

효율적인 PCR을 위한

Pyrobest DNA Polymerase 조건설정 가이드

1. PCR 반응 조성

[효소량]

일반적으로 1.25 U/50 μ l PCR를 추천합니다. 단 증폭 사이즈, 주형의 순도 및 양에 따라 조절이 필요한 경우가 있습니다.

[주형 DNA 양]

주형 DNA의 권장 사용량은 다음과 같습니다.

인간 genomic DNA의 경우	50 ng~500 ng/50 μ l PCR
λ DNA의 경우	100 pg~10 ng/50 μ l PCR
Plasmid DNA의 경우	10 pg~100 pg/50 μ l PCR

단, DNA의 순도에 의해 조절이 필요한 경우가 있습니다. 보다 정확하게 목적 영역을 증폭하고 싶은 경우, 주형량을 충분히 사용하고, PCR cycle을 줄일 수 있습니다.

[Primer]

Pyrobest[®] DNA Polymerase의 경우 (3'→5'exonuclease 활성화에 의해 primer degradation이 발생할 수 있기 때문) 비교적 높은 농도의 primer를 사용하는 것을 권장합니다.

또한 3' 말단에 S를 가진 primer (S-Oligo)는 degradation 가능성이 낮고, 실제 S-Oligo primer에 의해 반응성이 향상하는 경우가 있습니다.

추천 농도	0.2 μ M~2 μ M
Primer size	25 mer~30 mer
(3'→ 5'exonuclease 활성화의 영향으로 long primer 가 유리하다.)	

※주의: Pyrobest[®] DNA Polymerase의 경우 이노신을 포함한 primer는 사용하지 않도록 해주세요.

Degenerated primer는 사용 가능합니다.

[dNTP 와 Mg²⁺]

dNTP 에는 킬레이트 작용이 있기 때문에, dNTP 농도를 높이면 유효한 Mg²⁺ 농도가 낮아 집니다.

Pyrobest[®] DNA Polymerase의 경우, 아래와 같이 권장합니다.

Mg ²⁺	1 mM (final conc.)
dNTPs	200 μ M each (final conc.)

일반적으로 과잉의 Mg^{2+} 에서 비특이적 반응이 일어나기 쉽고, 반대로 Mg^{2+} 농도가 불충분하면 반응성이 저하됩니다.

EDTA 등의 킬레이트제가 존재하고 있다면 유효한 Mg^{2+} 가 줄어들기 때문에 일반적으로 PCR 용액 중의 Mg^{2+} 농도는 dNTP 농도 (4종류의 total 농도)보다 높게 설정합니다.

또 dNTP의 농도가 낮으면 3' → 5'exonuclease 활성이 강해지므로 주의가 필요합니다.

각 dNTP의 농도에 차이가 있는 경우 misincorporation error이 일어나기 쉬우므로, 각 dNTP의 농도는 맞추는 것을 추천합니다.

※주의: Pyrobest® DNA Polymerase의 경우 dTTP 대신 dUTP를 사용하면 반응성이 저하됩니다.

2. PCR cycle 조건설정

[Initial denaturation]

Genomic DNA를 주형으로 하는 경우에서도 통상 94°C 1 min의 초기 변성으로 충분합니다.

[2 step PCR 또는 3 step PCR]

기본적으로는 2 step PCR (shuttle PCR)을 권장하지만, primer의 T_m 값이 낮아 2 step PCR의 반응성이 낮은 경우에는 3 step PCR을 권장합니다.

< 2 step PCR의 경우 >	98°C	1 sec ~ 10 sec	} 25~30 cycles
	68°C	1 min/kb	

< 3 step PCR의 경우 >	98°C	1 sec ~ 10 sec	} 25~30 cycles
	55°C	30 sec ~ 1 min	
	72°C	1 min/kb	

[Denaturation]

효소 불활성화, 주형 DNA 손상을 억제하기 위해 변성 시간은 짧게 합니다.

변성의 조건은 98°C의 경우는 1 sec, 10 sec, 94°C의 경우는 10 sec, 30 sec를 기준으로 하여 사용 기종과 튜브의 종류에 맞추어 설정하세요.

[Annealing/Extension 반응(2 step PCR), Extension 반응(3 step PCR)]

Pyrobest® DNA Polymerase의 반응 속도(약 25 bases/sec) 및 3' → 5' exonuclease활성에 의한 PCR 산물의 분해를 고려하여, 신장 반응 시간은 일반적으로 1~2 min/1 kb (68~72°C에서)로 설정합니다.

대부분의 경우 1 min/1 kb의 신장 시간이면 충분하므로, 불필요하게 오래 신장 시간은 피하세요.

[Annealing (3 step PCR)]

Annealing 온도는 가능한 primer의 T_m값에 가까운 온도를 설정합니다.

(primer T_m값) -5°C이 적당합니다.

Cycle마다 annealing온도를 낮추는 Touch Down PCR도 유효합니다.

Annealing 온도가 높을 때에는 증폭효율은 낮으나 특이적인 증폭이 가능합니다.

다음 증폭 때에 낮아진 annealing 온도로 반응하므로 증폭효율이 향상됩니다.

따라서 이 방법으로 비특이적인 증폭을 억제하면서 특이적인 반응을 높은 효율로 수행할 수 있습니다.

[Cycle 수]

정확도를 높이기 위해서는 cycle 수를 줄이는 것이 중요하며, 이 경우 주형양을 늘려서 사용합니다.

[Final extension]

Taq 계열 효소를 사용한 경우에 흔히 이용되는 PCR의 final extension 단계 (예를 들면, 72°C, 10분)는 smear의 원인이 될 수 있으므로 가급적 진행하지 않습니다.