

Blunt-Ended PCR Product 정제(Blunt-end polymerase 이용시)

합성하고자 하는 DNA의 특성에 따라서 polymerase의 선택이 가능한데, 그 중 blunt-end로 합성하는 polymerase, 예를 들어 PrimeSTAR HS DNA Polymerase(Takara Code R010)를 이용한 경우, T vector에 cloning 하기 위해서는 합성된 DNA에 A-tailing 과정이 필요하다.

이 과정도 위의 일반적인 insert DNA 정제과정을 거쳐 순수한 target DNA만을 정제한 후에 진행해야 한다.

일반적인 A-tailing 과정은 아래와 같다

- (1) 정제된 PCR 산물 적정량(7 μ l 이하)을 tube에 담는다.
- (2) 10 x PCR buffer 1 μ l를 넣는다.
- (3) 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 dATP를 가한다.
- (4) Takara Taq Polymerase 5 U을 가한다.
- (5) D.W.로 최종 volume 10 μ l를 맞춘다.
- (6) 70 °C에서 15-30분간 방치한다.
- (7) 이 반응액을 T vector와의 ligation 반응에 이용한다.