

Application note

HawkZ05 Fast Polymerase를 이용한 분석법 최적화 가이드라인

July 2018

Sashi Nakerakanti Ph.D, Neeraja Sammeta, Ph.D

Roche Diagnostics Corporation

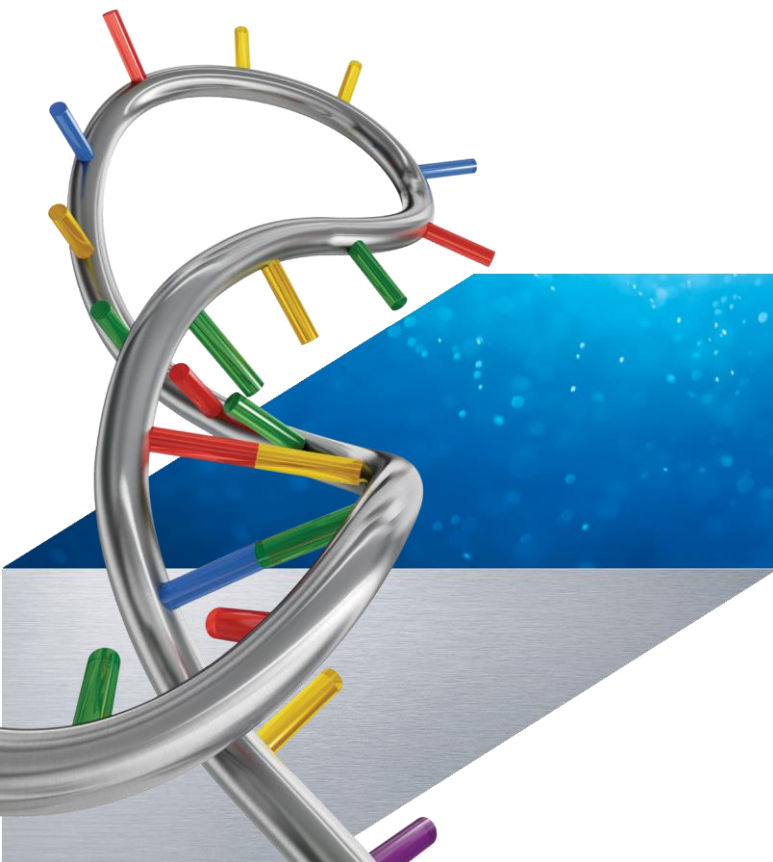
머릿말

Z05 Fast DNA polymerase는 호열성 진정세균인 Z05 균주로부터 분리한 Z05 polymerase의 돌연변이 효소로, 속도와 효율성이 증가된 효소입니다. RNA 그리고 DNA dependent polymerase 활성을 모두 가지고 있는 이 Z05 fast DNA polymerase는 하나의 효소로만으로 one tube에서의 one-step RT-PCR에 적용할 수 있습니다. 모든 HawkZ05 Fast 관련 제품은 열에 안정적이고 효소의 활성이 뛰어난 Z05 Fast 효소를 포함하고 있습니다.

HawkZ05 Fast Polymerase는 높은 온도에서도 좋은 결과를 얻을 수 있으며, inhibitor tolerance가 뛰어납니다. 이런 제품의 특징으로 인해 하나의 프로토콜로 다양한 샘플을 검출하는 등 복잡하고 다양한 타겟 검출에 용이합니다.

PCR분석에는 복잡한 여러 요인들이 작용하므로 최적의 조건을 찾는 것이 쉽지 않습니다. 이 application note의 첫 번째 섹션에서는 HawkZ05 Fast Polymerase의 기술적 성능에 대해, 그리고 두 번째 섹션은 어떻게 여러분의 실험에 이 효소를 최적화할 수 있는지에 대한 내용을 담고 있습니다.

반응 조건 및 최적의 결과를 얻을 수 있도록 도와주는 요소들이 무엇인지, 각 데이터와 함께 여러분의 분석법 개발에 도움을 줄 수 있는 가이드라인을 제공합니다.



For further processing only.

CUSTOMBIOTECH

목 차

HawkZ05 Fast의 강점	3
Hot start 특징	3
두 가지 polymerase 활성	4
PCR 저해제 내성	5
Multiplexing 능력	5
상온 안정성	7
동결 건조가 가능한 디자인	8
HawkZ05 Fast를 이용한 실험	9
실험 최적화를 위한 가이드라인	9
최적의 PCR 조건 잡기	9
필요한 cofactor의 영향 평가 및 적정 농도 설정	11
적절한 버퍼 조성 확인 및 선택	13
GC rich template 또는 복합적인 샘플 증폭 위한 첨가물	14
샘플에 존재하는 저해제의 영향 확인	15
결론	16
Appendix	17
Materials	17
References	18

HawkZ05 Fast의 강점

HawkZ05 Fast Polymerase은 참으로 다양한 기능을 가지고 있다 할 수 있습니다. Hot start 효소이면서 RNA와 DNA-dependent activity 두 가지 기능을 다 가진 dual polymerase 이고, 다양한 저해제가 있는 경우에도 효과적으로 적용할 수 있고, multiplexing이 가능하며, 동결 건조도 가능하기 때문입니다. 이제 이런 특징이 해당 효소에 어떤 강점으로 작용하는지, 분석 결과에는 어떤 영향을 주는지 살펴보겠습니다.

Hot start 특징

분자진단 분석법 개발에서 분석의 특이성은 필수적인 사항입니다.¹

높은 온도에서의 역전사 반응이나 고온으로 시작하는 Hot Start 작용은 비특이적 증폭산물을 막아주며, 분석 특이성을 높여주는 중요한 요소입니다.

열에 안정적인 Z05 Fast Polymerase는 고온에서 효과적으로 역전사 반응을 수행할 수 있고, 온도에 따라 효소의 활성을 가역적으로 조절할 수 있도록 aptamer가 첨가 되어 있습니다. 낮은 온도에서는 aptamer가 효소와 결합하여 활성을 억제하고, 55 °C 이상의 온도에서는 효소에 대한 aptamer의 결합력이 약해지면서, 60 °C가 되면 aptamer가 떨어져 효소는 완전히 활성화 됩니다. 반응 마지막 단계에서 55 °C 이하로 온도를 낮추게 되면, aptamer는 DNA polymerase에 다시 붙게 되고, 효소는 다시 불활성화 됩니다.

Figure 1은 HawkZ05 Fast Polymerase를 이용한 서로 다른 온도에서의 역전사 반응 결과에 대한 예시입니다. 그림에서 보는 바와 같이 완전히 효소가 활성화되는 60 °C에서 최적의 반응결과를 볼 수 있습니다. 50 °C와 55 °C에서는 여전히 효소가 aptamer와 어느 정도 결합하고 있기 때문에 불활성화 된 상태입니다. 그럼에도 불구하고 Multiplex 반응을 최적화 하기 위해서는, 55 °C와 60 °C, 그리고 필요에 따라 65 °C에서 2 단계 혹은 3 단계로 나누어, 역전사 시작 전에 온도를 잠깐 유지 하는 단계를 넣는 것이 좋은데, 이렇게 함으로 보다 우수한 특이성을 달성 할 수 있게 합니다. 아래 QR 코드로 Standard primer design guideline^{2,3}을 확인하시고, primer를 제작할 때 역전사 반응 및 PCR annealing과 extension 과정은 반드시 60 °C 또는 그 이상의 고온에서도 견딜 수 있도록 디자인하도록 합니다.

올바른 Primer 제작 가이드

여러분의 primer를 제작할 때 고려해야 할 사항 및 팁을 확인해 보세요.



<http://www.roche-applied-science.com/campaigns/DeveloperTips/pcr/Strategies-for-Designing-Good-Primers.html>

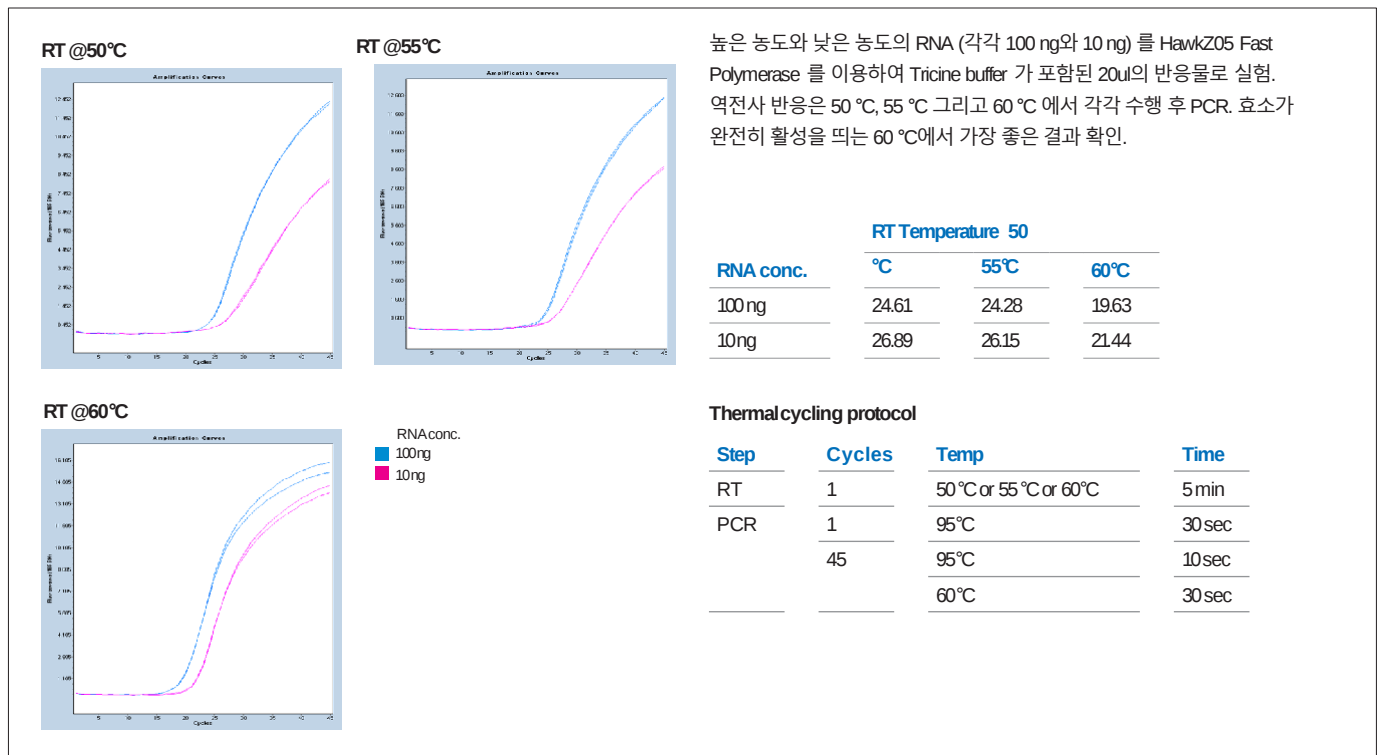


Figure 1: 최고의 실험결과를 위해 RT 반응. 최적 온도를 찾는 것은 매우 중요합니다.

두 가지 polymerase 활성

두 가지 polymerase 활성을 가진 HawkZ05 Fast Polymerase는 하나의 효소로 RT-PCR과 PCR을 모두 수행할 수 있으며, RNA와 DNA target을 하나의 반응에서 동시에 검출할 수도 있어 복잡한 실험과정을 줄일 수 있습니다. 하나의 반응에서 RNA와 DNA target을 동시에 검출할 수 있는 HawkZ05 Fast Polymerase의 능력을 체크해 보기 위해, 서로 다른 비율의 RNA (Hepatitis C Virus (HCV); low, medium, high)와 DNA (Human Papillomavirus (HPV); low, medium, high) target을 이용하여 duplex PCR (RT-PCR과 PCR)을 진행하였습니다(Figure 2).

두 분석물의 증폭은 DNA대 RNA의 농도 차이가 몇 자리수에 걸쳐 있는 경우에도 모두 잘 되었으며, Cp 값과 형광 값이 모두 혼합 반응에서 영향을 받지 않았습니다.

이처럼 혼합 반응을 디자인 할 때에는 Multiplex assay 설계 상의 이유 때문에 발생 할 수 있는 증폭의 효율과 민감도의 다양한 차이에 대해서 특정해 내야 합니다. 이때는 혼합 반응의 각 target인 RNA와 DNA가 서로 다양한 농도로 존재하는 경우를 감안하여 각 경우의 target에 대한 증폭 효율이 어떠한지 평가 해야 합니다.

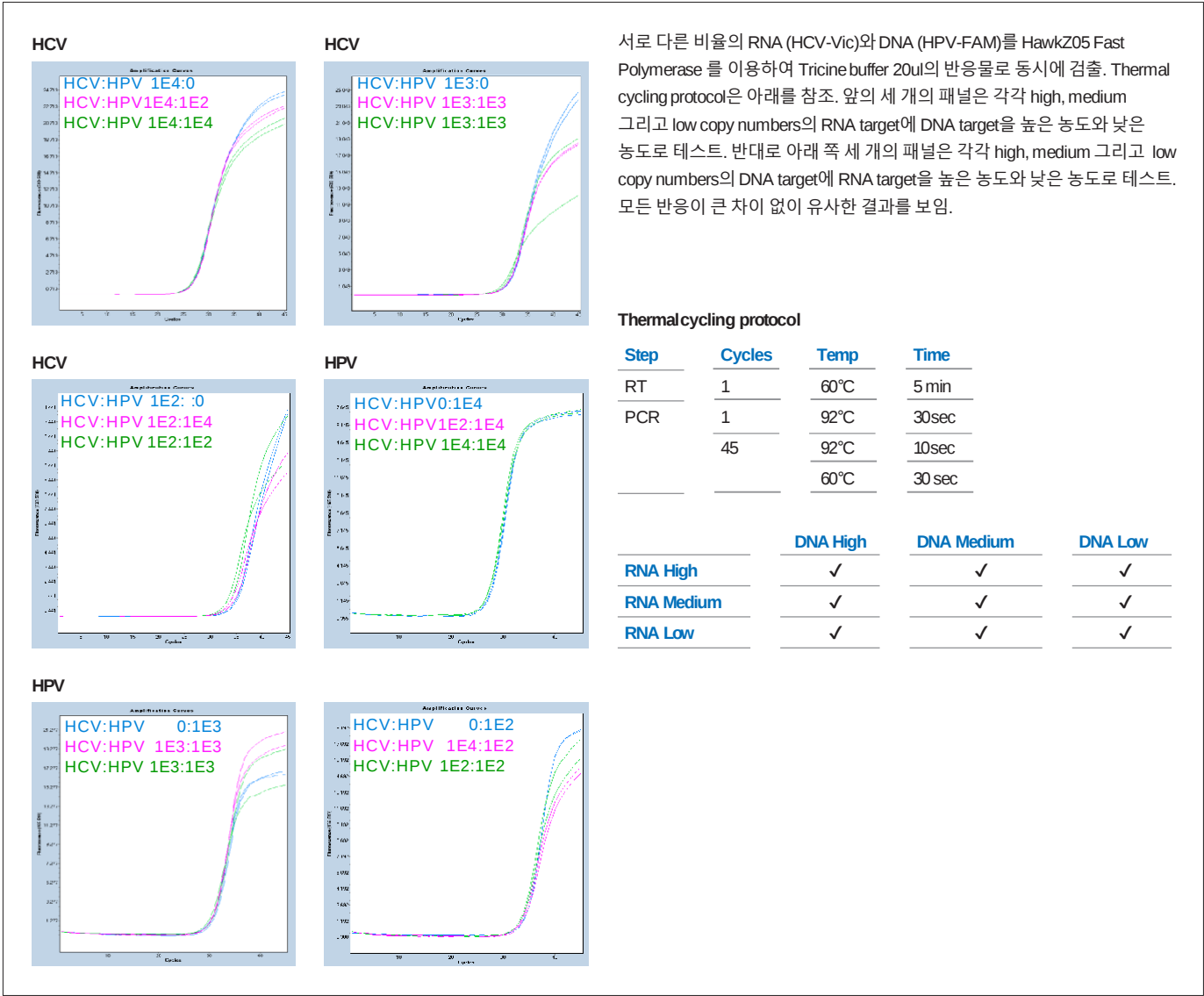


Figure 2: One-enzyme, one-step 그리고 one-tube 에서의 RNA와 DNA target 증폭

PCR 저해제 내성

PCR 분석의 민감도와 특이성은 샘플의 상태 (예를 들어 FFPE 샘플, 혈액 샘플), template 순도(crude 샘플인지 정제된 샘플인지) 등 여러 요인에 의해 영향을 받을 수 있습니다. ‘반응 저해 성분’이 포함된 샘플 분석을 위해서는 정확하면서 일관된 결과가 나오는지 먼저 검증해 보아야 합니다.¹ **혼합형의 DNA polymerase**는 임상 샘플⁴에 포함되어 있는 다양한 반응 저해 성분들에 대한 저항성이 있는 것으로 알려져 있으며, HawkZ05 Fast Polymerase도 마찬가지입니다.

HawkZ05 Fast Polymerase는 특별한 구성물 배합 또는 첨가제 없이도 샘플 자체에 이미 들어 있거나 샘플 준비과정에서 추가 되어 질 수 있는 여러 저해 물질에 대해서 흔들림 없는 결과를 보여줍니다. Figure 3은 방해 요인에 대한 저항성을 어느 정도 가지고 있는지를 요약하여 보여주고 있습니다. 비슷한 방법으로, 분석과정 중 생길 수 있는 저해 물질에 대한 저항성을 여러분의 샘플로 테스트해 보시기 바랍니다. 효소의 농도를 최적화하고 적절한 반응 첨가물을 추가할 경우 더 나은 실험 결과를 얻을 수 있습니다.

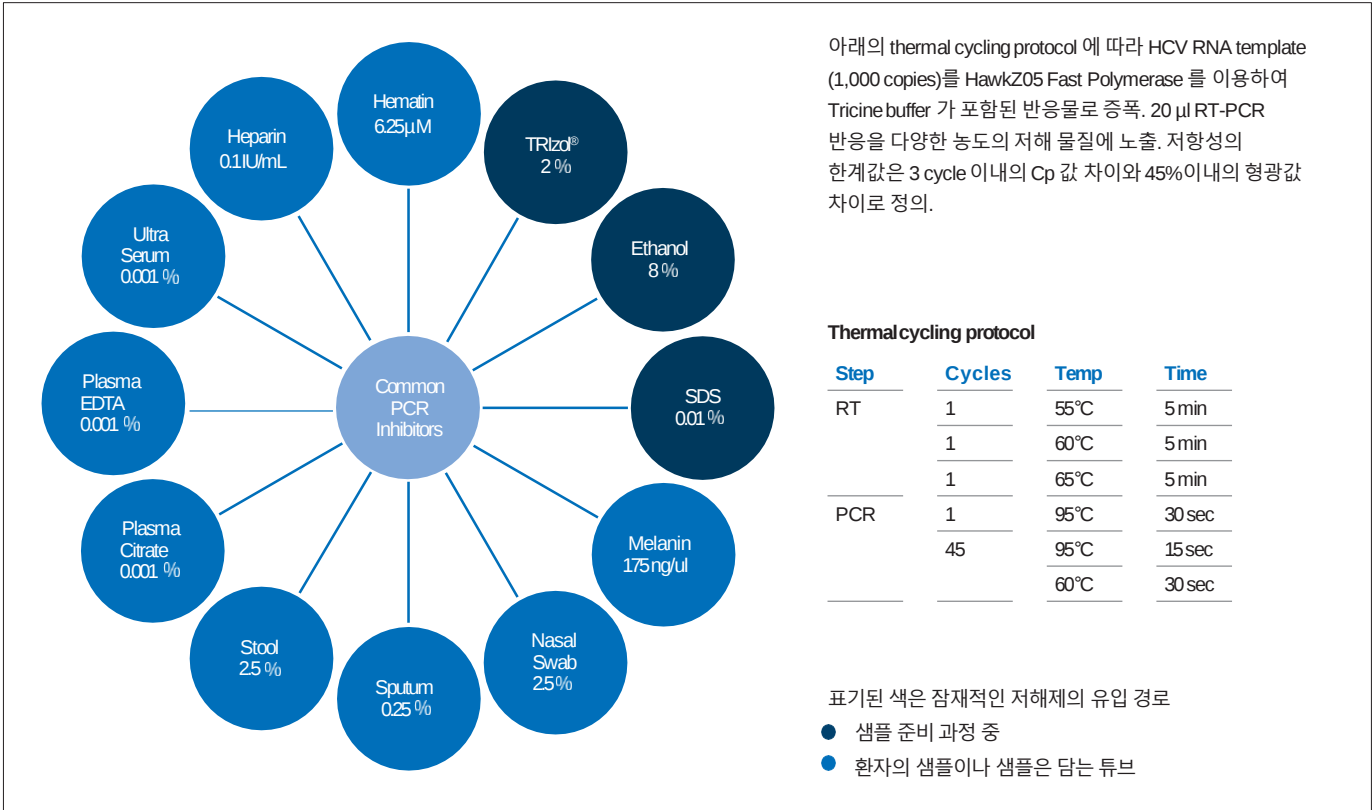
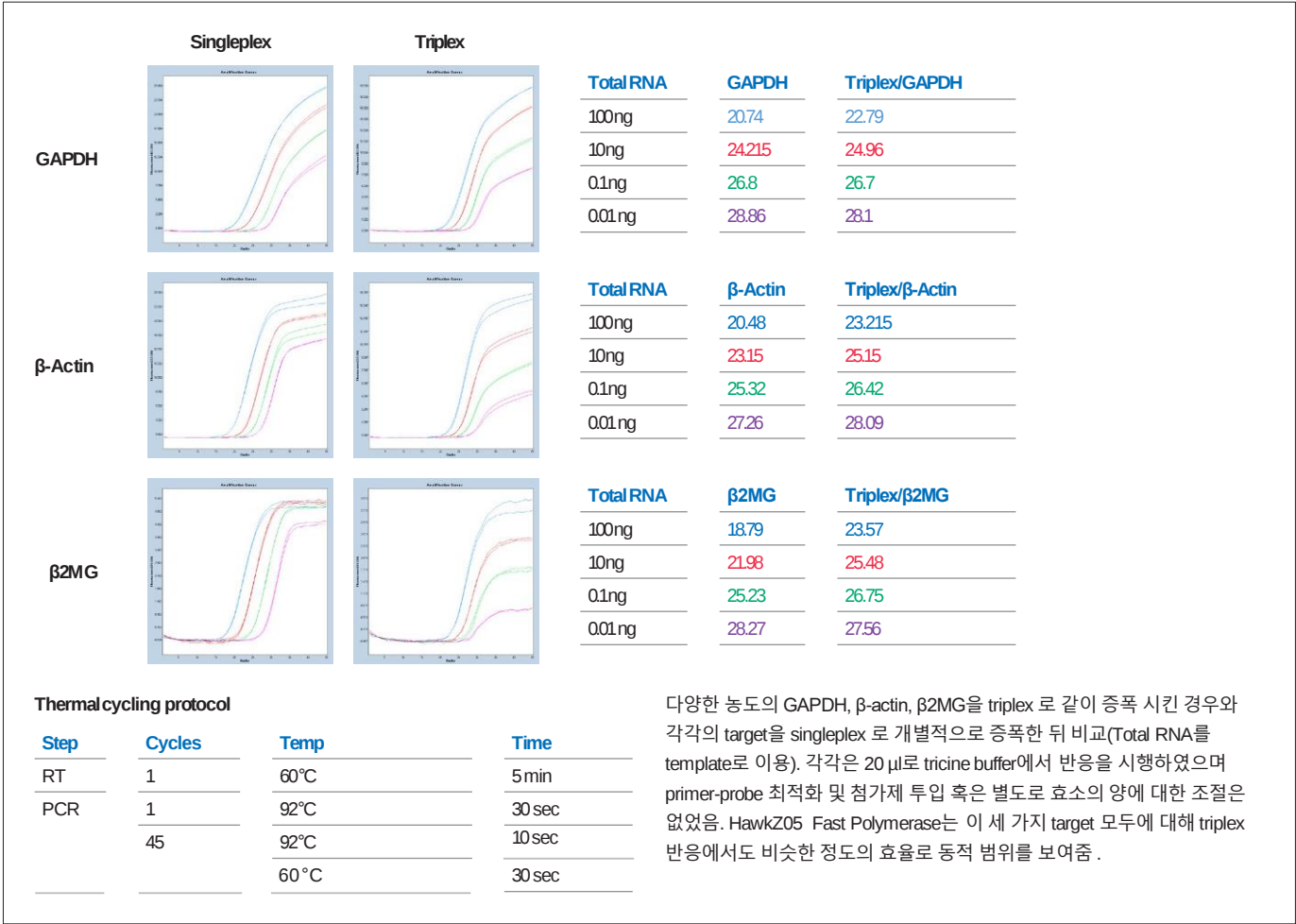


Figure 3: HawkZ05 Fast Polymerase가 가지는 반응 저해 물질 저항성

Multiplexing 능력

HawkZ05 Fast Polymerase는 한 번의 반응에서 여러개의 target을 동시에 증폭할 수 있으므로, 여러분의 소중한 샘플을 아낄 수 있고 반응 수를 현저히 줄여 줍니다. Figure 4는 GAPDH, β-actin 그리고 β2MG 을 같이 (triplex) 증폭했을 때와 각각을 개별적으로 (singleplex) 증폭했을 때를 비교한 것입니다. 0.01ng 에서 100ng 까지 각기 다른 농도의 total RNA가 template로 사용되었습니다.

반응은 Tricine buffer를 이용하였고, 별도의 첨가물이나 primer-probe 조합의 최적화, 효소 농도의 변화 등을 하지 않고 시행하였습니다. 효소를 적절 양으로 조절하고 최적의 primer를 디자인하며 적합한 PCR cycling 조건과 형광을 찾아 내기 위한 테스트를 시행하면 보다 나은 multiplex assay 결과를 얻을 수 있습니다.



상온 안정성

HawkZ05 Fast Polymerase와 HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR Master는 사용 설명서 (IFU, instruction for use)에 명시된 바와 같이, 2-8 °C에서 4주에서 12주까지 안정한 상태를 유지합니다. 샘플의 처리량이 많은 경우, 자동화 분주기로 샘플은 plate에 분주가 되고, PCR 기기로 들어가기 전에 이 plate는 홀더에서 쌓인 채로 기다리게 됩니다. 이런 경우 상온에서의 안정성은 작업의 흐름을 아주 간단하게 만들어 줄 수 있습니다. HawkZ05 Fast Polymerase의 상온 안정성을 테스트 하기 위해, 우리는 HawkZ05 Fast Master mix를 이용하여 RT-PCR 반응을 진행했습니다. HawkZ05 Fast Master mix는 highthroughput 자동화에 적용할 수 있도록 glycerol이 들어 있지 않은 master mix입니다.

Duplex RNA 증폭을 위해 최종 반응물을 첨가하고 상온에서 0, 6, 12, 24시간 동안 보관 후 실험하였습니다. 테스트 된 각 시간대에서 Cp 값이나 형광값에 기초한 성능의 감소는 보이지 않았습니 다(Figure 5). 상온에서 반응물을 두어야 하는 경우, 샘플 자체 또는 샘플을 준비하면서 생길 수 있는 저해 물질에 대한 반응의 민감도와 높은 온도에 장시간의 노출이 반응물의 성분에 미치게 되는 영향은 중요하게 고려되어야 요소입니다. 이러한 요소들은 Figure 5에 보여 지는 것처럼 체계적으로 평가하여 분석의 여러 요인들과 프로토콜의 각 단계가 최적의 반응과 성능을 낼 수 있도록 조절되어야 합니다.

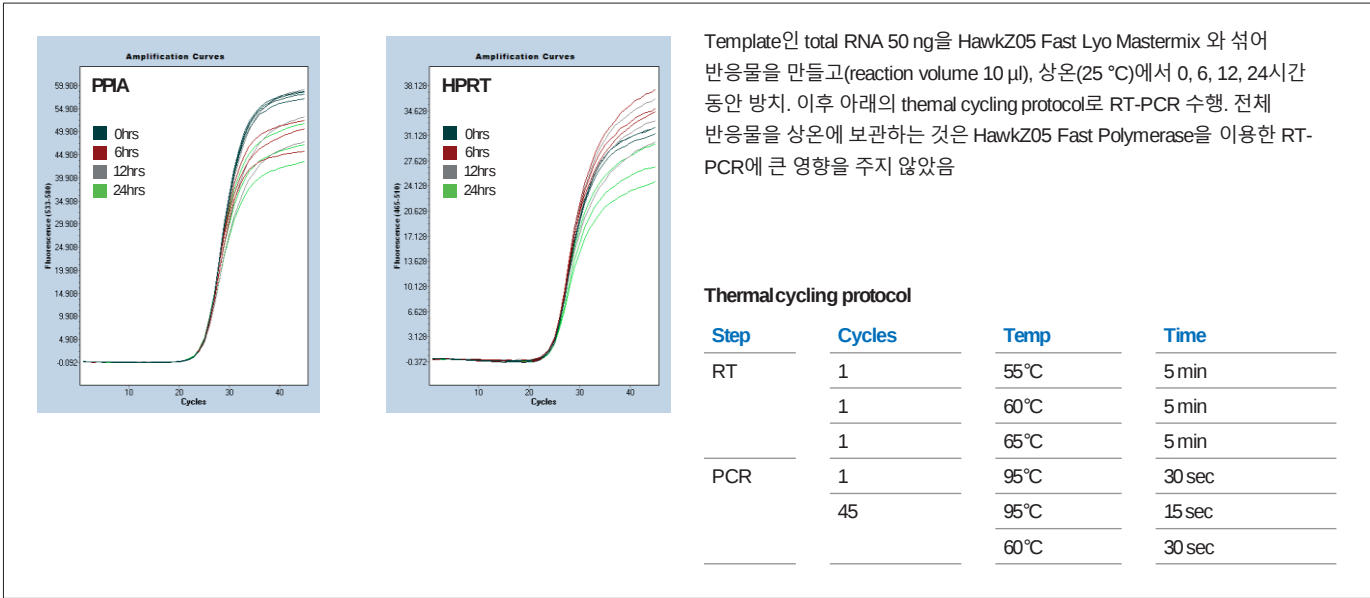


Figure 5: HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR Master 의 상온(25 °C) 안정성.

동결 건조가 가능한 디자인

분석 구성물질이 동결 건조가 가능하다면 운반, 보관 및 실험의 셋업이 쉬워지기 때문에 동결 건조는 분석의 구성 물질로써의 필수 불가결한 특징이라고 할 수 있습니다. HawkZ05 Fast Polymerase enzyme (≤0.1% glycerol)과 HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR Master (5× conc., 0.5% glycerol 함유)는 Glycerol의 함량이 매우 낮기 때문에 동결 건조와 high-throughput의 자동화 실험에 사용 될 수 있습니다.

저희는 HawkZ05 Fast Polymerase의 동결 건조 적합성을 평가해 보았습니다. 외부 업체를 통해 HawkZ05 Fast Master mix를 세 가지의 서로 다른 안정화 물질 (stabilizer)과 증량제 (bulking agent)를 이용해 동결 건조시켰습니다. (각각 A, B, C로 표기) 그 결과로 생성이 된 pellet을 물에 다시 용해 후 RNA target의 증폭에 사용하였으며, 증폭의 성능은 증량제 첨가가 없었으며 동결 건조를 하지 않은 효소와 비교해 보았습니다. 동결 건조 전과 후의 Cp 값과 형광의 세기는 매우 유사한 값을 보여주었습니다. (Fig. 6B). 더불어 동결 건조 시 안정화 물질을 첨가하는 경우, GAPDH의 경우에서와 같이 (Figure 6B) 그 성능 (Cp 값)이 더 개선되는 경우도 관찰 할 수 있었습니다.

또한, 동결 건조 된 pellet은 실온에서 4주까지 보관 하였을 때의 안정성에 대해서도 평가 하였습니다. Figure 6C에서 보여지는 바와 같이 동결 건조된 pellet은 상온에 보관하여도 그 안정성이 유지 되었고 대조 pellet과 유사한 성능을 보여 주었습니다.

분석의 설계 (효소만 사용하느냐 혹은 첨가물을 넣느냐), 동결 건조 후 master mix나 다른 분석 구성물질의 저장 조건 (다시 냉장 보관을 하느냐 혹은 실온에 보관하느냐), 그리고 증량제나 안정제의 사용 여부 등은 모두 분석을 최적화 하는데 중요하게 고려되어야 하는 것들입니다.

동결 건조는 분석 성분의 운송과 취급에 편의를 제공할 수 있지만, 동결 건조 전후 분석의 견고성에 대해서는 반드시 평가 되어야 하며, 필요에 따라서는 보관 중에 생겨날 수 있는 여러 조건들에 대한 적절한 취급 권고 사항들도 제시되어야 합니다.

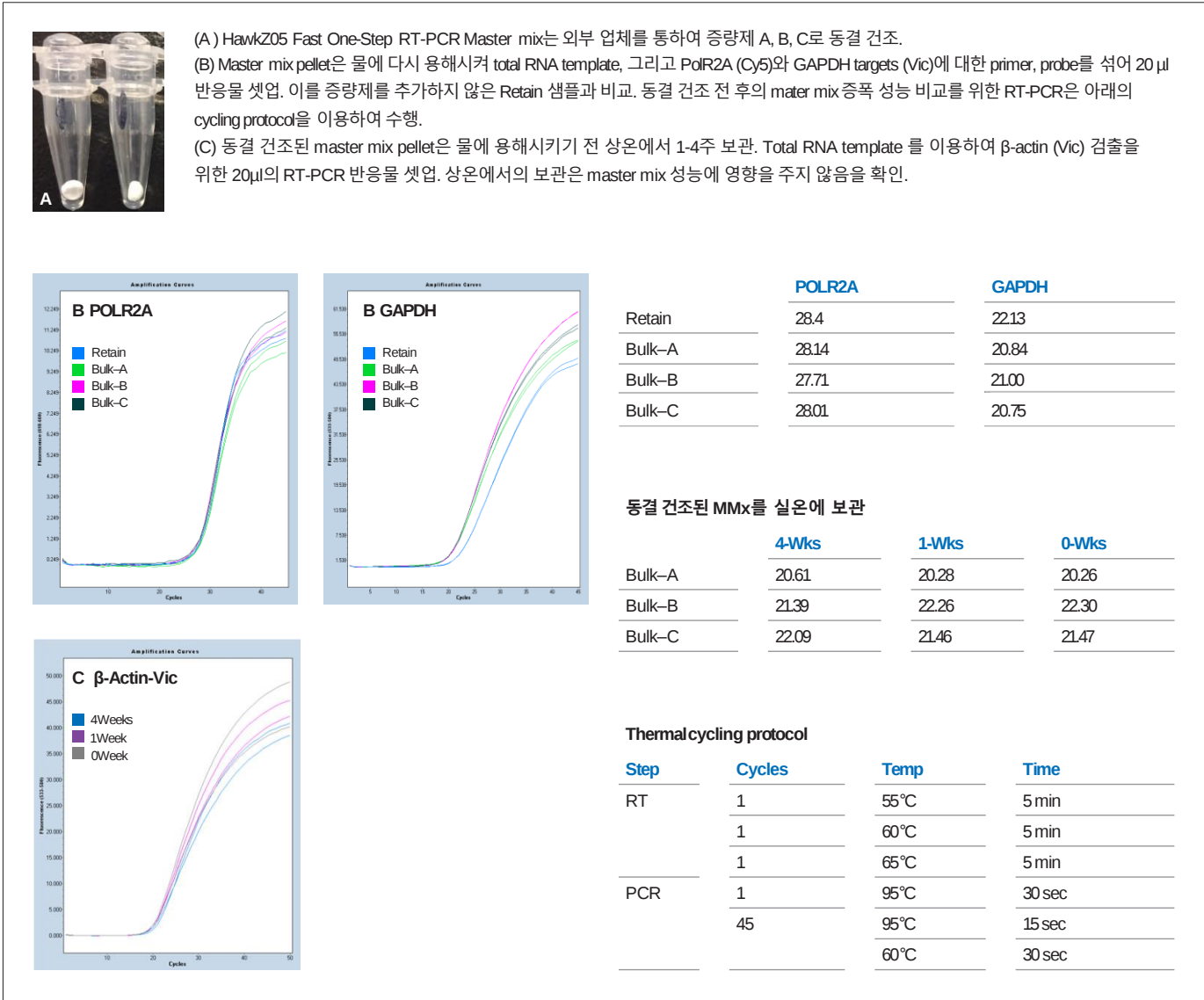


Figure 6: 동결 건조 이후의 HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR Master (with Mn cofactor) 실험 성능.

HawkZ05 Fast를 이용한 실험

HawkZ05 Fast Polymerase를 여러분의 분석에 적용하면 작업의 흐름을 간소화하고 실험 시간을 단축할 수 있습니다. 이 효소는 다양한 반응 조건에서도 일관된 결과를 얻을 수 있어 분석의 최적화가 용이합니다. 다음은 Roche Custom Biotech에서 수행된 연구를 요약한 것으로 여러분의 분석을 최적화하기 위한 출발점으로 사용하시기 바랍니다.

실험 최적화를 위한 가이드라인

HawkZ05 Fast Polymerase는 고온에서 좋은 성능을 보여주며, 반응 저해 물질에 대한 내성이 있으므로 다양한 시료에서 복잡한 표적에 대한 분석 실험을 유연하게 설계할 수 있습니다. 효소의 성능은 반응의 구성물, 조건, 그리고 첨가제 등이 최적화 되면 향상될 수 있는데, 샘플과 target이 필요로 하는 특정 사항들이나 제한 점등은 분석 개발의 초기 단계부터 반드시 고려되어야 하는 것을 염두 하시기 바랍니다.

PCR은 매우 복잡한 분석이기 때문에 여러 요소들을 한 가지씩 순차적으로 최적화 하는 것은 매우 어렵습니다. 그러나 DOE (Design of Experiments) 접근 방식을 사용하면 분석 개발 시간이 크게 단축되고 최적의 성능으로 간소화 된 분석을 최종적으로 할 수 있게 됩니다.

최적의 thermal cycling protocol 설정

HawkZ05 Fast Polymerase는 역전사 속도가 매우 빠르기 때문에 품질 저하없이 전체 분석 시간을 최소화 할 수 있습니다. 저희는 다양한 copy 수를 가지는 HCV를 표준 조건과 빠른 PCR 조건에서 증폭을 시켜 보았습니다. (Table 1) Figure 7A에서 보는 것과 같이 HawkZ05 Fast Polymerase는 Fast PCR 조건과 다양한 범위의 테스트에서 뛰어난 성능과 민감도를 보여 주었습니다. Target의 농도가 낮은 경우 Fast PCR 조건에서는 Cp 값이 뒤로 밀리는 것을 볼 수 있었으나, 역전사는 빠르게 하고 일반 PCR은 표준 조건으로 수행하는 방식으로 묶으면 TAT와 Cp 값 사이의 균형을 맞출 수 있게 됩니다. (Table 1)

대부분의 real-time PCR target의 경우 (<200 nucleotides), 60°C의 단일 온도에서 2-5분 정도 유지하는 것만으로도 효과적인 역전사를 하는데 충분합니다.

Target이 길거나(>300 nucleotides) 복잡한 이중 구조를 가지고 있는 경우, 역전사를 위한 단일 온도 유지 시간을 좀더 길게 잡거나 (대략 10분) 아래와 같이 3 단계의 역전사를 수행하는 방식으로 민감도를 개선해야 합니다. :

- **처음 55°C로 유지:** 이 단계는 melting temperature가 낮은 Primer에 안정성을 제공하며 RNA 표적과 Primer가 약간 일치 하지 않는 경우 (예: Viral RNA target)에 유용할 수 있습니다.
- **두 번째 60°C로 유지:** 이 온도에서는 효소가 완전히 활성화되고 aptamer에서 분리 됩니다.
- **세 번째 65°C로 유지:** 최종 고온 단계는 RNA 표적에서 복잡한 2차 구조를 완화하여 보다 효율적인 cDNA 합성을 가능하게 합니다.

Figure 7B는 복잡한 2차 구조를 가진 표적의 증폭을 보여줍니다. 하나의 Forward primer와 다른 Reverse primer를 결합하여 HCV의 GC-rich 5'UTR에서 다양한 사이즈의 증폭 산물을 생성 하였습니다.⁵

복잡한 영역을 증폭시키는 HawkZ05 Fast Polymerase의 능력은 표적 위치와 길이에 대한 여러분의 선택의 폭을 넓혀 줍니다. 증폭의 주기를 조정하여 분석 성능을 더 향상시킬 수도 있습니다. 한 예로 짧은 anneal 과 extension 과정은 반응의 특이성과 민감성을 증가시킬 수 있습니다. 만약, GC-rich 반응물로 실험을 해야 한다면, 각 cycle의 denaturation 시간을 15초까지 연장하고 denaturation 온도도 92°C에서 94°C로 올려 증폭의 효율성을 개선할 수 있습니다.

Table 1: Fast and standard thermal cycling protocols.

Step	Cycles	Standart Cycling		Fast Cycling	
		Temp	Time	Temp	Time
RT	1	55°C	5 min		
	1	60°C	5 min	60°C	5 min
	1	65°C	5 min		
PCR	1	92°C	30 Sec	92°C	30 sec
	45	92°C	15 Sec	92°C	1 sec
		60°C	30 Sec	60°C	10 sec
Time to completion		74min		44min	

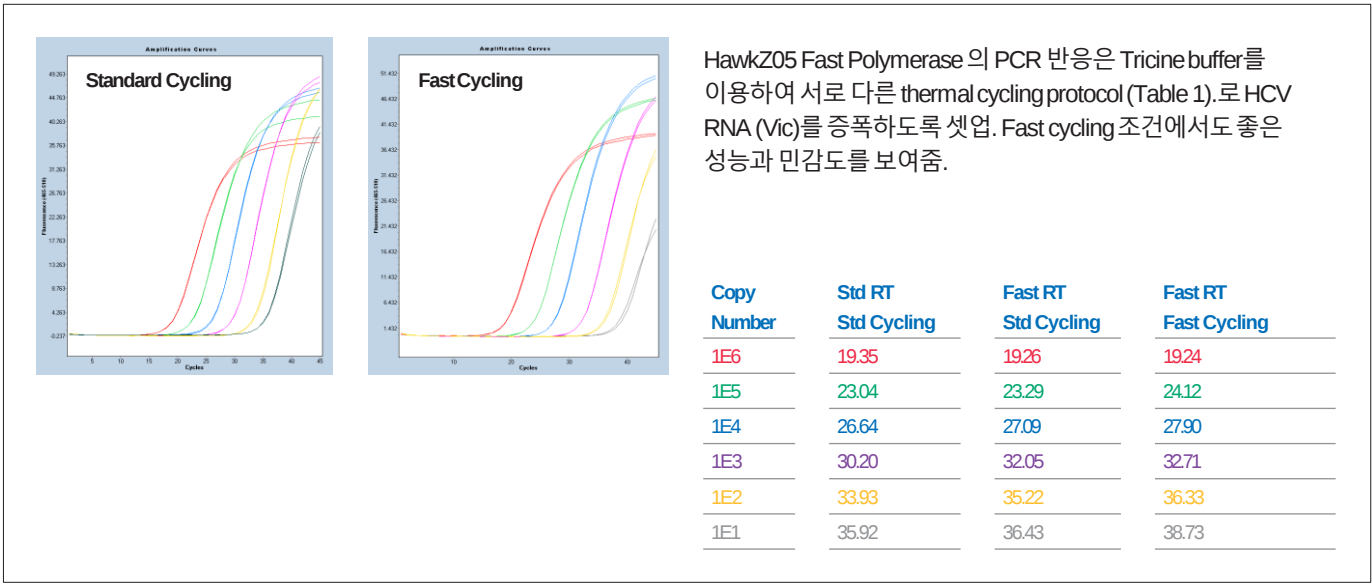


Figure 7A: 표준 조건과 fast cycling 조건에서의 HawkZ05 Fast Polymerase 성능

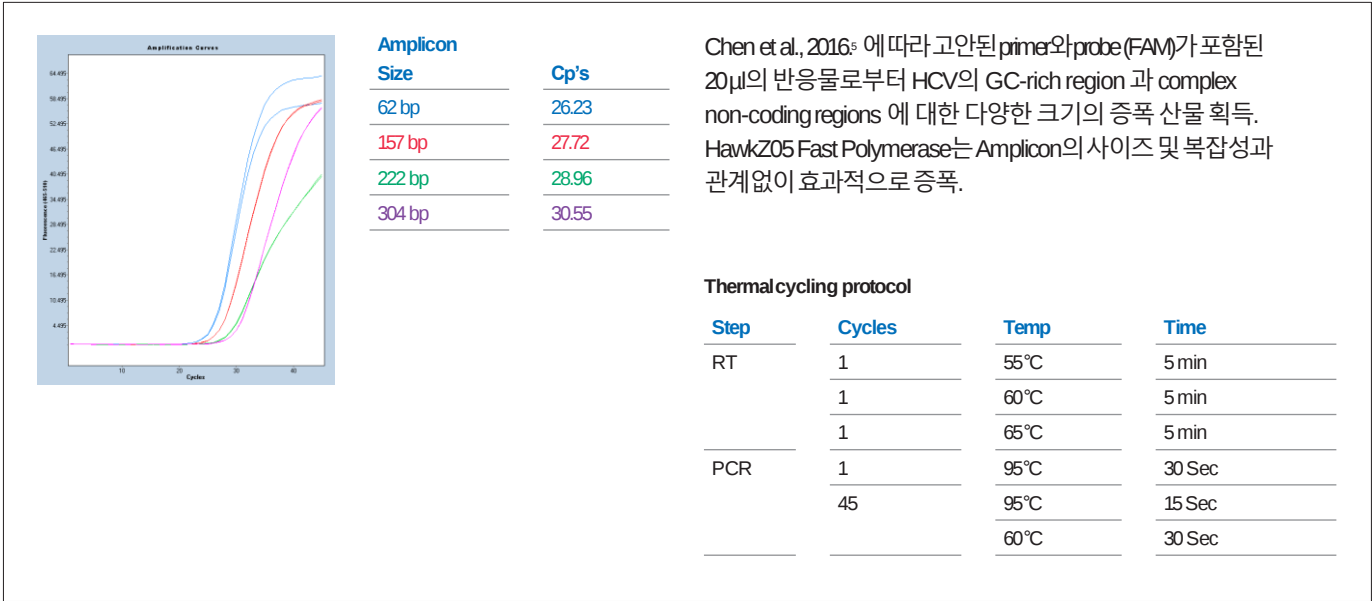


Figure 7B: HCV의 GC-rich region과 complex 5' non-coding regions에서 얻은 다양한 사이즈의 amplicon의 증폭

필요한 cofactor 평가 및 적정 농도 설정

Cofactor에 따라서 HawkZ05 Fast Polymerase는 RNA-dependent-와 DNA-dependent DNA polymerase의 활성을 모두 가지거나 DNA-dependent DNA polymerase 활성만을 가질 수도 있습니다. Cofactor로 망간 (Mn)을 사용하는 경우, HawkZ05 Fast Polymerase는 두가지 활성을 모두 가지게 되므로 one step으로 하나의 튜브에서 RT-PCR증폭을 할 수 있습니다. Cofactor로 마그네슘 (Mg)을 사용하면, HawkZ05 Fast Polymerase는 DNA-dependent DNA polymerase 활성을 나타냅니다. 따라서 DNA의 증폭의 경우 분석의 필요에 따라, Figure-8에서 볼 수 있듯이 cofactor로 망간 또는 마그네슘을 선택하여 사용할 수 있습니다. 마그네슘을 사용한 경우 각각의 Template 농도에서 일관되게 더 높은 형광 (15-18)을 보인 반면, 망간은 DNA 증폭에 있어서 특히 Copy number가 더 적은 경우 Cp 값이 더 낮게 나타났습니다.

망간은 HawkZ05 Fast Polymerase의 이중 중합 효소 (dual polymerase) 활성을 촉진합니다 (Figure9). Cofactor로 마그네슘을 추가하면 형광 신호가 약간 증가하며 시킬 수 있으나 Cp 값도 약간 밀릴 수 있습니다.

대부분의 분석에서는 망간 아세테이트 (manganese acetate)는 최종 농도 1.5mM을 권장하며 이 농도에서 매우 민감하고 특이적인 RT-PCR을 가능하지만 경우에 따라 1.5에서 3.0mM 농도의 범위에서 최적화를 시킬 수 도 있습니다. 일반적으로 낮은 마그네슘과 망간 이온의 농도는 수율을 떨어뜨릴 수 있고 높은 농도는 비 특이적인 산물을 발생시킬 수 있습니다. Cofactor로 마그네슘과 망간을 조합하면 형광의 세기와 증폭 곡선의 모양도 개선할 수 있습니다. 더불어 Cofactor의 최적화는 혈액 샘플의 EDTA와 같이 샘플에 있는 PCR 저해 물질의 영향을 극복하는데도 도움이 됩니다.

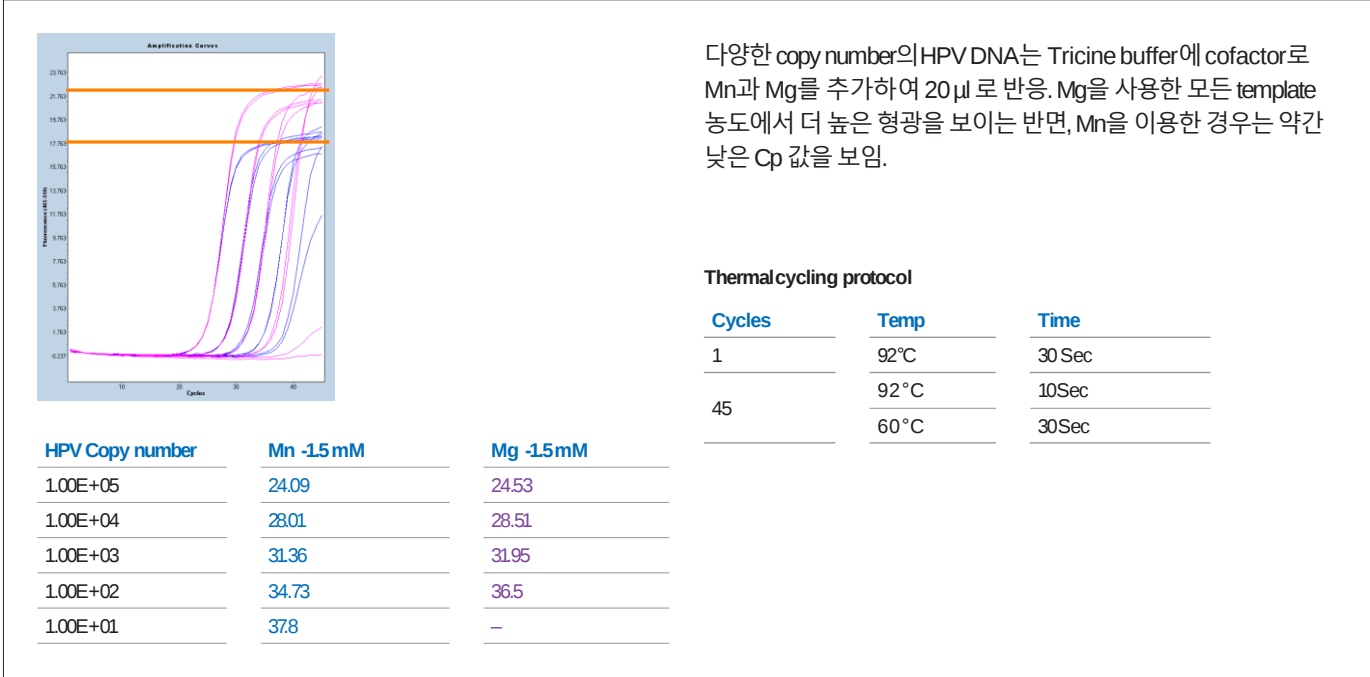


Figure 8: DNA 증폭에 있어서 HawkZ05 Fast Polymerase 성능에 미치는 cofactor의 영향.



Figure 9: RNA 증폭에 있어서 HawkZ05 Fast Polymerase 성능에 미치는 cofactor의 영향.

적절한 버퍼 조성 확인 및 선택

분석을 위한 Buffer를 선택하거나 제조 시, HawkZ05 Fast Polymerase는 Tricine 기반 또는 Tris 기반의 Buffer 중에서 탄력적으로 선택할 수 있습니다. 효소는 두 Buffer에서 모두 잘 작동하지만 Cofactor의 최적화 시 Tricine / bicine Buffer의 경우 Tris Buffer보다 Cofactor의 농도 범위를 더 넓게 적용할 수 있습니다.⁶ HawkZ05 Fast Polymerase는 Tricine 및 Tris 기반의 Buffer 모두에서 우수한 성능과 민감도를 나타냈습니다.

Buffer의 선택과 더불어, Buffer의 pH와 농도도 효소의 성능에 영향을 미칩니다. HawkZ05 Fast Polymerase는 Tricine 버퍼의 경우 pH 범위 8.0–8.3, Tris 기반 버퍼의 경우 8.3–8.6에서 우수한 성능을 보입니다. 칼륨 (Potassium)과 암모늄염 (ammoniumsalts)의 경우 template의 denaturation에 중요한 역할을 하고 polymerase의 성능을 개선할 수 있습니다. HawkZ05 Fast는 다량의 염 (예: 최대 150mM potassium)을 견딜 수 있는데 이런 점은 buffer의 농도와 pH와 함께 최적화 전략에 활용될 수 있습니다.

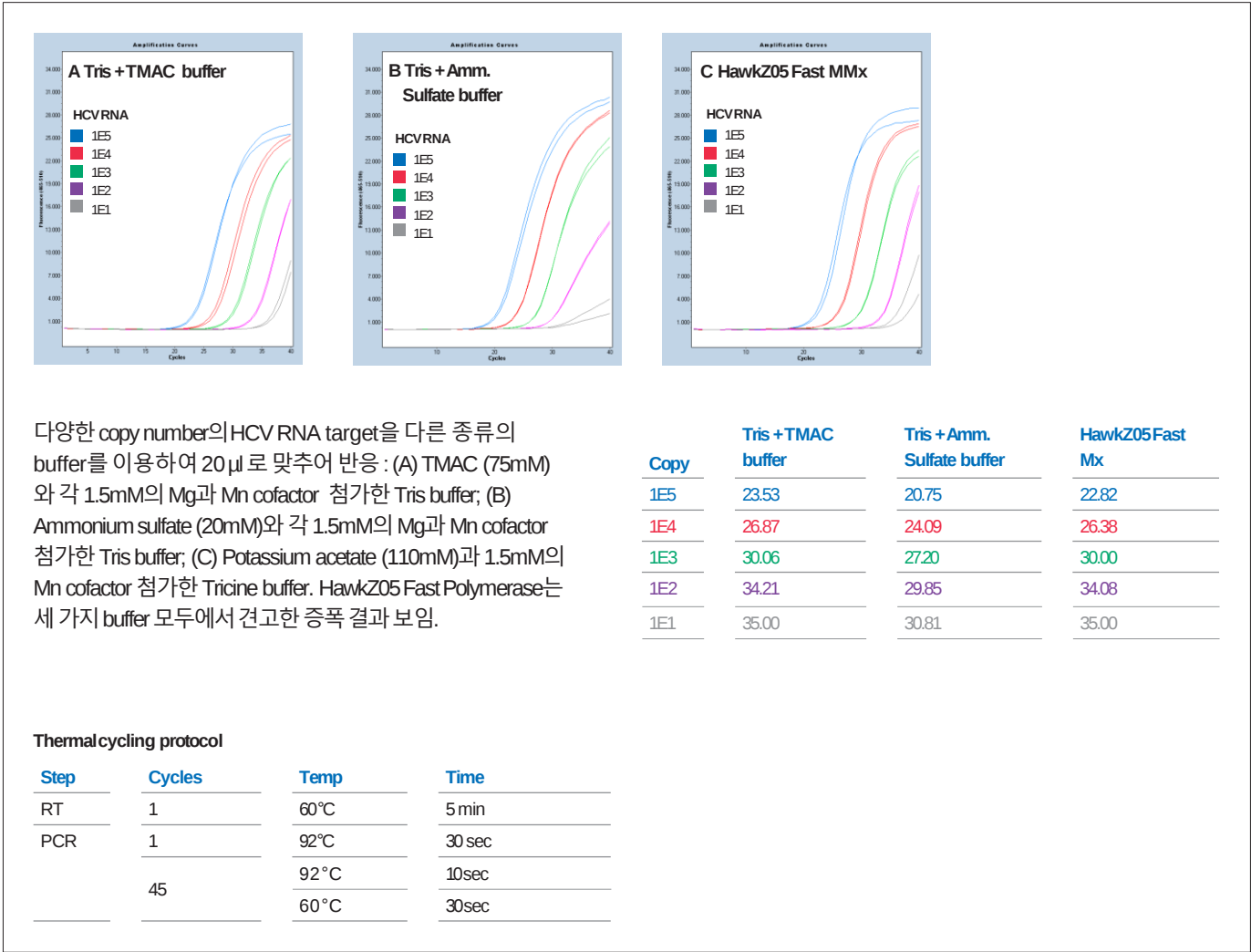


Figure 10: Tris와 Tricine buffer에서의 HawkZ05 Fast Polymerase 성능

GC rich template 또는 복합적인 샘플 증폭 위한 첨가물

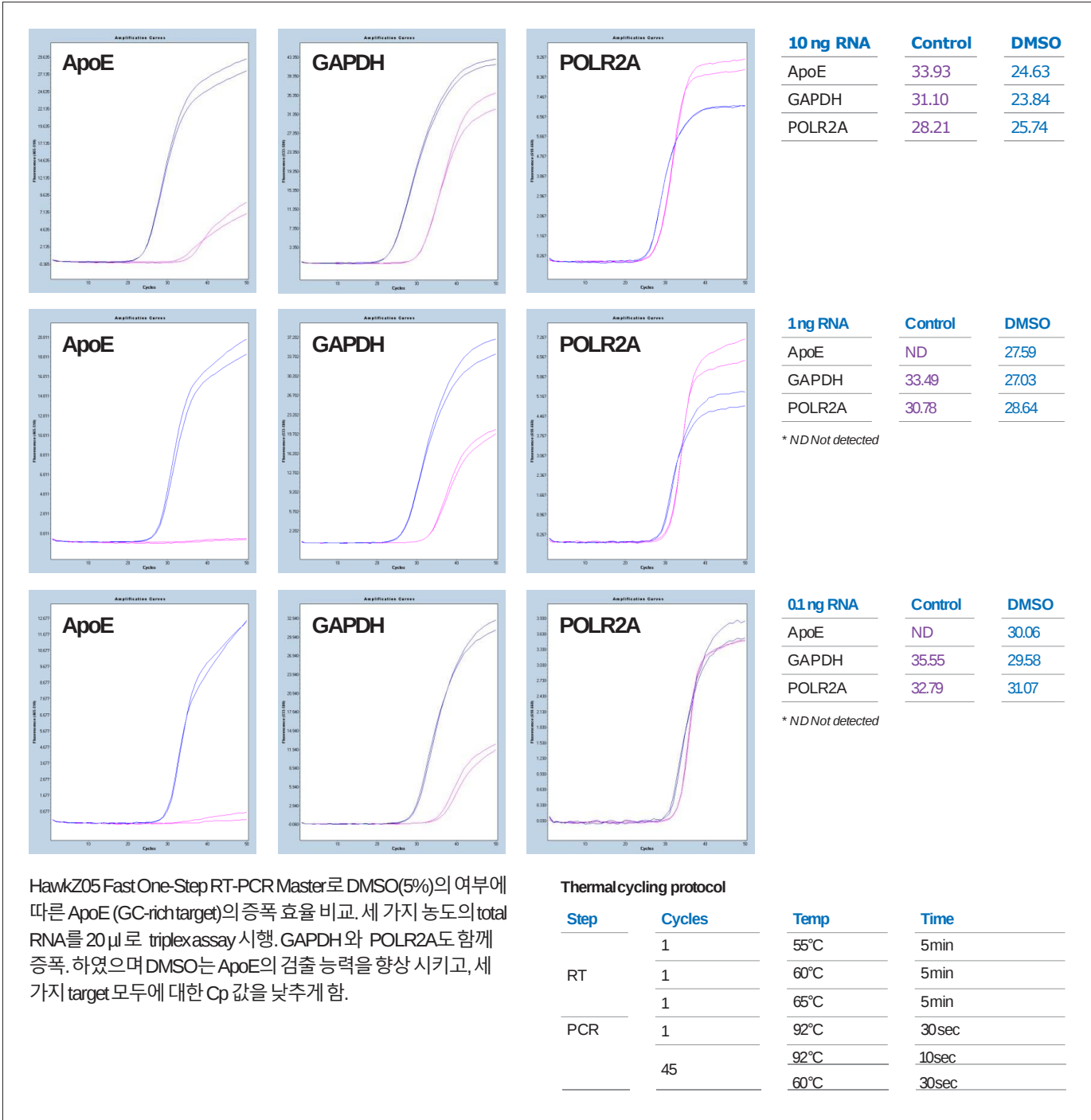
HawkZ05 Fast Polymerase는 고온에서 역전사를 수행하므로 복잡한 GC-rich target 증폭도 견고하게 수행 할 수 있습니다. DMSO와 Betaine 혹은 Glycerol과 같은 첨가물은 GC 함량이 높거나 2차 구조가 많은 target에 대한 민감도를 개선시켜 줄 수 있습니다.

RT-PCR에 DMSO를 첨가하게 되면 HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR Master 의 성능에 긍정적인 영향을 주며 target에 대한 전반적인 검출 능력을 향상 시킵니다

Figure 11은 3가지 다른 Target에 대한 Triplex 분석 실험에 있어서 DMSO의 영향을 보여 줍니다. 실험에 사용 된 Template의 모든 농도 범위에서 타겟 증폭 곡선의 Cp값이 더 낮게 나왔습니다.

여러분의 분석에 첨가물을 넣어서 최적화를 하려고 하신다면 다음에 나열된 일반적인 지침을 따르시기 바랍니다.:

- 최종 DMSO 농도는 1~5%
- 최종 Betaine 농도는 0.5~3%
- 최종 Glycerol 농도는 2~15%
- DMSO와 Glycerol을 병합하는 것은 최적화를 개별적으로 해야 하며, 이 경우 최종 농도는 5~15%



샘플에 존재하는 저해제의 영향 확인

HawkZ05 Fast Polymerase는 호흡기 검체 (Nasal swab), 대변, 가래 혹은 crude 샘플에 존재 할 수 있는 저해제에 대해서 내성이 있으며, 혈액으로 부터의 serum, plasma 에 혼합이 된 EDTA나 citrate에도 내성을 가지고 있습니다. (Figure 3).
첨가물로 BSA, gelatin 그리고 T4 Gene 32 protein을 사용 하거나 효소 자체의 사용량을 늘리면 저해제에 대한 내성을 더 개선 할 수도 있습니다.
저해제의 종류에 따라 첨가물은 달리 선택되어야 하며 개선 정도는 다를 수 있습니다.⁷ 한 예로, Hematin은 Polymerase에 붙어서 PCR 성능을 떨어뜨립니다. 이런 저해제의 경우는 BSA와 같은 첨가물을 사용하면 완화 할 수 있는데 BSA가 hematin이 결합할 수 있는 대체의 결합자리를 제공 하기 때문입니다.⁸

Figure 12에 보이는 것처럼 최종 농도 0.02%로 BSA를 첨가하면 hematin 625µM 에서 25 µM까지 내성을 개선시킵니다.

특정 시료 유형에 대한 잠재적인 저해제 및 저해 방식에 대한 지식은 PCR 반응의 저해를 극복하기 위한 적절한 첨가제를 선택하는데 도움이 됩니다. Table 2에는 PCR enhancer와 이들의 원리가 기술되어 있습니다.

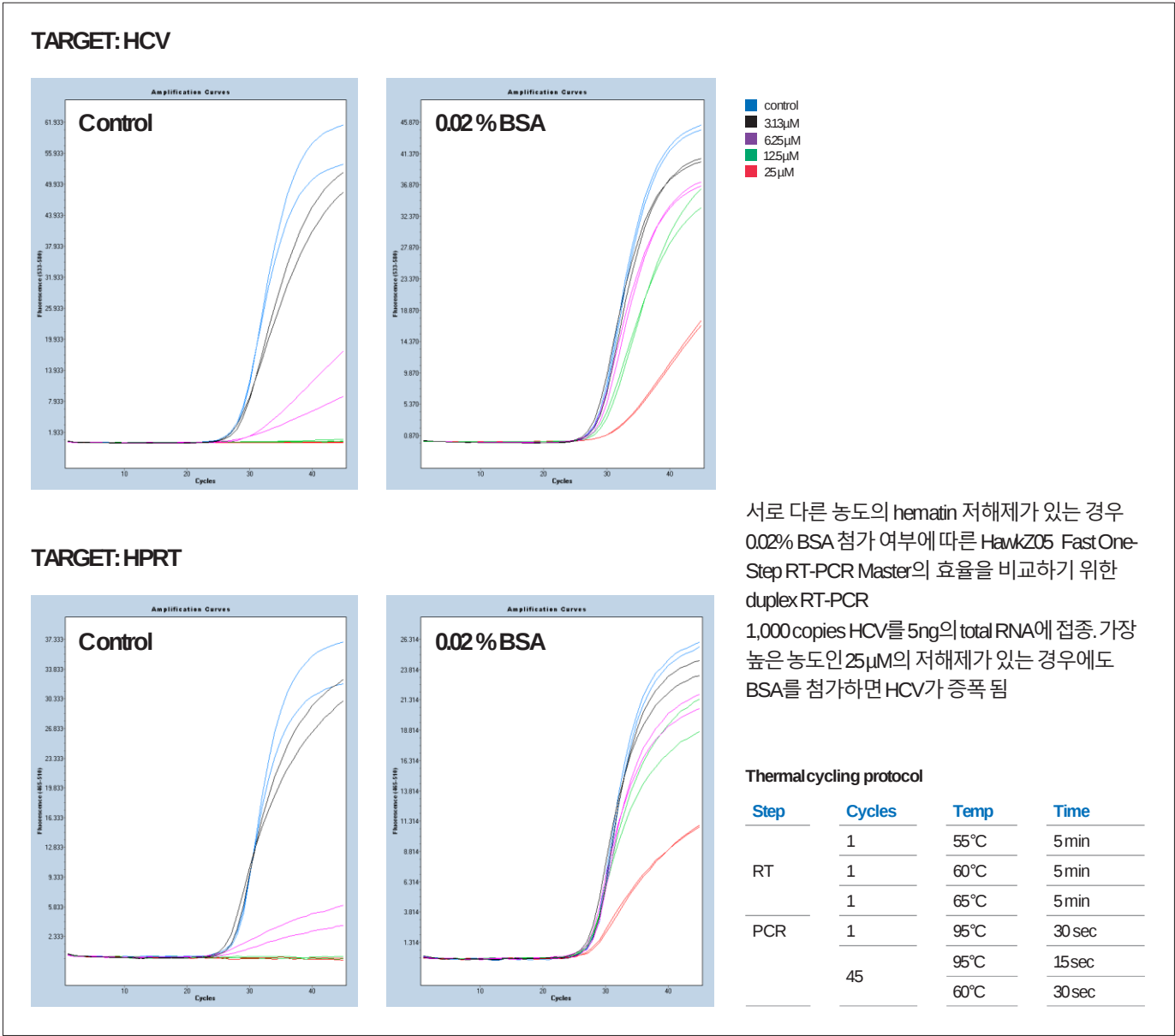


Figure 12: BSA 첨가를 통한 hematin에 의한 PCR 저해 감소.

Table 3: 표준 PCR에 대한 첨가제의 영향

첨가물	반응에 대한 권장 농도 ^a	첨가제의 효과 ^a
Ammonium sulfate [(NH ₄) ₂ SO ₄]	5–30 mM	DNA 가닥의 분리 촉진
Bovine serum albumin*	50 µl의 반응 당 50–500 ng	조직 샘플에서 쉽게 발견이 되는 PCR 저해제에 결합
Dimethylsulfoxide (DMSO)	2–10 % v/v	Target DNA의 T _m 을 낮추고 annealing을 도움
Dimethylformamide (DMF)	<10 % v/v ^b	Target DNA의 T _m 을 낮추고 annealing을 도움
Betain		Target DNA의 T _m 을 낮추고 annealing을 도움
Formamide	1.25–10 % v/v ^b	- 특이성과 효율을 증가시키기 위해 Primer-Template 결합의 T_m을 변화시킴 - Taq DNA Polymerase 안정화
Gelatin	0.01–0.10 % w/v	Taq DNA Polymerase 안정화
Glycerol	5–15 % v/v	Taq DNA Polymerase 안정화
PEG 6000	5–15 % w/v	Taq DNA Polymerase 안정화
SDS	0.01 % w/v ^b 이하로	Polymerase의 응집 방지
Spermidine	50 µl 반응당 0.05–0.1 nmol	Polymerase의 Template DNA에 대한 비 특이적인 결합을 줄임
T4Gene 32 protein *		특이성과 효율을 증가시키기 위해 Primer-Template 결합의 T _m 을 변화시킴
Triton X-100	0.01 % v/v	Polymerase의 응집 방지
Urea	1–15 M ^b	Target DNA의 T _m 을 낮추고 annealing을 도움

References

- a) 이 표의 일부 정보는 Aoyagi (2001)에서 인용되었음. 첨가제의 효과는 Taq DNA Polymerase와 함께 사용 하는 경우에 한하여 적용됨
b) 고농도는 오히려 역제의 효과가 있음
* Roche CustomBiotech을 통해 구매 가능

결론

궁극적으로 분석을 최적화하는 데 필요한 정확한 절차와 일련의 테스트는 관련 샘플 유형과 선택한 target에 따라 결정됩니다. 많은 참고 문헌들이 올바른 PCR 기기와 시약을 선택하는데 추가적인 정보들을 제공하고 있습니다.^{9–13} HawkZ05 Fast Polymerase의 가역적인 Hot start와 dual polymerase activity에도 불구하고, 이 효소는 높은 유연성과 견고함을 가지기 때문에 민감도와 일관성 및 매우 높은 특이성을 보여 주어 분석을 최적화 과정을 쉽게 합니다.

HawkZ05 Fast Polymerase는 다양한 buffer와의 호환성, 동결 건조 내성 및 자동화의 가능성이 있어서 여러분의 분석의 작업 흐름을 더욱 간소하게 설계할 수 있도록 도울 것입니다.

Appendix

Materials

A) Template: HCV, HPV from ATCC[®]; Total RNA, Total cDNA from Clontech[®].

B) Primer-Probes: HCV (FAM & Vic), HPV (FAM), β -Actin (FAM and Vic), GAPDH (FAM and Vic), HPRT1 (FAM), PP1A (Vic), ApoE (FAM) from Life Technologies[®]; β 2MG (Cy5), POLR2A (Cy5) HCV different amplicon size from IDT[®].

C) HawkZ05 Fast DNA Polymerase, 200 U/ μ l (≤ 0.1 % Glycerol); Cat. No. 07731329103
HawkZ05 Fast DNA Polymerase, 40 U/ μ l; US Cat. No. 07731264103

D) HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR kit, 5 ml plus manganese acetate; 05987687190
HawkZ05 Fast One-Step RT-PCR kit, 50 ml plus manganese acetate; 05987695190

E) HawkZ05 Fast reaction buffer (5 $\times$):

Buffer composition used

250 mM Tricine
550 mM potassium acetate
0.05 (V/V) Tween 20
25 (V/V) Glycerol
pH 8.0 $\pm$ 0.1
Adjust the pH of Tricine using potassium hydroxide

Unless otherwise specified, the final reaction includes 200 μ M of each dNTP, an enzyme concentration of 0.5 U/ μ l of reaction volume (10 U/20 μ l reaction volume) and 1.5 mM manganese acetate.

F) Tris reaction buffers (5 $\times$)

Tris TMAC buffer	Tris ammonium sulfate buffer
250 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25 $^{\circ}$ C)	375 mM Tris-HCl, pH 8.5 (25 $^{\circ}$ C)
375 mM TMAC	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	0.05 % TWEEN [®] 20
	0.05 % gelatin
	7.5 mM MgCl ₂

Unless otherwise specified, the final reaction includes 200 μ M of each dNTP, an enzyme concentration of 0.5 U/ μ l of reaction volume (10 U/20 μ l reaction volume) and 1.5 mM manganese acetate.

References

- 1) Burd, E. (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin Microbiol Rev 23, 550-576.
- 2) Rodríguez, M., Córdoba, J.J., Andrade, M.J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. Methods Mol Biol. 1275, 31-56.
- 3) Chuang, L.Y., Cheng, Y.H. & Yang, C.H. (2013). Biotechnol Lett 35, 1541.
- 4) Cai, D. et al. (2018). Direct DNA and RNA detection from large volumes of whole human blood. Sci Rep 21, 3410.
- 5) Chen, L. et al. (2016). Hepatitis C Virus RNA real-time quantitative RT-PCR method based on a new primer design strategy. J Mol Diagn 18, 84-91.
- 6) Myers, T.W. and Sigafoos, C.L. (1995). Amplification of RNA: High-temperature reverse transcription and DNA amplification with *Thermus thermophilus* DNA polymerase. In Innis, M., Gelfand, D. and Sninsky, J. (Eds), PCR Strategies, 1st Edition, 58-68, Academic Press.
- 7) Abu Al-Soud, W. and Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl Environ Microbiol 64, 3748-3753.
- 8) Akane, A. et al. (1994). Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from blood stains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci 39, 362-372.
- 9) PCR, Kazuko Aoyagi; Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide. Edited by Alan S. Gerstein Copyright ©2001 by Wiley-Liss, Inc. ISBNs: 0-471-37972-7 (Paper); 0-471-22390-5 (Electronic).
- 10) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. PCR Methods Appl. 1993 May;2(4):275-87.
- 11) Taq DNA Polymerase. Gelfand DH; PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Editors Henry A. Erlich (1992).
- 12) PCR. McPherson, M. J. and Møller, S.G. (2000). BIOS Scientific Publishers, Oxford, 288.

Regulatory disclaimer

For further processing only.

Trademark

HawkZ05 is a trademark of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

custombiotech.roche.com

한국로슈진단(주)



서울특별시 강남구 테헤란로 108길 22 (06174)
TEL : 02-550-3300 Fax : 02-550-1218
E-mail : korea.diagnostics@roche.com
Homepage : <http://custombiotech.roche.com>