

Q_1...

Northern blot 해석으로 검출할 수 없는 유전자를 DNA chip으로 검출할 수 있을까요?

A_... DNA chip의 검출감도는 northern blot 해석과 비교하여 월등하다고는 할 수 없습니다. 다만 northern으로는 목적 유전자가 긴 경우, 분해되지 않은 전장의 mRNA를 회수하기 어렵기 때문에 밴드를 얻을 수 없는 경우가 있습니다. 그 같은 경우에도 mRNA가 극단적으로 분해되지 않는다면 DNA chip으로 검출할 수 있는 가능성이 있습니다. 목적 유전자가 소수이고 명확한 경우는 정량 RT-PCR쪽이 감도 및 정량성의 면에서 우수합니다.

Q_2...

Hot Start 용 Taq Antibody(TaKaRa Code 9002A/B)는, 사용하기 전에 Taq과 섞기만 하면 되나요?

A_... Taq DNA Polymerase의 효소액과 Taq Antibody는 반드시 원액 그대로 동량씩 부드럽게 혼합하여 20~25℃에서 약 10분간 방치합니다. 그 다음 각 효소의 사용방법에 따라 PCR을 실시해 주십시오. 이 방법으로 Taq Antibody가 TaKaRa Taq™(TaKaRa Code R001A/B/C), TaKaRa Ex Taq™(TaKaRa Code RR001A/B/C), TaKaRa LA Taq™(TaKaRa Code RR002A/B) 및 TaKaRa Z-Taq™(TaKaRa Code R006A/B)에 대해서 유효하게 작용한다는 것을 확인하였습니다.

Q_3...

Refolding CA Kit(TaKaRa Code 7350)로 처리가능한 단백질의 양은? 또 얻어진 refolding 단백질의 양은?

A_... 본 kit는 refolding조건을 검토하기 위한 kit 이므로 한번에 대량 단백질을 처리할 수는 없습니다. Inclusion Body를 형성한 단백질을 10 mg/ml 이하의 농도로 현탁하고, 우선 unfolding 조작을 합니다. 이때 염산 구아니딘 첨가 단계에서 용액의 점도가 높지 않으면 조작상의 문제는 없습니다. 10 mg/ml의 농도에서 사용한 경우, protocol에 따른 1회의 처리로 100%의 refolding이 일어나면 약 14 μg의 refolding 단백질을 얻을 수 있습니다.

Q_4...

Refolding CA Kit 로 refolding한 후의 단백질 용액에 침전이 다시 생기는 일이 있는데?

A_... Refolding과정에는 CA가 계면활성제를 포접하여 포접화합물(현 면상태의 침전)이 생깁니다. 이 원심 상층을 모아 refolding 단백질 용액으로 존재하지만, 방치해두면 남아있는 CA와 계면활성제가 반응하여 침전이 생길 수 있습니다. 다시 원심하여 침전을 제거하여도 refolding된 단백질에 특별한 영향은 없습니다.

Q_5...

Refolding CA Kit로 refolding한 후의 단백질 용액중의 refolding단백질의 검출과 정제는 어떻게 하나요?

A_... 원심 상층에서 얻은 refolding단백질 용액은 대부분의 경우 효소활성 등의 생리활성 측정에 그대로 사용할 수 있습니다. 활성측정이 곤란한 경우는 SDS-PAGE를 하여 단백질의 크기를 확인함으로써 refolding의 여부를 판단할 수 있습니다. Tag(His·Tag, GST·Tag 등)을 부가한 재조합 단백질에 관해서는 Tag를 이용한 통상 affinity 정제를 해주십시오.

Q_6...

Alkaline Phosphatase에는 대장균 유래의 효소(BAP)(TaKaRa Code 2120A/B, 2110A/B)와 송아지 소장 유래의 효소(CIAP)(TaKaRa Code 2250A/B)가 있으나 사용구분은 어떻게 하나요?

A_... BAP와 CIAP는 열안정성과 실험조건이 다릅니다. BAP는 상당히 안정성이 높은 효소이므로 반응종료 후 적어도 2회 phenol 처리를 해주십시오. CIAP는 킬레이트제 존재하에서 65℃, 30분의 열처리로 99% 이상의 활성이 불가역적으로 실행되지만 사용조건에 따라서는 불충분한 경우도 있으므로 완전히 실행시키기 위해서는 phenol 처리를 해주십시오. 일반적으로 평활말단이나 5'-함몰말단의 경우 5'-돌출말단보다 탈인산화의 효율이 떨어지게 됩니다. 그 경우는 BAP을 이용한 고온(55~60℃)에서의 반응을 추천합니다.