

# III액 (Transformation Enhancer) 첨가로 효율 향상!!

## DNA Ligation Kit Ver.2.1

TaKaRa Code 6022 50~100회용

당사의 best item으로 자리잡고 있는 DNA Ligation Kit Ver.2에 벡터 ligation 반응 후의 형질 전환효율을 향상시키는 III액 (Transformation Enhancer)을 새로 추가하여 version up 하였다.

목적 유전자와 plasmid 벡터와의 ligation을 효율적으로 하고자 할 때, insert/벡터의 몰비가 매우 중요하다. 보통 벡터에 대해 3 ~ 10배의 몰비로 insert DNA를 사용하도록 권장하고 있다. 그러나 항상 ligation 반응에 따라 충분한 양의 목적 유전자를 얻을 수 있는 것은 아니다. 또한 DNA 단편의 size나 말단 형태 등에 따라 충분한 ligation 효율을 얻지 못하는 경우도 있다. 이런 경우에는 ligation 반응 종료액을 그대로 형질전환에 이용해도 cloning된 클론을 조금밖에 얻지 못하거나 전혀 얻지 못하는 경우가 있다. 이 경우, ligation 반응 후 용액에 1/10 용량의 III액을 첨가하면 형질 전환효율이 향상되어, 더 많은 클론을 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 그 효과는 목적 유전자의 말단 형태, size와 관계없다. 형질 전환시에 III액을 첨가했을 경우의 효과는 다음과 같다.

### 실험 예 1: III액 (Transformation Enhancer)의 효과

#### 【방법】

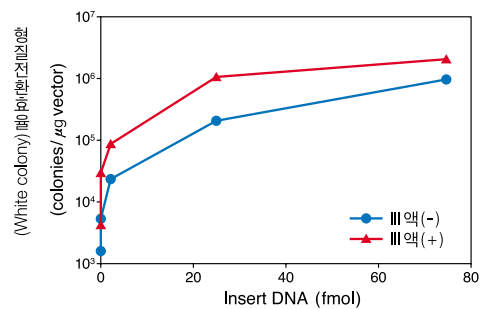
벡터 (50 ng, 25 fmol) [돌출말단: pUC118 *Hind*III/BAP (TaKaRa Code 3324) 또는 평활말단: pUC118 *Hinc*II/BAP (TaKaRa Code 3322)]에  $\lambda$ DNA 유래의 *Hind*III 단편 (0.25 ~ 75 fmol: 벡터와의 몰비 1/100 ~ 3) 또는  $\lambda$ DNA 유래의 *Hinc*II 단편 (2.5 ~ 75 fmol: 벡터와의 몰비 1/10 ~ 3)을 추가한 DNA 용액 5  $\mu$ l에 I액 5  $\mu$ l를 혼합하고 16°C에서 30분간 반응하였다. 반응 후 반응액 10  $\mu$ l 또는 반응액 9  $\mu$ l에 III액 1  $\mu$ l를 첨가한 것으로, *E.coli* JM109 Competent Cells (TaKaRa Code 9052)를 형질전환하여 X-Gal, IPTG를 포함한 L-amp plate에서 colony를 형성시켰다. White colony수를 측정하여 형질 전환효율을 조사한 결과를 그림 1 (A), (B)에 나타냈다.

#### 【결과】

그림 1 (A), (B)에서 알 수 있듯이, 어느 조건이라도 형질 전환시에 1/10 용량의 III액을 첨가함으로써 white colony수가 많아져, 형질 전환효율 향상이 인정되었다.

#### $\lambda$ *Hind* III 단편 (564 bp)

Insert DNA (fmol)	Insert/vector (몰비)	형질 전환 효율 (white colony) (colonies/ $\mu$ g vector)		White colony 비율 (%)	
		III액 (-)	III액 (+)	III액 (-)	III액 (+)
0	-	$1.6 \times 10^3$	$4.4 \times 10^3$	9.9	7.9
0.25	1/100	$5.2 \times 10^3$	$3.1 \times 10^4$	41.9	29.8
2.5	1/10	$2.3 \times 10^4$	$8.8 \times 10^4$	79.0	75.2
25	1	$2.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	98.1	98.7
75	3	$9.5 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	99.2	99.1



#### $\lambda$ *Hind* III 단편 (2,027 bp)

Insert DNA (fmol)	Insert/vector (몰비)	형질 전환 효율 (white colony) (colonies/ $\mu$ g vector)		White colony 비율 (%)	
		III액 (-)	III액 (+)	III액 (-)	III액 (+)
0	-	$1.8 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	12.7	12.6
6.25	1/4	$9.4 \times 10^3$	$2.3 \times 10^4$	38.8	41.1
12.5	1/2	$1.5 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4$	56.0	46.0
25	1	$2.3 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$	69.9	70.0
75	3	$4.6 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	75.8	74.0

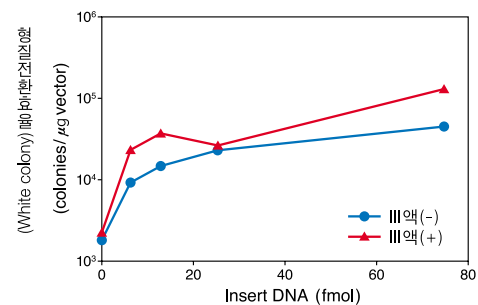
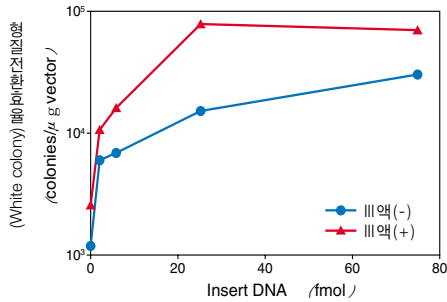


그림 1 (A) 돌출말단 벡터 ligation

$\lambda$ HincII 단편 (500 bp)

Insert DNA (fmol)	Insert/vector (몰비)	형질 전환 효율 (white colony) (colonies/ $\mu$ g vector)		White colony 비율 (%)	
		III액 (-)	III액 (+)	III액 (-)	III액 (+)
0	-	$1.2 \times 10^3$	$2.7 \times 10^3$	8,7	8,8
2,5	1/10	$6.0 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	23,3	16,5
6,25	1/4	$6.8 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4$	38,2	32,3
25	1	$1.5 \times 10^4$	$7.8 \times 10^4$	78,9	72,2
75	3	$3.0 \times 10^4$	$6.9 \times 10^4$	75,0	84,9



$\lambda$ HincII 단편 (2,080 bp)

Insert DNA (fmol)	Insert/vector (몰비)	형질 전환 효율 (white colony) (colonies/ $\mu$ g vector)		White colony 비율 (%)	
		III액 (-)	III액 (+)	III액 (-)	III액 (+)
0	-	$1.0 \times 10^3$	$3.6 \times 10^3$	6,4	6,3
6,25	1/4	$5.2 \times 10^3$	$1.8 \times 10^4$	17,9	14,2
12,5	1/2	$6.0 \times 10^3$	$6.7 \times 10^3$	22,7	20,1
25	1	$2.0 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	33,3	36,5
75	3	$4.6 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	31,9	38,5

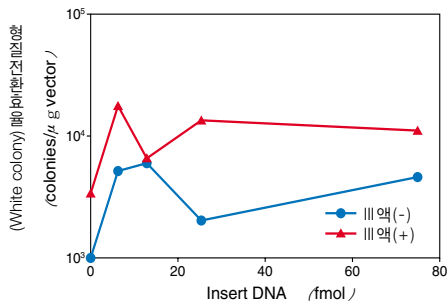


그림 1(B) 평활말단 벡터 ligation

이 밖에 III액을 첨가한 각 조건에서 얻은 white colony 중 8개를 취해, PerfectShot<sup>™</sup> Insert Check PCR Mix (TaKaRa Code RR020A)를 이용해 insert를 확인하였다. 그 결과, insert/벡터의 몰비가 1/100 ~ 1/10처럼 보통의 ligation에 비해 상당히 소량의 insert DNA를 이용한 경우라도 대부분의 white colony (8개 중 6개 이상)에서 목적하는 insert DNA가 포함되어 있음이 확인되었다.

보통 insert DNA 양이 적어질수록 얻어지는 cloning된 colony수는 적어진다. Insert DNA 사용량이 적은 조건에서 벡터 ligation을 실시한 경우나 ligation 효율이 낮은 것으로 예상될 경우 (insert DNA의 size가 크거나 평활말단인 경우 등)는 ligation 반응 후에 III액을 첨가하여 형질을 전환할 것을 권장한다.

실험 예 2: 타사 제품과의 비교

실험 1에서 사용한 insert DNA와 벡터 DNA로 DNA Ligation Kit Ver.2.1 성능을 타사제품과 비교하였다.

- 벡터 DNA : 50 ng (25 fmol)
- Insert DNA : 75 fmol
- Ligation 조건 : 각 Ligation Kit의 표준 protocol
- 형질전환 : (1/5 양의 ligation 반응 종료액 (Vector DNA=10 ng)/100  $\mu$ l *E.coli* JM109\*

\* *E. coli* JM109 Competent Cells

【결과】

DNA Ligation Kit Ver.2.1은 어느 size나 말단형태의 insert DNA를 이용한 경우라도 타사제품에 비해 효율적으로 형질전환체를 얻을 수 있었다 (그림 2).

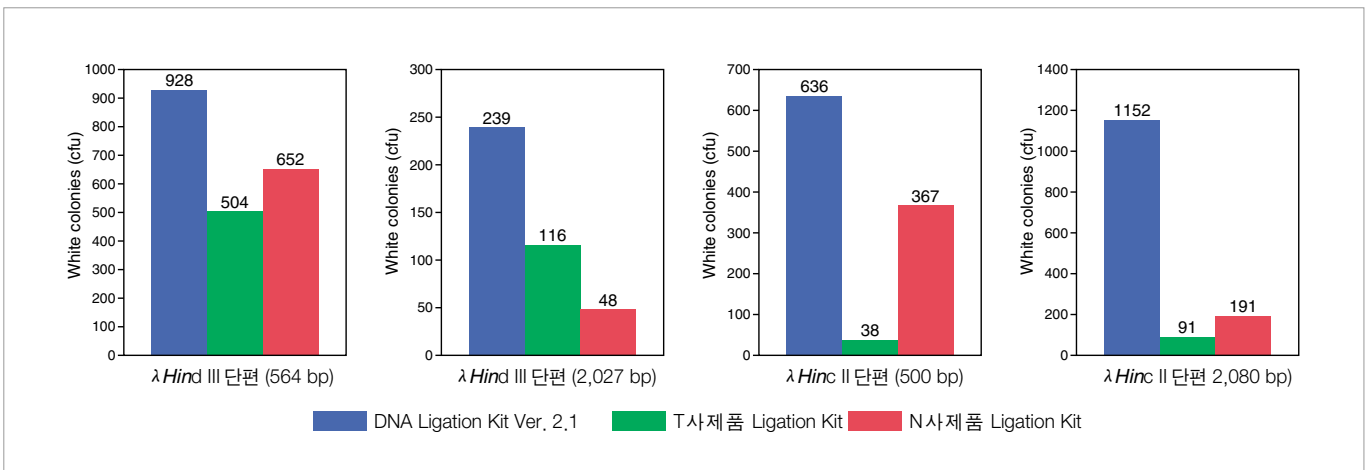


그림2 타사제품과의 성능비교