cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version)

cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version)
TaKaRa Code 6130 RNA 20 ㎍

M-MLV (Moloney murine leukaemia virus) 유래의 역전사 효소를 사용한 double strand cDNA 합성 kit이다. 본 kit에서 사용되고 있는 역전사 효소, Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻) (TaKaRa Code 2640)는 점돌연변이에 의해 RNase H 활성을 결손시킨 재조합 효소로, ① 주형 mRNA를 분해하지 않기 때문에 긴 cDNA를 합성할 수 있으며 ② deletion type의 RTase M-MLV (RNase H free)에 비해 신장성이 우수하고 ③ 열안정성이 비교적 높으며(50~55℃), 효소 · 기질 농도의 최적 범위가 넓고, 사용상 용이점 등의 이점이 있다. 또, 반응계의 개선으로 기존의 제품에 비해 2nd strand 합성 성능이 높아졌다.

Kit의 내용 (RNA 20 ㎍분)

Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻) (200 U/㎕)	10 ㎕
RNase Inhibitor (20 U/㎕)	10 ㎕
Oligo (dT)$_{18}$ Primer (1 ㎍/㎕)	20 ㎕
Random Primer (9 mer) (0.3 ㎍/㎕)	20 ㎕
5 × 1st Strand Synthesis Buffer	40 ㎕
dNTP Mixture (각 10 mM)	40 ㎕
E. coli RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture	20 ㎕
E. coli DNA Polymerase I (20 U/㎕)	20 ㎕
5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	300 ㎕
T4 DNA Polymerase (1 U/㎕)	40 ㎕
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 처리 H_2O	600 ㎕ × 2
Control RNA (1 ㎍/㎕)	5 ㎕

실험예

●방법

Poly (A)$^+$ RNA Ladder 1 ㎍을 주형으로 Oligo (dT)$_{18}$ Primer로 cDNA를 합성하였다. 중간 산물인 1st strand DNA와 최종 산물인 2nd strand DNA를 다음의 2가지 방법으로 확인하였다.

①1.4% 알칼리 변성 agarose gel 전기영동하고 SYBR® Green II로 염색한 후 형광이미지 analyzer로 검출 (single strand DNA의 검출)

②1.4% agarose gel 전기영동 후 EtBr로 검출 (double strand 및 single strand DNA의 검출

●결과

①1.4% 알칼리 agarose gel 전기영동으로 합성된 cDNA 확인 (그림 1)

1st strand와 2nd strand 모두 7.46 kb cDNA까지 검출할 수 있었다. 알칼리 agarose 전기영동에서는 cDNA 합성산물이 알칼리 변성으로 모두 single strand로 전기영동되기 때문에 1st strand와 2nd strand cDNA는 같은 위치에 band가 검출된다. 2nd strand cDNA의 경우 각 band의 강도는 1st strand cDNA의 약 2배가 되는 것으로 double strand cDNA의 합성이 추측된다.

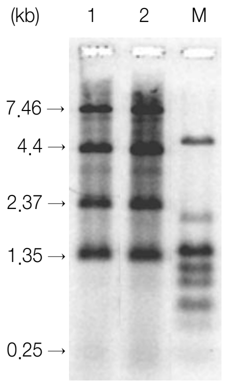

그림 1
1: 1st strand 합성산물, 2: 2nd strand 합성산물, M: pHY narker

②1.4% agarose gel 전기영동으로 합성된 cDNA 확인 (그림 2)

2nd strand cDNA를 비변성 agarose gel 전기영동으로 7.46 kb까지 double strand cDNA를 검출할 수 있었다 (그림 2, lane 2). 또한 1st strand cDNA는 double strand cDNA보다 작고 약한 size로 검출되었다 (그림 2 , lane 1). 게다가 EtBr은 double strand DNA에 정량적으로 강하게 결합하지만 single strand DNA에는 결합이 약하기 때문에 single strand DNA의 band는 흐리게 보인다.

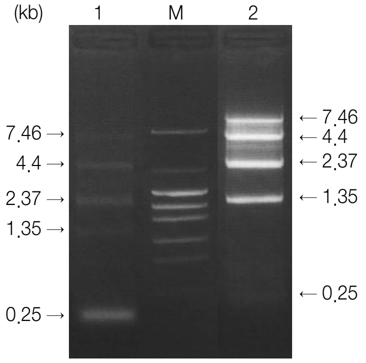

그림 2
1: 1st strand 합성산물, 2: 2nd strand 합성산물, M: pHY narker