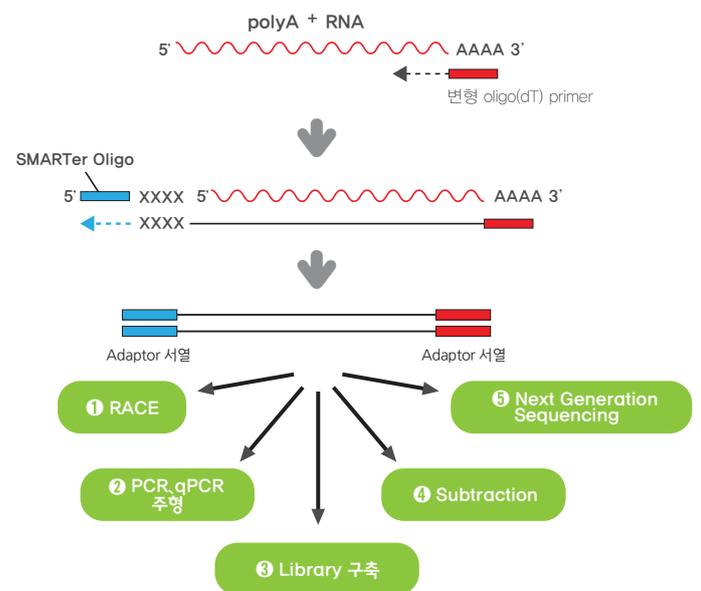


cDNA Synthesis & Library Construction

SMART/SMARTer Technology



- Full-length cDNA 합성
- cDNA Library 구축
- 5'-RACE & 3'-RACE
- 극미량 RNA의 NGS용 cDNA 조제
- Subtractive Hybridization
- mRNA Amplification

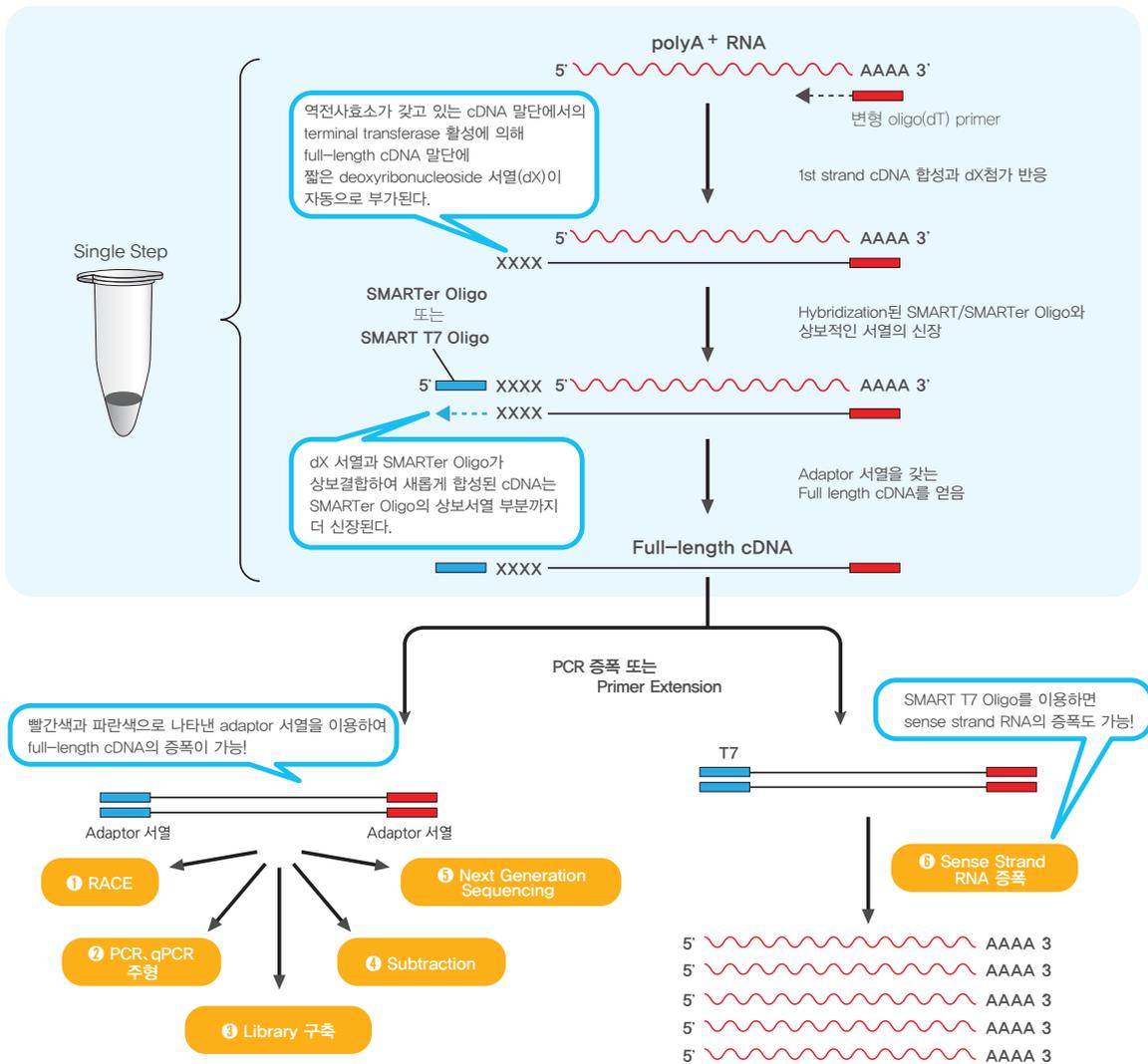
SMART/SMARTer 기술의 개요

- Full-length cDNA만을 선택적으로 취득 가능
- 나노 그램(ng) 단위의 미량의 total RNA에서도 고품질 cDNA 합성 가능
- 유전자 빈도의 변동이 없는 mRNA 증폭 가능

SMART법 (Switching Mechanism At 5'-end of the RNA Transcript)은 역전사효소가 갖고 있는 cDNA 말단에서의 terminal transferase 활성과 주형을 바꾸어 DNA 복제를 계속하는 성질을 이용하여, 효율적으로 full-length cDNA를 합성하는 Clontech의 독자적인 기술이다 (미국특허 제 5,962,271). 한층 업그레이드 된 SMARTer 법에서는 SMARTer oligo의 변형과 더 강력해진 SMARTScribe Reverse transcriptase를 통해 극미량의 RNA 시료로도 cDNA 합성이 가능하도록 감도를 높였다.

역전사효소는 주형인 mRNA의 말단에 이르면 새롭게 합성된 cDNA의 말단에 짧은 deoxyribonucleoside 서열을 자동적으로 부가하고, 이 부가된 서열에 상보적인 SMARTer Oligo가 결합하면, 역전사효소는 주형을 바꾸어 SMARTer Oligo의 말단까지 cDNA 합성을 계속한다 (SMART switching process). 그 결과, cDNA의 말단에는 SMARTer Oligo 서열이 포함되게 된다. SMARTer Oligo에 있는 adaptor 서열을 이용하여 PCR이나 T7 promotor를 이용한 *in vitro* 증폭을 용이하게 실시할 수 있다.

SMART/SMARTer 법의 모식도



관련제품

- | | |
|---|---|
| ① SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Code 634923) | ④ Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Code 637401) |
| ② SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Code 634925) | ⑤ SMARTer™ Ultra Low RNA Kit for Illumina® Sequencing (Code 634935) |
| SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Code 634928) | ⑥ SMART™ mRNA Amplification Kit (Code 635001) |
| ③ In-Fusion™ SMARTer™ Directional cDNA Library Construction Kit (Code 634933) | |
| SMART™ cDNA Library Construction Kit (Code 634901) | |

미량의 Total RNA로 부터 Full-length cDNA 취득

SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit Code 634925 (10회) / Code 634926 (20회)

- 2 ng의 total RNA로부터 고품질의 cDNA 합성

본 kit을 사용하면 다용도로 적용 가능한 고품질의 cDNA를 합성할 수 있다.

[응용 예시]

Clontech PCR-Select cDNA Subtraction



(비교 대조 샘플)

Virtual Northern Blot



Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit Code 637401(7회)

PCR-Select cDNA Subtraction은 발현량에 차이가 있는 유전자를 찾는 유용한 방법이다. 초기 시료가 소량인 경우에도 이용 가능하며 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit으로 합성한 cDNA는 PCR-Select cDNA Subtraction에 직접 사용할 수 있다.

Virtual Northern Blot의 제작

일반적인 northern blot을 진행하기에 polyA⁺ RNA나 total RNA가 충분하지 않는 경우 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit으로 합성한 SMARTer cDNA를 이용해 virtual northern blot을 제작할 수 있다.

SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit Code 634928 (10회)

- 1 ng의 미량의 total RNA로부터도 고품질의 cDNA 합성

불과 1 ng의 미량의 total RNA로 부터 cDNA subtraction, virtual northern blot, 또는 array용 probe 합성 용도의 고품질 cDNA를 합성할 수 있다. LCM(Laser Capture Microdissection)법에 의한 시료나 flow cytometry로 선별한 세포 등과 같은 극소량의 시료에서 추출한 RNA와 같이 제한된 시료를 이용하는 경우 특히 SMARTer pico 기술이 유용하다.

SMARTer와 SMARTer Pico에 의한 프로토콜 비교

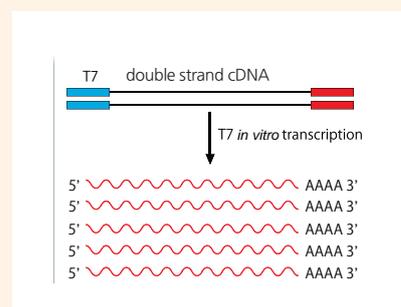
프로토콜	SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit	SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit
RNA 사용량	2~1,000 ng의 total RNA, volume ≤ 3.5 μl 최소 total RNA 농도 0.6 ng/μl	1~1,000 ng의 total RNA, volume ≤ 50 μl 최소 total RNA 농도 20 pg/μl
1 st strand cDNA 합성(RT)	1st Strand cDNA 합성 반응 volume = 10 μl	1st Strand cDNA 합성 반응 volume = 106 μl
PCR 전처리	Dilute 1:5 with TE Buffer (Total RNA 경우) Volume = 50 μl	NucleoSpin 컬럼으로 정제
PCR	cDNA 10 μl를 SMARTer PCR 증폭에 적용 (100 μl 반응)	cDNA 80 μl를 SMARTer Pico PCR 증폭에 적용 (100 μl 반응)
수율(Yield)	1~2 μg ds cDNA	1~2 μg ds cDNA

소량의 Total RNA로부터 mRNA 증폭

SMART™ mRNA Amplification Kit Code 635001(10회)

- 50 ng의 total RNA로부터 mRNA를 선형으로 증폭

SMART mRNA Amplification Kit은 소량의 total RNA로부터 다량의 sense strand RNA(mRNA)를 신속하고 간편하게 합성할 수 있는 방법이다. 발현이나 구조, 기능 분석을 위한 RNA 양이 부족한 경우에 본 제품을 사용하면 시료내 transcript의 상대량을 유지한 채 mRNA를 증폭할 수 있다. 또한 합성된 mRNA는 qRT-PCR, *in vitro* translation, cDNA cloning 그리고 array probe 제작에 이용할 수 있다.



간편하고 확실한 5'-RACE & 3'-RACE

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit Code 634923 (10회) / Code 634924 (20회)

SMARTer RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends) cDNA Amplification Kit은 SMARTer 기술을 이용하여 5'-RACE로 완전한 5'말단을 포함한 cDNA를 취득하는 것이 가능하며 프로모터 영역이나 전사 개시점의 해석 등에도 유효하다. 동일한 kit을 이용해서 3'-RACE도 실시할 수 있다.

• Full length cDNA를 쉽게 취득

SMARTer 기술에 의해 full-length cDNA만을 선택적으로 PCR 증폭할 수 있다. Gene specific primer만 준비하면 5'-RACE와 3'-RACE를 모두 진행할 수 있다.

• 보다 편리한 사용법

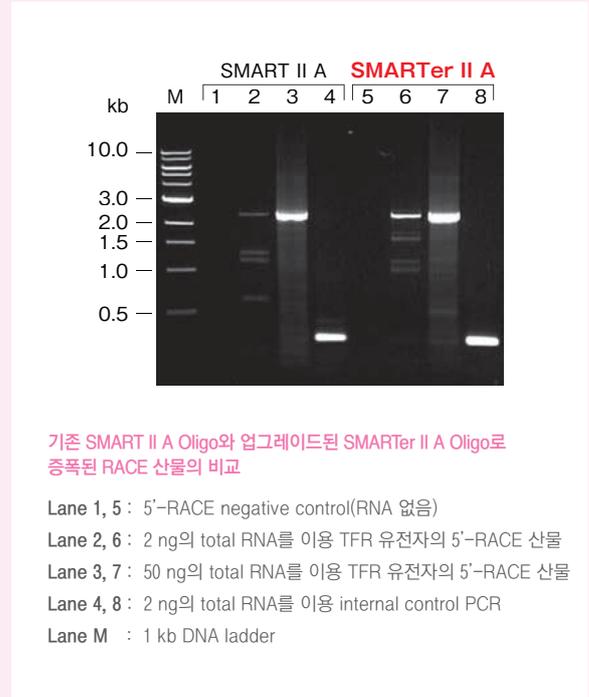
cDNA 합성 중에 5'말단과 3'말단에 adaptor가 합성되어 adaptor ligation 없이 1st strand cDNA를 그대로 RACE PCR에 사용할 수 있다. 실험 스텝이 최소화되어 전체 실험 시간은 4시간 밖에 소요되지 않는다.

• 10 ng의 total RNA에서도 OK

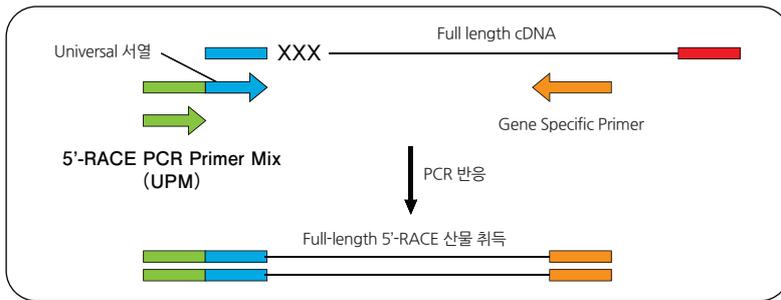
실험에 필요한 total RNA의 최소량이 10 ng에 불과하고, 복잡한 ligation 조작 과정이나 복수의 효소 반응이 필요없기 때문에, 여러 단계 반응시 보다 시료의 손실이 줄어든다. 따라서 소량의 시료를 취급하는 경우 강력하게 추천한다.

• RNA의 전처리 불필요

SMARTer RACE 법에서는 DNase 처리와 같은 RNA의 전처리가 필요하지 않다. 본 프로토콜은 total RNA 뿐만 아니라 genomic DNA가 혼합되어 있을 가능성이 있는 시료에도 유효하다.



5'-RACE PCR 예



5'-RACE를 위한 변형 Oligo(dT) primer와 SMARTer Oligo를 이용해 full-length cDNA를 합성한다. 그 후 목적 유전자의 specific primer와 kit에 포함된 5'-RACE PCR Primer Mix(UPM)*를 이용하여 PCR을 실시하면 full-length RACE 산물을 취득할 수 있다.

* SMARTer Oligo에 있는 universal 서열을 갖는 long primer와 short primer의 혼합

SMARTScribe™ Reverse Transcriptase Code 639536 (40회)

본 효소는 RNA로부터 효율적으로 full-length 1st strand cDNA를 합성할 수 있는 개량된 M-MLV Reverse Transcriptase이다. Total RNA로 역전사 반응시 최대 14.7 kb까지 증폭 가능하다. 또한 주형 RNA의 상대적인 발현 프로파일을 유지하면서 10 copy 정도의 mRNA나 0.1 pg의 미량의 total RNA 주형으로부터 cDNA 합성이 가능하다. 별도 구매 가능하다.

Marathon® cDNA Amplification Kit Code 634913 (5 cDNA&100 PCR)

기존의 RACE Kit과 달리 동일한 template를 이용하여 5'-RACE와 3'-RACE를 동시에 진행할 수 있다. ESTs(expressed sequence tags), differential display, RNA fingerprinting, 또는 cDNA subtraction과 같은 방법으로 확보된 multiple RNA 등의 분석에 유용하다. 또한 세포 종류나 조직에 따라 미리 만들어져 있는 Marathon-Ready cDNAs도 판매되고 있다.

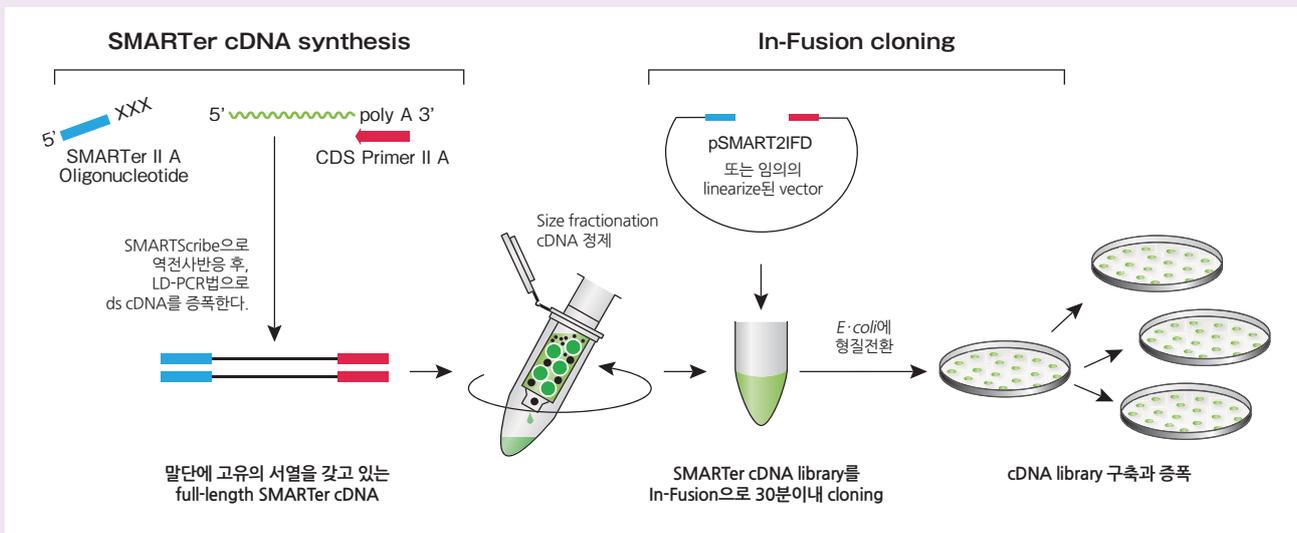
Full-length cDNA Vector Library 구축

In-Fusion[®] SMARTer[™] Directional cDNA Library Construction Kit

Code 634933 (10회)

• 원하는 plasmid vector의 원하는 부위에 고품질 full-length cDNA library 구축

본 kit은 Clontech의 뛰어난 SMARTer cDNA 합성 기술과 In-Fusion Cloning 기술이 조합된 제품이다(그림 참조). SMARTer cDNA 합성법은 미량의 total RNA(최소 적용량 10ng)로부터도 고품질의 full-length cDNA library를 합성할 수 있으며, In-Fusion Cloning 법은 PCR 산물로 얻은 library를 임의의 원하는 plasmid vector의 원하는 위치에 directional cloning이 가능하다. 이 제품을 이용하면 번거로운 cDNA의 제한효소 처리나 dephosphorylation 그리고 adaptor 부가 등의 실험 단계가 필요 없어, cDNA 합성부터 cloning을 통해 library 구축과 증폭까지 전 과정을 3일 이내에 완료할 수 있다. 또한, In-Fusion Cloning 법으로 cDNA library를 구축하면 cloning시 문제가 되는 vector와의 교차점에서 여분의 염기 부가도 일어나지 않는다. Cloning 후 콜로니를 체크한 결과 90% 이상에서 insert가 확인 되었으며 cDNA 단편(12kb)도 포함되어 있음을 확인하였다.

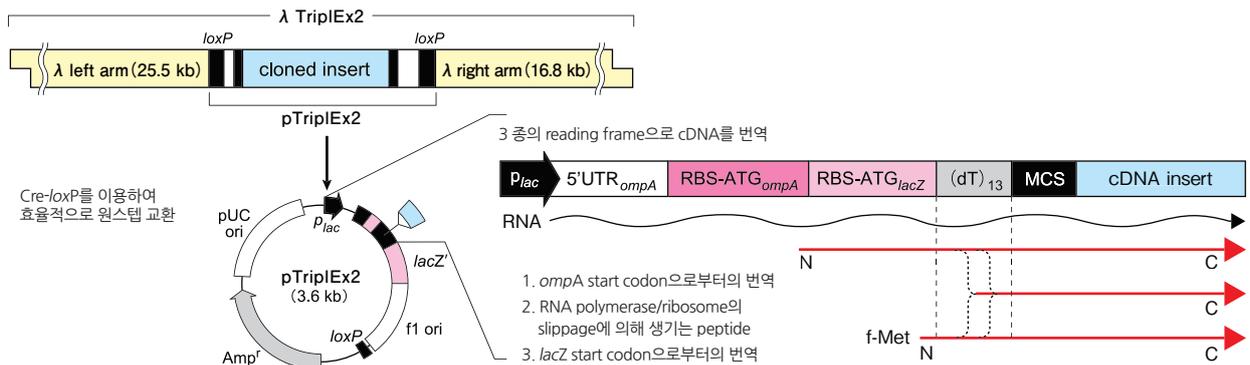


SMART[™] cDNA Library Construction Kit Code 634901 (10회)

• Phage λTriplEx2 Vector Library 구축

본 kit은 λTriplEx2 vector를 이용하여 cDNA library를 구축하는 제품이다. 양쪽에 loxP 사이트를 갖고 있어 λ내로 목적 유전자를 넣고(그림 참조) loxP 사이트를 이용해 원시스템으로 phage로 부터 plasmid로 변환하는 것도 가능하다. 또한 2개의 translation start site와 (dT)₁₃ slip site가 MCS 상류에 위치하고 있어 삽입된 유전자를 3가지 reading frame으로 번역할 수 있다. 무엇보다 높은 효율의 발현 스크리닝이 가능하다.

λTriplEx 발현계 개요



Next Generation Sequencing을 위한 cDNA 합성

SMARTer™ Ultra Low RNA Kit for Illumina® Sequencing

Code 634935 (10회)

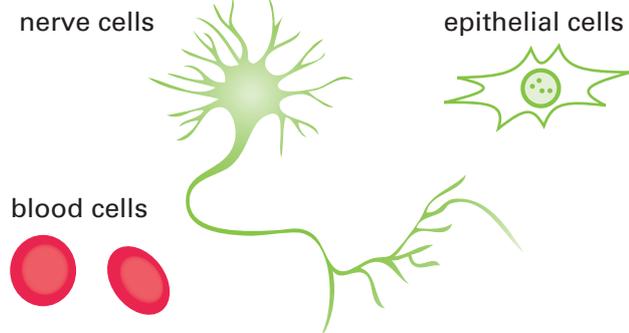
- 뛰어난 반응 감도 - 100 pg의 total RNA 적용 가능
- Single tube reaction - 실험 단계를 줄여 시료 손실 가능성을 낮춰 시료 보존에 유리
- RNA-seq에 적용 - whole transcriptome 정보 분석에 유용
- Single-cell analysis - 세포로부터 곧바로 RNA-seq library 제작 가능
- Illumina의 NGS 프로토콜에 포함된 제품

RNA Sequencing(RNA-Seq)은 유전자 발현 분석법의 혁신을 통해 세포의 transcriptome complexity 분석을 가능하게 하였으나, 줄기세포, 순환하는 암세포나 뇌조직과 같이 시료가 희귀하고 매우 제한된 경우 여전히 기존의 RNA-Seq 방법을 적용하는데 어려움이 있다. 이런 극미량의 시료를 민감하고 재현성있게 분석하기 위해 Clontech과 Illumina가 협력하여 SMARTer Ultra Low RNA Kit for Illumina Sequencing(Code 634935)을 이용한 강력한 프로토콜을 개발하게 되었다.

뛰어난 민감도와 재현성

SMARTer Ultra Low RNA Kit for Illumina Sequencing은 100 pg의 극미량의 total RNA로부터 간편하고 효율적으로 library를 제작한 후 Illumina사의 HiSeq™, HiScanSQ™ 와 Genome Analyzer IIX로 분석하도록 되어 있다(Illumina사 프로토콜). 본 kit로 합성된 cDNA는 변형된 Illumina library prep 프로토콜을 이용하여 표준 Illumina sequence-by-synthesis (SBS) sequencing에 이용할 수 있다.

How Much RNA is in a Single Cell?



세포로부터 추출할 수 있는 RNA의 양은 세포의 크기나 대사 상태에 따라 큰 차이를 보이지만 일반적으로 신체 세포 대부분은 10-30 pg의 RNA를 포함하고 있다. SMARTer Ultra Low RNA Kit for Illumina Sequencing를 이용하면 소수의 세포로부터 추출된 미량의 RNA 뿐만 아니라 cell 자체를 이용해서도 고품질의 RNA sequencing 결과를 얻을 수 있는 강력한 기술이다.



SMARTer Ultra Low RNA Kit for Illumina Sequencing은 Illumina사의 차세대 시퀀서인 Genome Analyzer, HiSeq™와 HiScanSQ™를 이용한 유전자 발현 해석에 적합하도록 디자인된 cDNA 조제 kit이다. 불과 100 pg의 total RNA로부터 Illumina사의 NGS 시스템에 적용할 cDNA를 조제할 수 있으며, 조제된 cDNA는 Illumina사의 독자적인 Sequencing By Synthesis (SBS)법에 사용하는 library 제작에 곧바로 이용할 수 있다.