

BAC library 제작에 최적인 electroporation용 competent cell *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells

- 일반적인 클로닝은 물론 긴 사이즈의 DNA (10 kb 이상) 클로닝에도 추천!
- 메틸화 DNA의 클로닝도 가능
- Electroporation법으로 cDNA library, genome library, BAC library 제작에 최적

E. coli HST08 Premium은 다카라가 개발한 새로운 대장균주로 클로닝에 필요한 거의 모든 요소를 겸비한 제품으로, 최근에는 electroporation용 competent cell인 *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (TaKaRa Code 9028)이 출시되었다. HST08 Premium 균주는 외래의 메틸화 DNA를 절단하는 유전자군(mcrA, mrr-hsdRMS-mcrBC)이 결손되어 있는 competent cell로 매우 높은 형질전환 능력을 가지고 있기 때문에 메틸화된 DNA의 클로닝 뿐만 아니라 cDNA library나 genome DNA library의 제작, 그리고 서브 클로닝까지 폭넓은 용도에 사용할 수 있다. 길이가 긴 플라스미드 DNA의 형질전환 능력도 뛰어나 TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024)과 조합하여 10 kb 이상의 긴 DNA 단편의 클로닝이나 library 제작에도 유용하게 사용할 수 있다. 본 제품은 F⁻이며 BAC벡터나 Fosmid 벡터를 사용할 수 있다. 또한 pUC계 플라스미드로 형질전환시에는 β-galactosidase의 α-complementation을 이용해 X-Gal에 의한 재조합체의 선별이 가능하다. 다양한 형질전환법 중 고전압 펄스를 이용하는 electroporation법은 가장 효과적인 방법 중 하나이다. Electroporation에 HST08 Premium Electro-Cells을 이용하면 보다 높은 효율의 형질전환 결과를 얻을 수 있다.

[HST08 Premium의 유전자형]

F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, φ80dlacZ ΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ-

■ 실험예

본 제품과 *E. coli* DH5α Electro-Cells (TaKaRa Code 9027), A사 electroporation용 DH10B, 그리고 B사 고효율 electroporation용 competent cell을 이용해 형질전환 효율을 비교했다. 카탈로그에 표기된 각 제품의 형질전환 효율은

각각 >1.0×10⁹, >1.0×10⁹, >1.0×10¹⁰ 과 >3.0×10¹⁰ 형질전환체/μg pUC19 DNA 이다.

(1) 정제 플라스미드를 이용한 형질전환효율의 비교

【방법】

형질전환효율은 2 kb (10 pg), 10 kb (100 pg), 20 kb (100 pg), 90 kb (100 pg)의 플라스미드 DNA를 각 competent cell에 동일 조건으로 형질전환한 후 암피실린 함유 LB agar배지에 도말하여 얻은 콜로니 수로부터 계산하였다(그림 1). 2 kb 플라스미드로 얻은 각 형질전환 효율을 100%로 하여, 10 kb, 20 kb, 90 kb 플라스미드 형질전환 효율의 비율을 산출하였다(그림 2). 형질전환에는 *E. coli* Pulser (Bio-Rad사)를 이용하였다.

【결과】

어떤 사이즈의 플라스미드에 대해서도 *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells를 이용했을 경우에 가장 높은 형질전환 효율을 얻을 수 있었다(그림 1). 또한, 20 kb, 90 kb의 길이가 긴 플라스미드를 형질전환한 경우에는 긴 플라스미드의 형질전환에 널리 이용되는 DH10B, DH5α 등보다도 높은 형질전환 효율을 확인 할 수 있었

다(그림 2). 이 특성은 통상의 클로닝 작업 뿐만 아니라 cDNA library나 genome library 제작시 library내 긴단편 DNA 함유율을 높이는 효과가 있을 것으로 예측한다.

(2) BAC library의 제작

【방법】

배양한 고도호열균(高度好熱菌)을 아가로스 겔로 처리 후 protease 처리하여 고분자 계층 DNA를 조제하였다. 제한효소 Sau3A I으로 부분절단 후, 약 100 kb의 DNA 분획을 취하여 TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024)으로 BamH I으로 절단한 pCC1BAC 벡터(Epicentre 사)와 ligation 반응을 실시하였다. 이 ligation 반응액을 투석에 의해 TE 버퍼로 치환 후, electroporation법으로 HST08 Premium Electro-Cells과 A사 DH10B에 도입하였다. 이를 통해 얻은 형질전환체 콜로니 중 10개 클론을 무작위로 선택하여 배양한 후 BAC 클론 DNA를 추출하였다. 각 DNA를 Not I으로 절단 후, pulse-field 전기영동하여 인서트 길이와 함유율을 계산했다.

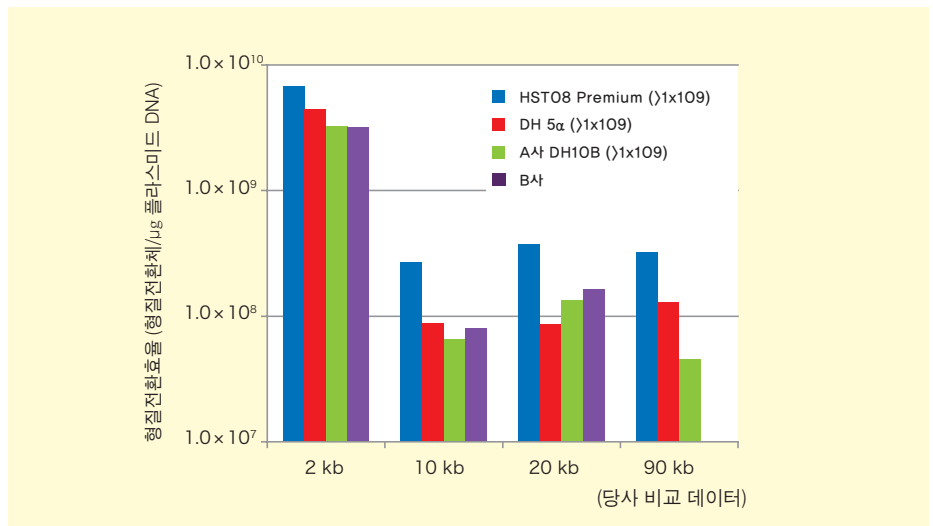


그림1. 정제 플라스미드를 이용한 형질전환 효율의 비교
90 kb 플라스미드에는 BAC 클론을 사용하였다. BAC는 대장균의 F 플라스미드 유래의 복제 개시점을 가지고 있기 때문에, F⁺ 균주인 B사 electro-competent cell에서는 거의 형질전환체를 얻을 수 없었다. (괄호 안은 카탈로그에 표시된 형질전환 효율: /μg pUC19)

continued...

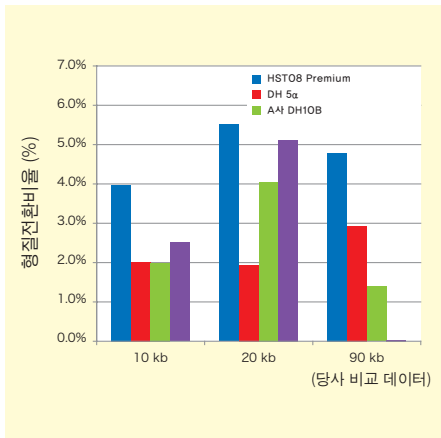


그림 2. 길이가 긴 플라스미드 형질전환 비율의 비교 (2 kb 플라스미드에 의한 각 형질전환 효율을 100%로 산출)

[결과]

두 대장균주 모두, 형질전환 효율이나 평균 인서트 길이가 동등한 형질전환체를 얻을 수 있었다. DH10B 균주에서는 10개 클론 중 2개 클론이 타겟 인서트를 포함하지 않았으며, 이 클론은 PCC1BAC 벡터의 일부 결실이라 생각되는 전기영동 밴드 패턴을 나타내었다(그림 3). 반면, HST08 Premium 균주는 모든 클론에서 긴 단편 인서트를 확인할 수 있었다 (표 1).

■ 결론

형질전환 실험을 실시할 때 카탈로그에 표기된 형질전환 효율을 현저하게 밀도는 경우가 발생하곤 한다. 이는 카탈로그에 기재되어 있는 형질전환 효율이 competent cell 제작 직후에 정제 플라스미드를 이용해 취득한 값을 채용하는 경우가 많은 것도 한 요인이라고 생각할 수 있다. 다카라바이오에서는 출고 시점에서 보증할 수 있는 형질전환 효율을 카탈로그에 기재함으로써 카탈로그에 표기된 competent cell이나 electro-cell의 형질전환 효율과 실제 형질전환을 실시할 때의 효율의 차가 크지 않도록 하고 있다(주: 운송과정에 의해 효율이 약간 저하하는 경우는 발생할 수 있다). 이번 발매한 HST08 Premium Electro-Cells도 동일하다.

또, HST08 Premium 균주는 외래의 메틸화 DNA를 절단하는 유전자군(*mcrA*, *mrr-hsdRMS-mcrBC*) 결손 균주로 자주 사용되는 DH10B 균주보다 생육 속도가 빨라 콜로니 확인이 용이하다(Life Science & Biotechnology 44호 p30). 또한 DH10B와 같이 F⁻균주로 BAC

library 제작에 대해서도 양호한 결과를 얻고 있다. 아울러 본 제품은 일반적인 클로닝 실험 중 고성능 electroporation용 competent cell을 필요로 하는 다양한 형질전환 조작에 폭넓게 사용할 수 있는 유용한 competent cell 이다.

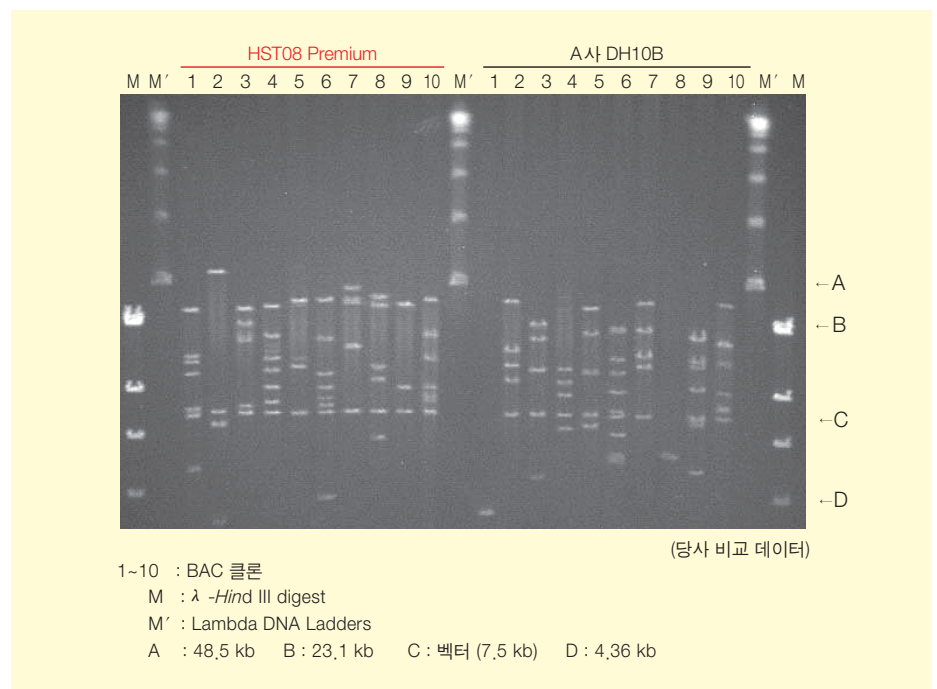


그림 3. 고도호열균 BAC library으로부터 선택한 BAC 클론의 Not I 절단 후의 전기영동 사진

표 1. 고도호열균 BAC library 제작의 비교

	HST08 Premium	A사 DH10B
형질전환 효율 (형질전환체/μg 벡터 DNA)	5.9 × 10 ⁵	4.8 × 10 ⁵
평균 인서트 길이	약 80 kb	약 80 kb
인서트 함유율	10/10	8/10

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit	6024
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	1 Kit	6023
<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 μl × 10)	9128

BAC library 제작에 최적인 electroporation용 competent cell *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells

■ 대장균 competent cell의 기본

Q1) Chemical competent cell과 electroporation용 competent cell은 어떻게 구분하여 사용하는가?

당사 chemical competent cell의 표준적인 형질전환 효율은 1×10^9 transformants/ μ g 플라스미드DNA 정도이지만, electroporation용 competent cell은 10배 정도 효율이 높다. Chemical competent cell에서는 특별한 장치가 필요없고, 간단한 조작으로 플라스미드 도입을 실시할 수 있다. 사이즈가 큰 플라스미드나 library 제작시에는 electroporation용 competent cell을 이용한 형질전환을 추천한다.

Q2) 어떤 대장균주를 competent cell로 사용하면 좋은가?

대장균은 본래 외래 DNA를 절단하는 성질을 가지고 있어서, 어떤 종류의 메틸화 DNA나 PCR 산물 등 염기가 수식되어 있지 않은 DNA를 절단해 버린다. 그 때문에 포유류 게놈 DNA나 메틸화 cDNA(library 제작시), PCR 산물을 클로닝하는 경우에는, 제한-수식(restriction-modification) 유전자(*mcrA*, *mcrB* 등)를 결손한 대장균주가 이용되고 있다. 한편, 일부 제한효소(*XbaI* 등)는 메틸화된 플라스미드 DNA를 절단할 수 없기 때문에, *Dam*, *Dcm* methylase 등의 methylation계 유전자의 일부를 결

손한 대장균주로 플라스미드를 조제할 필요가 있다. 다카라바이오에서는 다양한 competent cell을 제공하고 있으므로 사용하는 플라스미드나 실험 목적에 적합한 제품을 이용하면 된다. 클로닝 조작에는 통상 *E. coli* K12주 유래의 대장균주가 사용된다. 그러나 BL21계의 대장균은 형질전환 효율이 낮아 클로닝 조작에는 적합하지 않다.

Q3) 도입 가능한 플라스미드의 크기는?

Chemical competent cell의 경우, 플라스미드 사이즈가 10 kb를 넘으면 도입 효율이 50 % 이하로 떨어지고, 18 kb에서는 약 10 % 정도가 된다. 사이즈가 증가하면 형질전환 효율이 저하되지만 40 kb 정도의 adenovirus 플라스미드도 chemical competent cell로 클로닝 가능하다(pUC계의 플라스미드의 경우, 사이즈 증가에 따라 복제와 분리 단계가 불안정하여 서브 클로닝이 어렵게 된다. 사이즈가 큰 DNA, 안정성에 문제가 있는 DNA는 pBR계의 low copy 플라스미드를 사용한다). 같은 K12주의 대장균에서도 변이 유무에 따라 큰 사이즈의 플라스미드 형질전환 효율이 다르므로, BAC 등 100 kb 정도의 큰 DNA의 도입에는 신제품인 (*E. coli* HST08 Premium Electro-

Cells)(TaKaRa Code 9028)나 Supercharge EZ10 (electroporation용) (TaKaRa Code 636756)의 사용을 추천한다.

Q4) 플라스미드의 순도와 양은 어느 정도가 좋은가?

대장균의 형질전환에는 mini-prep 정도 순도의 DNA로 충분하고 100 μ l의 competent cell에 10~1000 pg 정도의 플라스미드 DNA를 이용한다. 또, electroporation에 의한 형질전환시에는 염을 완전히 제거하기 위해 DNA를 TE buffer나 멸균수에 용해한 것을 사용한다

Q5) 형질전환 후의 콜로니 사이즈가 불균일?

형질전환 후의 올바른 인서트를 포함한 클론이 작은 콜로니를 형성하는 경우가 있다. 아울러 2 mm 정도의 콜로니 주변에 생기는 다수의 작은 콜로니는 satellite colony로 불리며 플라스미드를 보유하고 있지 않다.

Q6) 전달성이나 감염성은 없나요?

통상, 클로닝 조작에는 전달성에 관계하는 F 인자, R 인자를 가지지 않는 대장균주가 사용되고 있기 때문에 전달성이나 감염성은 없다

여전히 T4 DNA Ligase를 사용하신다면? 이제는 바꾸세요.

효소 따로, buffer 따로는 이제 그만!
간편하고 효율적인 2 x premix 타입의 ligation solution
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>(TaKaRa Code 6023)

Insert Size는 이제 더 이상 Cloning에 걸림돌이 될수 없습니다!
TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024)



continued...

■ Ligation & Cloning Q&A

다카라바이오는 PCR 효소로부터 competent cell까지 다양한 ligation/cloning kit 제품을 두루 갖추고 있다. 본고에서는 이들 제품에 대해 자주 하는 질문을 Q&A 형식으로 정리하였다.

Q1) 플라스미드 벡터의 클로닝에는 어떤 ligation kit를 이용하면 좋은가?

일반적인 플라스미드 벡터의 ligation은 DNA Ligation Kit (Mighty Mix) (TaKaRa Code 6023)를 추천한다. 본 키트는 돌출말단(stick end)은 물론, 높은 효율을 얻기 어려운 평활말단(blunt end) 클로닝이나 T-Vector 클로닝에도 기존제품(Ver. 1, Ver. 2.1)에 비해 동등 이상의 높은 효율을 얻을 수 있다. 또한, 효소와 버퍼를 포함한 1X 타입의 premix 시약으로 신속하고 간편하게 ligation 반응을 할 수 있다.

Q2) 클로닝 가능한 인서트는 사이즈(-kb)는?

플라스미드에 도입할 수 있는 인서트 DNA의 사이즈는 몇 kb까지라는 제한은 없지만 사이즈가 긴 만큼 ligation 효율이 저하되는 경향이 있다. TaKaRa DNA Ligation Kit LONG (TaKaRa Code 6024)는 긴단편의 DNA ligation에 최적화되어 있기 때문에, 10 kb 이상의 ligation을 실시하는 경우에 효과적이다. 또한, 인서트 DNA를 포함한 플라스미드의 사이즈가 커지면 (특히 10 kb를 넘으면) 대장균에의 도입 효율이 낮아지고 대장균내에서 플라스미드의 안정성도 나빠지는 경우가 있어 플라스미드 결실 클론이 되는 확률이 높아진다.

긴단편의 DNA 형질전환에는 큰 사이즈의 DNA를 효율적으로 형질전환할 수 있는 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (TaKaRa Code 9128), *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (TaKaRa Code 9028) 또는 Supercharge EZ10 Electrocompetent Cells (TaKaRa Code 636756)를 추천한다.

Q3) TaKaRa DNA Ligation Kit LONG은 짧은 DNA의 ligation에도 사용할 수 있을까?

TaKaRa DNA Ligation Kit LONG은 인서트 DNA가 수 kb 이하의 경우에서도 다른 ligation kit와 동등 이상의 효율을 나타낸다. 단, 본 키트는 표준 반응시간이 길고 premix 타입의 제품이 아니기 때문에 짧은 단편의 DNA ligation에는 신속·간편하게 사용할 수 있는 DNA Ligation Kit (Mighty Mix)를 추천한다.

Q4) DNA Ligation Kit (Mighty Mix)를 사용할 때 반응조건 변경으로 향상되는 경우가 있을까?

DNA Ligation Kit (Mighty Mix)의 표준 반응시간은 16℃, 30분이다. 대부분의 ligation 반응에서는 이 조건으로 효율적인 ligation이 가능하다.

그러나 평활말단 ligation 등 ligation이 어려운 경우에는 반응시간을 수시간부터 하룻밤으로 늘리는 것으로 개선되는 경우가 있다. 또한, 비교적 ligation이 간단한 돌출말단 ligation 등에서 반응시간을 단축하고 싶은 경우에는 25℃, 5분의 고속 프로토콜에서도, 16℃, 30분의 표준 프로토콜과 동등한 효율을 얻을 수 있다.

Q5) Ligation이 어렵고, 형질전환 효율이 낮을때 주의할 점은 무엇인가?

- Ligation 반응 시간을 연장한다.
- DNA 용액의 염 농도가 높으면 ligation 효율이 저하된다. 특히 에탄올 침전시의 아세트산 암모늄 염은 저해 작용을 나타내기 때문에, 에탄올 침전시에는 염이 남지 않게 정제 과정을 실시한다.
- 인서트 DNA를 아가로스 겔로부터 잘라 정제할 때 UV 조사에 의해 DNA가 손상을 받는다. DNA에 UV 조사시간을 가능한 한 짧게 한다 (특히 300 nm 이하의 단파장 영역 UV 조사시). 또한, 시판되는 아가로스 겔로부터 DNA를 추출하는 키트 중 컬럼에서의 용출액을 그대로 ligation에 이용하는 키트의 경우에는 최종적으로 얻은 용출액을 에탄올 침전하고 버퍼를 교환하면 ligation 효율이 개선되는 경우가 있다.
- DNA Ligation Kit (Mighty Mix)의 Ligation Mix는 용해 후 반드시 파이펫으로 잘 혼합하고 나서 사용한다. 혼합이 불충분한 경우, 조성이 불균일하여 안정된 결과를 얻을 수 없는 경우가 발생할 수 있다

Q6) 벡터를 탈인산화하는 경우, 인서트 DNA와 어떻게 연결되어 환상화되는가?

Alkaline phosphatase로 탈인산화한 플라스미드 벡터는 인서트 DNA의 5' 말단 인산기로 한쪽 편의 사슬만 연결되어, 대장균에 도입 후 대장균의

DNA 수복기작에 의해 연결되어 플라스미드 상태로 유지된다.

Q7) 클로닝에 이용하는 competent cell은 무엇이 좋은가?

보편적인 플라스미드 벡터에의 클로닝에는 형질전환 효율이 높은 K12주 유래의 대장균을 사용한다. 플라스미드를 안정하게 유지하는 *recA* 등의 재조합능 결손, 플라스미드의 순도에 영향을 주는 *endA* 등의 endonuclease 결손을 갖는 대장균이 적합하다. blue/white 스크리닝을 실시하는 경우는 *lacZ ΔM15*를 갖는 JM109나 DH5α 등이 자주 이용된다. HST08 Premium, HST02와 Supercharge EZ10는 상기의 유전자형에 추가로 메틸화 DNA를 절단하는 유전자군 *mrr-mcrBC-hsd RMS*, *mcrA*가 완전하게 결여되어 있기 때문에 메틸화된 DNA의 클로닝에도 최적이다. 또한, HST08 Premium와 Supercharge EZ10는 F⁻이며 BAC library의 제작에도 이용할 수 있다.

아울러 발현용의 숙주세포(BL 21 등)는 일반적으로 형질전환 효율이 낮고 *recA*, *endA*의 결손주가 아니기 때문에 클로닝용의 숙주세포로는 적합하지 않다.

Q8) Clontech의 In-Fusion PCR Cloning Kit는 어떤 경우에 사용하는가?

Clontech의 In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit는 독자적인 In-Fusion 효소를 이용하는 directional cloning에 편리한 키트이다. DNA 말단에 상동인 15 염기가 있으면 어떠한 서열에서도 융합해 결합할 수 있으므로, 적절한 제한효소 사이트가 존재하지 않거나, 추가 서열을 일절 부가하지 않고 서브클로닝 없이 발현용 벡터에 직접 클로닝하고 싶거나 복수의 DNA 단편을 클로닝해야하는 경우와 같이 통상의 ligation 반응에서는 곤란한 실험에 사용이 가능하다. Ligation 반응에 비해 형질전환 효율은 낮아지지만, 보다 정확하게 클로닝 가능하므로 클로닝을 실시하는 대상이 적절한 제한효소 사이트를 갖고 있지 않거나 상기와 같은 문제가 있는 경우에는 In-Fusion kit를 적극 권장한다.