

PCR primer design

(주)다인바이오 연구소

1. PCR primer

PCR로 유전자의 특정영역을 증폭하려면 primer가 되는 2종의 합성된 한가닥 (single strand) DNA가 필요하다. Primer의 설계와 그에 대응하는 재조건 설정이 PCR의 성패를 결정한다고 해도 과언이 아니다. Primer 설계상 주의점은 1) 길이, 2) primer 간의 상보성, 3) GC 함량, 4) primer 내의 2차 구조, 5) Tm 값, 6) 사용농도 등이 있으나, 현재는 primer 설계용 컴퓨터 프로그램도 시판하고 있다. PCR을 실시하려면 primer가 되는 2종의 합성 한가닥 DNA가 필요하다. Primer가 결합하는 위치에 따라 DNA상의 어느 부분이 증폭되는지 결정된다. 또한 primer의 설계와 그 primer의 서열에 따라 PCR의 조건을 설정하여야 하며 이것이 PCR의 가장 중요한 요인이 된다. 표적 DNA의 상류 (5')측의 sense strand (순방향), 하류 (3') 측의 antisense strand (역방향)의 primer를 선택한다.

2. Primer 설계상의 주의점

(1) Primer의 길이

Primer의 길이는 15~30 염기가 적당하고 20~25 염기가 바람직하다. 이 크기의 primer는 주형 DNA와 특이적으로 annealing하는데 충분하다. 단지 LA PCR (long and accurate PCR)의 경우는 30 염기 이상의 primer가 보다 효과적이다.

(2) Primer간의 상보성

2개의 primer끼리 annealing하지 않도록 한다. 특히 3'말단이 상보적인 primer가 되지 않도록 하면 primer의 dimer 형성에 의한 증폭 효율 저하의 위험성을 줄일 수 있다.

(3) GC 함량

GC 함량이 50% 전후로 설계하고 부분적으로 GC 혹은 AT-rich가 되지 않도록 한다. 또 primer의 3'말 단과 주형 DNA와 안정한 결합이 되도록 primer의 3'부근이 AT-rich가 되지 않도록 한다.

(4) Primer 내의 2차구조

Primer 자신의 2차구조의 형성을 피하기 위하여 자기 상보서열을 갖지 않도록 한다.

(5) Tm 값

Double strand DNA가 single strand DNA로 되는 온도변화에 있어서 그 중간값을 Tm (melting temperature)이라고 하며 이 값은 DNA의 길이, 염기 조성에 따라 다르게 나타나며 이 값이 높을수록 강하게 결합된다는 것을 의미한다. Primer-template DNA duplex의 안정성은 Tm 값에 의해 결정되는데, 이 값은 실험치를 바탕으로 한 계산식을 통해 구할 수도 있다.

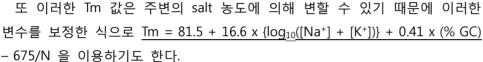


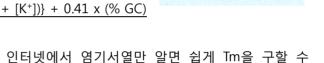
$Tm = 4^{\circ}C \times (G+C의 수) + 2^{\circ}C \times (A+T의 수)$

이 공식은 G+C 염기쌍이 A+T 염기쌍보다 안정하다는 것에 기초를 두고 있다. 주로 이 공식을 이용하여

Tm 값이 비슷한 primer를 설계하는데, 실제 annealing하는 온도는 Tm 값보다 $2\sim3^{\circ}$ 정도 낮아야 primer가 template DNA의 원하는 위치에 정확히 결합할수 있다.

그러나 위의 식은 N(염기의 수)이 14이하일 때 적합한 식이며 N>14일 때는 $Tm = 64.9 + 41 \times (G+C) + C9$ 수 - 16.4)/N의 식으로 구한다.





b

SS-DNA

Temp

Tm

하지만 이러한 계산식은 이미 프로그램으로 나와있고 인터넷에서 염기서열만 알면 쉽게 Tm을 구할 수도 있다. [참고] http://depts.washington.edu/bakerpg/primertemp/primertemp.html

2종류의 primer는 가능한 Tm 값이 근접하도록 설계한다. 몇 개의 primer 후보가 있을 경우는 통상 Tm 값이 높은 것을 선택한다. Annealing 온도는 primer Tm 값에 의존하지만 55~65℃에서 양호한 결과를 얻을 수 있다. Annealing 온도를 높임으로써 특이성 높은 PCR 반응을 실시할 수 있다.

(6) 농도

Primer를 주문하면 건조된 상태나 완충용액에 용해된 상태로 운송된다. 건조 상태일 때는 초순수 물 또는 TE buffer에 녹여 알맞게 희석해서 사용한다. 원액상태일 때도 같은 방법으로 처리한다. Primer의 사용 농도는 template DNA와의 비율에 의해 결정되는데, 보통 template에 비해 10⁷ 정도 과량으로 넣어준다. 그러므로 PCR 30 cycle이 끝나더라도 처음 넣어준 primer의 95%는 그대로 존재하게 된다. 하지만 지나치게 고농도로 사용하면 primer dimer 형성이나 비특이적인 증폭이 발생할 수 있으므로 일반적으로 0.1~0.5mM (최종농도: 0.2~1uM)가 적합하다. 두 primer는 같은 농도로 넣어주어야 하고 Primer를 사용하지 않을 때에는 -20℃에 보관하도록 한다.

3. PCR primer의 설계

PCR을 실제로 실시하는 경우 온도조건을 조절하는 기계 (thermal cycler), 효소, 완충액 등과 함께 필수불가결한 요소가 oligonucleotide primer로, 목적이 되는 유전자는 2종류의 PCR primer 사이에서 증폭된다.

최근 oiligonucleotide의 합성에 소요되는 비용이 낮아져 염기서열 설계 그 자체에 중점을 두지 않고 다수 합성하여 실험을 통해 증폭할 수 있는 pair를 찾는 경향이 있다. 그러나 일회성의 실험이 아니고 계속해서 같은 PCR을 해야 한다면 처음 단계의 설계에서 신중을 기해 안정적이고 재현성이 높으면서도



감도가 좋은 primer를 설계해야만 한다고 생각한다.

<PCR primer 설계에 필요한 인자>

(1) 결합능

Primer와 target 유전자 사이의 결합능력은 primer 디자인에 가장 기본적인 요소의 하나이다. DNA와 DNA 특이적 결합은 nucleotide의 Adenine (A)과 Thymine (T), Guanine (G)와 Cytosine (C)의 특이적인 결합에 의한 것으로 전자는 2개의 수소결합, 후자는 3개의 수소결합이미로, 필연적으로 A와 T가 많은 primer의 결합능력은 G와 G가 많은 primer보다 약하다. 또 항원항체반응과 Biotin, Avidin 결합의 경우는 특이성이 달라서, DNA의 경우 조건에 따라 특이성이 저하하여 mismatch가 있어도 결합하는 수가 있다. 따라서 특이성을 유지하기 위해서는 그 나름의 연구가 필요하다. 특히 PCR의 경우에는 2종류의 primer를 사용하기 때문에 제 1 primer가 특이적으로 target 유전자에 결합하는 조건이 제 2 primer에 따라 target 유전자에 결합할 수 없는 조건이 되든지, 반대로 mismatch를 많이 허용하는 조건이 되면 특이적인 증폭을 기대할 수 없다.

(2) 특이성

Primer 염기서열의 특이성을 살펴보기 위해 종래부터 homology를 검색하여 왔다. 그러나 homology는 유전자의 염기서열의 유사도를 살펴보는 것이 목적이므로 homology와 oligonucleotide의 결합능 사이에는 차이가 있어 이 같은 문제를 극복하기 위해 homology 분석을 대신하는 새로운 방법론으로 결합능 (hybridizability)에 근거하는 분석법을 개발하였다.

즉 후보가 되는 다수의 primer와 GenBank 등의 database에 등록되어 있는 유전자의 염기서열과의 사이에 mismatch를 고려한 nn법으로 결합능력을 계산하여 primer가 결합할 수 있는 유전자를 그 결합력(Tm 내지는 ΔG)의 강도순으로 나열하여 표시하였다. 즉 target 유전자에 대한 Tm 값과 cross hybridization하는 유전자에 대한 Tm 값의 차를 계산함으로써 그 primer의 target 유전자에 대한 특이성의 정도를 알수 있다. PCR의 과정에서 primer는 5' 말단에서 3' 말단 방향으로 DNA 합성이 진행되어 가는데 이 3' 말단에 GC 함유량이 많거나 3' 말단이 부분적으로 Tm 값이 높으면 primer의 3' 부분이 target 유전자와 결합하는 것만으로 DNA 합성이 시작되어 버리므로 3' 말단의 GC 함유량을 낮도록 설계한다. 더욱이 대상이 되는 유전자 database 중에서 5 mer와 6 mer의 짧은 염기서열의 빈도를 계산해서 빈도표를 작성해두고 primer 3' 말단측의 짧은 부분의 염기를 이 빈도표에 맞추어 보아 빈도가 적은 것을 선택하는 경우도 있다. 최근 PCR 프로그램에는 이 기능이 부가되어 있는 경우가 많다.

(3) 2차구조

PCR에 사용하는 primer는 모든 염기가 목적하는 유전자에 결합하는 것을 전제로 하나 primer 자신이 hairpin 구조를 형성해버리면 목적 유전자에 결합할 수 없거나 다른 유전자와 결합해버려 false positive의 원인이 되는 경우가 있다. 다행히 PCR 반응 중에는 열에 의한 변성 과정이 존재하여 그 과정



에서 hairpin 구조는 해소되기 대문에 hairpin이 그만큼 중요시되지 않는 경우가 많다. 그러나 PCR 반응액 중 primer 농도는 target 유전자의 농도에 비하면 압도적으로 많기 때문에 primer의 hairpin은 PCR 감도를 저하시키는 원인이 된다. Oligonucleotide 자체의 hairpin 구조를 형성할 가능성은 일반적으로 kacl/mol로 계산된다.

(4) Primer의 상호작용

PCR 반응액 중의 primer의 농도는 표적 유전자의 농도와 비교하여 압도적으로 많기 때문에 primer 간에 서로 hybridize하기 쉬운 구조를 갖고 있으면 이른바 primer dimer를 형성하여 target 유전자와의 hybridization이 대폭 억제된다. 이 primer dimer에는 sense간, antisense간 및 sense와 antisense간의 3종 류가 있다. 한편 sense와 antisense간에서는 hybridize하기 않는 것으로 착각할 수 있는데, 예를 들어 5'-AGCT-3'은 반대방향(3'-TCGA-5')에 상보성이 있으므로 충분히 dimer를 형성한다. 이들 dimer의 형성 가능성은 계산으로 쉽게 예상할 수 있다.

(5) 증폭산물의 위치

Cloning 등의 기초실험의 경우 예를 들면 전단백질 정보영역 염기서열을 증폭하는 것처럼 PCR 산물의 위치는 실험의 목적에 따라 결정된다. 그러나 PCR을 이용해서 특이적인 유전자의 발현을 조사할 경우에는 PCR 산물의 위치에 관한 한정이 적어 primer의 설계에 융통성이 있다. 일반적으로 GC가 많은 부분을 PCR로 증폭하는 것은 어려워 상당히 특별한 know-how가 필요하다. 그래서 미리 표적 유전자에 GC가 많은 부분의 존재여부를 확인하여 GC가 많은 부분이 증폭되지 않도록 primer를 설계하는 것이 바람직하다.

PCR 산물의 위치와 동시에 PCR 산물의 크기도 중요한 요인이다. 일반적으로 PCR 산물이 짧으면 짧을수록 증폭이 확실하고 감도도 증가한다. 길이가 1000bp를 초과하면 더욱 특수한 know-how가 필요하다. 최단 길이는 primer dimer를 구별할 수 있는 길이면 가능하지만 이 경우 agarose gel 전기영동보다는 조작이 복잡한 acrylamide gel 전기영동이 필요하므로 그다지 일반적은 아니다.

(6) Primer의 길이

실험에 따라 10 mer 전후의 짧은 경우로부터 40 mer를 초과하는 긴 primer를 사용한 경우까지 다양하다. 기본적으로 sense와 antisense가 같은 Tm 값이 된다면 같은 길이로 할 필요는 없다. 길이가 길면특이성이 증가한다고 오해하는 경우가 많지만 너무 길면 primer의 Tm 값이 annealing 온도보다 높아지기 때문에 mismatching 가능성이 커진다. 단순히 human genome 유전자 총량으로부터 계산하면 17 mer(4¹⁷)까지는 human 유전자의 어딘가는 같은 서열이 있을 가능성이 존재한다. PCR의 경우 2종류의 primer와 반응해야만 되기 때문에 이론적으로 17 mer로 충분하지만 일반적으로 20 mer 전후의 primer를 가장 많이 사용한다.



4. References

- PCR 기초강좌, 백전백승 PCR가이드/Takara
- http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
- http://molbiol-tools.ca/PCR.htm

