Q&A

Q1 *BioWhittaker사의 정상사람세포를 배양할 때의 주의할 점은?*

A1 정상사람세포는 주화된 세포에 비하여 미묘하고 예민하므로 신중한 취급이 필요하다. 각 세포에 첨부되어있는 instruction manual을 반드시 정독한 후에 manual에 따라 세포를 배양한다. 특히 주의해야할 점은 아래와 같다.

① 배양에 사용하는 용기는 접착성 세포배양용 플라스크나 접시를 이용한다.
Collagen이나 Matrigel로 처리한 것을 권장한다.

② 각 세포를 배양할 때는 반드시 전용 권장배지를 사용한다. 다른 배지를 사용하는 경우 세포 성능을 보증할 수 없다.

③ 세포를 접종할 때 밀도는 반드시 권장 접종밀도로 한다.

④ 동결세포 vial은 37℃의 항온조에서 재빨리 융해한다. 융해한 후 가능하면 신속하게 세포를 접종한다(세포가 융해된 상태에서 3분 이상 방치하면 세포가 damage를 입는다).

⑤ 세포의 subculture가 필요한 경우는 반드시 전용 subculture시약 set ReagentPack™(TaKaRa Code B5034)를 사용한다.

Q2 *Long Ranger® 50% Gel Solution(TaKaRa Code F50611, F50612, F50615)는 요소를 첨가하지 않은 미변성 조건에서도 사용 가능한가?*

A2 사용할 수 없다. 미변성 조건에서 사용하면 통상 polyacrylamide gel보다 분리능이 상당히 떨어진다. Long Ranger는 요소를 첨가한 변성조건에서만 사용한다.

Q3 *Pfu N-Acetyl Deblocking Aminopeptidase(Ac-DAP)(TaKaRa Code 7340)은 종래 Pfu Deblocking Aminopeptidase(DAP)(TaKaRa Code 7338)와 어떻게 다른가?*

A3 DAP로 목적 단백질을 소화할 경우 E/S비 = 1/1~1/2의 양(mol비)의 DAP를 이용하므로 소화물로 직접 아미노산 서열을 해석하면 DAP 유래의 N말단 서열도 검출되어 버린다. 따라서 기존 DAP를 사용할 때는 소화 후에 목적 단백질의 소화물과 DAP를 분리할 필요가 있다.

Ac-DAP는 유전자 변형기술로 N말단 아미노산 잔기를 acetyl화한 DAP이다. N말단이 수식되어 있으므로 소화물로 직접 아미노산 서열을 해석하여도 DAP유래의 서열이 검출되지는 않는다. 이렇게 Ac-DAP를 이용하면 소화 후에 분리하는 조작을 하지 않아도 목적 단백질 서열만을 해독할 수 있다.

Q4 *TaKaRa의 PCR효소로 증폭한 PCR 산물은 그대로 T-Vector에 cloning할 수 있는가?*

A4 당사의 PCR 효소 중 Pyrobest® DNA Polymerase(Code R005A/B)로 증폭한 PCR산물의 대부분은 평활말단이 되므로 T-Vector로의 cloning은 권장할 수 없다.

그 밖의 PCR효소(*TaKaRa Taq*™, *TaKaRa Ex Taq*™, *TaKaRa LA Taq*™, *TaKaRa Z-Taq*™)로 증폭한 PCR 산물의 대부분은 3' 말단에 A가 부가된 상태가 되므로 T-vector cloning이 가능하다. 단, 길이가 긴 PCR 산물(5 kbp 이상)의 T-vector cloning은 효율이 떨어지므로 주의해야 한다.

Q5 *pTriEx™ Vector나 pETBlue™ Vector를 이용하여 목적 단백을 발현할 때, 숙주에 pLacI이 포함되어야 하는 이유는?*

A5 pTriEx™ Vector나 pETBlue™ Vector는 pET Vector와 달리 plasmid 안에 *lac* I 유전자를 포함하지 않는다. 따라서 pLacI을 포함하지 않는 숙주를 이용하면 *lac* repressor가 생산되지 않으므로 기저 lebel에서의 발현 억제가 충분히 이루어지지 않아 colony형성이나 세포 생육에 영향을 미치는 경우가 있다.

pTriEx™이나 pETBlue™을 이용하여 발현하는 경우는 반드시 pLacI를 포함하고 있는 숙주(Tuner™(DE3) pLacI이나 Origami™(DE3) pLacI 등)을 이용한다.