

Code 6136

TAKARA

cDNA Library Construction Kit

사용설명서

v201010Da

목차

I. 제품 설명

II. 제품 구성품

III. 보존

IV. cDNA 합성 반응전 준비 사항

1. 기구 멸균 방법

2. 시약의 조제법

3. RNA의 조제법

V. Protocol

V-1. 1st Strand cDNA 합성

V-2. 2nd Strand cDNA 합성 반응과 말단 평활화

V-3. Adaptor ligation

V-4. 제한효소 *NotI* 처리

V-5. 스피ن 컬럼으로 짧은 DNA 단편 제거

V-6. Vector ligation

V-7. Transformation

VI. 실험예

VII. Troubleshooting

VIII. Appendix

1. Primer와 Adaptor 염기서열

2. pAP3neo Vector Map

3. 주의사항

IX. Library의 이용 방법

IX-1. Library 증폭

IX-2. Screening (colony hybridization)용 membrane 준비

X. 참고 문헌

XI. 관련 제품

XII. 주의

I. 제품설명

진핵생물의 여러 조직이나 세포에서 조제한 poly (A)⁺ RNA로부터 cDNA를 합성하여 클로닝하는 기술은 분자생물학 연구에 있어서 중요한 기법 중 하나로 유전자의 구조 해석이나 목적 단백질의 발현 조작에 활발하게 적용되고 있다.

일반적으로 cDNA 합성과 cDNA library는 목적 poly (A)⁺ RNA에 상보적인 double cDNA를 합성해 박테리아나 바이러스 유래의 벡터에 클로닝한다. 이 cDNA 재조합체는 박테리아나 진핵세포에 도입하여 cDNA를 증폭시킨 후 cDNA의 해석을 실시하거나 *in vitro* transcription 또는 *in vitro* translation 등에 이용된다.

본 제품은 주로 동·식물 유래의 poly (A)⁺ RNA로부터 double cDNA를 합성한 후, 첨부된 pAP3neo 등의 플라스미드 벡터에 재조합하여 cDNA library를 구축하기 위한 제품이다. pAP3neo는 SV40 promoter가 있어 포유 동물 세포에서 발현이 가능하다. cDNA library의 구축에는 Gubler-Hoffman 방법에 근거한 linker-primer 법을 사용하고 있어, 유전자의 방향성을 유지하는 directional cloning이 가능하다.

(시스템의 원리는 그림 1을 참고하세요.)

- 1) 역전사 효소 M-MLV³⁾ Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer^{1, 4-6)}를 이용하여 1st Strand cDNA를 합성한다. 1st Strand cDNA 합성시 5-methyl dCTP를 사용한다.
- 2) *E. coli* RNase H⁷⁾를 처리하여 mRNA-1st Strand cDNA hybrid의 RNA에 nick을 만든 후 *E. coli* DNA Polymerase I와 *E. coli* DNA Ligase를 사용하여 RNA에서 DNA chain으로 대체하여 2nd Strand cDNA를 합성한다.^{1, 8)}
- 3) T4 DNA Polymerase를 이용하여 말단을 평활화 시킨다.
- 4) Adaptor ligation 후 *Not*I으로 절단한다.
- 5) 스피ن 컬럼으로 짧은 DNA를 제거한다.
- 6) 벡터 pAP3neo⁹⁾와 ligation 반응한다. (Directional cloning)
- 7) Electroporation법으로 대장균에 도입한다.
- 8) Titer 및 insert를 확인한다.

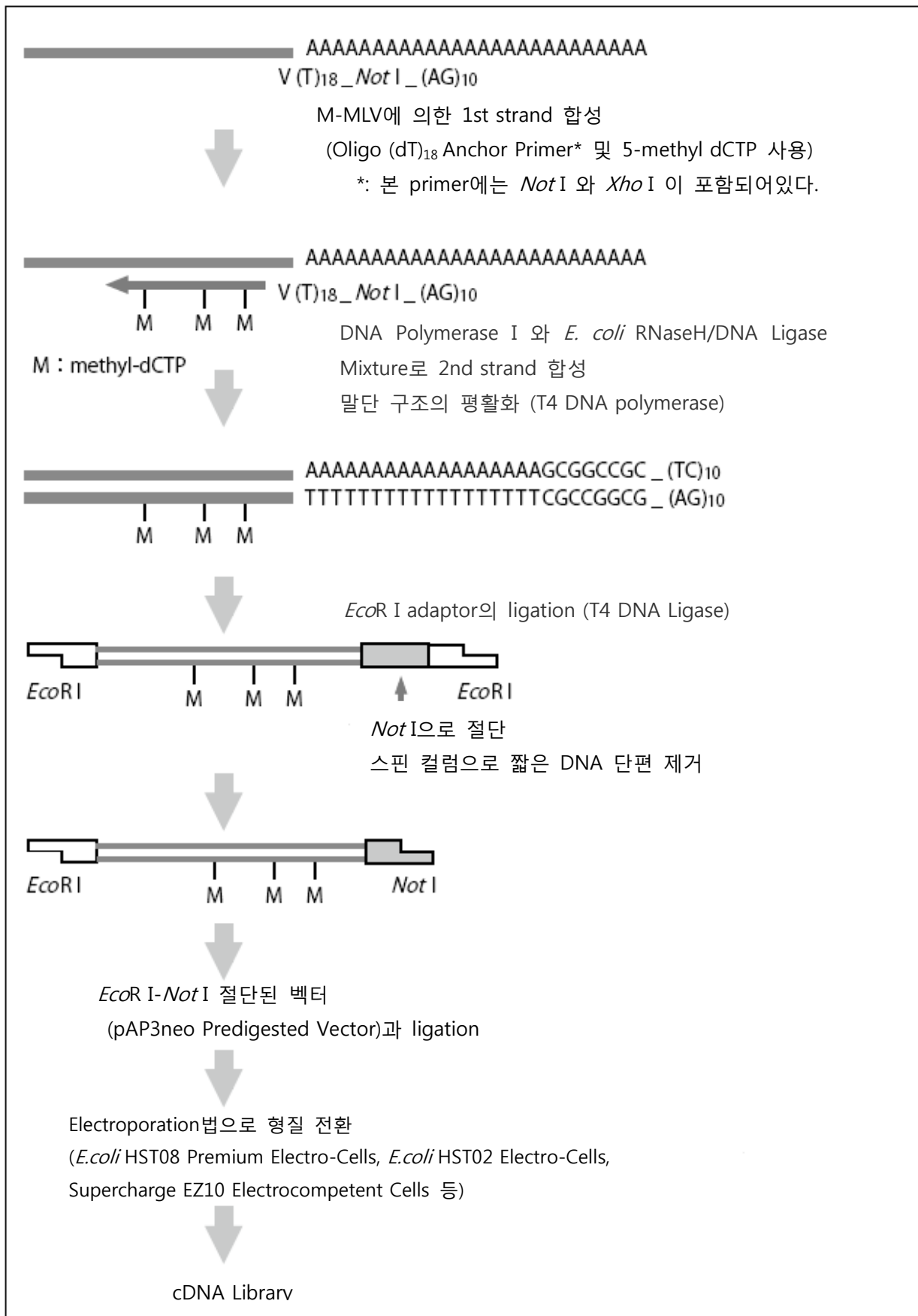


그림 1. 본 제품을 이용한 cDNA library 제작 모식도

II. 제품 구성품 (5 회분)

[1] Reverse Transcriptase (M-MLV) (200 U/μl)	5 μl
[2] RNase Inhibitor (20 U/μl)	5 μl
[3] Oligo (dT) ₁₈ Anchor Primer (1 μg/μl) ^{*1}	10 μl
[4] 5 × 1st Strand Synthesis Buffer ^{*2}	20 μl
[5] 1st Strand dNTP Mixture	6 μl
[6] <i>E. coli</i> RNase H/ <i>E. coli</i> DNA Ligase Mixture	10 μl
[7] <i>E. coli</i> DNA Polymerase I (20 U/μl)	10 μl
[8] 2nd Strand dNTP Mixture	23 μl
[9] 5 × 2nd Strand Synthesis Buffer ^{*2}	150 μl
[10] T4 DNA Polymerase (1 U/μl)	20 μl
[11] 10 × T4 DNA Ligase Buffer	20 μl
[12] T4 DNA Ligase (350 U/μl)	20 μl
[13] <i>EcoR</i> I- <i>Sma</i> I Adaptor (0.4 μg/μl)	18 μl
[14] <i>Not</i> I Supplement	135 μl
[15] <i>Not</i> I (50 U/μl)	15 μl
[16] tRNA (10 μg/μl)	5 μl
[17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier ^{*3}	60 μl (4°C 보존)
[18] 3M Sodium Acetate (pH5.2)	1 ml (4°C 보존)
[19] pAP3neo Predigested Vector (100 ng/μl) ^{*4}	5 μl
[20] RNase-free H ₂ O	640 μl
[21] Control RNA (1 μg/μl) ^{*5}	5 μl
[22] T7 promoter primer ^{*6} (5 pmol/μl)	20 μl
[23] T3 promoter primer (for pAP3neo) ^{*6} (5 pmol/μl)	20 μl
[24] 스피ن 컬럼 (CHROMA SPIN™ -1000 + DEPC - H ₂ O Columns ^{*7})	5 개 (4°C 보존)

*1: Oligo (dT)₁₈Anchor Primer는 *Not* I, *Xho* I 부위를 포함하고 있다. (VIII. Appendix 참조)
Not I이 아닌 *Xho* I 으로 절단하면 *EcoR* I-*Xho* I fragment로 double strand cDNA을 만들 수 있으며 생성된 효소부분을 이용하여 vector(탈 인산화 된 것은 불가)의 cDNA library 구축에 사용할 수 있다. 본 제품에는 *Xho* I 효소는 포함되어 있지 않으므로 별도 판매 제품을 구입하여 사용하기 바란다. Adaptor ligation 후에 *Xho* I으로 절단을 하는 경우에는 VIII. Appendix 3. 주의사항을 참고한다.

*2: cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version) (Code 6130)에 포함된 제품과는 조성이 다르다.

*3: GenTLE Precipitation Carrier (Code 9094)와 동일한 제품이다.

*4: *EcoR* I, *Not* I 으로 절단된 상태이다.

*5: 본 kit에 포함된 Control RNA는 SP6 promoter 영역 하류에 pBR322 유래의 tetracycline 내성 유전자를 포함한 약 1.4 kb 단편을 삽입한 plasmid pSPTet3를 주형으로 SP6 RNA Polymerase를 이용해 *in vitro* transcription으로 합성한 것이다.

본 kit에는 1 반응 분량 (5 µg)의 Control RNA가 포함된다.

또한, Control RNA는 30개의 아데닌 (adenine) 염기를 함유한 poly (A)⁺ tail을 가진 약 1.4 kb의 poly (A)⁺ RNA로, 이를 주형으로 double strand cDNA를 합성하고 적당한 plasmid에 삽입 했을 때 double strand cDNA가 full-length가 되면, plasmid는 tetracycline 내성을 갖게 된다.

*6: Insert 확인 및 sequencing에 사용 가능하다. 염기서열은 VIII. Appendix 참조한다. T7 promoter primer는 BcaBEST™ Sequencing Primer T7 (Code 3884)와 같은 서열이다.

*7: Clontech Laboratories 사의 제품입니다.

(주) 본 제품에는 형질전환에 필요한 대장균은 포함되어 있지 않다. 메틸화 DNA에 의한 형질전환 (electroporation법)이 가능한 *E. coli* HST08 Electro-Cells (Code 9028) 또는 Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells (Code 636756) 등을 별도로 준비해야 한다.

장비 이외에 필요한 시약 및 기구류

<시약>

Electroporation용 competent Cell

E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code 9028)

Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells (Code 636756)

Phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1, v/v/v)

Chloroform / isoamylalcohol (24 : 1, v/v)

에탄올

TE 버퍼 (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH8.0)

DNA size marker

1 % Agarose gel (0.1 µg/ml Ethidium bromide 함유)

LB 배지

LB/Amp (100 µg/ml) plate

<기구>

Micro centrifuge

Water bath (아래의 온도 설정으로 사용; 온도에 따라 thermal cycler 사용 가능);

8 °C, 12 °C, 16 °C, 37 °C, 42 °C, 70 °C

Micropipet

Microtube

Pipet tip

FALCON 튜브 (BD; Code No.352059)

Electroporator

전기영동장치

III. 보존

- [17]. Dr. GenTLE Precipitation Carrier, [18]. 3M Sodium Acetate (pH5.2), Spin column: 4°C
- 그 외 kit 내 시약류: -20°C

IV. cDNA 합성 반응을 실시전 준비 사항

1. 기구 소독 방법

판매되고 있는 플라스틱 기구는 보통 RNase free로 실험에 그대로 사용해도 무방하나 일반적인 microcentrifuge tube와 micro-pipet용 tip은 autoclave한 후에 사용해야 한다. 유리기구, spatula 등을 사용할 경우 160°C에서 최소 2시간 이상 건열 멸균한다. 건열 멸균할 수 없는 것은 0.1% DEPC 용액 중에 담가 실온에서 하룻밤(또는 37°C에서 12시간)정도 지난 후, autoclave하여 사용한다. RNA 실험용 기구류는 다른 사람과 명확하게 구별하는 것이 필요하다. 또한 RNase가 혼입을 피하기 위해 마스크와 청결한 일회용 플라스틱 장갑을 착용한다.

2. 시약 조제

RNA의 조제나 분석에 사용하는 시약 용액은 모두 0.1% DEPC 처리수를 사용하여 조제하고, autoclave 후 사용한다. Autoclave 할 수 없는 시약이 함유된 경우에는 미리 멸균조작을 한 기구와 물을 사용하여 용액을 조제하고 여과 멸균(filtering)하여 사용해야 한다.

3. RNA의 조제

고순도 RNA 시료가 필요하다. 다당이나 단백질 등 불순물이 RNA에 혼입되면 cDNA 합성 반응을 저해할 수 있다. 또한 DNA도 역전사 효소의 주형으로 이용 가능하기 때문에 게놈 DNA의 혼입을 방지해야 한다. 조직과 세포에서 RNA는 시료채취 후 바로 추출해야 하며 불가능한 경우는 사용시까지 -80°C 혹은 액체질소에 시료를 보존해야 한다.

(1) Total RNA의 조제

CsCl density gradient centrifugation이나 Acid Guanidium-Phenol-Chloroform 법 (AGPC법) 또는 시판되는 RNA 분리 정제용 시약을 사용한다.

RNAiso Plus (Code 9108/9109)

(2) Poly(A)⁺ RNA의 정제

Poly(A)⁺ RNA는 Oligo(dT) Cellulose나 Poly(U) Sepharose을 사용하여 Total RNA로부터 분리하는 방법이 일반적이다.

(3) RNA의 순도 검정

최적의 cDNA 합성을 위해서는 가능한 고순도의 RNA 샘플을 얻는 것이 중요하다. cDNA를 합성 하기 전에 RNA의 순도를 확인하는 것을 권장한다.

1) 전기영동에 의한 Total RNA의 순도검정

Total RNA 1~2 μg을 열변성 (65°C, 10분)하여 agarose gel에 전기영동한다.

분해가 되지 않은 total RNA는 2개의 ribosomal RNA (진핵세포: 28S, 18S)의 선명 band가 약 2:1의 비율로 보이며, ribosomal RNA의 band가 퍼져있는 경우에는 RNase의 혼입으로 RNA가 분해되었을 가능성이 크기 때문에 사용하지 않는 것이 좋다. 또 28S band보다 분자량이 큰 band가 있는 경우는 genomic DNA의 혼입을 생각할 수 있으므로 Recombinant DNase I (RNase-free)(Code 2270A/B)을 처리한 후 cDNA 합성에 사용해야 한다.

2) 흡광도를 이용한 검정 (Total RNA와 poly (A)⁺ RNA)

흡광도를 측정하고 A260/A280의 비율이 1.7 이하인 경우는 사용하지 않는 것이 바람직하며, A260/A280 비율이 1.8-2.1 샘플을 사용하는 것이 좋다.

V. Protocol

V-1. 1st Strand cDNA 합성

- 1) Template RNA (poly (A)⁺ RNA) 5 µg에 [20] RNase-free H₂O를 첨가하고 최종 반응 용량은 10.8 µl가 되도록 한다.
- 2) 65 °C에서 5분 열처리 후 얼음에 옮겨 5 분간 냉각한다.*1
- 3) Microtube에 아래의 반응액을 조제한다.

[4]	5 × 1st Strand Synthesis Buffer	4.0 µl
[5]	1st Strand dNTP Mixture	1.2 µl
[2]	RNase Inhibitor	1.0 µl
[3]	Oligo (dT) ₁₈ Anchor Primer*2	2.0 µl

- 4) 3)의 반응액에 열처리 한 poly (A)⁺ RNA 용액 (5 µg)을 첨가하고 부드럽게 pipetting한다.
- 5) 실온에서 10 분간 반응 후 [1] Reverse Transcriptase M-MLV를 1.0 µl 첨가하고 최종 반응 용량이 20 µl 가 되도록 한 뒤 부드럽게 pipetting 한다.
- 6) 42 °C에서 1 시간 반응한다
- 7) 얼음에 옮겨 2 분간 냉각한다.

*1: 2 차 구조가 강한 template RNA를 이용하는 경우에도 cDNA 합성 반응 전에 RNA 용액을 65 °C에서 5 분간 처리 후 얼음에서 급냉하면 2 차 구조의 영향을 완화하고 역전사 효율을 높일 수 있다.

*2: Primer에는 *Not*I외에 *Xho*I 사이트도 포함되어 있다.

V-2. 2nd Strand cDNA 합성 반응과 말단 평활화

- 1) 1st Strand cDNA 합성 반응 후 반응액 20 µl를 포함한 microtube에 아래의 반응액을 첨가 하여 최종 반응 용량이 146 µl가 되도록 한다.

[9]	5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	30 µl
[8]	2nd Strand dNTP Mixture	4.5 µl
[20]	RNase-free H ₂ O	87.5 µl
[6]	<i>E. coli</i> RNase H/ <i>E.coli</i> DNA Ligase Mixture	2 µl
[7]	<i>E. coli</i> DNA Polymerase I	2 µl

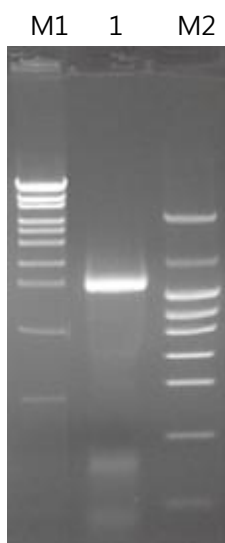
- 2) 부드럽게 pipetting으로 혼합하여 16 °C에서 2 시간 반응한다.
- 3) 70 °C에서 10 분간 열처리 후 실온에서 5 분간 방치한다.
- 4) [10] T4 DNA Polymerase 4 µl를 첨가하고 부드럽게 pipetting 한다.
- 5) 37 °C에서 10 분간 반응한다.
- 6) 2nd Strand cDNA 합성 반응 후 반응액* 150 µl에 phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 150 µl를 첨가하고 vortex로 5~10초 동안 혼합한다.
- 7) 실온에서 15,000 rpm, 5 분간 원심분리하여 상층을 새로운 튜브에 옮긴다. (중간층이 오염되지 않도록 주의한다)
- 8) Chloroform / isoamylalcohol (24 : 1) 150 µl 를 첨가하여 vortex로 5~10 초 동안 혼합한다.
- 9) 실온에서 15,000 rpm, 5 분간 원심분리하여 상층을 새로운 튜브에 옮긴다.
- 10) 상층액의 1/10 양의 [18] 3M Sodium Acetate (pH5.2)와 [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier 4 µl, 2~2.5 배의 에탄올을 첨가하여 잘 섞는다.
- 11) 즉시 실온에서 15,000 rpm 30 분간 원심분리 후 침전물 (pellet)에 주의하여 상층액을 제거한다.
- 12) 70 % 에탄올로 침전물을 washing한다.
- 13) 자연 건조 후 침전물을 12.5 µl의 [20] RNase-free H₂O에 녹인다

*: poly (A)⁺ RNA가 불순물로 인해 분해가능성이 있다면, 2nd strand cDNA 합성 후 일부를 전기영동하여 cDNA의 신장과 합성량을 확인하십시오. 이러한 Poly(A)⁺ RNA를 사용하면 cDNA 합성과 증폭길이에 영향을 줄 수 있다. 일반적으로 끌리는(smear)패턴의 전기영동 결과가 나오며, cDNA 합성이 확인되지 않거나 저분자쪽으로 몰려있다면 보다 고순도의 RNA를 사용하여 다시 cDNA를 합성하는 것을 추천한다.

(참고) 컨트롤 반응 실험예

프로토콜에 따라 control RNA (약 1.4 kb) 5 µg을 주형에 Oligo (dT)₁₈Anchor Primer를 사용하여 2nd Strand cDNA 합성 반응했다.

반응액을 phenol/chloroform 추출, 에탄올 침전하여 일부를 전기영동했다.



Lane
1: 2nd Strand cDNA 합성 산물
M1: λ-*Eco*T14 I digest
M2: pHY Marker

(결과)

2nd Strand cDNA 합성에서 double cDNA의 밴드가 확인되었다.

V-3. Adaptor ligation

1) 위의 cDNA 용액 12.5 μ l에 아래의 반응액을 첨가하여 최종 반응 용량이 20 μ l가 되도록 한다.

[11] 10 × T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
[13] <i>Eco</i> R I – <i>Sma</i> I Adapter	3.5 μ l
[12] T4 DNA Ligase	2 μ l

2) 부드럽게 pipetting하여 섞고 8 °C에서 overnight이상 반응한다.

3) 70 °C에서 30 분간 열처리하고 5 분간 실온에 방치한다.

V-4. 제한효소 *Not*I

1) Adaptor ligation 용액 20 μ l에 아래의 반응액을 첨가하여 최종 반응 용량이 50 μ l가 되도록 한다.

[14] <i>Not</i> I Supplement	27 μ l
[15] <i>Not</i> I	3 μ l

2) 부드럽게 pipetting하여 섞고 37 °C에서 3 시간 반응한다.

V-5. 스핀 컬럼으로 짧은 DNA 단편 제거

다음 컬럼 처리는 400 bp 이하의 짧은 DNA를 제거하기 위한 단계이다.

A. 스핀 컬럼 준비*1

- 1) 컬럼내의 matrix을 균일하게 다시 섞어준다.
- 2) 컬럼 아래쪽 끝 부분을 꺾어 제거한 후 상단 덮개를 제거한다.(상단 덮개와 아래 뚜껑은 버리지 않도록 주의한다.)
- 3) 컬럼내 buffer를 자연 배수한다 (약 10분 소요).
- 4) 아래 뚜껑을 장착하고 1 ml의 TE buffer를 첨가한다. 상단 덮개를 장착하고 컬럼 내 matrix을 균일하게 다시 섞어준다.
- 5) 상단 덮개를 제거한 후 아래 뚜껑을 천천히 제거한다. (상단 덮개 및 아래 뚜껑은 버리지 않도록 주의한다.)
- 6) A-3)~A-4) 작업을 다시 반복한다.
- 7) 위덮개 및 아래 뚜껑을 제거하고 컬럼에 buffer를 자연 배수한다.
- 8) 배출액 회수용으로 미리 뚜껑을 제거 한 1.5 ml 튜브를 FALCON 튜브에 설치한다.
- 9) Swing Rotor type의 원심분리기에서 700×g, 5 분간 원심분리한다.
- 10) 뚜껑을 제거하고 새로운 1.5 ml 튜브를 FALCON 튜브에 설치한다.

*1: 스핀 컬럼 준비는 *Not*I 제한효소 반응하는 동안 수행하는 것이 좋다. 그러나 matrix가 건조되지 않게 주의해야 한다.

*2: 컬럼 matrix에 기포가 들어갔을 경우, 아래 뚜껑을 장착하고 다시 TE buffer를 첨가한 후 상단 뚜껑을 설치하여 matrix을 잘 섞고 위의 A-7)단계를 반복한다.

B. 짧은 DNA 제거

1) *NotI* 반응 용액 50 μ l에 아래의 반응액을 가하여 혼합한다.

TE buffer	40 μ l
[16] tRNA	1 μ l

- 2) B-1)에서 조제한 용액을 A에서 준비한 컬럼의 matrix표면 중앙부에 10 μ l씩 여러번으로 나누어 천천히 첨가한다.
- 3) Swing rotor type의 원심분리기로 700 \times g, 5 분간 원심분리한다.
- 4) 컬럼 용출액 약 100 μ l*를 새로운 1.5 ml 튜브에 옮긴다. Phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 100 μ l를 첨가하고 vortex로 5~10 초 동안 혼합한다.
- 5) 실온에서 15,000 rpm, 5 분간 원심 분리하여 두 개의 층 중 상층을 새로운 튜브에 옮긴다. (중간층을 혼합하지 않도록 주의한다)
- 6) Chloroform / isoamylalcohol (24 : 1)을 100 μ l 첨가하여 vortex로 5~10 초 동안 혼합한다.
- 7) 실온에서 15,000 rpm, 5 분간 원심 분리하여 상층을 새로운 튜브에 옮긴다.
- 8) 상층액 1/10 양의 [18] 3M Sodium Acetate (pH5.2), [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier 4 μ l, 2 ~ 2.5 배의 에탄올을 첨가하여 잘 섞는다.
- 9) 즉시 실온에서 15,000 rpm, 30 분간 원심분리한 후 침전물(pellet)에 주의하여 상등액을 제거한다.
- 10) 70 % 에탄올로 침전물(pellet)을 washing한다.
- 11) 건조 후 침전물(pellet)을 15 μ l의 [20] RNase-free H₂O에 녹인다.

* : 용출액이 100 μ l 미만인 경우, TE를 첨가하는 것도 가능하다.

V-6. Vector ligation

1) 아래의 반응액을 조제하여 vector와 ligation한다.

[11] 10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
Purified cDNA	15 μ l
[19] pAP3neo Predigested Vector	1 μ l
[12] T4 DNA Ligase	2 μ l

- 2) 부드럽게 pipetting하여 섞고 12 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응한다.
- 3) Ligation 반응액에 TE buffer 80 μ l 와 phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 100 μ l를 첨가한 후 vortex로 5 ~ 10 초 동안 혼합한다.
- 4) 실온에서 15,000 rpm, 5 분간 원심분리하여 상층을 새로운 튜브에 옮긴다. (중간층을 취하지 않도록 주의한다)
- 5) Chloroform /isoamylalcohol (24:1)을 100 μ l를 첨가하여 vortex로 5~10초 동안 혼합한다.
- 6) 실온에서 15,000 rpm, 5 분간 원심분리하여 상층을 새로운 튜브에 옮긴다.
- 7) 상층액의 1/10의 [18] 3M Sodium Acetate (pH5.2), [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier 4 μ l, 2 ~ 2.5 배의 에탄올을 첨가하여 혼합한다.

- 8) 즉시 실온에서 15,000 rpm, 30 분간 원심분리 후 침전물(pellet)에 주의하여 상등액을 제거한다.
- 9) 70 % 에탄올로 침전물 (pellet)을 washing한다.
- 10) 건조 후 침전물 (pellet)을 20 µl의 TE buffer에 용해한다.
- 11) - 20 °C에 보관한다.

V-7. Transformation

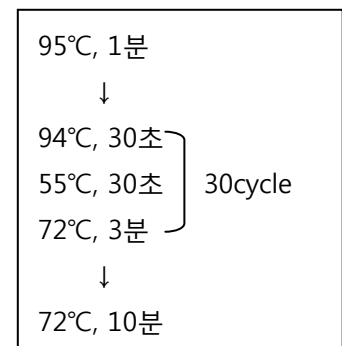
- 1) Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells을 얼음에서 녹인다.
- 2) Ligation 용액 (0.5 ~1.0 µl)과 대장균 (40 µl)을 얼음에서 차게 해둔 멸균 microtube에 첨가하여 천천히 pipetting하여 섞는다.
- 3) 얼음에 차게 둔 0.1 cm 큐벳에 옮겨 electroporation을 한다.
(조건에 대해서는 사용하는 electroporator-취급 설명서를 참조하십시오.)
- 4) 신속하게 SOC (960 µl)를 큐벳에 넣고 섞어 전체를 회수한다.
- 5) 배양 튜브 (FALCON 튜브 등)에 옮겨 37 °C에서 1 시간 진탕 배양한다.
- 6) 5) 일부 (1~10 µl 상당)를 LB/Amp plate에 spread한다. 남은 배양액은 4 °C에서 보관한다.*2.
- 7) 37 °C에서 overnight 배양한다.
- 8) Colony 수를 계산하고 기본 library titer를 구한다.
- 9) [22] T7 promoter primer 와 [23] T3 promoter primer (for pAP3neo)를 사용하여 colony PCR³로 insert를 확인한다. PCR로 검출이 어려운 경우 제한효소를 이용하여 insert를 확인한다.

*1: cDNA insert는 메틸화되어있기 때문에, 형질전환시 *E.coli* HST08 Premium Electro-Cells (Code 9028)* Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells (Code 636756)와 같이 메틸화된 DNA의 형질전환이 가능한 대장균을 이용한다. 또한 electroporation법 수행 시 대장균 50 µl 당 4 µl 이하의 ligation 반응액을 넣어 형질전환을 한다.

*2: 4 °C에서 1일 이상의 장기 보존은 권장하지 않습니다.

*3: Colony PCR 조건 (10 µl 기준)

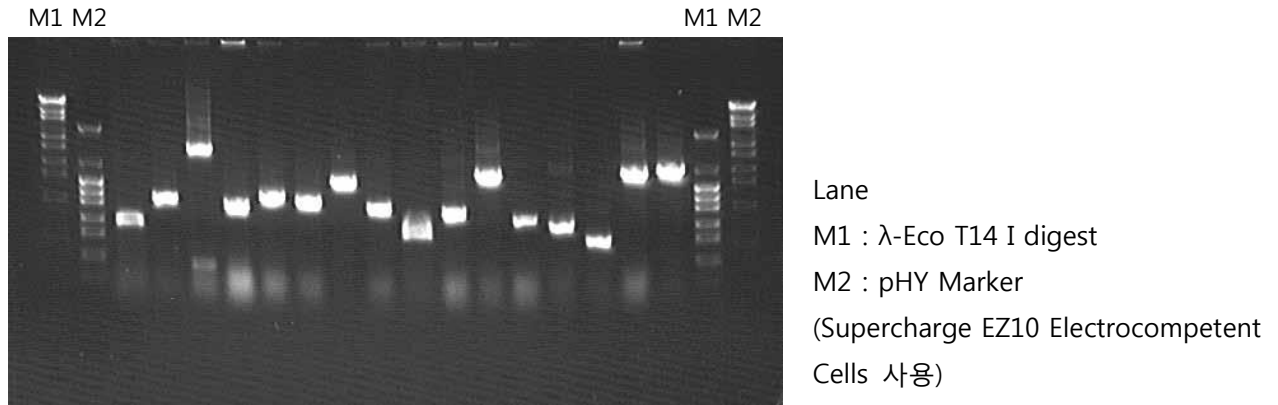
<i>TaKaRa LA Taq</i> HS	0.1 µl	(0.5 U)
각 Primer	0.5 µl	(각 2.5 pmol)



본 키트에는 40회분의 primer가 포함되어 있다. Primer가 부족한 경우 VIII. Appendix의 primer 서열을 참고하여 준비한다.

VI. 실험예

프로토콜에 따라 Chicken 유래의 poly (A)⁺ RNA 5 µg를 template으로 cDNA library를 제작했다. 얻어진 콜로니 중 무작위로 16개를 선택하여 키트에 첨부된 벡터 primer를 사용하여 insert DNA를 증폭하고 1 % agarose gel 전기 영동으로 확인했다.



VII. Troubleshooting

실험이 제대로 진행되지 않는 경우 사용설명서를 확인하고 아래의 사항에 대해서 검토한다.

1. Control RNA 이용

이 키트에는 control RNA로 pSP Tet3 poly (A)⁺ RNA가 포함되어 있다. Control RNA를 사용하여 1st Strand 및 2nd Strand cDNA 합성이 정확히 진행되는지 확인한다.

2. poly (A)⁺ RNA 순도 확인

cDNA 합성 효율을 최대한으로 높이기 위해서는 손상되지 않은 poly (A)⁺ RNA가 높은 비율로 존재해야 한다. 순도가 낮은 RNA를 사용하면 cDNA 합성량과 cDNA 증폭길이와 최종 library titer 및 insert에도 영향을 미치기 때문에 cDNA 합성 반응전에 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정하고 (A₂₆₀/A₂₈₀의 비가 1.8 ~ 2.1 이상적) 전기영동으로 RNA의 순도를 확인해야 한다.

3. RNase 오염

RNA에 RNase의 오염을 피하기 위해 세심한 주의가 필요하다. 사용 기구와 시약류는 가능한 건열 멸균, autocleave하여 사용하고, 반드시 장갑을 착용하고 실험을 진행한다.

4. Template RNA의 2 차 구조가 역전사 반응에 미치는 영향

어떤 종류의 poly (A)⁺ RNA는 복잡한 2 차구조를 가지고 있어 역전사 효율이 떨어지는 것으로 알려져 있다. cDNA 합성 반응 전에 RNA를 65 °C에서 5 분 열처리 후 얼음에서 급냉함으로 RNA 2차 구조의 영향을 완화하고 역전사 효율을 높일 수 있다.

5. Electroporation

Electroporation시 많은 양의 ligation 반응액을 사용하면 형질전환 효율이 떨어질 수 있다. 이런 경우 최적화 과정을 통해 높은 형질전환 효율을 얻을 수 있는 조건을 검토가 필요하다.

VIII. Appendix

1. Primer 와 Adaptor 염기서열

- Oligo (dT)₁₈Anchor Primer

5' - (GA)₁₀CTCGAGCGGCCGC(T)₁₈V-3'(V = A or C or G)

*: Anchor Primer는 *Not*I 사이트 외에 *Xho*I 사이트도 포함하고 있다. Kit에 첨부된 pAP3neo 외에 다른 vector에도 사용할 수 있다.

- *Eco*R I - *Sma*I Adaptor

5' -OH-AATCCCCGGG-3'

GGCCCC p-5'

- T7 promoter primer

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

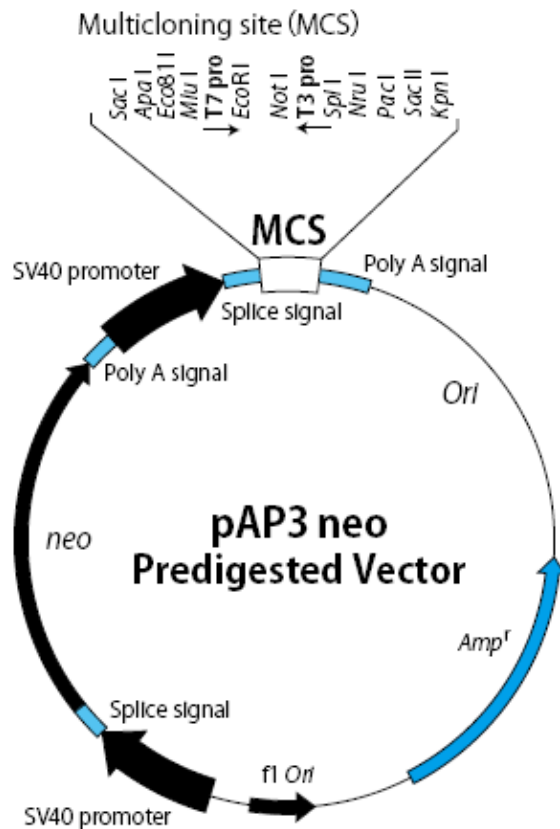
*: BcaBEST™ Sequencing Primer T7 (Code 3884)과 같은 서열이다.

- T3 promoter primer (for pAP3neo)

5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'

*: pAP3neo 벡터 전용 서열이다.

2. pAP3neo Vector Map



* 본 Kit에 포함되어있는 pAP3neo Predigested Vector는 *Eco*R I과 *Not*I으로 절단되어 있다. *Eco*R I 쪽에는 인산기가 존재하고, *Not*I 에는 탈인산처리를 하여 인산기를 제거하였다.

* 본 vector의 *Eco*R I 사이트에 존재하는 T7 promoter는 *in vitro* transcription에 응용 가능하다.

GenBank Accession No.AB 003468

3. 주의사항

NotI 대신 *XhoI*를 사용하여 절단하는 경우에는 V-3. Adaptor ligation (1~3)을 실시한 후, 에탄올 침전법으로 DNA를 회수하여 제한효소 *XhoI* (Code 1094AH), H Buffer를 사용하여 50 µl 반응시 37 °C, 3 시간 정도 반응한다.

IX. Library 이용방법

IX - 1. Library 증폭

- 1) 필요한 clone을 포함한 plasmid library (ligation 반응액)을 electroporation으로 *E.coli* HST08 Premium 등에 도입하고 titer를 확인한다. (Electroporation은 V-7. Transformation 참조)
- 2) 다음날 φ15 cm LB/Amp plate (100 µg/ml ampicillin) 하나에 약 5 만 colony 이하가 되도록 spread 후, 37 °C에서 overnight 배양한다.
- 3) Plate에 생성된 colony에 LB/Amp (100 µg/ml ampicillin)를 약 2 ml^{*1} 첨가하고 spreader와 pipet으로 회수한다.
- 4) 다시 LB / Amp (100 µg/ml ampicillin)를 플레이트에 약 2 ml^{*1} 첨가하고 다시 회수한다.
- 5) 얻어진 균액을 글리세롤을 20 %가 되도록 추가한 후 -80 °C에서 보관한다^{*2}.
- 6) Titer를 확인 후, screening 및 plasmid 조제에 이용한다.
* 1: 첨가한 액체 배지의 대부분이 plate에 흡수되는 경우 첨가량을 증가하십시오.
*2: 보관 중에 역가가 저하될 수 있습니다. Titer를 확인 후 사용하십시오.

IX - 2. Screening(colony hybridization) membrane 준비

- 1) 필요한 clone을 포함한 plasmid library (ligation 반응액)을 electroporation으로 *E.coli* HST08 Premium 등에 도입하고 titer를 확인한다. (Electroporation은 V-7. Transformation 참조)
- 2) 다음날 φ15 cm LB/Amp plate (100 µg/ml ampicillin) 하나에 5 만 colony 이하가 되도록 spread 후, 37 °C에서 6~8 시간 배양한다. Colony가 서로 닿지 않을 정도까지 배양한다.
- 3) Plate에 생성된 colony와 membrane을 천천히 접촉시켜 colony를 membrane으로 transfer시킨다. 이때 membrane과 plate에 바늘로 구멍을 뚫어 나중에 위치를 파악 할 수 있도록 한다.
- 4) Membrane을 새로운 LB/Amp plate (100 µg/ml ampicillin)에 colony 면을 위쪽하여 하고 몇시간 배양하여 colony를 증식시킨다. (Master plate는 몇시간 배양 후 4 °C에 보관한다.)
- 5) 적당한 용기에 여과지^{*1} 두 겹을 포개고 0.5 N NaOH를 스며들게 한다. 이 위로 colony면을 위로 해서 membrane을 천천히 올린다. 30초 이상 0.5 N NaOH을 스며들게 하여 알칼리 처리를 한다.
- 6) 새로운 두 겹의 여과지^{*1}를 포개고 1M Tris-HCl (pH7.6)를 스며들게 한다. 이 위

- 로 colony면을 위로 해서 membrane을 천천히 올린다. 30초 이상 처리한다.
- 7) 새로운 두 겹의 여과지^{*1}에 1M Tris-HCl(pH7.6)/1.5M NaCl을 스며들게 한다. 이 위로 colony면을 위로 해서 membrane을 천천히 올린다. 30초 이상 처리한다.
 - 8) 새로운 1M Tris-HCl (pH7.6)/1.5M NaCl에 membrane을 담근다. 장갑을 착용하고 천천히 균체 잔류물을 씻어낸다.
 - 9) 새로운 1M Tris - HCl (pH7.6) / 1.5M NaCl로 washing한다.
 - 10) 여과지에 membrane을 끼어 80 °C, 2시간 처리하여 DNA를 membrane에 고정한다. (UV Crosslinker를 사용해도 좋다.)
 - 11) 여과지에 끼워 먼지가 묻지 않도록 실온에서 저장한다.
 - 12) 위의 과정에서 제작한 membrane은 colony hybridization에 의한 screening에 사용하여 원하는 clone을 분리할 수 있다. Probe hybridization에서 probe 조제^{*2}와 hybridization, washing 및 검출에 관한 것은 일반적인 순서 및 사용하는 labeling, 검출 시약의 설명서를 따라 주십시오.

* 1: Colony 표면에 액체가 닿으면 colony가 흘러 신호 검출이 되지 않을 수 있으니 membrane에 액체가 닿지 않도록 하십시오. 또한 여과지와 membrane사이에 기포가 들어가지 않도록 주의하십시오.

* 2: AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare사) 등을 사용할 수 있습니다.

X. 참고 문헌

- 1) Gubler, U. and Hoffman, BJ (1983) *Gene*, **25**, 263.
- 2) 노지마 히로 (1994) 실험 의학 별책 바이오 매뉴얼 시리즈 2 "유전자 library의 제작법 ", p79 - 94.
- 3) Roth, MJ *et al* (1985) *J. Biol. Chem*, **260**, 9326.
- 4) Wokdhar - Filipowicz, A. *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2295.
- 5) Howells, RD *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7651.
- 6) Schneider, C. *et a.l* (1984) *Nature* **311**, 675.
- 7) Leis, P. *et al.* (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 466.
- 8) Okayama, H. and Berg, P. (1982) *Mol. Cell Biol.*, **2**, 161.
- 9) Kobori, M., Ikeda, Y., Nara, H., Kato, M., Kumegawa, M., Nojima, H. and Kawashima, H. (1998) *Genes To Cells* **3**, 459-475

XI. 관련 제품

Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) (Code 2640A)
Recombinant RNase Inhibitor (Code 2313A)
DNA Polymerase I (*E. coli*) (Code 2130)
T4 DNA Polymerase (Code 2040)
T4 DNA Ligase (Code 2011A)
T4 Polynucleotide Kinase (Code 2021)
pHY Marker (Code 3404)
RNAiso Plus (Code 9108/9109)
GentLE Precipitation Carrier (code 9094)
E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code 9028)
Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells (Code 636756)
CHROMA SPIN™ -1000 + DEPC-H₂O Columns (Code 636093)

XII. 주의

- 본 제품은 연구용 시약입니다. 사람, 동물 등에 대한 의료, 임상진단에는 사용할 수 없습니다. 식품, 화장품, 가정용품 등으로도 사용하지 말아 주세요.
- 다카라바이오의 승인없이 제품의 재판매, 양도 및 재판매, 양도 등을 위한 제품 변형 및 상용물품제조에 사용할 수 없습니다.