

# EZ™ MEGA T7 Transcription Kit

## 제품설명서

Kit for 50 samples

Cat# EZ039S

For research use only. Not for therapeutic or diagnostic purposes

## 목 차

I. 제품 설명.....	3
II. 제품 구성.....	4
III. 실험 방법.....	5
IV. Troubleshooting guide.....	10

## I. 제품 설명

EZ™ MEGA T7 Transcription Kit 는 T7 promoter 를 포함하는 DNA template 에서 고수율, 고순도의 RNA 를 합성하는데 특화된 제품으로 합성부터 정제까지 간단하고 효율적으로 수행할 수 있습니다. 반응 당 1  $\mu\text{g}$  의 선형화 된 template 에서 100~180  $\mu\text{g}$  의 RNA 를 1시간 안에 생산 할 수 있으며 50회 반응 분량으로 구성되어 있어, 이 제품을 사용하여 총 5 mg 이상의 RNA 를 합성할 수 있습니다. 실험에 사용되는 DNA template 은 상부에 18 염기의 이중 가닥 T7 promoter 가 위치해야 합니다. Template 이 준비되면 RNA polymerase, rNTP, transcription buffer를 넣고 37°C에서 1시간 반응합니다. RNA polymerase 가 이중 가닥의 promoter 와 결합하면, DNA 가닥이 서로 분리되어 한 가닥의 주형으로부터 5'→3' 방향으로 상보적인 RNA 가 합성됩니다. 이 제품은 RNA 길이가 길거나 짧을 경우 모두 성공적인 결과를 제공하며, 대량의 RNA 합성을 요구하는 in vitro translation, antisense RNA, RNAi, RNase protection assay, RNA splicing, RNA binding protein, microarray, in situ hybridization 등의 다양한 연구에 적합합니다.

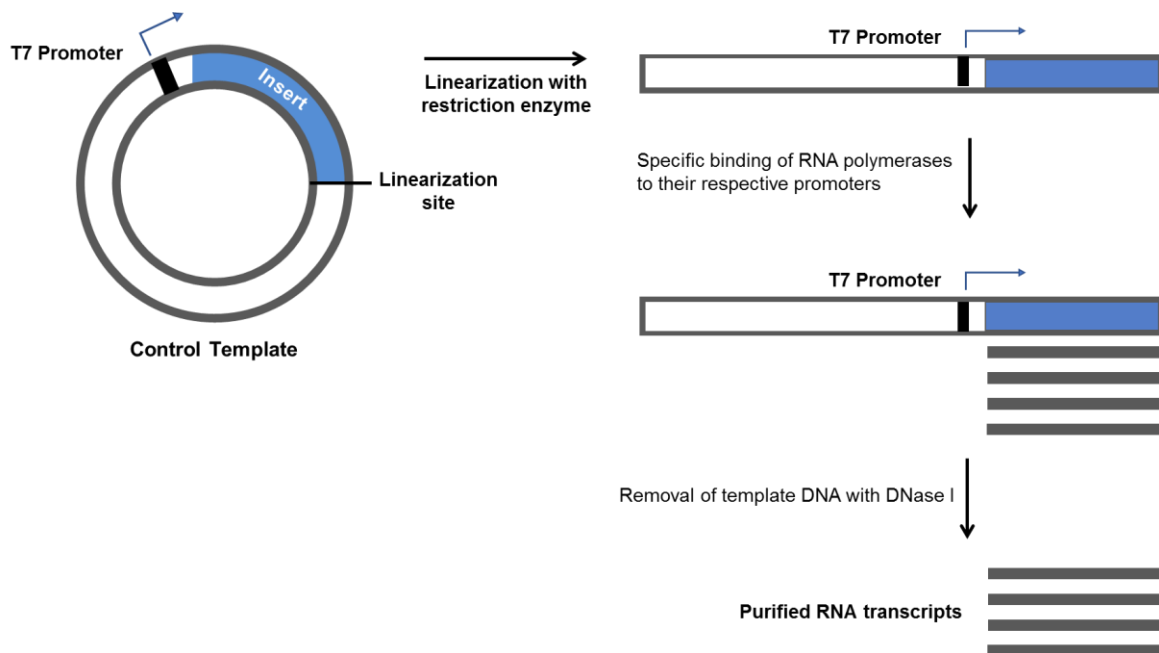


그림 1. The principle of In vitro T7 RNA transcription system.

## II. 제품 구성

제품명	Cat. No.	제공량
EZ™ MEGA T7 Transcription Kit	EZ039S	50 rxn

### 1. 구성품

No.	구성품	용량	보관온도
1	RNase-free Water	1 ml	Any temp.
2	MEGA T7 Enzyme Mix	20 $\mu$ l	-20°C
3	MEGA 10X T7 Reaction Buffer	50 $\mu$ l	-20°C
4	rATP (100 mM)	100 $\mu$ l	-20°C
5	rGTP (100 mM)	100 $\mu$ l	-20°C
6	rCTP (100 mM)	100 $\mu$ l	-20°C
7	rUTP (100 mM)	100 $\mu$ l	-20°C
8	DNase I	100 $\mu$ l	-20°C
9	Control Template [1 $\mu$ g/ $\mu$ l]	10 $\mu$ l	-20°C
10	Lithium Chloride Precipitation Solution	1.4 ml	-20°C
11	Ammonium Acetate Stop Solution	1 ml	-20°C
12	10X RNA Loading Dye	0.5 ml	-20°C
13	RNA Sample Buffer	1 ml	-20°C

### 2. 제공되지 않는 구성품

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

### III. 실험 방법

#### ※ 주의사항

- RNase 오염을 주의하십시오.
- 실험에 사용되는 모든 기구와 Tip 등을 멸균하십시오.
- RNA 를 다루는 실험에는 항상 실험용 장갑을 착용하십시오.
- 제품의 모든 구성 품은 항상 밀봉된 상태를 유지하십시오.

#### (1) Template DNA 준비

##### ※ 제작 시 고려사항

이 제품은 T7 RNA Polymerase promoter 를 포함하는 linearized plasmid DNA 또는 PCR 산물로 0.5~5 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 완전히 절단된 plasmid DNA 를 사용하는 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 (표 1).

Aat II (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)	SacI I (Cat. No. R036)	Sfi I (Cat. No. R033)
Sph I (Cat. No. R017)	Pst I (Cat. No. R019)	Pvu I (Cat. No. R100)		

표1. 일반적으로 사용되는 3' overhang 제한효소

#### 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 μM 이 포함된 *in vitro* transcription 반응 액을 준비합니다.
- ② Klenow DNA Polymerase 5 unit/μg 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).

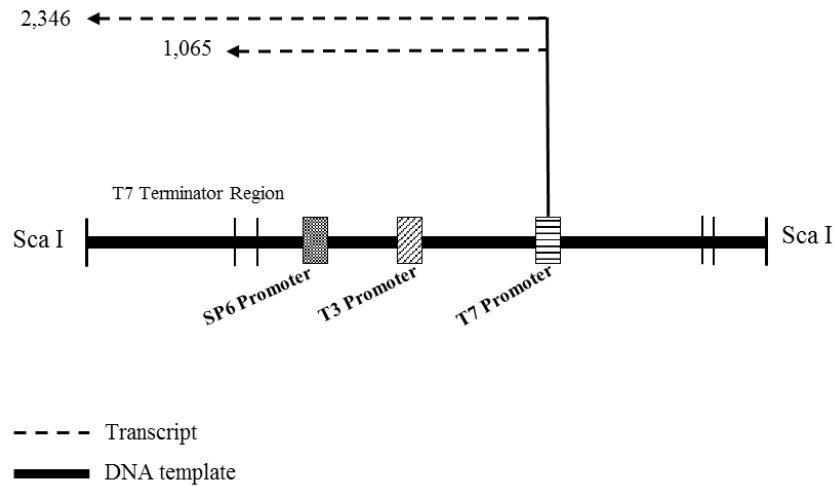


그림2. Control Template

## (2) Transcription 반응

## 1. 반응 조건

Component	Volume	Final Conc./ Amount
<sup>1)</sup> Linearized DNA	x $\mu$ l	1 $\mu$ g
rATP (100 mM)	2 $\mu$ l	10 mM each
rGTP(100 mM)	2 $\mu$ l	
rCTP (100 mM)	2 $\mu$ l	
rUTP (100 mM)	2 $\mu$ l	
10X T7 Reaction buffer	2 $\mu$ l	1X
T7 Enzyme Mix	2 $\mu$ l	-
RNase-free Water	up to 20 $\mu$ l	-
반응조건	37°C, 1시간	-

<sup>1)</sup>Linearized DNA: Control Template (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) 사용 시 1  $\mu$ l 의 control template 를 사용하십시오.

- 더 많은 RNA 생산을 원하실 경우 2 ~ 4시간으로 반응시간을 늘리십시오.
- 4°C 에서는 buffer 조성에 포함된 spermidine 으로 인해 DNA 가 침전될 수 있으므로 상온에서 혼합을 진행하십시오.
- Template DNA 제거를 원하시면, 반응 후 DNase I 2  $\mu$ l 를 37°C, 15분간 처리합니다. RNA 대비 DNA 비율은 매우 낮기 때문에 일반적인 경우 template 제거는 필요하지 않습니다.

### (3) 결과확인

#### ※ Agarose gel 에서 결과를 확인할 경우

보통 1  $\mu\text{g}$  의 RNA 를 loading 할 경우 적절한 intensity 의 band 를 확인할 수 있습니다. 반응 액 2  $\mu\text{l}$  를 RNA sample buffer 15  $\mu\text{l}$  와 혼합합니다. loading 전 1X RNA Loading Buffer 를 넣고 65~70°C 에서 5~10분 간 heating 후 10~15  $\mu\text{l}$  loading 합니다.

- 전기영동 시 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 시 정확하지 않은 크기로 나타날 수 있습니다.

#### 1. 합성된 RNA 정제

합성된 RNA 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  $\mu\text{l}$  를 넣고 완전히 혼합합니다.
  - 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  $\mu\text{l}$  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 침전되어 버퍼 교환을 할 수 있는 방법이기도 합니다.

- ① 반응액에 Ammonium Acetate Stop Solution 10  $\mu\text{l}$  을 넣고 완전히 혼합합니다.
- ② 동일용량만큼 phenol/chloroform 을 넣고 이어서 동일양의 chloroform 을 넣습니다.
- ③ 수용상의 용액을 회수하여 새 튜브로 옮기고 동일양의 isopropanol 을 넣어 잘 혼합합니다.
- 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 현탁합니다.



## 2. RNA 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  $\mu\text{g}$  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. 정량 하고자 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  $\mu\text{l}$  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 알고 있는 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 0.5 kb 보다 작을 경우

이 제품은 0.5~5 kb 의 transcript 를 합성하기에 최적화 되어있습니다. 이 범위안에 드는 경우라면 제시된 프로토콜 만으로 한 반응 당 plasmid template 1  $\mu\text{g}$  의 사용으로 최대수율을 얻을 수 있으며 반응시간, Polymerase 농도, template 농도를 증가시킨다고 해서 수율을 더 증진하는 데에 큰 도움이 되지는 않습니다. 하지만 0.5 kb 이하인 경우라면 아래의 사항을 순서대로 하나씩 변경해 보시며 조건을 찾을 것을 권장합니다.

- ① 반응시간을 4시간에서 6시간까지 늘려보십시오.
- ② Template 농도를 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.

#### IV. Troubleshooting guide

원하는 결과를 얻지 못한 경우 아래의 문제해결 방안을 참고하십시오.

Description	Possible cause and Solution
<b>RNA 생성물이 적은 경우</b>	<p><b>반응 액의 template 양이 불충분 할 가능성이 있습니다.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>정량이 제대로 되었는지 재확인 해보시고 재 실험 시 반응시간을 2시간에서 4~6 시간까지 늘려서 시도하십시오.</li> <li>Transcription Buffer 의 spermidine 으로 인해 DNA template 가 침전될 수 있으므로 제시된 실험 방법에 맞게 상온에서 시약을 혼합하십시오.</li> </ul>
	<p><b>사용하시는 template 의 문제일 수 있습니다.</b></p> <p>Control template 일 경우 반응 당 30 <math>\mu</math>g 을 합성할 수 있으며 적어도 15~20 <math>\mu</math>g 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"> <li>RNA 밴드형태나 크기가 부정확한 경우 반응액의 RNase 오염을 의심하십시오.</li> <li>RNA 밴드형태와 크기가 정확하고 control 에 대비 수율만 낮은 경우 다음과 같이 실험하여 template 의 문제를 확인하십시오.             <ol style="list-style-type: none"> <li>0.5 <math>\mu</math>g Control template</li> <li>0.5 <math>\mu</math>g 사용자 template</li> <li>①+② 혼합</li> </ol> </li> <li>③의 결과에서 사용자의 template 밴드만 흐릴 경우 사용방법대로 template 을 준비하였는지 확인하십시오. 크기와 정량 값을 재 확인하십시오</li> <li>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</li> </ul>
<b>예상했던 RNA 크기와 다를 때</b>	<p><b>반응온도가 37°C 보다 낮은 경우일 수 있습니다.</b></p> <p>그런 경우, 긴 길이의 RNA 생성물이 증가됨을 보입니다.</p>
	<p><b>Polymerase terminator 염기서열이 있을 수 있습니다.</b></p> <p>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><b>RNA sample buffer 가 변질되었을 수 있습니다.</b></p> <p>RNA sample buffer 가 오래되었거나 동결-해동과정을 많이 거쳐 변질되었을 때 RNA 가 부정확한 크기로 전기영동 될 수 있습니다.</p>

예상했던 RNA 크기와 다를 때	<p><b>Template 의 Linearization 이 잘못되었을 수 있습니다.</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• 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.</li><li>• 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.</li></ul>
	<p><b>RNA 전사물이 3' end 에서 안정적인 이차구조를 생성하지 못한 경우 예상보다 생성물의 길이가 길 수 있습니다.</b></p> <p>60분에서 15~30분 정도로 반응 시간을 줄여 시도하십시오.</p>