

Q & A

Q1 카다로그 등에 제한효소의 상품명에 *Bbe* (*Nar* I) 이라고 쓰여 있는데 이 두 개의 제한효소는 동일하게 사용할 수 있습니까?

A1 카다로그에 ()로 기재한 효소는 isoschizomer이다.

같은 염기서열을 인식하는 제한효소를 isoschizomer라고 하는데 절단위치가 다른 경우도 있다.

Bbe I 과 *Nar* I의 경우, 두개의 인식서열은 같지만 *Bbe* I은 GGCGC↓C, *Nar* I 은 GG↓CGCC 로 절단위치가 다르므로 주의해야 한다.

또 절단위치가 같은 isoschizomer라도 메틸화의 영향이 다른 것이 있다. *Sau*3A I과 *Mbo* I은 인식서열 및 절단위치도 같은 isoschizomer이지만 *Mbo* I은 dam methylase로 일부 염기가 methylation의 영향을 받으므로 일반적인 대장균에서 유래하는 DNA는 절단할 수 없다. 그러나 *Sau*3A I은 dam methylase의 영향을 받지 않으므로 일반적인 대장균에서 유래하는 DNA를 절단할 수 있다.

제한효소를 사용할 때는 메틸화의 영향에 대해서도 반드시 확인한 후 사용해야 한다.

Q2 cDNA library plasmid형(TaKaRa Code 9501~9549)을 사용하여 PCR로 screening할 경우 실험방법은?

A2 표준 protocol을 나타낸다.

① 아래의 반응액을 조제한다(total 25 μl).

cDNA library*1	1 μl
10× <i>Ex Taq</i> Buffer(Mg ²⁺ plus)*2	2.5 μl
2.5 mM dNTP Mixture*2	2.0 μl
TaKaRa <i>Ex Taq</i> TM	0.25 μl
Primer(forward, reverse)	각 10 pmol
멸균증류수	

*1: 원액(200 ng/μl)을 20배 희석한 것(10 ng/μl)

*2: TaKaRa *Ex Taq*TM(TaKaRa Code RR001A/B/C)에 첨부되어 있다.

② 다음 조건으로 PCR 한다.

94°C	30초	} 30 cycle
55°C	1분	
72°C	0.5~3분	

③ PCR산물 일부(5 μl)를 agarose 전기영동으로 확인한다.

[주의]

- Annealing 온도는 37~65°C의 범위에서 검토한다.
- 증폭하는 insert의 길이에 맞추어 1 kb/1 분을 기준으로 신장시간을 조절한다.
- Target 특이적 primer 외에 T7 primer와 T3 primer를 사용하여 PCR을 할 수 있다(T7 primer는 *BcaBEST*TM Sequencing Primer T7(TaKaRa Code 3884)을 사용할 수 있다).

Q3 pT7Blue T-Vector(TaKaRa Code NV004)를 사용하여 PCR산물을 cloning 할 때 주의점은?

A3 ① PCR산물은 SUPRECTM-PCR(TaKaRa Code 9073), SUPRECTM-02(TaKaRa Code 9041)를 사용하여 primer와 dNTP를 제거한 후 사용한다.

② T-Vector와 PCR산물의 ligation에 DNA Ligation Kit(TaKaRa Code 6021, 6022)를 사용할 경우 16°C에서 1시간 이내에 반응해야 한다. 장시간 반응할 경우 false positive colony (white colony에서도 insert가 포함되어 있지 않은 것)가 증가하는 경우가 있다.

③ PCR산물이 긴 경우(5 kbp 이상), T-Vector로의 cloning 효율이 상당히 저하된다. 제대로 되지 않을 경우에는 T-Vector 이외의 다른 vector를 권장한다.

Q4 OrigamiTM Competent Cells(TaKaRa Code NV688~690)과 OrigamiTM B Competent Cell(TaKaRa Code 944~946)의 차이는?

A4 OrigamiTM와 OrigamiTM B는 모두 thioredoxin·reductase(*trx*B)와 glutathione·reductase(*gor*) 유전자가 결실된 대장균이다. 이들을 숙주로 한 경우 세포질 내에서의 disulfide 결합이 향상되어 pET Vector 등을 사용하여 발현시킨 단백질의 가용화와 refolding이 촉진된다. OrigamiTM은 *E. coli* K12 주 유래이고 OrigamiTM B는 BL21 주 유래이다. 둘다 *lon*, *ompT* protease가 결실되어 있어 목적 단백질을 보다 안전하게 발현할 수 있는 숙주이다. 또 OrigamiTM B는 *lacY*도 결실되어 있어 IPTG로 발현을 조절할 수 있다.