

분자 생물학 실험

Part 1

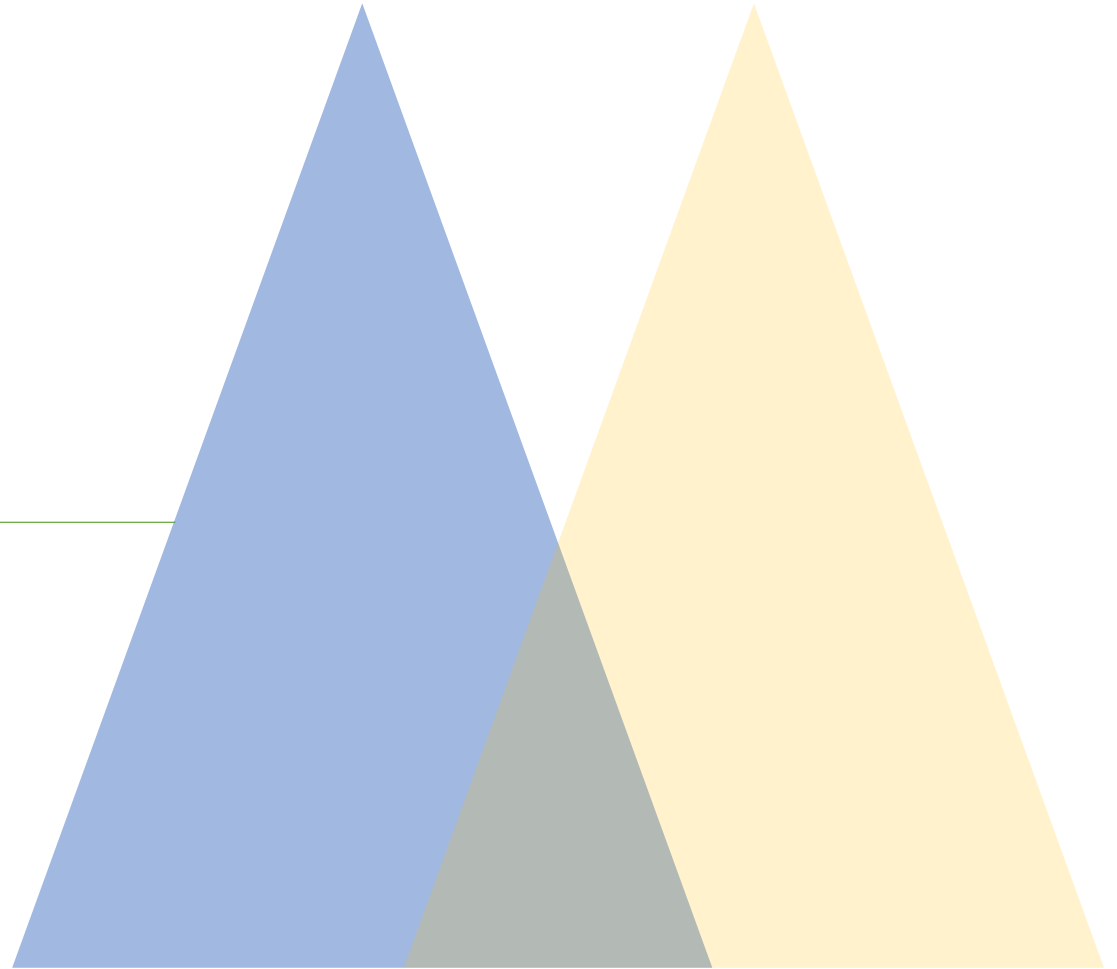
- Recombinant DNA technology -

분자생물학 실험

1. Competent cell 제조 & transformation (Day 1) 9/7
2. Plasmid miniprep (pEGFP-C1 & pET-21a) & RE digestion & competent cell yield 측정 (Day 2) 9/8
3. Insert prep (EGFP) & plasmid & RE digestion (Day 3) 9/9
4. Band elution & DNA ligation (Day 4) 9/10
5. Transformation into DH5 α (Day 5) 9/11
6. Conformation of cloned plasmid by restriction enzyme digestion
& Transformation into BL21 (Day 6) 9/14
7. Preparation of reagent and buffers (Day 7) 9/15
8. Induction & RNA isolation from cells (Day 8) 9/16
9. Reverse transcription reaction (Day 9) 9/17
10. Measurement of gene expression by qPCR (Day 10) 9/18

Day1

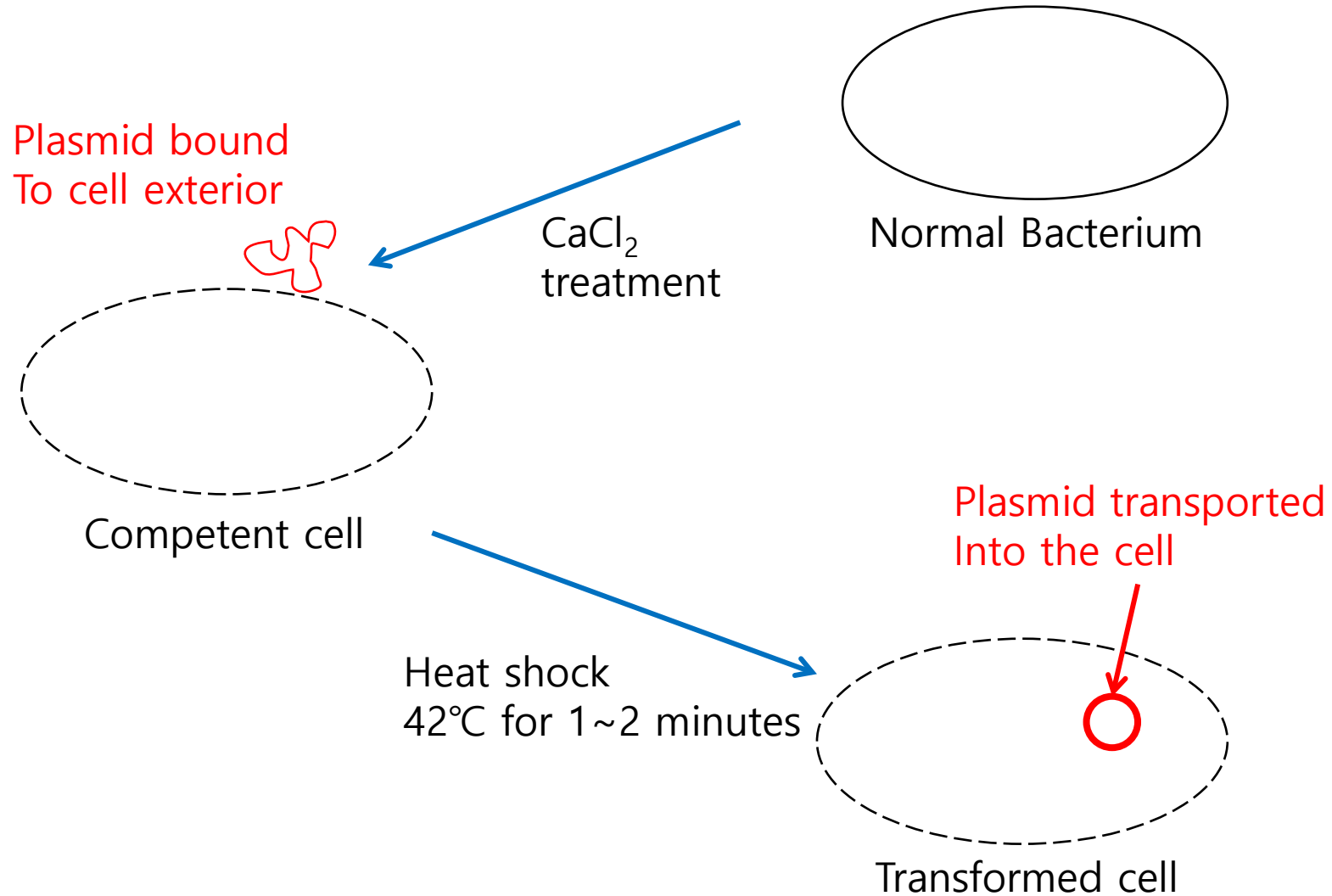
- Competent cell 제조
- Transformation



Competent Cell (Comp. Cell)

- 정상적인 bacteria cell에 이러한 **물리적, 화학적** 처리를 하여 외부의 DNA가 잘 들어갈 수 있도록 만든 cell을 competent cell이라고 함
- E.coli를 포함한 대부분의 박테리아는 일반적인 환경에서 극히 제한된 양의 DNA만을 받아들임
- 효과적으로 transformation 하기 위하여 박테리아는 DNA를 받아 들이는 능력을 향상시키는 물리적, 화학적 형태의 처리가 필요로 함

Com. Cell 제조 과정



Day 1. Competent cell 제조 & transformation

1. Competent cell 제조

- DH5 α
- LB
- Inoue transformation buffer
(MnCl₂, CaCl₂, KCl, PIPES(0.5M pH 6.7), H₂O)
- DMSO

2. Transformation

- competent cell
- Plasmid DNA (pEGFP-C1 & pET-21a)
- Antibiotics (Kanamycin & Ampicillin)
- LB plate
- LB broth

Day 1. Competent cell 제조 & transformation

* Competent cell 제조

1. Antibiotics 없는 LB plate에 DH5 α streaking 후 37°C incubation, 18hr
2. Inoculation (4ml LB broth에 single colony을 pick하여 넣어준 후 37°C shaking incubation, overnight)
3. Inoculation (125ml LB에 전날 inoculation 한 LB broth 중 1ml을 넣어준 후 37°C shaking incubation, overnight)
4. 10min ice incubation
5. Centrifugation (2,500g, 10min, 4°C)
6. Supernatant 제거 후 paper tower 위에 뒤집어서 2min incubation
7. Inoue transformation buffer(ice-cold incubation 된) 40ml을 넣고 resuspension
8. Centrifugation (2,500g, 10min, 4°C)
9. Supernatant 제거 (6번 과정과 동일)
10. Inoue transformation buffer(ice-cold incubation 된) 10ml 넣고 resuspension
11. DMSO 750 μ l를 넣고 mix 후 10min ice incubation
12. 50 μ l씩 EP tube에 옮긴 후 액체 질소에 넣는다. (Working quickly)
13. -70°C 보관

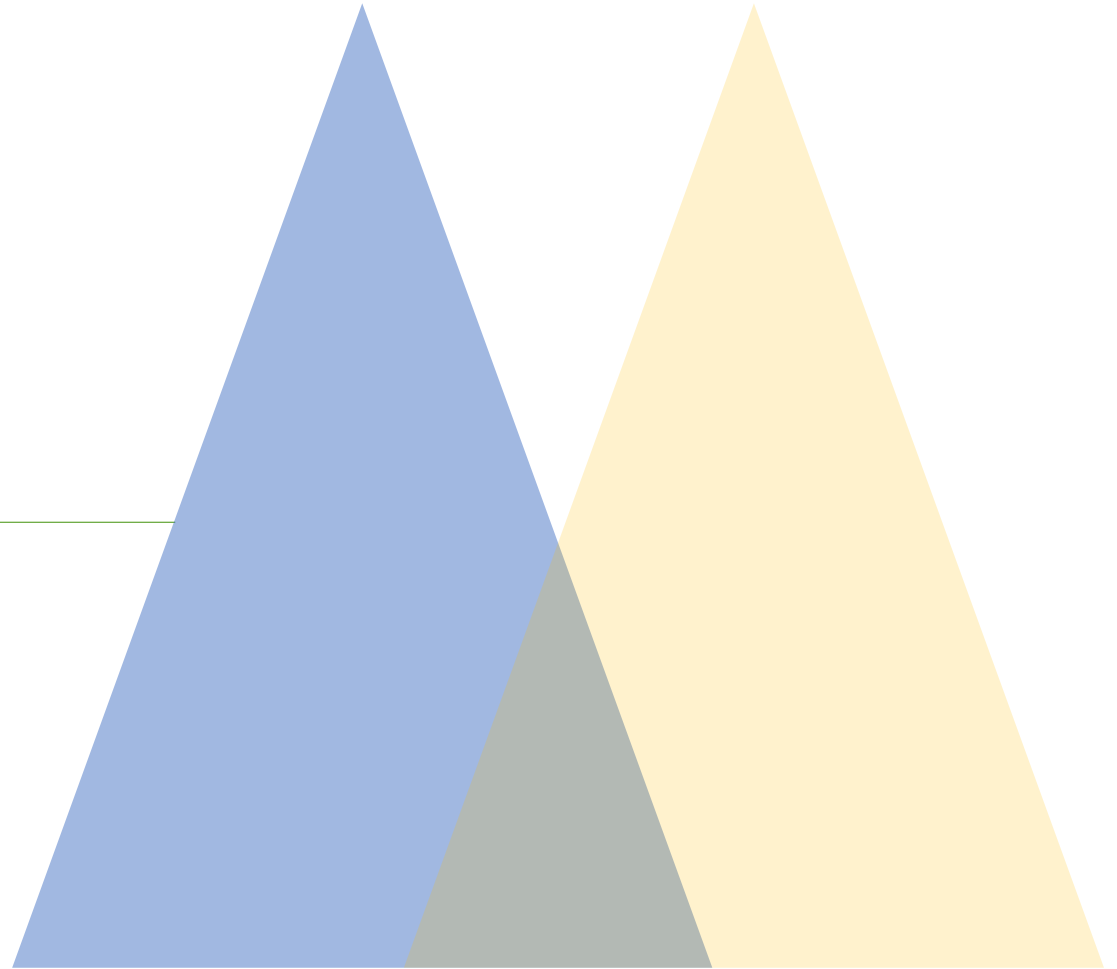
Day 1. Competent cell 제조 & transformation

* Transformation

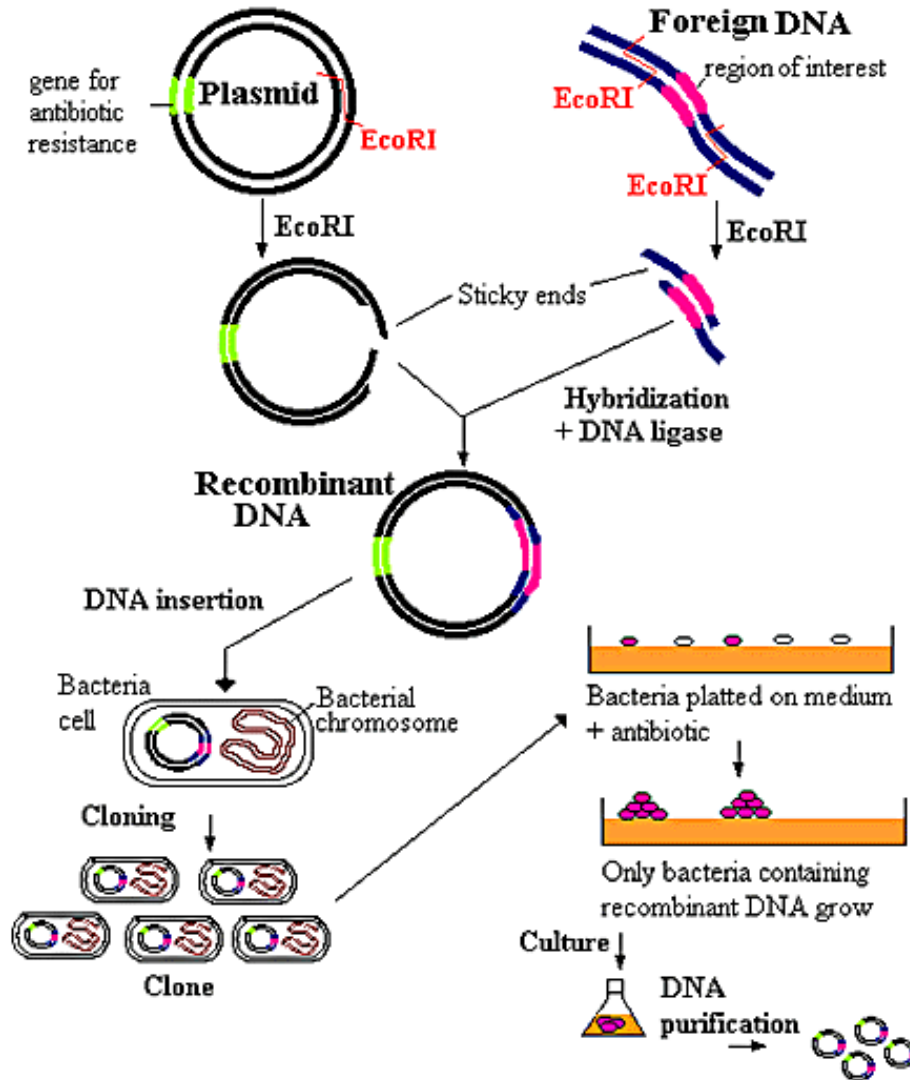
1. Competent cell(DH5a)에 plasmid DNA $5\mu\ell$ 넣고 tapping
2. Ice에 10min incubation
3. Heat shock(42°C), 40sec incubation 후 Ice에 1min incubation
4. 액체 LB 1ml 넣고 37°C 1h incubation (recovery stage)
5. Recovery 이후 $100\mu\ell$ 를 따서 고체 LB plate에 spreading
6. Plate를 뒤집어서 37°C incubation, 18h
7. 9/5 colony confirmation

Day2

- Plasmid miniprep (pEGFP-C1 & pET-21a)
- RE digestion
- competent cell yield 측정



Recombinant DNA technology : *Overview*

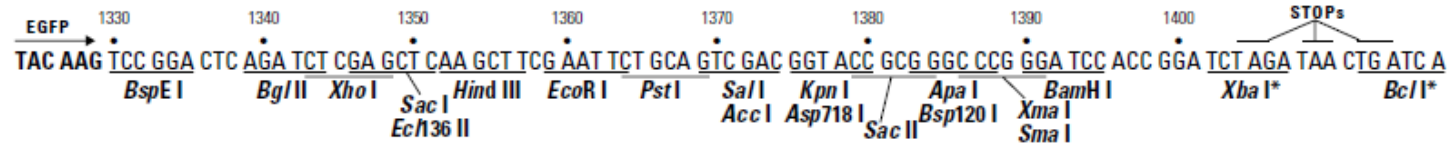
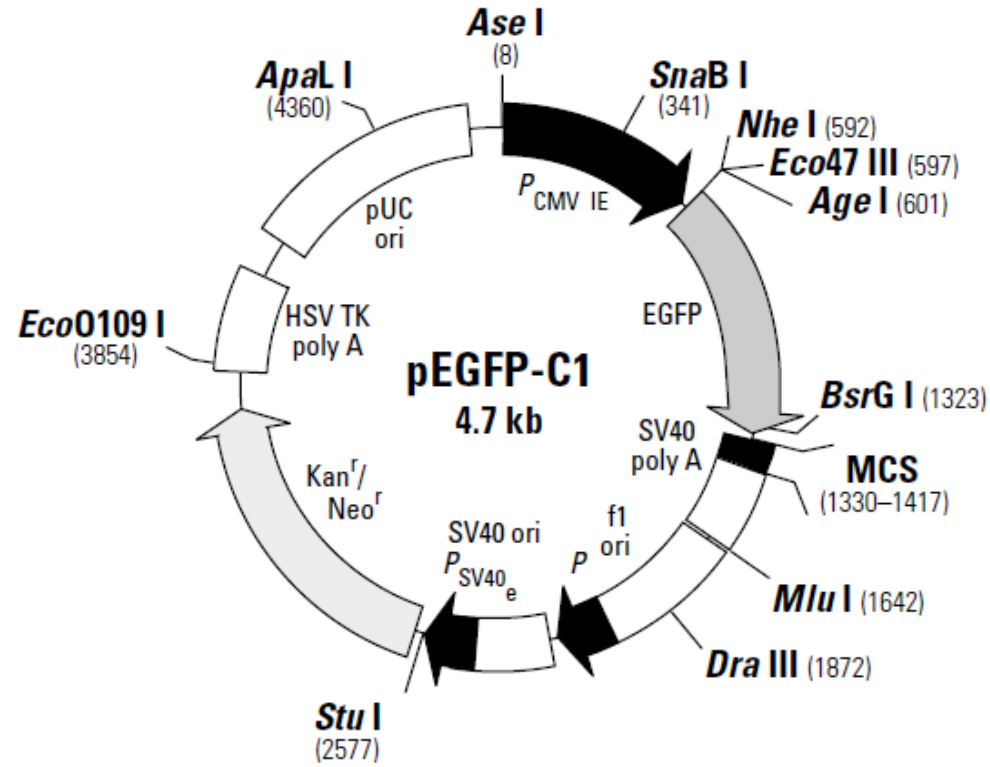


1. Insert preparation
(gene of interest)
2. Plasmid isolation
3. Plasmid/insert digestion
4. Ligation
5. Transformation
(transduction, conjugation)
6. Transformant isolation

Cloning into a plasmid

GenBank Accession #: U55763

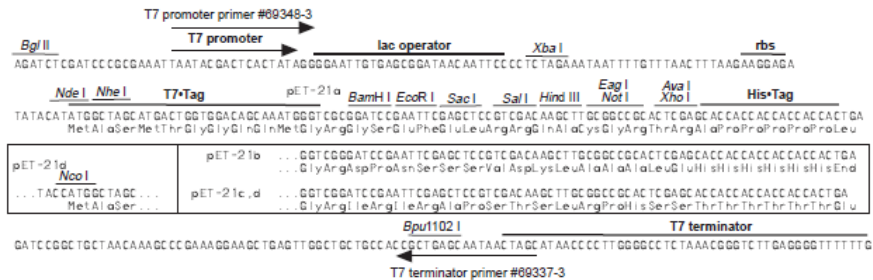
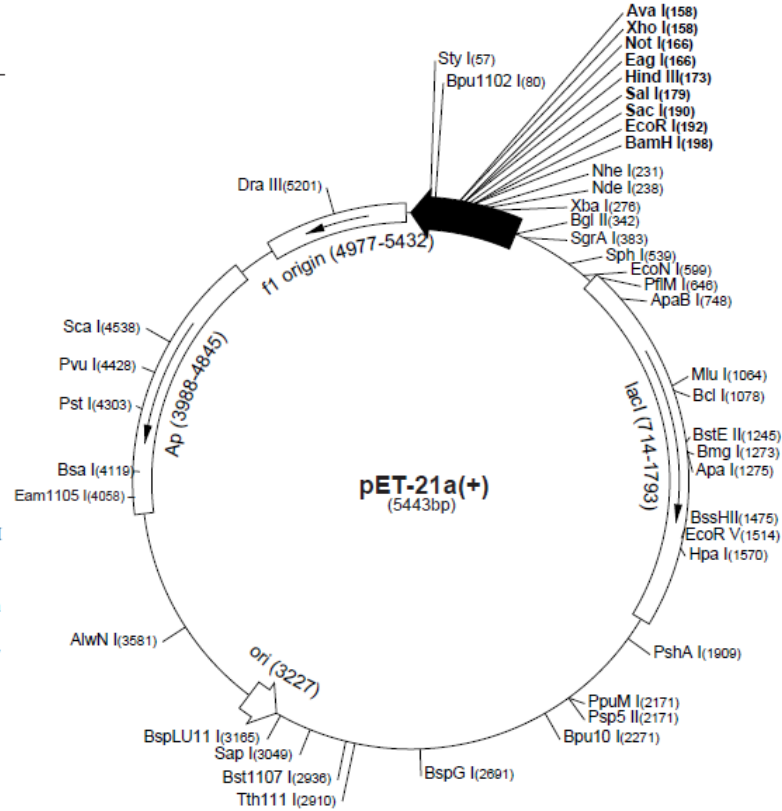
Catalog #6084-1



pET-21a(+) sequence landmarks

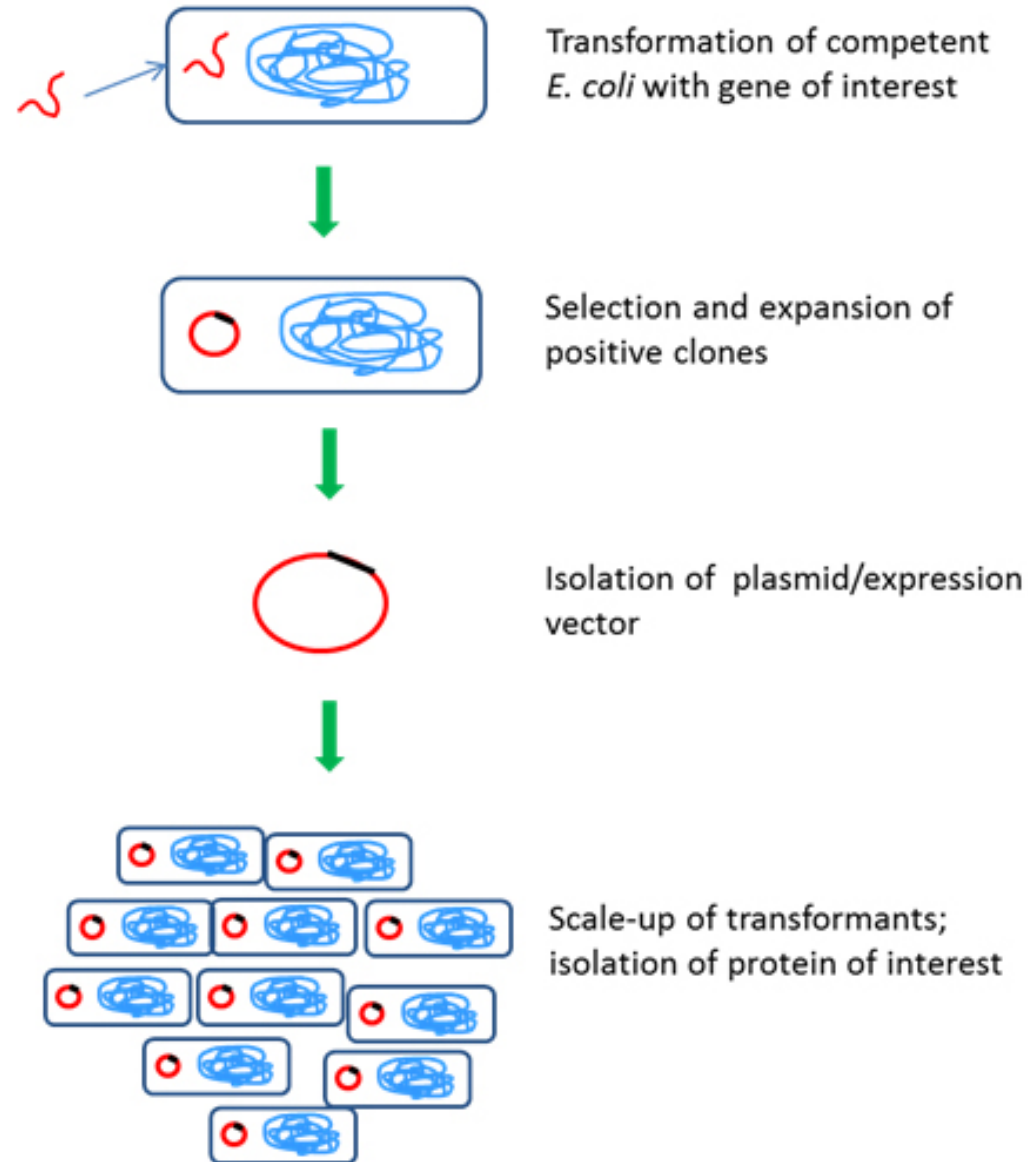
T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7*Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
<i>bla</i> coding sequence	3988-4845
f1 origin	4977-5432

The maps for pET-21b(+), pET-21c(+) and pET-21d(+) are the same as pET-21a(+) (shown) with the following exceptions:
 pET-21b(+) is a 5442bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198.
 pET-21c(+) is a 5441bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.
 pET-21d(+) is a 5440bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-21c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-21c(+). As a result, *Nco* I cuts pET21d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-21a(+).
Nde I does not cut pET-21d(+). Note also that *Sty*I is not unique in pET-21d(+).



pET-21a-d(+) cloning/expression region

Day 2. Competent cell yield 측정 (Calculate Transformation Efficiency)



Day 2. Competent cell yield 측정 (Calculate Transformation Efficiency)

1. Required information

- Number of CFU
- Volume of bacterial culture plated
- Fraction of overall final transformation volume (i.e. dilution)
- Mass of the DNA used in the transformation

Example: 50 ng of plasmid DNA is transformed into a final transformation volume of 500 μl , and 10 μl of this volume is spread onto a plate. Assume 60 CFU are observed on the plate.

1. Count colonies to determine CFU CFU = 60

2. Determine amount of plasmid DNA (in μg) spread on the plate.

3. Divide the number of colonies on the plate (in CFU) by the amount of DNA (in μg) spread on the plate.

$$\begin{aligned} \text{DNA spread on the plate} &= \frac{\text{Volume spread } (\mu\text{l}) \times \text{DNA transformation } (\mu\text{g})}{\text{Total volume of transformation } (\mu\text{l})} \\ &= \frac{10 \mu\text{l} \times 0.05 \mu\text{g}}{500 \mu\text{l}} = 0.001 \mu\text{l} \\ \frac{60 \text{ CFU}}{0.001 \mu\text{g}} &= 60 \times 10^4 \text{ CFU}/\mu\text{g} \end{aligned}$$

Day 2. mini prep & RE digestion

1. Miniprep

- Miniprep은 DNA를 소량 추출한다는 뜻으로, plasmid DNA 추출이 그 목적이다. Competent의 membrane을 깨고 chromosomal DNA와 plasmid DNA를 구분하여 분리 한다. Chromosomal DNA는 plasmid DNA에 비해 size가 크기 때문에 이러한 성질을 이용하여 분리할 수 있다.

2. Boiling method

- Plasmid를 지닌 bacteria는 lysozyme, Triton, 열처리 등으로 깨어질 수 있는데, chromosomal DNA는 세포막에 결합된 상태로 남아있게 되고 원심분리로서 침전 시켜 모을 수 있으며 plasmid DNA는 상등액에서 isopropanol로 침전 시켜 분리 할 수 있음.

- Boiling miniprep은 적은 양의 plasmid를 분리할 때 쓰이는 방법이지만 분리된 plasmid DNA는 Alkaline lysis miniprep보다 quality가 떨어짐.

3. Alkaline lysis method

- 가장 일반적으로 쓰이는 분리 방법

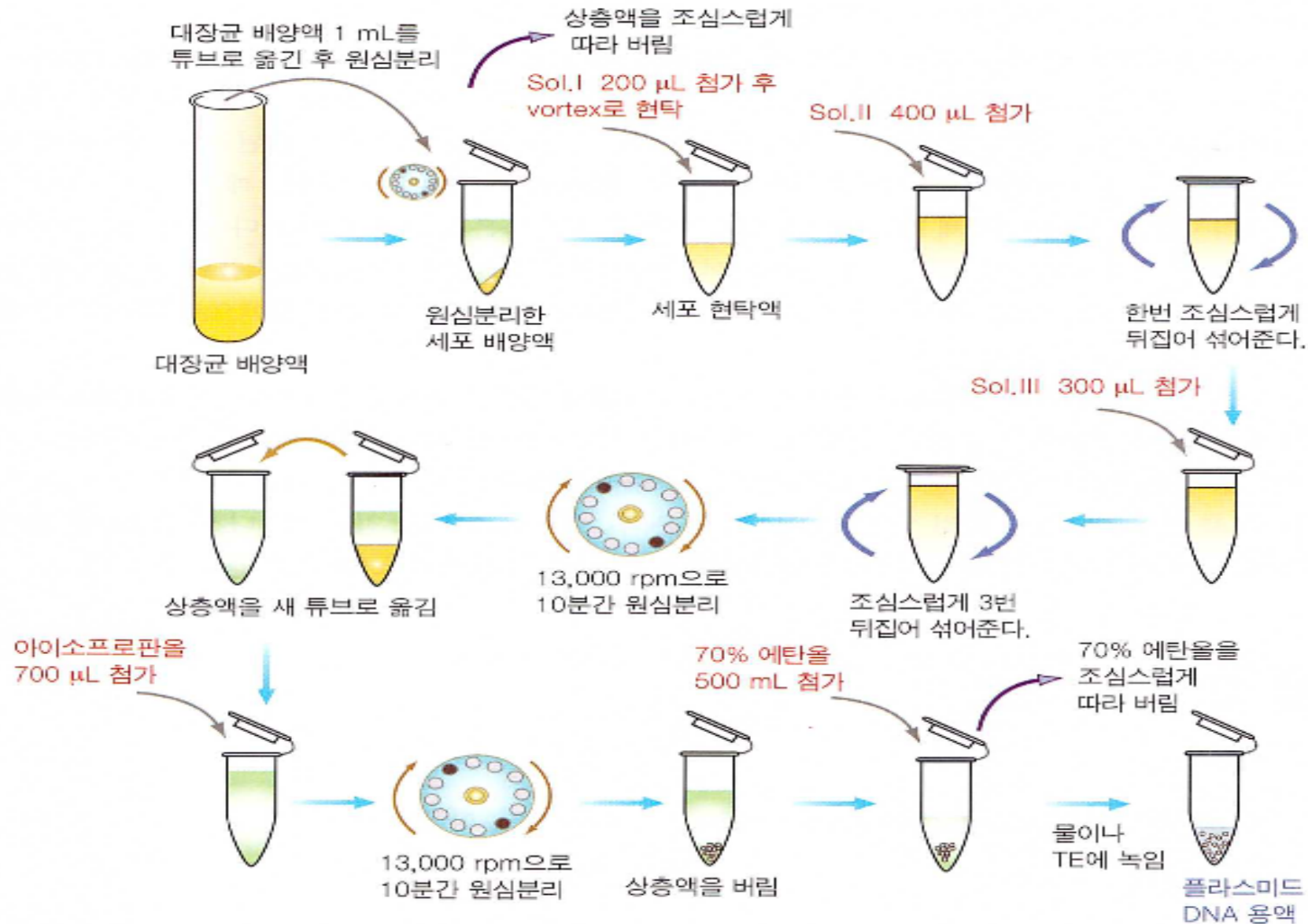
- Plasmid DNA는 Plasmid을 지니고 있는 bacteria에서 적은 양의 배양으로 분리될 수 있는데, Bacteria는 sodium dodecyl sulfate (SDS), NaOH를 함유하는 용액으로 처리하여 용균 되어 진다.

- Potassium acetate를 첨가하여 혼합액을 중성화 시키는데 이것을 covalently closed plasmid DNA를 빠르게 reanneal 시킨다.

- Chromosomal DNA와 bacterial proteins의 대부분은 침전되며 침전물은 원심분리로서 제거할 수 있다.

- Plasmid DNA는 상등액에 남아있게 되고 ethanol precipitation으로 집중시킬 수가 있다.

Day 2. mini prep & RE digestion



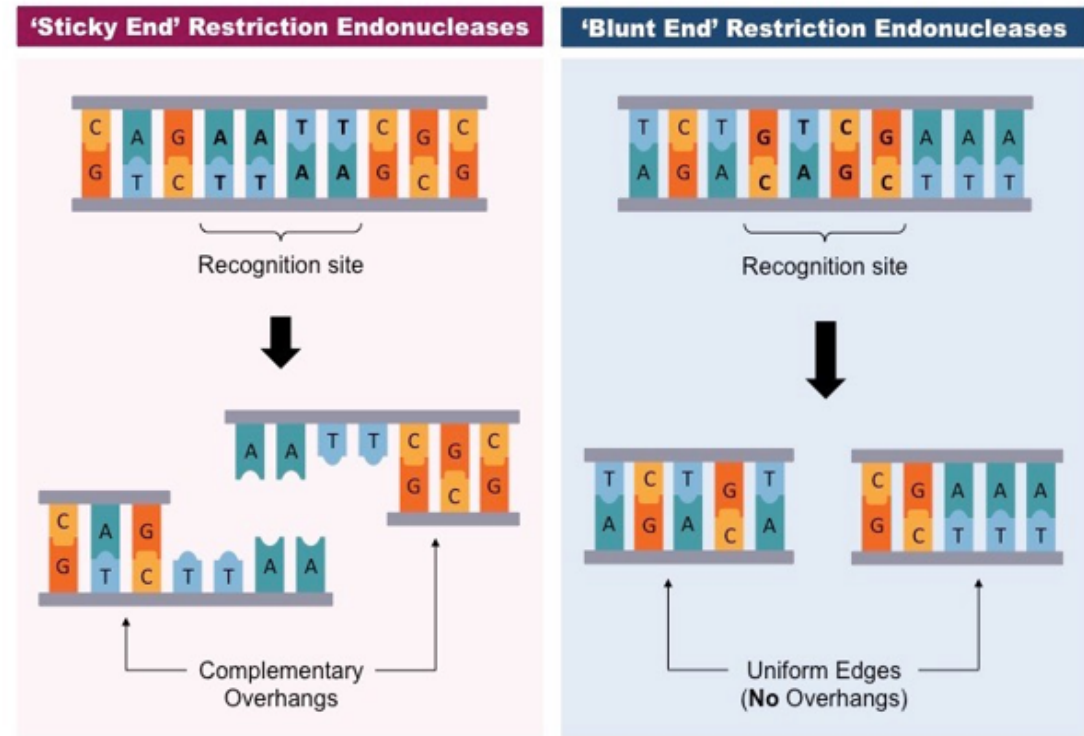
Day 2. mini prep & RE digestion

Restriction Enzymes

Three types of Restriction Endonucleases

Type II enzymes

- They recognize a specific nucleotide sequence but differ from the type I enzymes in that they do not require cofactors and **they cleave specifically within or close to the recognition sequence**, thus generating a specific set of fragments.
- Recognition site: Palindromic sequence.
ex) *EcoRI* :5'-GAATTC-3'
- It is this exquisite specificity which has made these enzymes of great importance in DNA research, especially in the production of recombinant DNAs.
→ **Molecular cloning become feasible.**



Day 2. mini prep & RE digestion

1. Mini prep

- *E. coli* (pEGFP-C1, pET-21a)
- Sol I, SolII, SolIII, Wash buffer, DW
- Spin column, collection tube, EP tube
- Centrifuge

2. RE digestion & gel electrophoresis

- plasmid DNA(pEGFP-C1, pET-21a)
- RE enzyme (Nde I, Xho I)
- Heat block
- 0.8% agarose gel

Day 2. Plasmid DNA prep & Confirmation of plasmid by RE digestion

(inoculation까지 조교 준비)

1. Single colony를 따서 LB broth 4ml에 inoculation (37°C shaking incubation, 14hr)
2. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
3. Supernatant 제거 후 S1 buffer 250ul 넣고 vortexing
4. S2 buffer 250ul 넣은 후 inverting
5. G3 buffer 350ul 넣은 후 inverting
6. Centrifugation (12,000rpm, 10min, room temperature)
7. Supernatant 800ul을 Spin column에 옮긴 후
Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
8. Collection tube에 있는 Sup 제거 후 PW buffer 750ul 넣고
Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
9. Collection tube에 있는 Sup 제거 후
추가 Centrifugation (12,000rpm , 3min, room temperature)
10. Spin column만 새 EP tube에 옮긴 후 DW 50ul 넣고 5min incubation
11. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
12. Nano drop

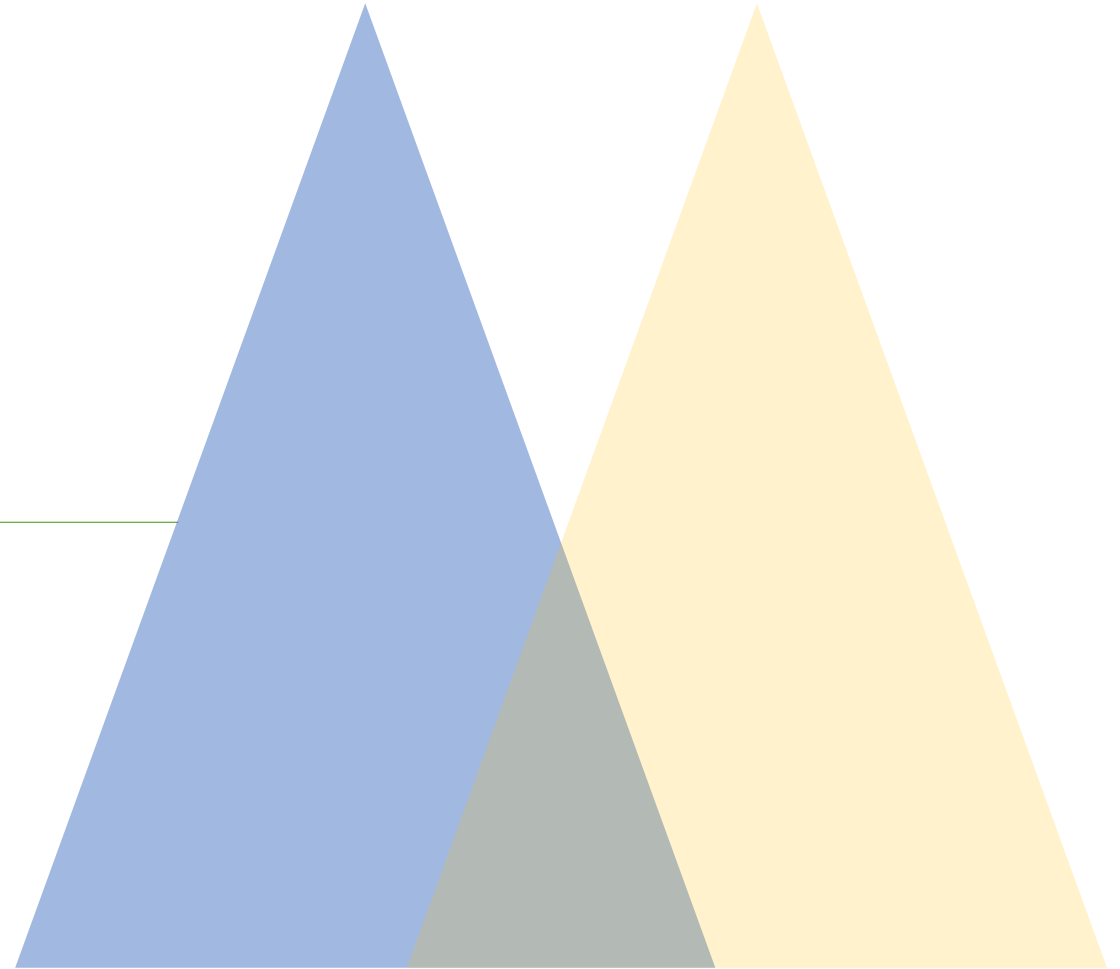
Day 2. RE digestion & gel electrophoresis

1. Enzyme digestion mixture 제조
2. 37°C incubation, 30min
3. 6x loading dye 섞은 후 gel에 loading
4. Gel electrophoresis (100V, 40min)

	pEGFP-C1	pET-21a
DNA	5 μ l	5 μ l
10x buffer	1.5 μ l	1.5 μ l
Nhe I	0.5 μ l	
Xho I	0.5 μ l	
Nde I		0.5 μ l
EcoRV		0.5 μ l
DW	7.5 μ l	7.5 μ l
total	15 μ l	15 μ l

Day3

- Insert prep (EGFP)
- Plasmid
- RE digestion



Day3. Plasmid DNA

Plasmid 란?

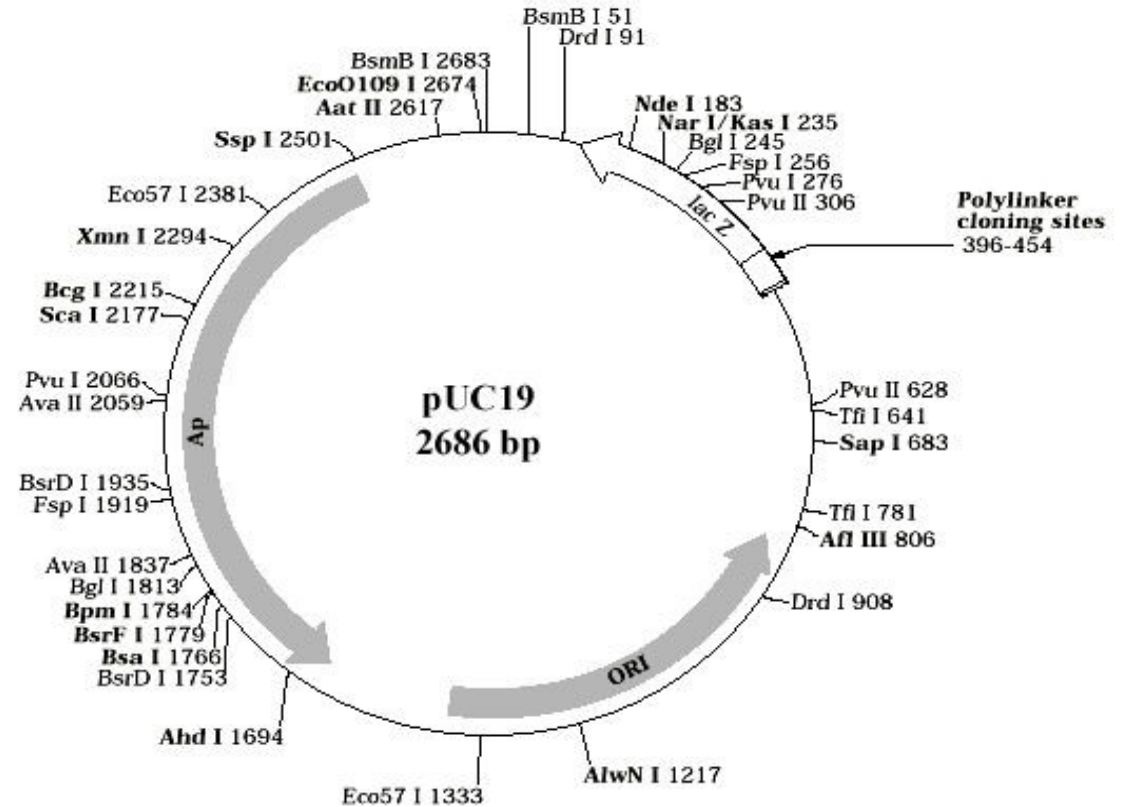
- 플라스미드(Plasmid)는 세균의 세포내에 복제되어 독자적으로 증식할 수 있는 염색체 이외의 DNA 분자를 일컫음.
- Plasmid는 세균의 생존에 필수적이지는 않으며, 다른 종의 세포 내에도 전달될 수 있음.
 - 위 성질을 이용하여 세균 내 플라스미드를 세포 밖으로 빼내고 제한효소로 자른 뒤 필요로 하는 유전자를 삽입하여 이를 사디 세균에 넣어 배양하는 유전자 재조합 기술을 사용함.



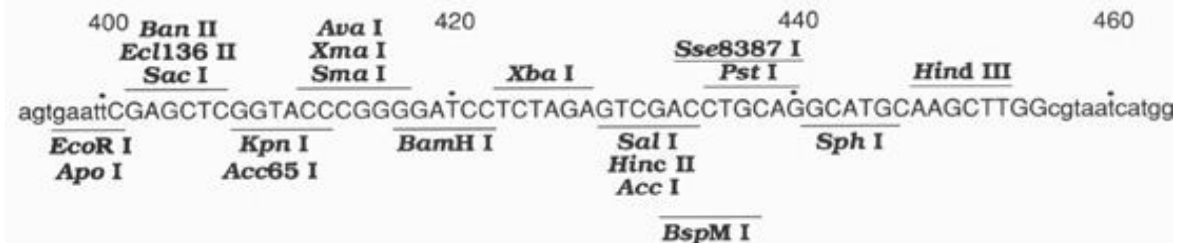
Day3. Plasmid DNA

Plasmid Vector의 특징

1. Origin of replication (ori)
2. Multiple Cloning Sites (MCS)
3. Circular form DNA
4. Antibiotic resistance
5. Restriction enzyme site



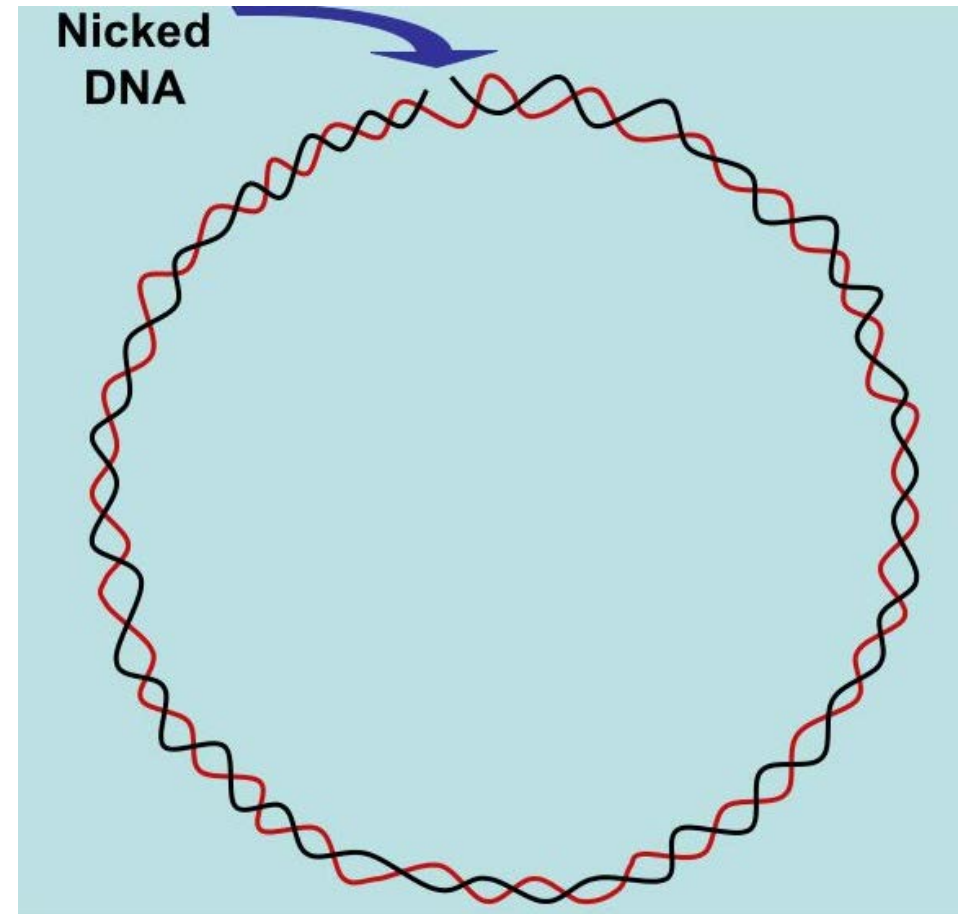
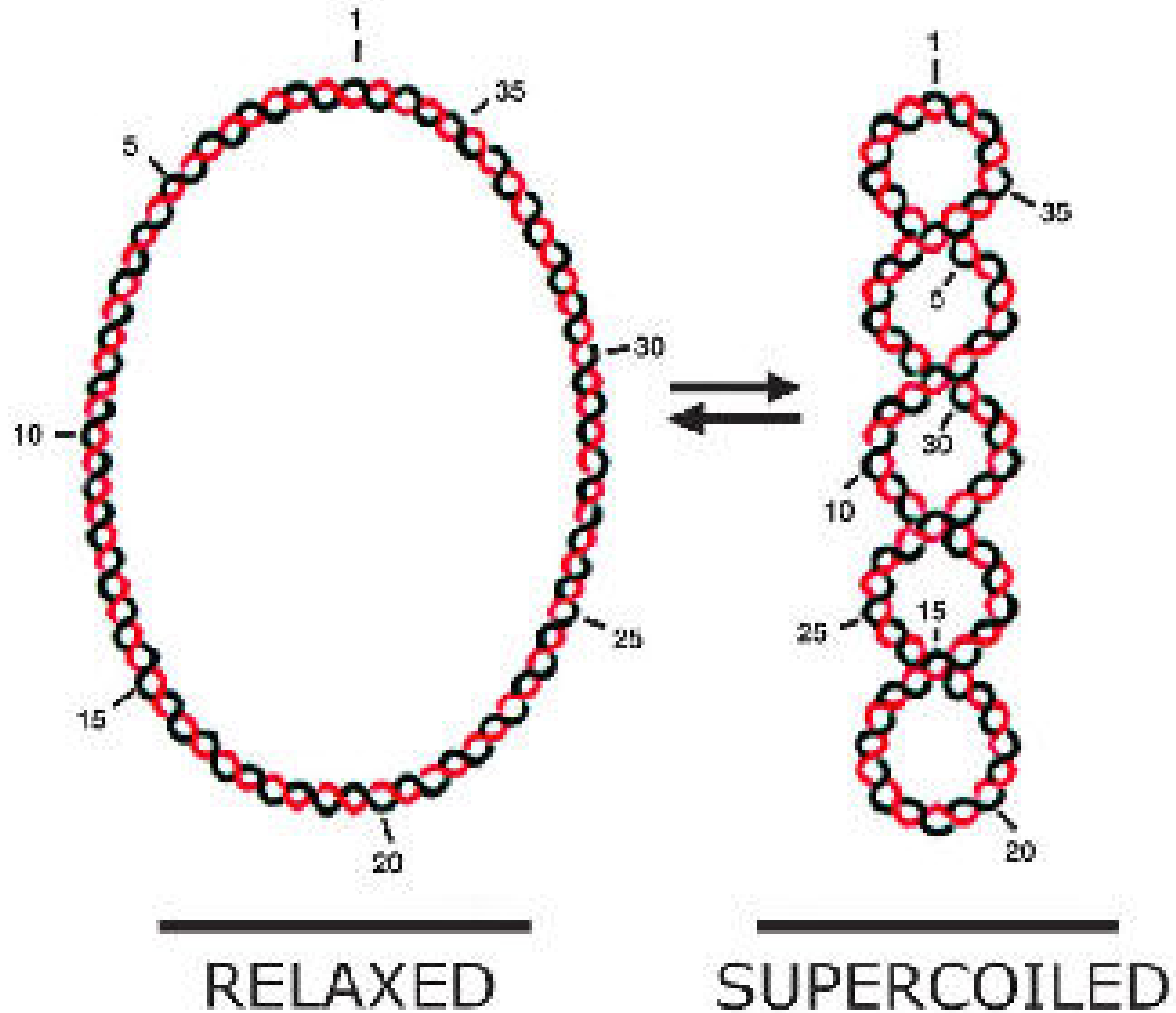
polylinker region



Day3. Plasmid DNA

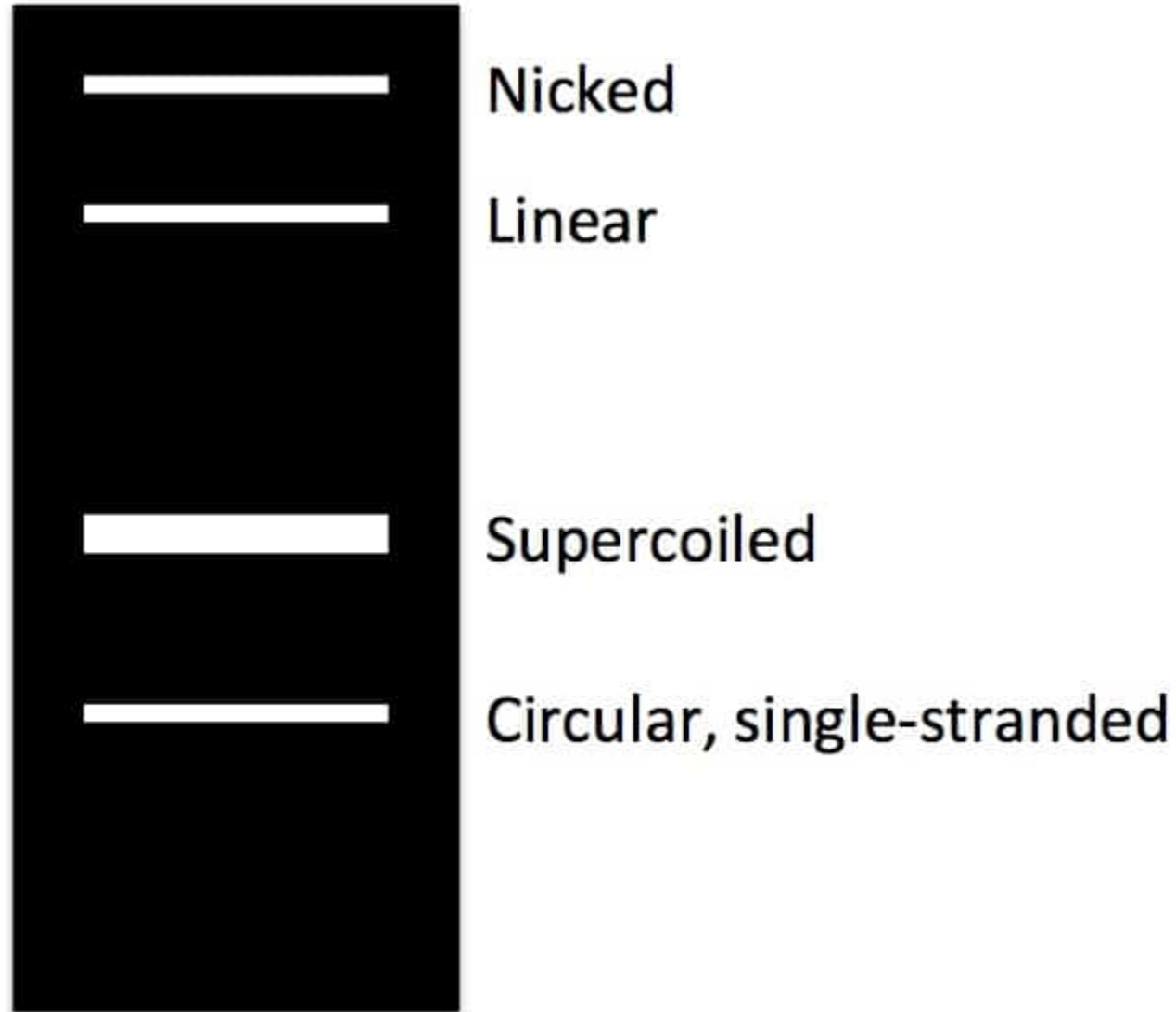
Plasmid Vector의 특징

PLASMID SUPERCOILING



Day3. Plasmid DNA

Plasmid Vector의 size 비교



Day3. PCR amplification of gene of interest

<PCR primer design for GFP cds amplification from pEGFP-C1>

※ GFP cloning plan (pEGFP-C1 → pET21-a)

5' - CAT ATG GTG AGC AAG GGC GAG-----ATG GAC GAG CTG TAC AAG TGA CTC GAG -3'
3' -CTG CTC GAC ATG TTC ACT GAG CTC GG -5'

5' - **GG CAT** ATG GTG AGC AAG GGC -3'

3' - GTA TAC CAC TCG TTC CCG CTC -----TAC CTG CTC GAC ATG TTC ACT GAG CTC -5'

Forward primer

5' - **GG CAT** ATG GTG AGC AAG GGC -3'

Reverse primer

5' - **GG CTC GAG TCA** CTT GTA CAG CTC GTC -3'

NdeI

5' -CATATG-3'

3' -GTATAC-5'

XhoI

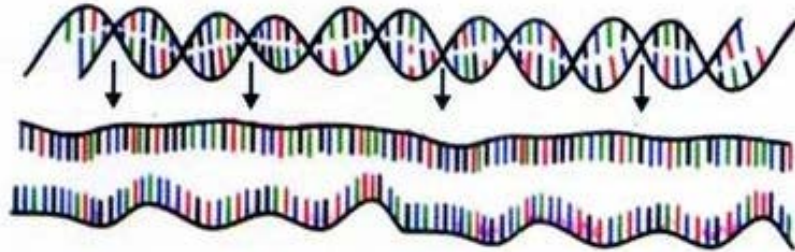
5' -CTCGAG-3'

3' -GAGCTC-5'

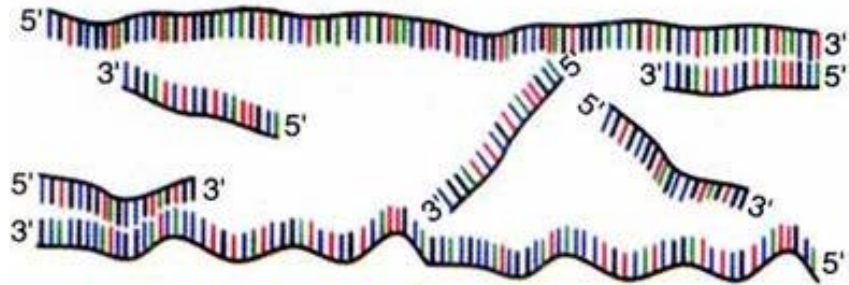
PCR

- ❑ PCR(polymerase chain reaction)법은 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관 내에 대량으로 증폭하는 획기적인 기술이다.
- ❑ PCR증폭효율에 영향을 미치는 요인으로는 ① 각 단계의 반응온도와 시간, ② cycle수, ③ 반응액 조성(주형 DNA, dNTP농도, Mg²⁺ 농도 등), ④ primer 설계, ⑤ 사용 DNA polymerase 등이 있다.
- ❑ Denaturation, Annealing, Extension 3단계를 거친다.

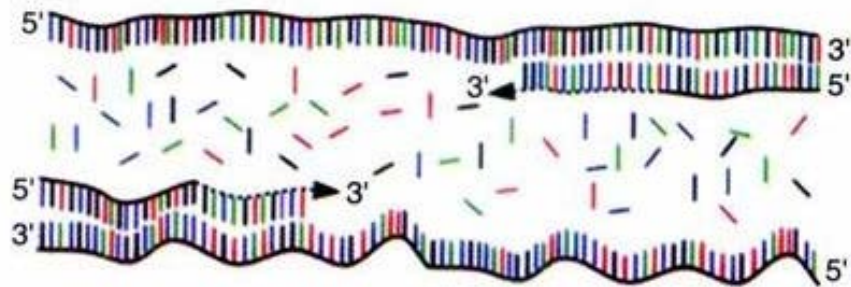
PCR 과정



□ Denaturation



□ Annealing



□ Extension

PCR 과정

□ Denaturation

- 두가닥의 DNA를 약 94°C에서 15~30초간 처리하여 각각 한가닥의 DNA로 분리시키는 과정이다. 온도를 너무 높이거나 너무 오랜시간 처리하면 내열성 DNA polymerase라고 하여도 activity를 잃어버리므로 주의하여야 한다.

□ Annealing

- 열처리로 만들어진 ssDNA와 primer가 있는 상태에서 온도를 낮추면 2종류 (Forward,Reverse)의 primer는 각각의 complementary ssDNA Template에 annealing한다. Annealing에 적합한 온도와 시간은 primer의 sequence와 그 길이에 따라 결정된다.

□ Extension

- 4종류의 기질(dNTP)이 공존하는 상태에서, DNA polymerase를 작용시켜 primer 이후의 sequence를 polymerization 한다. 보통 extension의 시간은 1Kb/m 으로 하여 계산한다.

Day 3. PCR amplification of gene of interest

(Maxime PCR premix 사용)

1. Mixture 제조

template DNA : 1ul

primer(10pmol) : F/R 각 3ul

DW : 13ul

2. PCR 진행 (총 35cycle)

Denaturation : 95°C, 30sec

Annealing : 55°C, 30sec

Extension : 72°C, 1min

Day 3. Gel electrophoresis and elution / Preparation of insert and plasmid by RE digestion

1. Gel electrophoresis (100V, 40min)
2. Gel cutting (gel 100mg 당 GE buffer 300ul)
3. 50°C incubation (10min동안 진행)
4. Room temp에서 10min cooling
5. Collection tube와 spin column 결합 후 녹인 gel을 전부 column에 넣기
6. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temp)
7. Collection tube에 있는 sup 전부 제거 후 Wash buffer 750ul 넣기
8. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temp)
9. Sup 제거 후 추가 Centrifugation (12,000rpm, 3min, room temp)
10. Spin column을 새 EP tube에 옮긴 후 DW 40ul 넣고 5min incubation
11. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temp)

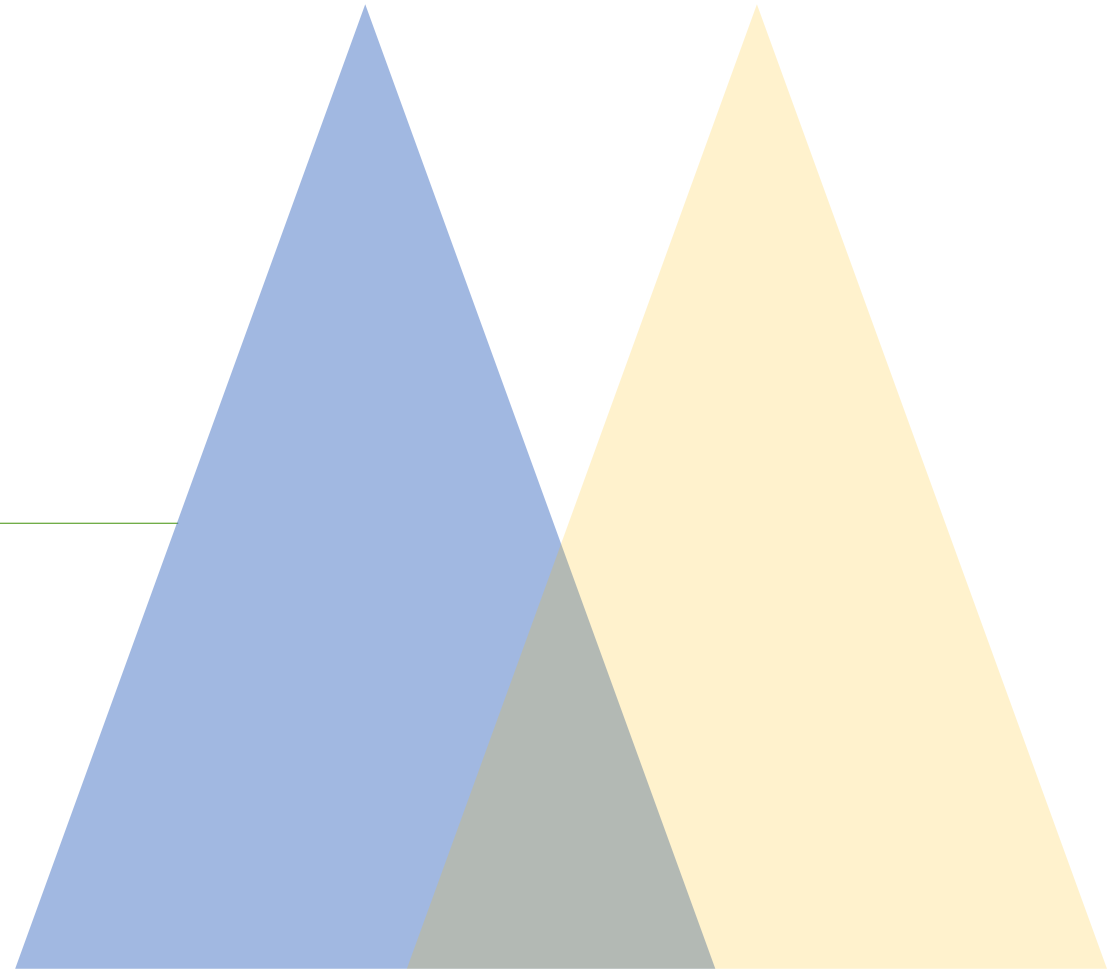
Day 3. Gel electrophoresis and elution / Preparation of insert and plasmid by RE digestion

1. Enzyme digestion mixture 제조
2. 37°C incubation, overnight

	PCR product	pET-21a
DNA	43ul	43ul
10x buffer	5ul	5ul
Nde I	1ul	1ul
Xho I	1ul	1ul

Day4

- Electrophoresis
- Band elution
- DNA ligation



Day 4. Gel electrophoresis and elution / Preparation of insert and plasmid by RE digestion

1. Enzyme digestion mixture 제조
2. 37°C incubation, overnight
3. Gel electrophoresis (100V, 40min)
4. Gel cutting (gel 100mg 당 GE buffer 300ul)
5. 50°C incubation (10min동안 진행)
6. Room temp에서 10min cooling
7. Collection tube와 spin column 결합 후 녹인 gel을 전부 column에 넣기
8. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temp)
9. Collection tube에 있는 sup 전부 제거 후 Wash buffer 750ul 넣기
10. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temp)
11. Sup 제거 후 추가 Centrifugation (12,000rpm, 3min, room temp)
12. Spin column을 새 EP tube에 옮긴 후 DW 40ul 넣고 5min incubation
13. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temp)

	PCR product	pET-21a
DNA	43ul	43ul
10x buffer	5ul	5ul
Nde I	1ul	1ul
Xho I	1ul	1ul

Day 4. DNA ligation

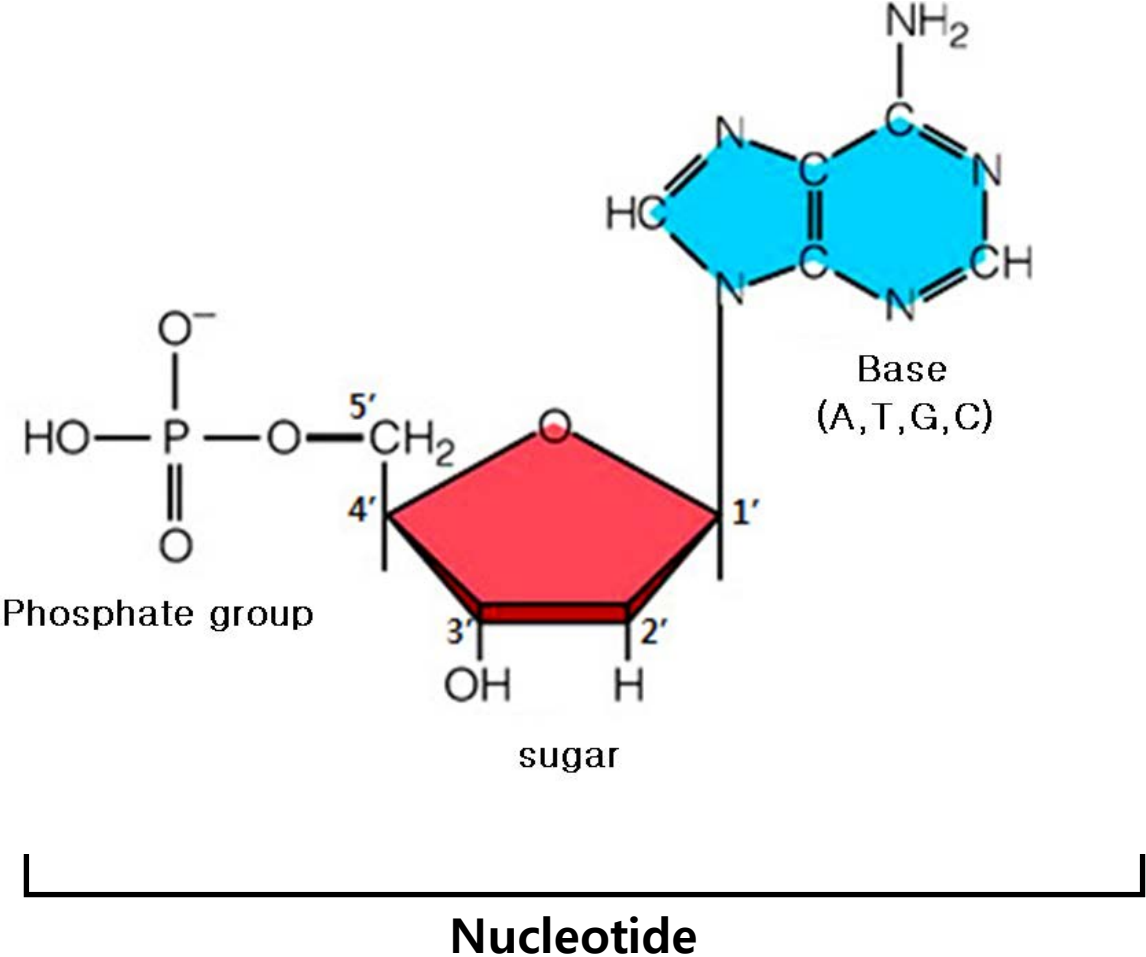
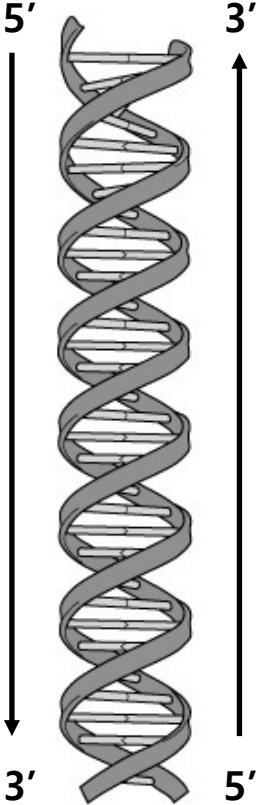
1. DNA ligation

	Volume
Insert DNA	4ul
Vecor DNA	3ul
10X buffer	2ul
T4 ligase	0.1ul
DW	0.9ul
total	10ul

2. Mixture 제조 후 room temp에서 1h 30 min incubation
3. 4°C에서 overnight incubation

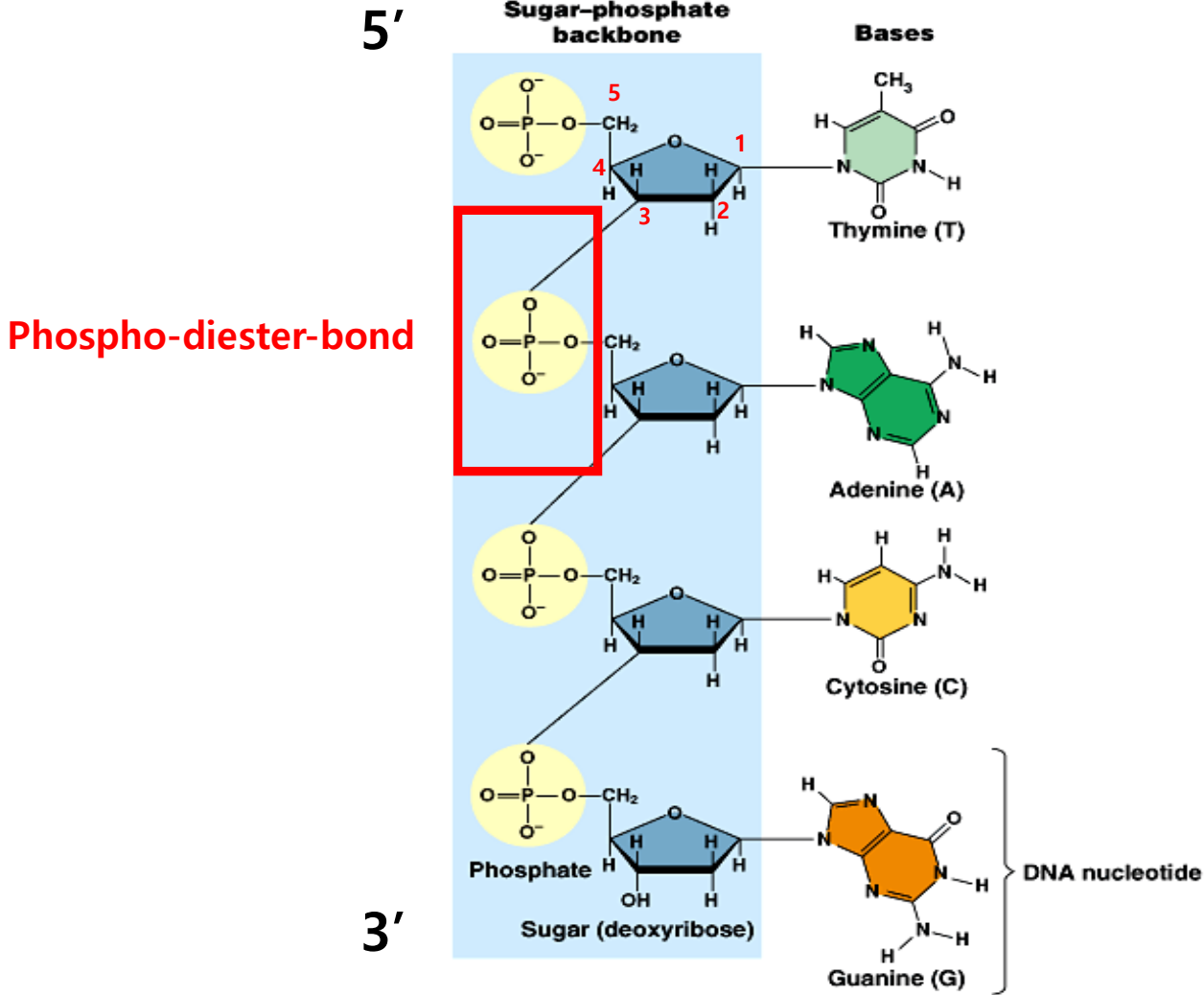
Day 4. DNA ligation

DNA structure



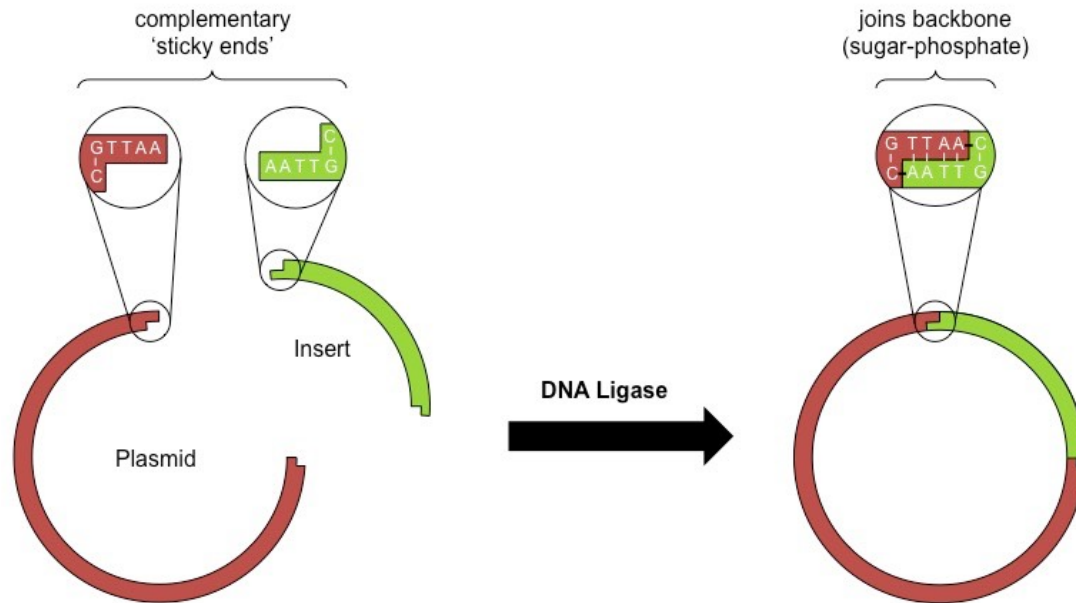
Day 4. DNA ligation

DNA structure



Day 4. DNA ligation

- Enzyme의 작용을 통해 nucleotide가 결합
- Molecular cloning에 필수적인 절차
- 외부 DNA fragment (insert)를 plasmid (vector)에 insertion시 사용
- 5'-phosphate group + 3'-hydroxyl group(-OH) 사이에서 phosphodiester bond를 이룸



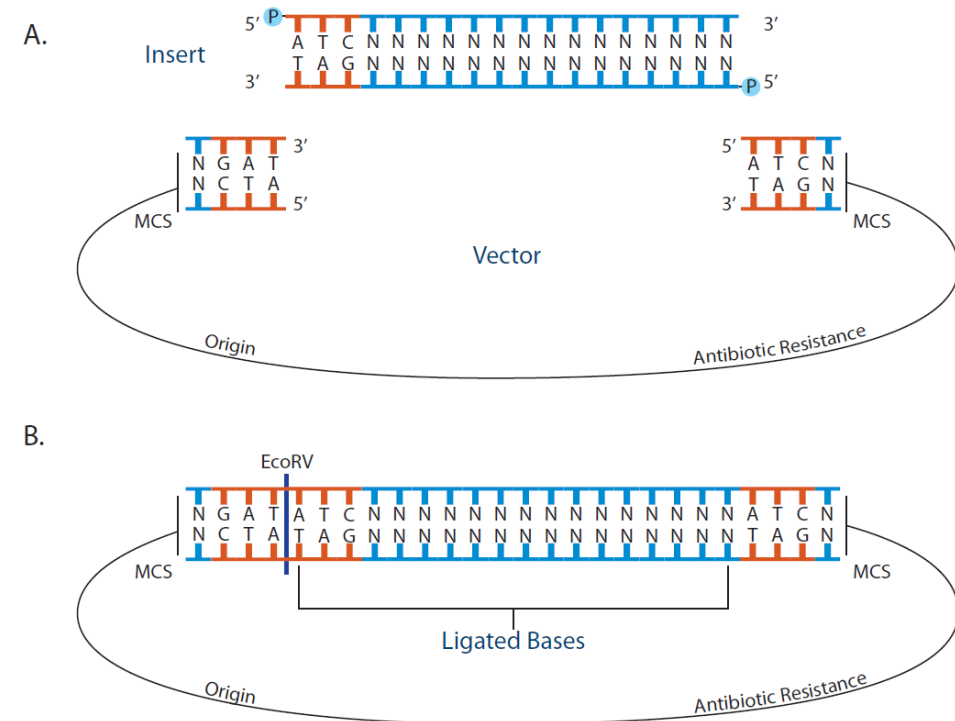
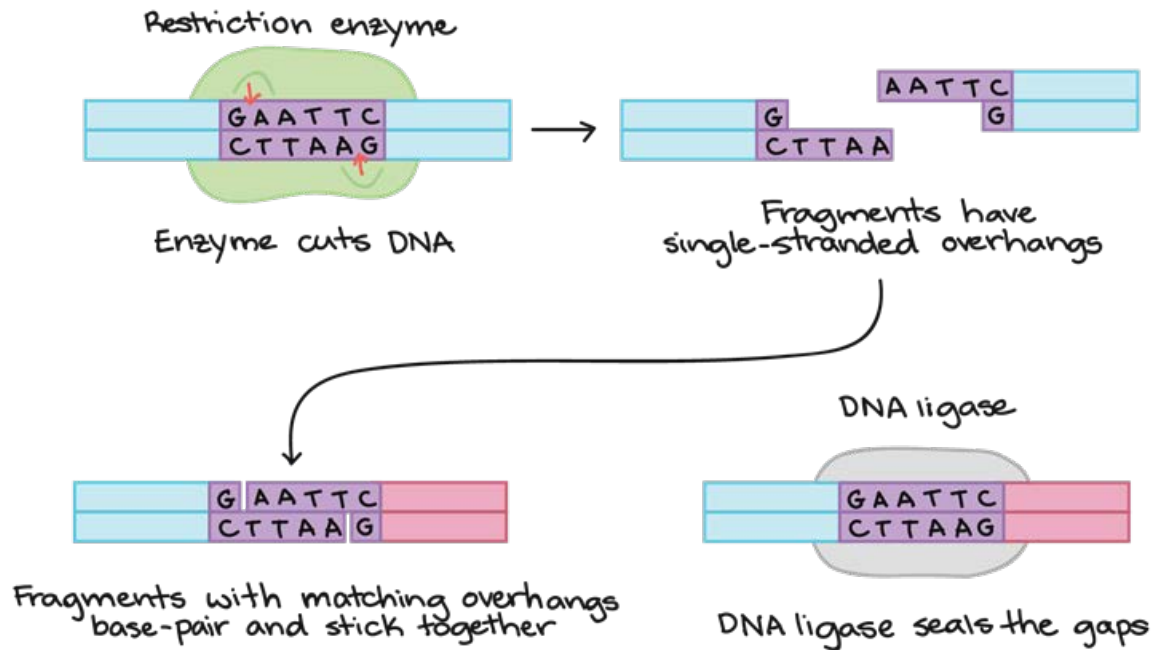
Day 4. DNA ligation

Ligase

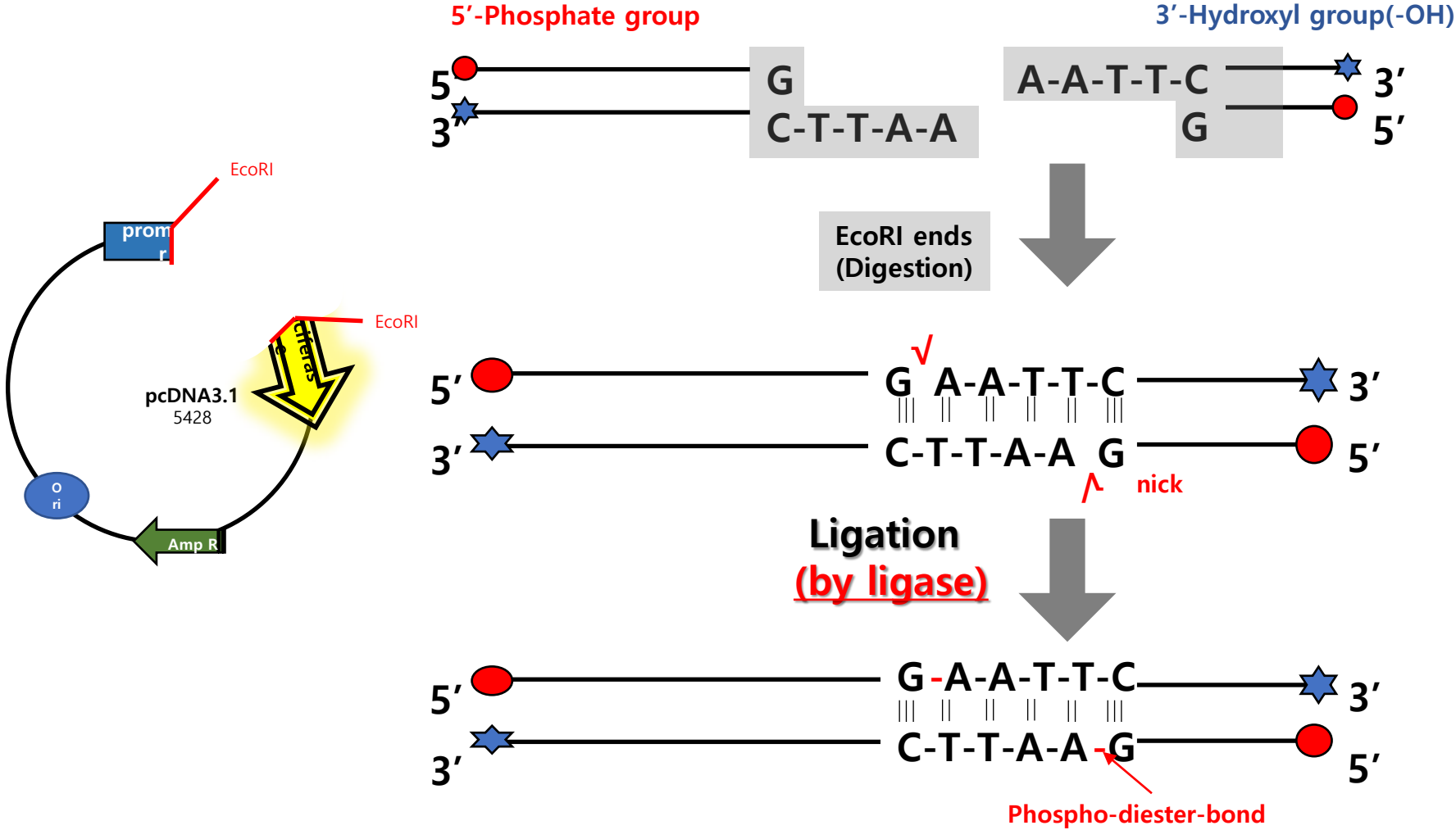
- T4 DNA ligase : Cofactor로 ATP 사용
- E.coli DNA ligase: Cofactor로 NAD⁺ 사용
- T4 DNA ligase는 E.coli DNA ligase에 비해 blunt end에도 작용이 용이하기때문에 T4 DNA ligase가 더 많이 사용됨

Day 4. DNA ligation

- Annealing complementary extensions after staggered **cleavage with same endonuclease**.
- **Nick**: a break in the phosphodiester bond in one strand of duplex DNA.
- **With protruding ends**, the reaction is often carried out at low temperature for long periods to ensure that the extensions remain base paired
- **Blunt-end ligations** require 10 to 100 times more T4 DNA ligase than do ligations of DNA molecules with extensions
→ conducted at RT

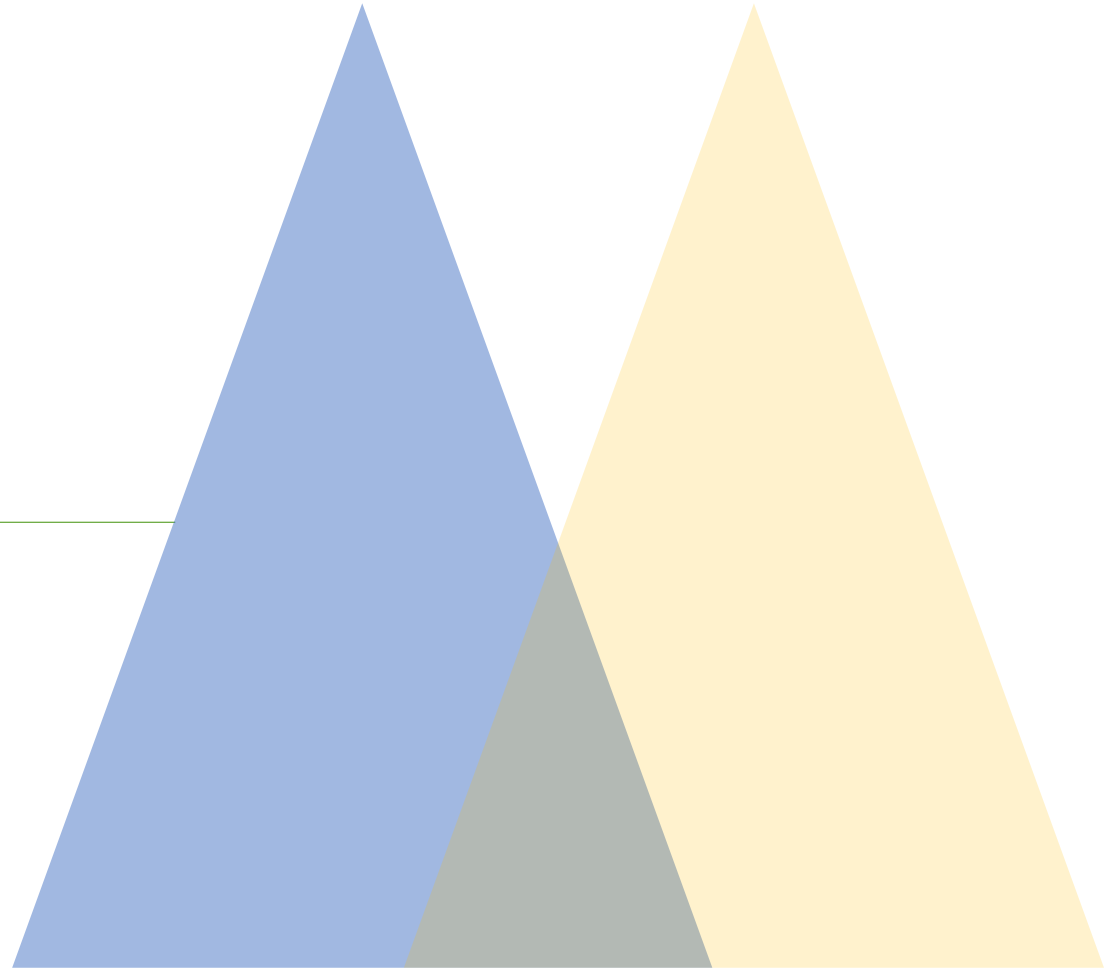


Day 4. DNA ligation



Day5


- Transformation into DH5 α



Recombinant DNA technology

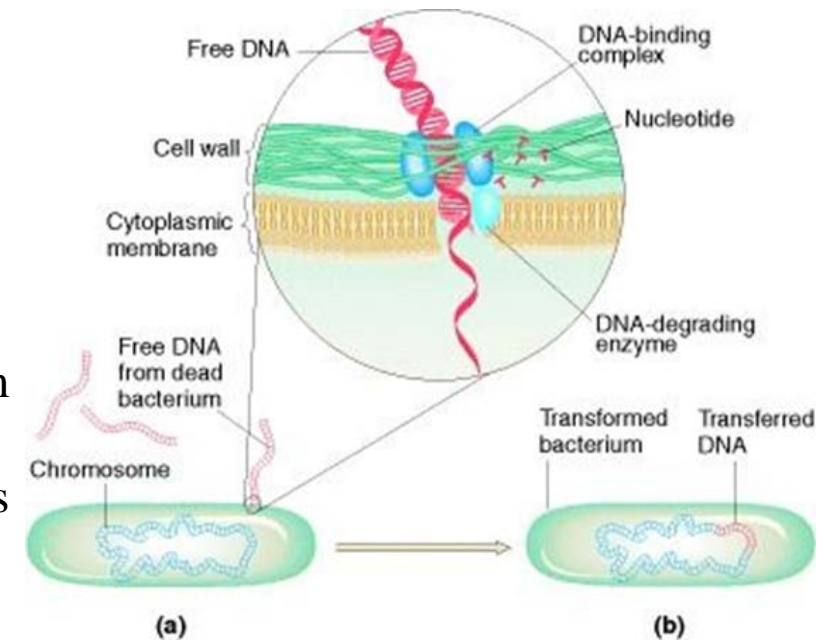
■ Transformation and selection

➤ Transformation

- Next step ⑦ **uptake by E.coli of the cloned DNA.**
- Transformation: the process of introducing purified DNA into a bacterial cell.
- **Competent**  a cell that is capable of taking up DNA.
- Competence occurs naturally in many bacteria.

① Natural transformation process

- Binding of double-stranded DNA to components of the cell wall.
- Entry of the DNA into an inner compartment where it is protected from enzymes that degrade nucleic acids.
- Transmission of one strand into the cytoplasm while the other one is degraded.
- Linear DNA: may integrate into the host chromosome.
- Plasmid: maintained in the cytoplasm after a second strand is synthesized.



Recombinant DNA technology

■ Transformation and selection

② Induction of competence in E.coli by various special treatments

- Enhance the acquisition of DNA by the cell.

I. Heat-shock method:

a. Preparation of **competent cell** :

- ✓ Native E. coli cell cannot uptake the foreign DNA.

→ ice-cold **CaCl₂ treatment** – change the cell wall structure.

b. Mix DNA and competent cells on ice.

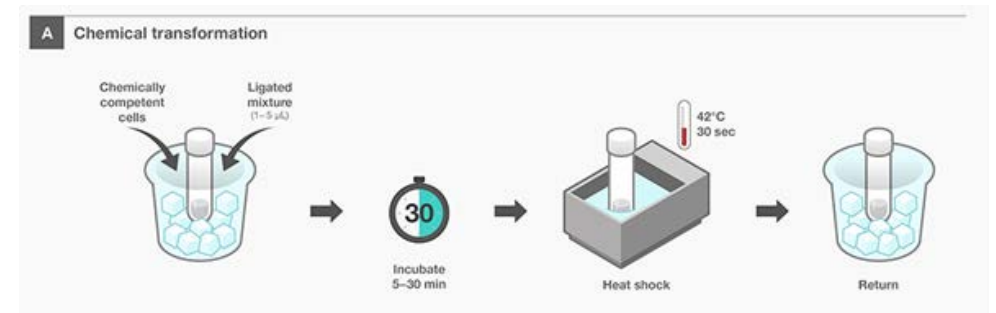
→ DNA binds to cell wall.

c. Heat shock at 42°C for 2 min.

→ DNA is transferred into bacterial cell.

d. Spread on selection agar plate.

→ Only transformants can survive on selection agar plate which contains antibiotics.



❖ **Transformation efficiency is not high.** $10^7 \sim 10^8$ transformants per ug of intact plasmid DNA

Recombinant DNA technology

Transformation and selection

III. Other Methods of Transformation

a. Conjugation (mating)

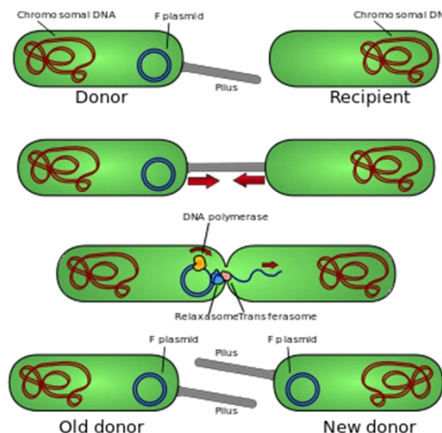
→ Transfer DNA into bacterial cells by cell-to-cell interaction.

b. Transduction

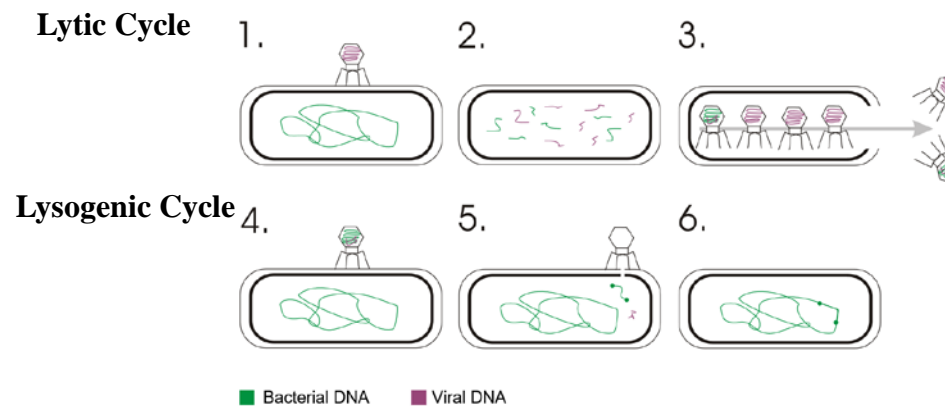
→ Transfer DNA into bacterial cells by bacteriophage.

c. Transfection

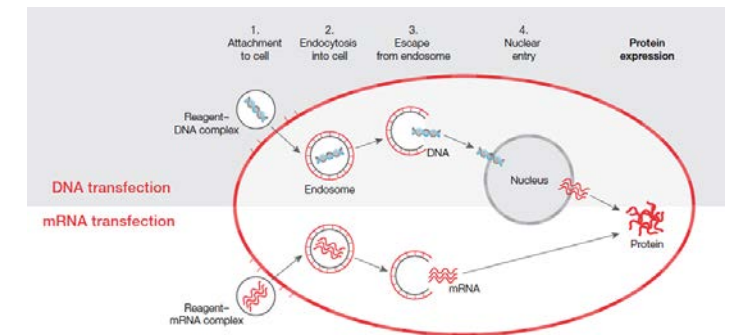
→ Transfer DNA into mammalian/insect cells.



Conjugation



Transduction



Transfection

Recombinant DNA technology

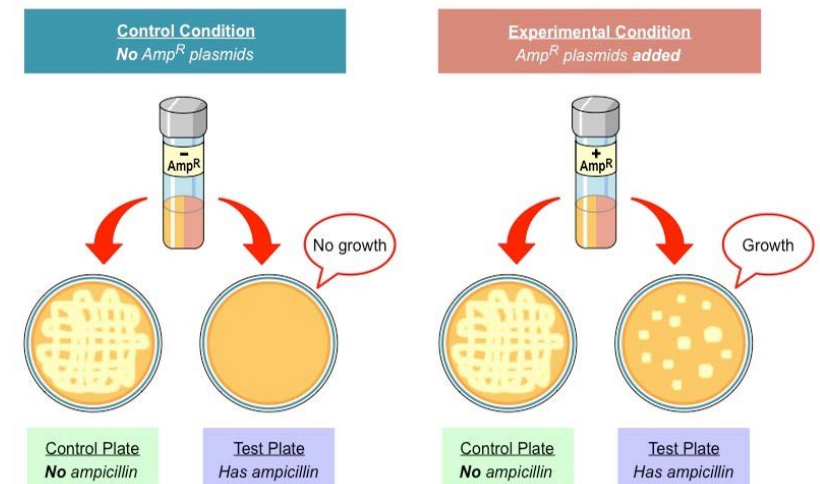
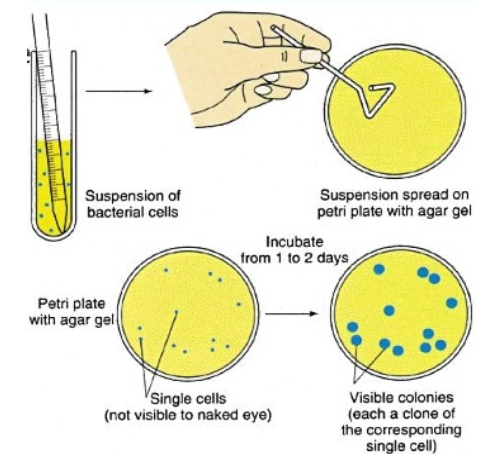
■ Transformation and selection

➤ Selection

- Selection : Identify colonies of bacteria containing the recombinant DNA with gene of interest.
- Possible bacterial clone products
 - a. Bacteria without vector.
 - b. Bacteria with vector without the gene.
 - c. Bacteria with vector with the gene of interest.
- **Plating** : taking a sample of the bacteria and growing them on plates.
- Plates have a medium containing ① Antibiotics and ② X-gal.

① Antibiotic Resistance

- Vector confers antibiotic resistant to bacteria because the vector contains an **antibiotic resistant gene**.
- Only bacterial cells that properly transformed the vector will live and grow on the plate.



Recombinant DNA technology

■ Transformation and selection

➤ A summary of the common selectable marker genes and their respective antibiotics and target organisms

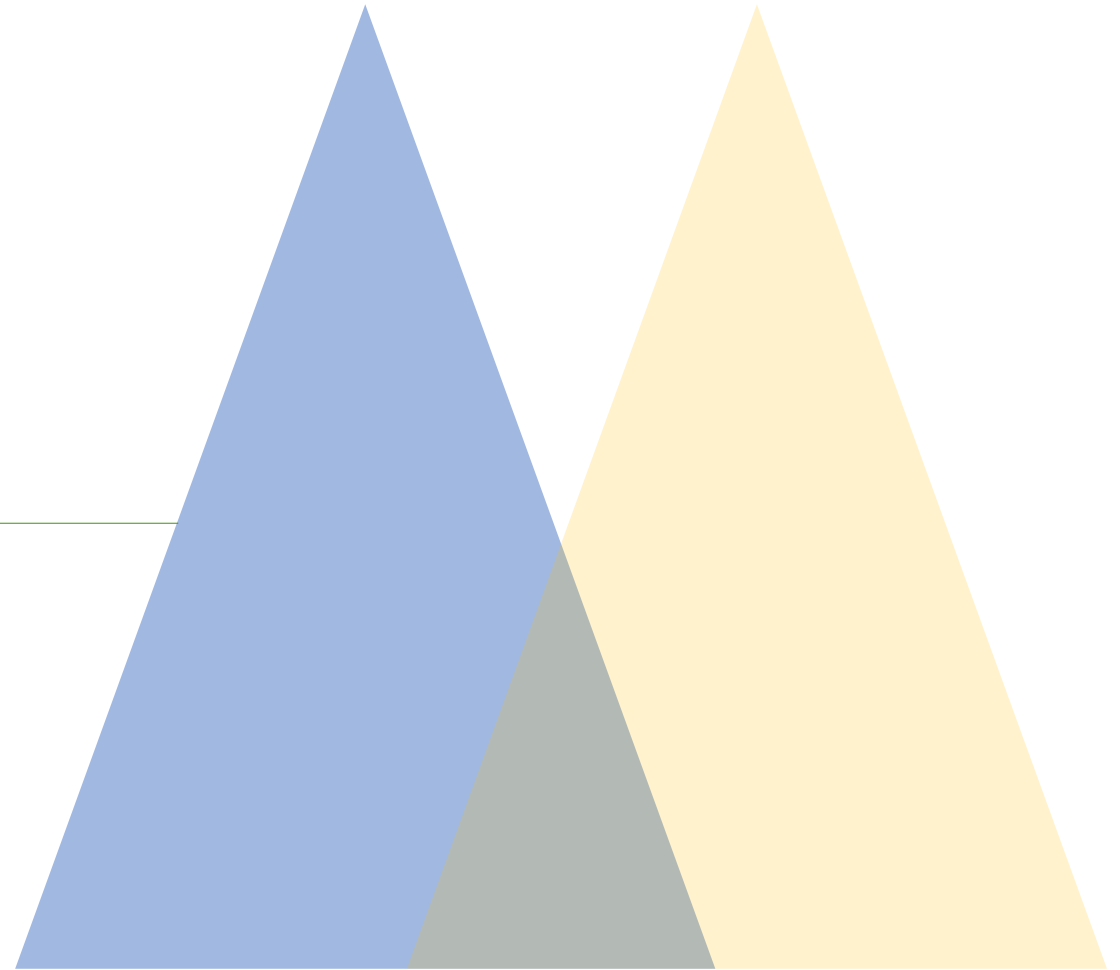
Selectable Marker (Gene)	Selection	Selection Type	Target Organisms
AmpR	Ampicillin	Positive	Bacteria
NeoR	Kanamycin and Geneticin (G418)	Positive	Bacteria, Mammalian and Fungi
mFabI	Triclosan (antibiotic free)	Positive	E. Coli
ZeoR	Zeocin	Positive	All, especially yeasts
NAT	Nourseothricin (NTC)	Positive	Every organism
HygR	Hygromycin	Positive	Eukaryotes
SpcR (AadA)	Streptomycin and Spectinomycin	Positive	Bacteria
Pac	Puromycin	Positive	Bacteria, yeast and virus
Ura3	5-FOA	Negative	Yeast
Ura3	Uracil deficient media	Positive	Yeast
His3	Histidine deficient media	Positive	Yeast
Leu2	Leucine- deficient media	Positive	Yeast
Trp1	Tryptophan- deficient media	Positive	Yeast

Day 5. Transformation into DH5 α

1. Competent cell(DH5a)에 ligation된 plasmid 10ul 넣고 tapping
2. Ice에 10min incubation
3. Heat shock(42°C), 40sec incubation 후 Ice에 1min incubation
4. 액체 LB 1ml 넣고 37°C 1h incubation (recovery stage)
5. Centrifugation (4,000rpm, 3min, room temp)
6. Sup dilution 후 resuspension
7. 고체 LB plate에 spreading
8. Plate를 뒤집어서 37°C incubation, 18h
9. 9/12 colony confirmation (1시 이후)

Day6

- Plasmid DNA prep
- Conformation of cloned plasmid by RE digestion
- Transformation into BL21



Day 6. Plasmid DNA prep & Confirmation of plasmid by RE digestion

(inoculation까지 조교 준비)

1. Single colony를 따서 LB broth 4ml에 inoculation (37°C shaking incubation, 14hr)
2. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
3. Supernatant 제거 후 S1 buffer 250ul 넣고 vortexing
4. S2 buffer 250ul 넣은 후 inverting
5. G3 buffer 350ul 넣은 후 inverting
6. Centrifugation (12,000rpm, 10min, room temperature)
7. Supernatant 800ul을 Spin column에 옮긴 후
Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
8. Collection tube에 있는 Sup 제거 후 PW buffer 750ul 넣고
Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
9. Collection tube에 있는 Sup 제거 후
추가 Centrifugation (12,000rpm, 3min, room temperature)
10. Spin column만 새 EP tube에 옮긴 후 DW 50ul 넣고 5min incubation
11. Centrifugation (12,000rpm, 1min, room temperature)
12. Nano drop

Day 6. Plasmid DNA prep & Confirmation of plasmid by RE digestion

1. Enzyme digestion mixture 제조
2. 37°C incubation, Overnight
3. 6x loading dye 섞은 후 gel에 loading
4. Gel electrophoresis (100V, 40min)

	Plasmid DNA
DNA	5 μ l
10x buffer	1.5 μ l
Nde I	0.5 μ l
Xho I	0.5 μ l
DW	7.5 μ l
total	15 μ l

Day 6. Transformation into BL21

1. Competent cell(BL21)에 plasmid DNA 10ul 넣고 tapping
2. Ice에 10min incubation
3. Heat shock(42°C), 40sec incubation 후 Ice에 1min incubation
4. 액체 LB 1ml 넣어 dilution
5. Dilution한 competent cell 100 μ l 따서 고체 LB plate에 spreading
6. Plate를 뒤집어서 37°C incubation, 18h
7. 9/15 colony confirmation (1시 이후)

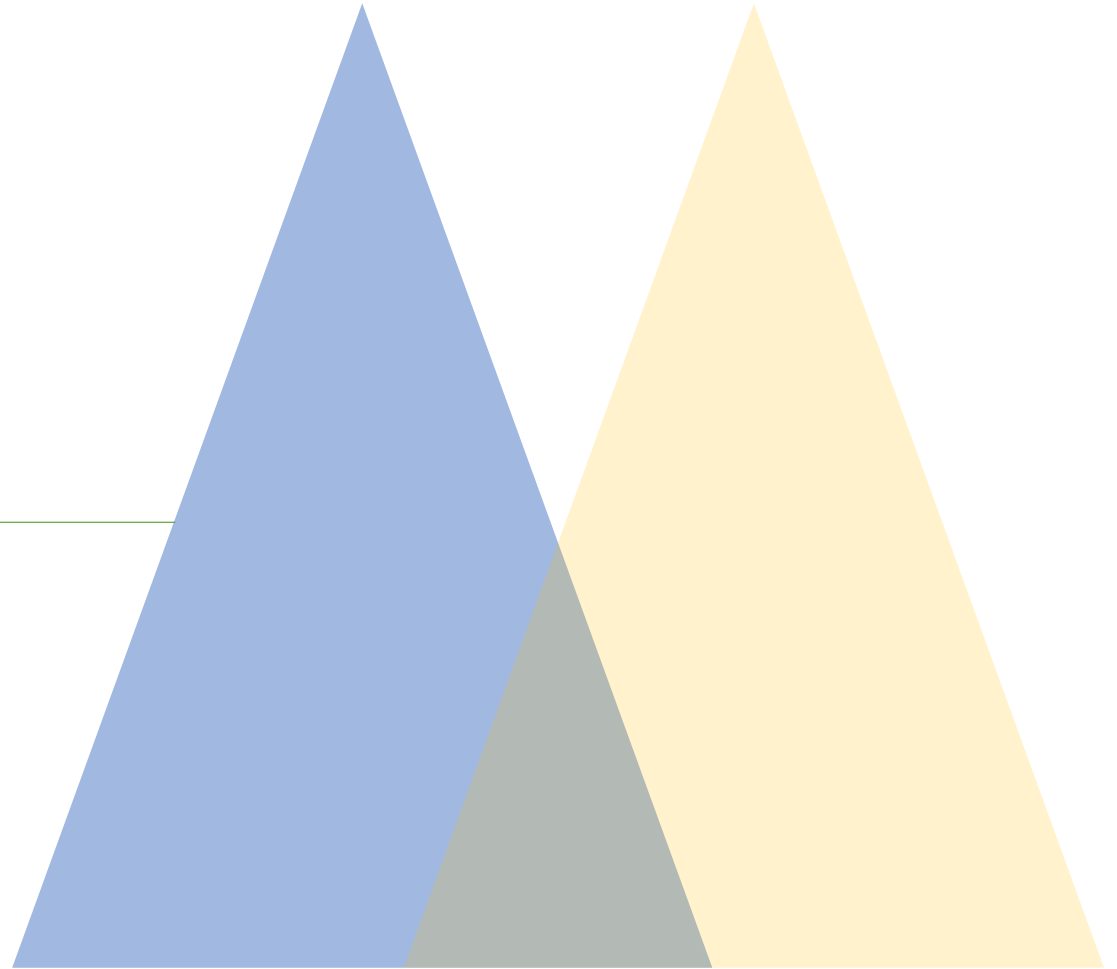
분자 생물학 실험

Part 2

- Measurement of gene expression -

Day7

- Preparation of reagent and buffers
- Day 8에 사용할 시약 및 sample 사전 준비 단계



Day 7. IPTG induction

▪ What IPTG?

- IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG))로 분자 생물학 실험에서 사용하는 시약 중 하나이다.
- 이 화합물은 allolactose와 분자적으로 유사하며, lactose metabolite로서 lac operon의 전사를 개시한다.
- 유전자가 lac operon 통제 하에 있을 때 단백질 발현을 유도하는데 쓰인다.
- IPTG는 lac repressor에 결합한 후 lac operator에서 allosteric한 방법으로 4량체의 억제제를 분비하여 lac operon 내 gene의 transcription을 가능하게 한다.

Day 7. RNA extraction

▪ Why RNA?

- DNA는 한 개체내의 모든 세포에서 동일한 DNA 추출이 가능하다. 이 실험에서 RNA를 이용하는 이유는 RNA는 세포마다 발현되는 유전자의 양이 다르므로 단백질 합성에 직접 관여하는 mRNA를 조사함으로써 **유전자 발현량**을 알 수 있다.

- RNA extract(**mRNA**, ribosomal RNA... etc) ->
RT-Reaction (cDNA합성) -> qPCR(정량)

Day 7. RNA extraction

- 80~85% is ribosomal RNA
- 15~20% is small RNA (tRNA, small nuclear RNA)
- About 1~5% is mRNA
 - unstable
 - 다양한 size
 - 3'에 poly(A) tail 존재

Day 7. RNA extraction

Reagent

- Trizol
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% EtOH
- DEPC water

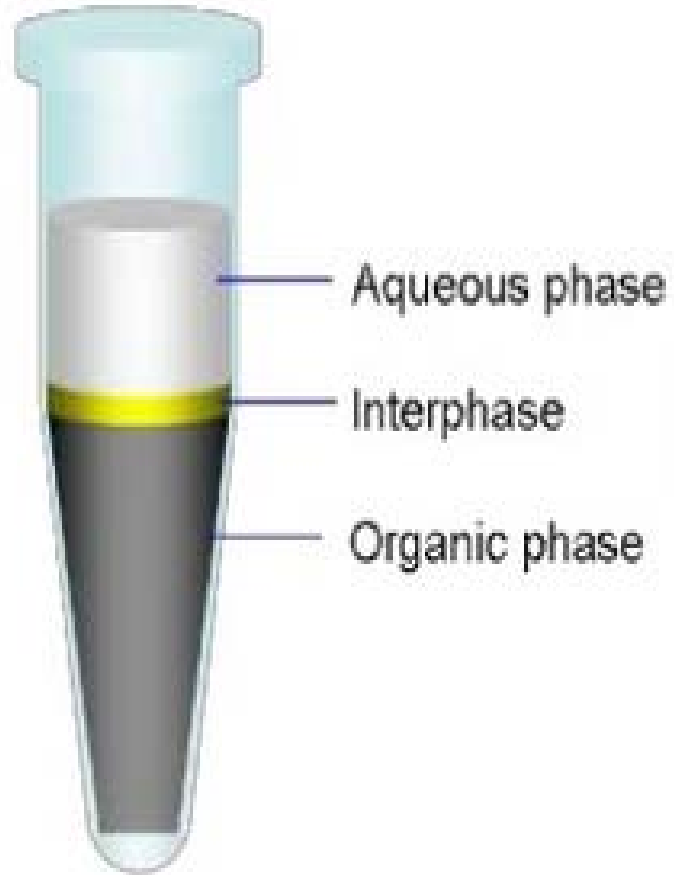
Day 7. RNA extraction

✓ Tri-RNA Reagent (Trizol)

- Combines **phenol** and **guanidine thiocyanate** in a mono-phase solution to facilitate the immediate and most effective inhibition of RNase.
- **guanidinium isothiocyanate** (powerful protein denaturant)
: inactivation of RNases
- **acidic phenol/chloroform**
: partitioning of RNA into aqueous supernatant for separation

Day 7. RNA extraction

Phase Separation

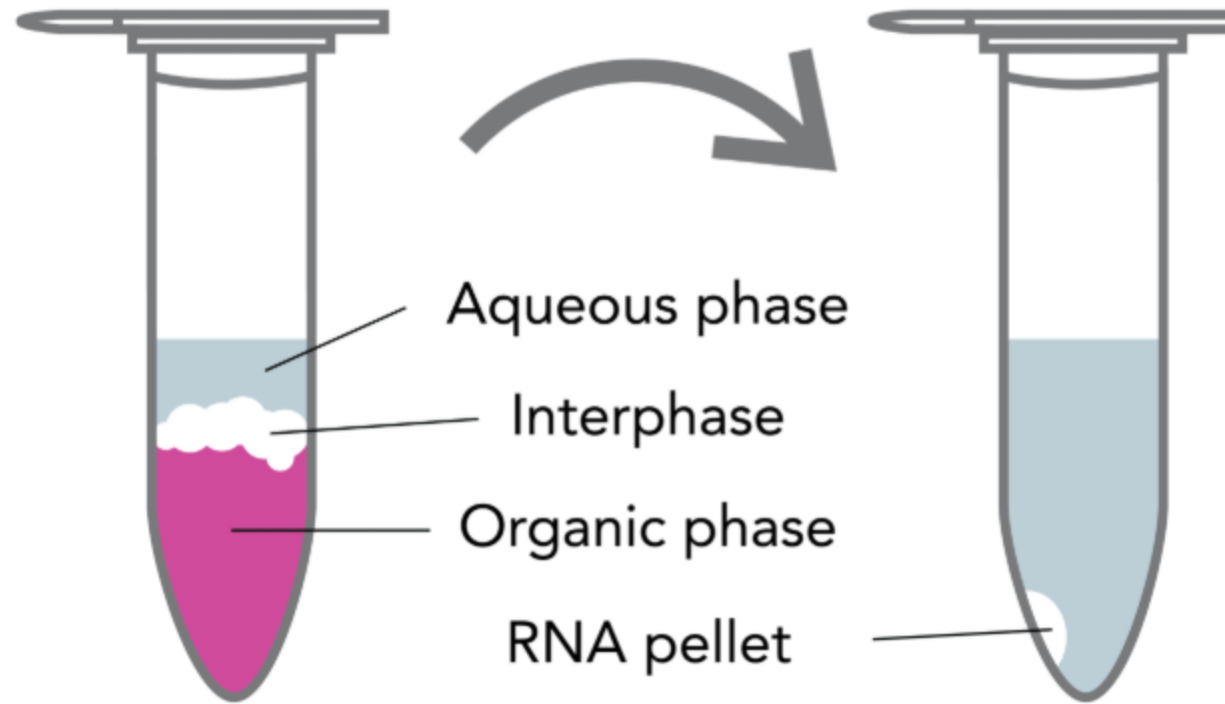


- Aqueous phase
 - RNA
- Interphase
 - DNA
- Organic phase (red color)
 - Protein

Day 7. RNA extraction

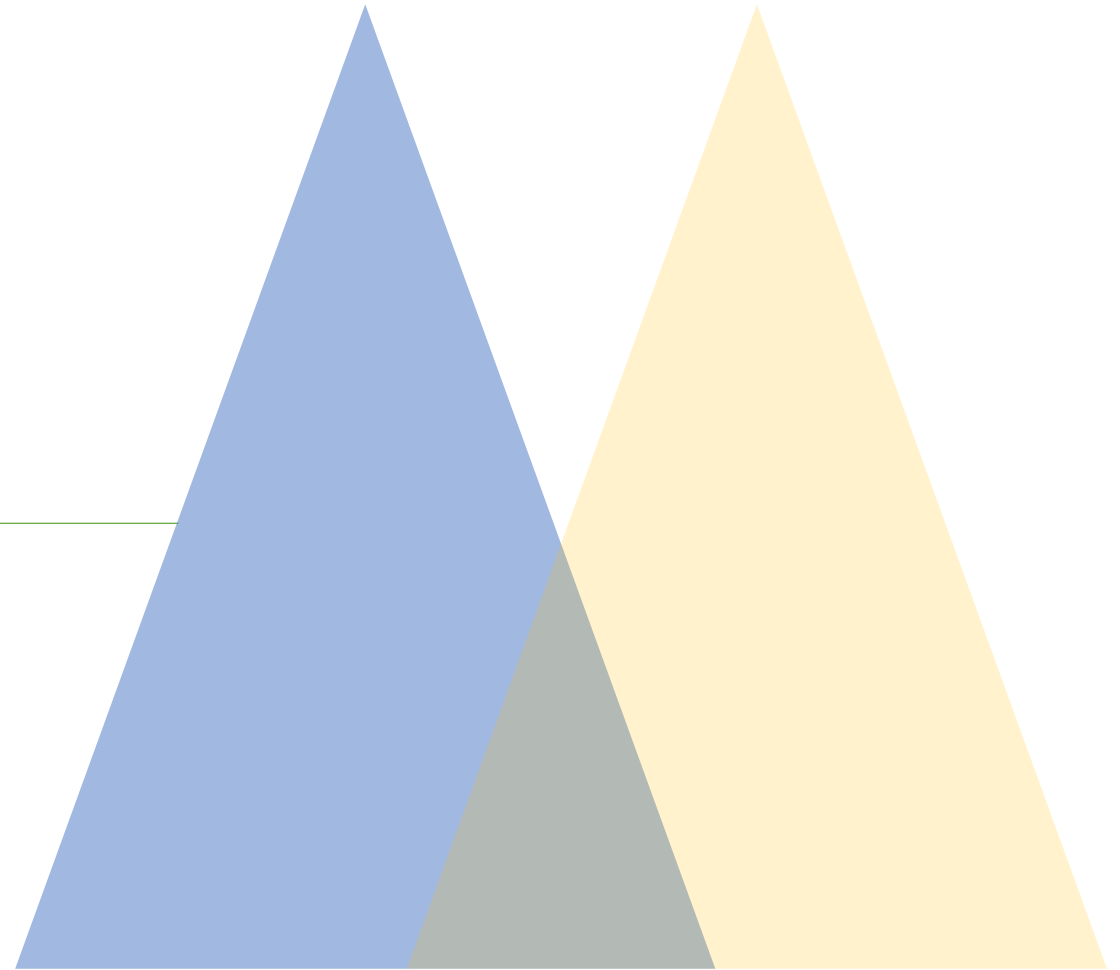
Phase separation

Isopropanol precipitation



Day8

- Induction
- RNA extraction
- cDNA synthesis



Day 8. IPTG induction

▪ What IPTG?

- IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG))로 분자 생물학 실험에서 사용하는 시약 중 하나이다.
- 이 화합물은 allolactose와 분자적으로 유사하며, lactose metabolite로서 lac operon의 전사를 개시한다.
- 유전자가 lac operon 통제 하에 있을 때 단백질 발현을 유도하는데 쓰인다.
- IPTG는 lac repressor에 결합한 후 lac operator에서 allosteric한 방법으로 4량체의 억제제를 분비하여 lac operon 내 gene의 transcription을 가능하게 한다.

Day 8. RNA extraction

▪ Why RNA?

- DNA는 한 개체내의 모든 세포에서 동일한 DNA 추출이 가능하다. 이 실험에서 RNA를 이용하는 이유는 RNA는 세포마다 발현되는 유전자의 양이 다르므로 단백질 합성에 직접 관여하는 mRNA를 조사함으로써 **유전자 발현량**을 알 수 있다.

- RNA extract(**mRNA**, ribosomal RNA... etc) ->
RT-Reaction (cDNA합성) -> qPCR(정량)

Day 8. RNA extraction

- 80~85% is ribosomal RNA
- 15~20% is small RNA (tRNA, small nuclear RNA)
- About 1~5% is mRNA
 - unstable
 - 다양한 size
 - 3'에 poly(A) tail 존재

Day 8. RNA extraction

Reagent

- Trizol
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% EtOH
- DEPC water

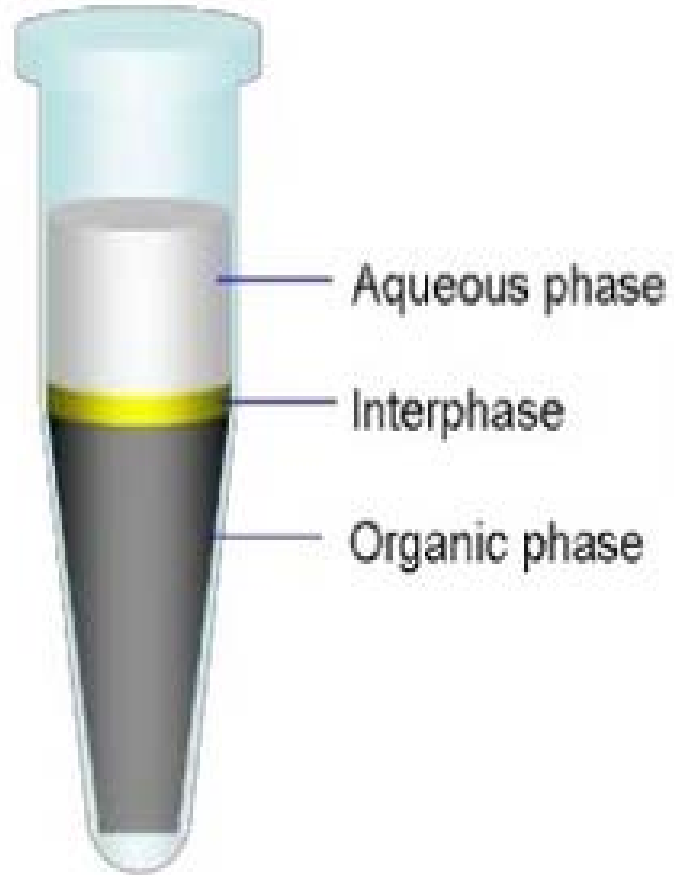
Day 8. RNA extraction

✓ Tri-RNA Reagent (Trizol)

- Combines **phenol** and **guanidine thiocyanate** in a mono-phase solution to facilitate the immediate and most effective inhibition of RNase.
- **guanidinium isothiocyanate** (powerful protein denaturant)
: inactivation of RNases
- **acidic phenol/chloroform**
: partitioning of RNA into aqueous supernatant for separation

Day 8. RNA extraction

Phase Separation

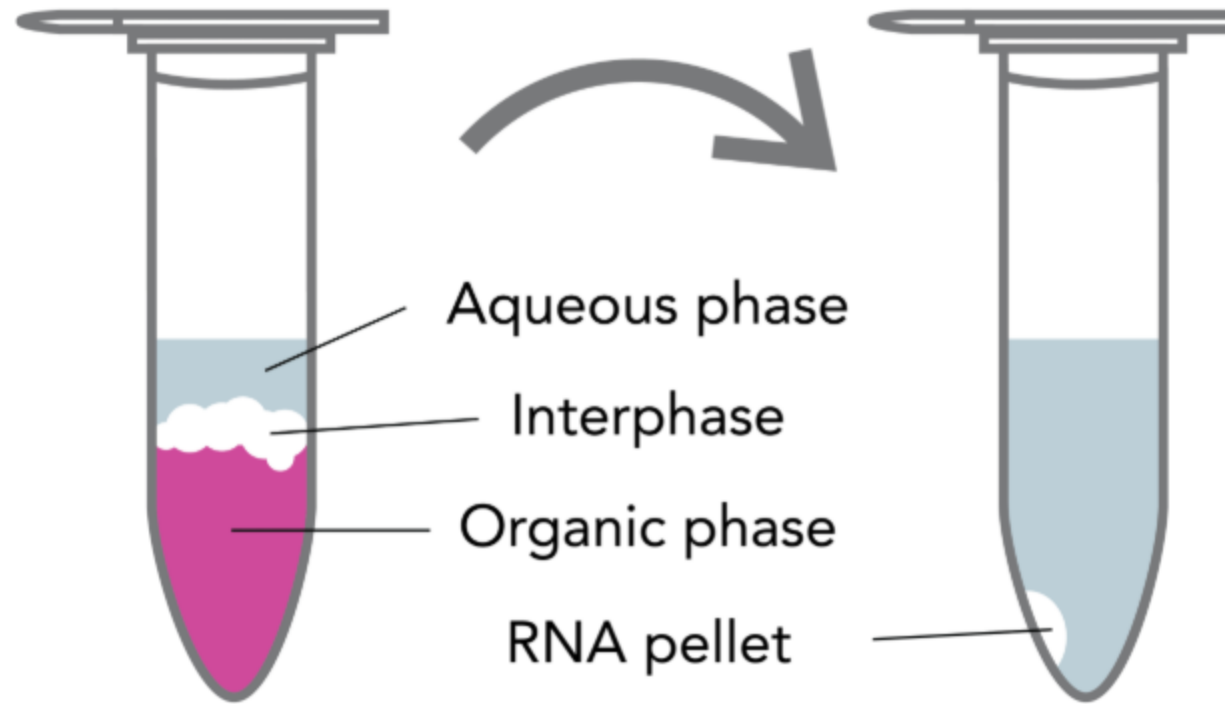


- Aqueous phase
 - RNA
- Interphase
 - DNA
- Organic phase (red color)
 - Protein

Day 8. RNA extraction

Phase separation

Isopropanol precipitation



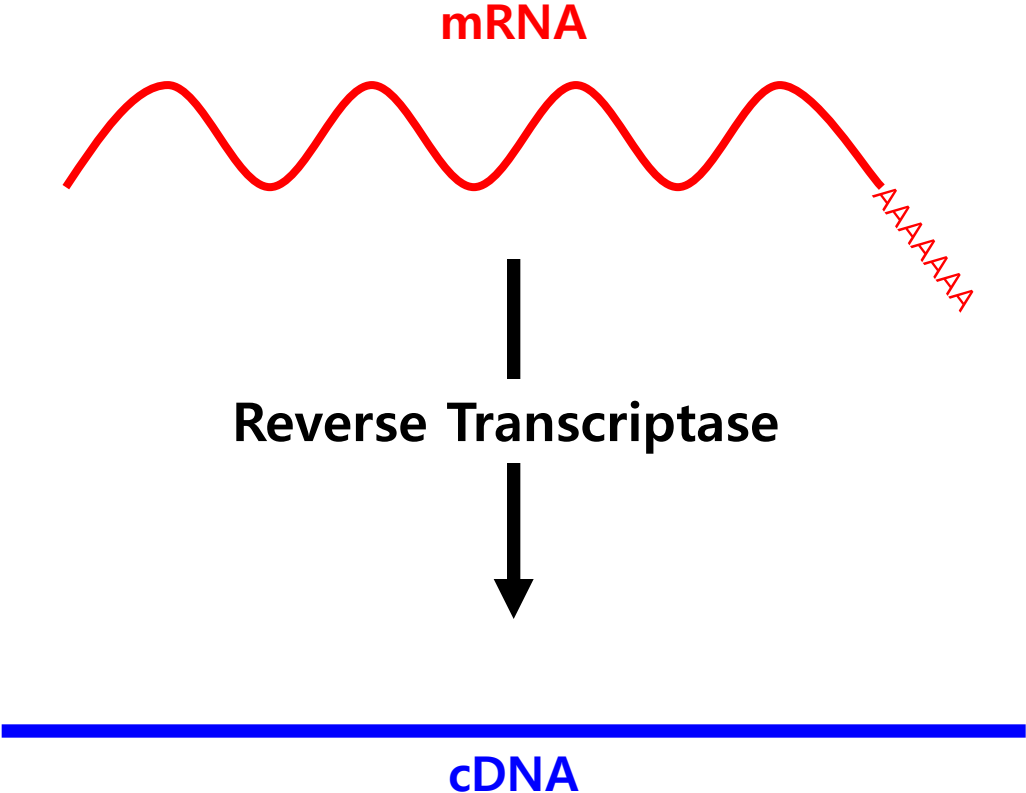
Day 8. cDNA synthesis

- PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR)
 - 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 특정 **DNA 부위를 특이적으로 반복 합성**하여 시험관내에서 원하는 DNA 분자를 증폭시키는 방법
 - 적은 양의 DNA를 이용하요 많은 양의 DNA 합성이 가능함
- RT - PCR (Reverse Trascriptase Polymerase Chain Reaction)
 - **특정 부위의 RNA**를 template로 하여 이에 상응 하는 **cDNA를 만들어내는 기술**

Day 8. cDNA synthesis

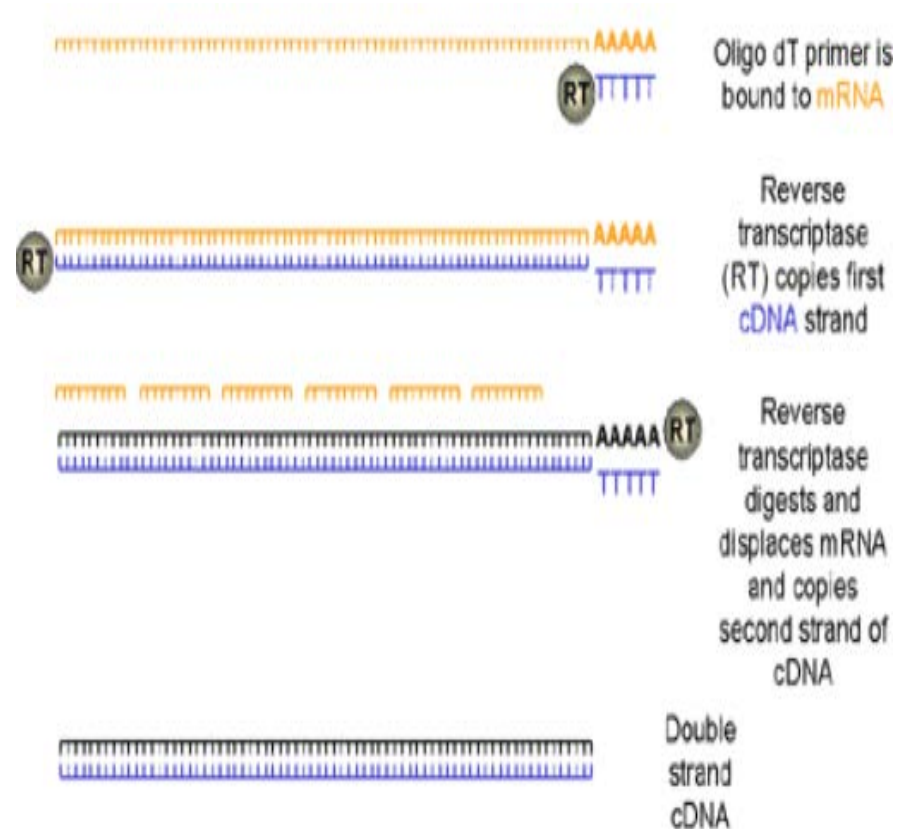
- 일반적인 PCR과 RT의 차이
 - ✓ Template : DNA vs RNA
 - ✓ Cycle 수 : 여러 번 vs 한 번
 - ✓ Product : dsDNA vs DNA&RNA hybrid or ssDNA
 - ✓ Polymerase :
 - DNA dependent DNA polymerase
 - vs
 - RNA dependent DNA polymerase

Day 8. cDNA synthesis



Day 8. cDNA synthesis

- RT-PCR의 과정
 - 이 과정 중 2번째 과정까지만 진행
 - Product는 RNA&DNA hybrid가 됨
 - RNaseH activity를 가지고 있을시 RNA&DNA hybrid 중 RNA는 제거



Conversion of mRNA to cDNA by Reverse Transcription

Day 8. IPTG induction

1. Inoculation – transformant를 LB 4ml에 넣고 37°C shaking incubation

* transformant 2개 inoculation

2. Seed culture – 새로운 액체 LB 4ml에 antibiotics 4 μ l, Inoculation 한 것 1ml 넣고 3hr incubation

3. IPTG (100mM) 40 μ l 넣고 3hr incubation

* 둘 중 하나만 induction

4. Centrifugation (4000rpm, 5min, 4°C)

5. UV로 단백질 발현 유무 확인

Day 8. RNA isolation from cells

1. PBS wash – PBS 1ml 넣은 후 resuspension 후 EP tube에 옮겨담기
2. Centrifugation (12,000rpm, 1min 40sec, 4°C) 후 sup 제거
3. 1~2번 과정 한번 더
4. Trizol 1ml 처리 후 resuspension
5. Choroform 200 μ l씩 (한 tube 당) 넣은 후 shacking
6. Centrifugation (12,000rpm, 10min, 4°C)
7. Aqueous phase 400 μ l 새 tube로 옮기기
8. Isopropanol 400 μ l씩 넣고 ice incubation, 5min
9. Centrifugation (12,000rpm, 15min, 4°C)
10. Pellet 확인 후 sup 제거
11. 75% EtOH(with DEPC) 500 μ l 넣고 washing
12. Inverting
13. Centrifugation (12,000rpm, 10min, 4°C)
14. Sup 제거 후 dry
15. DEPC 40 μ l 넣고 resuspension
16. Nanodrop

Day 8. Reverse Transcription (cDNA synthesis)

1. Mixture 제조

* Maxime RT premix kit 사용

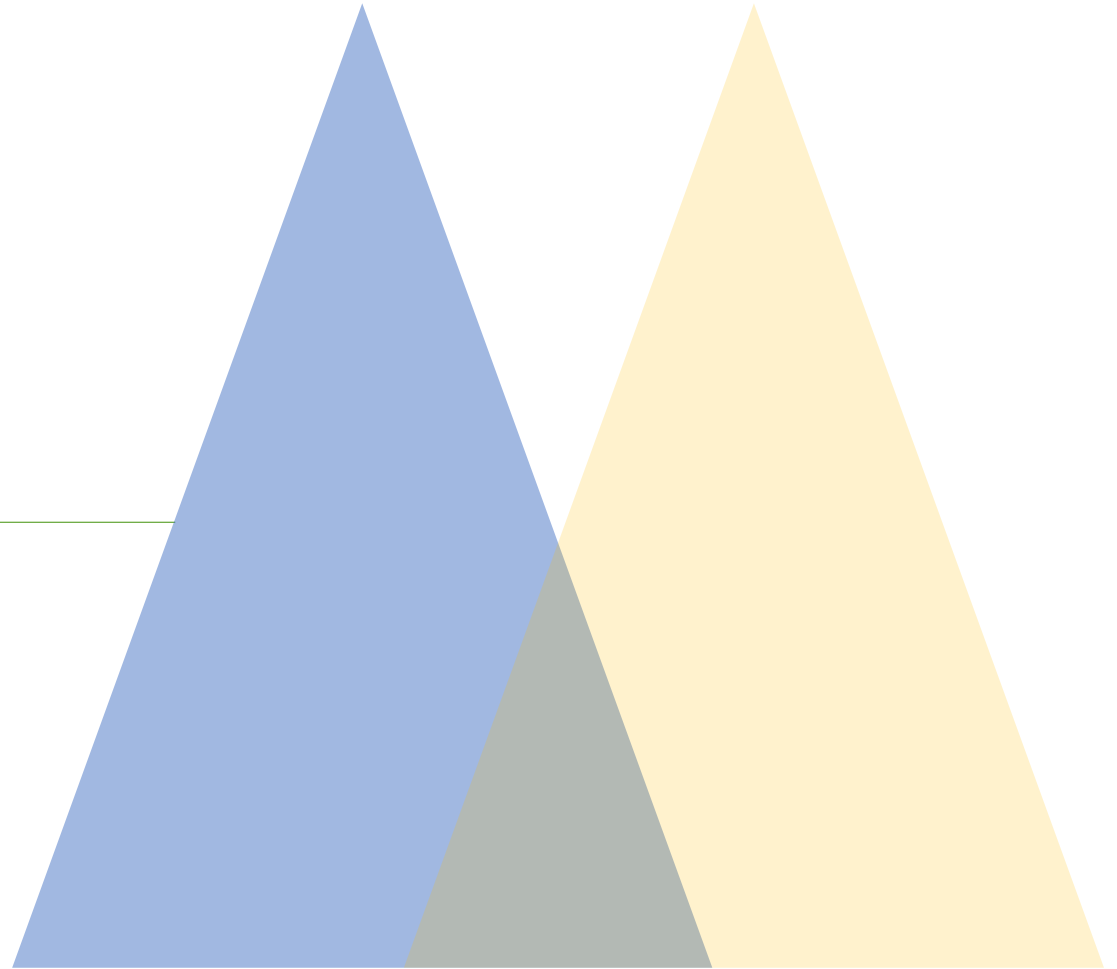
	volume
Template	0.1 ~ 1 μ g
DEPC	Up to 20 μ l
Total volume	20 μ l

2. 45°C 1hr

3. 95°C 5min

Day9

- Measurement of gene expression by qPCR



Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

PCR

- ❑ PCR(polymerase chain reaction)법은 DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관 내에 대량으로 증폭하는 획기적인 기술이다.
- ❑ PCR증폭효율에 영향을 미치는 요인으로는 ① 각 단계의 반응온도와 시간, ② cycle수, ③ 반응액 조성(주형 DNA, dNTP농도, Mg²⁺ 농도 등), ④ primer 설계, ⑤ 사용 DNA polymerase 등이 있다.
- ❑ Denaturation, Annealing, Extension 3단계를 거친다.

PCR 과정

□ Denaturation

- 두가닥의 DNA를 약 94°C에서 15~30초간 처리하여 각각 한가닥의 DNA로 분리시키는 과정이다. 온도를 너무 높이거나 너무 오랜시간 처리하면 내열성 DNA polymerase라고 하여도 activity를 잃어버리므로 주의하여야 한다.

□ Annealing

- 열처리로 만들어진 ssDNA와 primer가 있는 상태에서 온도를 낮추면 2종류 (Forward,Reverse)의 primer는 각각의 complementary ssDNA Template에 annealing한다. Annealing에 적합한 온도와 시간은 primer의 sequence와 그 길이에 따라 결정된다.

□ Extension

- 4종류의 기질(dNTP)이 공존하는 상태에서, DNA polymerase를 작용시켜 primer 이후의 sequence를 polymerization 한다. 보통 extension의 시간은 1Kb/m 으로 하여 계산한다.

Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

qPCR (quantitative PCR)

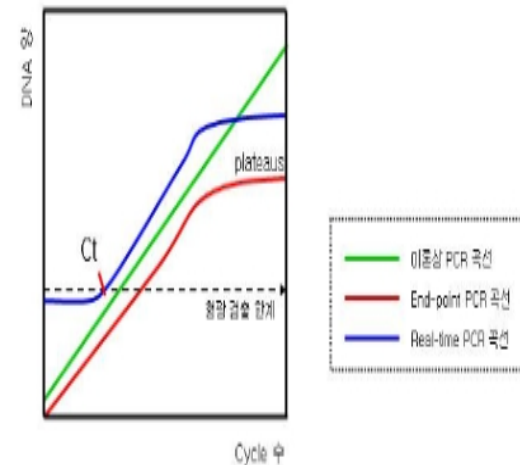
◆ End-point PCR

✓ 마지막 산물만을 전기영동(Electrophoresis)를 통하여 비교하는 end-point PCR은 샘플량에 비례한 정량 PCR이 불가능

◆ qPCR

✓ Gene의 정확한 정량을 위해 실시간으로 형광으로 분석하는 방법

✓ real-time PCR은 형광을 이용해 cycle 마다 실시간으로 샘플 변화값을 측정, 분석하여 정량이 가능하도록 한 PCR 방법



Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

qPCR (quantitative PCR)

◆ qPCR의 용도

- 유전자 발현 해석
- SNP typing
- 도입 유전자의 copy수 해석

◆ qPCR을 이용한 정량법의 원리

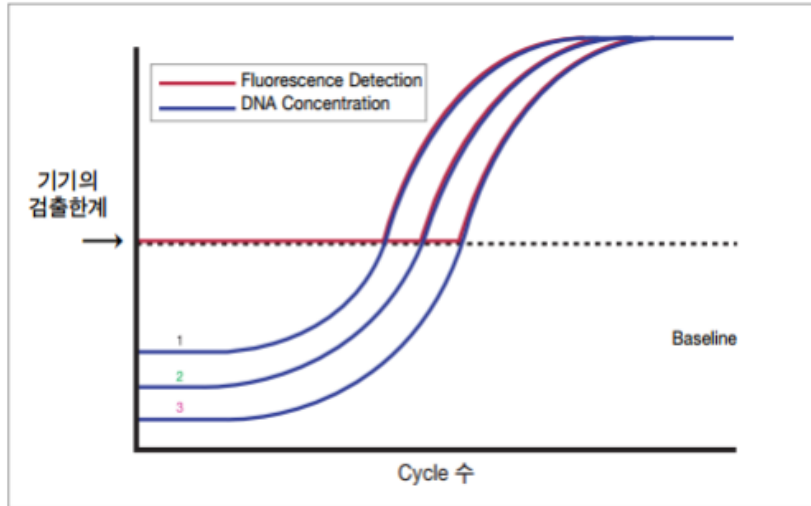
- PCR에서 1 cycle마다 DNA가 2배씩 지수함수적으로 증가
 - > 일정 이상의 cycle이 지나면 DNA양은 plateau에 도달
 - > 증폭하는 DNA의 양을 실시간으로 모니터링(증폭 곡선)

◆ 형광 검출법

- qPCR에서는 PCR 증폭 산물을 형광감도에 의해 검출함.
- Intercalator or 형광 표지 probe이용

Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

qPCR (quantitative PCR)

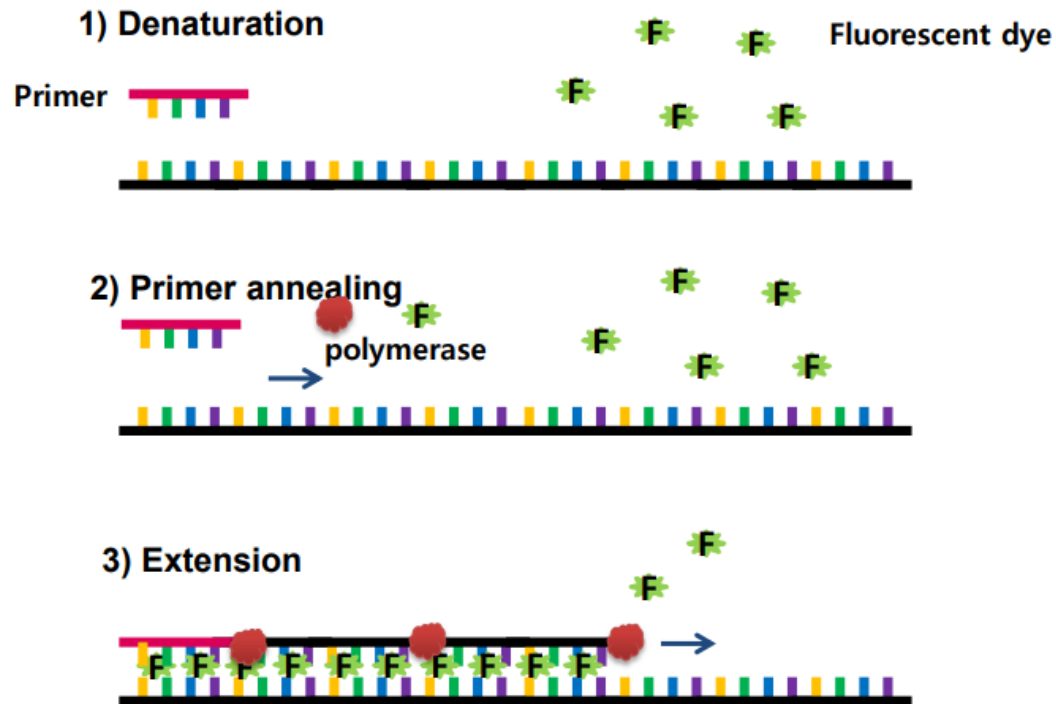


PCR 산물을 형광물질을
이용하여 실시간으로
모니터링하고 측정

- **SYBR Green** : double stranded DNA에 결합하여 형광을 나타냄
- **TaqMan probe** : exonuclease를 갖고 있는 polymerase에 의해 분해됨으로써 형광을 나타냄
- **Cycling probe** : RNA를 중간에 갖고 있어 RNase H에 의해 분해됨으로써 형광을 나타냄
- **Specificity**
: **SYBR Green < TaqMan probe < Cycling probe**

Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

SYBR Green



*SYBR Green의 특징

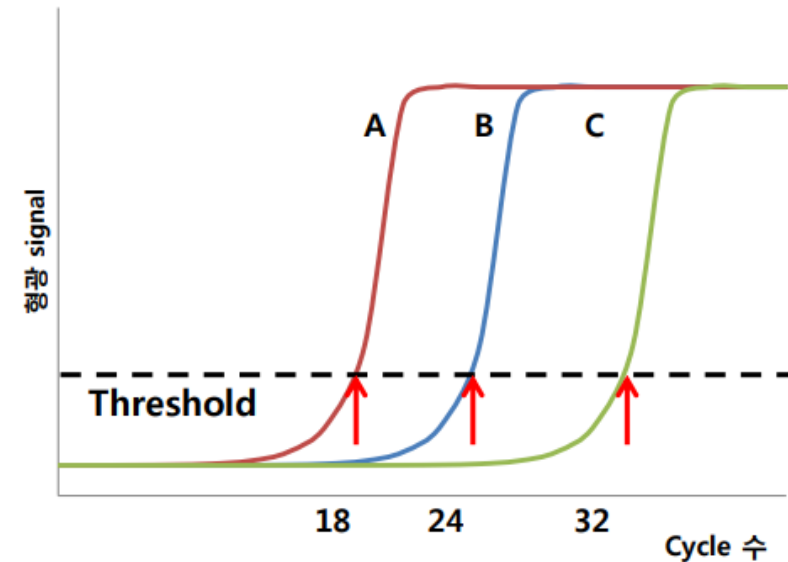
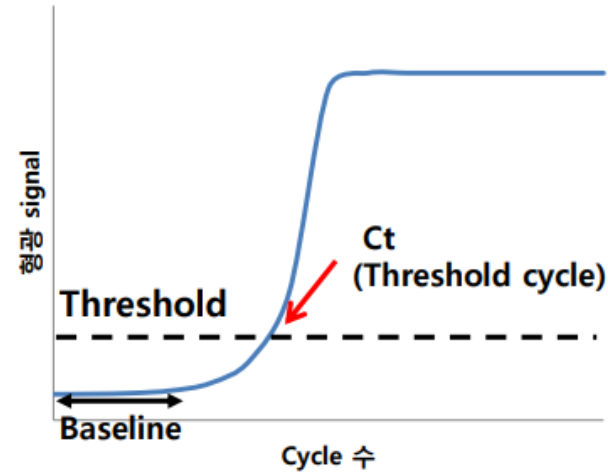
- ✓ 장점 : SYBR는 dsDNA에 결합하는 특징이 있어 특별한 Target sequence가 없어도 결합하므로 특정 target sample이 아닌 폭넓은 범위의 sample에 적용할 수 있는 특징이 있다. 또한 형광이 200배 이상 증폭되기 때문에 새로 합성되는 DNA양에 비례하여 형광의 양이 증폭하며 가격이 저렴하다는 장점이 있다.
- ✓ 단점 : Primer dimer나 primer의 비 특이적인 결합에 의한 산물에 대한 형광을 배제할 방법이 없으므로 아주 정확한 결과를 얻기가 어렵다.

Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

Cross Point 산출법

◆ Ct값(Threshold Cycle)

- 증폭 반응을 일으키는 최소의 역가(Threshold)와 증폭 곡선의 교차점

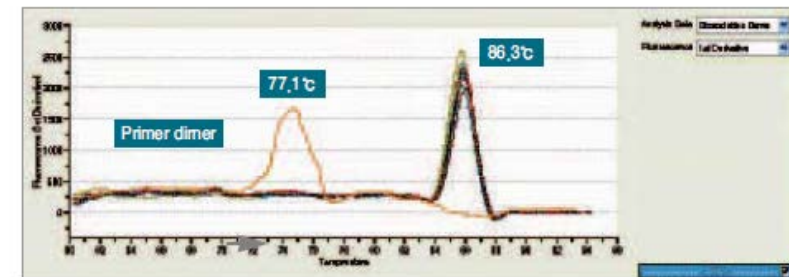
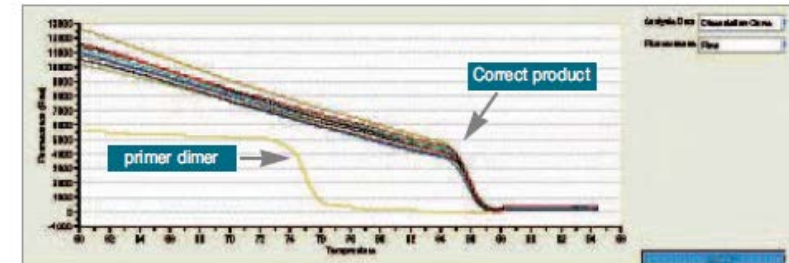


Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

Melting Curve 분석법

◆Melting curve(용해곡선)

- PCR 이후 PCR mixture의 온도를 서서히 올려, SYBR Green의 형광 signal을 모니터링
- PCR 결과물이 double strand이기 때문에 형광 signal을 보이지만, 일정 온도에 이르면 single strand로 분리되어 SYBR Green의 형광 signal이 급격히 감소
- 이 때의 온도를 용해온도라 한다

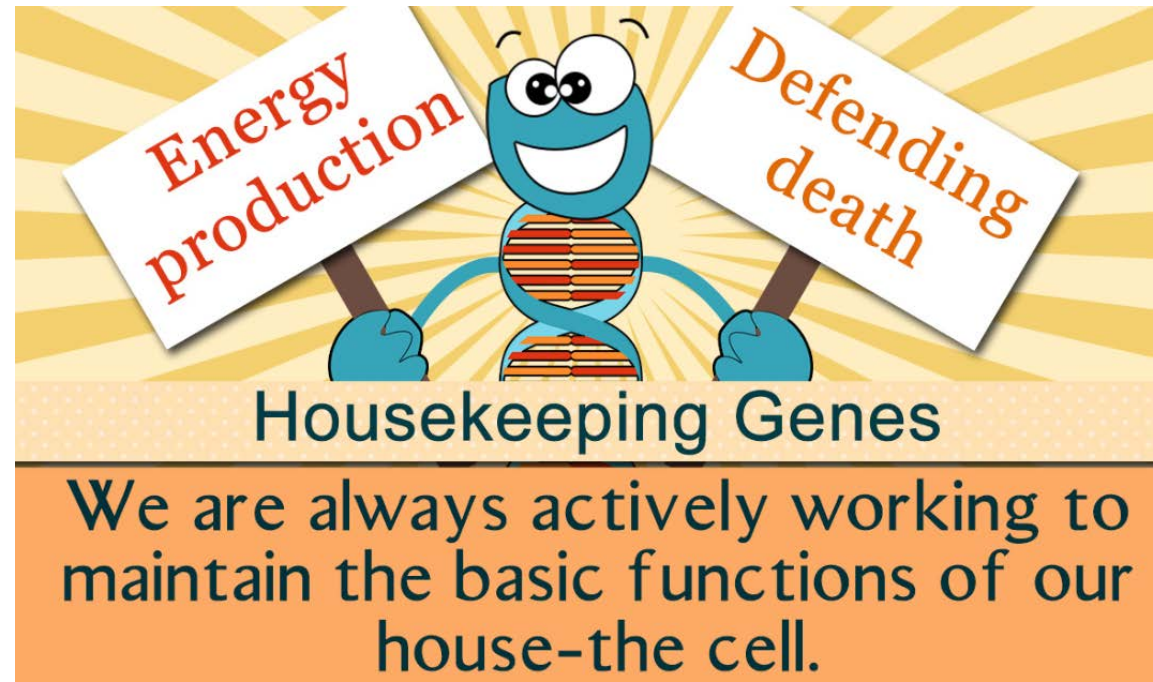


Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

◆ Housekeeping gene

- Housekeeping Gene이란 세포 생존에 필수불가결한 유전자로 어떠한 상황에서도 발현되는 유전자를 의미
- 특정 세포에 관계없이 모든 세포에서 항상 발현되고 세포의 생명 활동에 필수적인 기능을 수행하는 유전자의 총칭. 형질발현이나 DNA 복제, 세포분열, 에너지 대사, 물질대사 등에 관여하는 유전자들이 이에 속함
- housekeeping gene은 control로써 target gene의 발현양을 비교하기 위해 사용

*이번 실험에서의 housekeeping gene은 16s rRNA를 사용



Day 9. Measurement of gene expression by qPCR

1. qPCR mixture 제조

	Volume
cDNA	$2\mu\ell$
Primer	F/R 각 $2\mu\ell$
SYBR Green	$10\mu\ell$
DEPC	$4\mu\ell$
total	$20\mu\ell$

2. qPCR running

Day10

- 총정리 및 Q&A

