

PCR fragment의 cloning을 간편하게! Perfect-T Cloning Kit

보다 더 효율적으로 사용하기 위하여

TaKaRa Code TK6002

Perfect-T Cloning Kit는 pMD18-T vector(pUC18 유래)와 TaKaRa DNA Ligation Solution(2×)과의 결합으로 탄생한 T vector cloning을 간편하게 할 수 있도록 만들어진 kit이다.

본 고에서는 Perfect-T Cloning Kit를 사용할 때의 요령과 주의사항에 대하여 소개하여 본 제품의 보다 효율적인 방법을 제시하고자 한다.

Cloning 효율 비교

일반적으로 PCR fragment을 이용한 T vector cloning에는 1 kb 이하의 PCR fragment가 많이 이용된다. 본 실험에서는 500 bp fragment를 이용하여 P사의 T vector와 클로닝 효율을 비교하였다.

[반응]

Vector는 두 제품 모두 50 ng을 사용하였으며, insert와의 비율은 molar ratio 1:1 비율을 사용하였다. Ligation 반응은 TaKaRa Ligation solution(Perfect-T Cloning Kit 내 포함)을 이용하였으며, 16 °C에서 30 분간 반응하였다.

Transformation은 *E. coli* JM109를 사용하였으며, heat shock method로 형질전환시켰다.

[결과]

Insert Size	Molar ratio	Perfect-T Cloning Kit		P사 T vector ¹	
		Colony forming unit(cfu/μg)	Blue colony %	Colony forming unit(cfu/μg)	Blue colony %
0.5 K	1:1	2.4 × 10 ⁵	4 %	1.6 × 10 ⁵	6 %

※ Transformation efficiency : 1.4 × 10⁷ cfu/μg

¹P사 T vector kit내 포함된 ligase를 이용한 경우, colony forming unit(cfu/μg)는 8.1 × 10⁴ cfu/μg 이었으며, Blue colony는 11%였다.

Perfect-T Cloning Kit가 P사의 T vector 에 비해 동등 이상의 효율을 나타내었다.

Size가 큰 PCR fragment의 T vector로의 cloning

Perfect T Cloning Kit를 이용한 T vector로의 cloning에 비교적 size가 큰 PCR fragment(3 kb, 5 kb)를 target으로 하여, 그 효율을 P사의 T vector와 비교하였다.

[반응]

Vector는 위의 실험과 동일하게 두 제품 모두 50 ng을 사용하였으며,

insert와의 비율은 molar ratio 1:3 비율을 사용하였다. Ligation 반응은 TaKaRa Ligation solution(Perfect-T Cloning Kit 내 포함)을 이용하였으며, 16 °C에서 16 시간(Over night) 반응하였다.

Transformation은 *E. coli* JM109를 사용하였으며, heat shock method로 형질전환시켰다. 보다 많은 colony를 얻기 위하여 cell들을 1,000 g 에서 10분간 원심분리하여 가라앉힌 다음 다시 SOC medium 100 μl 에 suspension하여 100 μl 모두를 plate에 도말하였다.

<반응표>

Insert	Molar ratio	pMD18-T	P사의 T vector
		Insert 첨가량(ng)	Insert 첨가량(ng)
3kb	1:3	150	150
5kb	1:3	250	250

(Vector의 size를 3 kb로 계산하였다.)

[결과]

Insert Size	Molar ratio	pMD18-T		P사 T vector ¹	
		Colony forming unit(cfu/μg)	Blue colony %	Colony forming unit(cfu/μg)	Blue colony %
3 kb ¹	1:3	2.8 × 10 ²	26 %	2.0 × 10 ²	27.6%
5 kb ¹	1:3	5.2 × 10 ²	26.1%	3.4 × 10 ²	29.8%

※ Transformation efficiency : 1.0 × 10⁷ cfu/μg

¹size가 큰 insert의 삽입은 cloning 효율 면에서 size가 작은 insert 삽입의 효율과는 비교될 수 없을 정도로 낮게 나온다.

Perfect-T Cloning Kit가 P사의 T vector 정도의 동등 효율을 나타내었다.

Size가 큰 PCR fragment의 cloning에서 보다 높은 cloning 효율을 얻으려면

1. Insert가 깨끗해야 한다.

Size가 클수록 target 이외의 band가 없어야 한다. 정제과정 중 특히 이 부분에 주의를 해야 하는데, insert 정제 방법으로 gel extraction을 필수적으로 해야 하며, 1회 이상하여 insert의 순도를 높이는 것이 cloning 효율을 올리는 최선의 방법이다.

2. Vector와 insert의 비율을 적절히 조절해야 한다.

일반적으로 vector DNA와 insert DNA의 비율은 1:2-10 정도가 적당하다. 이 때, vector와 insert의 비율을 절대량(예를 들어 ~ng)으로 생각하는 경우가 많다. 이 적절한 비율의 의미는 molar ratio임을 명심해야 한다.

3. Blue colony selection을 정확히 해야 한다.

배지의 상태에 따라서 blue colony selection이 정확히 되지 않아 cloning 효율 및 정확도 (white colony중 insert가 삽입된 비율)를 의심하는 경우가 있다. 실험에 사용되는 배지는 사용 직전에 만드는 것이 가장 좋으며, 시료를 도말하기 전에 IPTG(20%, 7 μl)와 X-Gal(20 mg/ml, 40 μl)을 먼저 도말한 후 plate 표면에 물기가 사라질 때까지(~30분) 37 °C에서 incubation한 후에 사용한다.

또한 LB agar plate를 만들 때 항생제(antibiotics)와 같이 X-Gal, IPTG를 첨가하여 만들기도 하는데, 항생제 첨가 시 아래와 같이 X-Gal, IPTG를 첨가하고 plate에 부어 굳힌 다음 실험에 이용한다. 하지만 X-Gal이 빛에 의해 분해되기 쉬울 뿐만 아니라 열에 의해 깨질 가능성도 있으므로, plate를 만든 후 바로 실험에 사용할 때를 제외하고는 권장하지 않는다.

[1 L LB agar plate용 medium]

1.5 ml X-Gal(20 mg/ml)

135 μl IPTG(20%)

Perfect-T Cloning Kit 사용시 주의사항

- 1) Ligation Solution은 효소를 포함하고 있는 용액 이므로 반드시 얼음 위에서 녹여야 하며, 사용 직전에 부드럽게 섞어준다.
- 2) Cloning에 이용하는 insert DNA 단편(PCR fragment)은 가능한 agarose gel로 부터 회수하여 정제하는 것이 좋다. PCR fragment인 target DNA 외에 전기영동 상으로는 확인이 불가능한 비 특이적인 짧은 단편 및 잔존하는 dNTP, primer 등이 TA Cloning의 효율에 영향을 줄 수 있다.
- 3) Ligation 후 반응액을 직접 형질전환하는 경우 반응액이 20 μl를 초과하지 않도록 한다.
- 4) 기본적으로 ligation 반응은 16°C에서 반응하는 것이 좋으며, 반응온도가 높으면(>26°C) 환상 DNA 형성이 저해된다.
- 5) Ligation 효율이 떨어질 경우에 반응시간을 길게 하는 것이 좋으나, TA cloning의 경우 1시간 이내를 권장한다. 반응시간이 길 경우 비특이적 반응이 일어날 수도 있다.
- 6) Ligation 반응을 한 DNA 양이 많거나 electroporation을 이용하여 형질전환할 경우에는 반응액을 ethanol 침전하여 정제한 후 형질전환에 적합한 용액에 다시 녹여 사용한다.

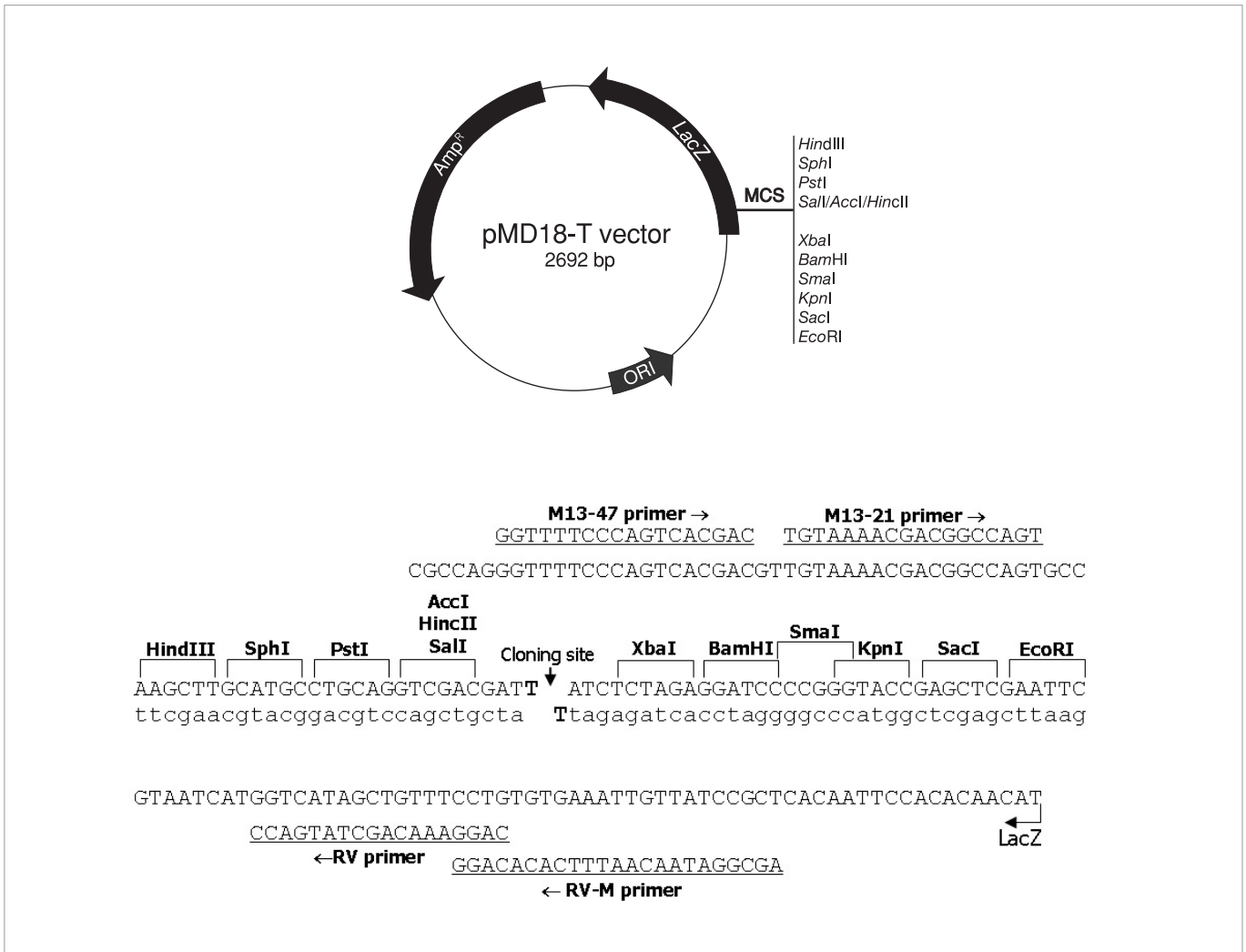


그림 1 pMD18-T Vector map

* 본 제품의 상세 Manual 이 준비되어있으니, 당사 또는 지역 전문대리점으로 연락하시기 바랍니다.