

{Q&A}

Q_1...

Competitive DNA Construction Kit (TaKaRa Code RR017)을 사용하여 competitive PCR을 수행할때, 어떤 서열의 primer를 사용하는 것이 좋은가?

A_1...

본 제품에서 competitor를 제작할 때 우선 목적 유전자의 size에 대응하는 competitor의 size를 결정한다. Competitor의 size가 정해지면 서열이 결정되기 때문에 목적 유전자 서열 내부에 competitor 서열이 되도록 primer를 합성한다.

Q_2...

Competitive DNA Construction Kit로 제작한 competitor는 몇 회 사용 할 수 있나?

A_2...

PCR법을 이용하기 때문에 1회 반응시 약 $10^{13} \sim 10^{14}$ copy의 competitor를 제작할 수 있다. 정량을 수행할 때는 보통 $10^7 \sim 10^9$ copy를 사용하기 때문에 최소 10,000회 사용 가능하다.

Q_3...

RNA를 정량할 경우, competitive PCR 관련제품의 어떤 kit를 사용하면 좋은지?

A_3...

RNA를 정량하는 경우에는 RNA competitor를 이용한 competitive PCR을 권장한다. DNA Construction Kit를 사용해 목적 cDNA에 반응하는 DNA competitor를 제작하고, 이것을 주형으로 하여 Competitive RNA Transcription Kit (TaKaRa Code 6125)로 RNA competitor를 제작한다. 또 DNA competitor 제작시 sense primer의 5' 쪽에 SP6 promoter 서열이 반드시 필요하다.

Q_4...

몇 개의 human 유래 시료간의 mRNA의 발현량을 비교할 경우 competitive PCR 관련제품을 어떻게 사용하는 것이 좋은가?

A_4...

여러가지 방법이 있지만 다음과 같은 방법을 권장한다. 먼저, human β -actin Competitive PCR Set (TaKaRa Code 6607)에 시료간의 β -actin mRNA를 정량하고 그 결과를 기본으로 하여 시료량을 보정한다. 그 후 Competitive DNA Construction Kit와 RNA Transcription Kit를 이용하여 목적 mRNA의 competitor를 제작하고 이것을 사용하여 competitive RT-PCR을 수행한다. 그 결과에서 발현량을 비교할 것을 권장한다.

Q_5...

5' Full RACE Core Set (TaKaRa Code 6122)에서 증폭하는 DNA의 최적 길이는?

A_5..

1 kbp 이하의 길이가 가장 적당하다.

Q_6...

DNase I의 표준적인 반응조건은?

A_6..

반응액의 조성은 50 mM Tris-HCl (pH 7~8), 10 mM $MgCl_2$ 를 권장한다. DNA 약 1 μ g에 대하여 DNase I을 1~5 U 첨가하고 37°C에서 10~15분간 반응한다. Phenol 추출을 수행한 후 앞의 반응을 진행할 것을 권장한다.

Q_7...

적리균 및 장관침입성대장균 검출용 primer에는 2 종류 (INV, IPA)가 있는데, 그 차이는 무엇인가?

A_7..

ipaH 유전자는 genome 또는 plasmid에 존재한다고 알려져 있다. 대부분의 적리균주는 이 유전자에 대해 양성이나, 그 기능은 알 수 없다. *invE* 유전자는 plasmid에 있는 침입성 유전자이기 때문에 소실되면 검출이 안되는 경우가 있다. *ipaH* 유전자 양성 균주의 약 50%가 *invE* 유전자의 양성 균주라고 알려져 있다.