많게는 45 cycle 이상을 주어야 합니다.
- Genomic DNA를 template로 사용하는 경우 cycle수는 유전자의 copy수 보다는 primer의 상태나 genomic DNA의 양, 그리고 PCR산물의 내부구조에 의해 결정되는 경우가 더 많습니다. 그래도 copy수가 전혀 다른 RT-PCR에서 보다는 유전자들의 평균적인 증폭 cycle수를 결정하기가 쉽습니다.

4. PCR 결과물의 확인

- PCR 산물 5 μ l에 6x sample loading buffer 1 μ l를 혼합하여 agarose 전기영동을 합니다.
- 전기영동은 PCR 산물의 크기를 고려하여 최적의 분리가 가능한 %의 agarose gel을 사용해야 합니다.

1-2% gel : 0.1-1 kbp, 0.7% gel : 1-10 kbp



0.7% Agarose gel/0.5X TAE buffer

자주하는 질문

1) Thermostable DNA Polymerase의 종류?

Thermostable DNA polymerase는 초고열성 세균으로 부터 분리 정제하였거나 또는 재조합으로 발현하여 정제한 내열성 종합효소로서 세균의 종류에 따라 크게 두가지로 분류가 됩니다. Thermus 균주에서 분리한 종합효소와 Pyrococcus 균주에서 분리한 B-type의 종합효소가 그것으로서 Taq나 Tth는 대표적인 Thermus 유래의 종합효소이며 Pfu나 KOD는 대표적인 Pyrococcus 유래의 종합효소들입니다. Pfu를 포함한 B-type 효소들은 3'→5' exonuclease 활성을 가지고 있기 때문에 proof-reading 활성을 보이며 결과적으로 에러율 (error rate) 일반적인 Taq 효소들에 비해 낮은 편입니다. Thermostable DNA polymerase는 발견한 균주의 종명과 속명의 첫자를 따서 명명하기도 하지만 (Thermus aquaticus: Taq, Pyrococcus furiosus: Pfu), 판매회사에 따라 고유한 특성을 반영하여 효소를 명명하기도 합니다.

2) Thermostability, Fidelity, Specificity, Elongation Rate, Processivity?

- **Thermostability** : 고온에서 효소가 활성저하 없이 견디는 시간을 의미합니다. Thermostability가 높을수록 denaturing 온도에서 견디는 시간이 길어지므로 효소의 활성저하에 의한 PCR의 실패가능성은 낮아집니다.
- **Fidelity** : Fidelity는 에러율을 의미하며, 초고열성 세균에서 유래한 DNA polymerase들은 생존전략의 차원에서 일반적인 미생물유래의 효소에 비해 에러율이 높은 편입니다. 보통 LacZ 유전자를 가지는 plasmid를 PCR로 증폭한 후 형질전환하여 얻은 대장균의 blue/white colony의 비율로서 표시를 합니다. Fidelity가 높다 또는 낮다라는 의미는 그만큼 증폭된 유전자조각에 에러가 있느냐 없느냐를 결정하는 요인입니다. Pfu는 일반 Taq에 비해 6배 정도 fidelity가 높지만 이는 전혀 에러가 없다는 의미는 될 수 없으며, Pfu의 경우에도 1,000 base당 2-3개의 에러율을 보이고 있습니다.
- **Specificity** : 원하는 target DNA만을 정확히 증폭할 수 있는지 여부의 지표로서 specificity는 Taq의 특성에 의해서도 좌우되지만, 일반적으로는 샘플의 상태와 primer의 상태에 의해 좌우되는 경우가 더 많습니다. Taq은 특성상 5'→3'으로 DNA 합성을 하며 primer에 의존적이므로 primer에서 3' 방향의 특이성이 떨어지면 그만큼 비특이적 유전자증폭을 유발할 가능성이 높아집니다. 따라서 primer내에서 3' 쪽은 GC content가 낮으며 또한 target에 대한 특이성이 다른 부위보다 높아야 하는 것이 무척 중요합니다.
- **Elongation rate** : 1초당 합성할 수 있는 최대 염기수로써 Taq polymerase의 속도를 의미합니다. 일반적인 Taq은 초당 60 base를 종합하지만 Pfu는 20 base/sec으로서 Taq에 비해 1/3정도 속도가 늦습니다. 반면 엘피스바이오텍의 rTaq plus는 120 base/sec으로 일반 Taq에 비해 두배 가량 빠릅니다. Elongation rate가 높은 효소일수록 elongation time을 줄일 수 있으므로 그만큼 PCR 반응에 소요되는 시간을 줄일 수 있습니다.
- **Processivity** : 하나의 polymerase 분자가 DNA 기질에 결합한 후 한번의 반응으로 합성할 수 있는 최대 염기수를 나타내는 지표로서 수치가 클수록 PCR에서 extension time을 줄일 수 있습니다.

3) Taq을 구입할 때 가장 먼저 고려해야 하는 내용이나 특성은 무엇인가요?

PCR에 사용하는 종합효소들을 총칭하여 Taq이라 했을 때, 어떤 것이 좋은 Taq인지는 실험자의 목적과 실험환경에 따라 달라질 수 있습니다. PCR은 현대 분자생물학에서 없어서는 안될 중요한 tool로서 자리매김한지 오래되었으며, 단순히 유전자의 존재여부를 확인하는 일에서부터 유전자내의 변이를 조사하는 일, 그리고 유전자를 재조합하는 일은 물론 돌연변이를 도입하는 일까지 광범위하게 사용되고 있습니다. 단순히 유전자의 존재여부를 확인하는데 있어서 fidelity가 높은 고가의 효소를 구매해 사용할 이유는 전혀 없습니다. 증폭률과 특이성만 만족된다면 저가의 Taq을 사용해도 무방합니다.

따라서 유전자의 존재유무만을 확인하는 일반적인 PCR에서는 Taq의 특이성, 증폭 효율 그리고 가격이 우선 고려대상이 됩니다. 하지만 유전자의 cloning에 이용하고자 할 때는 사용하고자 하는 Taq의 error 발생 정도를 반드시 우선 고려대상으로 해야 합니다. 또한 증폭하고자 하는 유전자 증폭 절편의 크기도 중요하며 Taq 제품들은 증폭할 수 있는 최대 크기가 서로 다르므로 사전에 이를 미리 확인하여야 합니다. 3 kbp 가 최대 증폭크기인 Taq으로 10 kbp의 DNA를 증폭할 수는 없습니다.

가격이 비쌀 수록 PCR에서 고려해야 하는 다양한 특성들을 만족하는 경우가 많습니다. 하지만 회사마다 가격정책이 다르므로 국산과 비교하여 가격이 더 높다고 해서 더 좋은 것이라는 생각은 맞지 않습니다.

Taq을 선정할 때 한가지 더 고려해야 하는 조건이 있다면 사용자가 하고자 하는 실험에 적합한지의 여부를 확인해야 한다는 것입니다. 가령 UDG (Uracil DNA glycosylase)를 이용해 PCR carry-over contamination을 방지하고자 하는 경우에서 dTTP 대신 dUTP를 기질로 사용하면서 Pfu와 같이 3'→5' exonuclease 활성을 갖는 효소를 사용하면 PCR은 성공할 수 없습니다. dUTP에 형광물질이나 DIG 또는 biotin과 같은 hapten이 붙어 있고 이를 이용해 PCR로 DNA probe를 만들고자 하는 경우에도 같은 원리가 적용됩니다. 또한 TaqMan probe를 이용해 real-time PCR을 하는 경우에 있어서도 Taq에 5'→3' exonuclease 활성이 있는지도 꼭 확인을 해야 합니다. 만약 5'→3' exonuclease 활성이 없다면 Taq이 종합과정에서 probe를 분해하지 못해 형광 signal을 관찰할 수 없는 사태가 발생할 수도 있기 때문입니다.

4) Taq의 보관, 및 유효사용기간?

모든 단백질 효소가 그렇듯이 Taq 제품들 역시 보관방법만 올바르다면 효소의 활성저하 없이 100년도 보관이 가능합니다. 더군다나 Taq은 열에 안정한 단백질이므로 상온보관도 가능하지만 판매자의 입장에서는 이를 권하지는 않습니다. 냉동조건에서 2년의 유효사용기간을 두는 것이 일반적입니다.

시중에 간혹 특별한 제품이라며 상온유통이나 보관이 가능하다고 홍보하는 제품들도 있으나, 이는 잘못된 지식을 전달하는 것으로서 Taq 제품은 특별한 기술이 없더라도 상온보관이 가능한 그런 효소의 한 종류입니다. 실제로 저희 제품을 대상으로 온도에 따른 안정성을 시험해 본 결과 Taq나 Taq을 이용한 premix 제품의 경우 37°C에서 한달간 보관하더라도 활성의 변화는 없었습니다. 그렇다고 상온유통이 가능한 특별한 제품이라고 홍보를 하지는 않습니다.

5) 회사에 따라 같은 Taq이라도 특성이 다른가요?

Taq의 유전자 서열은 어떤 Taq이던 동일하지만 Taq을 어떤 방법으로 발현했으며 또한 어떤 방법으로 정제를 했고, 정제도는 어떠한지 그리고 Taq의 발현정제과정에서 여분의 서열을 넣었는지, Taq의 원래 서열에 변형을 주었는지에 따라 같은 이름의 Taq이라도 특성이 완전히 달라질 수 있습니다. 하지만, PCR의 기본 목적을 충족한다면 Taq의 특성차이가 큰 문제가 되지는 않습니다. 수율 좋고, 특이성이 높고, 정확하며 터무니 없는 가격만 아닌 것이면 됩니다. 그리고 회사마다 각자 최적의 buffer 조건을 제시하고 있으며 같은 Taq이라도 buffer에 따라 활성도에 있어 차이가 날 수 있습니다.

6) PCR 반응시 우선 고려해야 하는 요인은 무엇인가요?

PCR의 최종목적은 원하는 유전자 조각만을 증폭하여 얻는 것입니다. PCR에서 가장 중요한 요소는 기질 DNA, primer, Taq과 PCR 조건, 그리고 PCR cycler입니다. 일반적으로 Taq이나 PCR 조건은 표준화되어 있기 때문에 결과가 나오지 않을 경우에는 다른 기질/primer조합으로 troubleshooting을 쉽게 할 수 있지만 사용하는 기질에 문제가 있거나 primer가 잘못 디자인 또는 합성되었다면 PCR은 결코 성공할 수 없는 것이므로 기질과 primer가 가장 중요한 요인이라 할 수 있습니다. 저도 잘못 디자인된 primer를 얻어 썼다가 6개월을 고생한 기억이 있습니다. 그 이후에는 결코 남이 디자인해놓은 primer는 사용하지 않고 있으며 primer를 디자인 할 때면 항상 primer의 디자인 규칙에 충실하려 노력하고 있습니다. 이는 기질 DNA의 경우에도 마찬가지이며, DNA가 깨졌거나 또는 정제도가 좋지 않은 경우 원하는 결과와 다른 결과가 나올 수도 있고, 또한 기질의 양이 너무 적거나 높은 경우에도 문제가 발생할 수 있습니다.

결과가 나오지 않을 경우, 기질 DNA의 양을 늘리고 사용하는 Taq의 양을 늘리고자 하는 것은 모든 사람의 심리이지만 결과는 점점 더 나빠지는 것이 흔히 있는 일입니다. 이런 경우에는 양을 늘리고 줄이는 일을 통해 문제를 해결하기 보다는 다른 기질/primer조합으로 전반적인 system에 문제가 없는지 먼저 확인하고 사용하는 기질과 primer에 문제가 있을 수 있다는 가정으로 이후 실험방향을 재설정하는 것이 좋습니다.

7) PCR을 하고 나면 volume이 줄어 있어요?

PCR은 고온에서 진행되는 반응인 만큼 tube내의 PCR 용액은 항상 고온에 노출되게 됩니다. 초기에는 mineral oil을 overlay로 용액 위에 놓아 PCR 용액의 증발을 막는 방법을 사용했지만, PCR 기술이 보편화되고 PCR 샘플의 수가 많아지면서, tube에 일일이 mineral overlay를 넣는 것은 아주 불편하고 시간을 소모하는 작업이 되었습니다. 더군다나 PCR tube가 200 μ l로 표준화되다시피 하면서, overlay를 주는 방식은 거의 사라지게 되었습니다. 현재의 PCR 기계들은 용액의 증발을 막기 위해 tube의 상충부를 105°C정도로 높여주는 방법을 채택하게 되었는데, PCR 기계를 열었을 때 tube의 뚜껑이 맞닿는 검은 판이 이러한 역할을 해주고 있습니다.

PCR을 하는 과정에서 상충의 열 판이 느슨하거나 또는 너무 눌러 tube가 찌그러지는 현상이 나타나게 되면 PCR 반응 후 용액의 volume은 현저히 줄어드는 결과가 나올 수도 있습니다. 이런 경우에는 열판의 장력조절 나사를 조절하여 적절한 압력이 유지되도록 조정을 해주어야 합니다. (방법을 모를 경우에는 구입처에 문의해야 합니다.)

PCR tube의 경우에 있어서도, 뚜껑이 느슨하거나 또는 뚜껑과 몸통이 맞닿는 부위가 짧은 tube의 경우, PCR 용액의 증발원인이 될 수도 있으므로 tube의 선정에 있어서도 주의를 해야 합니다. 하지만 이 역시 PCR 기계의 열판 압력과 온도가 적절하다면 충분히 예방할 수 있는 내용입니다. 기계적 결함이 심한 경우에는 mineral oil을 사용해 보는 것도 한 방법입니다 (mineral oil은 밀도가 낮은 light oil을 사용하시고 사용 전, autoclave로 멸균해야 합니다.)

8) Hot start PCR이 무엇인가요?

PCR 과정에서, 처음 denaturing 과정으로 온도가 상승하는 시간 동안에도 Taq는 활성을 가지고 있습니다. 더군다나 상온의 낮은 온도에서 94°C나 95°C로 온도가 서서히 올라가므로 이 과정에서 primer간 또는 primer와 주형 DNA의 비특이적 결합이 발생할 수 있고 또한 낮은 온도에서도 Taq는 일정부분 활성을 가지므로 비특이적으로 결합된 primer로부터 DNA가 합성될 수 있습니다. 이렇게 합성된 DNA는 비특이적인 합성과정을 거쳤더라도 다음 PCR 과정에서 primer와 100% 상보적인 서열을 갖는 주형으로 이용될 가능성이 높아지게 됩니다. 그러한 결과는 비특이적 band로 나타나게 되는데, 이를 줄이는 방법으로서 PCR mix의 온도가 denaturing 온도에 도달했을 때, Taq 효소만을 별도로 첨가해 주는 방식이 개발되었고 이와 같은 원리에 근거하여 "Hot Start PCR"이라 부르게 되었습니다. 이러한 방식을 사용했을 경우, 초기 denaturing으로 온도가 상승하는 과정에서는 DNA의 중합이 이루어지지 않고, PCR mix는 설정해 놓은 annealing 온도 이하로 떨어지지 않으므로 그만큼 비특이적 산물의 생성을 억제하게되고 원하는 산물만을 얻을 수 있는 방법으로 이용하게 되었습니다.

현재는 기계적인 방법보다는 항체나 또는 Taq 효소의 화학적 변형, 그리고 DNA 결합단백질을 이용하는 방법이 주류를 이루고 있으며, 항체가 Taq 효소에 특이적으로 결합함으로써 낮은 온도에서는 Taq의 활성을 억제하고 있다가 높은 온도가 되면서 상대적으로 열에 약한 항체가 떨어져 나와 Taq이 활성을 갖게 되는 원리의 방식입니다. 하지만 모든 PCR 반응에 항체를 이용한 hot start 방식을 적용하기에는 비용적인 부담이 만만치 않으며 또한 비특이적 band는 primer의 이상적인 디자인과 PCR 조건, 그리고 PCR additive로 사용하는 몇 가지 화학물질의 첨가만으로도 적절히 억제될 수 있기 때문에 큰 장점을 가지고 있지 않습니다. 더군다나 2-3개의 PCR tube를 이용할 경우에는 Taq를 denaturing온도에 도달했을 때 별도로 넣어주는 방법으로 쉽게 hot start PCR을 할 수 있습니다.

PCR 반응에서 non-specific 중합반응의 90% 원인은 primer가 일차 상승온도에서 비특이적으로 결합하기 때문으로서 (primer간 또는 primer와 기질간), primer 서열내에 특이한 구조를 넣어 비특이적 결합을 억제하는 방법도 시도되고 있지만 이도 hot start PCR의 애초 목적을 달성하기 위해 변형된 방법일 뿐 어떤 방식을 통해 hot start PCR을 구현하느냐는 결국 편리성과 가격적인 문제에 모든 해답이 있다고 할 수 있습니다. 결론적으로 primer만 원칙에 입각해 잘 디자인한다면 비싼 비용을 지불할 이유가 없습니다.

Hot start PCR이 빛을 발할 때는 특이성이 떨어져 non-specific band가 많거나 또는 primer의 상태가 좋지 않아 생기는 primer-dimer에 의해 증폭하고자 하는 산물의 양이 현저히 감소할 때입니다. 일반적으로 잘 나오는 PCR 조건에서는 hot start 방식의 PCR을 쓴다고 해서 결과가 더 좋아지는 것은 아닙니다.

9) Primer dimer는 무엇이며 왜 생기는 것인가요?

Primer dimer는 primer끼리 비특이적으로 결합한 후 Taq 효소에 의해 생성되는 PCR 산물로서 보통은 100 bp이하의 크기로 만들어 집니다. Primer내에 hair-pin 구조가 있거나 또는 primer간에 결합할 수 있는 약간의 상동성이 존재하는 경우에 쉽게 나타날 수 있지만, 몇 가지 방법으로 primer dimer의 생성을 막을 수 있습니다.

각 primer를 섞지 말고 별도의 tube에 보관하며 사용하기 직전 온도를 상승시켜 primer내의 이차구조가 없어지도록 하고 다시 이를 사용하기 전까지 얼음 위에 보관합니다 (얼음 위에서는 이차구조가 재형성되지 않습니다.) PCR mix를 얼음 위에서 만들고 PCR 기계에 넣기 전까지 얼음 위에 보관합니다. Primer는 가능한 이차구조나 상동성이 없도록 디자인하며 5'쪽에 GC 함량이 높게 디자인하여 기질과 primer의 결합이 3' 쪽이 아닌 5' 쪽부터 이루어지도록 하는 것이 좋습니다. PCR에 첨가하는 primer의 양은 가능한 20 μ l 반응당 5 pmol을 넘지 않도록 해주는 것이 좋습니다. 그래도 primer dimer의 형성이 과도하게 나타난다면, hot start PCR을 하거나 또는 annealing 온도를 조절하는 하는 방식으로 최적의 조건을 얻도록 노력해야 합니다.

Site-specific mutagenesis에서처럼 100% 상동성을 갖은 primer쌍을 PCR에 이용하는 경우에는 위에서 말씀드린 내용 중, primer의 별도 보관과 얼음위에서의 혼합작업이 primer dimer의 형성을 줄이는데 많은 도움이 될 수 있습니다.

결론적으로 primer dimer는 특이적 산물의 증폭이 적을 수록 더 많이 나타나는 경향을 보이며, 특이적 band의 크기가 작은 경우에 전기영동 분석에 있어서 방해작용을 할 수는 있지만, 보통 100 bp이하로 나타나므로 PCR산물의 크기를 300 bp 이상으로 설정한다면 크게 문제되지 않는 내용입니다. 하지만 전기영동 분석이 아닌 전체 산물을 흡광도로 읽어야 하는 real-time PCR의 경우에는 아주 중요한 문제로 대두되므로 반드시 이와 관련된 내용을 숙지하고 있어야 합니다.

10) Primer는 어디에 어떻게 녹여야 하나요?

특수한 목적이 아닌 이상 PCR에 사용하는 primer의 농도는 반응당 5-10 pmol을 넘지 않습니다. Primer의 농도는 사용자에게 따라 전체 몰수로 표시를 하기도 하며 몰농도로 표시를 하기도 하지만 제 사건으로는 몰수로 표시하는 것이 더 편합니다. Primer는 주문시 몰수를 기준으로 하는데 이는 primer를 합성할 때 사용하는 resin의 initiator 몰수에 의해 최종 합성량이 결정되기 때문입니다. 또한 primer는 몰수와 절대량으로 표기가 되어 공급되며, 가령 10 nmol이라 했을 때 100 μ l의 물을 넣어 주면 stock은 100 pmol/ μ l가 되므로 기억하기도 쉽습니다. PCR에 첨가하는 primer는 최종 10 pmol/ μ l로 다시 1/10 희석하여 이중 0.5-2 μ l를 PCR mix에 넣으면 됩니다.

건조된 상태로 제공되는 primer는 상온에서도 상당히 안정하여 오래 보관이 가능하지만 용액으로 만들었을 경우에는 깨질 수도 있습니다. 이는 용액에서 불안정하여 깨지는 것이 아니라 용액에 오염되었거나 또는 앞으로 오염될 수 있는 nuclease에 의한 것입니다. 이러한 이유로 primer 제공회사에서는 EDTA가 포함된 (EDTA는 nuclease의 inhibitor입니다) TE buffer에 녹일 것을 권장하고 있습니다. 물론 저 같은 경우는 항상 증류수에 primer를 녹이고 있지만 초보자의 경우에는 꼭 주의해야 할 내용입니다. PCR에 직접 사용할 희석된 primer는 일반 증류수를 사용해도 크게 문제될 것은 없지만 이 경우에도 primer가 오염되지 않도록 신경을 써주는 것이 좋습니다.

Primer의 보관은, 100 pmol/ μ l stock의 경우엔 -20°C, 10 pmol/ μ l로 희석한 후에는 4°C에 보관하는 것이 좋습니다. Primer는 물리적인 힘에 의해 깨지는 않지만 화학적 작용이나 효소의 작용에 의해 깨질 수 있으므로 stock은 항상 안전하게 -20°C로 보관하는 것이 바람직합니다.

11) PCR tube는 어떤 것이 좋을까요?

요즘 PCR은 대부분 96 well type의 0.2 ml thin wall tube를 사용하는 방식으로 바뀌어 있습니다. 예전처럼 0.5 ml의 tube를 사용할 때처럼 tube의 재질이나 두께를 일일이 확인하고 PCR이 정상적으로 되는지 검증해 보는 번거로움이 그만큼 사라졌습니다. 그러나 여전히 PCR tube의 선정에 있어서는 주의가 기울여야 합니다. 요즘 방식은 예전처럼 oil overlay를 얹어 증발을 막는 방식이 아니라 PCR 기계의 상판에 일정한 온도로 열을 가해 증발을 막는 방식으로 바뀌었기 때문에 tube의 모양이나 재질이 중요한 요인으로 인식되고 있습니다. 높은 온도에 의해 tube가 녹는지, 뚜껑부위가 약해 tube와의 틈이 생겨 증발이 발생하지 않는지 등을 고려해 봐야 합니다. 이 때문에 PCR tube의 뚜껑은 열고 닫을때 다소 뻑뻑한 느낌이 들어야 좋으며 뚜껑과 맞닿는 목부위는 다소 단단하게 느껴지는 것이 좋습니다. PCR 기계의 열판이 부실해서 뚜껑이 많이 놀리는 기계를 사용하고 있다면 동 형태의 tube보다는 평평한 형태의 tube가 좋습니다.

12) PCR 기계를 사고자 합니다. 어떤 점을 고려해야 하는지?

당연한 얘기지만, 잔 고장이 없는 기계가 가장 좋은 것이라 할 수 있습니다. 그리고 반드시 사전에 스펙을 확인해야 하며, 애프터서비스 기간도 확인해야 합니다. PCR은 온도의 상승과 하강이 반복되며 고온에 노출되는 기계이므로 고장이 없을 수는 없지만 이는 제조사에 따라 많이 달라집니다. 주위의 평가를 참조해 보는 것도 좋은 방법입니다.

PCR 기계의 스펙을 보면 ramping time이라는 것이 있습니다. 초당 상승속도와 하강속도를 의미하는 것으로서 빠를 수록 전체적인 PCR 반응은 빨라집니다. 제조사와 기계에 따라 ramping time에 차이가 많으며, 어떤 경우에는 ramping time을 현저히 줄여 표기함으로써 기계상에 표시되는 반응시간과 실제 소요되는 시간이 다를 수 있어 주의를 요합니다. 구입을 결정하기 전 반드시 이점에 대해 영업사나 제조사에게 확인을 해두는 것이 좋습니다.

현재 많이 사용되고 있는 PCR 기계들은 상판으로부터 열을 발생시켜 tube 내 용액의 증발을 막는 방식을 채택하고 있습니다. 하지만 누르는 방식에 따라 열이 고루 전달되지 않아 tube 간 부피차이가 발생할 수 있고 어떤 경우에는 tube가 눌러 찌그러지는 경우도 발생할 수도 있습니다. 정확한 정량을 하고자 하는 경우에 부피의 감소는 전체적인 부피대비 PCR 산물의 양에 있어 오류를 일으키므로 이러한 현상이 나타나지 않는지도 꼭 확인을 해봐야 합니다.

제가 생각하는 PCR 기계의 우선 순위는 가격입니다. 국산장비가 개발되어 판매되고는 있지만 대부분이 수입산이며 유통비용이 높아 대부분 고가입니다. 하지만 생각해 볼 때 단순히 온도 올리고 내리는 기계가 자동자 가격과 맞먹는다는 것은 이해하기 어려운 현실입니다. 장비의 특수성과 소비자의 특수성을 고려한다 해도 납득하기 어려운 것으로서 우리 모두가 더 노력해야 하는 대목입니다.

13) 같은 효소, primer, 그리고 주형을 가지고 우리 실험실에서 PCR을 하면 안 되는데, 다른 실험실의 PCR 기계를 이용하면 잘 나옵니다. 무엇이 문제인지?

PCR기계의 정상적인 작동이 의심되는 경우로서 액정에 표시되는 것은 정상이지만 실제 온도 profile이 표시되는 것과 다를 수 있습니다. 이런 경우, PCR 제조사에 의뢰해 보정 (calibration)을 반드시 받아야 합니다.

14) PCR 산물의 보관은 어떻게 하나요?

PCR이 끝난 후 산물은 -20°C에 보관하시면 됩니다. 4°C에 얼지 않도록 보관해 두는 것도 한 방법이며 2-3 개월이 지나도 큰 문제는 없습니다만, 가장 안전한 방법은 -20°C에 보관해 놓는 것입니다. PCR 산물은 DNA입니다. DNA는 물리적 힘에 의해 깨지지 않습니다. 또한 PCR은 94°C를 넘나들며 반응이 이루어진 상태이므로 주변환경에서 오염될 수 있는 DNA 절단효소가 설령 반응 초기에 오염되었다 할지라도 PCR이 끝난 후에는 살아남아 있을 수 없습니다. 하지만 뚜껑을 열고 pipette tip을 한번 넣었다면 이로 인해 새로운 DNA 절단효소의 오염이 발생할 수 있습니다. 이를 위해 효소가 활성을 갖지 못하는 -20°C에 열려 보관하는 것을 권장하는 것입니다.

15) PCR과 RT-PCR의 다른 점은 무엇이며 RT-PCR 시 가장 주의해야 할 내용은 무엇인가요?

PCR이나 RT-PCR은 DNA 단편을 증폭한다는 점에 있어서는 동일하지만, 그 최초 주형이 무엇이냐에 따라 다른 내용일 뿐입니다. RT-PCR은 최초 주형이 RNA로서 RNA는 Taq의 직접적인 기질로 사용될 수 없으므로 사전에 역전사과정 (reverse transcription)을 통해 cDNA로 합성하는 과정을 선행합니다. 역전사과정에서는 역전사 효소 (reverse transcriptase, 이하 RT 하겠음)가 사용되며, RNA로부터 oligonucleotide priming후 RNA에 상보적인 cDNA를 합성하는 효소입니다. 합성된 cDNA는 single stranded DNA로서 PCR의 주형으로 사용될 수 있습니다.

RT 과정에 사용하는 효소는 주로 MMLV와 AMV 등 RNA를 genome으로 가지는 virus의 polymerase gene 산물을 발현하여 정제한 것들이며 각각은 미세한 특성차이가 있어 PCR 과정 또는 cDNA library 구축과정에 선별적으로 사용되고 합니다.

PCR이나 RT-PCR이나 제품으로 제공되는 구성물들은 다양한 QC 과정을 거친 후 공급되고 있으므로 PCR 실패시 우선 고려해야 하는 내용은 primer의 적절성과 주형의 적합성이라 할 수 있습니다. PCR에 사용하는 gDNA나 또는 plasmid DNA도 정제과정이나 보관과정에서 깨질 수는 있지만 특별한 경우가 아니고서는 크게 염려할 수준은 아닙니다. 하지만 RT-PCR에서 최초 주형인 RNA는 극도의 주의와 경험이 요구되는 어려운 재료입니다. RT-PCR에서 실패하는 원인의 90% 이상이 RNA 시료의 부적합성이라 해도 과언이 아닐 만큼 RNA의 quality 유지는 매우 중요합니다. 따라서 새로운 실험에 앞서 정제한 RNA가 PCR에 적합한지 agarose 전기영동을 통해 미리 확인해 보는 작업과 함께 기존에 잘 나왔던 primer 조합을 이용해 지금 정제한 RNA에서도 같은 결과가 나오는지 사전에 확실히 해둘 필요가 있습니다. RT-PCR 자체는 아주 쉽습니다. 하지만 RNA를 다루는 일은 그렇지 않습니다.

16) Double 또는 single stranded DNA 모두 PCR의 주형이 될 수 있나요?

네! 모두 PCR의 주형으로 사용될 수 있습니다. 이는 primer가 양쪽 모두에 각각 붙을 수 있는 조합쌍으로 첨가되기 때문입니다.

17) Sense 그리고 anti-sense 가 어떻게 결정되나요?

Sense와 anti-sense는 항상 RNA 가닥을 기준으로 합니다. RNA의 서열이 sense이므로 RNA를 만드는 주형 DNA 가닥은 당연히 anti-sense가 됩니다. DNA는 이중가닥이며 RNA와 같은 서열을 sense strand 그리고 상보적인 반대 가닥을 anti-sense strand라고 합니다. 같은 원리로 sense DNA와 같은 서열의 primer를 sense primer, 상보적인 primer를 anti-sense primer라 합니다. RNA는 sense 서열이고 sense primer는 5' 방향 즉 왼쪽에 존재하므로 up-stream primer라고 하고 반대로 anti-sense primer는 down-stream primer라고 하기도 합니다.



18) PCR에서 마그네슘이 어떤 역할을 하며 농도가 중요한가요?

PCR에서 Mg^{2+} 는 Taq 효소의 조효소로서 반드시 필요한 물질입니다. PCR mix에 Mg^{2+} 를 넣지 않으면 Taq의 활성이 사라져 증폭산물을 얻을 수 없으며, 너무 많은 양으로 넣으면 활성이 극대화되어 비특이적 산물의 생성이 많아질 수 있습니다. Mg^{2+} 은 $MgSO_4$ 나 $MgCl_2$ 의 형태로 첨가되며 일반적으로 ~3 mM의 농도로 첨가됩니다. Taq의 종류에 따라 최적의 Mg^{2+} 이온농도가 달라질 수 있으므로 PCR을 시작하기전 최적의 이온 농도를 결정하는 것이 좋습니다. 하지만 많은 Taq 제품들에서 최적의 Mg^{2+} 이온농도가 미리 첨가된 buffer를 제공하고 있으므로 요즘은 실험자가 직접 농도결정을 하는 일은 흔치 않습니다.

19) RT 효소는 어떤 것을 사용해야 하나요?

RT 효소는 RNA를 기질로 cDNA를 합성하는 효소로서 MMLV나 AMV 등 RNA를 genome으로 가지는 RNA virus의 중합효소입니다. MMLV의 RT 효소가 최근에는 많이 사용되는 추세로서 wild-type의 MMLV RT 효소는 DNA 중합효소는 물론 RNase H 활성을 가지고 있습니다. 즉 cDNA 합성 후 기질로 사용된 RNA는 깨져 나가는 반응으로서 일반적인 RT-PCR에 보편적으로 사용될 수 있습니다. 돌연변이 도입으로 RNase H 활성을 없앤 RT H- 효소는 wild-type 효소에 비해 cDNA 합성길이가 길고 또한 반응 후 DNA/RNA hybrid가 생성되는 특성으로 인해 cDNA library의 제작이나 RACE PCR에 사용하곤 합니다. RNA의 이차구조문제로 인해 cDNA 합성 반응에 문제가 발생하는 경우에는 열 안정성을 가지는 thermostable RT효소를 사용하면 문제개선에 도움이 될 수도 있습니다. 일반적인 RT 반응은 37~42°C에서 이루어지며 이 온도에서는 primer의 non-specific binding은 물론 RNA의 이차구조가 다시 형성될 수 있지만 thermostable RT효소를 이용하여 55°C 이상의 높은 온도에서 반응을 하는 경우, 반응의 특이성은 물론 RNA의 이차구조형성으로 인한 cDNA의 서열변형을 방지할 수 있습니다. RT효소는 제조사마다 다양한 제품명으로 판매되고 있지만 결론적으로 앞서 말한 세가지 기능의 RT 효소들이 핵심입니다.

20) 키트를 구매하는 것과 개별 제품들을 구매하는 것의 차이는 무엇인가요?

키트는 실험에 필요한 개별 제품들과 control로 사용할 기질 그리고 primer쌍이 소량 포함된 종합세트일 뿐입니다. 초보자의 경우, 실험과정을 이해하는데 도움을 받을 수는 있지만 이 분야에서 키트의 구매비용은 개별 제품들을 구매하는 것보다 비싼 경우가 일반적입니다. 실험에 대한 이해도만 약간 있다면 개별 제품의 사용을 추천합니다. 또한 다른 회사 키트의 구성물 중 어느 하나가 바닥을 보였을 때 같은 성능의 같은 제품이라면 다른 것으로 얼마든지 보충할 수 있을 만큼 대부분의 제품들은 호환이 가능합니다.

21) Taq과 rTaq의 차이가 뭔가요?

효소는 그 자체로서 자연에 존재하는 것을 정제 가공한 것입니다. 원래의 균주로부터 다양한 방법으로 정제해 사용할 수도 있으며 효소의 유전자를 cloning하여 재조합 한 후 다른 발현 host를 이용해 발현하고 정제해 사용할 수도 있습니다. Taq은 전체를 포괄하지만 특별히 rTaq (recombinant Taq)이라 하면 재조합하여 정제한 Taq 효소를 의미합니다.

활성이나 사용법은 크게 다르지 않지만 제조사에 따라 추가기능이 부여될 수도 있으므로 다양한 제품명을 가질 수 있습니다.

실패 없는 PCR 실험법

1. Primer는 최소 하루 이상 요모조모 따져 본 후에 합성을 신청함
2. Complex sample의 경우, primer는 20-mer 이상을 사용
3. Primer 쌍간의 Tm 값 차이는 최소화 하고 Tm 값을 기준으로 annealing 온도 설정
4. 오염이 문제될 경우, PCR의 각 성분들을 소량 분주하여 보관
5. PCR이 잘 되었던 sample은 반드시 별도 보관하여 문제발생시 control로 사용
6. Sample을 포함한 모든 구성물들은 항상 권장량으로만 첨가
7. 능력자가 되기 전까진 Positive & Negative control을 반드시 실험에 포함
8. 최소 2년에 한번 정도는 PCR cycler의 calibration 수행
9. 나만의 Trouble shooting 매뉴얼을 제작
10. Data에는 반드시 일자와 자세한 실험조건을 기록하여 발생할 문제에 대비

PCR 반응시 문제점과 해결방안

대표적 문제	세부 현상	해결 방안
PCR 산물이 없거나 Background가 나타납니다	PCR band 주위로 smearing background가 나타납니다	1. 너무 많은 양의 Taq 효소를 첨가한 경우 - 50 μl 표준 반응에 1~2.5 unit의 Taq를 사용해야 합니다. 이렇게까지 했어도 또 background가 나타나는 경우에는 0.1~1 unit를 첨가합니다. 2. Annealing 온도가 너무 낮은 경우입니다. Annealing 온도를 primer의 T_m-2°C로 조정해봅니다. 3. PCR 산물의 크기에 비해 extension 시간이 너무 긴 경우로서 특히 extension rate가 좋은 Taq 효소의 경우에 발생할 수 있습니다. 권장하는 extension 시간에 맞게 조정해봅니다. 4. 주형의 양이 많은 경우로서 주형의 첨가량을 줄여봅니다.
	원하는 크기 이상에서 퍼져 나옵니다	1. 주형 DNA의 농도가 너무 많은 경우 - 주형 DNA를 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0.1 ng으로 희석하여 퍼지는 현상이 나타나지 않는 최적의 주형 농도를 결정해야 합니다. - gDNA의 경우에는 1~100 ng, plasmid DNA의 경우에는 0.1~10 ng, cDNA의 경우에는 1~100 ng의 주형을 사용해야 합니다. 2. 너무 많은 양의 Taq 효소를 첨가한 경우 - 50 μl 표준 반응에 1~2.5 unit의 Taq를 사용해야 합니다.
	Primer dimer가 많이 나타납니다	1. 사용중인 primer의 internal loop 형성 여부와 inter-, intra-dimer 형성여부를 프로그램으로 확인합니다. 확인결과 primer에 과도한 dimer 형성이 확인되면, primer를 다시 디자인해야 합니다. 2. PCR 용액 제조시, 얼음 위에서 작업을 합니다. Hot-start PCR의 경우에는 적정 온도 이하에서는 Taq 효소의 활성이 나타나지 않지만 그렇지 않은 경우, Taq 활성을 최대한 억제하기 위해 PCR 준비를 얼음 위에서 하는 것이 좋습니다. 3. PCR 반응시 구성물의 첨가는 증류수, buffer, dNTP, primer, template, Taq의 순서로 해야 합니다. 4. Hot-start 효소를 사용하거나 hot-start 방법을 사용해야 합니다.
	PCR 산물이 없습니다	1. 주형 DNA의 농도가 적절하지, primer를 포함하였는지 확인합니다. 2. Annealing 온도를 낮추거나, Gradient PCR을 수행하여 적절한 온도를 찾아 봅니다. 3. 수행한 cycle 수가 적을 수 있으니 5~10 cycle 정도 늘려서 해봅니다. 4. 너무 적은 양의 Taq를 넣었을 수 있으니, 적정 unit의 Taq를 넣어서 수행해봅니다. 5. 첨가물인 DMSO, BSA, 또는 Betaine을 넣어보거나, Hot-start Taq를 사용해 봅니다.
원하지 않는 PCR 산물이 나온 경우	PCR 산물의 크기가 예상과 다릅니다	1. 합성한 primer의 염기서열이 주형 DNA와 일치하지는, 다른 위치에 상보적 염기서열이 없는지 확인해 봅니다. 2. Annealing 온도가 적절치 않아, 비특이적 산물이 생긴 경우 일 수 있으니, 다른 온도를 확인해 봅니다. 3. 주형 DNA에 문제가 없는지 확인합니다. 오염의 우려가 있습니다. 4. Target 유전자의 변이체가 없는지 확인해 봅니다. 5. 큰 크기의 DNA 증폭에 적합한 Taq 효소인지 확인해 봅니다.
	PCR 산물의 염기 서열이 일치하지 않습니다	1. Taq 중합 효소의 fidelity 정도가 낮은 경우 에러가 생길 수 있습니다. High fidelity 기능을 가진 Pfu 중합효소를 이용하기 바랍니다. 2. PCR cycle 수를 줄이거나, extension 시간을 줄여보거나 바랍니다. 3. 주형 DNA가 손상을 입었을 수 있으니 새로운 샘플로 수행해 보기 바랍니다.
	하나 이상의 여러 비특이적 PCR 산물이 나타납니다	1. PCR 반응 mix를 만들 때 얼음 위에서 수행하며, hot-start Taq를 이용해 봅니다. 2. Annealing 온도가 적절치 않을 수 있으니, gradient PCR을 수행해 봅니다. 3. Primer의 특이성에 문제가 있을 수 있으니, 염기 서열을 확인해보고, 제작 프로그램을 이용하여 T_m 값과 GC 함량이 적절한지 확인해 봅니다. 4. 주형 DNA와 primer의 농도가 너무 높을 수 있으니, 낮추어서 수행해 봅니다. 5. Annealing 온도를 낮추어 봅니다. 6. 오염 우려가 있으니, 주형 DNA 없이 PCR을 수행해 봅니다.
	주형을 넣지 않은 샘플에서 PCR이 됩니다	1. PCR 반응에 사용하는 모든 구성물의 오염이 의심되므로 각 구성물들에 대한 순차적인 오염테스트를 시도해 봅니다. 2. PCR을 시행하는 주변환경을 청결하게 유지하고 락스 등을 이용해 자주 세척해 줍니다. 3. PCR에 사용하는 별도의 공간을 확보하고 실험에 사용하는 pipette이나 tip 그리고 시약은 별도로 관리해 줍니다.



잘못된 자료 저술의 사용은 모든 것을 망칩니다
엘피스바이오텍은 실험의 표준을 제시하고자 합니다

Real-Time PCR

2x Master Mix



HiPi Real-Time PCR 2x Master Mix (SYBR Green)

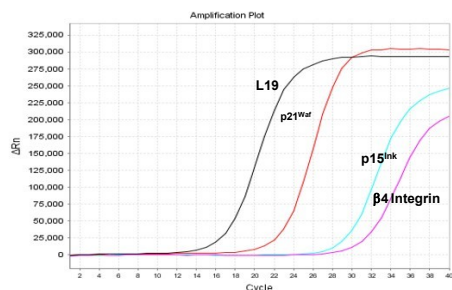
HiPi Real-Time PCR 2x Master Mix	1 ml	EBT-1801	100 reactions/20 μ l	2x ready to use mix	60,000
	5 x 1 ml				240,000

HiPi Real-Time PCR 2x Master Mix (SYBR Green, 2x ROX reference dye 포함)

HiPi Real-Time PCR 2x Master Mix	1 ml	EBT-1802	100 reactions/20 μ l	2x ready to use mix	60,000
	5 x 1 ml				240,000

50X ROX Reference Dye	1 ml	EBT-1821			60,000
-----------------------	------	----------	--	--	--------

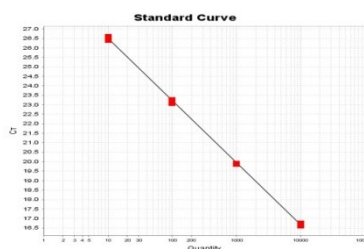
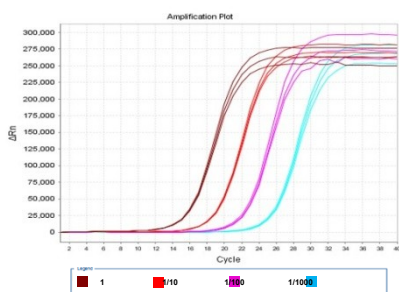
Real-Time RT-PCR



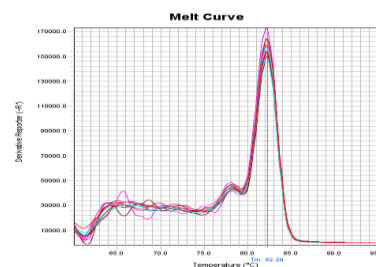
타사 제품간 효율 비교



Standard curve를 이용한 qRT-PCR 적용 예 : hActin



Target: Actin Slope: -3.274 Y-inter: 29.76 R²: 0.999 Efficiency: 102.035



Template : 1 μ l cDNA from 20 μ l RT reaction of 1 μ g 293 total RNA

* 위 결과는 ABI StepOne Real-Time PCR 기기를 이용해 얻은 결과입니다

Ultra Fast PCR Products

선택이 아니라 이제는 필수입니다

Fast PCR

rTaq Plus DNA Polymerase	500 unit	EBT-1318	5 unit/μl		120,000
rTaq Plus 5x PCR Master Mix	1 ml	EBT-1319	250 reactions/20 μl	5x ready to use mix	60,000

Fast HOT Start PCR

rTaq Plus HOT DNA Polymerase	500 unit	EBT-1612	5 unit/μl		140,000
rTaq Plus HOT 5x PCR Master Mix	1 ml	EBT-1614	250 reactions/20 μl	5x ready to use mix	80,000

Fast Long PCR

HiPi Super DNA Polymerase	500 unit	EBT-1302	5 unit/μl		260,000
HiPi Super 5x PCR Master Mix	1 ml	EBT-1604	250 reactions/20 μl	5x ready to use mix	120,000

Comparison of Total PCR Running Time with Common Taq

25 PCR cycles : Initial 95°C 3 min, annealing 60°C, no final 72°C extension
Takara DICE Thermocycler (ramping time : heating ~0.5°C/sec, cooling ~0.3°C/sec)

1 kbp PCR		10 kbp PCR	
rTaq Plus	Taq	rTaq Plus	Taq
47 min	78 min	66 min	171 min

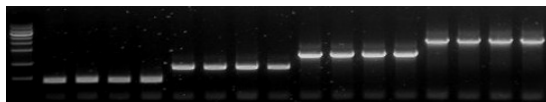
Extension Time :

rTaq Plus : 5 sec/kbp

Taq : 60 sec/kbp



Colony PCR using rTaq Plus Master Mix

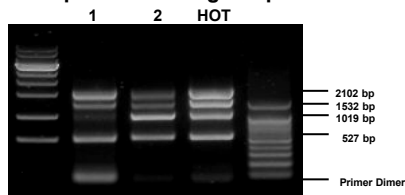


95°C : 3 min
95°C : 5 sec
60°C : 5 sec x25cycles
72°C : 5 sec

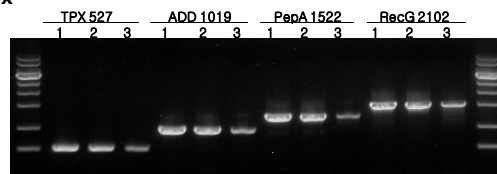
1 μl of overnight culture of *E. coli*
1 μl of vector primer pair (10 pmol)
4 μl of 5x rTaq plus master mix
20 μl total PCR reaction

5 μl is analyzed on a 0.7% agarose

Multiplex PCR using rTaq Plus HOT : High Size 4plex



1. rTaq
2. rTaq : manual hot-start
3. rTaq Plus HOT



1. rTaq Plus HOT
2. rTaq Plus
3. 국내 A사

NEW Pfu Plus

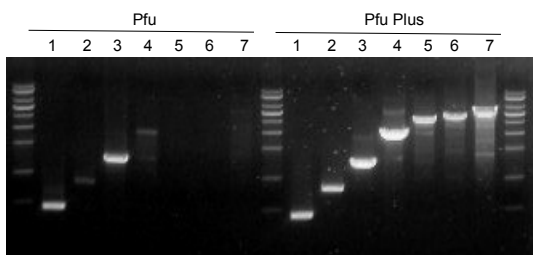
증폭율 UP
정확도 UP
특이성 UP

Pfu Plus DNA Polymerase	250 unit	EBT-1401	5 unit/μl		120,000
	500 unit	EBT-1402	5 unit/μl		200,000
Pfu Plus 5x PCR Master Mix	1 ml	EBT-1403	250 reactions/20 μl	5x ready to use mix	120,000

Features of Pfu Plus

Specificity	Fidelity	Yield	Speed	Max Size	3' end
★★★	★★★★★	★★★★★	★★	12 kbp	Blunt

Comparison of Pfu Products



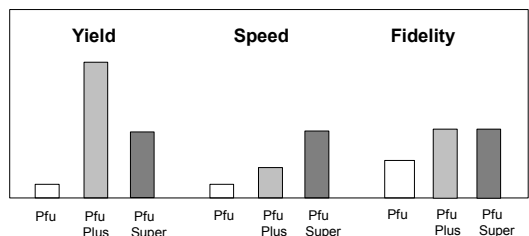
1. 443 bp
2. 842 bp
3. 1514 bp
4. 2852 bp
5. 4105 bp
6. 4502 bp
7. 5176 bp

1 ng Template
1 μl primer mix (5 pmol each)
20 μl total reaction
1 unit of DNA polymerases/reaction

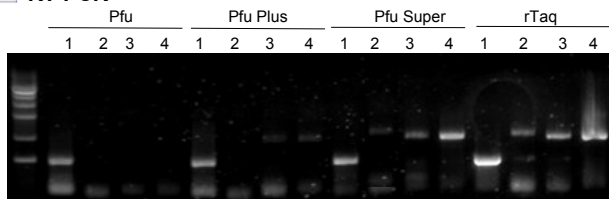
94°C 20 sec
60°C 20 sec x25 cycles
72°C 2.5 min

5 μl analyzed on a 0.7% agarose gel

Yield, Speed, Fidelity Comparison



RT-PCR



1. p21, 2. p53, 3. TBP, 4. GAPDH
60°C : 20 sec 72°C : 30sec x 35 (rTaq ≒ 30 cycle),
20 μl total vol. using 1 μl of 1/10 dilution of RT product
from 293 cell total RNA (1 μg)

권장 PCR 조건

Pfu Plus	1-2 kbp	3-5 kbp	> 6 kbp
Initial Denature 95°C	>3 min	>3 min	>3 min
Denature 95°C	20 sec	20 sec	30 sec
Anneal Tm-4°C	20 sec	20 sec	30 sec
Extend 72°C	30 sec	30 sec/1 kbp	30-60 sec/1 kbp

25-35 PCR cycles depend on input DNA

cDNA 합성 관련제품

mRNA 분석에 필요한 다양한 고품질 역전사 효소와 사용이 편리한 Master Mix 제품 그리고 RT 과정에 사용되는 Primer를 저렴한 가격에 공급해 드리고 있습니다.

응용실험 : mRNA의 검출/분석을 위한 모든 RT-PCR 반응에 사용할 수 있습니다.

Ordering Information

Products	Primer	Qty.	Cat. No.	Conc.	Price
M-MLV- RT H+ 5x Master Mix	Random hexamer	0.5 ml (125 rxn)	EBT-1511	4 µl /20 µl rxn	100,000
	Oligo d(T) ₁₅	0.5 ml (125 rxn)	EBT-1512	4 µl /20 µl rxn	100,000
	No primer	0.5 ml (125 rxn)	EBT-1513	4 µl /20 µl rxn	100,000
M-MLV- RT H- 5x Master Mix	Random hexamer	0.2 ml (50 rxn)	EBT-1531	4 µl /20 µl rxn	120,000
	Oligo d(T) ₁₅	0.2 ml (50 rxn)	EBT-1532	4 µl /20 µl rxn	120,000
	No primer	0.2 ml (50 rxn)	EBT-1533	4 µl /20 µl rxn	120,000
M-MLV- RT H- Thermostable 5x Master Mix	Random hexamer	0.2 ml (50 rxn)	EBT-1541	4 µl /20 µl rxn	150,000
	Oligo d(T) ₁₅	0.2 ml (50 rxn)	EBT-1542	4 µl /20 µl rxn	150,000
	No primer	0.2 ml (50 rxn)	EBT-1543	4 µl /20 µl rxn	150,000
Random Hexamer		50 µl	EBT-1522	100 pmol/µl	40,000
Oligo d(T) ₁₅		50 µl	EBT-1523	100 pmol/µl	40,000
RT Prime Kit		1 Kit (50 reaction)	EBT-1520		140,000
HiPi RT-PCR Kit		1 Kit (50 RT, 500 PCR)	EBT-1521		280,000

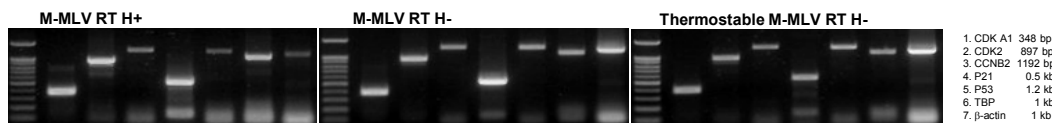
Features of Reverse Transcriptases

제 품	권장 온도	활성 온도	적용 실험
M-MLV RT H+	37-42℃	37-50℃	Product의 크기가 3kbp 미만인 일반적인 RT-PCR
M-MLV RT H-	37-42℃	37-50℃	큰 size의 RT-PCR, cDNA library 구축 목적의 RT
M-MLV RT H-, Thermostable	50-60℃	37-70℃	이차구조형성에 의해 증폭이 어려운 RT-PCR

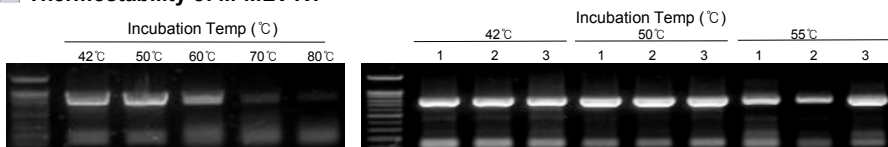


- Random Hexamer와 oligo d(T)를 RT primer로 이용할 경우 낮은 melting point로 인하여 온도가 높아지면 priming 효율이 떨어집니다.
Thermostable M-MLV RT를 사용하실 때 priming의 효율에 따라 cDNA 합성효율은 떨어질 수 있으므로 높은 온도에서 RT반응을 하실 때는 이에 적합한 primer를 선택하여 사용하셔야 합니다 (Gene specific primer의 사용을 권장)

Activity Test of M-MLV RT by RT-PCR



Thermostability of M-MLV RT



여러분 연구의 **"정확한 자"**가 되어 드리겠습니다



고객문의 : 042-581-8448
E-mail : elpis@elpisbio.com
URL : www.elpisbio.com

ELPIS-Biotech. Inc.
www.elpisbio.com