

polyA로부터 고품질의 cDNA 합성이 가능한 업그레이드 역전사효소

PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit

PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit

| | |
|---------------|------|
| 6210A | 50회 |
| 6210B (A x 4) | 200회 |

- 백그라운드를 최대한 억제한 고품질의 full-length cDNA 합성
- 최고의 신장능력
- 탁월한 polyA 이용효율과 합성속도

복잡한 구조나 긴 단편의 RNA를 주형으로 하는 경우, cDNA 합성을 방해하는 주요 요인은 RNA 고차 구조로 인해 역전사효소가 비특이적으로 결합하는 것이다. 또한, 역전사효소의 mispriming에 의한 비특이적 신장은 RT-PCR이나 full-length cDNA 합성에 막대한 악영향을 미치게 된다. 다카라에서는 accessory protein을 이용하여 PrimeScript® RTase의 개량으로, 이러한 cDNA 합성 저해 요인을 최대한 억제하는 것에 성공하였다.

본 제품은 특히 Oligo dT 프라이머를 이용한 cDNA 합성시, PrimeScript® RTase 본래의 탁월한 polyA 이용효율과 합성속도를 유지하면서, 긴 단편을 합성하는 신장성과 cDNA 합성 산물의 품질을 향상시켰다. 또한, polyA로부터 cDNA 합성저해의 원인이 되는 역전사 반응액 조제시 생기는 비특이적인 신장 반응이 완전히 억제되었기 때문에, 반응액 조제 후 얼음 위에 둔 채로 역전사 반응을 시작하기까지 다소 시간이 지연되어도 비특이적인 반응을 억제하는, 즉 "Hot Start와 같은 상태"를 실현하였다.

본 제품으로 합성된 cDNA는 full-length cDNA 비율이 확실히 높은 것을 기대할 수 있다. Full-length cDNA library 제작 등과 같이 고품질의 cDNA가 필요한 실험에 반드시 본 제품이 도움이 될 것이다.

■ 내용 (50회)

| | |
|----------------------------------|--------|
| PrimeScript® II RTase (200 U/μl) | 50 μl |
| 5 × PrimeScript® II Buffer | 200 μl |
| RNase Inhibitor (40 U/μl) | 25 μl |
| dNTP Mixture (10 mM each) | 50 μl |
| Oligo dT Primer (50 μM) | 50 μl |
| Random 6 mer (50 μM) | 100 μl |
| RNase Free dH ₂ O | 1 ml |

■ 백그라운드를 최대한 억제한 고품질의 full-length cDNA 합성

각종 역전사효소의 mispriming에 의한 비특이적인 신장 산물량과 그것이 polyA로부터의 full-length cDNA 합성에 미치는 영향을 Oligo dT 프라이머를 이용해 아래의 방법으로 조사하였다.

평가실험 1A : 역전사 반응액 조제 및 얼음 위 방치로 생기는 polyA 이외로부터의 비특이적인 신장 산물량(백그라운드)의 측정

[방법]

얼음 위에서 Human heart total RNA 1 μg, 각 회사별 역전사 효소, Oligo dT 프라이머로 cDNA를 합성하기 위한 반응액을 조제하여 0 ~ 30 분간 얼음 위에 방치한 다음, 역전사 반응을 실시하지 않고 95℃로 가열하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 주형으로 Dystrophin 유전자의 polyA로부터 7,327 base 떨어진 139 base (영역①)크기의 cDNA를 Real Time PCR로 정량하였다(그림 1).

본 실험에서 영역①의 cDNA 합성량은 polyA 에서부터 비특이적으로 신장한 cDNA 합성량을 반영한다.

평가실험 1B : 역전사 반응액 조제 및 얼음 위 방치로 인한 polyA로부터의 긴 단편 cDNA 합성 반응의 저해 평가

[방법]

얼음 위에서 Human heart total RNA 1 μg, 각 회사별 역전사 효소, Oligo dT 프라이머로 cDNA를 합성하기 위한 반응액을 조제하여 0 ~ 30 분간 얼음 위에 방치한 다음, 역전사 반응을 실시하고 95℃로 가열하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 주형으로 Dystrophin 유전자의 polyA로부터 6,930 base (영역②)크기의 cDNA를 Real Time PCR로 정량하였다(그림 1).

본 실험에서 영역②의 cDNA 합성량은 실제의 polyA로부터의 긴 단편 신장 산물량을 반영한다.

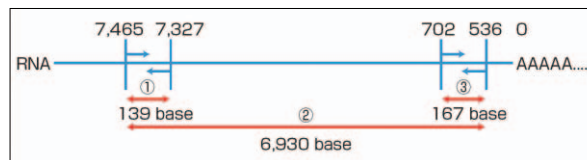
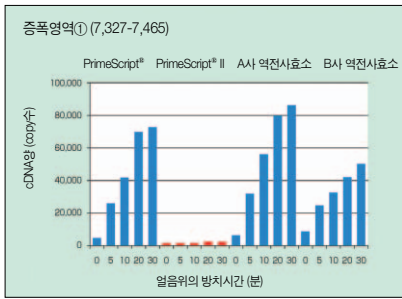


그림 1. 실험 1A, 1B, 2 및 3에서 실시한 Real Time PCR의 프라이머 위치와 증폭영역. 각 cDNA 합성 산물을 주형으로 Dystrophin 유전자의 ①, ②, ③의 영역을 Real Time PCR으로 증폭해 정량한다. 검량선은 ①, ②, ③의 영역을 포함하는 cDNA를 clone화한 plasmid를 주형으로 작성하였다. ① 및 ③ 단편의 Real Time PCR에는 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)를 사용하였고, ②의 긴 단편의 Real Time PCR에는 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase를 사용해 SYBR® Green I으로 검출했다.

[결과]

PrimeScript® RTase와 A사 및 B사 역전사 효소는 반응액을 얼음 위에 방치하는 시간이 길어짐에 따라 polyA부터 비특이적인 증폭 산물이 증가하였고(그림 2A), 역전사 반응에 의한 polyA로부터의 긴 단편의 증폭 산물은 반대로 감소하였다(그림 2B). 이 결과는 얼음 위에 방치될 때 비특이적인 증폭이 수반되어, 긴 단편의 cDNA 합성을 저해한다고 추측된다. 한편, PrimeScript® II RTase의 경우 반응액을 얼음 위에 방치해 놓는 시간이 길어져도 비특이적인 증폭 산물은 증가하지 않았고(그림 2A), 그 후의 역전사 반응에 의한 polyA로부터의 긴 단편의 cDNA 합성 저해도 전혀 볼 수 없었다(그림 2B). 따라서, PrimeScript® II RTase는 반응액 조제 후, 역전사 반응을 실시하기까지 시간(얼음 위에서 방치 시간)이 다소 지연되어도 크게 영향을 미치지 않고 반응할 수 있는 Hot Start 타입의 효소로, polyA로부터의 cDNA 합성시 백그라운드가 매우 적고 full-length의 비율이 높은 고품질의 cDNA를 얻을 수 있다.

(A) 역전사 반응액 조제 후 얼음위에 방치하여 생기는 비특이적인 증폭 (polyA로부터 증폭 되는 짧은 cDNA)



(B) 반응액 조제 후 얼음위에 방치한 다음 역전사반응을 하였을 때, polyA로부터 합성된 긴 단편의 cDNA 양

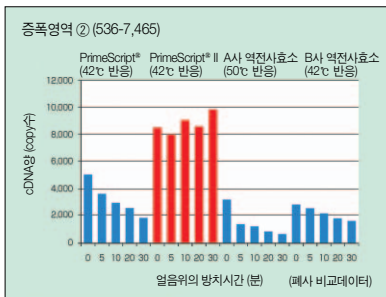


그림 2. 역전사 반응액 조제 후, 반응을 시작할 때까지 얼음 위 방치로 생기는 비특이적인 증폭과 polyA로부터의 cDNA 합성 저해

■ 뛰어난 신장능력

평가실험 2

[방법]

Human heart total RNA 1 μg, 각 회사별 역전사 효소, Oligo dT 프라이머로 cDNA를 합성하여, Dystrophin 유전자의 polyA로부터 6,930 base (영역②) 크기의 긴 단편의 cDNA를 Real-Time PCR로 정량하였다 (그림 1).

[결과]

PrimeScript® II RTase는 긴 단편 신장이 매우 역전사효소인 PrimeScript® RTase 를 상회하는 신장성을 나타냈다. 또한, PrimeScript® RTase와 PrimeScript® II RTase는 역전사 반응 5분에서의 cDNA 합성량이 이미 최대 cDNA 합성량의 70 %를 넘어 타사 효소에 비해 탁월한 cDNA 합성 속도를 가지고 있는 것이 확인되었다 (그림 3).

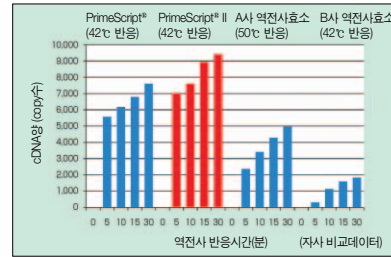


그림 3. 긴 단편 신장성

■ 탁월한 polyA의 이용 효율

평가실험 3

[방법]

Human heart total RNA 1 μg, 각 회사별 역전사 효소, Oligo dT 프라이머로 cDNA를 합성하여, Dystrophin 유전자의 polyA로부터 167 base (영역③) 크기의 cDNA를 Real-Time PCR로 정량하였다 (그림 1).

[결과]

PrimeScript® RTase 및 PrimeScript® II RTase는 A사나 B사 역전사 효소에 비해 cDNA의 합성량이 많아 높은 효율로 polyA를 이용하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 역전사 효소 반응액을 얼음 위에서 조제한 후, 즉시 95°C로 가열한 역전사시간 0분에서 cDNA 합성량이 이미 최대 합성량의 약 50 %에 이르렀고, 타사 효소에 비해 탁월한 cDNA 합성 속도가 확인되었다 (그림 4).

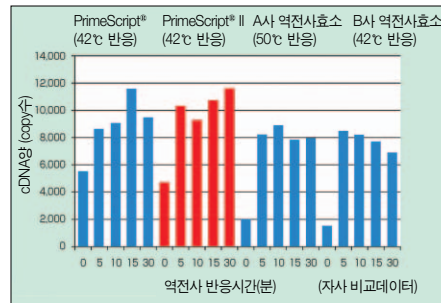


그림 4. polyA 이용효율

■ 결론

Accessory protein을 첨가하여 한층 더 업그레이드된 PrimeScript® II RTase는 cDNA 합성의 저해 요인을 최대한 억제하여, 높은 비율의 full-length cDNA를 포함한 고품질의 cDNA 합성을 가능하게 한다.

※ License Notice [1] [2] [4]