

Product News Letter 2호



Newly Developed, Highly Qualified Restriction Enzymes

CUT-PROOF Restriction Enzymes



- ✓ 고 순도 정제 단백질 효소
- ✓ 정확한 Unit 함량
- ✓ 엄격한 품질관리 및 애프터서비스
- ✓ 타사 대비 누구나 만족할 만한 저렴한 가격
- ✓ 충분한 재고확보로 발주 즉시 출고

㈜엘피스바이오텍은
단백질 전문 기술기업입니다
기술혁신형중소기업입니다
ISO9001 인증기업입니다



고객문의 : 042-581-8448
E-mail : sales@elpisbio.com
URL : www.elpisbio.com

제한효소란?

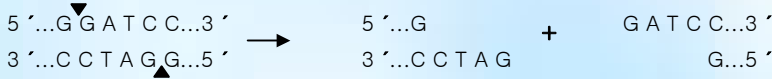
제한효소는 분자생물학의 기본 작업인 클로닝은 물론 유전체의 비교분석 실험 등에 널리 사용되고 있는 가장 기초적인 실험도구입니다. 현재까지 약 18,000여종의 제한효소가 다양한 미생물에서 보고되었으며 (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>), 이중 약 640여종이 제품화되어 판매되고 있습니다. 제한효소에 의한 제한/변형시스템 (restriction/modification system)은 미생물의 방어기작 중 하나로서 외래 유전물질의 침입에 대처하기 위한 미생물의 자구책으로 진화하였습니다. 변형은 methyltransferase에 의해 메틸기가 유전자에 수식되는 방법으로 이루어지며, 제한효소는 메틸기가 도입된 자기 유전자와 메틸기가 없거나 또는 메틸화 패턴이 다른 외래유전자를 정확히 구분하여 절단함으로써 외래유전자를 제거하는 방식으로 이루어지고 있습니다.

제한/변형시스템은 하나의 유전자 클러스터로 작동하는 경우가 많으며, methylase (또는 methyltransferase)는 제한효소와 동일한 서열을 인식하고 있습니다. 메틸기가 수식된 DNA는 제한효소의 접근을 방해함으로써 제한효소의 절단으로부터 유전자를 보호하게 됩니다.

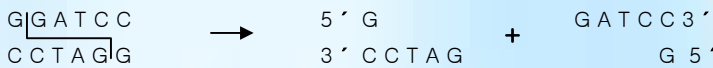
결론적으로 제한효소는 특정한 DNA 서열을 인식하여 절단하는 효소입니다. 클로닝의 가장 기본적인 작업이 DNA를 절단하고 붙이는 것이라 했을 때, DNA 절단은 제한효소에 의해, 붙이는 것은 ligase에 의해 이루어집니다.

제한효소는 인식자리 (recognition site)에서 특정한 염기서열을 인식하고 제한자리 (restriction site)에서 DNA를 절단합니다. 따라서 제품화된 제한효소에는 인식자리와 제한자리를 정확히 표기하여야 합니다. 제한효소의 인식자리와 제한자리의 표기는 제조사에 따라 방식이 조금씩 다를 수 있지만 같은 효소라면 표기방식이 다르더라도 동일한 서열을 인식 절단하는 것이므로 이점만 명심한다면 크게 혼동되는 일은 없을 것입니다. 다음은 BamH I의 표기방법입니다. GGATCC는 BamH I의 인식자리이며 제한자리는 각각 화살표와 실선으로 표기되어 있습니다.

N사의 경우



엘피스바이오텍의 경우



제한효소의 종류

제한효소 소단위 (subunit)의 구성, 서열의 특이성, 절단하는 위치, 그리고 조효소의 종류 및 필요성에 따라 크게 3가지 (I, II, III)로 분류되고 있습니다. 이중에서 우리가 실험실에서 많이 사용하고 있는 제한효소는 II형으로서 서열의 특이성과 절단위치에 따라 8가지로 세분되고 있지만, 크게 주의해야 하는 사항은 methyl기의 존재여부에 따라 제한이 이루어지는 Dpn I 정도입니다.

제한효소는 발견된 미생물의 속명 머리글자 1문자와 종명 머리글자 2문자, 주명으로 표기합니다. 그리고 한 균주가 여러 개의 제한효소를 가지고 있는 경우 발견된 순서에 따라 로마자로 순서를 구분합니다. Xho I의 경우를 보면 *Xanthomonas hollicola*의 첫 문자를 따고 처음 발견되었기 때문에 로마자 I을 넣어 명명한 것입니다. 따라서 동종에서 두 번째로 발견된 제한효소는 Xho II가 됩니다. 흔히 많이 사용하는 효소주의 하나인 EcoR I은 *Escherichia coli* RY13 균주에서 처음 분리된 효소입니다. 따라서 효소의 이름만으로도 효소가 발견된 균주를 추정할 수 있는 것입니다.

제한효소의 활성단위

제한효소의 활성단위는 unit으로 표시되며, 1 unit은 기준조건에서 1 μg의 DNA를 1시간동안 100% 절단할 수 있는 효소의 양으로 표시를 하고 있습니다. 활성단위의 결정은 lambda DNA를 기질로 주로 사용하고 있으며, 경우에 따라서는 methyl기가 없는 lambda DNA (dam 또는 dcm methyl 수식에 의한 절단이 제한되는 효소의 경우)나 또는 pBR322와 같은 plasmid DNA를 사용하기도 합니다.

제한효소는 주로 5-20 unit/μl로 제품화되어 포장되며, 여기에는 pH 유지를 위한 buffer, 50-200mM의 NaCl 또는 KCl, 산화를 방지하기 위한 DTT, 단백질분해효소를 억제하기 위한 EDTA, -20 °C 에서 결빙을 방지하기 위한 50%의 Glycerol이 첨가됩니다.

제한효소의 보관

제한효소는 -20°C 에 보관해야 합니다. 전용 보관용기를 사용하는 것이 가장 좋으며, 전용 보관용기가 없는 경우 냉동고에서 꺼낸 제한효소는 즉시 얼음 위에 두어야 합니다. 제한효소는 -20°C 에 보관하는 경우 1년 이상 안정하지만 상온에 방치하는 경우 활성이 급격히 저하될 수 있기 때문입니다.

장기간 보관하는 경우에는 -70°C 의 초저온 냉동고에 보관하는 것이 바람직하지만, 잦은 해동과 냉동으로 인한 얼음결정의 생성은 효소의 활성에 치명적일 수 있으므로 일회 개봉 후에는 반드시 -20°C 에 보관하는 것이 좋습니다. 다른 모든 단백질 효소류와 같이 보관만 잘 하면 현저한 활성저하 없이 10년은 무난히 사용할 수 있습니다.

Buffer와 BSA는 -20°C 에 보관하는 것을 권장하지만, 4°C 냉장고에 보관하여도 활성저하는 나타나지 않습니다.

제한효소를 잘 사용하는 방법

1. 제한효소 사용시 필수 고려사항

Methyl화 영향 : DNA의 메틸화는 제한효소활성에 중대한 영향을 주므로 사용하고자 하는 제한효소의 메틸화 특성과 자르고자 하는 DNA의 메틸화 여부를 사전에 반드시 확인해야 합니다. 생명체에 존재하는 methyl화 반응은 크게 Dam methylation, Dcm methylation, CpG methylation으로 나눌 수 있는데, Dam과 Dcm methylation은 주로 미생물의 메틸화 반응이고 고등생물의 경우엔 CpG 메틸화 반응이 주를 이루고 있습니다. 따라서 고등동물로부터 추출한 genomic DNA를 절단하고자 할 때 사용할 제한효소가 CpG 메틸화에 영향을 받는지 반드시 확인을 해야 하는 것입니다. 가령 *Ava* I, *Not* I, *Sma* I 등의 효소들은 인식 자리의 C에 메틸기가 붙어 있을 경우, 그 부위를 절단할 수 없습니다. 또한 *Apa* I이나 *Ban* I 등은 인식자리의 다음 염기가 G가 되고 마지막 C염기에 메틸화가 되어 있으면 그 부위를 절단하지 못합니다. 이와 같은 내용은 외우기 쉽지 않은 내용으로서 사전에 제한효소의 메틸화 특성표를 충분히 살펴보아 주의를 기울여야 합니다.

흔히 Plasmid DNA의 cloning에 사용하는 대장균주들은 *dam*과 *dcm* 유전자를 가지고 있습니다. 이와 같은 대장균주에서 정제한 DNA는 GATC의 A염기에 그리고 CCWGG의 처음 C염기에 메틸화가 되어 있는데, 몇몇 제한효소는 이와 같은 메틸화에 의해 절단이 제한되고 있습니다. *Bcl* I, *Dpn* II, *Mbo* I은 Dam 메틸화 DNA를 절단하지 못하며, *Apa* I은 인식자리 GGGCCC 다음에 WGG가 오고 다섯번째 C에 메틸화가 되어 있으면 이 DNA를 자르지 못합니다. 따라서 정확한 메틸화에 대한 이해가 없으면, 제한효소 처리 후 예상외의 분석결과가 나오더라도 이를 적절히 해석하기 어렵습니다.

메틸화반응에 대한 자세한 내용은 초보자로서는 쉽게 이해하기 어려운 내용이지만 제한효소가 메틸화반응에 영향을 받는다는 사실을 주지하고 사전에 메틸화 특성표를 살펴보는 습관만 갖는다면 메틸화반응에 의한 이상결과에 당황하지 않을 수 있습니다.

Additional Base : Plasmid vector를 두개의 제한효소로 절단해야 하는 경우나 또는 PCR 산물을 제한효소로 절단해야 하는 경우에 있어서 인식자리가 DNA의 끝부분에 위치하면 그 DNA는 100% 잘리지 않는 경우가 발생할 수 있습니다. 가령 *Bam*H I을 예로 들어 설명하면, DNA가 5'-GGATCC...-3'의 서열을 가질 때 *Bam*H I의 인식부위는 GGATCC이지만 절단되는 효율은 0%가 됩니다. 한 개의 추가염기가 존재하는 경우 말단에 존재하는 경우, 즉 5'-CGGATCC...-3'의 서열일 때는 20시간을 처리해도 20% 수준밖에 절단이 되지 않습니다. 반면 2개 이상의 추가염기가 존재할 경우 그 효율은 1시간 처리만으로도 90% 이상이 절단되는데, 이와 같이 모든 제한효소에는 100% 절단에 필요한 최소의 추가염기수가 존재합니다. 2-3개만의 추가염기로도 효율이 높은 제한 효소가 있는 반면, *Nde* I과 같은 효소는 최소 7개 이상의 추가염기가 있어야 하는 등 제한효소에 따라 요구되는 추가염기수가 다르므로 사전에 이에 대한 충분한 이해가 필요합니다. 따라서 제한효소의 특성표를 사전에 반드시 확인해 봐야 하는 내용입니다.

반응 부피 : 10-100 μl 가 적절합니다.

DNA의 양 : 0.05-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 DNA가 적절합니다. 너무 높은 농도의 DNA를 사용하면 DNA용액의 높은 점성으로 인해 반응이 저해될 수도 있습니다.

DNA의 순도 : O.D. 260/280 비율이 1.8 이상인 DNA를 권장합니다. DNA를 정제하는 과정에서 오염될 수 있는 salt, ethanol, phenol 등의 오염물질들은 제한효소의 활성을 저해하거나 star activity를 유발할 수 있습니다. 그리고, DNA를 정제하는 과정에 포함될 수 있는 단백질들은 제한효소의 작용에 큰 영향을 주지는 못하지만, *EndA* + 균주를 이용해 정제한 plasmid DNA의 경우에는 endonuclease A가 오염될 수 있으므로 제한효소를 처리하는 과정 중에 endonuclease A에 의해 DNA가 모두 깨질 수 있다는 점에 특히 주의를 해야 합니다.

제한효소의 양 : 1 unit이 1 μg 의 DNA를 자르는 활성단위 임을 고려하여 첨가할 효소의 양을 결정하여야 합니다. DNA의 양과 제한효소의 포장 unit을 고려하지 않은 채 enzyme을 volume 기준으로만 사용하는 것은 좋지 않은 실험방식입니다. 그러나 많은 회사들은 활성 unit 대비 100% 절단을 위해 5-10배 가량의 제한효소 사용을 권장하고 있으며, 경우에 따라서는 반응시간을 늘리는 것 또한 권장하고 있습니다.

반응 온도 : 일반적으로는 37°C 를 권장하고 있으나, 효소에 따라서 25°C 를 권장하는 경우 (Apa I, Sma I) 그리고 50°C (Bcl I, Sfi I)나 65°C (Taq I, Pho I 등)를 권장하는 경우가 있으므로 실험 전 반드시 카탈로그나 매뉴얼을 통해 최적 활성온도를 확인해야 합니다. 그리고 높은 온도에서 장시간 반응을 하게 되면 반응용액의 증발로 최종 부피의 변화가 생길 수 있으므로 장시간 처리를 해야 하는 경우에는 water bath보다는 tube의 내외부 온도가 같아 증발이 이루어지지 않는 항온기를 사용하는 것이 좋습니다.

Buffer의 사용 : 특수한 경우를 제외하고는 기본적인 Buffer 4종이 사용되고 있습니다. 제한효소에 따라 권장 Buffer가 있으므로 반드시 해당하는 Buffer를 사용해야 하며, double cut을 해야 하는 경우엔 도표 (Double Digestion Buffer Guide)를 참조하여 최적의 Buffer를 선택한 후 사용해야 합니다. Buffer는 상온에 보관하더라도 활성저해는 나타나지 않지만 가능한 4°C 에 보관하는 것이 좋습니다.

BSA 등 첨가제 : Bovine serum albumin (BSA)은 효소의 최적활성에 필요한 경우가 있으며, 이는 제한효소의 특성표에 표기되어 있으므로 사전에 확인하여 권장하는 양으로 사용해야 합니다. BSA의 첨가에 대한 언급이 없는 제한효소의 경우에, BSA의 첨가가 반응 저해로 나타나지는 않습니다. 따라서 double cut의 경우, 한 종류의 제한효소 사용에 BSA의 첨가가 표시되어 있다면 BSA를 사용해야 합니다.

반응혼합액의 제조 : 반드시 다음과 같은 순서를 지켜야 합니다.

DNA 용액 → 1/10 vol 10x Buffer → BSA → 제한효소 → 반응

전체 반응용액의 부피를 결정한 후 첨가할 10x Buffer, BSA 그리고 제한효소의 부피를 뺀 만큼 DNA용액의 부피를 계산하여 넣어 주고 위의 순서대로 첨가해야 합니다. 제한효소는 반드시 맨 마지막에 넣어야 한다는 점을 명심해야 합니다. 또한 BSA는 10x Buffer의 조건에서는 높은 염농도로 인해 침전이 발생할 수 있으므로 반드시 희석된 buffer에 첨가해야 합니다.

반응물의 혼합은 가벼운 pipetting이나 손가락으로 tube의 끝을 톡톡치는 정도로 해주는 것이 좋으며, 심한 vortexing을 하게 되면 반응물의 심하게 튀어 최종 부피의 변화가 생길 수도 있음에 주의해야 합니다.

2. 반응 종결 및 분석

불활성화 : 제한효소의 반응 후 불활성화는 반드시 필요한 것은 아니지만, 이후의 다른 작업을 위해 필요하다면 매뉴얼에 있는 방법에 따라 불활성화를 시켜주어야 합니다.

전기영동분석 : 6x Gel loading buffer를 1/6 수준으로 반응액에 첨가한 후 적절한 %의 agarose gel에서 분석합니다.

제한효소의 buffer에 포함되어 있는 salt는 DNA의 전기영동 pattern에 영향을 주어 정확한 크기와 맞지 않는 경우가 발생할 수 있습니다. 따라서 정확한 크기비교를 해야 하는 경우에는 phenol/chloroform 추출방법이나, PCR purification kit를 이용해 DNA를 사전에 깨끗이 정제한 후 전기영동 분석을 하는 것이 좋습니다.

전기영동 분석은 0.5x TAE buffer를 사용하는 것이 보편적이며, 보다 나은 해상도를 요구하는 실험의 경우엔, 0.5x 또는 1x TBE buffer system을 권장합니다.

DNA전기영동의 해상도는 사용하는 agarose의 품질과도 밀접한 관계가 있으므로 좋은 결과를 위해서는 좋은 품질의 agarose를 사용해야 합니다.

6x Gel loading buffer : 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol

50x TAE buffer : 242g Tris base, 37.2g Na_2EDTA in 900ml DW. Add 57.1ml glacial acetic acid and adjust to final 1Liter

사용하기 전에 증류수로 100배 희석하시면 됩니다.

1% Agarose gel (0.5x TAE) : 1g agarose를 저울로 재어 100ml의 0.5x TAE에 넣고, 4-6분간 전자레인지로 이용해 녹여줍니다. 부족한 부분은 증류수 (절대 TAE가 아님)로 채우고 손으로 만졌을 때 따뜻한 정도까지 식힌 후 EtBr를 첨가하고, gel tray에 부어 굳히면 됩니다. 남은 gel용액은 55°C 항온기에 보관하시면 됩니다.

표준반응 예시

예시1) 1 µg의 pBluescript DNA를 cloning을 위해 BamH I과 Xho I으로 절단하는 경우

- 1 µg pBluescript in 16 µl DW
- 2 µl 10x BamH I buffer
- 0.2 µl 100x BSA
- 0.1-0.5 µl BamH I (10 unit/µl)
- 0.1-0.5 µl Xho I (10 unit/µl)
- Adjust to final 20 µl with DW, incubate for 1-2hr at 37°C
- Gel electrophoresis on a 0.7% agarose gel in 0.5x TAE
- DNA purification by Gel Extraction Kit

예시2) 1 µg의 pBluescript DNA를 cloning을 위해 Sma I으로 절단하고 Alkaline phosphatase를 처리하는 경우

- 1 µg pBluescript in 16 µl DW
- 2 µl 10x Buffer 4
- 0.1-0.5 µl Sma I (10 unit/µl)
- Adjust to final 20 µl with DW, incubate for 1-2hr at 25°C
- Add alkaline phosphatase to reaction mix according to the user's manual
- Gel electrophoresis on a 0.7% agarose gel in 0.5x TAE
- DNA purification by Gel Extraction Kit

Note: Alkaline phosphatase의 처리는 제한효소 buffer를 그대로 사용해도 무방하나, 반드시 DNA의 몰수를 계산하여 정해진 unit을 정해진 사용방법에 따라 사용해야 합니다.

예시3) PCR 산물을 이용해 제한효소 절단 후 cloning하는 방법

Primer의 디자인 : 증폭하여 cloning하고자 하는 DNA의 제한효소 인식자리를 인터넷상의 제한효소분석 사이트로부터 확인한 후 (www.encyclon.net/seqsenser/Restriction) DNA의 내부에 인식부위가 없는 제한효소를 결정합니다. Cloning에 사용하고자 하는 효소의 최소 염기수를 특성표에서 확인합니다. 즉, BamH I을 사용하고자 하는 경우에,

5' -RRR-GGATCC-.....-3'

추가염기3개 BamH I

증폭특이서열

추가염기의 염기서열은 임의로 결정할 수 있으며 전체 primer의 Tm값을 맞춰 결정하는 것이 좋습니다. 90% 이상의 절단효율을 위해 필요한 추가염기수는 제한효소에 따라 다르므로 반드시 제한효소의 추가염기 특성표를 확인해야 합니다.

PCR증폭 : Cloning에 사용할 PCR 산물은 가능한 돌연변이율이 낮은, 즉 fidelity가 높은 Taq 효소를 사용하는 것이 바람직합니다. 그러나 아무리 fidelity가 높은 Pfu를 사용하더라도 전혀 돌연변이가 발생이 없다는 의미는 아니므로 최대한 돌연변이를 방지하기 위해 조건을 최적화해야 합니다.

PCR산물의 정제 : 제한효소를 처리하기 위해서는 사전에 반드시 PCR purification kit를 이용해 증폭 DNA를 고순도로 정제해야 합니다. 정제도가 낮을 경우, DNA에 포함된 salt와 각종 물질들이 제한효소의 활성을 저해할 수 있습니다. 또한 Taq polymerase는 DNA와의 친화도가 높기 때문에 DNA에 결합되어 있는 Taq polymerase가 제한효소의 인식부위를 가려 절단을 방해할 수도 있으므로 반드시 정제과정을 거친 후 제한효소 절단에 사용해야 합니다.

제한효소 처리 : BamH I과 Xho I을 사용한 경우

- 0.1-1 µg PCR products in 16 µl DW
- 2 µl 10x BamH I buffer
- 0.2 µl 100x BSA
- 0.1-0.5 µl BamH I (10 unit/µl)
- 0.1-0.5 µl Xho I (10 unit/µl)
- Adjust to final 20 µl with DW, incubate for 1-2hr at 37°C
- Gel electrophoresis on a 0.7% agarose gel in 0.5x TAE
- DNA purification by Gel Extraction Kit



자주하는 질문

1) 제조사가 다르더라도 Buffer를 공유해 사용할 수 있나요?

저희 엘피스바이오텍을 포함한 많은 제조사들은 최적의 활성조건을 제공하기 위해 자사에서 제공하는 buffer의 사용을 권장하고 있습니다만 효소가 같다면, 타사의 buffer를 사용해도 무방합니다. 단 buffer의 조성이 정확히 같은 것인지, 혹은 효소가 정확히 같은 것인지를 사전에 확인해야 합니다 (가령 어떤 회사는 인식자리와 절단자리는 동일하지만 효소의 이름이나 기원이 다른 것을 판매하기도 합니다).

제한효소에 사용되는 기본 buffer는 4종입니다. 이는 대부분의 제조사가 동일하며 buffer의 명칭이 다르고 순서는 다르지만 (A B C D, 1 2 3 4, I II III IV 등) 구성성분을 확인하면 크게 다르지 않습니다. 추가로 BamH I, EcoR I, Sal I 등의 몇몇 효소는 기본 buffer가 아닌 특이 buffer를 제공하고 있으며, 이는 기본 buffer에서 포함된 염류농도가 아닌 보다 정확한 염류의 농도를 요구하는 경우에 한하고 있습니다.

2) 제한효소의 품질을 결정하는 요인은 무엇인가요?

모든 단백질 효소들이 마찬가지로 이지만 제한효소의 품질을 결정하는 요인 중 가장 중요한 것은 효소의 정제도와 활성도입니다. 현재 세계적으로 판매되고 있는 많은 효소 제품들은 대장균을 발현숙주로 이용해 재조합으로 발현하고 정제한 효소들입니다. 제한효소의 품질을 결정할 때 정제도가 중요한 이유는 정제과정 중 오염될 수 있는 exo, endonuclease의 존재입니다. 많은 회사들은 RR10이나 HB101 균주와 같이 endonuclease A (endA) 유전자를 가지는 균주를 발현숙주로 사용하고 있으며, 정제과정에서 endonuclease가 오염되게 되면 제한 절단하고자 하는 DNA를 서서히 깨버릴 수 있습니다. 이는 아주 미세한 차이로 cloning의 효율을 방해할 수 있으며, 필자 역시 이와 같은 상황을 수 차례 경험한 바 있습니다.

그러나, 저희 엘피스바이오텍은 endA 음성 균주를 재조합 발현에 사용하고 있으며, 또한 음이온 교환방법 보다는 친화성 결합방법을 이용해 순도 99%로 제한효소를 정제하고 있습니다. 따라서 exo, endonuclease의 오염을 원천적으로 막아놓고 있는 것입니다. 또한 순수 정제된 단백질을 이용하므로 specific activity (unit/mg)가 타사의 제품에 비해 월등히 뛰어납니다.

결론적으로 제한효소는 잘 자르지만 하면 되는 것이 아니라 잘 붙일 수 있도록 절단된 부위에 손상을 주지 말아야 합니다.

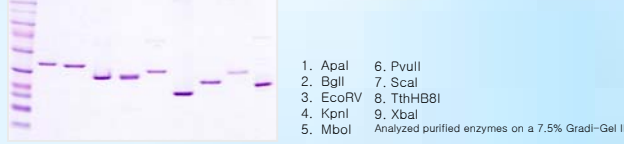
3) 제한효소의 unit은 어떻게 결정하는 것인가요?

제한효소는 1µg의 DNA를 정해진 조건에서 1시간동안 자르는 양으로 1 unit을 결정합니다. 보통은 lambda DNA를 기질로 이용하고 있습니다. 참 쉽죠~잉. 제한효소의 활성 unit이 정확한 것인지 또는 실패되지 않았는지를 확인하는 방법으로 누구나 쉽게 할 수 있는 방법입니다. 즉 제조사에서 시행하는 QC를 재연해 보면 제한효소를 이용한 cloning 과정에서 문제점이 나타날 경우, 그 문제점을 쉽게 찾을 수 있는 방법이 됩니다.

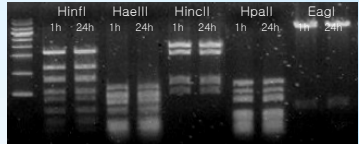
4) 제한효소의 QC는 어떤 방법으로 이루어지나요?

제한효소는 정제도를 확인하기 위해 정제 후 SDS-PAGE분석을 합니다. 정제된 효소의 unit을 결정하는데, 50, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.2 unit에서 절단되는 정도를 수치화하여 정확한 unit을 결정하고 50 unit에서 over-digestion하여 star activity는 없는지, endonuclease의 오염은 없는지를 확인해 줍니다. 또한 over-digestion한 DNA를 T4 DNA ligase를 이용해 ligation이 정상적으로 이루어지는지를 확인하는데, 이 과정에서 exonuclease의 오염여부를 재차 확인합니다. Ligation한 DNA는 다시 절단하여 정상적으로 절단되는지를 재 확인합니다. 마지막으로 흔히 사용하는 cloning vector를 이용해 절단한 DNA, 절단 후 ligation한 DNA를 대장균에 형질전환시켜 실제 형질전환효율을 확인합니다.

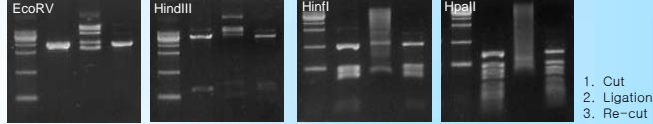
1. Purity by SDS-PAGE



2. Contamination of exo and endonuclease



3. Over-digestion and ligation/re-cut



5) 제한효소의 보관, 및 유효 사용기간

제한효소는 -20°C 에 보관해야 합니다. 전용 보관용기를 사용하는 것이 가장 좋으며, 전용보관용기가 없는 경우엔 냉동고에서 꺼낸 제한효소는 즉시 얼음 위에 두어야 합니다. 제한효소는 -20°C 에 보관하는 경우에 1년 이상 안정하지만 상온에 방치하는 경우라면 활성이 급격히 저하될 수 있기 때문입니다.

장기간 보관하는 경우에는 -70°C 의 초저온 냉동고에 보관하는 것이 바람직하지만, 잦은 해동과 냉동으로 인한 얼음결정의 생성은 효소의 활성에 치명적일 수 있으므로 일회 개봉 후에는 반드시 -20°C 에 보관하는 것이 좋습니다. 모든 단백질 효소류가 그렇듯이 보관만 잘 하면 현저한 활성저하 없이 10년은 무난히 사용할 수 있습니다.

Buffer와 BSA는 -20°C 에 보관하는 것을 권장하지만, 4°C 냉장고에 보관하여도 활성저하는 나타나지 않습니다.

저희 엘피스바이오텍의 제품 유효사용기간은 2년으로 하고 있습니다.

6) Star activity가 뭔가요?

제한효소를 중에는 fidelity가 낮은 것들이 있습니다 (Ase I, BamH I, EcoR I, EcoR V, Hind III, Hinf I, Pst I, Pvu II, Sal I, Sca I 등)
제한효소에서 fidelity란, 정해진 염기서열을 얼마나 정확히 인식하느냐의 척도로서 제한효소 고유의 특성입니다. Fidelity가 낮다는 것은 정해진 서열 외에 유사한 서열에서 DNA를 절단할 수 있다라는 의미입니다. 하지만 사용방법만 정확하다면 Star activity는 발생하지 않습니다. Star activity를 유발하는 요인으로는, DNA의 양에 비해 과도한 효소 첨가, 낮은 salt 농도, 5% 이상의 glycerol 농도, 높은 pH, 비권장 온도 등 다양합니다. 하지만 정해진 활성 unit을 사용하고, 정제도가 높은 DNA의 사용만으로도 star activity는 평생 걱정하지 못할 수도 있습니다. 그리고 구경하지 말아야 할 것이 Star activity입니다.

7) Isoschizomer와 compatible end는 무엇이며 차이가 어떤 것인가요?

기원이 다르고 이름은 다르지만 같은 제한서열을 갖는 효소를 isoschizomer라고 합니다. Hinc II와 Hind II는 유전자상에서도 같은 효소이지만, 기원이 다른 경우이고, Mbo I과 Dpn II, Sau3A I은 유전자도 다르고 기원도 다르지만 같은 인식자리와 같은 제한자리를 갖는 대표적인 isoschizomer들입니다. Compatible end를 갖는다는 의미는 완전히 다른 제한효소이지만, 절단 후 절단부위가 100% 일치하여 ligation 될 수 있는 경우입니다. 예를 들어 설명하면, BamH I, Bgl II, Mbo I은 각각 GGATCC, AGATCT, GATC의 제한자리를 인식하지만, 절단부위는 모두 GATC이므로 이 세 종류의 enzyme으로 처리하여 절단한 DNA는 모두 ligation이 가능합니다. Sal I과 Xho I은 또 다른 대표적인 compatible end를 만드는 효소들입니다. Compatible end를 만드는 제한효소에 대해 좀더 주의를 기울이면 특정 제한 자리를 없애거나 또는 multimer ligation에 이용할 수 있는 등 활용성을 높일 수 있습니다.

8) 메틸화 DNA는 무엇인가요? 그리고 효소반응에서 왜 중요한가요?

주의해야 하는 메틸화 반응은 크게 세가지 입니다. CpG methylation, Dam methylation, Dcm methylation. 메틸화된 DNA는 제한효소에 의해 절단되지 않을 수도 있으므로 사용하고자 하는 제한효소가 메틸화에 의해 영향을 받는 것인지 실험 전에 반드시 확인을 해야 합니다. 가령 Mbo I은 GATC를 제한하는 효소로서 A 염기에 메틸화가 된 DNA는 자르지 못하며 GATC서열은 일반적인 대장균에서 모두 메틸화가 됩니다 (Dam methylation). 따라서 Dam 유전자 돌연변이형이 아닌 일반 균주에서 정제한 DNA는 Mbo I으로는 잘리지 않습니다. 또한 고등동물의 일반적인 메틸화인 CpG methylation은 DNA의 CG 서열에서 C염기에 메틸기를 붙이는 것으로서 이와 같이 C염기에 메틸화가 되면 다수의 효소들이 작동을 하지 못하므로 미리 그 활성여부를 확인해야 합니다.

내 sample DNA에 메틸화되어 있는지? 그리고 어떤 염기에 메틸화되어 있는지? → 사용하고자 하는 제한효소가 해당 메틸화에 영향을 받는지?

9) 두개의 제한효소를 동시에 사용하고자 할 때 고려해야 하는 내용은 무엇인가요?

두개의 효소를 처리해야 하는 경우, 가장 이상적인 경우는 한번에 그리고 동시에 처리하는 것이지만 여러 가지 이유로 그럴 수 없을 때도 있습니다.

1. Buffer의 차이
2. 반응온도의 차이
3. 인식자리의 근접성
4. 절단에 필요한 최소 말단 염기 수

두 효소가 같은 buffer를 사용하는 경우인지 아니면, 동시에 처리할 수 있는 buffer가 있는지를 먼저 확인해 봐야 합니다 (Double Digestion Guide Table 참조). 같은 buffer를 사용하더라도 반응온도에 있어서 현저한 차이를 보인다면 함께 반응하기가 어려우며, 이 경우에는 한가지 효소를 먼저 넣고 반응이 끝난 후 다음효소를 넣은 방법을 사용하면 됩니다.

하지만 모든 것을 만족하더라도 인식자리가 너무 가까워 절단이 불가능한 경우나 또는 한가지씩 자르더라도 절단에 필요한 최소염기수가 적은 경우에는 동시절단이 불가능할 수도 있습니다.

다음과 같은 경우는 근접성과 최소 염기수를 고려했을 때 같은 효소를 사용하더라도 순서에 따라서 절단이 될 수 있는 경우와 없는 경우를 보여주고 있습니다.

5'-.....GGATCC CATATG...-3'

BamH I Nde I

- BamH I과 Nde I을 동시처리 → 동시 절단 불가
- BamH I을 먼저 처리하고 Nde I을 처리 → 절단효율이 극히 낮음
- Nde I을 먼저 처리하고 BamH I을 처리 → 정상적으로 절단

그 이유를 설명하면 BamH I은 절단에 필요한 최소 말단 염기가 2개인데 반해 Nde I은 최소 7개이기 때문입니다. 따라서 Buffer의 호환성, 인식자리의 근접성과 말단 염기 수 그리고 반응온도를 모두 고려해야 합니다.

10) Supercoiled Plasmid DNA와 linear DNA를 기질로 하는 경우에 있어서 반응의 차이점이 있나요?

Supercoiled DNA는 linear DNA에 비해 접근성이 용이하지 않으므로 더 많은 unit의 제한효소를 사용해야 합니다. 예를 들면 Sca I의 경우에 절단효율은 linear DNA에 비해 plasmid DNA의 효율이 5~10% 정도입니다. 따라서 이러한 경우에는 더 많은 제한효소를 반응에 사용해야 합니다.

11) 제한효소 처리 후 불활성화가 반드시 필요한가요?

제한효소 처리의 일반적인 목적은 ligation에 사용할 DNA 절편을 준비하는 것이 전부라 해도 과언이 아닙니다. 이런 경우, 제한효소를 처리한 DNA는 보통 phenol 추출이나 DNA extraction kit를 이용해 정제를 하므로 정제 전 불활성화는 별 의미가 없습니다. 이는 효소가 phenol이나 또는 DNA extraction buffer에 있는 chaotropic agent에 의해 denature됨으로써 제거되기 때문입니다. 하지만 제한효소 처리 후 직접 다른 반응 (ligation이나 또는 순차적인

이중효소처리)을 할 목적이라면 가장 보편적인 불활성화가 열에 의한 것입니다. 많은 제한 효소들이 65℃에서 20-30분 정도 열처리하는 것만으로도 활성이 없어지지만, 80℃ 이상에서 생존하는 효소도 있기 때문에 열처리를 하기 전 적절한 처리시간과 온도를 반드시 확인하는 것이 좋습니다.

12) 제한효소 처리 후 DNA절편의 예측 크기와 다르게 나오는 이유는 무엇인가요?

제한효소 처리 후 정제과정 없이 직접 전기영동을 해보면 예측한 크기보다 크게 나오는 경우를 본적이 있을 겁니다. 이와 같은 현상은 제한효소의 buffer에 존재하는 salt의 양적 차이에 의해서 나타나는 것으로 salt의 농도가 높을 수록 DNA의 이동은 방해받기 때문에 크기가 다르게 보이는 정도가 커집니다. 보통은 그러려니 하지만 제한효소를 사용해 본 경험이 없고 꼼꼼한 성격이라면, 절단부위에 대한 정보가 잘못되었다고 판단할 수 있으나 이는 지극히 정상적인 것으로서, 제한효소 처리한 DNA를 정제하여 salt를 없앤 후 전기영동을 해보면 정확한 제 크기로 이동하는 것을 볼 수 있습니다.

또한 제한효소에 따라 salt의 요구농도가 다르므로 (사용하는 buffer가 다르므로), 모든 제한효소에서 이러한 현상이 나타나는 것은 아닙니다.

13) 제한효소만 처리하면 DNA가 모두 깨집니다. 왜 그럴까요?

제한효소를 처리하다 보면 간혹 smear되어 나오는 결과를 얻는 경우도 있습니다. 이런 경우는 두 가지를 생각해 봐야 합니다.

1. DNA를 추출한 균주가 endonuclease를 가지고 있는 것인지? Cloning에 사용되는 일반적인 대장균들은 (DH5a, XL1-blue 등) endA를 없앤 돌연변이 균주들입니다. 이는 정제한 DNA에 즉, endonuclease가 조금이라도 오염되게 되면 DNA가 자동적으로 깨져나가는 현상이 나타나기 때문입니다. 하지만 야생 균주를 사용한 경우나 또는 BL21 균주를 사용한 경우에는 endA가 활성화되어 있기 때문에 아무리 plasmid DNA를 깨끗이 정제했다 할지라도 pg수 준이하로 오염될 수 있는 endonuclease가 DNA를 순식간에 깨버릴 수 있습니다. 이 경우에는 정제과정에서 endonuclease의 오염을 없애는 전용 DNA 정제키트를 사용하는 것이 좋습니다.
2. 제한효소의 star activity : 과량의 효소를 사용하거나 buffer를 잘못 사용하는 경우, 그리고 DNA가 깨끗하지 못한 경우에서 star activity를 보이는 일부의 효소들은 과반응에 의해 DNA를 무작위로 절단할 수 있습니다. 제조사의 권장 방법에 따라 최적의 조건으로 제한효소 처리를 하는 방법밖에는 도리가 없습니다.
3. 흔한 경우는 아니지만 시약이나 buffer가 오염되어 있는 경우에도 이러한 현상은 나타날 수 있습니다. 특히 gel loading buffer나 전기영동 buffer가 심하게 오염된 경우에 발생할 수 있는 현상으로서 전기영동 buffer는 이물질이 발생한 경우 즉시 교체해 주는 것이 좋습니다.

14) 제한효소 처리 후 확인해 보면 잘 잘린 것 같은데, transform을 해보면 self가 많이 뜹니다. 왜 그런가요?

어떤 반응이던 100%는 없습니다. 99.999%의 효율을 가지고 있는 경우, 육안으로는 모두 잘린 듯 하지만 남아있는 0.001%의 절단되지 않은 DNA는 대장균을 transform을 시키기에 충분한 양일 수 있습니다. 따라서 단일효소를 사용한 경우라도 절단된 DNA와 circular DNA의 크기가 차이 나는 점을 이용해 전기영동 후 gel정제를 통해 DNA를 준비하는 것이 좋습니다. 또는 자주 사용하는 vector의 경우, 제한효소자리의 중간부분에 임의의 DNA조각을 넣어놓고 (stuffer), 제한효소를 처리해 stuffer가 제거된 정확한 크기의 vector DNA만을 정제해 사용하는 것도 한 방법입니다.



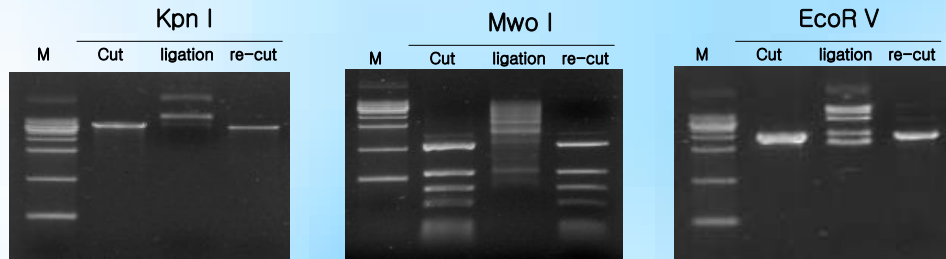
15) 제한효소 처리는 잘 되었지만 transform을 해보면 colony가 없습니다. 왜 그럴까요?

제한효소 자체에 또는 DNA 샘플에 exonuclease가 오염된 경우에, 제한 절단에 의해 생성된 sticky end가 잘려나가 T4 DNA ligase에 의해 접합이 안될 수도 있습니다. 저 역시 이러한 경우로 인해 고생을 한적이 몇 번 있습니다. DNA 샘플이 오염된 경우라면, 다시 준비하면 되겠지만, 제한효소가 오염된 경우라면 사실 문제확인이 아주 어렵습니다. 이런 점 때문에 저희 회사는 모든 효소들에 대해, cut, ligation, re-cut의 QC는 물론 transformation 실험을 하고 있습니다.

하지만, transformation은 DNA의 상태, 절단 효율, DNA의 양, T4 DNA ligase의 활성 그리고 적절한 사용방법, 마지막으로 Competent cell의 transformation효율 등 아주 다양한 요인들에 의해 영향을 받을 수 있는 것이므로 이 모든 상황에 대해 실험자 스스로 QC매뉴얼을 가지고 있는 것이 좋습니다.

16) 제한효소 처리 후 잘 잘린 것은 알겠는데, 잘 붙는 것은 어떻게 확인을 하나요?

제한효소 처리한 DNA를 T4 DNA ligase로 처리하고 전기영동을 해보면 됩니다. 단일 절단이면 이중 절단이면 DNA간의 접합이 이루어 지므로 단일 band가 아니며 원래 DNA 크기보다 크고 또한 크기가 다른 여러 개의 band를 관찰할 수 있어야 합니다. Ligation이 덜 되었거나 또는 ligation이 안되었다면, 원래 크기의 단일 band가 많거나 또는 전부이어야 합니다. 아래 사진은 pBluescript vector를 해당하는 제한효소로 자른 후 T4 DNA ligase로 접합하고 다시 제한효소로 자른 결과를 보여주고 있습니다. 보시는 바와 같이 DNA가 접합되어 큰 size의 multi band로 나타나고 있는데, 이는 제한효소의 QC 뿐만 아니라 T4 DNA ligase의 활성 QC방법으로도 유용하게 사용할 수 있습니다.



17) 제한효소 처리 후 보관은 어떻게 하나요?

제한효소 처리 후, 즉시 실험을 수행하지 못하는 경우에는, 4℃ 에 보관하여도 무방합니다. 장기보관을 해야 하는 경우에는 -20℃ 에 보관하여야 합니다.

18) 제한효소 처리는 어디에서 하는 것이 좋은가요?

제한효소 처리는 항온기, 항수조, 히팅블록, PCR기계 등 사용자의 취향에 따라 다르게 사용하고 있습니다. 항수조는 온도전달이 빨라 효소반응에 많이 사용하고 있으나, 튜브 내 용액의 증발현상이 발생할 수 있어 자주 확인해 주고 원심분리를 해주지 않으면 용액 내 구성물의 농도변화가 발생하게 되어 예측하지 못한 현상이 발생할 수도 있습니다. 장시간 처리해야 하는 경우에는 내외부의 온도가 같은 항온기를 사용하는 것이 바람직하며, PCR기계를 이용하는 것도 한 방법입니다.

19) 제한효소 위치 찾는 프로그램?

제가 주로 사용하는 프로그램은,

<http://www.encyclon.net/seqsenser/Restriction>

회원가입 후 사용하시면 됩니다.

Methylation Sensitivity

Blocked by CpG methylation

Aat II, Age I, Ava I, Cla I, Eag I, Fsp I, Hae II, Hha I, Hpa II, Kas I, Mlu I, Nae I, Nar I, Not I, Nru I, Pvu I, Sac II, Sma I, SnaB I, Xho I

Blocked by overlapping CpG methylation

Acc I, Apa I, ApaL I, Ava II, Ban I, Bgl I, Dpn II, Dra III, EcoR I, EcoR V, Hinc II, Hinf I, Hpa I, Mbo I, Mwo I, Nhe I, Sfi I

Blocked by *dam* methylation

Bcl I, Dpn II, Mbo I

Blocked by overlapping *dam* methylation

Cla I, Hph I, Nru I, Xba I

Blocked by overlapping *dcm* methylation

Apa I, Ava II, Ban I, Sfi I

Double Digestion Buffer Guide

Enzyme	Buffer	Aat II	BamHI	BglII	Eag I	EcoRI	EcoRV	Hind III	Kpn I	Nco I	Nde I	Nhe I	Not I	Pst I	Pvu I	Sac I	Sac II	Sal I	Sma I	Spe I	Sph I	Xba I	Xho I
Buffer	4	BamHI	3	3	EcoRI	3	2	1	4	4	2	3	3	3	1	4	3	4	4	2	4	4	
Aat II	4	--	seq	seq	seq	4	4	4	4	4	4	seq	4	seq	4	4	seq	4	4	4	4	4	
BamHI	BamHI	seq	--	3	3	EcoRI	3	seq	seq	3	3	seq	3	3	3	seq	seq	3	seq	seq	3	3	3
BglII	3	seq	3	--	3	EcoRI	3	2	2	3	3	2	3	3	3	2	seq	3	seq	2	2	2	3
Eag I	3	seq	3	3	--	EcoRI	3	seq	seq	3	3	seq	3	3	3	seq	seq	3	seq	seq	3	3	3
EcoRI	EcoRI	seq	EcoRI	EcoRI	EcoRI	--	EcoRI	seq	1	EcoRI	EcoRI	1	EcoRI	EcoRI	EcoRI	1	EcoRI	EcoRI	seq	EcoRI	EcoRI	seq	EcoRI
EcoRV	3	4	3	3	3	EcoRI	--	2	2	3	2	2	3	3	3	2	3	4	2	2	2	2	3
Hind III	2	4	seq	2	seq	seq	2	--	2	2	2	2	2	2	2	2	2	seq	4	2	2	2	2
Kpn I	1	4	seq	2	seq	1	2	2	--	1	1	1	2	1	2	1	4	seq	seq	1	1	2	1
Nco I	4	4	3	3	3	EcoRI	3	2	1	--	4	2	3	3	3	1	4	3	4	4	2	4	4
Nde I	4	4	3	3	3	EcoRI	2	2	1	4	--	4	3	3	3	4	4	3	4	4	2	4	4
Nhe I	2	4	seq	2	seq	1	2	2	1	2	4	--	2	2	2	1	4	seq	4	2	2	2	2
Not I	3	seq	3	3	3	EcoRI	3	2	2	3	3	2	--	3	3	2	2	3	seq	2	2	3	3
Pst I	3	4	3	3	3	EcoRI	3	2	1	3	3	2	3	--	3	1	2	3	4	2	2	3	3
Pvu I	3	seq	3	3	3	EcoRI	3	2	2	3	3	2	3	3	--	2	2	3	seq	2	2	3	3
Sac I	1	4	seq	2	seq	1	2	2	1	1	4	1	2	1	2	--	4	seq	4	1	1	4	1
Sac II	4	4	seq	seq	seq	EcoRI	2	2	4	4	4	4	2	2	2	4	--	seq	4	4	4	4	4
Sal I	3	seq	3	3	3	EcoRI	3	seq	seq	3	3	seq	3	3	3	seq	seq	--	seq	seq	3	3	3
Sma I	4	4	seq	seq	seq	seq	4	4	seq	4	4	4	seq	4	seq	4	4	seq	--	4	4	4	4
Spe I	4	4	seq	2	seq	EcoRI	2	2	1	4	4	2	2	2	2	1	4	seq	4	--	2	4	4
Sph I	2	4	3	2	3	EcoRI	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	4	3	4	2	--	2	2
Xba I	4	4	3	2	3	seq	2	2	2	4	4	2	3	3	3	4	4	3	4	4	2	--	4
Xho I	4	4	3	3	3	EcoRI	3	2	1	4	4	2	3	3	3	1	4	3	4	4	2	4	--
Xma I	4	4	seq	seq	seq	seq	4	seq	4	4	4	4	2	4	seq	4	4	seq	4	4	4	4	4

효소반응시 문제점과 해결방안

문제	원인	해결방안
DNA가 잘리지 않거나 부분적으로 잘리는 경우	DNA가 깨끗하지 않은 경우	DNA를 분광광도계와 아가로즈 젤 전기영동을 이용하여 정확한 농도와 순도를 확인해야 합니다. 순도가 낮으면 제한효소가 제대로 작용하지 못하게 됩니다. 따라서 Phenol/Chloroform 추출방법으로 단백질을 제거하고, 에탄올 침전을 통해 불순물을 제거하거나 또는 DNA 분리 kit 등을 이용하여 정제도를 높인 후 제한 효소를 처리해야 합니다.
	DNA 농도가 너무 높거나 낮은 경우	DNA 농도가 지나치게 높으면 정도가 높아져 효소 반응이 저해를 받게 되므로 희석하여 반응하고 너무 낮은 경우는 반응 효소의 Km 값이 낮아지기 때문에 부분 절단 현상이 나타나게 되므로 DNA를 더 첨가하여 반응해야 합니다.
	DNA의 메틸화 (dam, dcm, CpG methylation)	이용하는 제한효소가 DNA 메틸화에 영향을 받는지를 확인하여 메틸화에 영향을 받는다면 메틸화에 영향을 받지 않는 isoschizomer를 이용하거나, 기질 DNA를 메틸라제 (methylase) 유전자 없는 대장균주 (예 JM110; dam- dcm-)를 이용하여 분리하여 이용해야 합니다. Dpn I과 같은 일부 제한효소는 염기(N6-methylated adenine)에 메틸화되어 있을 때 작용하므로 methylase 유전자가 있는 대장균주로부터 기질 DNA를 분리하여 이용해야 합니다.
	Supercoil form DNA인 경우	기질 DNA가 Supercoil form인 경우에 linear form에 비해 구조적인 문제로 절단이 잘 안 되는 경우가 있으므로 더 많은 제한효소를 필요로 합니다. 일반적으로 제한 효소 unit은 linear DNA (lambda)를 기준으로 하기 때문에 supercoil DNA의 절단을 위해서 필요한 효소량을 확인하여 절단하며, supercoiling에 저해를 받지 않는 제한효소를 먼저 처리한 후, 다른 제한 효소를 처리하거나, topoisomerase 등을 처리하여 DNA를 풀어진 상태로 변형시켜 처리하는 방법도 있습니다. 또한 제한 효소 unit 을 정하는 기준 DNA 보다 절단 부위의 개수가 현저하게 다를 경우 제한 효소의 양을 증가시켜 반응해야 합니다.
	DNA 염기서열 정보가 잘못된 경우	DNA의 염기서열에서 제한효소 부위와 개수를 확인해야 합니다.
	제한효소가 불활성 되거나 약화된 경우	제한효소의 활성도를 나타내는 unit은 linear DNA 1 µg을 1시간에 모두 절단 할 수 있는 제한효소의 양을 의미하므로 Lambda DNA나 기질 DNA를 이용하여 효소의 활성을 검사하여 활성 상태를 확인해야 합니다. 많은 제한 효소는 열에 약해 불활성화 되거나 공기에 노출되어 단백질 산화가 되어 변성될 수 있으므로 제한효소는 장시간 외부노출을 하지 말고 희석하는 경우나 또는 반응액에 첨가 시에도 부드럽게 섞어주어야 합니다. 제한효소의 실활이 확인되면 새로운 batch를 사용해야 합니다.
	제한효소 반응억제제 (inhibitors)가 있는 경우	Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, SDS, CsCl이 오염되어 있거나 고농도의 염산태인 경우 제한효소의 활성이 억제될 수 있습니다. DNA 분리 시 이용되는 Phenol/Chloroform 처리 후 에탄올 침전방법시 시약이 떨어지지 않도록 완전히 제거하도록 하며, 상업적으로 구입이 가능한 DNA 분리 kit 등을 사용하는 방법도 있습니다.
	제한효소가 반응액 내에서 완전히 섞이지 않은 경우	제한효소를 마지막에 첨가하고 부드럽게 혼합하여 완전히 섞이도록 합니다 (vortex는 사용금지)
	제한효소 희석으로 효소활성이 낮아지거나 없어진 경우	제한효소는 가능한 희석하지 않고 사용하는 것이 좋으나 희석이 필요한 경우 storage buffer나 희석액 (diluent)에 희석하여 사용해야 합니다. 바로 사용하는 경우라면, 1x reaction buffer에 희석할 수 있으나 장시간 보관은 피해야 합니다.
제한효소활성이 낮을 때	효소의 보관이 부적절한 경우	제한효소는 성에 제거 기능이 없는 -20°C 냉동고에서 보관하는 것이 최적이며 전용용기 또는 cooler를 이용하는 것이 좋습니다.
	효소를 희석하여 사용 보관한 경우	제한효소를 물에 직접 희석하는 것은 좋지 않으며 적절한 희석액에 희석을 해야 하고, 희석 후 쉽게 실활되는 경우가 많기 때문에 가능한 빨리 사용해야 하며 이를 냉동 보관하는 것은 좋지 않습니다.
	Pipetting error	정도가 높은 용액 DNA나 제한효소를 소량 취할 때에 실제보다 더욱 소량을 취하는 경우가 있을 수 있으므로 pipetting에 주의해야 하며, 경우에 따라서는 DNA나 효소를 희석하여 사용해야 합니다.
	글리세롤에 의한 효소 활성 방해의 경우	제한효소가 전체 반응액의 10%를 넘게 되면 (즉, 글리세롤 농도가 5%를 넘게 되면) 효소활성이 방해 받게 되므로 반응액의 양을 조절하거나 제한효소 양을 줄여야 합니다.
	반응 온도를 잘못된 경우	제한효소의 반응 온도를 확인하여 적절한 온도에서 효소 반응을 실시해야 합니다.
	반응 조건이 맞지 않은 경우	제품설명서를 확인해야 합니다.
DNA 절단 band수가 예상보다 많을 때	비특이적 반응 (star activity)이 나타난 경우	제한효소의 유사한 염기서열 (cognate sequence)에 대한 비특이적 반응은 부적절한 반응조건 때문에 나타나므로 적절한 반응 조건을 지키며 깨끗한 DNA를 이용해야 합니다. 비특이적인 반응의 원인 : 과량의 효소 (>100 units/µg), 5% 이상의 글리세롤 농도, 망간을 비롯한 2가 이온 (마그네슘 대신), 적정 농도 범위를 벗어난 NaCl 농도, 극단적인 pH (>pH 8.0), DMSO와 에탄올을 비롯한 유기 용매의 오염 등
	다른 종류의 DNA가 오염된 경우	기질 DNA 분리 시 오염에 의한 다른 종류의 DNA가 포함되어 있을 가능성이 있으므로 DNA를 새롭게 준비하여 이용해야 합니다. 아가로즈 전기영동 시에 로딩 완충액 또는 전기영동 완충액에 다른 DNA 오염 가능성도 있으므로 새로운 것을 이용하는 것이 좋습니다.
	다른 종류의 제한효소가 존재한 경우	기준이 되는 Lambda DNA나 절단부위의 수가 확실한 기질을 이용하여 DNA band pattern을 확인하여 추가 band가 확인되면 다른 제한 효소가 오염되었을 가능성도 있으므로 새로운 batch의 제한효소를 사용해야 합니다.
	DNA 염기서열 정보가 잘못된 경우	DNA의 염기서열 정보를 자세히 살펴서 정확한 제한효소 부위와 개수를 확인해야 합니다.
제한효소 처리 후에 DNA가 Smearing 되거나 관찰되지 않을 때	기질 DNA가 부적당한 경우	분광광도계나 아가로즈 젤 전기영동을 이용하여 DNA의 정확한 농도를 확인하고 RNA나 Guanidine과 같은 염이 오염되어 있는 가를 확인해야 합니다. 염이 많은 경우 230nm에서 높은 흡광도를 보이는 점을 이용하여 확인할 수 있습니다. RNA는 RNase를 처리하여 제거하고, 에탄올 침전방법으로 RNA와 염을 제거한 후 사용해야 합니다.
	비특이적 핵산분해효소(nuclease)의 오염의 경우	EndA(+) 대장균주에서 DNA를 분리한 경우 endonuclease가 오염되어 DNA를 완전히 분해하게 되므로 endA(-) 대장균주를 사용하고, 부득이한 경우 endonuclease를 제거할 수 있는 DNA정제 kit를 이용하는 것이 좋습니다. 반응 성분물에 박테리아, 곰팡이등이 오염되어 있는지 여부를 확인하고 성분자체의 nuclease 오염여부를 확인하여 새로운 시약으로 교체해야 합니다. BSA가 든 buffer의 경우에는 박테리아나 곰팡이가 증식할 수 있으므로 저온보관을 해야 합니다.
절단 DNA의 ligation 효율이 낮을 때	ligation buffer 조성의 문제	ligation buffer내의 ATP, DTT는 쉽게 깨어지는 성분이므로 새로운 buffer를 사용해야 합니다.
	ligation 반응에서 제한효소의 활성이 남아있는 경우	제한효소의 불활성화 (heat inactivation, phenol extraction 방법 등)를 확실한 후 사용해야 하며, 제한효소, ligase, DNA 중에 비특이적 핵산분해효소의 오염 가능성이 있는 것이 있는지 확인해 봐야 합니다.
	ligase 농도가 너무 낮은 경우	blunt end ligation 반응은 sticky end에 비해 더 높은 농도의 ligase를 필요로 하며, 특정 제한효소 중에서도 ligation이 잘 안 되는 경우 (예; Mbo II)가 있으므로 ligase 농도를 더 높이거나 10% 농도가 되도록 PEG를 추가로 넣고 반응해야 합니다.

CUT-PROOF Restriction Enzymes

Aat II	$\begin{array}{c} G A C G T C \\ C I T G C A G \end{array}$	EBR-1001	250 unit	80,000	Acc I	$\begin{array}{c} A G \\ G T C T A C \\ C A T C T G \\ G A \end{array}$	EBR-1003	250 unit	80,000
Acc III	$\begin{array}{c} T I C C G G A \\ A G G C C I T \end{array}$	EBR-1005	250 unit	80,000	Afl II	$\begin{array}{c} C I T T A A G \\ G A A T T I C \end{array}$	EBR-1201	2,500 unit	80,000
Age I	$\begin{array}{c} A I C C G G T \\ T G G C C I A \end{array}$	EBR-1007	250 unit	80,000	Alu I	$\begin{array}{c} A G C T \\ T C G A \end{array}$	EBR-1011	500 unit	80,000
Apa I	$\begin{array}{c} G G G C C I C \\ C I C C G G G \end{array}$	EBR-1013	2,500 unit	60,000	ApaL I	$\begin{array}{c} G I T G C A C \\ C A C G T I G \end{array}$	EBR-1015	1,000 unit	70,000
Apo I	$\begin{array}{c} P u A A T T P y \\ P y T T A A I P u \end{array}$	EBR-1203	500 unit	80,000	Ase I	$\begin{array}{c} A T I T A A T \\ T A A T I T A \end{array}$	EBR-1017	2,500 unit	80,000
Ava I	$\begin{array}{c} C I P y C G P u G \\ G P u G C P y I C \end{array}$	EBR-1019	2,500 unit	80,000	Ava II	$\begin{array}{c} A \\ G I G T C C \\ C C T G I G \\ A \end{array}$	EBR-1021	1,000 unit	80,000
Ava III	$\begin{array}{c} A T G C A I T \\ T I A C G T A \end{array}$	EBR-1023	1,000 unit	80,000	BamH I	$\begin{array}{c} G I G A T C C \\ C C T A G I G \end{array}$	EBR-1025	10,000 unit	50,000
Ban I	$\begin{array}{c} G I G P y P u C C \\ C C P u P y G I G \end{array}$	EBR-1027	2,500 unit	70,000	Bbv I	$\begin{array}{c} G C A G C (N)_8 \\ C G T C G (N)_{12} \end{array}$	EBR-1031	200 unit	70,000
Bcl I	$\begin{array}{c} T I G A T C A \\ A C T A G I T \end{array}$	EBR-1033	1,000 unit	60,000	Bgl I	$\begin{array}{c} G C C N N N N / G G C C \\ C G G N / N N N N C C G \end{array}$	EBR-1035	1,000 unit	60,000
Bgl II	$\begin{array}{c} A I G A T C T \\ T C T A G I A \end{array}$	EBR-1037	2,500 unit	60,000	Dde I	$\begin{array}{c} C I T N A G \\ G A N T I C \end{array}$	EBR-1043	250 unit	70,000
Dpn I	$\begin{array}{c} C H_3 \\ G A I T C \\ C T I A G \\ C H_3 \end{array}$	EBR-1045	500 unit	70,000	Dpn II	$\begin{array}{c} I G A T C \\ C T A G I \end{array}$	EBR-1047	1,000 unit	70,000
Dra I	$\begin{array}{c} T T T A A A \\ A A A T T T \end{array}$	EBR-1049	1,000 unit	70,000	Dra III	$\begin{array}{c} C A C N N N I G T G \\ G T G I N N N C A C \end{array}$	EBR-1051	2,500 unit	70,000
Eag I	$\begin{array}{c} C I G G C C G \\ G C C G G I C \end{array}$	EBR-1053	500 unit	70,000	EcoR I	$\begin{array}{c} G I A A T T C \\ C T T A A I G \end{array}$	EBR-1055	10,000 unit	50,000
EcoR V	$\begin{array}{c} G A T A T C \\ C T A T A G \end{array}$	EBR-1057	5,000 unit	70,000	Fok I	$\begin{array}{c} G G A T G (N)_9 \\ C C T A C (N)_{13} \end{array}$	EBR-1059	1,000 unit	80,000
Hae II	$\begin{array}{c} P u G C G C I P y \\ P y I C G C G P u \end{array}$	EBR-1063	1,000 unit	70,000	Hae III	$\begin{array}{c} G G I C C \\ C C I G G \end{array}$	EBR-1065	2,500 unit	70,000
Hae IV	$\begin{array}{c} (N)_7 G A P y N N N N N P u T C (N)_{14} \\ (N)_{13} C T P u N N N N N P y A G (N)_9 \end{array}$	EBR-1067	500 unit	80,000	Hinc II	$\begin{array}{c} G T P y I P u A C \\ C A P u I P y T G \end{array}$	EBR-1071	1,000 unit	70,000
Hind III	$\begin{array}{c} A I A G C T T \\ T T C G A I A \end{array}$	EBR-1073	10,000 unit	60,000	Hinf I	$\begin{array}{c} G I A N T C \\ C T N A I G \end{array}$	EBR-1075	2,500 unit	70,000
Hpa I	$\begin{array}{c} G T T A A C \\ C A A T T G \end{array}$	EBR-1077	500 unit	70,000	Hpa II	$\begin{array}{c} C I C G G \\ G G C I C \end{array}$	EBR-1079	1,000 unit	70,000
Kas I	$\begin{array}{c} G I G C G C C \\ C C G C G I G \end{array}$	EBR-1205	500 unit	70,000	Kpn I	$\begin{array}{c} G G T A C I C \\ C I C A T G G \end{array}$	EBR-1083	5,000 unit	70,000
Mbo I	$\begin{array}{c} I G A T C \\ C T A G I \end{array}$	EBR-1085	500 unit	80,000	Mbo II	$\begin{array}{c} G A A G A (N)_8 \\ C T T C T (N)_7 \end{array}$	EBR-1087	250 unit	80,000

Mlu I	A C G C G T T G C G C A	EBR-1089	1,000 unit	80,000	Mwo I	G C N N N N N N N G C C G N N N N N N N C G	EBR-1091	250 unit	80,000
Nae I	G C C G G C C G G C C G	EBR-1093	500 unit	80,000	Nco I	C C A T G G G G T A C C	EBR-1097	1,000 unit	60,000
Nde I	C A T A T G G T A T A C	EBR-1099	5,000 unit	70,000	Nhe I	G C T A G C C G A T C G	EBR-1101	1,000 unit	70,000
Not I	G C G G C C G C C G C C G G C G	EBR-1103	500 unit	70,000	Pho I	G G C C C C G G	EBR-1107	500 unit	80,000
Pst I	C T G C A G G A C G T C	EBR-1109	10,000 unit	60,000	Pvu I	C G A T C G G G C T A G C	EBR-1111	500 unit	80,000
Pvu II	C A G C T G G T C G A C	EBR-1113	2,500 unit	70,000	Sac I	G A G C T C C T C G A G	EBR-1115	2,500 unit	70,000
Sac II	C C G C G G G G G C G C C	EBR-1117	1,000 unit	70,000	Sal I	G T C G A C C A G C T G	EBR-1119	2,500 unit	70,000
Sca I	A G T A C T T C A T G A	EBR-1123	1,000 unit	70,000	Sfi I	GGCC N N N N N GGCC CCGG N N N N N CCGG	EBR-1125	2,500 unit	80,000
Sma I	C C C G G G G G G C C C	EBR-1127	2,500 unit	70,000	SnaB I	T A C G T A A T G C A T	EBR-1129	500 unit	80,000
Spe I	A C T A G T T G A T C A	EBR-1131	500 unit	70,000	Sph I	G C A T G C C G T A C G	EBR-1133	500 unit	80,000
Ssp I	A A T A T T T T A T A A	EBR-1135	500 unit	70,000	TthHB8 I	T C G A A G C T	EBR-1145	2,500 unit	70,000
Xba I	T C T A G A A G A T C T	EBR-1147	5,000 unit	70,000	Xho I	C T C G A G G A G C T C	EBR-1149	5,000 unit	60,000
Xho II	Pu G A T C Py Py C T A G Pu	EBR-1151	500 unit	80,000	Xma I	C C C G G G G G G C C	EBR-1153	250 unit	70,000

Pu = A or G Py = C or T N = A or C or G or T

Buffer Composition (1x)

Buffer 1 : 10mM Bis Tris Propane-HCl, pH7.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT

Buffer 2 : 10mM Tris-HCl, pH7.9, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT

Buffer 3 : 50mM Tris-HCl, pH7.9, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT

Buffer 4 : 20mM Tris-acetate, pH7.9, 10mM magnesium acetate, 50mM potassium acetate, 1mM DTT

Buffer BamH I : 10mM Tris-HCl, pH7.9, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT

Buffer EcoR I : 100mM Tris-HCl, pH7.5, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100

ELPIS-Biotech. Inc.
www.elpisbio.com

보다 자세한 자료를 원하시면 www.elpisbio.com 을 방문하시거나 이메일 sales@elpisbio.com 또는
전화 042-581-8448로 문의를 주시면 성심껏 답변을 드리겠습니다