

About Nucleic Acid Purification

- 핵산 정제의 원리 -

- NAP (Nucleic Acid Purification)
- Spin-column 기반 정제
- AGPC 기반 정제

NAP (Nucleic Acid Purification)

핵산 (Nucleic Acid)

RNA		DNA
단일 가닥	구조	이중 가닥
리보스 (ribose)	5탄당	디옥시리보스 (deoxyribose)
아데닌(A), 우라실(U), 구아닌(G), 사이토신(C)	구성 염기	아데닌(A), 티민(T), 구아닌(G), 사이토신(C)
mRNA, rRNA, tRNA, miRNA, lncRNA 등	종류	Genomic DNA, cDNA, plasmid DNA 등
리보스 (ribose)의 2'-OH기가 알카리 가수분해에 의해 쉽게 분해되어 불안정하며, 다양한 환경에 존재하는 RNase에 노출되어 쉽게 파괴될 수 있다.	정제 시 주의점	RNA보다 안정한 구조이나, nuclease 등의 혼입을 최소화하여야 intact한 DNA 추출이 가능하다.

RNA 정제에서 중요한 점

정제된 RNA는 순도가 매우 중요한데, gDNA 혼입여부도 순도를 결정하는 주요 요인 중 하나이다. 특히 qPCR 등 후속 실험을 정확하게 진행하기 위해서는 gDNA를 제거하는 과정을 추가하는 것이 좋다.

또한, 잔존하는 RNase의 활성을 막고 열로부터의 손상을 최소화하기 위해 RNA 추출 시 4 °C에서 진행하는 것이 좋다.

Plasmid DNA란?

플라스미드 (plasmid)는 염색체와는 별개로 존재하며 독립적으로 복제될 수 있는 세포 내의 작은 DNA분자이다. 대부분 세균에 존재하지만 일부 진핵세포 생물 (예: 효모)에도 존재하는 고리형의 이중가닥 DNA이다. 플라스미드가 복제 원점 (replication origin)을 통해 복제가 가능한 점을 이용하여, 유전공학의 tool로서 유전자를 운반하는 역할로 활용할 수 있다.

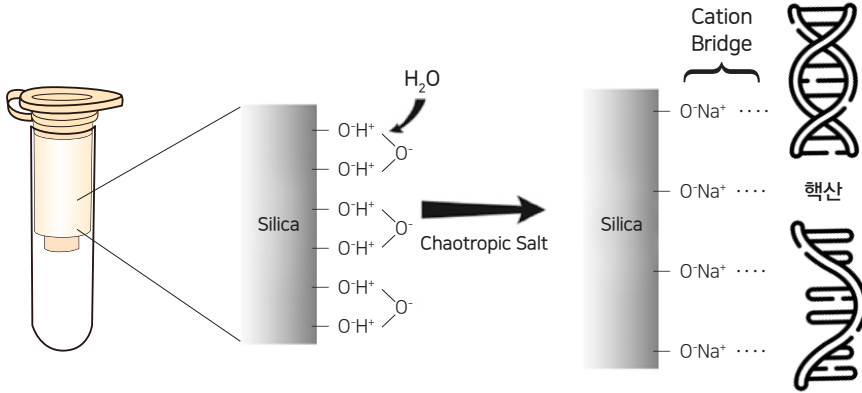
NAP (Nucleic Acid Purification) 의 과정

- * **Lysis step:** Lysis buffer와 같은 detergent로 조직 또는 세포에서 핵산을 용해하는 단계. 방법에 따라서 phenol 또는 chloroform을 사용하기도 한다. 식물이나 곰팡이류 세포벽의 다당류 성분들을 제거하기 위해 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 등을 추가하기도 하며, 박테리아의 세포막과 세포벽을 lysis하기 위해 lysozyme과 proteinase K를 사용하기도 한다. 세포벽이 강해서 깨지지 않을 때는 glass bead 등으로 물리적인 충격을 가하여 분쇄 후 용해 시키기도 한다.
- * **Washing step:** ethanol 등으로 핵산 외 오염물질이나 염을 씻어내는 단계. Ethanol 등의 알코올에는 전하가 없어 핵산이 잘 녹지 않고 침전되는 특징이 있다. 때문에 washing buffer에 포함된 ethanol, isopropanol은 silica membrane에서 핵산이 떨어지지 않게 하거나 침전시키면서 주위의 염을 녹여 없애는 역할을 한다.
- * **Elution step:** 핵산만을 회수하는 단계. D.W나 EB buffer 등 전하를 띠는 물질에는 핵산이 녹을 수 있다. Membrane에 결합되어 있는 경우 low salt solution이 지나가면 cation bridge가 끊어지게 되고, 핵산이 떨어져 나오게 된다.

Spin-column 기반 정제

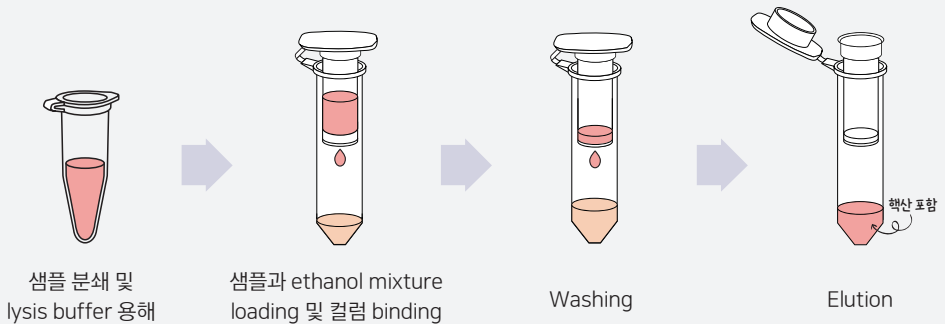
Spin column 기반 핵산 정제법은 핵산을 신속하게 정제할 수 있는 방법이다. 원심력을 이용하여 membrane에 핵산을 붙였다가 추출해내는 방법으로 고염 조건에서 핵산의 backbone이 silica column의 membrane (고체상)에 결합하는 원리다. 이 방법은 고순도로 빠르게 핵산을 추출할 수 있다는 특징이 있다. 대표적으로 Takara의 MiniBEST Extraction Kit 시리즈가 있다.

핵산이 Silica membrane 에 결합하는 원리



Chaotropic agent (chaotropic salt)는 수소이온결합을 끊어주는 물질을 통칭하는 말로 대표적으로 guanidine sodium salt, UREA, sodium iodide 등 1가 양이온의 염이다. 핵산 정제에서 chaotropic agent는 세포 내 단백질의 folding을 풀어 denature 시켜주고 cell lysis를 하는 역할을 하며, 핵산과 silica가 결합될 수 있는 다리 (cation bridge)를 형성해 준다. Chaotropic agent가 제공한 양이온을 중심으로 이온교환방법이 spin column 방식 핵산정제의 가장 큰 원리이다. Silica와 상호작용하던 물 분자는 chaotropic agent에 의해 dehydration (탈수 반응)이 일어나서 남아있는 O⁻와 핵산 인산기의 O⁻사이를 Na⁺가 연결하면서 좀 더 안정된 형태를 띠면서 Si⁻ (silica membrane)의 주성분, Na⁺ (chaotropic agent가 제공해준 1가 양이온), O⁻ (핵산 backbone의 인산기)이 순차적으로 이온결합을 하게 된다. 이는 염이 제거되면 끊어지는 약한 결합이므로 저염의 버퍼 (예, 물)로 핵산과 양이온 결합을 끊어내어 elution하게 된다.

실험 순서 간단 정리



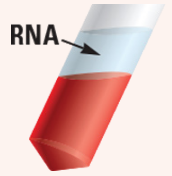
AGPC (Acid Guanidinium thiocyanate –Phenol–Chloroform)

AGPC 기반 정제법은 용해도와 밀도 차이를 이용해 핵산을 분리하는 것으로 원심분리 후 상층액에 녹은 핵산만 회수하는 방법으로 spin column법보다 상대적으로 시간이 오래 걸리지만 수율이 높다는 특징을 가지고 있다. 대표적으로 Takara의 RNAiso 시리즈가 있다.

핵산이 분리, 정제되는 원리

* 밀도 : 물 (water) < 페놀 (phenol) < 클로로포름 (chloroform)

물은 페놀:클로로포름을 포함한 유기층보다 밀도가 낮기 때문에 위로 올라가며, 이러한 밀도 차이 때문에 소수성인 지질은 하단의 유기층으로 분리된다. 이때 단백질은 두 층 사이 (interphase)에 남아있는 반면, 핵산 (염을 비롯한 오염물질도 포함)은 상단의 수용층에 녹아 분리된다. 수용층에서 얻어낸 핵산은 isopropanol 등으로 침전시켜 회수한 후 75% ethanol로 세척하고 pellet 을 건조시킨 후, 다시 TE 버퍼 또는 물에 녹여 후속 실험에 사용하게 된다.



AGPC 기반 정제에 사용되는 주요 시약의 역할

- Phenol (페놀): RNase의 저해작용을 하며 금속 이온에 대해 약한 chelator이다. 페놀은 지질을 녹이며 세포막을 용해하여 핵산과 단백질을 추출할 수 있도록 한다. 산화된 페놀이 핵산을 손상시키기 때문에 이를 막기 위한 항산화제가 포함되기도 한다.
- Chloroform (클로로포름): 클로로포름은 상 분리 시약으로 핵산 및 단백질 층을 나누는 역할을 한다. 원심분리 후 페놀과 클로로포름은 물보다 밀도가 크기 때문에 밑으로 가라앉으며 수용층과 분리시킨다.
- Isoamyl alcohol (이소아밀알코올): RNase 활성을 억제하고 거품을 제거하는 효과가 있다. 유기용매로 이소아밀알코올 없이 페놀:클로로포름만 사용하기도 한다.
- Isopropanol (이소프로판올): 핵산을 침전시키는 역할을 한다. 이소프로판올이 에탄올보다 침전 효율이 좋지만 휘발성이 낮아 건조가 오래 걸릴 수 있다.
- Proteinase K : 단백질을 분해하는 효소로 각종 nuclease를 분해시키기 위해 첨가한다. 열로 비활성화할 수 있다.

전처리시약

Fruit-mate™ for RNA Purification (Code 9192)

→ 비이온성의 폴리머를 사용하여
다당류와 폴리페놀류 제거



다당류가 다량 함유된 식물에서 RNA 추출 시

RNAiso Plus (Code 9109)
: AGPC 법 기반 추출 시약

후처리시약

High-Salt Solution for Precipitation (Plant) (Code 9193)

→ 잔존하는 다당류를 제거

다양한 샘플을 적용할 수 있는 NAP 제품리스트

특징	Code	제품명	용량
Spin-column 기반 정제 : 고순도 RNA 정제			
gDNA 제거 컬럼 포함	9767A/B	TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit	50 회/200 회
2종류의 lysis buffer로 다양한 식물 샘플 적용	9769A/B	TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit	50 회/200 회
Spin-column 기반 정제 : 고순도 DNA 정제			
동식물 조직 및 세포, bacteria 모두 적용	9765A/B	TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit	50 회/200 회
식물 샘플 전용 (종자, 과실, 버섯 등 적용)	9768A/B	TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit	50 회/200 회
바이러스 genome 정제	9766A/B	TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit	50 회/200 회
그람 음성/양성균 적용	9763A/B	TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit	50 회/200 회
<i>E.coli</i> plasmid DNA 정제	9760A/B	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit	50 회/200 회
PCR 반응 산물 정제	9761A/B	TaKaRa MiniBEST DNA fragment Purification Kit	50 회/200 회
Agarose gel 실온 용해, DNA 단편 정제	9762A/B	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit	50 회/200 회
FFPE 샘플 DNA 추출	9782A/B	TaKaRa MiniBEST FFPE DNA Extraction Kit	50 회/200 회
AGPC 기반 정제 : 고순도 RNA 정제			
적색 유기용매층으로 구분 분리	9108/9109	RNAiso Plus	100 ml/ 200 ml
혈액 등 수분이 많은 샘플의 적용	9112/9113	RNAiso Blood	100 ml/ 200 ml
다당류 함유 샘플 전처리 시약	9192	Fruit-mate™ for RNA Purification	100 ml
다당류 함유 샘플 후처리 시약	9193	High-Salt Solution for Precipitation (Plant)	100 ml
같이 쓰면 좋은 제품			
핵산 추출 전 샘플 보존	9750	Sample Protector for RNA/DNA	100 ml
1.5 ml microtube에서 간편한 파쇄	9790A/9791A	TaKaRa BioMasher Standard(Non-sterile/sterile)	50회
RNA 실험 필수품, RNase 오염 제거 시약	9037	RNase-OFF®	500 ml

In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (Code 638947 외)



Any insert / Any vector / Any site
고효율 Cloning을 쉽고 정확하게

고감도, 고효율, 뛰어난 신장성으로
고차구조, GC rich RNA 까지 적용 가능

- Full length cDNA 합성
(Code 6110A 외)
- Real Time PCR 전용 cDNA 합성
(Code RR092A 외)



고성능 high fidelity RTase

PrimeScript™ 시리즈

Full length cDNA 합성
Real Time PCR 전용 cDNA 합성