

역전사 효소 & cDNA 합성

정제된 RNA로부터 RT-PCR 또는 library를 제작할 경우, 우선 역전사 효소(Reverse Transcriptase: RTase)를 이용해 cDNA를 합성한다. 본 고에서는 MMLV유래의 RTase로 1st Strand cDNA 합성을 위한 일반적인 방법을 소개하고자 한다.

현재 연구용 시약으로 사용되고 있는 역전사효소에는 avian myeloblastosis virus(AMV)에서 유래한 것과 moloney murineleukemia virus(M-MLV)에서 유래한 2종이 있다. 기존에는 mRNA 고차구조 때문에 열안정성이 높은 AMV RTase가 주로 사용되었지만, 최근 MMLV유래의 개량형 효소(PrimeScript RTase 등)들의 성능이 향상되면서 MMLV 유래의 역전사 효소 사용이 주류를 이루고 있다.

또한 역전사효소를 이용한 cDNA 합성에서는 RNA와 annealing 위치에 따라 3종류의 primer를 사용할 수 있다.

1. Oligo dT primer: mRNA의 polyA tail에 annealing되어, 3' 에서부터 cDNA를 만든다.
2. Random primer(일반적으로 6nt~ 9nt 정도): mRNA의 모든 영역에서 cDNA 합성을 시작한다.
3. Specific primer: 목적한 특정 cDNA만을 합성한다.

[실험방법]

1st strand cDNA 합성

PrimeScript® Reverse Transcriptase사용의 경우

- ① Tube에 주형 RNA/Primer 혼합액을 조제한다.

Oligo dT primer (또는 Random primer (6 mers) (또는 Gene specific primer	50 pmol 50 pmol) 2 pmol)
dNTP mixture(10 mM each)	1 μl
Total RNA *1 (또는 mRNA	≤ 5 μg ≤ 1 μg)
RNase free dH ₂ O	Up to 10μl

- ② 65℃에서 5분간 incubation 후, 얼음에서 급냉한다.*2

- ③ 아래의 반응액을 더하여 total 20 μl로 한다.

① 반응액 : 주형 RNA/Primer Mixture	10 μl
5X PrimeScript Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	20 units
PrimeScript Reverse Transcriptase	100~200 units
RNase free dH ₂ O	up to 20 μl

- ④ 가볍게 vortex한다.

- ⑤ 아래의 조건으로 반응한다.

Option (30℃	10 min) *3
42℃ (~ 50℃) *4	30 ~ 60 min

- ⑥ 70℃에서 15분간 incubation 후 얼음에서 냉각한다.

위와 같은 조건으로 반응하여 생성된 1st strand cDNA는 PCR의 주형 또는 2nd strand cDNA 합성 반응에 사용할 수 있다.



체크 포인트

*1 성공적인 cDNA 합성을 위해서는 순도가 높은 RNA 샘플을 얻는 것이 중요하며, 이를 위해서 세포내에 포함되어 있는 RNase의 작용을 억제하는 것과 사용하는 기구나 용액 등 외부에서의 RNase의 오염을 피해야 한다. RNA 조제시 실험자의 땀이나 타액에 포함된 RNase의 오염을 막기 위해서 작업 중 불필요하게 이야기하지 않고, 청결한 disposable 글로브 착용을 권장한다.

*2 열변성 처리에 의해 RNA의 고차구조를 제거한다.

*3 Random primer 사용시 필요하다.

*4 RNA의 분해를 방지하기 위해서는 장시간의 고온처리를 피하는 것이 바람직하다. 최근 MMLV 유래 개량형 RTase의 성능이 향상되어 42℃에서 반응하더라도 RNA 고차구조에 의한 신장 반응 저해가 나타나지 않는 PrimeScript RTase와 같은 효소들이 많이 개발되었다.

[관련제품 리스트]

구분	Code	제품명	용량
최고품질의 1st strand cDNA의 합성	6210A	PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit	50 회
범용적인 RT PCR kit	RR014A	PrimeScript RT-PCR Kit	50 회
	RR055A	PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2	50 회
Full-length cDNA 합성	634925	SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit	10 회
탁월한 신장 능력을 가진 역전사 효소	2680A	PrimeScript Reverse Transcriptase	10,000 U