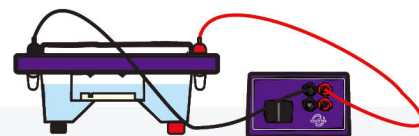


형질전환 실험세트5 (블루/화이트 클로닝)

Blue/White Cloning of a DNA Fragment and Assay of B-galactosidase

ED300



☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 목표

이 실험의 목적은 DNA 조각을 pUC-linker에 클로닝하고 색상 선택에 기반하여 DNA 삽입물이 있는 콜로니를 선택하는 것입니다. 이 실험은 (1) 연결(Ligation), (2) 형질 전환 및 선택(Transformation and selection), (3) 변형체의 성장 및 β -갈락토시다제 분석(β -galactosidase assay)이라는 세 가지 모듈로 나뉘어 있습니다.

제품 구성품

REAGENTS FOR DNA LIGATION

L1 DNA Vector Linearized with EcoRI and DNA Fragments	-20°C 냉동보관
L2 Control Superhelical Plasmid	-20°C 냉동보관
L3 T4 DNA Ligase/ATP Reaction Tubes (5 lyophilized T4 pellets in small screw-capped tubes)	-20°C 냉동보관
L4 TE Buffer, Sterile	-20°C 냉동보관

REAGENTS FOR TRANSFORMATION

TR1 Ampicillin	-20°C 냉동보관
TR2 IPTG	-20°C 냉동보관
TR3 X-Gal	-20°C 냉동보관
TR4 CaCl ₂	-20°C 냉동보관
TR5 Sterile Water	-20°C 냉동보관

REAGENTS AND CELLS FOR TRANSFORMATION

• BactoBeads™ JM109	-20°C 냉동보관
• ReadyPour™ Agar (sterile)	실온보관
• Recovery Broth (sterile)	실온보관

REAGENTS β -GALACTOSIDASE ASSAY

A1 Bottle LB Growth Medium	실온보관
A3 Sodium Phosphate Buffer	실온보관
A5 Stop Buffer (Na ₂ CO ₃)	실온보관

REAGENTS β -GALACTOSIDASE ASSAY

A2 Lysozyme	-20°C 냉동보관
A4 ONPG	-20°C 냉동보관

- Microtest tubes (0.5ml)
- 1.5 mL microtest (microcentrifuge) tubes
- Transfer pipets (sterile)
- 10 mL pipets (sterile)
- Petri plates (sterile, 60x15 mm)
- Inoculation loops (sterile)
- Toothpicks

필요 장비 및 준비물

항온수조 2개(37°C, 42°C), 원심분리기, 37°C 배양기, 진탕배양기 또는 진탕항온수조, 마이크로 피펫, 피펫, 피펫펌프, 전자저울, 전자레인지 또는 핫플레이트, 스펙트로미터, 멸균기, 10-125mL 플라스크와 캡

13x100mm 튜브 80개

1.5mL 원심분리기튜브 80개

증류수, 얼음

배경지식

대부분의 생명공학에서 사용되는 특수 재조합 DNA 분자는 서브클로닝 절차를 통해 구성되었습니다. 재조합 분자는 분자 생물학 연구의 특정 요구를 충족시키기 위해 설계된 벡터입니다. 예를 들어, 일부 벡터는 높은 복제 수를 가지며 많은 양의 서브클로닝된 DNA 삽입물을 생성합니다. 다른 벡터는 인 비트로 전사 및 인 비보 단백질 과발현을 촉진하도록 설계되었습니다.

서브클로닝은 이전에 클로닝되고 정제된 DNA 분자를 벡터에 연결하는 과정을 포함합니다. 생성된 재조합 분자는 적절한 숙주 세포에 도입되어 클로닝된 유전자가 발현됩니다.

이 실험은 세 가지 실험 모듈로 구성됩니다. 그것들은 1) 플라스미드 벡터에 DNA 조각의 연결; 2) 형질전환을 통해 재조합 DNA를 대장균 세포에 도입; 3) 앰피실린 저항성 형질전환체의 선택; Lac⁺ 및 Lac⁻ 콜로니의 선택 및 성장; 이러한 콜로니의 β-갈락토시데이스 활성 분석입니다. 선택 활동으로, 세포에서 재조합 플라스미드를 추출하고 제한 효소로 절단하여 아가로스 겔 전기영동으로 분석할 수 있습니다 (재료는 제공되지 않음).

플라스미드 벡터 Plasmid Vector

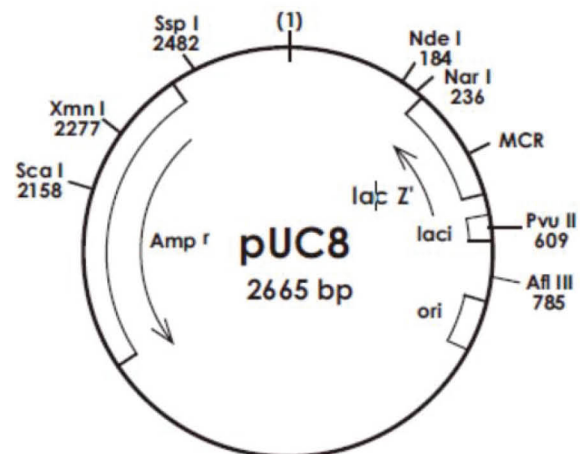
pUC8은 Eco RI 엔도뉴클레아제에 대한 단일 인식 부위를 가지는 2700 염기쌍의 플라스미드로, 이는 Lac Z 조각의 M13 mp 유래 폴리링커에 위치합니다. 폴리링커 영역은 약 30 염기쌍 길이로, 벡터 내 DNA 연결을 용이하게 하기 위해 여러 고유한 제한 효소 부위를 포함하고 있습니다.

pUC8은 숙주 대장균 세포 내에서 다중 복사본으로 존재합니다. 이 플라스미드는 유전자 조작에 의해 갈락토사이드 대사에 관여하는 β-갈락토시데이스 효소를 암호화하는 lac Z 유전자의 일부를 포함하도록 수정되었습니다.

오페론은 효소와 같은 단백질 합성을 위한 정보를 담고 있는 구조 유전자와 구조 유전자의 발현을 조절하는 조절 유전자를 포함합니다. lac 오페론은 구조 유전자와 조절 유전자로 구성됩니다. lac Z 유전자는 갈락토사이드 대사에 필요한 구조 유전자입니다. pUC8 플라스미드는 lac Z 유전자의 알파 조각을 운반합니다. 알파 조각은 단백질의 아미노 말단으로, 단독으로는 기능하지 않습니다. 알파 조각은 lac Z'로 표시됩니다.

형질전환에 사용되는 대장균 숙주 균주는 일반적으로 lac Z의 알파 조각이 결실된 돌연변이 균주입니다. 대장균 염색체는 단백질의 카르복시 말단인 오메가 조각을 포함합니다. 오메가 조각도 기능하지 않습니다. 알파와 오메가 조각이 발현되면 상호작용하여 기능성 β-갈락토시데이스 단백질을 형성합니다.

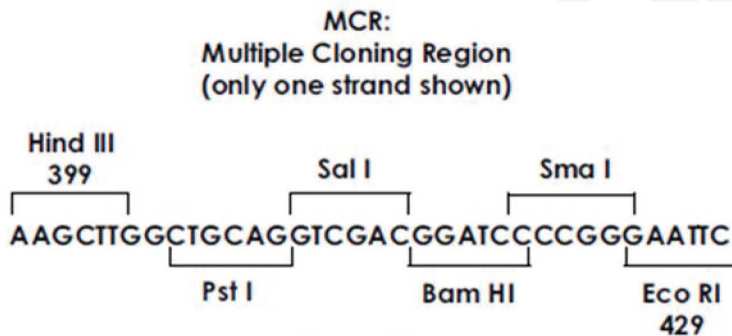
형질전환에 사용되는 대장균 숙주 균주는 일반적으로 lac Z의 알파 조각이 결실된 돌연변이 균주입니다. 대장균 염색체는 단백질의 카르복시 말단인 오메가 조각을 포함합니다. 오메가 조각도 기능하지 않습니다. 알파와 오메가 조각이 발현되면 상호작용하여 기능성 β-갈락토시데이스 단백질을 형성합니다.



니다. 이 상호작용을 알파 상보성이라고 하며, 1967년 올만, 자코브, 모노드에 의해 발견되었습니다.

lac 오페론은 억제제와 유도체에 의해 강하게 조절됩니다. 억제제는 박테리아 세포에 의해 낮은 수준으로 지속적으로 생성되어 오페론을 "꺼진 상태"로 유지합니다. IPTG(이소프로필-β-D-티오갈락토피라노사이드)와 같은 유도체가 존재하면 억제 단백질은 DNA 분자의 조절 부위 대신 유도체에 결합합니다. 그 후 구조 유전자의 전사가 발생하고, 기능성 단백질 분자로 번역됩니다.

β-갈락토시데이스 효소의 기질은 락토스와 같은 갈락토사이드입니다. 락토스는 갈락토스와 포도당으로 가수분해됩니다. X-Gal(5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-베타-D-갈락토사이드)과 같은 인공 갈락토사이드도 β-갈락토시데이스의 기질입니다. 가수분해되면 X-Gal은 파란색 침전을 방출하므로, pUC8로 형질전환된 대장균 콜로니는 파란색으로 나타납니다. 마찬가지로, ONPG(오르토니트로페닐갈락토피라노사이드)는 β-갈락토시데이스 활성의 색도 지표로 사용될 수 있습니다. 가수분해되면 노란색 용해 생성물을 형성하며, 이는 분광광도계로 정량화할 수 있습니다.



pUC8 플라스미드는 lac Z' 유전자에 삽입되어 lac Z 기능을 방해하지 않는 다중 클로닝 영역(MCR)을 가지고 있습니다. MCR 또는 "폴리링커" 영역은 약 30 염기 길이로, 분자 클로닝에 다재다능한 여러 고유한 제한 효소 부위를 가지고 있습니다. 외래 DNA는 MCR에 삽입되어 lac Z' 유전자를 방해하고 기능성 β-갈락토시데이스 단백질의 형성을 방지할 수 있습니다. 이러한 재조합체는 선택 플레이트에서 흰색 콜로니로 나타납니다.

플라스미드는 또한 β-락타마제를 암호화하는 앰피실린 저항성 유전자를 포함하고 있습니다. 이 실험을 위해 플라스미드는 Eco RI 엔도뉴클레아제로 선형화되어 서브클로닝 실험을 위한 호환 말단을 생성합니다.

연결 반응 Ligation

절단된 벡터와 DNA 조각의 반응 혼합물에 T4 DNA 연결 효소를 추가하여 선형화된 벡터에 조각을 연결합니다. 이 효소는 인접한 뉴클레오타이드의 5' 인산과 3' 하이드록실 그룹의 응축을 통해 인산다이에스터 결합을 형성하는 반응을 촉매합니다. DNA 연결 효소는 T4 파지에 감염된 대장균에서 정제되며, 마그네슘과 ATP가 필요합니다. 각 인산다이에스터 결합의 형성은 ATP가 AMP와 피로인산으로

가수분해되는 결과를 초래합니다. 효소의 촉매 효율은 37°C에서 최적이지만, 접착성 말단을 가진 DNA 조각의 연결은 일반적으로 4°C에서 22°C 사이의 온도에서 수행됩니다. 낮은 온도는 DNA의 상보적인 말단 사이의 결합을 허용하며, 이는 접착성 말단의 연결을 위한 전제 조건입니다.

가장 간단한 경우, 벡터와 삽입 DNA의 연결은 원형 재조합 플라스미드를 생성합니다. DNA 조각의 연결은 Eco RI 말단의 구아닌 3' 하이드록실 그룹과 아데닌 5' 인산 사이에서 발생합니다. 그러나 연결 반응에서 결합된 벡터와 삽입물의 실제 화학량은 두 DNA 종류의 길이와 상대 농도에 따라 복잡하게 결정됩니다. 효소의 농도와 이온 강도도 영향을 미칩니다.

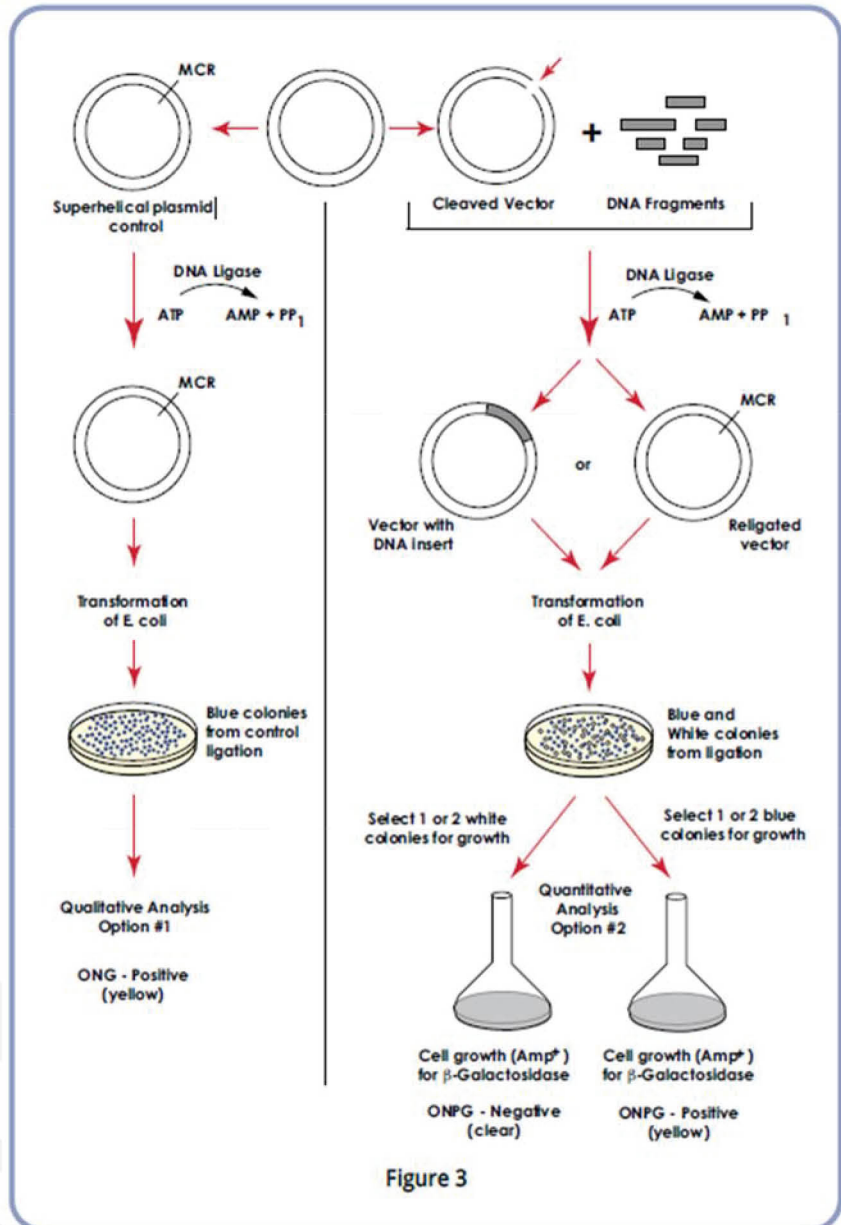


Figure 3

Eco RI 말단의 상보성 때문에 벡터는 삽입물 없이 다시 닫힐 수 있습니다. 높은 농도에서는 벡터의 전체 길이 반복 단위로 구성된 더 큰 선형 배열인 콘카타머를 형성할 수 있습니다. 삽입 조각도 원형화 및 콘카타머 형성을 겪을 수 있습니다. 벡터와 삽입물 사이의 대체 결합 및 방향도 상상할 수 있습니다. 이러한 다양한 형태의 DNA는 연결 반응 생성물의 전기영동 동안 관찰되는 복잡한 밴딩 패턴으로 나타납니다.

형질전환은 선형 DNA 분자로는 매우 비효율적이기 때문에, 원형 분자의 생성을 최적화해야 합니다. 또한, 여러 벡터와 삽입물 배열을 포함하는 큰 재조합 분자는 효율적으로 복제되지 않으며 분석을 복잡하게 만들 수 있습니다. 선형화된 플라스미드 벡터는 때때로 알칼리성 인산가수분해효소로 처리됩니다. 이 인산모노에스터는 DNA 말단의 5' 인산을 제거하여 5' 하이드록실 그룹과 무기 인산을 생성합니다. 연결 효소는 인산다이에스터 결합 형성을 위해 5' 인산을 필요로 하기 때문에, 벡터의 재폐쇄

및 콘카타머(Concatamers) 형성이 제거됩니다. 이 경우, DNA 벡터에 삽입물이 연결되면 결합된 접합 부에 틸이 생기며, 이는 변형된 숙주에서 수리됩니다.

삽입물의 콘카타머는 삽입 DNA의 농도를 낮춤으로써 줄일 수 있습니다. 원형 재조합 분자의 비율은 총 DNA 농도와 벡터 대 삽입물의 몰비를 조정하여 증가시킬 수 있습니다. 벡터와 삽입물이 동일한 접착성 말단을 포함할 때, 서브클로닝된 삽입물의 방향은 동일한 형질전환 실험에서 유래한 개별 박테리아 콜로니 사이에서 달라질 수 있습니다. 이는 말단의 대칭적 특성 때문이며, 많은 콜로니를 분석할 경우 두 삽입 방향의 발생이 50:50으로 나타날 것으로 예상됩니다. 재조합 플라스미드의 단일 삽입물은 벡터의 고정 지점에 대해 두 방향 중 하나로 존재할 수 있습니다.

형질전환 Transformation

대장균 JM109 배양액에서 competent 세포를 준비했습니다. 이 균주는 자연적인 항생제 저항성이나 플라스미드를 가지지 않으며 제한 효소가 없습니다. 또한, 이 균주는 세포 내 재조합 사건의 가능성을 줄이는 RecA 단백질을 생성하지 않습니다. 이러한 모든 특징은 대장균 JM109를 클로닝 및 서브클로닝 실험에 이상적인 숙주로 만듭니다.

형질전환은 연결 반응 생성물로 여러 기능을 수행합니다. 형질전환은 연결 반응 생성물의 복잡한 혼합물을 개별 박테리아 콜로니로 분리하거나 일부를 완전히 제거하는 정화 단계로 작용합니다. 선형 벡터와 매우 큰 콘카타머는 competent 대장균에 잘 흡수되지 않습니다. 초나선형 및 이완된 원형 DNA는 가장 높은 형질전환 효율을 가집니다. 일반적으로 10 나노그램 미만의 소량의 DNA만이 형질전환에 필요합니다. 사실, 100 나노그램을 초과하는 DNA 양은 형질전환을 억제합니다. 외부 DNA를 성공적으로 흡수하는 세포는 10,000개 중 1개에 불과합니다. 형질전환 중 동일한 세포에 의해 두 개의 다른 DNA 분자의 흡수는 낮은 빈도로 발생합니다.

형질전환 효율은 DNA 1마이크로그램당 얻어진 형질전환체의 수로 정의됩니다. 예를 들어, 10 나노그램의 DNA를 1 mL의 세포에 형질전환하고 그중 0.1 mL를 선택적 한천 배지에 도말하여 100개의 콜로니를 생성했다면, 이는 mL당 1000개의 형질전환체에 해당합니다. 각 콜로니가 하나의 형질전환된 세포에서 자랐다는 점을 감안할 때, 효율은 $1000/0.01\mu\text{g} = 1 \times 10^5$ 이 됩니다. 10^5 에서 10^6 의 형질전환 효율은 대부분의 서브클로닝 실험에 충분합니다. 단일 복사 유전자를 게놈 DNA에서 클로닝할 때는 10^7 에서 10^8 의 효율이 필요합니다.

파란색/흰색 콜로니 선택

스크리닝은 종종 지루하고 시간이 많이 걸릴 수 있습니다. 플라스미드 벡터는 일반적으로 클로닝된 DNA를 포함하는 재조합 플라스미드를 가진 박테리아를 양성 선택하기 위해 사용되는 항생제 저항성 유전자를 포함합니다. 이 실험의 목표는 X-Gal과 IPTG가 존재하는 조건에서 두 가지 유형의 형질전환

된 박테리아 콜로니, 즉 파란색과 흰색 콜로니를 얻는 것입니다. 파란색 콜로니는 lac Z 유전자를 방해하는 DNA 삽입물이 없는 "자체" 재결합된 플라스미드를 포함합니다. 흰색 콜로니는 lac Z 유전자를 방해하는 DNA 삽입 조각을 포함한 플라스미드를 가진 박테리아로 구성됩니다. 선택은 앰피실린이 포함된 배지에서 수행됩니다.

β -갈락토시데이스는 Lac+ 형질전환체(활성 효소를 생성하는 파란색 콜로니)에서 분석됩니다. A4-오르토니트로페닐갈락토피라노사이드(ONPG)가 β -갈락토시데이스 분석에 사용됩니다. 이 기질은 촉매 작용에 의해 노란색으로 변합니다. Lac- (흰색 콜로니)는 ONPG를 가수분해하지 않으며, 노란색이 나타나지 않습니다.



실험 전 준비 - 모듈 I

pUC8에서 DNA 조각의 연결

5개의 연결 반응을 수행할 수 있는 충분한 시약이 제공됩니다. 각 실험 그룹을 위해 아래 2단계에 설명된 대로 시약을 분할할 수 있습니다. 또는 학생들이 실험실 중앙에서 스톡 튜브를 공유할 수도 있습니다. **참고:** 튜브를 공유하면 유출이나 오염의 위험이 증가합니다.

1. 실험이 시작되기 직전에, 다음을 해동하고 얼음 위에 놓으세요:
 - Eco RI로 선형화된 L1 DNA 벡터와 DNA 조각
 - L2 대조 초나선 플라스미드 DNA
2. 각 실험 그룹을 위해, 다음 용량을 각각 적절하게 라벨이 붙은 차가운 0.5 mL 마이크로 테스트 튜브에 옮기세요.
 - Eco RI로 선형화된 L1 DNA 벡터와 DNA 조각 25 μ L
 - L2 대조 초나선 플라스미드 DNA 25 μ L
 - L4 TE 버퍼 50 μ L
3. 모든 튜브를 얼음 위에 보관하세요.

*모듈 I을 위해 각 그룹당 받아야 하는 것

- 1 Tube with 25 μ L of L1, DNA vector linearized with Eco RI and DNA fragments
- 1 Tube with 25 μ L of L2, Control Superhelical Plasmid DNA
- 1 Tube with 50 μ L of L4, TE Buffer

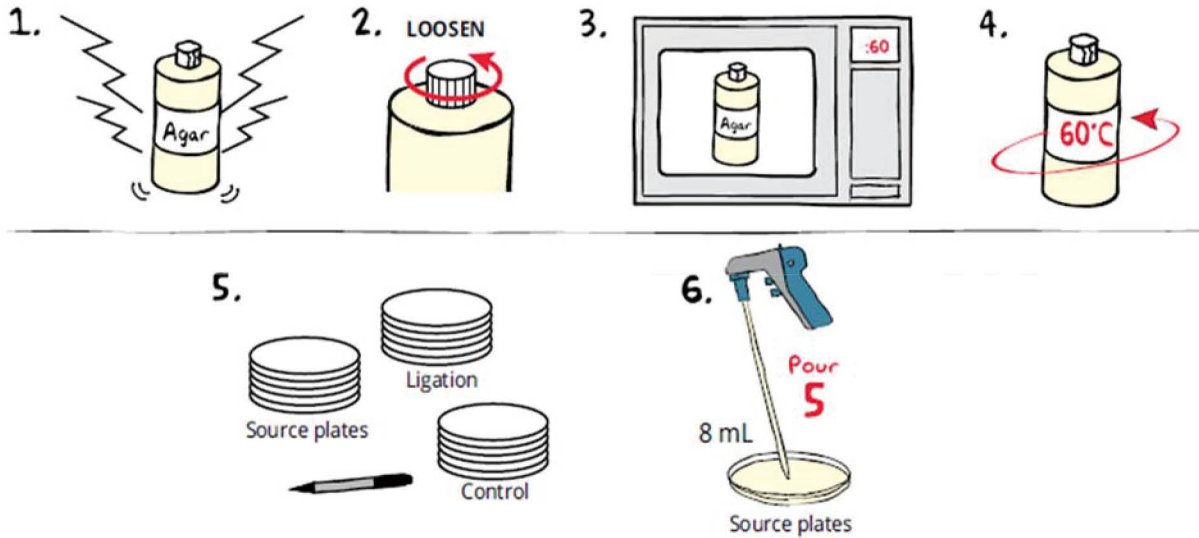
실험 전 준비 - 모듈 II

LB-아가 플레이트 준비

최적의 결과를 위해, 플레이트를 도말하기 이틀 전에 준비하고 플레이트를 뒤집어 실온에 보관하세요. 사용하기 이틀 전에 부어야 하며, 이틀 이상 전에 부어야 할 경우 냉장고에 뒤집어서 보관해야 합니다. 냉장고에서 꺼낸 후 사용하기 이틀 전에 실온에 뒤집어서 보관하세요. 시약 준비:

- X-Gal 용액(TR3)과 멸균증류수(TR5)를 해동하세요.

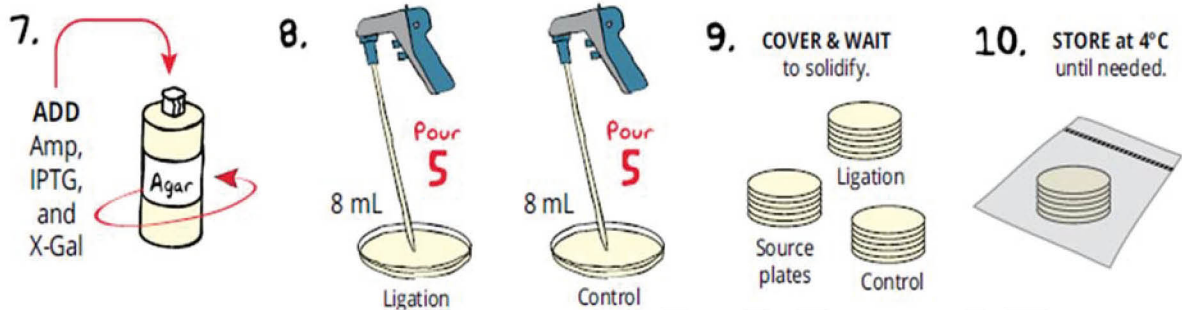
- 앰피실린(TR1)이 들어 있는 튜브에 멸균증류수(TR5) 0.75 mL (750 μ L)를 추가하세요. 분말을 녹이기 위해 강하게 혼합하거나 흔들고 얼음 위에 놓으세요.
- IPTG(TR2)이 들어 있는 튜브에 멸균증류수(TR5) 0.70 mL (700 μ L)를 추가하세요. 분말을 녹이기 위해 강하게 혼합하거나 흔들고 얼음 위에 놓으세요.



아가 가열 및 플레이트 붓기:

1. 플라스틱 병을 강하게 눌러 ReadyPour™ LB 아가를 작은 덩어리로 부수세요.
2. ReadyPour™ 아가 병의 뚜껑을 살짝 돌리되 제거하지 마세요. 이는 가열 중에 증기가 배출되도록 합니다. 주의: 가열 전에 뚜껑을 느슨하게 하지 않으면 병이 깨지거나 폭발할 수 있습니다.
3. ReadyPour™ 아가를 전자레인지에서 60초 동안 고온으로 가열하여 아가를 녹이세요. 전자레인지에서 병을 조심스럽게 꺼내어 병을 돌려가며 혼합하세요. 아가가 완전히 녹을 때까지 30초 간격으로 계속 가열하세요 (호박색 용액은 투명하고 작은 입자가 없어야 합니다).
4. ReadyPour™ 아가를 60°C로 식히면서 고르게 열이 확산되도록 조심스럽게 돌려가며 식히세요.
5. ReadyPour™ 배지가 식는 동안, 총 15개의 페트리 디쉬에 라벨을 붙이세요. 이 접시의 하단에 라벨을 붙이세요:
 - 5개 접시: 소스 플레이트
 - 5개 접시: 연결 Ligation
 - 5개 접시: 대조 Control
6. ReadyPour™가 60°C로 식으면, 각 8 mL씩 5개의 소스 플레이트에 부으세요 (아래의 "빠른 참

조: 아가 플레이트 붓기" 를 참조하세요).



7. 멸균된 피펫을 사용하여 배지에 앰피실린(TR1) 0.30 mL, IPTG(TR2) 0.30 mL, 그리고 모든 X-Gal(TR3)을 추가하세요. 식힌 아가에만 시약을 추가하세요. 혼합하기 위해 배지를 돌려가며 섞으세요. 남은 앰피실린과 IPTG는 모듈 III를 위해 냉동고에 다시 넣어 두세요.
8. 남은 플레이트에 각각 8 mL씩 부으세요 (아래의 “빠른 참조: 아가 플레이트 붓기” 를 참조하세요).
9. 덮개를 덮고 LB-아가 플레이트가 굳을 때까지 기다리세요. 최적의 결과를 위해 플레이트를 실온에서 하룻밤 동안 두세요.
10. 필요할 때까지 플레이트를 4°C에서 보관하세요. 플레이트는 뒤집어서 밀봉 가능한 플라스틱 백에 넣어 건조되지 않도록 하세요.

참고: 플레이트가 사용하기 이틀 이상 전에 준비된 경우, 굳고 건조되도록 하룻밤 동안 실험대에 두세요. 다음 날, 뒤집은 플레이트를 비닐지퍼백에 넣어 냉장고(4°C)에 보관하세요. 사용 전에 플레이트를 냉장고에서 꺼내 37°C 인큐베이터에서 30분 동안 따뜻하게 하세요.

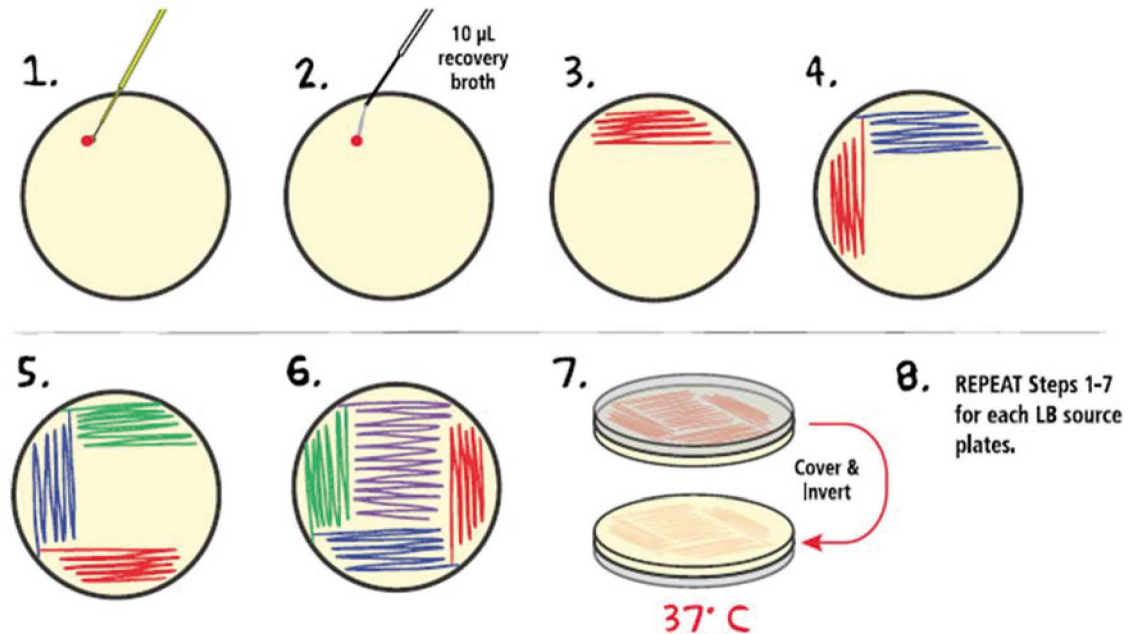
식힌 배지에 앰피실린, IPTG, 그리고 X-Gal을 추가하세요. 뜨거운 배지는 앰피실린의 빠른 분해를 초래할 수 있습니다.

빠른 참조: 아가 플레이트 붓기

- 멸균된 10 mL 피펫과 피펫 펌프를 사용하여 지정된 양의 배지를 각 페트리 디쉬로 옮기세요. 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 피펫하세요.
- 페트리 디쉬를 앞뒤로 흔들어 배지가 전체적으로 퍼지도록 하세요.
- 녹인 배지에 기포가 있을 경우, 불꽃을 배지 표면에 가까이하여 제거할 수 있습니다.
- 페트리 디쉬를 덮고 배지가 굳을 때까지 기다리세요.

대장균 E.coli 소스 플레이트 준비

최상의 결과를 위해, 대장균 소스 플레이트는 실험이 수행되기 18-22시간 전에 도달해야 합니다. 실험 24시간 이상 전에 소스 플레이트를 준비하면 형질전환 실험의 성공 확률이 낮아질 수 있습니다.



1. 멸균된 접종 루프를 사용하여 바이알에서 BactoBead™ 하나를 꺼내세요. 무균 기술을 사용하여 비드를 큰 페트리 디쉬(LB 소스 플레이트)의 가장자리로 옮기고 뚜껑을 덮으세요. 사용 후 즉시 바이알을 닫아 공기 중의 습기에 노출되는 것을 제한하세요.
2. 회복 배지(recovery broth) 10 µL를 추가하여 비드를 녹이세요.
3. 녹인 BactoBead™을 통해 루프를 앞뒤로 움직이며 접시 상단에 1차 도말을 하세요. 루프가 배지에 파고들지 않도록 주의하세요.
4. 접시를 90° 회전시키세요. 루프를 1차 도말을 통해 한 번 지나가게 한 다음, 깨끗한 아가 부분을 지그재그로 여러 번 지나가며 2차 도말을 만드세요.
5. 접시를 회전시키세요. 루프를 2차 도말을 통해 한 번 지나가게 한 다음, 깨끗한 아가 부분을 여러 번 지나가세요.
6. 접시를 한 번 더 회전시키세요. 루프를 3차 도말을 통해 지나가게 한 다음, 남은 깨끗한 아가를 지그재그로 지나가세요. 이렇게 하면 고립된 콜로니가 형성됩니다.
7. 접시를 덮고 37°C에서 18-22시간 동안 뒤집어 배양하세요. 인큐베이터가 없는 경우, 콜로니는 실온에서 약 24-48시간 후에 형성되지만 형질전환 효율은 감소할 것입니다.
8. 각 LB 소스 플레이트에 대해 위의 단계를 반복하고, 각 플레이트에 새로운 루프를 사용하세요.

참고: 플레이트 위의 세포성장이 너무 많아 밀집될 경우(즉, 콜로니가 잔디처럼 자랄 경우), 학생들에게 루프 하나 분량의 세포를 CaCl₂ 용액에 옮기도록 지시하세요.

형질전환 실험을 위한 기타 준비 사항

- 실험 당일
1. 각 그룹을 위해 "CaCl₂"라고 라벨이 붙은 마이크로 원심분리 튜브에 CaCl₂ (TR4) 1 mL를 분주하고 얼음 위에 놓으세요.
 2. 항온수조와 인큐베이션 오븐의 온도가 충분히 안정화될 시간을 두세요.
 3. 5개의 실험 그룹을 위한 시약과 재료를 준비하세요.

모듈II 실험을 위해 각 그룹당 받아야 하는 것

- 1 Ligation plate
- 1 Control plate
- 1 E. coli source plate
- 1 Ligation reaction from Module I
- 1 Ligation control from Module I
- 1 Tube of 1 mL CaCl₂

실험 전 준비 - 모듈 III

모듈 III - 파란색 및 흰색 콜로니에서 β-갈락토시데이스 분석

1. 앰피실린(TR1)을 해동하세요. LB 배양 배지(A1)에 앰피실린 0.4 mL를 추가하여 배양 배지를 준비하세요.
2. 멸균된(고압 멸균된) 125 mL 플라스크 10개를 준비하고 각 플라스크에 배양 배지 + 앰피실린 25 mL를 분주하세요.
3. 학생들이 실험 4~5시간 전에 분석 배양액을 접종하도록 하세요. 또는 강사가 배양액을 접종

할 수 있습니다. 배양액은 초기 지수 성장 단계($OD_{540} = 0.3 \sim 0.5$)까지 배양할 수 있으며, 최대 4시간 동안 얼음 위에 보관할 수 있습니다.

4. 모든 인산 나트륨 완충액(A3)을 27 mL의 증류수에 추가하세요. 각 그룹에 5.5 mL씩 덮개가 있는 튜브에 분주하세요.
5. 각 그룹에 1.5 mL의 정지 완충액(A5)을 덮개가 있는 튜브에 분주하세요.
6. ONPG(A4-오르토니트로페닐갈락토피라노사이드)를 20 mL의 증류수에 녹이세요 (ONPG는 용해하기 어려울 수 있습니다). 3 mL씩 덮개가 있는 튜브에 분주하고 얼음 위에 보관하세요. 최종 농도는 ONPG 4 mg/mL입니다.
7. IPTG(TR2)을 해동하고 5개의 미세 테스트 튜브에 60 μ L씩 분주하세요.
8. 라이소자임(A2)을 10 mL의 증류수에 녹이고 "라이소자임"이라고 라벨이 붙은 5개의 튜브에 1.5 mL씩 분주하세요. 얼음 위에 보관하세요.
9. 모듈 III의 후반부를 위해 42°C의 항온수조를 준비하세요.

정성적 β -갈락토시데이스 반응 분석

학생들은 형질전환 실험에서 사용한 플레이트를 사용할 수 있습니다. 파란색 콜로니와 흰색 콜로니를 각각 동일한 수(15-20개씩)로 선택하여 두 개의 마이크로 원심분리 튜브에 넣으세요. 500 μ L의 인산 완충액에 현탁하고, 모듈 III 실험의 β -갈락토시데이스 분석의 5단계부터 시작하여 26페이지에 설명된 프로토콜을 따르세요.

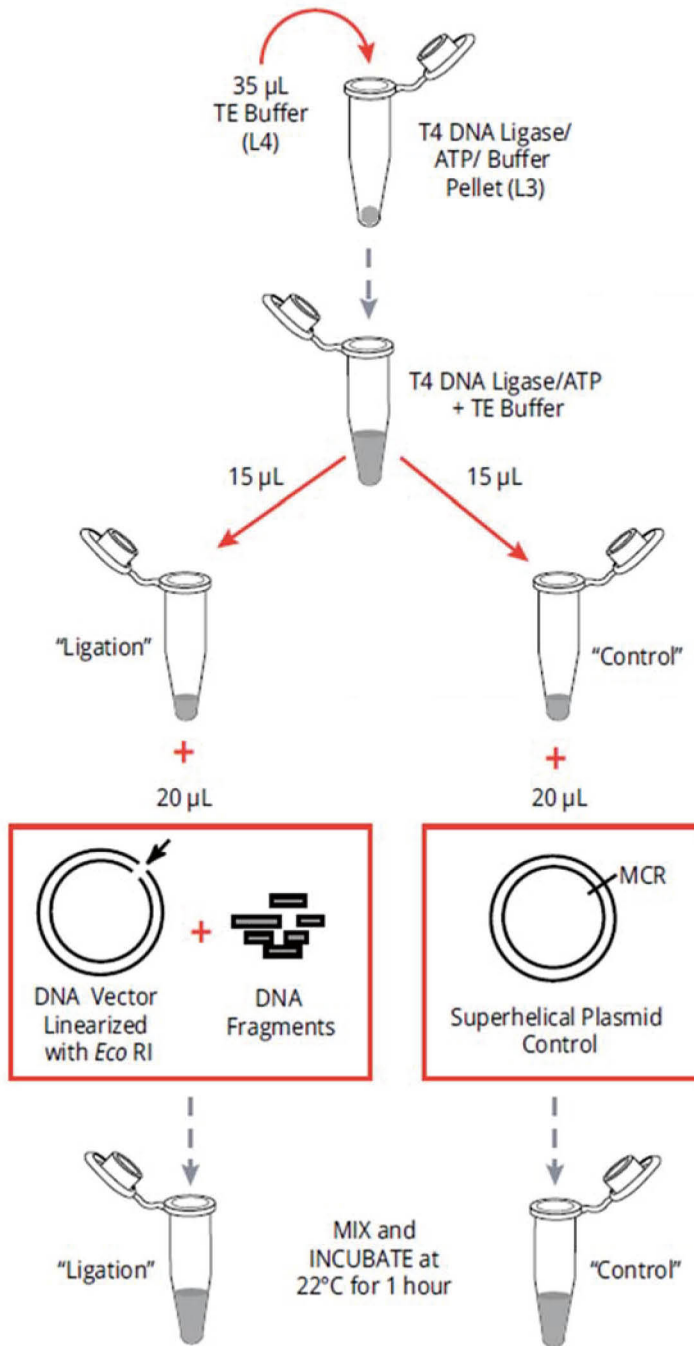
모듈III 실험을 위해 각 그룹당 받아야하는 것

- 2 flasks containing 25 mL of growth medium + ampicillin
- Sterile loops
- 60 μ L diluted IPTG (TR2)
- 5 mL tubes
- Six 1.5 mL microcentrifuge tubes
- 5.5 mL diluted phosphate buffer (A3)
- 1.5 mL diluted stop buffer (A5)

- 3 mL diluted ONPG (4 mg/mL)
- 1.5 mL diluted lysozyme (A2)
- Access to 37°C shaking incubator
- Access to 37°C & 42°C waterbaths
- Access to microcentrifuge
- Cuvettes + access to spectrophotometer (OD420, OD550, OD600)

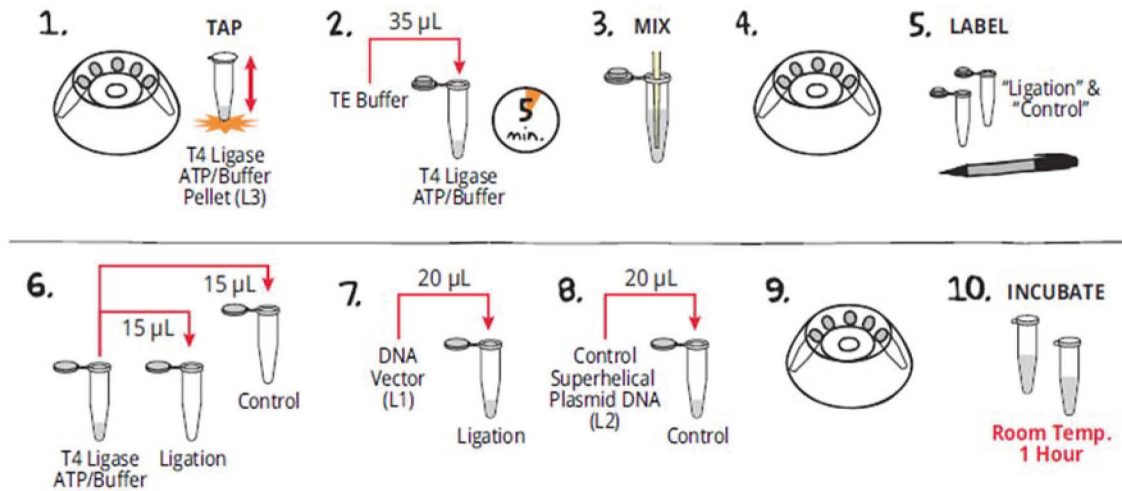
(주)한유과학기술
KOREA SCIENTIFICS

MODULE I OVERVIEW



Continue with the experiment, or freeze the Ligation and Control tubes until needed for Transformation in Module II.

모듈 I : LIGATION OF A DNA INSERT IN THE MCR OF PUC8 VECTOR



1. T4 Ligase/ATP/Buffer 펠릿(L3)이 들어 있는 튜브를 볼텍싱하세요. 펠릿이 튜브 바닥에 모이도록 실험대에 가볍게 두드리세요.
2. T4 Ligase/ATP 반응 튜브(L3)에 멸균된 TE 버퍼(L4) 35 µL를 추가하세요. 5분 동안 수화되도록 두세요.
3. 피펫 팁으로 혼합물을 조심스럽게 저어주고, 용액을 부드럽게 위아래로 피펫하여 버퍼와 연결 효소(ligase)를 혼합하세요.
4. 튜브를 마이크로 원심분리기에서 잠깐 돌려 모든 용액이 튜브 바닥에 모이도록 하세요.
5. 두 개의 1.5 mL 마이크로 테스트 튜브에 "Ligation"과 "Control"이라고 라벨을 붙이고 이름을 적으세요.
6. 수화된 T4 Ligase/ATP/Reaction Buffer 15 µL를 "Ligation"과 "Control" 튜브에 분주하세요.
7. "Ligation" 튜브에 Eco RI로 선형화된 DNA 벡터와 DNA 조각(L1) 20 µL를 추가하세요. 볼텍싱하거나 가볍게 두드려서 혼합하세요.
8. "Control" 튜브에 대조 초나선 플라스미드 DNA(L2) 20 µL를 추가하세요. 볼텍싱하거나 가볍게 두드려서 혼합하세요.
9. "Ligation"과 "Control" 튜브를 마이크로 원심분리기에 잠깐 돌려 모든 샘플이 튜브 바닥에 모이도록 하세요.
10. 실온(약 22°C)에서 1시간 동안 배양하세요. 10~15분 간격으로 튜브를 두드리거나 볼텍싱하여 주기적으로 혼합하세요.

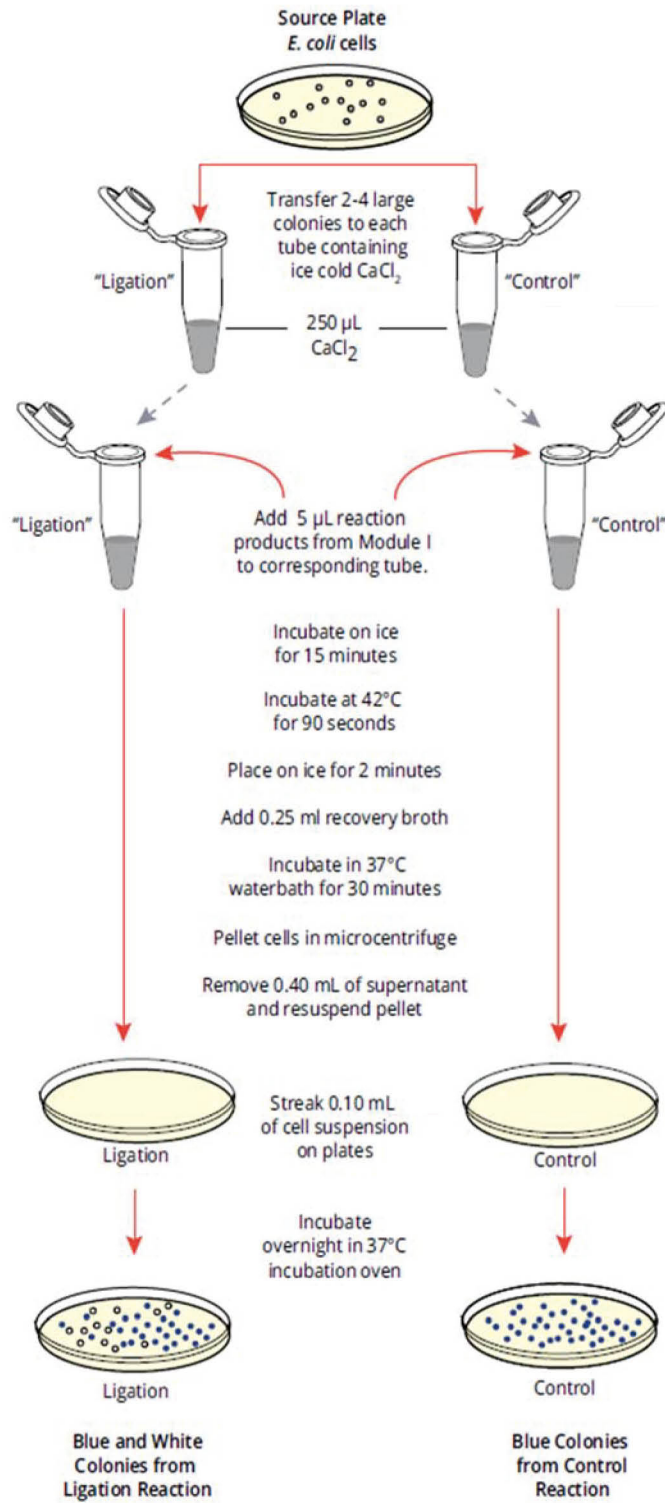


선택적 중지 지점

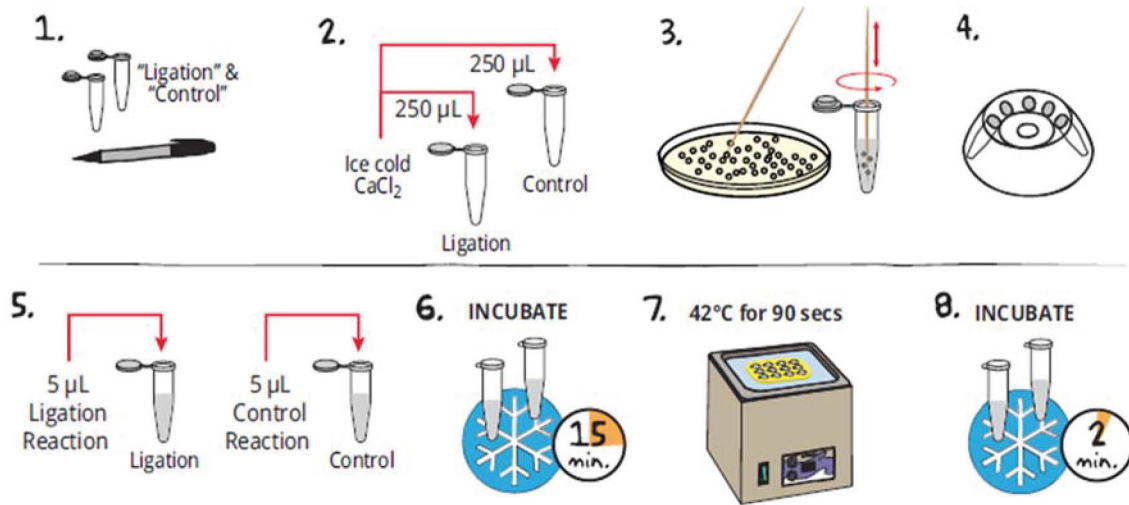
실험을 계속 진행하거나, 모듈 II에서 형질전환이 필요할 때까지 Ligation 및 Control 튜브를 냉동 보관하세요.

(주)한유과학
KOREA SCIENTIFICS

MODULE II OVERVIEW



모듈 II : TRANSFORMATION AND SELECTION



형질전환 및 대조 실험 설정

1. 마이크로 원심분리 튜브 하나에 "ligation"이라고 라벨을 붙이세요(이 튜브는 ligation DNA로 형질전환할 튜브입니다). 두 번째 마이크로 원심분리 튜브에는 "control"이라고 라벨을 붙이세요(이 튜브는 초나선 플라스미드 DNA로 실험 대조군입니다).
2. 멸균된 1 mL 피펫을 사용하여 각 튜브에 차가운 CaCl₂ 용액 250 µL(0.25 mL)를 추가하세요.
3. 대장균 세포의 소스 플레이트에서 콜로니를 선택하세요. "ligation"과 "control"이라고 라벨이 붙은 각 시험관에 다음을 수행하세요:
 - 멸균된 이쑤시개를 사용하여 소스 플레이트에서 2개의 콜로니(2-4 mm)를 시험관으로 옮기세요.
 - 손가락 사이에 이쑤시개를 잡고 CaCl₂ 용액에서 강하게 비틀고 위아래로 움직여 세포를 떼어내고 유화시키세요.

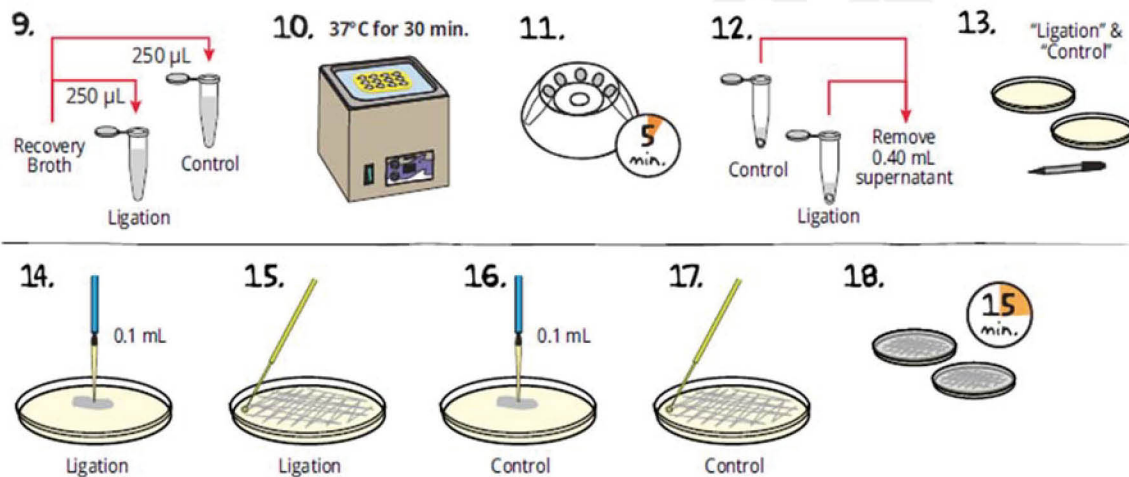
3단계 주의 사항:

세포를 원판(source plate)에서 칼슘 염화물 용액이 들어 있는 튜브로 옮길 때, 배지를 긁어내지 않도록 주의하세요. 세포는 칼슘 염화물 용액에 다시 현탁되어야 하며, 튜브 벽에 남지 않도록 하는 것이 중요합니다

4. 튜브를 두드리거나 볼텍싱하여 두 튜브의 세포를 현탁하세요.
5. 모듈 I의 반응 생성물을 추가하세요:
 - "ligation"이라고 라벨이 붙은 튜브에 ligation reaction 5 µL를 추가하세요.

- "control"이라고 라벨이 붙은 튜브에 control reaction 5 μ L를 추가하세요.

6. 두 튜브를 얼음에 15분 동안 꼽아 둡니다.
7. 두 튜브를 42°C의 항온수조에 90초 동안 넣어 열 충격(Heat Shock) 단계를 수행하세요. 이는 박테리아 세포 내로 DNA의 진입을 촉진합니다.
8. 두 튜브를 즉시 얼음통으로 되돌려 2분 동안 놔둡니다.



9. 멸균된 피펫을 사용하여 각 튜브에 회복 배지(Recovery Broth) 250 μ L(0.25 mL)를 추가하고 혼합하세요. 회복 배지에는 항생제가 포함되어 있지 않습니다.
10. 세포를 37°C의 항온수조에서 30분 동안 회복 기간을 갖도록 하세요. 이는 세포가 회복되어 항생제 저항성 유전자를 발현하기 시작하도록 합니다.
11. 회복 기간이 끝난 후, 튜브를 항온수조에서 꺼내어 마이크로 원심분리기에 넣고 5분 동안 회전하여 세포를 펠릿으로 만드세요.
12. 상층액 0.40 mL를 제거하고 , 남은 액체와 펠릿을 다시 잘 섞어주세요.

세포 도말하기

13. 두 개의 아가 플레이트("Ligation"과 "Control")를 준비하고, 이니셜이나 실험 그룹 번호로 라벨을 붙이세요.
14. "Ligation" 튜브에 있는 회복된 형질전환 세포 0.1 mL를 아가 플레이트의 중앙에 피펫으로 옮기세요.
15. 멸균된 루프를 사용하여 세포를 전체 표면에 고르게 퍼세요. 플레이트를 90° 회전시키고 다

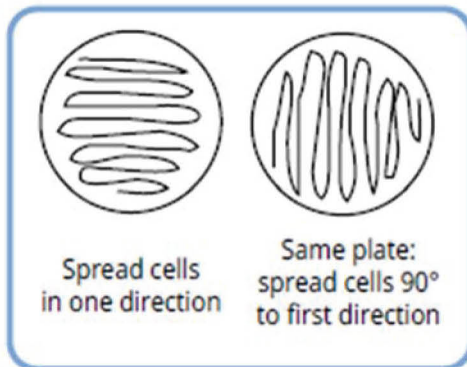
시 고르게 펴세요.

16. 새로운 피펫을 사용하여 "Control" 튜브에 있는 회복된 세포 0.1 mL를 "Control" 아가 플레이트의 중앙에 옮기세요.
17. 새로운 루프를 사용하여 플레이트의 전체 표면에 세포를 펴세요.
18. 두 플레이트를 덮고 액체가 흡수되도록 하세요(약 15-20분).
- 19.

참조: DNA와 competent 세포가 현탁액으로 결합됩니다. 세포가 DNA와 배양된 후, 배양 배지(회복 배지)가 추가됩니다. 박테리아 세포는 회복 과정 동안 계속 성장하며, 이때 세포벽이 복구됩니다. 세포는 회복되고 항생제 저항성 유전자를 발현하기 시작합니다.

중요 주의 사항

도말할 때 오염을 피하기 위해, 뚜껑을 실험대에 놓지 마세요. 플레이트의 뚜껑을 여는 것은 퍼트릴 수 있을 만큼만 들어 올리세요. 루프가 한천에 굽히지 않도록 주의하세요. 만약 세포가 배지에 흡수되지 않았다면, 플레이트를 세운 상태로 인큐베이션하는 것이 좋습니다. 플레이트를 뒤집는 것은 뚜껑에 물방울이 생기는 것을 방지하기 위해서입니다. 물방울이 배양액에 떨어져 실험 결과에 영향을 줄 수 있습니다.



배양을 위한 플레이트 준비하기

19. 그룹의 플레이트 세트를 서로 쌓고 테이프로 붙입니다.
20. 테이핑된 플레이트 세트에 이름이나 그룹 번호를 적습니다.
21. 플레이트 세트를 방해 받지 않을 안전한 곳에 두십시오. 세포 현탁액이 한천에 흡수될 수 있도록 15~20분 동안 세운 상태로 두어야 합니다.

22. 플레이트를 뒤집어서(한천 면이 위로) 37°C 인큐베이터에서 하룻밤(15-20시간) 배양합니다.

인큐베이션 후 플레이트 관찰하기

23. 결과를 관찰합니다.

24. 결과를 분석한 후, 액체 박테리아 배양을 위해 콜로니를 채취할 수 있도록 플레이트를 보관합니다. 모듈 II에서 사용한 기타 재료와 오염된 재료를 적절히 폐기합니다.

형질 전환 효율성 계산

형질 전환 효율은 플라스미드 DNA 1 µg당 몇 개의 세포가 형질 전환되었는지를 정량적으로 판단하는 것입니다. 본질적으로, 이는 형질 전환 실험이 얼마나 잘 실행되었는지를 나타내는 지표입니다. 실험에서 수집한 데이터로부터 형질 전환 효율을 계산할 것입니다.

1. 두 개의 플레이트에서 변형체(흰색 및 파란색 콜로니)의 수를 추정합니다. 플레이트에 마킹 펜으로 콜로니를 표시하여 카운트한 콜로니를 추적하는 것이 편리합니다.

2. 전체 변형체에 대한 형질 전환 효율과 삼입물이 있는 벡터를 함유한 콜로니(흰색 콜로니)에 대한 형질 전환 효율을 계산합니다.

최종 회수한 세포의 부피는 0.50 mL였으며, 원심분리를 거친 세포의 플레이트 부피는 0.10 mL입니다. 사용된 DNA의 양은 약 25 ng이었습니다.

형질 전환 효율을 다음의 공식을 사용하여 계산합니다:

$$\frac{\text{Number of transformants}}{\mu\text{g of DNA}} \times \frac{\text{final vol at recovery (mL)}}{\text{vol plated (mL)}} = \frac{\text{Number of transformants}}{\text{per } \mu\text{g}}$$

EXAMPLE: Assume you observed 40 colonies:

$$\frac{40 \text{ transformants}}{0.025 \mu\text{g}} \times \frac{0.5 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}} = \frac{8000 \text{ (} 8 \times 10^3 \text{) transformants}}{\text{per } \mu\text{g}}$$

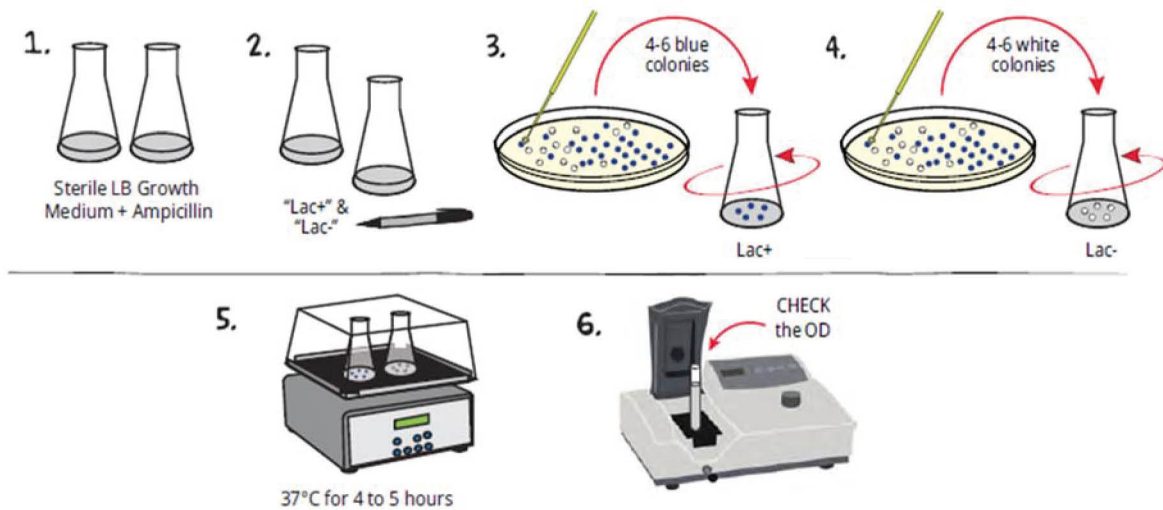
QUICK REFERENCE FOR EXPT. 300:

25 ng of DNA is used.

The final volume at recovery is 0.50 mL.

The volume plated is 0.10 mL.

모듈 III : ASSAY FOR B-GALACTOSIDASE IN BLUE AND WHITE COLONIES



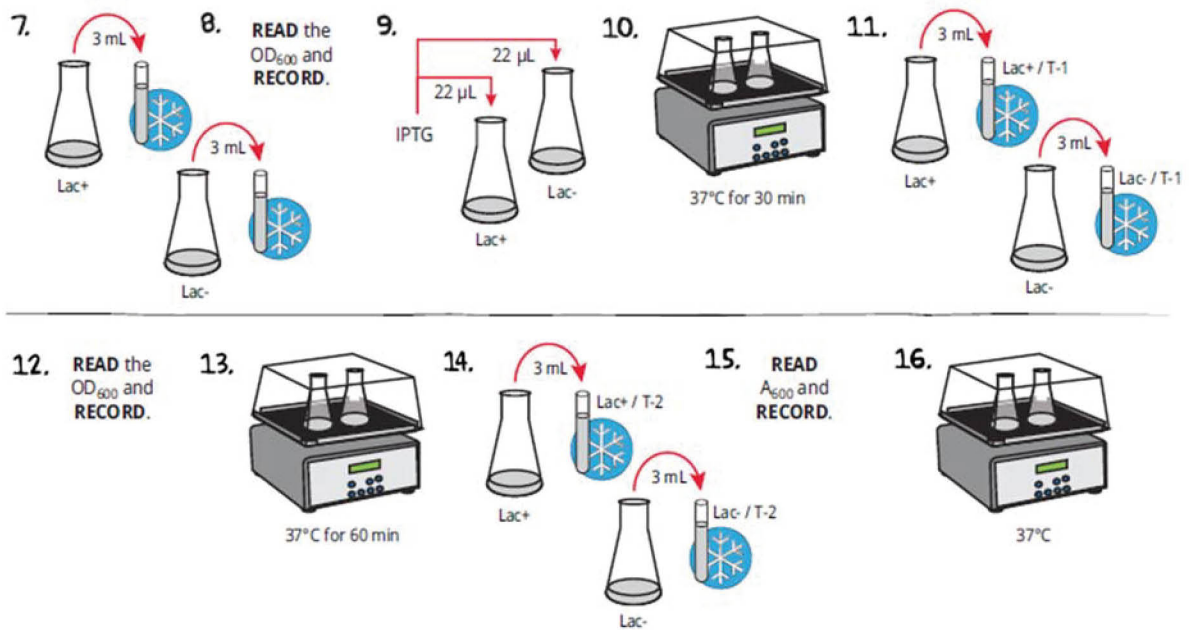
분석을 위한 Lac+ 및 Lac- 배양

실험 4~5시간 전에 Lac+ (파란색 콜로니)와 Lac- (흰색 콜로니) 박테리아 배양 배지를 접종합니다.

1. 살균된 LB 성장 배지 + 앰피실린이 각 25 mL씩 들어 있는 125 mL 플라스크 2개를 준비합니다.
2. 한 플라스크에는 "Lac+"라고 라벨을 붙이고, 다른 플라스크에는 "Lac-"라고 라벨을 붙입니다.
3. 살균된 접종 루프를 사용하여 개별 파란색 변형체 콜로니 4~6개를 PICK하여 "Lac+"로 라벨이 붙은 플라스크에 접종합니다. 플라스크를 흔들어 박테리아를 분산시킵니다. 참고: 루프를 배지에 흔들어 박테리아가 루프에서 떨어져 배지에 들어갈 수 있도록 합니다.
4. 살균된 접종 루프를 사용하여 개별 흰색 변형체 콜로니 4~6개를 PICK하여 "Lac-"로 라벨이 붙은 플라스크에 접종합니다. 플라스크를 흔들어 박테리아를 분산시킵니다. 참고: 루프를 배지에 흔들어 박테리아가 루프에서 떨어져 배지에 들어갈 수 있도록 합니다.
5. 진탕배양기 37°C에서 4~5시간 동안 흔들면서 배양합니다.
6. 600 nm에서 광학 밀도(OD)를 확인합니다. 참고: 3 mL를 13 mm x 100 mm 유리 튜브에 넣거나 1 mL를 큐벳에 넣고 분광광도계에 놓으면 OD가 0.5에서 0.7이어야 합니다.

세포 성장용: OD600 흡광도 읽기를 위해 남은 LB + AMP를 기준값으로 사용하세요.

β-갈락토시다제 분석용: OD420 및 OD600 흡광도 읽기를 위해 증류수(Distilled H₂O)를 기준값으로 사용하세요.

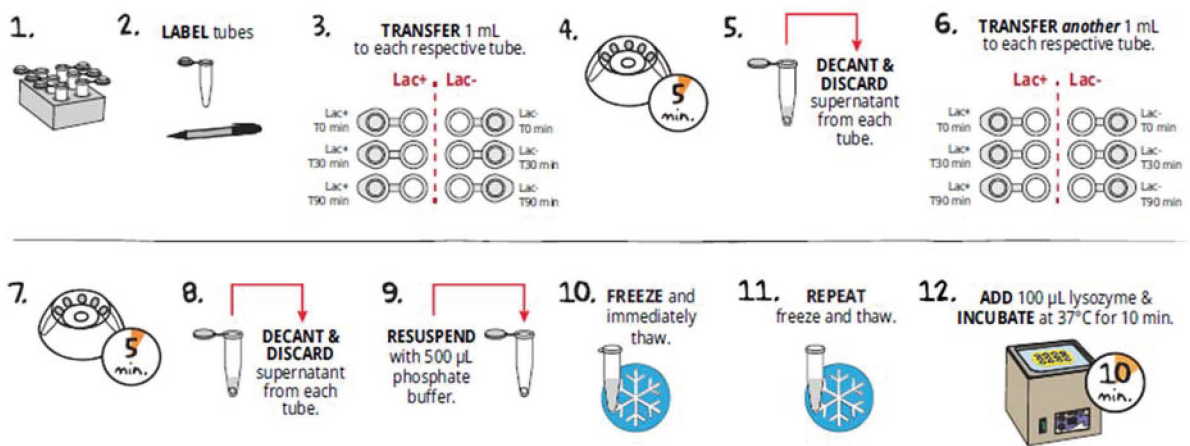


β-갈락토시다제 유도 및 샘플링

7. 각 플라스크에서 3 mL를 빼냅니다. 이 샘플은 β-갈락토시다제 분석을 위한 제로 타임포인트로 보관합니다. 튜브에 "Lac+/ T-0" 및 "Lac-/ T-0"이라고 라벨을 붙입니다. 샘플을 얼음 위에 놓습니다.
8. OD₆₀₀을 측정하고 기록합니다.
9. 남은 배양액 22 mL에 각각 β-갈락토시다제 활성을 유도하기 위해 22 µL의 IPTG를 추가합니다.
10. 진탕배양기 37°C에 30분 동안 흔들어 줍니다.
11. 30분 후, 각 배양액에서 3 mL를 빼내 13 x 100 mm 튜브에 놓습니다. 튜브에 "Lac+/ T-1" 및 "Lac-/ T-1"이라고 라벨을 붙입니다. 샘플을 얼음에 놓습니다.
12. OD₆₀₀을 측정하고 기록합니다.
13. 남은 배양액(19 mL)을 37°C 인큐베이터로 다시 넣습니다.

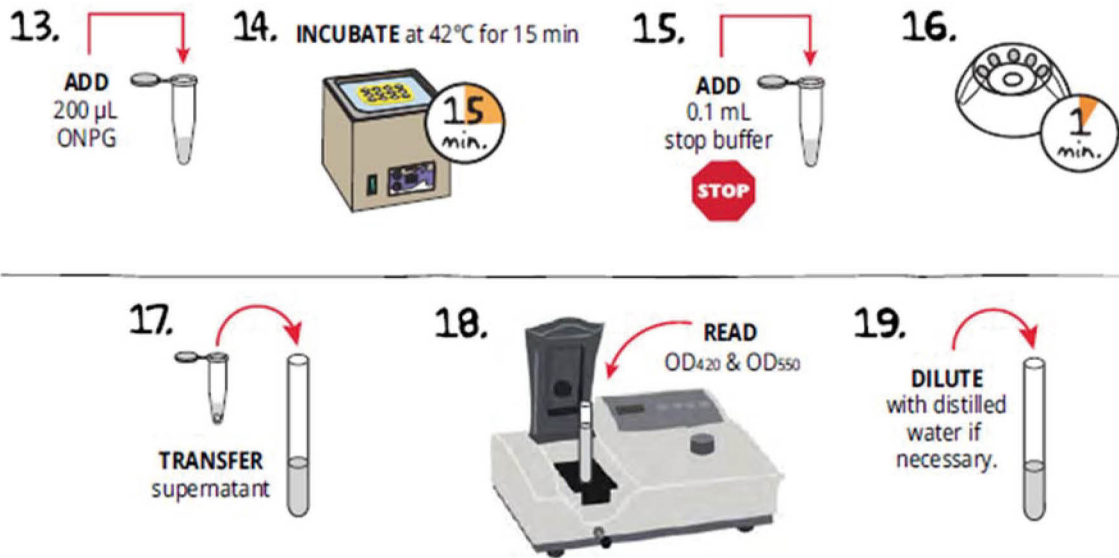
선택 단계 (14-16):

14. 더 나은 결과를 얻기 위해, 추가로 60분 후 각 배양액에서 3 mL를 빼내 13 x 100 mm 튜브에 놓습니다. 튜브에 "Lac+/ T-2" 및 "Lac-/ T-2"라고 라벨을 붙입니다. 샘플을 얼음 위에 놓습니다.
15. OD₆₀₀을 측정하고 기록합니다.
16. 플라스크에 남은 배양액(16 mL)을 다시 넣고 37°C 인큐베이터에 넣습니다.



β-갈락토시다제 분석

1. 여섯 (6) 개의 1.5 mL 마이크로 원심분리 튜브를 받침대에 놓고 분석 튜브를 준비합니다.
2. 6개의 튜브에 다음과 같이 라벨을 붙입니다:
 - Lac+ / T0 min - Lac- / T0 min - Lac+ / T30 min
 - Lac- / T30 min - Lac+ / T90 min - Lac- / T90 min
3. 얼음 위의 각 샘플에서 배양액 1 mL를 각 해당 분석 튜브로 옮깁니다.
4. 세포를 마이크로 원심분리기에서 5분간 회전시켜 세포를 침전시킵니다.
5. 상층액을 제거하고 버립니다.
6. 얼음 위의 각 튜브에 다시 배양액 1 mL를 옮깁니다.
7. 세포를 다시 5분간 회전시켜 침전시킵니다.
8. 상층액을 제거하고 버린 후, 각각의 침전을 보관합니다.
9. 침전을 500 µL의 인산 완충액(A3)에서 재현탁합니다.
10. 현탁액을 얼음이 얼 때까지 얼리고 즉시 해동합니다. 참고: 세포는 드라이 아이스에서 빠르게 얼리거나 -20°C 냉동고에 튜브를 펼쳐서 놓아서 얼릴 수 있습니다. 세포는 실온에서 해동하거나 42°C 수조에서 잠깐 인큐베이션하여 해동할 수 있습니다(해동하기에 충분한 시간만큼).
11. 얼리고 해동하는 과정을 두 번째로 반복합니다.
12. 각 튜브에 100 µL의 리소자임을 추가하고 37°C에서 10분 동안 인큐베이션합니다.



13. 각 분석 튜브에 200 μL 의 ONPG를 추가합니다.
14. 분석 튜브를 42°C 수조에서 15분 동안 배양합니다.
15. 반응을 중지하기 위해 0.1 mL의 중지(stop) 버퍼(Na_2CO_3)를 추가합니다.
16. 세포를 침전시키기 위해 튜브를 원심분리기에서 1분 동안 회전시킵니다.
17. 각 튜브에서 맑은 상층액을 깨끗한 튜브나 큐벳으로 옮기고 적절하게 라벨을 붙입니다.
18. 증류수를 기준값으로 사용합니다. OD_{420} 및 OD_{550} 을 측정합니다.
19. 읽은 값이 0.8보다 높으면 증류수로 희석하고 희석 배수를 기록합니다.
20. 효소 활성을 단위로 결정합니다. 단위는 아래의 공식을 기반으로 한 밀러 단위로 정의됩니다.

$$\text{Miller Units} = \frac{1000 \times [\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}]}{T \times V \times \text{OD}_{600}}$$

여기서:

- OD_{420} 및 OD_{550} 은 ONPG 반응에서 측정한 값입니다.
- OD_{600} 은 세포 배양의 광학 밀도입니다.
- T는 ONPG 반응의 시간(분 단위)입니다.
- V는 ONPG 반응에 사용된 세포 배양의 부피(mL 단위)입니다.

420 nm에서의 측정값은 O-니트로페놀과 세포 잔해와 같은 입자 물질에 의한 빛 산란에서 발생하는 결합 흡광도입니다. 550 nm에서의 흡광도는 O-니트로페놀 반응에 기여하지 않고 빛 산란을 보정합니다. 420 nm에서의 빛 산란은 $(-1.75 \times OD_{550})$ 로 계산됩니다.

즉, OD550의 값을 사용하여 420 nm에서의 빛 산란의 영향을 조정하고, 이 조정된 값으로 효소 활성을 보다 정확하게 평가할 수 있습니다. 이는 O-니트로페놀의 흡광도가 튜브 내에서의 그라디언트에 따라 변경될 수 있기 때문입니다.

21. 박테리아 세포와 접촉한 모든 액체, 배지, 플레이트 및 플라스틱 기구는 10% 표백제에 하룻밤 동안 담가 소독하거나 오토클레이브로 멸균합니다



연구 질문

1. 왜 이 클로닝 실험에서 파란색과 흰색 콜로니가 모두 나타나나요?
2. 모든 흰색과 파란색 콜로니가 플라스미드를 포함하고 있나요?
3. 세포 용해에 사용된 리소자임이 β -갈락토시다제를 변성시킬까요?
4. pUC8 에서 클로닝에 가장 적합한 제한 효소는 무엇인가요?

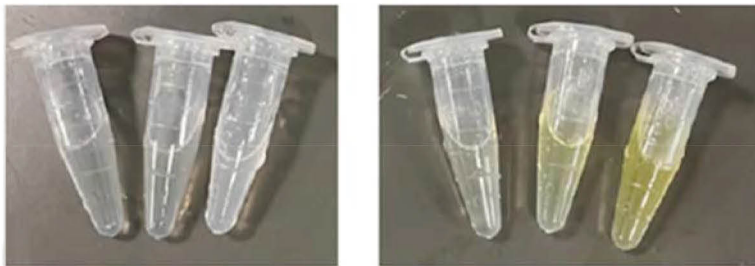
(주)한진과학기술
KOREA SCIENTIFICS

실험 결과

MODULE II RESULTS



MODULE III RESULTS



β -gal Assay: Lac- samples on left, Lac+ samples on right.

OD600			
	T0	T1	T2
Lac+	.446	.492	.667
Lac-	.796	.990	1.406

OD550			
	T0	T1	T2
Lac+	.09	.111	.146
Lac-	.128	.314	.384

OD420			
	T0	T1	T2
Lac+	.230	.720	1.435
Lac-	.205	.492	.575

형질전환 실험 문제 발생 원인 및 해결방법

1. 원판(Source plate)에서 세포 성장 불량

- 인큐베이션 시간이 너무 짧음

→ 원판을 37°C에서 총 18-22시간 동안 계속 인큐베이션합니다.

- 항생제가 원판에 추가됨

→ 플레이트를 부을 때 항생제 및 첨가제를 올바른 단계에 추가했는지 확인합니다.

2. 형질 전환 플레이트에서 콜로니가 흐릿하게 나타남

- 변형체가 포함된 플레이트가 너무 빨리 뒤집힘

→ 세포가 배지에 완전히 흡수된 후 플레이트를 뒤집습니다.

- 실험 플레이트가 너무 습함

→ 플레이트를 붓고 나서 실온에서 밤새 건조시키거나, 세포를 도말하기 전에 37°C에서 30분간 따뜻하게 합니다.

- 형질 전환에 부적합한 숙주 세포 사용

→ 올바른 박테리아 균주가 사용되었는지 확인합니다.

- 세포가 적절히 열충격(heat shock)되지 않음

→ 온도가 42°C이며, 열충격 단계가 정확히 45초 동안 진행되었는지 확인합니다.

3. 형질 전환 플레이트에서 콜로니가 전혀 보이지 않음

- 세포가 제대로 사분의 스틱스가 됨

→ 학생들이 CaCl₂에 박테리아의 소량을 옮기도록 합니다.

- 원판에서 개별 콜로니가 보이지 않음

→ 플라스미드 DNA가 형질 전환 혼합물에 추가되지 않았거나, 인큐베이션 온도가 잘못됨

→ 플라스미드 DNA를 형질 전환 튜브에 추가했는지 확인합니다.

→ 인큐베이터의 온도를 측정 및 조정하여 37°C가 되도록 합니다.

4. 형질 전환 플레이트에서 위성 콜로니가 보임

- 플레이트의 항생제 농도가 잘못됨

→ 올바른 농도의 항생제가 플레이트에 추가되었는지 확인합니다.

- 항생제가 분해됨

→ ReadyPour가 60°C로 식은 후 항생제를 추가했는지 확인합니다.

- 세포가 CaCl₂에 잘 재현탁되지 않음

→ 세포가 응집되지 않도록 CaCl₂에 완전히 재현탁하고(소용돌이 또는 위아래로 피펫하여 완전히 재현탁), 현탁액은 불투명해야 합니다.

5. 형질 전환 효율 낮음

- 형질 전환에 사용된 세포가 충분하지 않음

→ 원판에서 더 많은 콜로니(500μL CaCl₂당 5개의 1-1.5 mm 폭 콜로니)를 선택합니다.

- 원판이 20시간 이상 인큐베이션됨

→ 세포가 20시간 이상 성장하지 않도록 하고, 필요할 경우 20시간 후에 플레이트를 냉장합니다.

- 실험 플레이트가 너무 오래됨

- 24시간 이상 인큐베이션된 원판은 사용하지 않도록 합니다.

- CaCl₂에서 세포가 잘 재현탁되지 않음
 - CaCl₂에 있는 세포를 완전히 재현탁하되 클러스터가 남지 않도록 합니다.

- CaCl₂ 용액이 충분히 차갑지 않음
 - 세포를 CaCl₂에 추가하기 전에 CaCl₂를 미리 냉각합니다.

- 세포 용액이 충분히 차갑지 않음
 - CaCl₂에 세포를 추가하기 전에 CaCl₂를 미리 차갑게 합니다.

- 플라스미드 DNA가 너무 많이 또는 너무 적게 추가됨
 - 형질 전환 튜브에 올바른 양의 플라스미드를 추가했는지 확인합니다.

- 세포가 제대로 열충격되지 않음
 - 온도가 42°C로 유지되었는지, 열충격 단계가 45초를 초과하지 않았는지 확인합니다.

- 항생제가 플레이트를 붓기 전에 분해됨
 - ReadyPour가 60°C로 식은 후 항생제를 추가했는지 확인합니다.

- 잘못된 항생제 사용
 - 올바른 항생제를 사용했는지 확인합니다.