

# PCR 산물의 cloning

PCR로 증폭한 DNA 단편을 sequencing 등 다양한 실험에 이용할 경우,

증폭 단편을 plasmid에 cloning해야 한다.

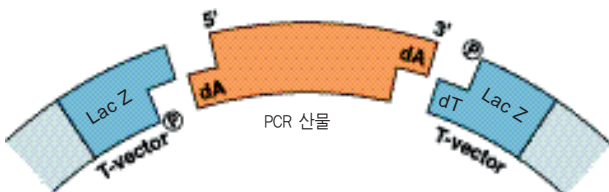
PCR 산물의 cloning은 PCR 관련 실험조작에서 가장 널리 이용되는 기초적인 조작이다.

PCR 산물의 cloning 방법은 몇 가지 있으나

본 고에서는 가장 자주 이용되는 4종류를 소개하고자 한다.

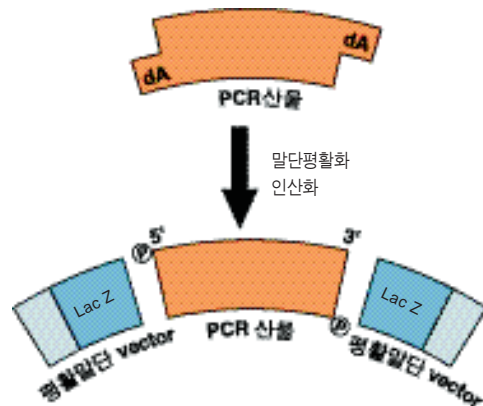
## ■ T-Vector cloning

T-Vector cloning은 PCR 산물을 cloning하는 방법 중 가장 많이 이용된다. PCR에 사용되는 *Taq* polymerase는 증폭한 DNA의 3' 말단에 dA를 부가하는 성질이 있어 PCR 산물 대부분은 그 3' 말단에 dA 돌출 염기를 갖고 있다. T-Vector는 위 이론을 바탕으로 고안된 PCR 산물 cloning용 plasmid vector로 3' 말단에 dT 돌출 염기를 갖고 있다 (Novagen사의 AccepTor™ Vector Kit은 dT의 대신 dU가 첨가된 vector를 사용하고 있으나, T-Vector과 같은 방법으로 cloning할 수 있다). T-Vector는 self ligation하지 않으므로 탈 인산화할 필요가 없다. T-Vector의 5' 인산을 ligation에 이용할 수 있어, 삽입하는 PCR 산물을 인산화조작할 필요가 없다. 또 T-Vector의 대부분은 Blue/White selection이 가능하므로 쉽게 screening할 수 있다. 당사의 PCR 효소 중 *TaKaRa Taq™*, *TaKaRa Ex Taq™*, *TaKaRa LA Taq™*, *TaKaRa Z-Taq™*으로 증폭한 PCR 산물의 대부분은 3' 말단에 dA가 첨가되므로 T-Vector를 이용할 수 있다. *Pyrobest®* DNA Polymerase는 증폭한 PCR 산물의 대부분이 평활말단이므로 그대로 T-Vector에 사용할 수 없다. T-Vector는 짧은 단편(약 2 kbp 이하)에서 효율이 높으며, 길이가 길어지면 효율이 나빠진다.



## ■ 평활말단 vector cloning

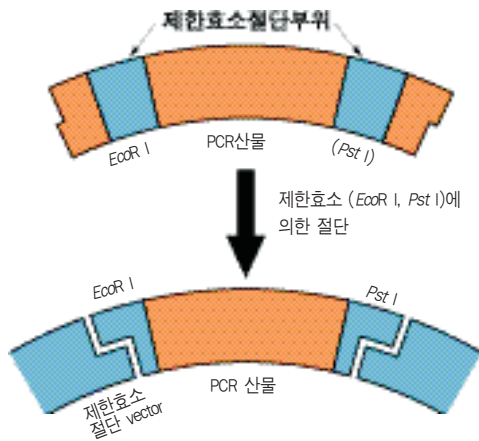
평활말단 vector를 이용할 경우 dA가 돌출한 PCR 산물의 3' 말단을 T4 Polynucleotide Kinase로 5' 말단을 인산화 해야한다. Novagen사의 Perfectly Blunt™ Cloning Kit로 평활화, 인산화를 동시에 할 수 있어, PCR 산물의 처리가 쉽다. 인산화된 평활말단 단편을 탈 인산화된 평활말단 plasmid vector에 cloning한다. 이 방법은 모든 종류의 polymerase로 증폭한 산물도 cloning 할 수 있다(*Pyrobest®* DNA Polymerase로 증폭한 산물일 경우 말단을 평활화할 필요 없다.). Perfectly Blunt™ Cloning Kit에 포함되어 있는 vector는 Blue/White selection이 가능하다.



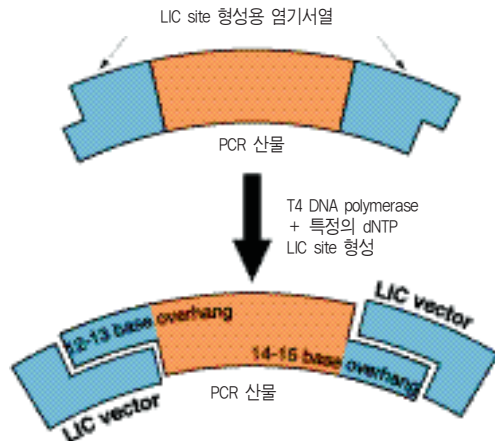
## ■ 제한효소 절단부위를 부가하는 방법

PCR을 할 때, 미리 2개의 primer 5' 말단에 별도의 제한효소 인식배열을 부가하여 증폭 단편의 양쪽말단에 다른 제한효소 절단부위를 도

입할 수 있다. 그 절단부위를 이용하여 cloning하면 방향성을 가진 cloning이 가능하고 또 vector의 self ligation을 방지할 수 있어 cloning 효율을 향상시킬 수 있다. 이 제한효소 인식서열은 목적하는 증폭 단편 내에 존재하지 않고, 가능하면 4 염기 돌출말단이 생성하는 인식서열(*EcoR* I, *Pst* I 등)로 하면 고효율로 ligation할 수 있다. 주의할 점은 부가하는 제한효소 인식서열의 5'측에 몇 개의 염기를 임의로 추가해야한다. 대부분의 제한효소는 인식서열 외에 몇 개의 염기가 없으면 올바르게 작용하기 어렵다.



적인 특정 염기서열(12~15 염기)을 5' 말단에 추가한 primer로 목적유전자를 PCR로 증폭한다. 그 증폭단편에 한 종류의 특정한 dNTP 존재 하에 T4 DNA Polymerase를 작용시킨다. 그러면 그 효소의 3'→5' exonuclease 활성으로 특정 dNTP 직전까지 염기가 잘려나가고 LIC vector의 single strand 돌출말단에 상보적인 돌출말단(LIC site)이 생성된다. 이 LIC site를 가지는 증폭 단편과 LIC Vector를 annealing시켜 ligation하지 않고도 방향성 있는 cloning이 가능하다. Novagen사에서 각종 목적에 적합한 LIC Vector Kit이 판매되고 있다.



■ LIC Vector를 사용하는 방법

LIC(Ligation-Independent Cloning) Vector는 비 상보적인 single strand 12~15 염기(특정 dNTP중 한 종류만 포함하지 않는다)를 양 말단에 가진 plasmid vector이다. LIC Vector의 single strand 돌출부위에 상보

Cloning 방법	사용 vector	PCR primer 설계	Insert(PCR 산물) 처리	특징
T-Vector로 cloning	pT7 Blue T-Vector, 각종 Acceptor™ Vector Kit (Novagen사) 등	특별히 제한은 없다	PCR 산물의 정제*	조작이 간단 Blue/White selection
평활 말단화 vector로 cloning	각종 Perfectly Blunt™ Cloning Kit (Novagen 사) BAP 처리 vector pUC118 <i>Hinc</i> II (TaKaRa Code 3322) 등	특별히 제한은 없다	PCR 산물의 정제* ↓ 말단평활화, 인산화 (Perfectly Blunt™ Cloning Kit 사용)	어떤 종류의 DNA Polymerase로 증폭한 산물도 cloning Blue/White selection
제한효소 site 부가	제한효소 처리한 임의 돌출말단 vector	primer의 5' 말단에 제한효소 절단부위 + 임의 서열(12~15염기) 부가	PCR 산물의 정제* ↓ 제한효소로 절단	2종류의 제한효소를 사용하여 방향성 있는 cloning
LIC Vector로 cloning	각종 LIC Vector Kit(Novagen 사)	Primer의 5' 말단에 특정 서열(12~15염기) 부가	PCR산물 정제* ↓ T4 DNA Polymerase로 LIC site 형성(LIC Vector Kit 사용)	방향성있는 cloning

\*: PCR 산물을 agarose 전기영동으로 목적 서열의 증폭을 확인한다. 목적 서열만 증폭된 경우 SUPREC™-02(TaKaRa Code9041) 등 DNA 회수용 제품을 사용하여, primer 및 dNTPs를 제거한다. 목적 산물 이외의 band가 증폭된 경우 SUPREC™-01(TaKaRa Code 9040), EASYTRAP™ Ver.2(TaKaRa Code 9410), TaKaRa RECOCHIP(TaKaRa Code 9039) 등을 사용하여 agarose gel에서 목적산물을 회수한다.