

제한효소 처리된 Genomic DNA에 의한 Polymerase Chain Reaction 증폭 효율에 관한 연구

제한효소 처리된 genomic DNA 단편의 PCR 증폭 효과

현재까지 알려진 long-PCR 증폭을 위한 방법으로는 글리세롤, 높은 pH, 낮은 변성온도 그리고 짧은 변성시간 등을 이용하여 수행되어 왔다(1). 긴 사슬 genomic DNA 증폭을 위한 PCR은 주형의 양과 질, annealing 온도, 프라이머 합성, 완충액 조성, 변성 조건 그리고 dNTP/Mg 농도에 따라 그 결과가 좌우되지만, 2 kb 혹은 그 이상의 PCR DNA 단편을 얻을 수 없었다.

긴 사슬 genomic DNA의 PCR은 높은 온도에서 반응하면 depurination 또는 deamination되기 쉽다(3). 또한 긴 사슬 genomic DNA와 long-PCR 증폭 산물은 효율적으로 증폭하는데 방해가 되기도 한다. 이를 개선하기 위하여 DMSO와 글리세롤을 혼합하여 프라이머와 주형 DNA 2차 구조의 형성을 방지함으로써, long-PCR 단편을 증폭할 수 있었다(1). 일부 연구 결과는 개선된 완충액 조성, 반응조건 그리고 3'-exonuclease proofreading 활성과 비활성을 가진 thermostable DNA polymerase의 혼합에 따른 genomic DNA-PCR의 fidelity와 증폭효율이 개선되었다고 보고하였다(1). 그러나 이들 모든 조건은 원하는 long genomic PCR 단편을 얻는데 재현성과 증폭 효율성에 문제점이 제기되기도 하였다.

이러한 문제점을 극복하기 위하여, 제한효소로 절단된 genomic DNA를 사용하여 원하는 2 kb 이상 genomic PCR 단편을 얻을 수 있었을 뿐만 아니라 증폭 효율도 개선되었다. 100 ng genomic DNA는 α -그리고 β -tryptase를 특이적으로 인식하는 제한효소로 처리된 샘플과 처리되지 않은 샘플에 20 pmole 프라이머(sense primer, 5-GGACATTGAGGACTCGTAGGAG-3'; antisense primer, 5'-CGCTAATCCTCCTGAGTGCTGG-3'), 1X PCR 완충액, 0.5 mM MgCl₂, 그리고 2.5 U proofreading DNA polymerase mixture (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA)에 첨가하였다. PCR 반응은 25 ul master mixture에 dNTPs, 프라이머, 그리고 주형 DNA를 첨가하였으며, 다른 master mixture에는 PCR 완충액과 DNA polymerase를 첨가하였다.

PCR 수행은 hot-start 조건하에서 (95°C 에서 2 분), denaturation (95°C에서 30 초), annealing (60°C에서 30초), 그리고 extension (68°C에서 2.5 분) 반복하여 35 cycle 행하였다. 그리고 최종 extension 조건은 68°C 에서 10분 동안 행하였다. 원하는 genomic

PCR 단편은 2,487 bp 이었고, 이 PCR 단편은 3' end 와 open reading frame부터 5' end downstream 부분이 896 bp 포함되었다.

그림 1A에서 본바와 같이 제한효소로 처리되지 않은 genomic DNA 시료(lane 3)와 제한효소로 처리된 시료들, 즉 *EcoRV*-절단된 genomic DNA(lane 4), *BstEII*-제한효소 처리된 genomic DNA(lane 5)의 PCR 증폭 효율이 훨씬 좋은 것으로 나타났다. 또한 두 번째 실험에서는 제한효소로 처리되지 않은 시료(lane 6)에서는 원하는 genomic PCR 단편을 얻을 수 없었으나, *BstEII*로 제한효소 처리된 시료(lane 7)에서는 첫 번째 실험과 동일하게 genomic PCR 단편을 얻을 수 있었다. 또한 다른 제한효소로 처리된 genomic DNA PCR 증폭 효과 실험에서도 동일하게 원하는 genomic PCR 단편을 얻을 수 있었다. 이와 같은 반복 실험 결과를 종합해보면 long genomic PCR 증폭에 대하여 우수한 재현성을 나타냄을 알 수 있었다.

제한효소로 처리된 genomic DNA-PCR을 이용한 α - 또는 β -tryptase 유전자 분리

Genomic DNA로부터 특정 유전자의 분리는 일반적으로 phage genomic library로부터 southern blotting과 subcloning 등의 방법을 사용하지만, 많은 시간과 노동력이 소요된다. 제한효소로 처리된 genomic PCR는 간편하고 빠르게 목적하는 유전자를 분리 및 동정할 수 있다. 그러나 단일 genomic PCR 증폭 유전자는 쉽게 얻을 수 있지만, 두 종류의 유전자가 포함되어 있는 경우, 즉 α - 그리고 β -tryptase 유전자 분리는 사실 용이하지 않다. 왜냐하면 95% DNA 상동성을 가진 genomic DNA의 PCR은, 증폭 후 많은 heteroduplex DNA 단편이 존재하기 때문에 클로닝 효율이 떨어진다. 즉 이들 PCR 증폭 단편 내 특정 제한효소로도 절단되지 않은 많은 PCR 단편들이 존재하게 된다.

α -tryptase는 PCR 증폭 단편 내에 *EcoRV* 와 *SacII* 두 가지의 제한효소 인식 부위가 존재하는 반면, β -tryptase는 *BstEII* 제한효소 하나만의 인식부위가 존재한다. 따라서 그림 1A에서 본바와 같이 lane 5와 lane 7에서는 단지 β -tryptase 만이 존재하며, lane 4에서는 α -tryptase 만이 있는 것으로 볼 수 있다. 그러나 제한효소 처리되지 않은 genomic DNA 샘플에서는 두 유전자가 함께 포함되어 있다고 볼 수 있다. 이런 가설을 입증하기 위해서 그림 1B와 같은 실험을 실시하였다.

BstEII 또는 *EcoRV* 제한효소로 처리된 genomic DNA 시료들

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 804-828-6322, Fax: 804-828-0283
E-mail: hkmin@vcu.edu

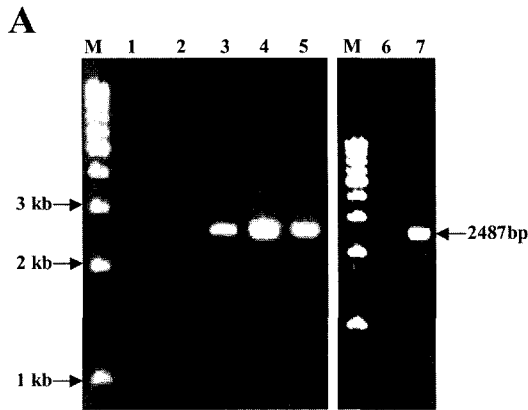


Fig. 1A. Amplification of restriction enzyme-digested and undigested genomic DNA by PCR. PCR was performed as described in text. Each amplified sample (5 ul) was subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel containing 1X TBE. The template corresponding to each lane is: (1) water, (2) pGL3 DNA vector as a negative control, (3,6) undigested genomic DNA and genomic DNA digested with (4) *EcoRV* and (5,7) *BstEII*. The molecular weight markers (M) in each panel are from a 1-kb DNA ladder (Promega Corp, Madison, USA). Lanes 3-5 and 7 show the expected 2,487 bp product.

을 이용한 PCR 증폭 단편들은 서로 다른 제한효소들, *EcoRV*, *BamHI*, *BstEII*, *XhoI* 그리고 *SacII*로 절단하였다. *BamHI* 제한효소 인식 부위는 α - 그리고 β -tryptases에서는 3 개의 *BamHI* 제한효소 인식부위가 존재하며, α -tryptase는 단지 한 개의 *EcoRV* 인식부위와 β -tryptase에서도 한 개의 *BstEII* 인식부위가 존재한다. 반면 α - 그리고 β -tryptases에서는 *XhoI* 제한효소 인식 부위는 존재하지 않는다.

그림 1B에서 본 바와 같이 *BstEII* 제한효소 처리된 genomic PCR 단편(α -tryptase)은 1개의 *EcoRV*(E), 3개의 *BamHI*(Ba) 그리고 1개의 *SacII*(S) 인식 부위가 존재한 것으로 나타난 반면, *BstEII*와 *XhoI* 제한효소 인식 부위는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 그림 1C에서 본 바와 같이 *EcoRV* 제한효소 처리된 genomic DNA PCR 단편(β -tryptase)은 1개의 *BstEII*와 3개의

BamHI 제한효소 인식부위가 존재한 것으로 나타났으며, *EcoRV*, *SacII* 그리고 *XhoI* 제한효소 인식 부위는 존재하지 않은 것으로 나타났다. 제한효소 처리되지 않은 샘플 PCR 단편에서는 (그림 1B와 C) *EcoRV*(E) 그리고 *BstEII*(GBc) 제한효소 처리 후에도 hetero-duplexs DNA 단편이 존재하였다.

결론적으로 제한효소로 처리된 genomic DNA PCR은 기존의 다른 방법보다 long genomic PCR 단편을 효율적으로 증폭할 수 있으며, 각각 원하는 단일 유전자 DNA를 얻을 수 있었다. 이는 PCR에 이용되는 주형으로써 본래의 genomic DNA를 사용한 것보다 절단된 genomic DNA를 이용하면, PCR 반응시 annealing 을 저해하는 2차 구조의 형성을 방지할 수 있을 뿐 만 아니라, template DNA 변성에 있어서도 보다 효율적으로 작용하는 것으로 생각된다. 따라서 이러한 방법을 이용하면 DNA 상동성이 높은 주형 DNA로부터 목적인 단일 유전자의 PCR 단편을 다량 얻을 수 있는 장점을 가진 연구방법이라고 사료된다.

민해기^{1*} · 장영호²

¹Department of Internal Medicine, Virginia Commonwealth University, PO BOX 980263, Richmond, Virginia 23298

²한국생명공학연구원 생물자원센터

참고문헌

1. Cheng, S., C. Fockler, W.M. Barnes and R. Higuchi. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5695-5699.
2. Dieffenbach, C.W. and G.S. Dveksler. 1995. PCR primer: A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
3. Eckert, K.A. and T.A. Kunkel. 1991. In PCR: A practical approach, pp. 225-244. M.J. McPherson, P. Quirke, G.R. Taylor (ed.), (IRL, Oxford, UK)
4. Niu, L.L and A.M. Fallon. 1998. Retrieval of flanking DNA using a PCR-based approach with restriction enzyme-digested genomic DNA template. *BioTechniques* 26, 630-634.
5. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi,

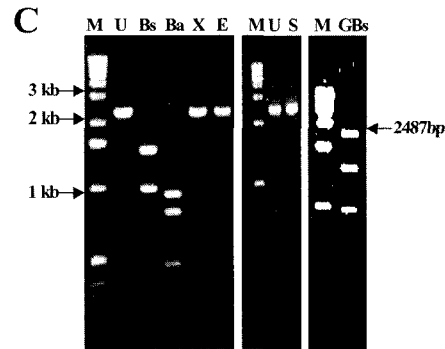
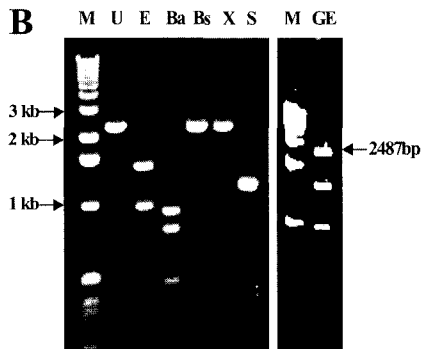


Fig. 1B and 1C. Analysis of PCR products from restriction enzyme digested genomic DNA. PCR was performed on genomic DNA digested with *BstEII* (1B) or *EcoRV* (1C) as described. Products were subjected to electrophoresis in a 1.5% agarose gel containing 1X TBE without being digested (U) or after digestion with either *EcoRV* (E), *BamHI* (Ba), *BstEII* (Bs), *XhoI* (X) or *SacII* (S) and amplification of undigested genomic DNA (U) or after digestion with either *EcoRV* (GE) or *BstEII* (GBs). The molecular weight markers (M) in each panel are from a 1-kb DNA ladder.

- Horn, G.T., K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. *Science*, 239: 487-491.
6. Shyamala, V. and G.F.L. Ames. 1989. Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR. *Gene* 84, 1-8.
7. Willems, H. 1998. Adaptor PCR for the specific amplification of unknown DNA fragments. *BioTechniques* 24, 26-28.

(Received August 2, 2004/Accepted September 6, 2004)

ABSTRACT : Treatment of Genomic DNA with Restriction Enzyme(s) Improves Amplification Efficiency by Polymerase Chain Reaction

Hae-Ki Min^{1*} and Young-Hyo Chang² (¹Department of Internal Medicine, Virginia Commonwealth University, POBox 980263, Richmond, Virginia 23298, USA, ²Biological Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Yuseong POBox 115, Taejeon 305-600, Korea)

Polymerase chain reaction (PCR) is a powerful tool for precisely amplifying selected DNA sequences that have had a broad impact on genomic studies. When examining human α - and β - trypsin genes which have 95% DNA homology, inconsistent PCR amplification of genomic sequences hampered our progress. This study suggests that long PCR technique on the original DNA digested with restriction enzymes improves both efficiency and sensitivity of PCR. These improved results seem to be derived from the effective denaturation of the original genomic DNA template or reduction of formation of secondary structures that block either primer annealing or extension in PCR. Elimination of homo- or hetero-duplex products derived from highly homologous genes provides an additional advantage in this study. This communication describes how the use of restriction enzymes improved these efficiencies, and also facilitated studies of highly homologous genes including trypsin genes.