

Dyne High Yield In Vitro Transcription kit

Cat. No.	용량	농도
DYK1220	25 rxns	

◆ **제품구성**

	Vol. (μl)
5X Transcription Buffer	500
10X MgCl ₂	200
rATP (100 mM)	100
rGTP (100 mM)	100
rCTP (100 mM)	100
rUTP (100 mM)	100
Control Template DNA (1 μg/μl)	5
T3 RNA Polymerase (200 U/μl)	25
T7 RNA Polymerase (200 U/μl)	25
SP6 RNA Polymerase (80 U/μl)	25
DTT (100 mM)	200
20X Enhancer Solution	100
Sterile water (RNase free)	1,000

◆ **보관온도**

· -20°C

◆ **추가로 필요한 구성**

- DNase I
- RNA Ladder Marker
- RNA Loading Dye
- RNA Loading Buffer
- RNA Sample Buffer

◆ **제품 설명**

· Dyne High Yield In vitro Transcription Kit는 T7, T3, SP6 RNA polymerase promoter를 포함하는 DNA template에서 고수율의 RNA 합성을 위해 제작되었으며, 필요한 모든 구성품을 제공한다 (Radioisotope 제외). 본 제품은 RNA polymerase 1 종당 25 reaction으로 구성되었으며, 각 반응당 1 μg 대조군 template에서 180 μg 까지의 RNA를 1시간 안에 생산할 수 있다. SP6, T3, T7 RNA polymerase는 DNA template로부터 RNA 합성에 일반적으로 쓰이며 각각의 고유 promoter에 특이적으로 작용한다. 따라서 실험에 사용되는 DNA template는 상부에 적합한 이중가닥 promoter가 위치해야 한다. Template가 준비되면 RNA polymerase, rNTP, transcription buffer를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다. RNA polymerase가 이중가닥의 DNA promoter와 결합하면, DNA 가닥이 서로 분리되어 한 가닥의 주형으로부터 5'→3' 방향으로 상보적인 RNA가 합성된다. 본 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 연구에도 적합하다.

◆ **표준반응조건**

- ① 아래의 조성표대로 구성 성분을 상온에서 혼합한다.
※ 4°C에서는 buffer 조성에 포함된 spermidine으로 인해 DNA가 침전되므로 혼합하는 동안은 반드시 상온을 유지하십시오.

Component	Vol.	Final conc.
5X Transcription Buffer	4 μl	1X
10X MgCl ₂	2 μl	1X
DTT (100mM)	2 μl	10 mM
20X Enhancer Solution	1 μl	1X
rATP (100 mM)	1 μl	5 mM
rGTP (100 mM)	1 μl	5 mM
rCTP (100 mM)	1 μl	5 mM
rUTP (100 mM)	1 μl	5 mM
¹⁾ Template DNA	x μl	1 μg
RNA polymerase	1 μl	T3 or T7 : 200U SP6 : 80U
Sterile water	Up to 20 μl	

¹⁾Template DNA : control template (1 μg/μl) 사용 시 1 μl의 control template를 사용할 것.

※ 더 높은 농도의 RNA 생성물을 얻고자 할 경우 반응시에 5 mM rNTP, 1X MgCl₂를 추가로 첨가하십시오 (SP6 RNA polymerase 제외).

- ② 완전히 섞은 후에 짧게 원심분리하고 37°C에서 60분간 반응한다.
③ Template DNA의 1 unit/μg이 되도록 DNase I을 처리한다.

- ④ 37°C에서 30 분간 반응한다.
- ⑤ 반응액의 5 ul 를 RNA Sample Buffer 15 ul 에 혼합한다.
- ⑥ Agarose gel loading 전 2~5 μl 의 RNA loading buffer 을 넣고 60°C에서 10 분 간 가열합니다.

◆ **주의사항**

- 합성된 RNA를 Transcription Buffer가 들어있는 상태에서 저온 보관하게 되면 Spermidine으로 인해 침전될 수 있다. 저온 보관한 RNA를 전기영동 할 경우 정확하지 않은 크기로 나타날 수 있다.
- RNase가 오염되는 것을 방지한다.
- Enhancer Solution은 RNA 합성률을 증가시키기 위해 RNase Inhibitor와 특별한 효소로 구성되어 있다.
- DNA template가 제대로 제거되지 않으면 고분자 크기 (대조군 DNA의 경우 4kb 이상)의 밴드가 나타난다.

◆ **참고사항**

· **Transcript 길이가 0.3kb 보다 작을 경우**

본 제품은 0.3kb 이상의 transcript 합성에 최적화 되어있다. 0.3kb 이상일 경우 제시된 프로토콜 만으로 한 반응 당 plasmid template 1 μg의 사용으로 최대 수율을 얻을 수 있으며 반응시간, polymerase, template 농도를 증가해도 수율을 늘리는데 큰 도움이 되지 않는다. 하지만 0.3kb 이하인 경우에 표준 프로토콜로 합성했을 때 수율이 기대 이하라면 아래의 사항들을 순서대로 하나씩 변경해보며 적정 조건을 찾을 것을 권장한다.

- 1) 반응시간을 4시간에서 6시간으로 늘린다.

- 2) Template 농도를 0.5~2 pmole까지 늘린다. (PCR product 등의 template size가 작은 경우는 가능하나, 2kb 이상의 plasmid의 경우는 벡터에서 template 부분만 분리하여 사용한다.)
- 3) 아래와 같이 농도를 줄이고 4시간 이상 반응한다.

Component	Vol.	Final conc.
Linearized DNA	X μl	1 μg
rATP (100 mM)	1.5 μl	7.5 mM each
rGTP (100 mM)	1.5 μl	
rCTP (100 mM)	1.5 μl	
rUTP (100 mM)	1.5 μl	
10X MgCl ₂	3 μl	1.5x
DTT (100 mM)	1.5 μl	
5X Transcription Buffer	3 μl	0.75X
T7 RNA Polymerase	0.75 μl	
20X Enhancer solution	0.75 μl	0.75X
RNase-free water	Up to 20 μl	
Reaction condition	37°C, 4hrs	

Buffer 조성

- 1) 5X MOPS Buffer

0.2M MOPS (pH 7.0), 50 mM sodium acetate, 5 mM EDTA (pH 8.0)

- 2) RNA Sample Buffer

10 ml deionized formamide, 3.5 ml 37% formaldehyde, 2 ml MOPS buffer

* 해동-동결을 반복하지 않기 위해 실험에 필요한 만큼의

양을 분주한다. 나선형 뚜껑이 있는 튜브를 사용하여 밀봉하고 -20°C에서 3~6개월간 보관 가능하다.

- 3) RNA loading buffer

50% Glycerol, 1 mM EDTA, 0.4% Bromophenol blue, 1 mg/ml Ethidium bromide

* 고순도의 glycerol을 사용한다. 실험에 필요한만큼 분주하고 -20°C에서 보관한다.