

EZ™ T7 *In Vitro* mRNA Synthesis Kit

제품설명서

Kit for 10 samples

Cat# EZ038S

For research use only. Not for therapeutic or diagnostic purposes

목 차

I. 제품 설명.....	3
II. 제품 구성.....	4
III. Template DNA 준비.....	5
IV. 실험방법.....	7
V. Troubleshooting guide.....	11

I. 제품 설명

Enzynomics 의 EZ™ T7 *In vitro* mRNA Synthesis Kit 는 transcription 부터 5' capping, 3' poly(A) tailing 까지의 과정을 간단하고 효율적으로 만든 제품으로 transfection 과 microinjection 실험에 적합한 mRNA 를 생산하는데 특화된 제품입니다. Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) 가 포함되어 있어 기존의 Cap analog 가 절반 정도의 효율을 갖는 mRNA 를 합성하는데 반해 100% 기능을 하는 mRNA 를 합성할 수 있습니다. 이 제품은 고농도의 NTP 를 제공하며 ARCA 와 GTP 의 비율을 4:1 로 최적화하였기 때문에 한번의 반응으로 대량의 capping 된 transcription 산물을 얻을 수 있습니다. 또한 transcription 과정 중 오염에 의해 발생하는 RNA degradation 을 방지하기 위한 RNase Inhibitor 를 RNA polymerase 와 mixture 형태로 제공하여 편의성을 높였습니다. 구성품인 Control Template 1 μg 을 사용하였을 때 한 반응 당 20~30 μg 의 mRNA 를 생산할 수 있습니다. Transcription & capping 과정 후 *E. coli* Poly(A) Polymerase 를 이용하여 3' poly(A)-tail 반응을 수행하며 30분 반응시간 안에 100 bp 이상의 poly(A) 를 연결할 수 있습니다. 두 단계 실험 과정의 최종 산물인 capping 된 poly(A)-tailed RNA 를 사용하면 transfection 과 microinjection 실험 시 안정성을 높이고 translation 효율을 증가시킬 수 있습니다.

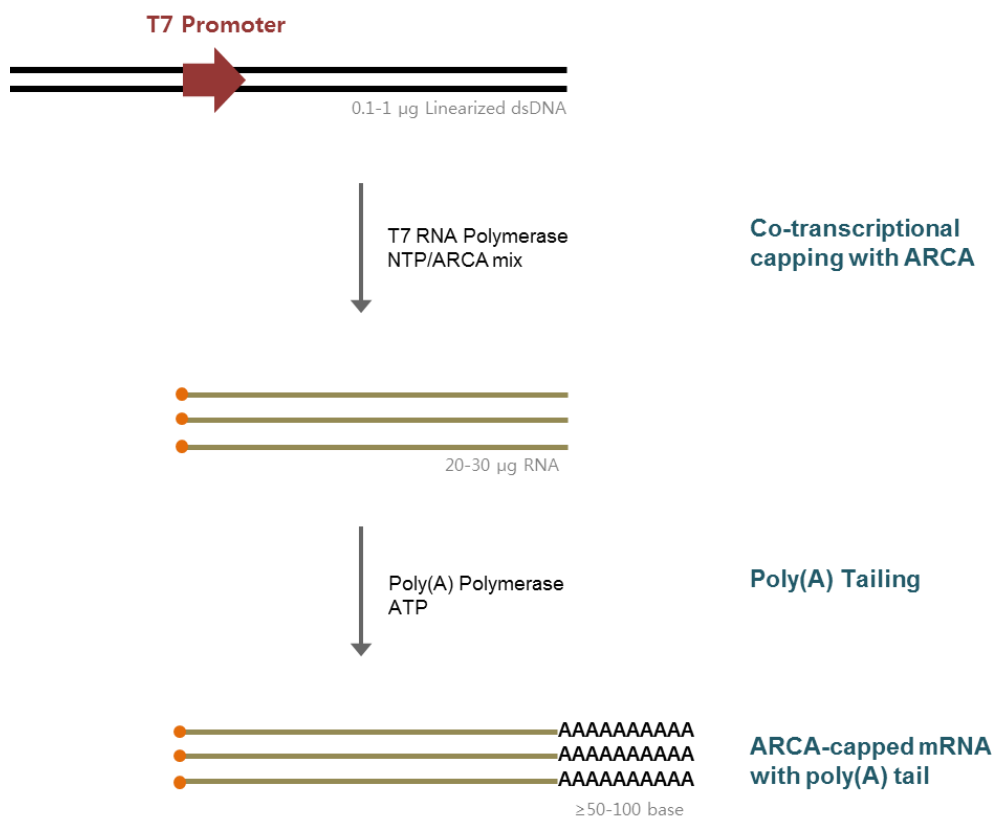


그림1. *In Vitro* mRNA Transcription 실험과정 모식도

II. 제품 구성

제품명	Cat. No.	제공량
EZ™ T7 <i>In Vitro</i> mRNA Synthesis Kit	EZ038S	10 rxn

1. 구성품

No.	구성품	용량	보관온도
1	RNase-free Water	1 ml	Any temp.
2	T7 Enzyme Mix	20 μ l	-20°C
3	10X T7 Reaction Buffer	50 μ l	-20°C
4	2X NTP/ARCA	100 μ l	-20°C
5	30 mM GTP	25 μ l	-20°C
6	DNase I	100 μ l	-20°C
7	<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase	40 μ l	-20°C
8	5X Poly(A) Pol. Reaction Buffer	250 μ l	-20°C
9	10 mM ATP	100 μ l	-20°C
10	25 mM MnCl ₂	100 μ l	-20°C
11	Control Template [1 μ g/ μ l]	10 μ l	-20°C
12	Lithium Chloride Precipitation Solution	1.4 ml	-20°C
13	Ammonium Acetate Stop Solution	1 ml	-20°C
14	10X RNA Loading Dye	1 ml	-20°C
15	RNA Sample Buffer	1 ml	-20°C

2. 제공되지 않는 구성품

- (optional) 방사능 표지 된 nucleotide
- (optional) Phenol/chloroform, isopropanol, 70% ethanol

III. Template DNA 준비

※ 제작 시 고려사항

이 제품은 T7 RNA Polymerase promoter 부분을 포함하는 Linearized Plasmid DNA 또는 PCR 산물로 0.3~5 kb 사이즈의 transcript 를 생산하기에 최적화된 제품입니다.

1. DNA linearization

Transcription 반응에는 blunt end 또는 5' sticky end 인 linearized dsDNA 가 적합합니다. T7 promoter 가 올바른 위치에 있는 DNA 또는 PCR product, cDNA 를 사용하십시오. Plasmid의 경우는 적절한 제한효소로 벡터를 linearization 합니다. 제한효소 처리 후에 PCR 정제 또는 DNA 침전 방법을 통해 linearized plasmid 만을 분리하십시오. 잘리지 않은 일부 plasmid DNA는 비정상적으로 긴 RNA 를 생성하기 때문에 제한효소처리가 완전히 되는 것이 중요합니다.

DNA template 이 3' overhang 인 경우 예상했던 결과와 관련 없는 RNA 가 추가로 생성될 수 있습니다. 그러므로 plasmid 는 반드시 3' overhang 을 만들지 않는 제한효소를 처리해야 합니다 (Table 1).

Aat I (Cat. No. R026)	Apa I (Cat. No. R020)	Bgl I (Cat. No. R043)	BstX I (Cat. No. R030)	Hae II (Cat. No. R090)
Hha I (Cat. No. R045)	Kpn I (Cat. No. R014)	Sac I (Cat. No. R005)	Sac I (Cat. No. R036)	Sfi I (Cat. No. R033)
Sph I (Cat. No. R017)	Pst I (Cat. No. R019)	Pvu I (Cat. No. R100)		

Table 1. Commonly used restriction enzyme that generation 3' overhangs

2. 3' Overhang 을 blunt end 로 전환하는 방법

만약 제한효소를 대체할 수 없는 경우라면, Klenow DNA Polymerase (Cat. No. KP001S) 의 3'→5' exonuclease 활성을 이용하여 아래와 같은 방법으로 3' overhang 을 blunt end 로 전환할 수 있습니다.

- ① dNTP 33 μ M 이 포함된 *in vitro* transcription 반응 액을 준비합니다.
- ② Klenow DNA Polymerase 5 unit/ μ g 를 처리하고 22°C 에서 15 분 간 반응합니다.
 - ※ 조건보다 높은 온도, 높은 enzyme 농도, dNTP 처리이상, 반응시간 초과 등의 문제는 3'→5' exonuclease 활성으로 인해 DNA 끝부분이 짧아지는 현상을 초래할 수 있습니다.
- ③ rNTP 와 RNA polymerase를 첨가하여 반응을 진행합니다.

3. Control Template

Control Template 은 제한효소 Sca I 으로 선형화 하여 제작했으며 T7 promoter 가 포함되어 있습니다. Control template 을 사용하여 합성된 transcript 는 1,065 염기와 2,346 염기로 생성되는데, 1,065의 짧은 염기가 생성되는 이유는 template 에 T7 terminator 부분이 있기 때문입니다. T7 terminator 부분은 대략 70-80% 정도의 효율을 가지고 있습니다. (그림 2).

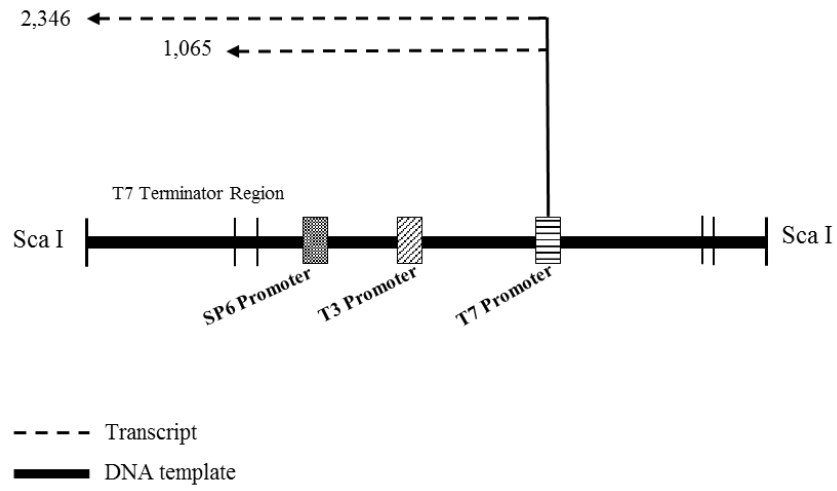


그림2. Control Template

IV. 실험방법

1. Transcription & Capping.

Component	Volume	Final Conc./ Amount
¹⁾ Linearized DNA	x μ l	0.1~1 μ g
2X NTP/ARCA	10 μ l	1X
10X T7 Reaction buffer	2 μ l	1X
T7 Enzyme Mix	2 μ l	-
RNase-free Water	up to 20 μ l	-
반응조건	37°C, 1시간	-

¹⁾Linearized DNA: Control Template (1 μ g/ μ l) 사용 시 1 μ l 의 control template 를 사용하십시오.

- 더 많은 RNA 생산을 원하실 경우 2시간 반응을 권장합니다.
- 4°C 에서는 buffer 구성에 포함된 spermidine 으로 인해 DNA 가 침전될 수 있으므로 상온에서 혼합을 진행하십시오.
- Template DNA 제거를 원하시면, 반응 후 DNase I 2 μ l 를 37°C, 15분간 처리합니다. RNA 대비 DNA 비율은 매우 낮기 때문에 일반적인 경우 template 제거는 필요하지 않습니다.

2. Poly(A) Tailing

Component	Volume	Final Conc.
Transcription & Capping reaction	[20 μ l]	
5X Poly(A) Pol. Reaction Buffer	20 μ l	1X
25 mM MnCl ₂	10 μ l	2.5 mM
10 mM ATP	10 μ l	1 mM
RNase-free Water	40 μ l	
¹⁾ Enzyme minus control	- 4 μ l	
Total	96 μ l	
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase	4 μ l	Final 100 μ l
반응조건	37°C, 30~45분	

¹⁾Enzyme minus control 로 준비한 4 μ l 는 실험 완료 후의 산물과 함께 agarose gel 상에서 Poly(A) tailing 대조군으로 확인할 수 있습니다.

※ Agarose gel 에서 결과를 확인할 경우

보통 1 μg 의 RNA 를 loading 할 경우 적절한 intensity 의 band 를 확인할 수 있습니다. 반응 액의 4 μl 를 RNA sample buffer 15 μl 에 넣어 혼합합니다. loading 전 1X RNA Loading Buffer 를 넣고 65~70°C 에서 5~10분 간 heating 후 10~15 μl loading 합니다.

- 전기영동시에 RNA 를 Staining 할 경우 아래 사항 중 하나를 따르십시오.
 - a. 10X RNA Loading Buffer 에 1 mg/ml 농도로 ethidium bromide 를 넣어 사용하십시오.
 - b. Agarose gel 제조시에 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 ethidium bromide 를 넣어 사용하십시오.
 - c. Running buffer 에 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 ethidium bromide 를 넣어 사용하십시오.
- 합성된 RNA 를 Transcription buffer 가 들어있는 상태에서 저온 보관하게 되면 buffer 성분 중 spermidine 에 의한 침전이 발생하여 전기영동 할 경우 정확하지 않은 크기로 나타날 수 있습니다.

1. 합성된 mRNA 정제

합성된 mRNA 는 사용자의 선택에 따라 Prep kit, Spin column chromatography, Phenol : chloroform extraction, Lithium Chloride precipitation 등 다양한 방법을 이용하여 정제할 수 있습니다. 본 제품은 Lithium Chloride precipitation 에 필요한 Lithium Chloride (LiCl) 와 Phenol : chloroform extraction 과정에 필요한 Ammonium Acetate Stop Solution 을 제공합니다.

1) LiCl 을 이용한 정제는 합성 후 반응액에 남아있는 nucleotide 와 protein, salt 를 편리하고 효율적으로 제거할 수 있는 방법입니다. 방법은 아래와 같습니다.

- ① 반응액에 LiCl 50 μl 를 넣고 완전히 섞어줍니다.
 - ② -20°C 에서 30 분 이상 유지합니다.
 - ③ 가능한 최대 속도로 4°C 에서 15 분간 원심분리 합니다.
 - ④ 상층액을 조심스럽게 제거합니다.
 - ⑤ 세척을 위해 70% 에탄올 700 μl 를 넣고 위와 같은 조건으로 재 원심분리 합니다.
 - ⑥ 에탄올을 완벽하게 제거한 후 준비해 둔 버퍼나 RNase-free water 로 RNA pellet 을 현탁 합니다.
- LiCl 을 넣기 전 반응액을 물에 희석하지 마십시오.
 - 300 bp 보다 작은 사이즈는 정제 효율이 떨어집니다

2) Phenol : chloroform extraction 을 이용한 RNA 정제는 고전적이면서 가장 확실한 정제 방법입니다. RNA 가 침전되기에 버퍼 교환을 할 수 있는 방법이기도 합니다.

- ① 반응액에 Ammonium Acetate Stop Solution 10 μl 을 넣고 완전히 혼합합니다.
- ② 동일용량만큼 phenol/chloroform 을 넣고 이어서 동일량의 chloroform 을 넣습니다.
- ③ 수용상의 용액을 회수하여 새 튜브로 옮기고 동일량의 isopropanol 을 넣어 잘 섞어줍니다.
- ④ -20°C 에서 15분 이상 유지한 뒤 가능한 최대속도로 4°C 에서 15분간 원심분리 합니다.
- ⑤ 상층액을 제거한 뒤 준비해 둔 버퍼나 RNase-free water 로 RNA pellet 을 현탁 합니다.

2. mRNA 정량

1) UV light absorbance 측정

A_{260} 에서의 흡광도 측정은 가장 간편하고 정확하게 RNA 수율을 측정하는 방법입니다. 하지만 정제되지 않은 반응액을 정량 할 경우 incorporation 되지 않은 NTP 나 template DNA 가 측정에 영향을 주므로 희석하여 측정해야 합니다. 일반적으로 1/100 로 반응액을 희석할 경우 linear 한 값을 얻을 수 있습니다. ssRNA 일 때 1 A_{260} unit 은 40 μg 에 해당하므로 다음과 같은 식에 대입하여 계산할 수 있습니다.

$$\rightarrow A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40 = \mu\text{g/ml RNA}$$

2) Ethidium bromide fluorescence 측정

Ethidium bromide 에 염색된 RNA 의 intensity 를 측정하여 대략적인 RNA 수율을 추정할 수 있습니다.

- Ethidium bromide spot assay

Incorporation 되지 않은 NTP 를 제거한 경우, ethidium bromide spot assay 를 수행하여 RNA 를 정량 할 수 있습니다. 먼저 농도를 알고 있는 RNA 샘플을 이용하여 standard curve 를 제작합니다. 이때 RNA 를 2 배 간격으로 희석하여 80 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 부터 1.25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 까지의 농도로 사용합니다. 정량하고자 하는 RNA 샘플은 몇가지로 희석하여 준비합니다. 모든 샘플에 ethidium bromide 를 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 가 되도록 넣은 뒤 UV transilluminator 에 wrap 을 놓은 후 그 위에 2 μl 씩 떨어뜨리고 Standard curve 샘플과의 형광 량을 비교하여 농도를 추정합니다. 측정하고자 하는 샘플의 형광 량이 standard curve 의 Linear 한 범주안에 들어야 합니다.

- Denaturing agarose gel electrophoresis

Incorporation 되지 않은 NTP 를 제거하지 않은 경우, 적절하게 희석하여 농도를 알고있는 RNA 샘플과 함께 agarose gel 에 loading 합니다. (8페이지 'Agarose gel 에서 결과를 확인할 경우' 참고) Running 후 ethidium bromide 로 staining 하여 농도를 알고 있는 샘플과의 intensity 비교를 통해 농도를 추정합니다.

추가로 필요할 수 있는 과정

1) Transcript 의 길이가 5 kb 보다 클 경우

합성 하고자 하는 transcript 의 길이가 5~6 kb 보다 클 경우에는 특이적으로 GTP 가 부족하게 되어 수율이 감소할 수 있으므로 여분의 GTP 로 반응을 보충하는 것이 바람직 합니다. 5-8 kb 범위의 template 에 대하여 처음에 1 μl 의 30 mM GTP 를 첨가해 보십시오. 8 kb 이상의 template 인 경우, 추가 GTP 를 적정하여 필요한 최소량을 결정해야 합니다. 여분의 GTP 를 첨가하면 full length product 의 수율이 높아지지만 capping 된 transcripts 의 비율은 감소하게 됩니다.

2) Transcript 의 길이가 0.3 kb 보다 작을 경우

이 제품은 0.3~5 kb 의 transcript 를 합성하기에 최적화 되어있습니다. 이 범위안에 드는 경우라면 제시된 프로토콜 만으로 한 반응 당 plasmid template 1 μg 의 사용으로 최대수율을 얻을 수 있으며 반응시간, Polymerase 농도, template 농도를 증가시킨다고 해서 수율을 더 증진하는 데에 큰 도움이 되지는 않습니다. 하지만 0.3 kb 이하인 경우라면 아래의 사항을 순서대로 하나씩 변경해 보시며 조건을 찾을 것을 권장합니다.

- ① 반응시간을 4시간에서 6시간까지 늘려보십시오.
- ② Template농도를 0.5~2 pmole 까지 늘려보십시오. (PCR Product 등의 template 사이즈가 작은 경우는 가능하나, 2 kb 이상의 Plasmid 의 경우는 벡터에서 template 부분만 분리하여 사용하십시오.)
- ③ 자사 제품 T7 RNA Polymerase (Cat. No. RP001) 를 이용하여 50~200 unit 까지 늘려보십시오.
주의) 본 제품 구성품인 T7 Enzyme Mix 는 이 경우에 사용이 적합하지 않습니다.

V. Troubleshooting guide

원하는 결과를 얻지 못한 경우 아래의 문제해결 방안을 참고하십시오.

Description	Possible cause and Solution
<p>RNA 생성물이 적은 경우</p>	<p>반응 액의 template 양이 불충분 할 가능성이 있습니다.</p> <ul style="list-style-type: none"> 정량이 제대로 되었는지 재확인 해보시고 재 실험 시 반응시간을 2 시간에서 4~6 시간까지 늘려서 시도하십시오. Transcription Buffer 의 spermidine 으로 인해 DNA template 이 침전된 경우일 수 있으므로 제시된 실험 방법에 맞게 상온에서 시약을 혼합하십시오. <p>사용하시는 template 의 문제일 수 있습니다.</p> <p>Control template 일 경우 반응 당 30 μg 을 합성할 수 있으며 적어도 15~20 μg 을 합성합니다. 그러나 사용자께서 준비하시는 template 에 따라서는 합성수율이 크게 달라질 수 있습니다. 수율이 매우 적을 경우 우선은 Control template 을 사용하여 과정에 문제가 없었는지 확인하십시오.</p> <p>(control 결과는 좋으나 사용자의 DNA 실험결과가 안 좋을 경우)</p> <ul style="list-style-type: none"> RNA 밴드형태나 크기가 부정확한 경우 반응액의 RNase 오염을 의심하십시오. RNA 밴드형태와 크기가 정확하고 control 에 대비 수율만 낮은 경우 다음과 같이 실험하여 template 의 문제를 확인하십시오. <ol style="list-style-type: none"> 0.5 μg Control template 0.5 μg 사용자 template ①+② 혼합 <ul style="list-style-type: none"> ③의 결과에서 사용자의 template 밴드만 흐릴 경우 사용방법대로 template 을 준비하였는지 확인하십시오. 크기와 정량 값을 재 확인하십시오 ③의 결과에서 두 밴드 다 흐릴 경우 사용자의 template 에 RNA polymerase 활성을 방해하는 SDS, EDTA, Salt 와 같은 성분이 있을 수 있습니다. Template 을 다시 정제하십시오
<p>예상했던 RNA 크기와 다를 때</p>	<p>반응온도가 37°C 보다 낮은 경우일 수 있습니다. 그런 경우, 긴 길이의 RNA 생성물이 증가됨을 보입니다.</p> <p>Polymerase terminator 염기서열이 있을 수 있습니다. 원하는 염기서열이 다른 벡터로 subclone 되었을 때 다른 종류의 RNA polymerase 로 전사될 수 있으며, 염기서열이 terminator 로 인식되어 효율이 감소될 수 있습니다.</p> <p>RNA sample buffer 가 변질되었을 수 있습니다. RNA sample buffer 가 오래되었거나 동결-해동과정을 많이 거쳐 변질되었을 때 RNA 가 부정확한 크기로 전기영동 될 수 있습니다.</p>

<p>예상했던 RNA 크기와 다를 때</p>	<p>Template 의 Linearization 이 잘못되었을 수 있습니다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • DNA template 이 3' overhang 되는 제한효소를 사용하여 선형화 했을 경우 생성물의 길이가 길어질 수 있습니다. 만약 이런 유형의 제한효소를 사용해야 한다면 반응 전 blunt-end 할 수 있는 Klenow DNA polymerase (KP001S) 를 사용하십시오. • Linearization 이 완전히 안된 plasmid 가 존재하는 경우일 수 있습니다. 전기영동을 통해 DNA sample 을 분석하십시오. 만약 불완전하게 잘린 벡터가 보일 경우 적절한 제한효소를 재처리 하십시오.
	<p>RNA 전사물이 3' end 에서 안정적인 이차구조를 생성하지 못한 경우 예상보다 생성물의 길이가 길 수 있습니다. 60분에서 15-30분 정도로 반응 시간을 줄여 시도하십시오.</p>
<p>Agarose Gel 상에서 Poly(A)- tailing 반응물의 사이즈가 shift 되지 않을 경우</p>	<p>Control template 은 shift 되지만 사용자의 template 은 안될 경우 사용자의 transcript 사이즈가 control 에 비해 많이 클 경우 agarose gel 상에서의 shift 비교는 적절하지 않습니다. 적절한 gel % 를 맞추어 재확인하십시오. Trace labeling 방법을 수행하시는 방법도 있습니다.</p>