

Plasmid DNA 자동추출정제 시스템

자동 Plasmid 추출장치 “T1000”

Takara code TL100

Tepnel Life Sciences사의 제품입니다.

Takara에서는 이번에 96개의 well이 장착된 plasmid DNA 자동 추출정제 시스템 T1000을 신발매 하였다. T1000은 대장균을 배양한 96 deep well plate를 원심 한 후에 세트 하는 것만으로, OD₂₃₀/OD₂₆₀ 비가 높은 고순도 plasmid DNA를 약 2시간 만에 효율적으로 추출 정제할 수 있는 장치이다(그림 1). 시약은 kit화 되어 병 상태로 장치에 세트 할 수 있다. 조작성이 뛰어난 터치 패널 형식의 user interface로, 1 well에서 96 well까지의 처리 숫자를 자유롭게 설정할 수 있어, 시약이나 소모품의 낭비를 막을 수 있다. 또한 게놈 DNA나 RNA의 contamination이 적고, 재현성이 뛰어난 plasmid DNA의 추출 정제가 가능하다. 정제한 plasmid DNA는 그대로 염기서열해석에 적용할 수 있고 수율성도 높아지기 때문에, 그 상태로 spotting 하여 DNA chip을 제작할 수 있다. 본 제품의 개요와 본 제품을 사용한 간단한 실험예를 소개하기로 한다.



그림 1 Plasmid DNA 자동추출정제 시스템 T1000
사이즈 : 950(W) X 457(D) X 950(H) mm ; 중량 : 60 kg

1. 원리

T1000의 plasmid DNA 추출정제의 원리는 그림 2와 같다.

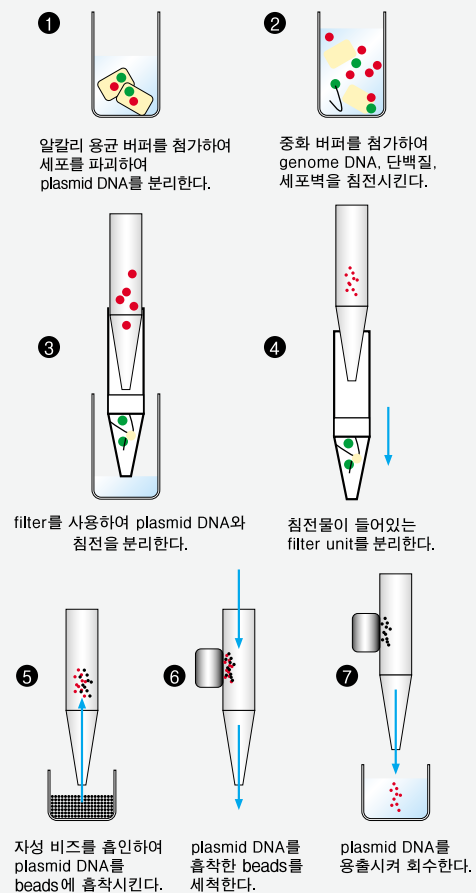


그림 2 T1000 plasmid DNA 자동추출정제의 원리
Step ①, ②에서는 T1000의 진동반응 기능으로 모든 시료를 완전하게 현탁한다.

2. 조작법

(1) 시약 및 기구 세팅

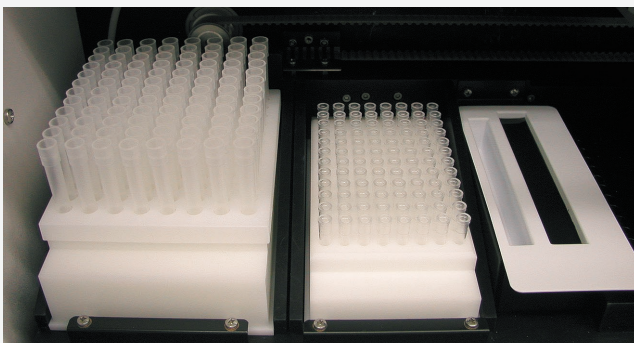
사용할 시약이나 기구가 모두 kit로 되어 있다.

- ① 자성 beads와 RNase A 이외의 시약은 모두 병에 들어있는 상태이므로 먼저 시약병을 T1000에 그대로 세트한다(그림 3A). 단 washing buffer 병에는 에탄올 200 ml를 첨가하여 혼합한 후 세트한다.
- ② Column과 filter는 rack에 나란히 놓여져 있는 상태이므로 그 상태로 T1000에 세트한다. 자성 beads는 binding solution 병에 넣어서 현탁한 후, RNase A용액과 함께 tray에 옮겨서 세트한다(그림 3B).
- ③ Bioblock 2장과 용출용 plate 1장을 소정의 위치에 세트한다. 마지막으로 96 deep well plate에서 하루 밤 배양한 대장균을 원심 분리해서 상청을 제거한 것(균체 plate)을 소정의 위치에 세트한다(그림 3C).

(A)



(B)



(C)

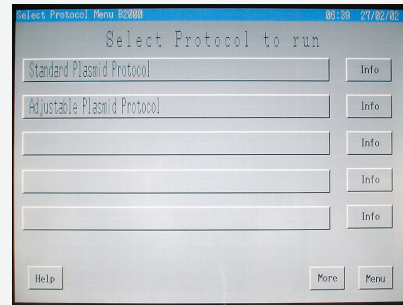


그림 3 T1000에 시약·소모품 세팅한 모습

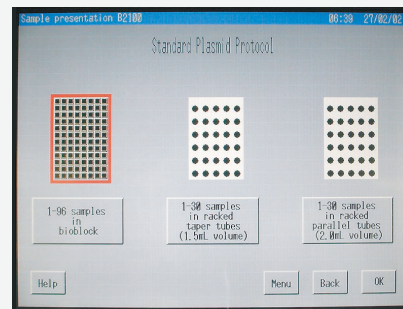
(2) Parameter의 입력

T1000 조작 panel은 touch panel 형식으로 사용하기 매우 편리하여 초보자도 조작하기 쉽게 설계되어 있다.

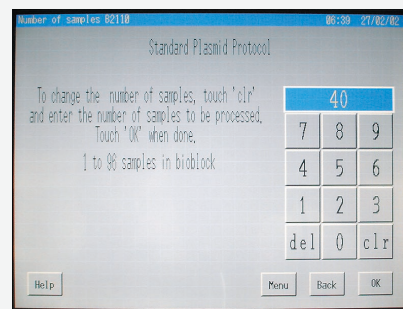
- ① 추출 protocol을 선택한다. 보통 「Standard Plasmid Protocol」을 사용한다.



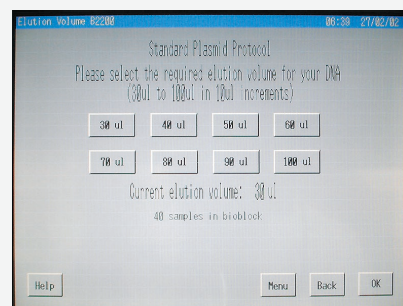
- ② 샘플 block의 종류를 선택한다.



- ③ 샘플 수를 입력한다. 1 에서 96 샘플까지 입력 가능하다.

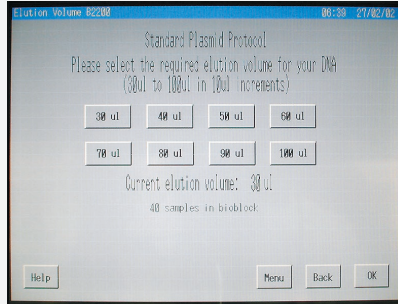


- ④ 추출액의 양을 입력한다. 30 μ에서 100 μ까지 10 μ단위로 선택할 수 있다.

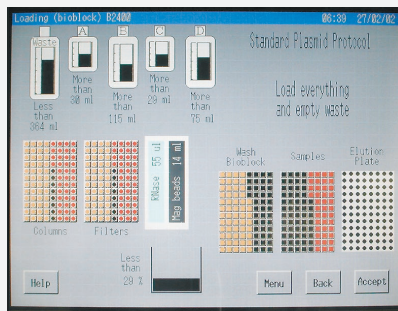


⑤ 사용할 filter의 start 위치를 선택한다.

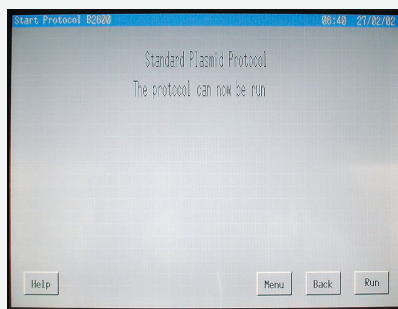
화살표 버튼을 누르는 것으로 위치 이동이 가능하고 선택된 filter는 빨강색 표시된다. 그림의 예에서는 ③에서 입력한 40 샘플을, A1에서 가져온 filter를 이용해서 처리하는 것을 의미한다. 이 기능으로 96 샘플 모두를 사용하지 않고도, 그 다음에 연속적인 filter 사용이 가능하기 때문에 소모품의 낭비가 없다.



⑥ 샘플 수나, filter 위치, 시약의 양을 화면으로 확인한다.



⑦ 마지막으로 「run」버튼을 눌러서 시작한다. 그 후의 조작은 자동적으로 이루어진다.



3. 사용례 (1) : 대장균 JM109에서 pUC18의 추출정제

pUC18로 형질전환한 대장균 JM109를 하룻밤 배양해서, T1000을 이용하여 plasmid를 추출 정제한다. 각 well의 재현성을 보기 위해 대장균을 50 ml × 7개로 배양 후, 96 deep well plate에 1.2 ml (OD₆₀₀ = 3.0)씩 분주하여 원심 분리한 후에 상청을 제거하여, T1000에 세트한다. 추출 프로토콜은 「Standard Plasmid Protocol」을 이용하고 추출 액의 양은 50 μl 했다. 추출 종료 후에 용출 plate에 용출된 정제 plasmid 용액에서 각 0.5 μl 취하여 전기영동을 실시한 후 그 결과를 그림 4에 나타내었다. 모든 well에서

순도가 높은 plasmid를 얻을 수 있었다.

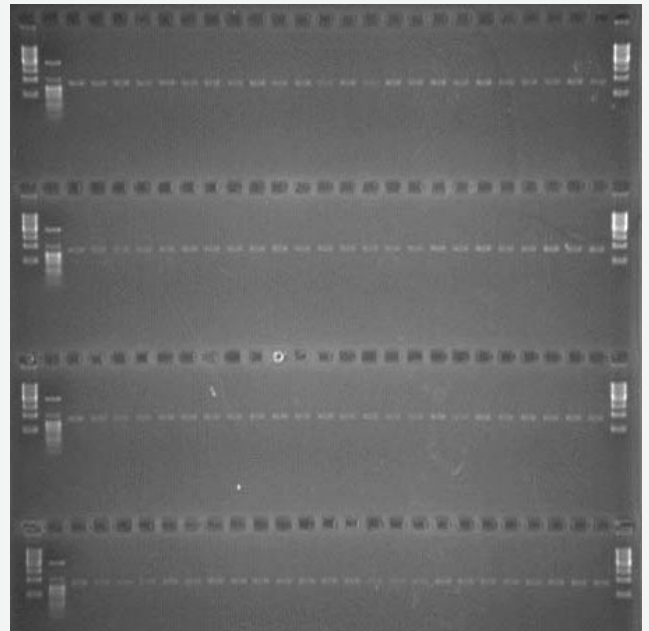


그림 1 T1000로 추출 정제한 plasmid DNA의 전기영동사진
MW marker: 1 kb DNA ladder 및 pHY marker

정제 plasmid DNA의 OD₂₆₀의 측정치를 그림 5(빨간 plot)에 나타내었다. 또한 타사 manual kit를 이용한 결과와 비교하여 같은 양의 같은 대장균 샘플에서 추출 정제한 plasmid의 OD₂₆₀의 측정치를 그림 5(파란 Plot)에 나타내었다. T1000을 이용하여 타사의 manual kit보다 높은 수율로 재현성이 좋은 plasmid를 얻어낼 수 있었다.

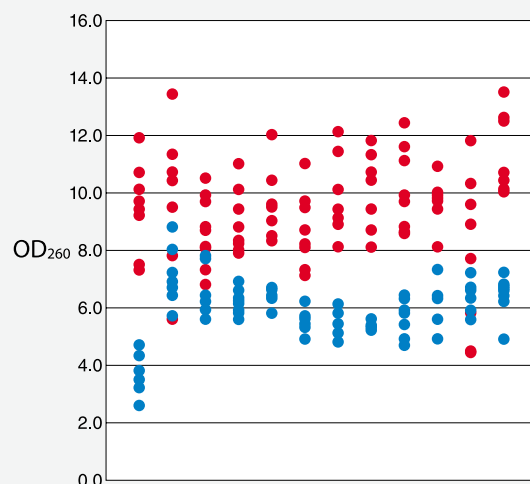


그림 5 T1000 및 타사 manual kit로 추출 정제한 plasmid DNA의 OD₂₆₀의 측정치
빨간 plot : T1000을 사용한 경우. 파란 plot : 타사 manual kit를 사용한 경우. 각 샘플의 well에서의 OD₂₆₀치를 나타낸다.

T1000을 사용하여 얻은 plasmid DNA의 염기서열해석 결과를 그림 6에 나타내었다. Sequence primer를 사용하고, sequencer는 MegaBASE 1000 및 ABI PRISM3700을 사용했다. 그림과 같이 매우 깨끗한 sequencing chart를 볼 수 있어, T1000에서 추출 정제한 plasmid DNA는 고순도임을 알 수 있었다.

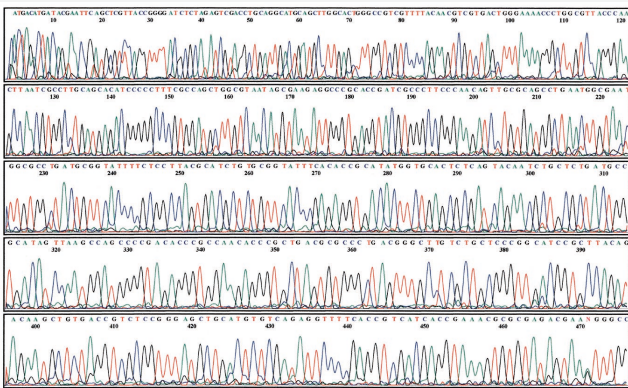
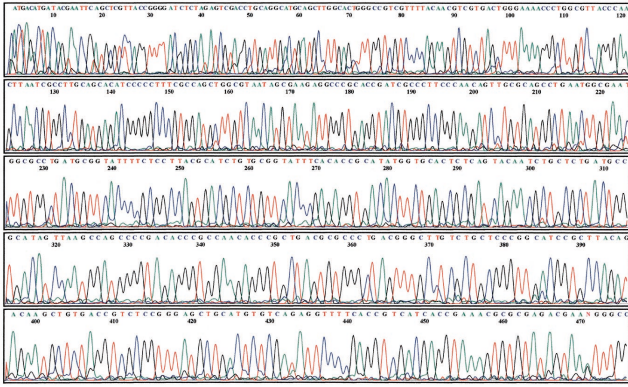


그림 6 T1000에서 추출 정제한 plasmid DNA sequencing chart (A) : MegaBASE 1000사용, (B) : ABI PRISM 3700 사용

4. 사용례 (2) : T1000으로 추출 정제한 plasmid DNA를 이용한 DNA chip의 제작

T1000은 높은 수율로 plasmid를 추출 정제하므로 얻은 plasmid를 그대로 spotting하여 DNA chip을 제작할 수 있다. Rat의 간장 mRNA 유래의 cDNA library에서 168개의 clone을 배양하여, T1000을 사용해 plasmid DNA를 추출 정제하고 알칼리 변성을 한 후에 Affymetrix® 417™ Arrayer 을 이용해서 spotting하여 DNA chip을 제작했다. β-naftofrabor을 투여한 rat와 투여하지 않은 rat 각각의 간장유래 mRNA를 Cy3™과 Cy5™에서 형광 표식한 것을 probe로 이용해서 chip 위에서 경합 hybridization 후에 Affymetrix® 428™ Array Scanner를 이용해서 각각의 형광을 scanning하였다. 각 파장에서 scanning 화상을 빨간 색과 녹색으로 색깔을 달리해서 합쳐놓은 것을 그림 7에 나타내었다. 이렇게 T1000에서 추출 정제한 plasmid DNA는 DNA chip 제작에도 사용할 수 있다.

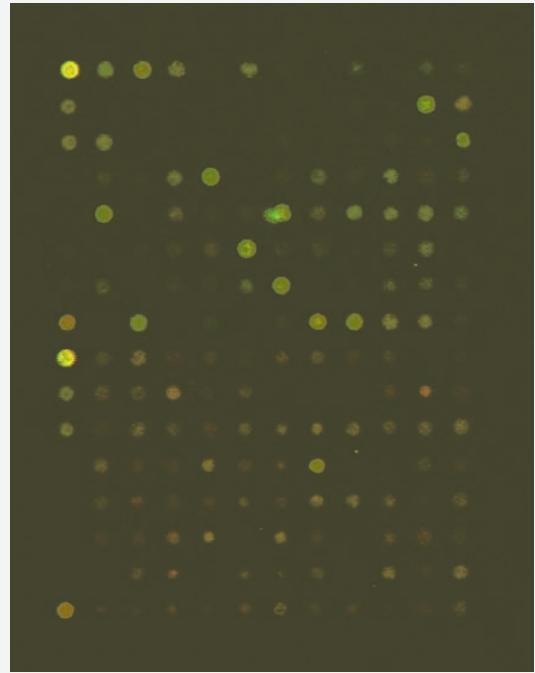


그림 7 T1000으로 추출 정제한 plasmid DNA를 spotting해서 제작한 DNA chip의 예
β-naftofrabor을 투여한 Rat의 간장유래 mRNA(Cy3™ 표식:녹색)과 투여하지 않은 간장유래의 mRNA(Cy5™ 표식:적색)를 Probe로 사용.

【관련제품】

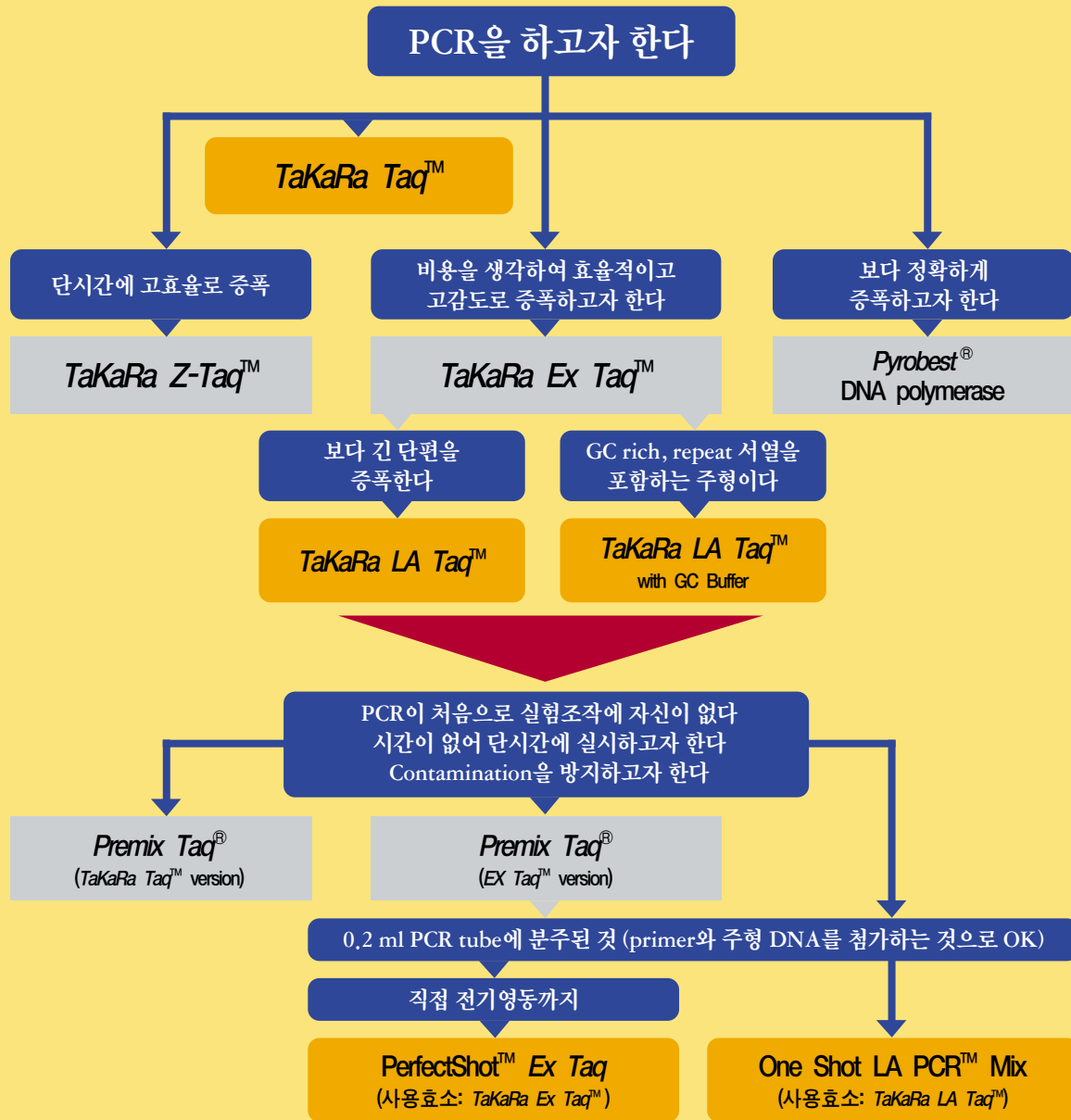
T1000 Reagent Kit

TaKaRa Code TL110 96샘플 X 2회분

【내용】

· Lysis buffer (Reagent A)	125 ml
· Wash butter (Reagent B)	125 ml × 2병
· Neutralisation butter (Reagent C)	125 ml
· Resuspention/Elution butter (Reagent D)	250 ml
· Binding solution	60 ml
· Magnetic particles	8 ml
· RNase A	0.5 ml
· Bioblock	4매
· Microtiter elution plate	2매
· Dual trough	2매
· Plate sealing membranes	2매
· Columns	96 × 2 (2 rack)
· Filter tips	96 × 2 (2 rack)

TaKaRa PCR Enzymes 선택 가이드



사용구분의 기준

증폭길이	TaKaRa Taq™ Pyrobest™ DNA Polymerase	<	TaKaRa Ex Taq™ TaKaRa Z-Taq™	<	TaKaRa LA Taq™
λ DNA					
양호하게 증폭	~6 kbp 정도		~20 kbp 정도		~35 kbp 정도
증폭가능 길이	~12 kbp 정도		~30 kbp 정도		~48 kbp 정도
human genomic DNA					
양호하게 증폭	~2 kbp 정도		~10 kbp 정도		~20 kbp 정도
증폭가능 길이	~4 kbp 정도		~20 kbp 정도		~30 kbp 정도
정확도(fidelity)	TaKaRa Taq™ < TaKaRa Ex Taq™ < TaKaRa Z-Taq™ < TaKaRa LA Taq™ < Pyrobest™ DNA Polymerase				
증폭효율	TaKaRa Taq™ ≙ Pyrobest™ DNA Polymerase < TaKaRa LA Taq™ ≙ TaKaRa Ex Taq™ ≙ TaKaRa Z-Taq™				
반응속도	TaKaRa Z-Taq™이 TaKaRa Taq™ 보다 5배 더 빠르다				

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어질수록 필요한 주형 DNA의 양이 많아지고 또 PCR 조건도 엄밀해진다.



TakaRa가 월드컵 16강 진출을 기원하며 총 150분께 Taq을 무작정 쏘겠습니다.

각 경기마다 한국팀이 1골 이상 넣으면



선착순 50분께 Taq(50unit)을 드립니다.

한국팀 경기일자	이벤트 응모일
6월 4일(화) 한국 : 폴란드	6 / 5
6월 10일(월) 한국 : 미국	6 / 11
6월 14일(금) 한국 : 포르투갈	6 / 17

2002 월드컵 16강 기원 이벤트 응모는
다카라 홈페이지(<http://www.takara.co.kr>)에서하실 수 있습니다.

