

가장 정확도가 높은 고성능 역전사효소

PrimeScript® Reverse Transcriptase

- M-MLV 유래의 Reverse Transcriptase
- 아주 탁월한 fidelity (정확성)를 통하여 실험 초기 단계에서부터 error 가능성 최소화
- 복잡한 고차구조를 가진 RNA라도 42°C 반응이 가능하므로 RNA damage 최소화 가능
- 42°C 반응온도에서도 Background가 적은 고품질의 full-length cDNA 합성 가능
- 특유의 displacement 신장 활성을 가지고 있어 long cDNA 합성 가능

PrimeScript® Reverse Transcriptase (TaKaRa Code 2680A)는 M-MLV 유래의 RTase를 기반으로 하여 Takara Bio에서 독자적으로 개발한 역전사효소로 신장성이 매우 뛰어나 높은 감도와 높은 수율로 1st strand cDNA를 합성할 수 있으며, 복잡한 고차 구조를 가지는 RNA에서도 표준적인 반응 온도 (42°C)에서 역전사 반응이 가능하다.

■ PrimeScript® RTase

복잡한 구조의 RNA나 긴 RNA를 template로 이용하는 역전사 반응에서 cDNA 합성을 방해하는 주된 요인은 고차구조를 형성하는 RNA 부위에 역전사효소의 비특이적 결합 및 mis-priming에 의한 비특이적 산물의 증폭 때문이며, RT-PCR이나 full-length cDNA를 얻는데 좋지 않은 영향을 미친다. 이런 역전사효소의 비특이적인 결합 및 mis-priming에 의해서 발생하는 비특이적 증폭을 개선하는 방법 중의 하나가 고차 구조의 형성을 방지하기 위하여 고온에서 반응하는 것이다. 그러나 이 방법은 RNA에 damage를 줄 수 있는 위험이 있으므로 최선의 방법은 아니다. PrimeScript® RTase는 RNA의 비특이적 결합을 억제하고 template와 primer가 annealing하여 형성된 double strand 부위에 결합하는 능력을 최적화하여 효소 자체가 cDNA 합성을 저해하거나 mis-priming을 억제할 수 있도록 개발된 효소이다. 또한, 강한 displacement 신장 활성을 가지고 있어 full-length cDNA의 합성 가능성을 크게 향상시켰다. 본 효소의 이러한 특징으로 인하여 RNA에 damage가 적은 42°C의 반응 온도에서도 복잡한 구조의 RNA 또는 긴 RNA를 template로 사용하여도 background가 낮은 고품질의 cDNA 합성이 가능하다.

■ PrimeScript® RTase의 특징

(1) PrimeScript® RTase는 강한 displacement 신장 활성을 가지고 있어 긴 strand의 신장이 가능하다.

PrimeScript® RTase와 최적 반응 온도가 50°C인 A사의 역전사효소를 이용하여 RNA transcript를 template로 하여 Oligo dT primer와 서열 특이적인 specific primer를 동시에 첨가하여 cDNA를 합성한 후 신장산물을 알칼리 변성 gel로 확인하였다. 그 결과, specific primer로부터 4.4 kb의 신장산물을 치환 (displacement) 하면서 Oligo dT primer로 부터 합성된 전체 길이 6.4 kb의 full-length cDNA 합성 양을 비교한 결과 PrimeScript® RTase가 A사 역전사효소보다 뛰어나며 PrimeScript® RTase가 42°C에서 강한 displacement 신장 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 1).

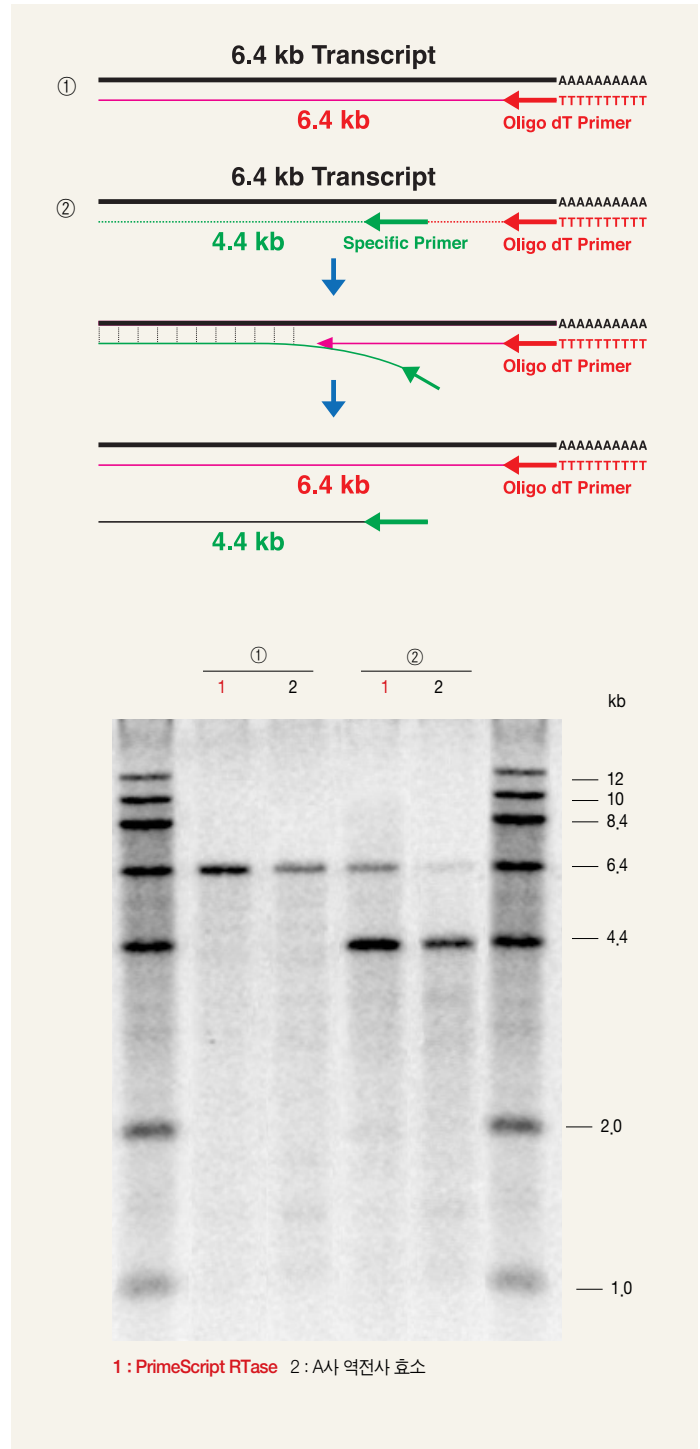


그림1. Displadment 신장 활성의 비교

Continued...

(2) PrimeScript[®] RTase는 42℃의 반응 온도에서 background가 매우 낮은 고품질의 cDNA를 합성할 수 있다.

각 회사의 역전사효소를 이용하여 RNA Ladder (1, 2, 4.4, 6.4, 8.4, 10, 12 kb)를 template로 1st strand cDNA를 합성하였다. 산물의 일정량을 알칼리 변성 gel에서 전기영동 한 후, SYBR[®] Green II로 염색하여 형광 이미지 analyzer FMBIO II로 검출해 신장산물을 비교하였다. 반응은 각 회사의 권장 조건으로 하였다. 그 결과, PrimeScript[®] RTase 쪽이 42℃의 반응 온도에서 보다 긴 길이의 cDNA 합성 능력을 보였고, 낮은 background와 높은 full-length cDNA의 합성비율을 나타내었다 (그림 2).

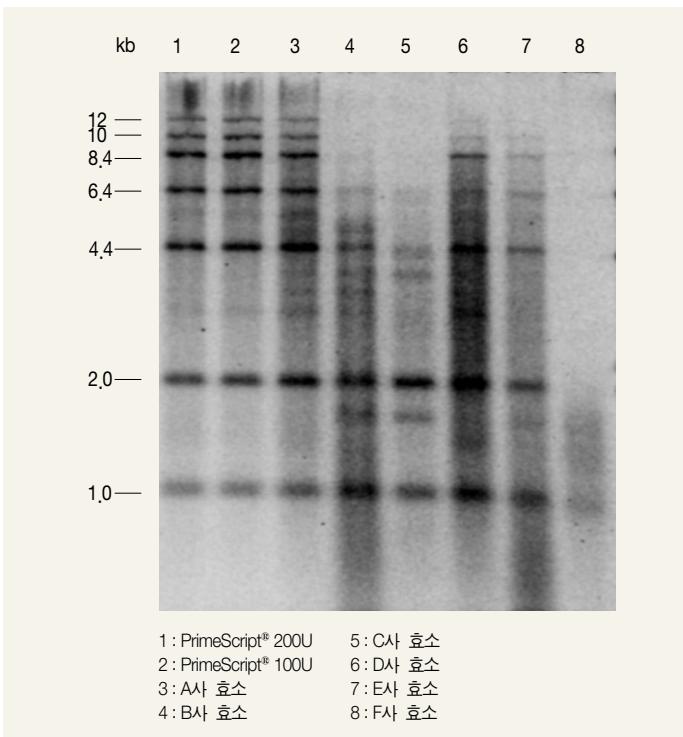


그림 2. 각 회사 역전사 효소의 1st strand cDNA 합성 비교

(3) PrimeScript[®] RTase는 정확성이 높은 역전사효소다.

Human placenta 유래 total RNA (Clontech)를 template로 하여 각 회사의 역전사효소를 이용하여 1st strand cDNA를 합성했다. 역전사 primer에는 Oligo dT primer를 사용하였으며, 각 회사의 권장 protocol을 이용하였다.

cDNA 합성 후, high fidelity 효소인 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase를 이용하여 PCR 증폭을 하였다 (Target gene: TFR, 증폭길이: 500 bp). 증폭 단편을 cloning 하여 선별된 여러 개의 clone에 대하여 염기서열을 확인하였다.

확인한 총 염기수 (약 20 만 염기) 중의 error 염기수의 비율을 에러율로 표기하였으며, 직접 genome으로부터 PCR 한 것을 control로 비교하였다.

PrimeScript[®] RTase에서는 sequencing한 20 만 염기 중 에러가 불과 7개이며, 비교 실험한 역전사효소 가운데, 정확성이 가장 높은 것으로 확인되었다 (그림 3).

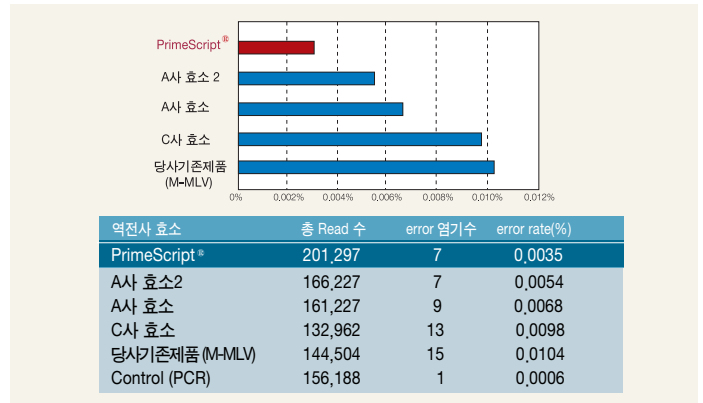


그림 3. 각회사 역전사 효소의 정확성

■ 반응 protocol과 PrimeScript[®] RTase의 장점

긴 strand의 cDNA 합성이나 복잡한 구조의 RNA를 이용하여 역전사 반응을 할 경우, 역전사효소 자체가 RNA의 고차 구조에 결합하여 cDNA 합성을 저해 (그림 4. ③) 하는 것을 막기 위하여 RNA를 denaturation 시킨 후 효소를 첨가하여야 한다 (그림 4. ②). PrimeScript[®] RTase를 사용할 경우, template RNA를 dNTP 존재 하에서 65℃, 5분 가열 후 ice에 냉각한다. 이렇게 denaturation한 RNA는 효율이 좋은 cDNA를 합성할 수 있는 template가 된다 (그림 4. ①). 50℃가 최적 반응 온도인 A사 역전사효소의 경우, 위의 방법으로 변성한 RNA를 ice에서 방치하지 않고 바로 효소를 첨가하여 cDNA 합성반응을 수행하여야 하지만, PrimeScript[®]는 ice에 15분간 방치하여도 충분한 양의 cDNA를 합성할 수 있었다 (그림 5). 이 결과는 PrimeScript[®] RTase가 template-primer 사이의 결합력을 최적화하여 RNA에 비특이적 결합을 억제한다는 것을 보여준다.

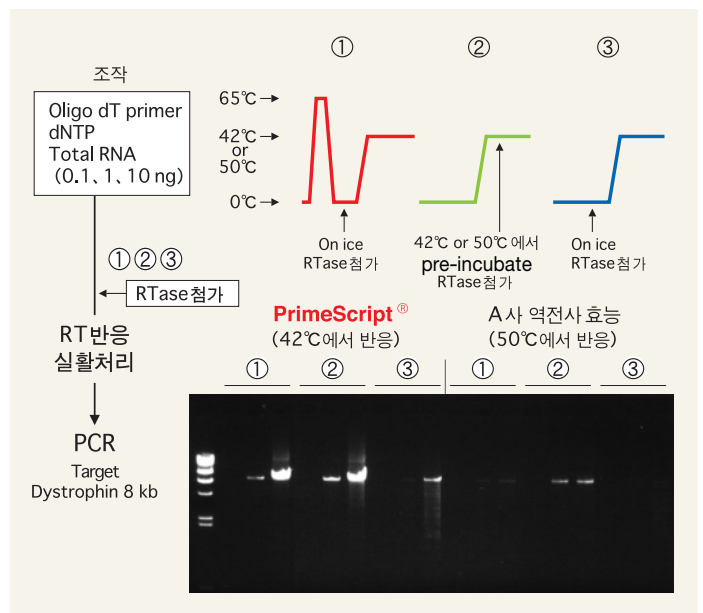


그림 4. 미변성 RNA를 이용한 역전사 효소 첨가에 의한 cDNA 합성 저해

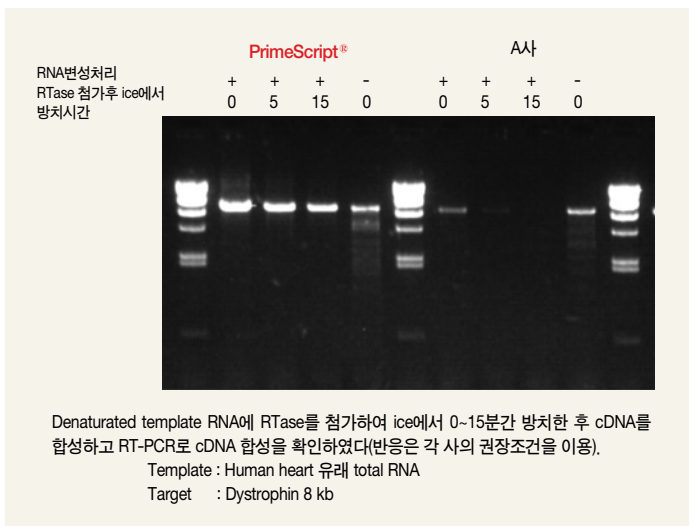


그림 5. 역전사 효소 첨가후 시간과 cDNA 합성과의 관계

■ 실험예1 : 고차 구조를 가진 RNA를 template로 이용한 반응

【방법】

HL60 유래 total RNA를 template로 견고한 고차구조를 가지는 28S ribosomal RNA를 target으로 하여 PrimeScript® RTase와 A사 내열성 역전사효소를 이용하여 Specific Primer로 cDNA를 합성하고, 동일 조건의 PCR로 cDNA를 증폭하였다. PrimeScript® RTase는 42 °C, A사 내열성 역전사효소는 50°C와 55°C로 반응하였으며, 반응 protocol은 각사에서 권장하는 조건으로 하였다.

【결과】

그림 6에 보이는 것처럼 PrimeScript® RTase가 가장 뛰어난 감도와 증폭 효율을 보였으며, 고차 구조를 가지고 있는 RNA에 대해서도 높은 신장성을 확인할 수 있었다.

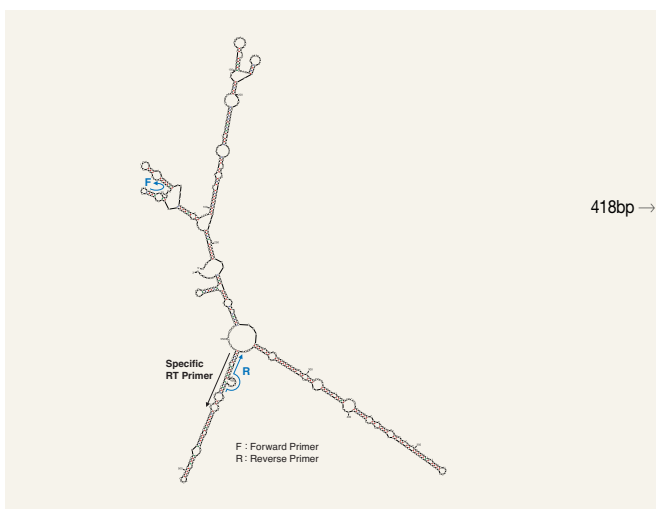


그림 6. 견고한 구조를 가지는 RNA를 template로 한 역전사 반응

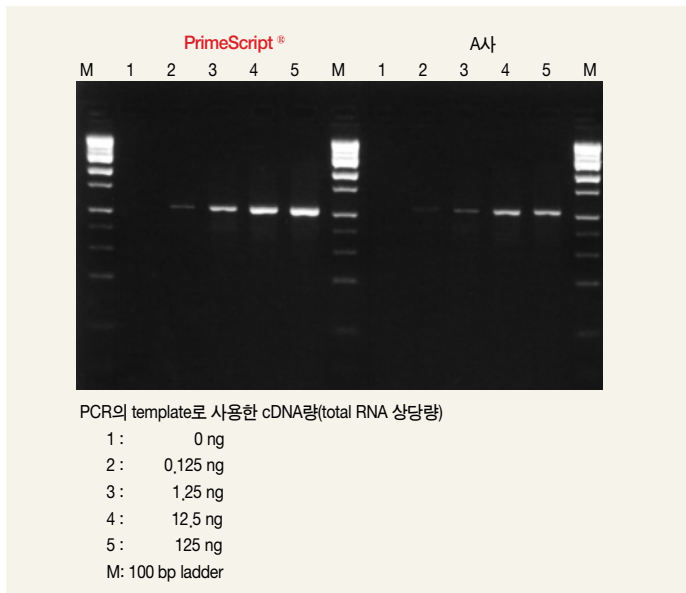


그림 7. GC rich 영역 (ApoE gene)의 신장

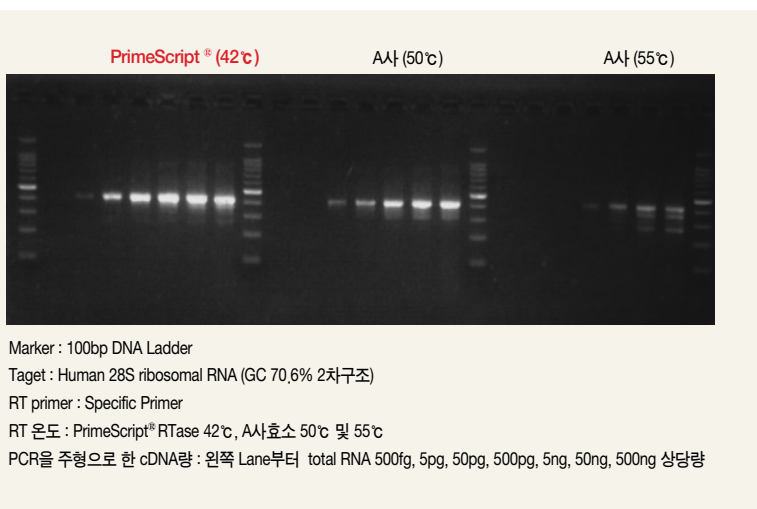
■ 실험예 2 : GC-rich한 RNA 영역을 template로 한 반응

【방법】

HL60 유래 total RNA를 template로 하여 PrimeScript® RTase와 A사 내열성 역전사효소를 이용하여, 각각의 권장 조건에서 Oligo dT primer로 cDNA를 합성하였다. 그리고 ApoE 유전자중 GC 함량이 약 75%인 유전자 (520 bp)를 target으로 동일 조건 하에서 PCR 결과를 비교하였다.

【결과】

그림 7에 나타난 것처럼 PrimeScript® RTase는 A사 내열성 역전사효소보다 뛰어난 결과를 보였다.



■ 실험예 3 : 긴 서열의 RT-PCR

【방법】

Human heart 유래 total RNA (Clontech)를 template로, PrimeScript[®] RTase와 타사 역전사효소를 이용하여 각각의 권장 조건 하에서 Oligo dT primer로 cDNA를 합성하였다. 그리고 Dystrophin 유전자 중 2 kb, 6 kb, 12 kb를 target으로 동일 조건 하에서 PCR 결과를 비교하였다.

【결과】

PrimeScript[®] RTase는 타사 역전사효소에 비하여 감도 및 신장성에서 뛰어난 것을 확인할 수 있었다 (그림 8).

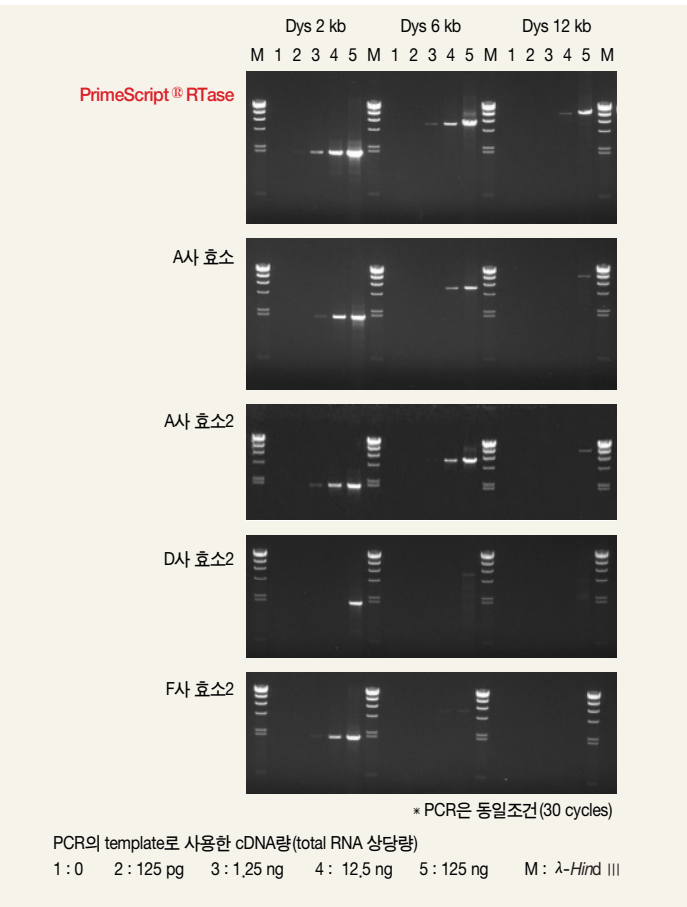


그림 8. RT-PCR 성능비교: 각 사의 역전사 효소와 비교

■ 실험예 4 : Random primer에 의한 RT-PCR

【방법】

Human heart 유래 total RNA (Clontech)를 template로 하고, 역전사효소는 PrimeScript[®] RTase를 사용하였으며, random primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Dystrophin 유전자의 6 kb와 12 kb를 target으로 PCR 증폭하였다.

【결과】

PrimeScript[®] RTase는 random primer를 이용한 경우에도 double strand를 치환하면서 12 kb 이상의 cDNA를 합성할 수 있었다 (그림 9).

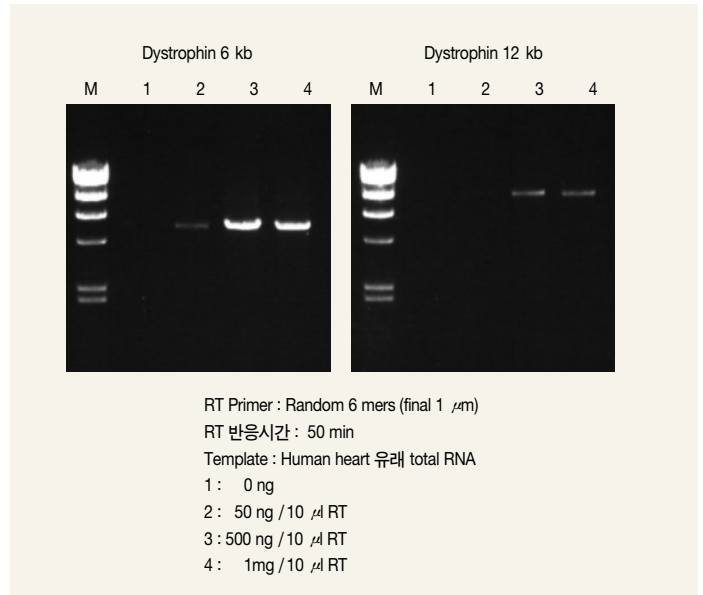


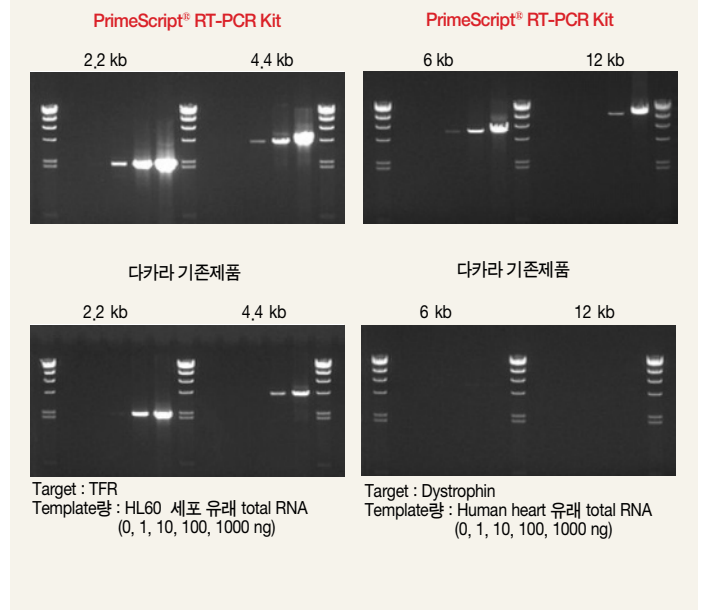
그림 9. Random 6 mer를 이용한 역전사 반응

■ PrimeScript[®] RT-PCR Kit와 AMV RTase를 사용한 당사 기존제품과의 비교

【방법】

여러가지 양의 total RNA를 이용하여 20 μl 반응계로 역전사 반응을 한 후, 역전사 반응액 2 μl를 template로 하여 50 μl 반응량으로 PCR을 했다.

PrimeScript[®] RT-PCR Kit가 뚜렷하게 성능이 좋아진 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 역전사 효소의 성능이 향상되었기 때문이다.



■ PrimeScript® RTase 시리즈

• 1st strand cDNA 합성에 필요한 component를 모두 갖춘 all-in-one kit.
 >> PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Code 6110A)
 본 제품은 PrimeScript® RTase를 이용하여 total RNA 또는 polyA⁺ RNA로부터 1st strand cDNA를 합성하기 위한 kit이다. 1st strand cDNA를 합성할 때 필요한 component가 모두 포함되어 있으므로 바로 실험할 수 있다. 조제한 1st strand cDNA는 2nd strand cDNA의 합성, PCR 증폭 및 Real Time PCR 등의 분야에 폭넓게 사용할 수 있다.

내용 (50 회)	
PrimeScript® Reverse Transcriptase (200 U/μl)	50 μl
5 x PrimeScript® Buffer	200 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	25 μl
dNTP Mixture (10 μm each)	50 μl
Oligo dT Primer (50 μm)	50 μl
Random 6 mers (50 μm)	100 μl
RNase Free dH ₂ O	1 ml

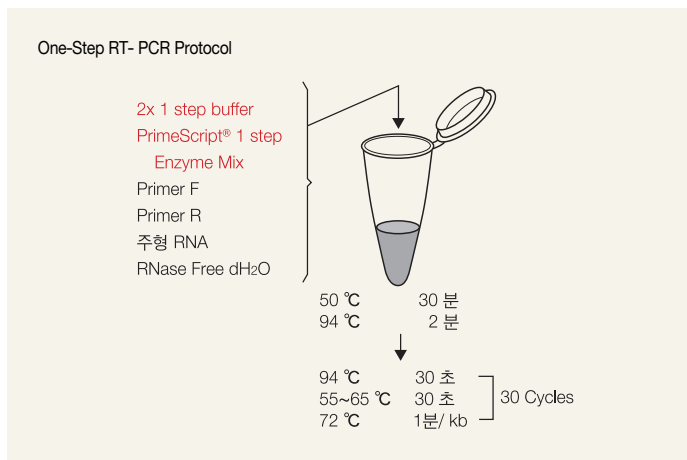
• TaKaRa Ex Taq® HS와 조합하여 최적화된 2 step RT-PCR kit.
 >> PrimeScript® RT-PCR Kit (TaKaRa Code RR014A)
 PrimeScript® RTase와 TaKaRa Ex Taq® HS를 조합하여 최적화된 제품으로 뛰어난 신장성과 아주 높은 증폭 효율을 가지고 있으며, 일반적인 RT-PCR에 이용할 수 있다. 본 제품은 역전사 반응으로 RNA로부터 cDNA의 합성 및 PCR을 통한 cDNA의 증폭에 필요한 모든 시약이 포함된 2 step RT-PCR Kit이다.

내용 (50 회)	
PrimeScript® RTase (for 2 step)	25 μl
5 x PrimeScript® Buffer	200 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	25 μl
dNTP Mixture (10 μmeach)	150 μl
Oligo dT Primer (2.5 μm)	50 μl
Random 6 mers (20 μm)	50 μl
TaKaRa Ex Taq® HS (5 U/μl)	25 μl
10 x PCR Buffer II	250 μl
Control F-1 Primer (20 μm)	10 μl
Control R-1 Primer (20 μm)	10 μl
Positive Control RNA	20 μl
RNase Free dH ₂ O	1 ml

• PrimeSTAR® HS DNA Polymerase와 조합하여 최고 수준의 정확성 추구.
 >> High Fidelity PrimeScript® RT-PCR Kit (TaKaRa Code R027A)
 PrimeScript® RTase와 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase를 조합한 2 step RT-PCR kit로 매우 정확성이 높은 cDNA를 합성할 수 있다. PrimeSTAR® HS DNA Polymerase는 최고 수준의 정확성을 가지고 있는 PCR 효소로 본 제품은 정확성이 요구되는 RT-PCR에 권장한다.

내용 (50 회)	
PrimeScript® RTase (for 2 step)	25 μl
5 x PrimeScript® Buffer	200 μl
RNase Inhibitor (40 U/μl)	25 μl
dNTP Mixture (10 mM each)	100 μl
Oligo dT Primer (2.5 μm)	50 μl
Random 6 mers (20 μm)	50 μl
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (2.5 U/μl)	25 μl
5 x PrimeSTAR PCR Buffer	500 μl
Control F-1 Primer (20 μm)	10 μl
Control R-1 Primer (20 μm)	10 μl
Positive Control RNA	20 μl
RNase Free dH ₂ O	550 μl

• 최고의 간편성을 추구한 one-step RT-PCR Kit
 >> PrimeScript® One Step RT- PCR Kit Ver. 2 (TaKaRa Code RR055A)
 탁월한 신장성을 가지고 있는 고성능 역전사효소인 PrimeScript® RTase와 TaKaRa Ex Taq® HS를 조합시킨 PrimeScript® One Step RT- PCR Kit의 업그레이드 버전으로 component를 premix하여 반응액 조제를 대폭 간소화하였다. 최소한의 조작으로 신장성, 검출 감도가 모두 뛰어난 one step RT- PCR을 실시할 수 있다.



내용 (50 회)	
PrimeScript® One step Enzyme Mix ¹	100 μl
2 x One step buffer ²	625 μl x 2
Control F-1 Primer ¹ (20 μm)	20 μl
Control R-1 Primer ² (20 μm)	20 μl
Positive Control RNA (2 x 10 ⁵ copies/μl)	20 μl
RNase Free dH ₂ O	625 μl x 2

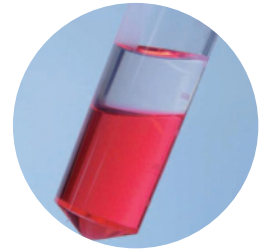
¹: PrimeScript® RTase, TaKaRa Ex Taq® HS 및 RNase Inhibitor를 one step RT-PCR에 최적화하여 안정제와 함께 분주한 premix type.
²: 반응 buffer, dNTP Mixture 및 One Step Enhancer Solution을 포함.

*License Notice : [2, 3, 4, 5, 6]

TaKaRa Total RNA 추출시약

유기용매를 기반으로 AGPC법에 의한

RNAiso Plus



- 배양 세포, 동식물 조직으로부터 효율적으로 total RNA를 추출
- 범용적인 AGPC법을 이용한 추출시약
- 샘플량이 많은 경우나 total RNA를 대량으로 회수하고 싶은 경우에 특히 추천!

용량	TaKaRa Code	가격
100 ml	9108	150,000 원
200 ml	9109	270,000 원

VS.

스핀 컬럼 타입의

FastPure[®] RNA Kit

- 독자적인 polymembrane을 채용
- 에탄올 침전과정이 필요없는 매우 간단한 실험 방법!
- DNase처리 없이도 고순도의 total RNA 추출가능



용량	TaKaRa Code	가격
50회	9190	220,000 원