

cDNA를 현명하게 합성하는 더 진화된 방법 SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit

- 1~2 ng의 극소량의 total RNA로도 고품질의 cDNA 합성
- 귀중한 시료의 보존과 정확한 유전자 빈도의 유지가 필요할 때
- 높은 특이성과 낮은 백그라운드, 그리고 높은 합성양
- 풍부한 full length cDNA 합성
- Adaptor ligation 불필요
- 더 길고 드문 유전자 증폭에 적합

■ SMART 기술로 더 현명해진 cDNA 합성

Clontech은 SMART(Switching Mechanism At the 5' end of RNA Transcript) 기술의 발명으로 cDNA 합성에 큰변화를 가져왔다. 매우 독특한 이 기술은 cDNA 양쪽 말단에 adaptor를 결합시킬 때 Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV) 역전사효소 고유의 말단전이효소(terminal transferase)의 특성과 주형 전환 활성(template-switching activity)을 이용하였다¹⁾.

한번의 cDNA 합성으로 universal primer 결합 부위까지 추가되므로 adaptor ligation이나 2nd strand 합성을 위한 복잡한 단계가 필요없어, 쉽게 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), subtractive hybridization이나 Library제작 등의 실험을 진행할 수 있다. 간단하고 효과적인 SMART cDNA합성 방법은 기존의 상용화된 방법과 비교해도 높은 특이성을 가지고 있다.

Clontech은 최근 구성품들을 업그레이드한 SMARTer Kit 시리즈를 출시하였다. 새로운 SMARTer Kit에는 개선된 SMARTer II A Oligonucleotide와 새로운 역전사효소인 SMARTScribe Reverse Transcriptase가 포함되어 있다.

SMARTer II A Oligonucleotide와 함께 사용함으로써 SMARTScribe Reverse Transcriptase의 주형 전환 능력이 더 향상되었고, 이로 인해 주형의 사이즈나 분포비율에 관계없이 높은 품질의 full-length cDNA를 만들 수 있게 되었다²⁾.

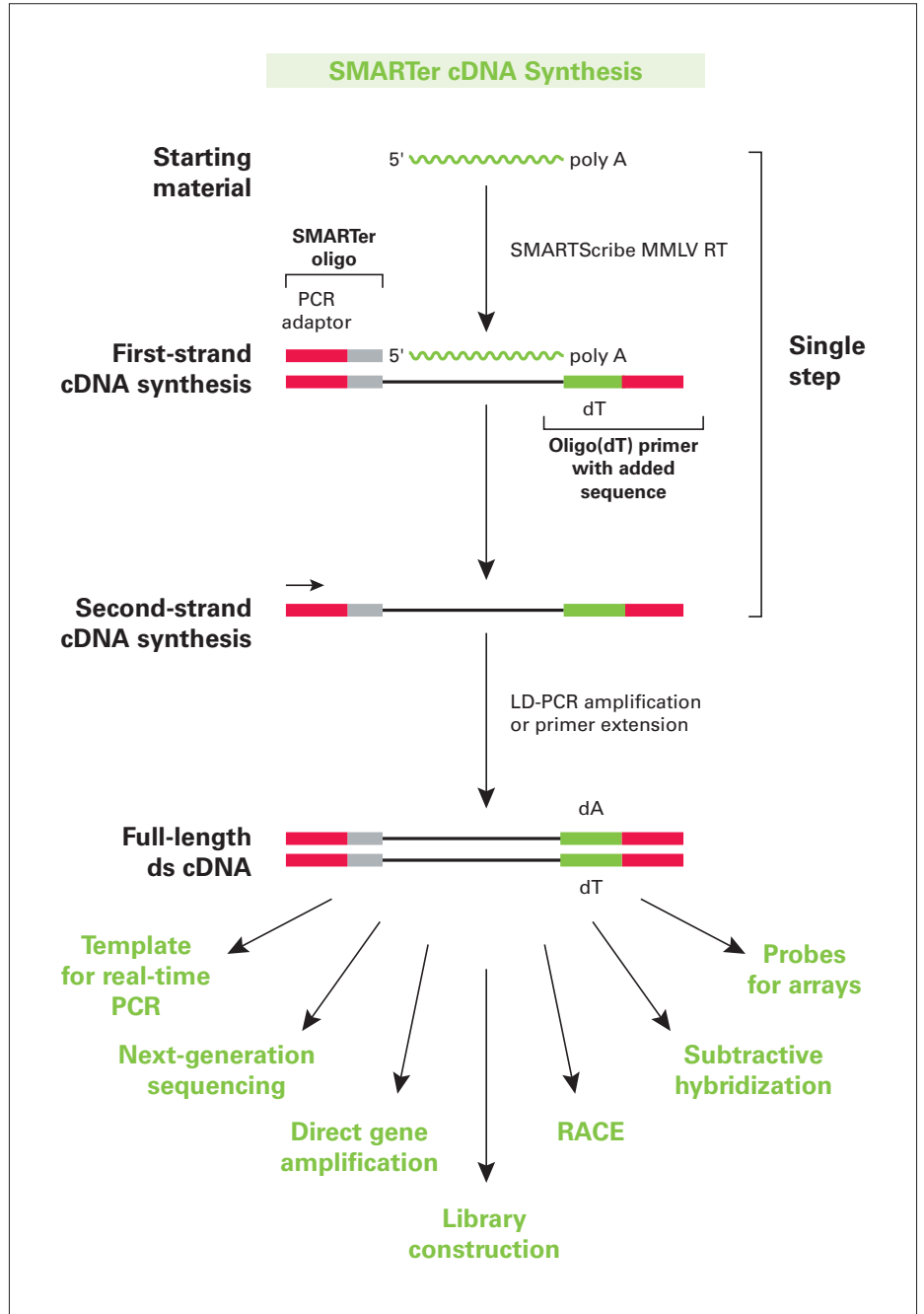


그림 1. SMARTer cDNA synthesis occurs in a single-step reverse transcription reaction. Following amplification, SMARTer cDNA can be used for a variety of downstream applications.

continued...

■ 소량의 RNA로부터 고품질의 cDNA 합성

SMARTer cDNA Synthesis Kit는 유세포분석기로 분류된 세포나 laser capture microscopy 시료와 같이 극미량의 시료로부터 추출된 RNA 등, 제한된 초기시료를 이용하는 연구자들에게 매우 유용하다. SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Code 634925, 634926)는 total RNA 2 ng의 미량의 초기 시료로부터도 1st strand cDNA를 합성할 수 있어(그림 2A), 기존의 SMART PCR cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Code 634902; 종매) 보다 더 낮은 농도의 시료도 cDNA 합성이 가능하다. 극도로 희석된 RNA는 일반적인 cDNA 합성에는 사용할 수 없기 때문에 Clontech은 농도가 20 pg/ul 정도로 낮은 total RNA 1 ng으로 고품질의 cDNA를 합성할 수 있도록 SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis

Kit (TaKaRa Code 634928)를 출시하였다 (그림 2B). SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit는 SuperSMART PCR cDNA Synthesis Kit를 업그레이드 시킨 제품으로 반응량을 증가시키고 컬럼 정제 단계를 추가하여 정제된 1st strand cDNA의 전량을 사용할 수 있도록 되어 있다. SMARTer와 SMARTer Pico 모두 1~2 ug의 dsDNA가 증폭되도록 구성되어 있다

■ 더 긴 전사산물(transcript) 증폭

SMART RACE cDNA Amplification Kit를 업그레이드하여 출시된 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit는 2ng의 total RNA를 이용하여 알고 있는 서열로부터 RNA의 5'-말단과 3'-말단까지 RNA 전사산물의 전체 서열을 해석하기 위한 제품이다. SMARTer cDNA는 역

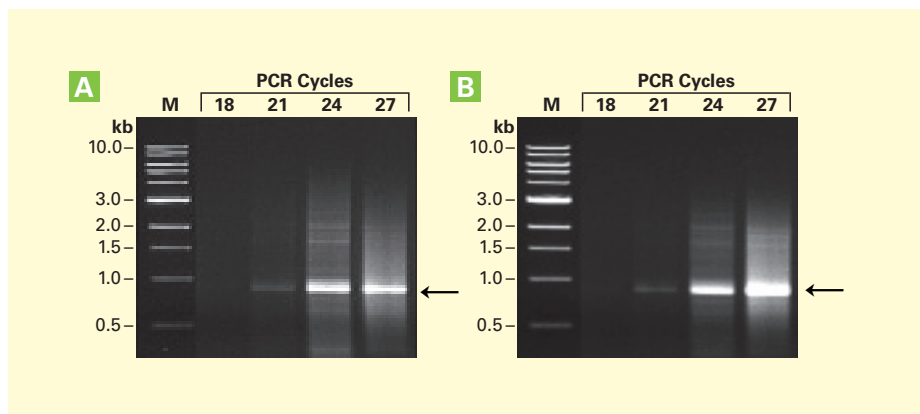


그림 2. Typical gel profile of ds cDNA synthesized with the SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Panel A) and the SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Panel B), using the Control Human Placental Total RNA as a template. 2 ng (Panel A) or 1 ng (Panel B) of the Control Human Placental Total RNA was subjected to first-strand cDNA synthesis and purification, followed by PCR amplification as described in the user manual for each kit. 5 μl of each PCR product was electrophoresed on a 1.2% agarose/EtBr gel in 1X TAE buffer following the indicated number of PCR cycles. Lanes M : 1 kb DNA ladder size markers. The arrows indicate the strong band at 900 bp typically seen for human placental total RNA.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit	10 rxns	634925
	20 rxns	634926
SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit	10 rxns	634928
SMARTer RACE cDNA Amplification Kit	10 rxns	634923
	20 rxns	634924
Universal Primer Mix	100 rxns	634922

전사반응 이후 adaptor ligation 단계를 추가하지 않아도 5'-RACE와 3'-RACE에 직접 사용될 수 있다. 업그레이된 제품에 포함된 새로운 SMARTer oligo는 기존의 SMART oligo보다 5'-RACE PCR 산물의 양을 증가시킨다(그림 3). SMARTer RACE Kit는 RACE PCR에 사용되는 Universal Primer Mix가 포함되어 있으며, Universal Primer Mix는 별도 판매되고 있다. 추가적으로 본 제품에는 poly(A) tail이 없는 RNA 실험을 위해 random primers도 포함되어 있다.

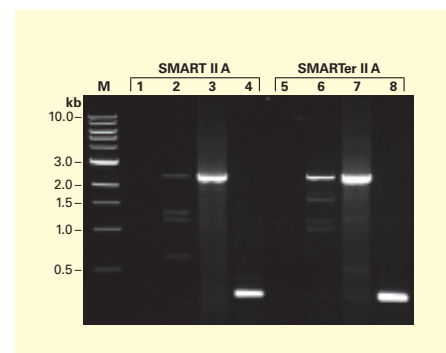


그림 3. The SMARTer II A Oligo increases the overall yield of the 5'-RACE PCR products. Note the difference in intensity between the 2.6 kb 5'-RACE product in Lane 2 (produced by the SMART II A oligo) and that in Lane 6 (produced by the SMARTer II A oligo); both bands resulted from the amplification of only 2 ng of human placental total RNA template. In the assay shown, first-strand cDNA synthesis and 5'-RACE PCR amplification were performed as described in the user manual (PT4096-1). Lanes 1 & 5: No RNA 5'-RACE control, Lanes 2 & 6: Transferrin Receptor (TFR) 5'-RACE starting from 2 ng total RNA. Lanes 3 & 7: TFR 5'-RACE starting from 50 ng total RNA. Lanes 4 & 8: 5'-cDNA internal control using 2 ng total RNA as template. Lane M: 1 kb DNA Ladder.

■ 참고문헌

- Chenik, A. et al. (1998) In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. Eds Siebert, P. & Larrick, J. (BioTechniques Books, MA) Ch 22.
- Be SMART™ About First-Strand cDNA Synthesis (January 2009) *Clontechiques* XXIV(1): 15 - 17.

* License Notice : [16]