

Polymerase chain reaction (PCR)과 PCR 증합효소연쇄반응기의 이해

2013. 12. 31

Il Shin Kim

UNIST Central Research Facilities (UCRF)





Polymerase chain reaction (PCR) 원리

DNA 또는 RNA 의 특정영역을 시험관(tube)에서 대량으로 증폭하는 기술

◆ PCR의 원리

- 1) 복잡한 전체 genome 중에 연구하고자 하는 유전자가 희귀유전자를 분석하고 연구하는데 가장 큰 문제점
- 2) PCR은 특정 DNA sequence의 copy 수를 기하급수적으로 증폭시킴
- 3) 단순하고, 쉽게 응용 할 수 있기 때문에 순수 분자생물학 분야 이외에도 의학, 이학, 농학, 수의학, 식품과학 뿐 아니라 고고학이나 인류학에 이르는 다양한 분야에서 그 사용 범위를 넓혀가고 있음

◆ PCR 구성 요소

- 1) DNA, RNA template: 증폭 대상이 되는 DNA, RNA
- 2) PCR Primers : 증폭할 부분을 잡는 짧은 염기서열
- 3) Taq polymerase : 열에 특별히 강한 유전자 합성효소
(*Taq polymerase: Thermus aquaticus* 라는 온천에 사는 세균의 DNA polymerase, 72°C 가 최적온도, 94°C 에서도 안정함)
- 4) dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) : 유전자를 합성하는 재료가 되는 각 뉴클레오티드 염기들
- 5) $MgCl_2$: $MgCl_2$ 은 dNTP와 복합체를 형성하여 효소활성, primer annealing 등에 관여

◆ PCR Primers Design

※ PCR Primer 디자인

Forward Primer: 5' - **ccc cgc ggt** - 3'

Reverse Primer: 5' - **ctt gtg tag** - 3'

※ OLIGO Primer Analysis Software 등의 primer 설계

소프트를 이용하여 최적의 배열을 선택하는 것이 중요함

- Tm(melting temperature) 값이 60 °C 전후가 되도록 설계

- Tm(°C) = [(nA + nT) × 2] + [(nC + nG) × 4] - 5

```

.....
ccccagatgacgacgaagcctgctagcactaggctcgacctagtgccgctctaggaagtsacsatcctattctc base pairs
ggggccaccgcggctccggacgactgctgatccagctggatcaccggcagagatcctcaststaggataagag 1 to 75
BstDSI KspI StuI AccI EaeI BstD102I
MspA1I CfrI SseBI HincII
SacII EaeI NheI
Ama87I BstSFI BstZI NgoMI Bsh1265I MspA1I
XmaI BcoI PstI EaeI BsaAI BsiEI NspB1I
AvaI Cfr9I NspB1I Xma11I MroNI BsaOI Ebv12I
tagaaaagtataggaacttcgatcccccggcctgacgcccggcctgtbasmastatctctaagatggctggc base pairs
atctttcatatccttgaagctaggggcccgacgtcccggccggcgacavtsktsatagagattctaccgaccg 76 to 150
BsoBI PspA1I EagI Eco52I Cfr10I FseI BsiHKA1
PspA1I SmaI MspA1I BsrFI NgoA1V BstMCI AspHI
Eco88I SfiI CfrI EclXI Bse118I NaeI Alw21I
BsaAI BsaI AseI
acgtaaaggggtctcaataaatgacctgaattgaatgaataacagtggtttctgacatcgctcccaagagc base pairs
tgcatttctcccagagttattatcggaaactaatctcttctgaccacaagacttagtaccggagttctctcg 151 to 225
Eco31I PshBI
AsnI
AccB1I
BanI
EcoNI
atttgcttttccctctcaccctctgaagggtgccagcgtgccctggcaggatgctctttctctgagggtg base pairs
taaacggaaaaggaggagaggaggagacttccacgggtccgacgggaccgctctacggagaaaagagaccaccac 226 to 300
Eco64I
Eco57I
BshNI
Mva1269I
BsaMI BseRI BstSFI PstI
gcattctctgctctctctaataactttcttttctccctctctcccccaactgacagagatgctttgtstg base pairs
cgtaaagacgagagagagatgatgagaaaagaaaagaggaggaggggggtgacgtctctacggaacasac 301 to 375
BsmI SfiI
EpiI
BpuAI
SphI Eco57I
gaactgtacggcccagcatgcggcctctgtttgatttctctggctgctctgaagactctgctcagtttgcc base pairs
ctgacatgcccgggtcgtacggcggagacaactaaagaggaccgacagagactctgagacaggtcaaacgg 376 to 450
PaeI Ebv161I
NspI EbsI
AccB1I NspI
Eco64I HindII
ctggtgggagcttgcataccctgggtgctatctgggccacaagtgaagtcaacatgctgccccaacaataa base pairs
gaccaccctcgaacgtagtggaccacggatagaccgaggttcaactcaagttgacggacggggttggttat 451 to 525
BanI HincII
BshNI
ApoI
EcoRI
EcoRV
tgcaaaaggtcactaaagcagtagaataatagcagggggccagcttgatcgaattctaccgggtagggg base pairs
acgtttccaagtgatttctgcatctttatatacgtcccggcgtcgaactatagcttaagatggccatcccc 526 to 600
Eco32I
AcsI
ErhI BbuI
Bsp1431I BssT1I SphI Bsp1431I
BstH2I Eco130I GsuI NspB1I BstH2I
aggcgttttcccacrvcaggcagctcggagcatgcgctttagcagcccgcctggcacttggcctacacaag base pairs
tccgcgaaaagggtgybygtccgtcagaccctcgtacgcaaatcgtcggggcagccctggaaccgagatgtgtc 601 to 675

```

◆ 반응액의 조성

1) 내열성의 DNA polymerase

: 반응에 사용하는 완충액의 조성이 다를 수 있으므로 주의

2) Mg^{2+} 농도

: 일반적으로 PCR 반응 에서는 1.5 ~ 2.5mM 의 Mg^{2+} 농도

※ PCR 상 Mg^{2+} 의 영향

- i) 효소 활성
- ii) primer 의 annealing
- iii) 합성된 DNA의 충실성
- iv) primer - dimer 의 형성

※ Tag polymerase 는 10mM $MgCl_2$ 에 의해 40 ~ 50% 저해($MgCl_2$ 를 과잉 첨가하는 것은 바람직하지 못함)

3) dNTP

: PCR의 효율, 특이성 면에서 20 ~ 200mM에서 양호한 결과를 얻음

※ dNTP 농도가 높으면 DNA polymerase 가 잘못된 dNTP를 intake 하는 mismatch 현상에 영향
dNTP 농도를 낮추면 PCR 특이성과 충실도가 높아짐 mispriming 이 감소

4) 주형 DNA . RNA

간편한 DNA 조제법

- i) 소수의 조직배양 세포를 비등한 증류수 속에서 가용화 하여 PCR에 사용
- ii) 사람의 머리털로 PCR을 증폭하는 다형분석
- iii) 포르말린으로 고정한 파라핀 조직을 조각으로 PCR

※ 주형 DNA 양(1-50ng)

- human genome DNA : 1ng
- 효모 DNA : 10ng
- 대장균 DNA : 10ng

◆ PCR의 세가지 반응단계

(1) DNA의 변성(denaturation), (2) Primer의 annealing, (3) 신장반응(extension)
세 가지 반응단계가 반복적 연쇄반응(cycle)으로 일어남

(1) DNA 변성 (Denaturation)

: 두가닥의 DNA를 94-95°C에서 15-30초간 처리
→ 각각 한가닥 DNA로 해리

(2) primer 의 Annealing

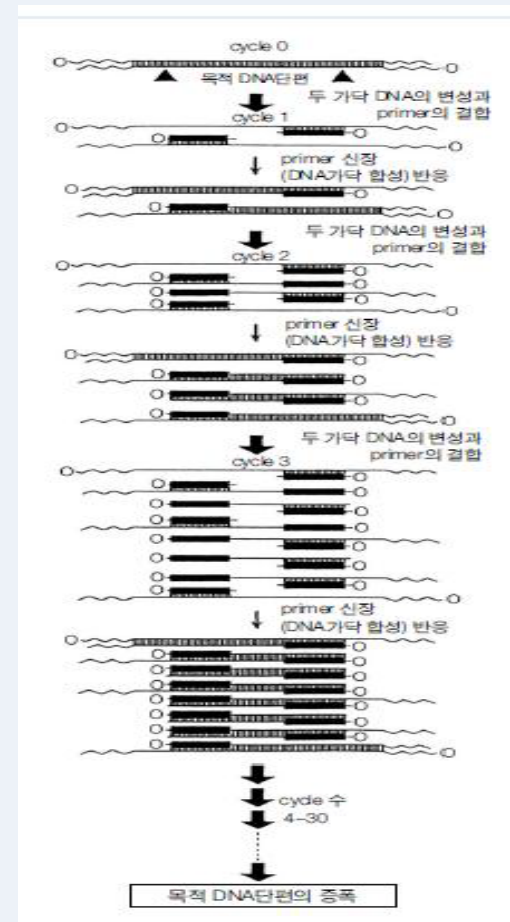
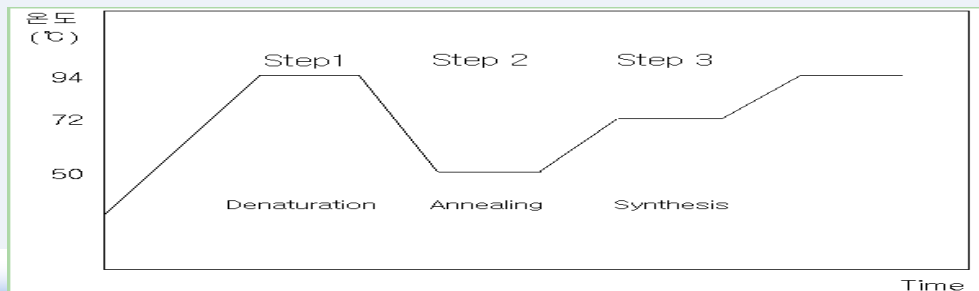
: 한 가닥으로 변성한 DNA 와 primer를 공존
2종류의 primer는 각각 상보적인 한 가닥 주형 DNA에 annealing 한다

(3) 신장 반응 (Extension)

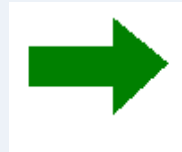
: 4종류의 기질 (dNTP : Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine)이 공존
DNA polymerase를 작용시켜 primer를 신장

- ※ 신장반응에 필요한 시간은 ① 주형 DNA의 농도 에 따라 좌우
② 증폭 단편의 크기
③ 반응 온도

Taq polymerase의 경우 72°C에서 30초~10분(1kb/min)



The Reaction



PCR tube

THERMOCYCLER

Mastercycler pro

Technical specifications

Description	Mastercycler® pro	Mastercycler® pro S	Mastercycler® pro 384
Thermoblock	Aluminum	Silver	Aluminum
Sample capacity:	96 x 0.2 ml PCR tubes or 1 PCR plate 8 x 12 (unskirted, semi-skirted, skirted – according to SBS standard)		1 PCR plate 384
Temperature control range of the block:	4–99 °C	4–99 °C	4–99 °C
Temperature control mode:	Fast, Standard, Safe; both available in gradient operation mode		
Heating technology of the block:	Peltier elements, Triple Circuit Technology		
Gradient block:	Over 12 rows	Over 12 rows	Over 24 rows
Gradient range:	1–20 °C	1–24 °C	1–20 °C
Gradient temperature range:	30–99 °C	30–99 °C	30–99 °C
Lid temperature range:	37–110 °C	37–110 °C	37–110 °C
Lid descent and closing pressure:	vapo.protect™ technology, with Thermal Sample Protection		
Block homogeneity:	20–72 °C	± 0.3 °C	± 0.3 °C
	95 °C	± 0.4 °C	± 0.4 °C
Block temperature accuracy:	± 0.2 °C	± 0.2 °C	± 0.2 °C
Heating rate*:	approx. 4 °C/s	approx. 6 °C/s	approx. 4 °C/s
Cooling rate*:	approx. 3 °C/s	approx. 4.5 °C/s	approx. 3 °C/s
Interfaces:	1 x Centronics®, 1 x RS-232, Control panel, one each of CAN_in/CAN_out		
Dimensions (W x D x H):	26 x 41.5 x 37 cm	26 x 41.5 x 37 cm	26 x 41.5 x 37 cm
Weight:	18.5 kg (40.8 lbs)	18.5 kg (40.8 lbs)	18.5 kg (40.8 lbs)
Power supply:	115 V or 230 V, 50–60 Hz	115 V or 230 V, 50–60 Hz	115 V or 230 V, 50–60 Hz
Power consumption:	950 W	950 W	950 W

* Heating and cooling rates measured at block

Master Cycler Pros의 작동 방법

모 델 명	Master cycler pros	제 조 사	Eppendorf
담 당 자	연구지원본부, 생체효능검중실 김일신 5211	업 체 명	와이제이사이언스 김영진 사장 054-272-2126

1. PCR 뒤쪽 왼편에 있는 전원 스위치를 ON으로 켜준다.
2. Control Panel의 문자 버튼으로 이름과 PIN 번호를 입력한다. (공용 PCR의 경우, 가급적 비밀번호는 형성하지 않는다)
3. Control Panel의 커서 혹은 마우스를 이용하여 사용자와 프로그램 파일을 선택한다.
4. 프로그램 화면에서 “Edit” 버튼을 눌러서 프로그램을 변경할 수 있다.
5. 먼저 왼쪽 하단에 “Header” 에서 Mastercycler “pro S” 외에 lid (뚜껑) 온도, lid function, control mode등을 설정한다.
6. 화면상에서 각각의 시간, 온도, cycle은 더블클릭하여 설정값을 변경할 수 있다.
7. “Options “에서는 gradient, time increment, temperature increment , ramping 속도 등을 설정할 수 있다.
8. control panel의 “STOP” 버튼 또는 화면상의 “STOP” 을 누르면 PCR 진행시에 일시정지가 가능하다.
9. “Resume” 일시정지된 PCR을 재실행이 가능하다.
10. “Abort” 는 PCR 진행을 취소할수 있다.
11. “Exit” 는 실행 중인 프로그램의 디스플레이 화면에서 퇴거가 가능하다.
12. “Status” 버튼 누르면 현재 진행 중인 PCR 과정이 디스플레이 된다.

Log book 작성

- 정확한 장비이용 방법을 습득한 후 장비이용
- 장비 옆에 비치되어 있음

순번	사용일자	시간	사용자	소속 / 연락처	비고
1	11월 26일	P.M 1:00 - 1:30	김영신	IVRC / 5211	
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

- 장비이용을 할때 반드시 log book 을 작성할것
- 사용일자, 사용시간, 사용자, 소속 및 연락처, 비고