

Q & A

Q1 DNA Chip으로 어떤 것을 할 수 있는가?

A1 DNA chip은 한번의 실험으로 다수의 유전자 발현정보를 동시에 얻을 수 있는 방법이다. 하지만 경우에 따라서는 DNA chip상에 spot 되어 있는 DNA와 상동성을 갖는 다른 유전자가 hybridize 되기도 하고 다른 원인에 의해 실제와는 다른 결과가 나타날 가능성이 있다. 이러한 이유로 DNA chip의 해석결과에서 발현양에 변동이 있는 유전자는 다른 발현해석법(Northern hybridization법, RT-PCR법 등)을 이용하여 확인할 것을 권장한다.

Q2 NuSieve® 3:1 Agarose(TaKaRa Code F50091/F50090)를 사용하여 고효율로 blotting하려면?

- A2**
- ① Gel의 두께는 5 mm 이하가 되도록 한다.
 - ② TBE Buffer 보다는 TAE Buffer가 적합하다.
 - ③ Capillary blotting일 경우 4% gel로 24시간 transfer한다. Paper towel을 적어도 한 번 정도 교환하고 paper towel이 젖은 경우는 바로 교환한다.
 - ④ 본 agarose는 alkaline blotting에는 사용할 수 없다. 10×, 20× SSC 사용을 권장한다.
 - ⑥ Membrane이 gel 표면에 닿도록 한다. Gel중 대부분의 DNA는 gel 표면에 있다.

Q3 5'-Full RACE Core Set(TaKaRa Code 6122)을 사용하여 증폭시킨 PCR산물을 sequencing할 때 주의점은?

A3 역전사반응으로 신장한 미지영역 5'말단이 갖춰지지 않을 수도 있으므로 미지영역 서열을 결정할 경우 PCR산물의 direct sequencing은 권장하지 않는다. TA cloning 등으로 subcloning한 후 복수의 clone에 대하여 sequencing할 것을 권장한다.

Q4 Klenow fragment(TaKaRa Code 2140A)를 사용하여 5' 돌출말단 DNA를 평활말단(fill-in 반응)으로 만드는 방법은?

A4 표준 실험방법은 다음과 같다.

① 다음의 반응액을 조제한다(total 25 μ l).

| | |
|----------------------|--------------------------|
| DNA | 1 μ g |
| 10× Klenow Buffer *1 | 2.5 μ l |
| 2.5 mM dNTP Mixture | 2 μ l (final 0.2 mM) |
| Klenow Fragment *2 | 0.1 U |
| 멸균증류수 | |

*1: 100 mM Tris-HCl(pH7.5), 70 mM MgCl₂, 1 mM DTT
Klenow Fragment에 첨부되어 있다.

*2: 1× Klenow Buffer로 희석한다.

- ② 37°C에서 10~30분간 반응한다.
- ③ 70°C, 10분간 열처리로 효소를 실행시킨다. 필요 시 phenol처리 후 ethanol로 침전하여 다음 실험에 사용한다.

[주의] Klenow Fragment는 3'-exonuclease 활성을 갖고 있으므로 DNA 1 μ g 당 1 U 이상 사용할 경우 효율이 떨어진다. 37°C에서 반응할 때 DNA 1 μ g 당 0.1 U 정도 사용하도록 한다. 3'-exonuclease 활성은 저온에서는 억제되므로 저온에서 장시간(10°C에서 1시간 혹은 0°C에서 3시간) 반응하는 것이 효과적이다. 이 경우 Klenow Fragment는 DNA 1 μ g 당 3 U까지 사용할 수 있다.

Q5 Pellet Paint™ Co-Precipitant(TaKaRa Code NV625)나 Pellet Paint™ NF Co-Precipitant(TaKaRa Code NV281)을 사용하여 ethanol침전하여 재용해한 DNA에서 Pellet Paint™만을 제거할 수 있는가?

A5 Pellet Paint™만을 제거할 수 있는 효과적인 방법은 없다. 하지만 재용해한 DNA를 전기영동하면 Pellet Paint™는 DNA와 역방향(-극측)으로 이동하므로 DNA와 분리할 수 있다. 분리된 DNA는 전기영동 후 gel에서 회수한다.

Q6 Human Mesenchymal Stem Cells(TaKaRa Code PT034)는 계대배양할 수 있는가?

A6 Mesenchymal Stem Cells는 계대를 거듭할 경우 분화능을 상실하므로 5회 이상의 계대배양은 좋지 않다.