

## 이제부터 클로닝은 고품질의 Competent Cell로!! *E. coli* HST08 Premium Competent Cells

- 일반적인 클로닝에도, 긴 단편 (10 kb 이상) 클로닝에도 최적!
- 메틸화된 DNA의 클로닝도 가능
- cDNA library나 genome library의 제작에도 추천!
- SOC 배지, control 플라스미드를 첨부

*E. coli* HST08 Premium Competent Cells은 클로닝에 필요한 거의 모든 요소를 겸비한 새로운 대장균주의 Competent Cell이다. HST08 Premium 균주는 외래의 메틸화된 DNA를 절단하는 유전자 (*mcrA*, *mrr-hsdRMS-mcrBC*)를 완전하게 결손시켜 한층 더 높은 형질전환 능력을 가지고 있기 때문에, 메틸화된 DNA의 클로닝에서 cDNA library나 genome DNA library의 제작, 서브클로닝까지 폭넓은 실험에 사용할 수 있다. 긴 단편의 플라스미드 DNA 형질전환 능력도 뛰어난 TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024)과 함께 사용할 경우, 10 kb 이상의 긴 단편 DNA 클로닝이나 library 제작도 쉽게 수행할 수 있다. 본 균주는 F<sup>-</sup> 이고, BAC, Fosmid vector의 사용이 가능하다. 또한, pUC계의 플라스미드 형질전환시에는 β-galactosidase의 α-상보성을 이용해 X-Gal에 의한 재조합체의 blue/white 선별이 가능하다.

### 【HST08 Premium의 유전자형】

F<sup>-</sup>, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*,  $\phi 80dlacZ \Delta M15$ ,  $\Delta(lacZYA-argF) U169$ ,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\Delta mcrA$ ,  $\lambda^{-}$

### ■ 실험예

본 제품과 *E. coli* DH5α Competent Cells (TaKaRa Code 9057) 및 A사 제품의 DH10B Competent Cell을 이용해 형질전환 효율을 비교했다. 카탈로그에 표시된 각 제품의 형질전환 효율은 >1.0×10<sup>9</sup> 형질전환체/μg pUC19 DNA이다.

#### (1) 실험예-1 : 정제 플라스미드를 이용한 형질전환 효율의 비교

### 【방법】

2 kb (100 pg), 10 kb (1 ng), 20 kb (1 ng)의 플라스미드 DNA 를 이용해 각 competent cell을 형질전환하고, ampicillin을 포함한 LB agar배지에 도말한 후 얻은 콜로니수로부터 형질전환 효율을 계산했다. 그리고 2 kb 플라스미드 DNA의 형질전환 효율을 각각 100 %로 해서 10 kb, 20 kb 플라스미드의 형질전환 효율의 비율을 산출했다 (형질전환 비율).

### 【결과】

*E. coli* HST08 Premium Competent Cells에서는 2 kb, 10 kb, 20 kb의 플라스미드 DNA 에서도, A사 제품 DH10B Competent Cell과 동등한 이상의 형질전환 효율을 얻을 수 있었다(그림 1). 또한, 10 kb, 20 kb의 플라스미드 DNA 형질전환에서는 긴 단편의 플라스미드 형질전환에 이용되는 DH5α, DH10B와 비교해 약 2배 높은 형질전환 효율을 확인할 수 있었다 (그림 2).

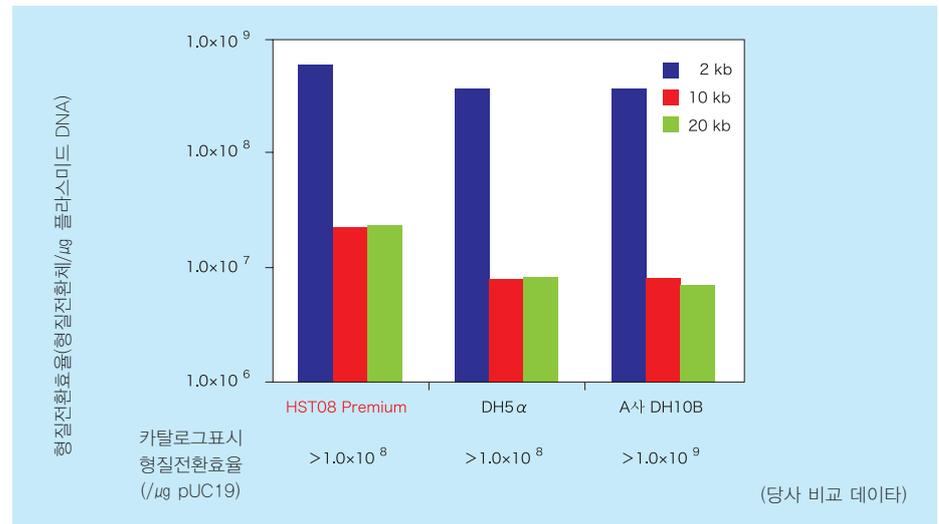


그림 1. 정제 플라스미드를 이용한 형질전환 효율의 비교

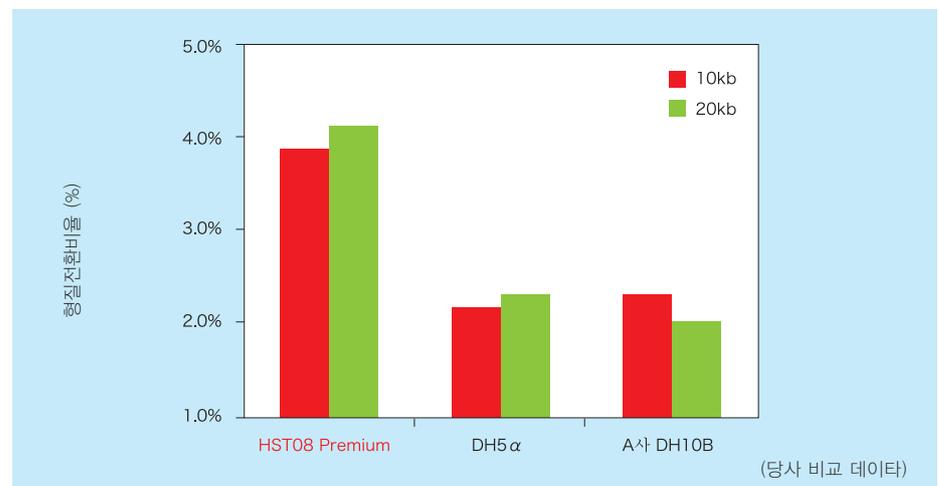


그림 2. 긴 단편의 플라스미드 형질전환 비율의 비교  
(2 kb 플라스미드 DNA의 각 형질전환 효율을 100%로 해서 산출)

continued...

**(2) 실험예-2 : Ligation 반응액을 이용한 형질전환 효율의 비교**

**【방법】**

2 kb, 20 kb의 DNA 단편과 pUC118 *Hind* III/BAP (TaKaRa Code 3324)의 ligation 반응에 각각 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa Code 6023) 및 TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024)을 이용하였다. 반응액의 일부를 각 Competent Cell로 형질전환시켜, ampicillin을 포함한 LB (+X-Gal) agar배지에 plating 후, 얻어진 white colony의 수로부터 형질전환 효율을 계산하였다. 그리고 2 kb DNA 단편의 ligation 반응액에 의한 형질전환 효율을 각각 100 %로 해서 20 kb DNA 단편의 ligation 반응액에 의한 형질전환 비율을 산출하였다.

**• 2 kb DNA 단편의 ligation 반응 조건**

2 kb DNA/*Hind* III (100 ng)와 pUC118 *Hind* III/BAP (50 ng)의 ligation 반응은 DNA Ligation Kit <Mighty Mix>를 이용

**• 20 kb DNA 단편의 ligation 반응 조건**

20 kb DNA/*Hind* III (75 ng)와 pUC118 *Hind* III/BAP (25 ng)는 TaKaRa DNA Ligation Kit LONG을 이용해 16 °에서 6시간 ligation 반응

**【결과】**

Ligation 반응액을 이용한 형질전환에 대해서도 insert size가 2 kb, 20 kb 모두에서 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells을 이용했을 경우에 가장 높은 형질전환 효율을 얻을 수 있었다(그림 3). 특히 20 kb 단편의 클로닝에서는 현저한 차이를 볼 수 있어 DH5 $\alpha$ , DH10B와 비교해 긴 단편의 클로닝에서의 형질전환율이 높은 것을 알 수 있었다(그림 4). 따라서 통상의 클로닝 작업을 효율적으로 하는 것은 물론, 특히 cDNA library나 genome library 제작시 library 중의 긴 DNA 단편의 함유율을 높인다고 예상할 수 있다.

**(3) 실험예-3 : Agar 배지상에서 형질전환체의 생육속도 비교**

**【방법】**

2 kb, 10 kb의 플라스미드 DNA를 이용하고, 실험예 1의 방법에 따라, *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 및 메틸화 서열 제한결손 등 유사한 유전 형질을 가지는 A사 제품의 DH10B Competent Cell을 각각 형질전환 해서, 15시간 배양 후 agar 배지상의 colony를 촬영했다.

실험예 1의 방법에 따라, *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 및 메틸화 서열 제한결손 등 유사한 유전 형질을 가지는 A사 제품의 DH10B Competent Cell을 각각 형질전환 해서, 15시간 배양 후 agar 배지상의 colony를 촬영했다.

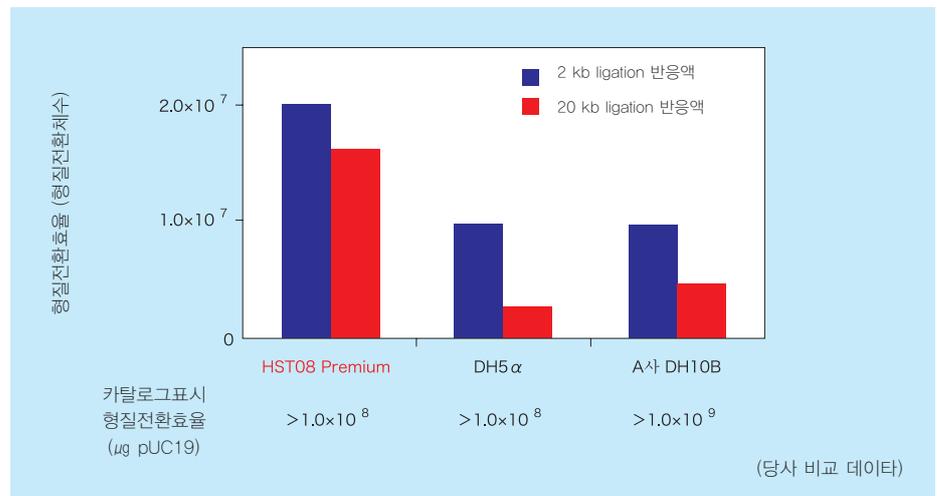


그림 3. Ligation 반응액을 이용한 형질전환 효율의 비교

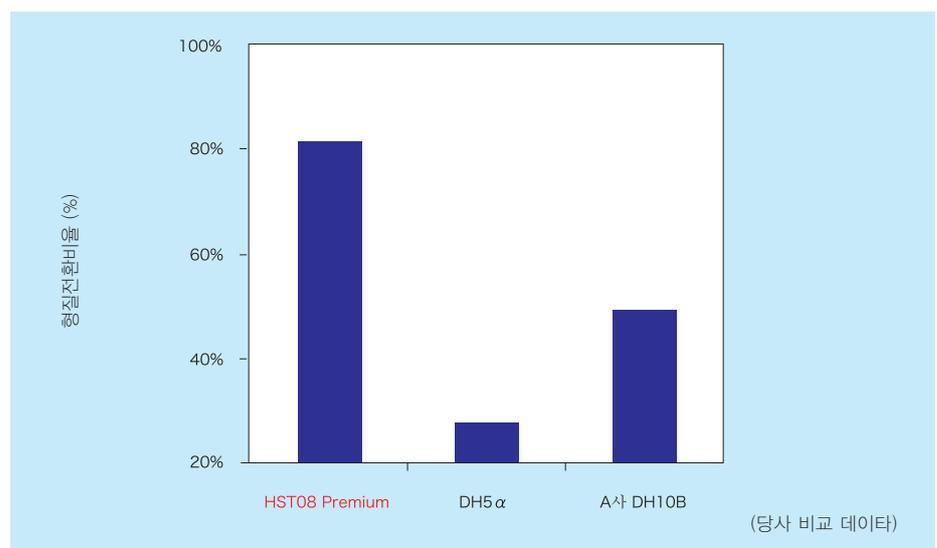


그림 4. 20 kb DNA 단편 클로닝 시의 형질전환 비율 (2 kb DNA 클로닝 시의 각 형질전환 효율을 100 %로 해서 산출)

# 이제부터 클로닝은 고품질의 Competent Cell로!! *E. coli* HST08 Premium Competent Cells

continued...

**【결과】**

2 kb 플라스미드 DNA를 도입했을 경우, 양쪽 대장균주에서 형질전환 colony의 생육속도에 분명한 차이는 확인되지 않았다(그림 5 상단). 한편, 10 kb 플라스미드 DNA를 도입했을 경우에는 HST08 Premium 균주는 DH10B 균주에 비해 분명하게 생육속도가 빠르고, 15시간 후에 형질전환 colony를 쉽게 확인할 수 있었다(그림 5 하단). 대장균주에 따라 긴 단편의 플라스미드 도입에 의해 생육이 늦어지는 현상을 자주 볼 수 있지만, HST08 Premium 균주에서는 생육속도를 유지할 수 있어 통상의 배양시간으로도 충분한 크기의 colony를 확인할 수 있었다.

**■ 끝으로**

Competent Cell의 성능을 나타내는 척도로써 카탈로그 등에 기재되어 있는 형질전환 효율은 일반적으로 Competent Cell 제작 직후에 정제 플라스미드를 이용해 얻어지는 값이 사용되고 있다. 실제로 실험에 이용할 때의 형질전환 효율이 표기값 이하로 나타나는 일이 있다. 또한, 일반적으로 ligation 반응액을 그대로 형질전환에 이용하는 경우, 반응액의 버퍼 조성 등에 의해 형질전환이 저해되어 충분한 효율을 얻을 수 없는 경우도 있다. 따라서, 카탈로그에 기재된 형질전환 효율만을 기준으로 Competent Cell의 성능을 판단하는 것은 곤란하다. 신제품의 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells은 실험예에서 보여준 것처럼, 정제 플라스미드, ligation 반응액의 어느 조건에 있어서도 높은 형질전환 효율을 얻을 수 있다는 것을 확인할 수 있다. 일반적인 클로닝 작업에서부터 library 제작까지 매일 사용하는 Competent Cell로 연구에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

— **자매품** —

*E. coli* HST04 *dam*<sup>-</sup> /*dcm*<sup>-</sup> Competent Cells  
(TaKaRa Code 9129)

유전자재조합 실험용 숙주로 사용되고 있는 대장균주의 상당수는 *dam* methylase, *dcm* methylase를 보유하고 있어, 도입된 외래 플라스미드의 GATC, CCWGG염기서열 부분이 메틸화된다. 이러한 서열이 인식 부위에 포함된 일부의 메틸화 감수성 제한효소에서는 플라스미드상에 인식 서열이 존재해도 절단할 수 없다. 새롭게 발매된 *E. coli* HST04 *dam*<sup>-</sup>/*dcm*<sup>-</sup> Competent Cells은 본래 대장균이 가지고 있는

메틸화 유전자 *dam*, *dcm*이 결손되어 있어, 본 균주를 이용해 조제한 플라스미드 DNA는 *dam* 메틸화(G<sup>m</sup>ATC), *dcm* 메틸화(C<sup>m</sup>CWGG) 영향을 받지 않습니다. 본 제품은 이러한 메틸화 감수성의 제한효소에서도 절단 가능한 플라스미드 DNA를 조제하기 위한 숙주로서 이용할 수 있다.

[주의] 본 제품은 클로닝용의 숙주에는 적합하지 않습니다. 형질전환시에는 미리 구축한 플라스미드를 사용하시기 바랍니다.

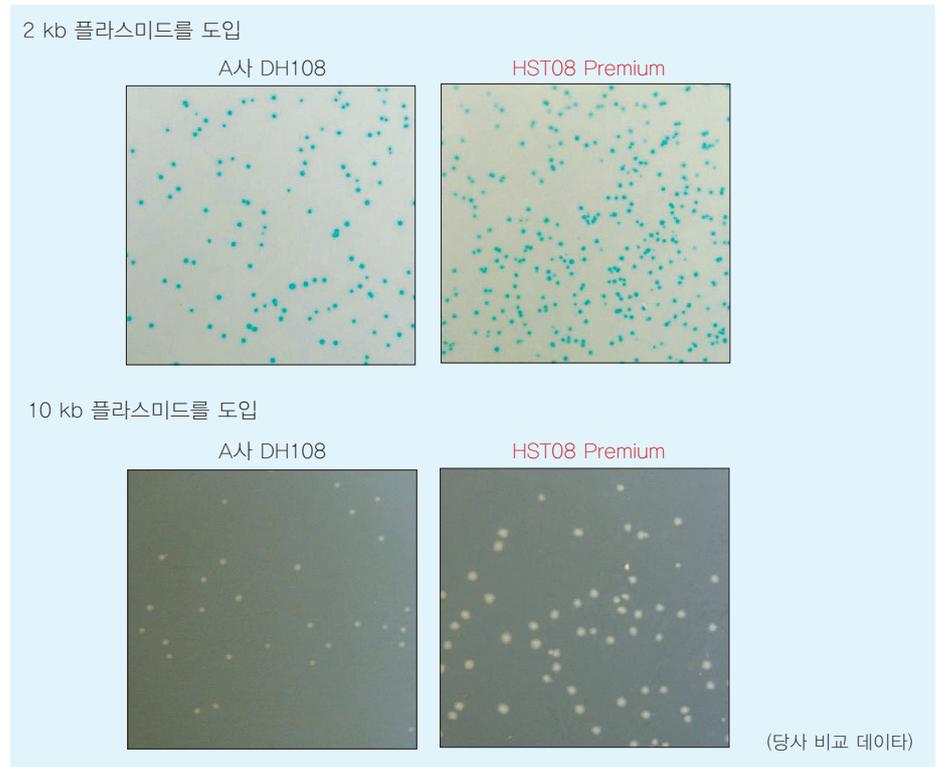


그림 5 형질전환 후 15시간 배양한 colony

**■ 관련제품**

제품명	용량	TaKaRa Code
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	50 rxns	6024
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	50 rxns	6023
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	250 U	R010A
	1,000U	R010B

Insert Size? 이제 더 이상 Cloning에 걸림돌이 아닙니다.

# TaKaRa DNA Ligation Kit LONG

Product	Size	TaKaRa Code
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 kit	6024

- 10 kb 이상의 DNA 단편 cloning에 최적
- BAC library 등 긴 단편의 DNA library 제작에 최적

### ■ 제품구성

DNA Ligase <LONG>	50 $\mu$ l
10 X LONG Ligation Buffer	300 $\mu$ l
Control Insert DNA/ <i>Hind</i> III (18 kb)	30 $\mu$ l
Control Vector (pUC118/ <i>Hind</i> III/BAP)	10 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	1 ml X 2

★ Sticky end의 경우 50 $\mu$ l 반응계 x 50 rxns, blunt end의 경우는 50 $\mu$ l 반응계 x 10 rxns 에 해당.

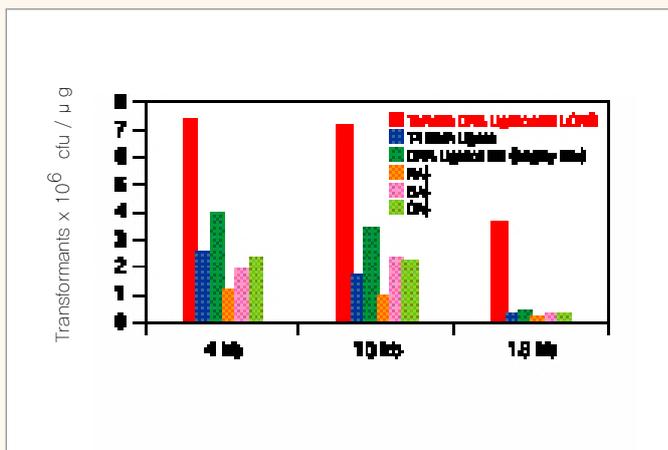
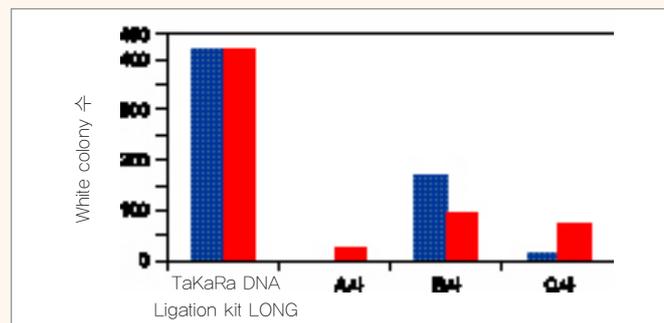


그림 1. Insert size별 ligation 효율 비교

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024), DNA Ligation Kit(Mighty Mix) (TaKaRa Code 6023), T4 DNA Ligase (TaKaRa Code 2011A) 및 타사의 ligation kit를 이용하여 4 kb, 10 kb, 18 kb DNA 단편의 ligation 효율을 비교하였다. TaKaRa DNA Ligation Kit LONG은 4 kb, 10 kb, 18 kb DNA 단편의 ligation에서 모두 높은 형질전환 효율을 나타냈다. 특히, 18 kb DNA 단편의 cloning에서는 다른 제품과 비교하여 최대 50배 이상의 높은 형질 전환 효율을 나타냈다.



• 반응액 중 각 DNA 농도

	Vector DNA (ng / $\mu$ l)	Insert DNA (ng / $\mu$ l)
■ 저농도	0,5	1,5
■ 고농도	2,5	5,0

그림 2. 반응액 DNA 농도차이에 따른 반응성의 변화

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG 및 타사의 ligation kit를 이용하여 18 kb DNA 단편을 ligation하였다. DNA 농도별 비교에서 TaKaRa DNA Ligation Kit LONG을 이용했을 경우에 가장 높은 형질전환 효율을 얻을 수 있었다. 또한 타사의 ligation kit에 비해 형질전환 효율이 DNA 농도의 영향을 적게 받았으며, 넓은 범위의 DNA 농도 조건에서 형질전환 효율이 높게 유지되는 것을 확인하였다.