

## 똑똑하게 cDNA를 합성하는

# SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit

- 1~2 ng의 극소량의 total RNA로도 고품질의 cDNA 합성
- 높은 특이성과 낮은 백그라운드, 그리고 높은 합성량
- 풍부한 full length cDNA 합성
- Adaptor ligation 불필요

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) 활성화와 주형 전환 활성화 (template switching activity)을 이용하였다<sup>1, 2)</sup>.

한번의 cDNA 합성으로 universal primer 결합부위까지 추가되므로 adaptor ligation이나 2<sup>nd</sup> strand 합성을 위한 복잡한 단계가 필요 없어, 쉽게 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), subtractive hybridization이나 Library 제작 등의 실험을 진행할 수 있다. 간단하고 효과적인 SMART cDNA 합성 방법은 기존의 상용화된 방법과 비교해도 높은 특이성을 가지고 있다.

### ■ 더욱 더 똑똑해진 SMART Technology

Clontech은 최근 구성품들을 업그레이드 한 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 되었다<sup>3)</sup>.

### ■ 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 1<sup>st</sup> strand cDNA를 합성할 수 있어 (그림 1A), 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 Clontech에서는 농도가 20 pg/μl 정도로 낮은 total RNA 1 ng으로 고품질의 cDNA를 합성할 수 있도록 SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Code 634928)가 출시되었다 (그림 1B). SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit는 Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit를 업그레이드 시킨 제품으로 반응량을 증가시키고 컬럼 정제 단계를 추가하여 정제된 1st strand cDNA의 전량을 사용할 수 있도록 되어 있다 (표 1). SMARTer와 SMARTer Pico 모두 1~2 μg의 dsDNA가 증폭되도록 구성되어 있다

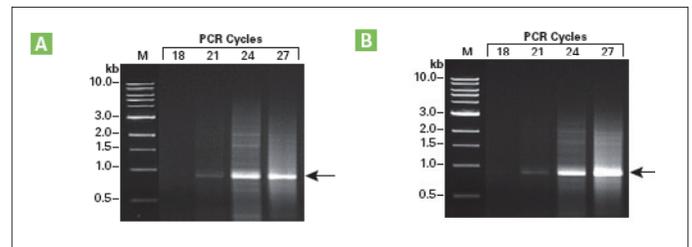


그림 1. Typical gel profile of ds cDNA synthesized with the SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit (Panel A) and the SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Panel B), using the Control Human Placental Total RNA as a template. 2 ng (Panel A) or 1 ng (Panel B) of the Control Human Placental Total RNA was subjected to first-strand cDNA synthesis and purification as described in the user manual for each kit. 10 μl was used for SMARTer™ PCR amplification (Panel A) and 80 μl was used for SMARTer™ Pico PCR amplification (Panel B). A range of PCR cycles was performed (18, 21, 24 and 27). 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.

표 1. SMARTer 와 SMARTer Pico 실험방법 비교\*

SMARTer	SMARTer Pico
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2~1000ng total RNA</li> <li>• Template reaction volume up to 3.5 μl</li> <li>• Total RNA template concentration as low as 0.6 ng/μl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1~1000ng total RNA</li> <li>• Template reaction volume up to 50 μl</li> <li>• Total RNA template concentration as low as 20 pg/μl</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• SMARTer first-strand cDNA synthesis</li> <li>• Volume=10 μl</li> <li>• Dilute 1:5 with TE Buffer</li> <li>• Volume=50 μl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SMARTer Pico first-strand cDNA synthesis</li> <li>• Volume=106 μl</li> <li>• Purify with NucleoSpin® Column</li> <li>• Column Elution Volume = 80 μl</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use 10 μl cDNA for SMARTer PCR amplification</li> <li>• 100 μl reaction</li> <li>• Cycle optimization and scale-up</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Use 80 μl cDNA for SMARTer Pico PCR amplification</li> <li>• 100 μl reaction</li> <li>• Cycle optimization and scale-up</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Purify PCR products with NucleoSpin®</li> <li>• Yields 1-2 μg ds cDNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Purify PCR products with NucleoSpin®</li> <li>• Yields 1-2 μg ds cDNA</li> </ul>

\* 실험방법의 차이가 있는 부분을 굵은 글씨로 표기함.

■ 더 긴 전사산물 (transcript) 증폭

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)기술은 RNA 전사물의 전체 서열을 얻기 위한 실험법으로 이미 알고 있는 RNA 서열로부터 5' - 말단 (5' -RACE PCR), 3' -말단 (3' -RACE PCR)까지의 서열을 확인할 수 있다. Clontech의 SMARTer RACE cDNA Amplification 실험법은 SMART 1st strand cDNA 합성기술과 강력한 PCR 기술이 조합되어 있어 일반적인 RACE 실험에서 나타날 수 있는 background 증폭을 크게 억제할 수 있다. 역전사 반응에 의해 합성된 SMARTer cDNA는 adaptor ligation 과정없이 직접 5' -, 3' - RACE PCR에 이용가능하다. SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit를 업그레이드하여 출시된 SMARTer<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit는 2 ng의 total RNA를 이용하여 알고 있는 서열로부터 RNA의 5' - 말단과 3' - 말단까지 RNA 전사산물의 전체 서열을 해석하기 위한 제품이다. SMARTer RACE Kit에는 SMARTer II A Oligonucleotide와 SMARTScribe Reverse Transcriptase가 추가 됨으로써 감도가 높아지고 background 증폭이 줄어 기존의 제품보다 더 효율적으로 RACE를 진행할 수 있게 되었다. 새로운 kit에 포함된 SMARTer oligo와 기존제품의 SMART oligo를 비교실험한 결과, SMARTer Oligo를 이용한 실험에서 5' -RACE PCR 산물의 양이 증가되었음을 확인하였다 (그림 2). 또한, 새로운 SMARTer RACE실험에서 14.9, 15.7 kb 크기의 유전자 5' -영역을 증폭할 수 있었다 (그림 3).

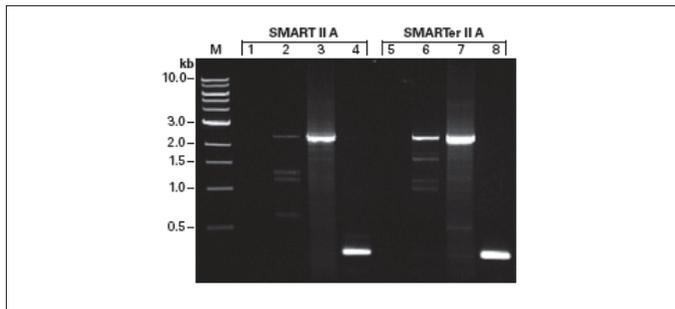


그림 2. The SMARTer II A Oligo increases the overall yield of the 5' -RACE PCR products. Note the different intensities of the 2.6 kb 5' -RACE product in Lane 2 (produced by the SMART II A oligo) versus that in Lane 6 (produced by the SMARTer II A oligo); both bands resulted from the amplification of only 2 ng of original RNA template. In the assay shown, 2 ng and 50 ng of human placental total RNA, 12 pmol SMART II A oligo or SMARTer II A oligo, and 100 units of SMARTScribe Reverse Transcriptase were combined in a first-strand cDNA synthesis reaction. The resulting single-stranded cDNA was then used as a template for 5' -RACE PCR amplification according to the protocol in the user manual (PT4096-1). The 5' -RACE PCR reaction was performed using the Universal Primer Mix and a gene-specific primer designed for transferrin receptor (TFR). Lanes 1 & 5: No RNA 5' -RACE control. Lanes 2 & 6: TFR 5' -RACE from cDNA synthesized using 2 ng of total RNA as template. Lanes 3 & 7: TFR 5' -RACE from cDNA synthesized using 50 ng of total RNA as template. Lanes 4 & 8: 5' -cDNA internal control using 2 ng total RNA as template. Lane M: 1 kb DNA Ladder.

■ 참고문헌

1. Zhu, et al. (2001) *BioTechniques* 30:892 - 897.
2. Chenchik, A. et al. (1998) In *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. Eds Siebert, P. & Larrick, J. (BioTechniques Books, MA) Ch 22.
3. Be SMART<sup>™</sup> About First-Strand cDNA Synthesis (January 2009) *Clontechiques* XXIV(1):15-17.

\*License Notice : [6]

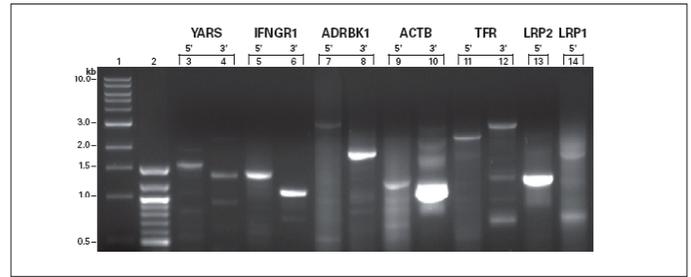


그림 3. SMARTer 5' - and 3' -RACE results for different genes. In this assay, we used the SMARTer RACE Kit to amplify 5' - and 3' -RACE products from many different genes, starting with human placental total RNA. The gel shows several representative 5' - and 3' -RACE products amplified from cDNA encoding the following: Lane 1: 1 kb DNA marker, Lane 2: 100 bp DNA marker, Lanes 3 & 4: tyrosyl-tRNA synthetase (YARS), Lanes 5 & 6: interferon gamma receptor 1 (IFNGR1), Lanes 7 & 8: adrenergic, beta, receptor kinase 1 (ADRBK1), Lanes 9 & 10: actin, beta (ACTB), Lanes 11 & 12: transferrin receptor (TFR), Lane 13: low density lipoprotein-related protein 2 (LRP2). The 1,3 kb 5' -RACE PCR product shown was amplified from cDNA synthesized from the gene's 15.7 kb mRNA. Lane 14: low density lipoprotein-related protein 1 (LRP1). The 2.1 kb 5' -RACE PCR product shown was amplified from cDNA synthesized from the gene's 14.9 kb mRNA.

■ SMARTer 법으로 합성된 cDNA

SMARTer cDNA 합성법은 고품질의 cDNA를 합성하는데 최적이다. 이를 통해 약 1~2 ng의 total RNA에서도 cDNA를 합성할 수 있고, RNA의 품질 저하없이 초기의 유전자 분포 (gene representation)를 유지한 상태로 full-length cDNA를 합성한다. 특별히 고안된 SMARTer oligonucleotide로 인해 연구자들은 더 많은 생물종에서 전사량이 적은 전사물을 증폭할 수 있게 되었고, 매년 human, plant, insect, fish 등의 다양한 RNA 샘플에 SMART 기술을 적용한 많은 논문이 보고되고 있다.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
SMARTer <sup>™</sup> PCR cDNA Synthesis Kit	10 회	634925
	20 회	634926
SMARTer <sup>™</sup> Pico PCR cDNA Synthesis Kit	10 회	634928
	20 회	634923
SMARTer <sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit	10 회	634923
	20 회	634924
Universal Primer Mix	100 회	634922
Advantage <sup>®</sup> 2 Polymerase Mix	100 회	639201
Advantage <sup>®</sup> 2 Polymerase Mix	500 회	639202
Advantage <sup>®</sup> 2 PCR Kit	30 회	639207
Advantage <sup>®</sup> 2 PCR Kit	100 회	639206