

# TA Cloning

Taq DNA Polymerase와 같은 PCR 효소로 증폭된 PCR 산물은 3' 말단에 deoxyadenosine(dA)이 1 base 추가된다. TA cloning은 3' 말단에 deoxythymidine(dT) 1 base를 추가한 T-vector와 PCR 증폭산물의 dA 1 base가 상보적으로 결합하는 것을 이용해, 간편하게 cloning하는 방법이다 (insert DNA 5' 말단의 인산화는 불필요하다).

## [실험방법]

### 1. Insert DNA 준비

① PCR에 의한 증폭 (TaKaRa Ex Taq 사용의 경우)

10 × Ex Taq Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 μl
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	4 μl (각 200 μM)
primer 1	0.2~1 μM (final conc.)
primer 2	0.2~1 μM (final conc.)
주형 DNA	<500 ng
TaKaRa Ex Taq	1.25 U
dH <sub>2</sub> O	up to 50 μl (가볍게 tapping)

98°C 10 sec.  
55°C 30 sec.  
72°C 1 min/kb

30 cycles

※ PrimeSTAR 와 같은 α형 PCR 효소는 3' 말단에 dA가 부가되지 않기 때문에 주의가 필요하다.

② Agarose gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인한다.

- 증폭산물이 single band인 경우는 다음 단계 「2. T vector와 ligation」에 따라 진행한다.
- Primer dimer나 비특이적인 band가 확인되었을 경우에는 전기영동 후 agarose gel로부터 목적 DNA 단편의 band를 잘라 DNA를 정제한다.

③ 잘라낸 gel에서 DNA를 정제한다 (TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extration Kit).

④ 회수한 DNA를 insert DNA 용액으로 한다.

### 2. T-Vector와 Ligation

#### Mighty TA-cloning Kit 사용할 경우

① 새로운 tube에 아래 구성물을 준비한다.

dH <sub>2</sub> O	3 μl
pMD20-T Vector	1 μl (50 ng)
정제한 PCR 산물 (Insert DNA 용액)	1 μl

② Ligation Mighty Mix를 5 μl 첨가하여 부드럽게 혼합한다.

③ 16°C에서 30 분간 incubation 한다.

### 3. 형질전환 (Transformation)

#### E. coli HST08 Premium Competent Cells 사용할 경우

① HST08 competent cell 100 μl를 사용 직전에 얼음 위에서 용해해 안정화 시킨 후, 14 ml tube로 옮긴다(vortex 불가).

② Ligation 반응 용액 10 μl를 첨가해 얼음에서 30 분간 방치한다.

③ 42°C에서 45초간 heat shock 후, 얼음에서 1~2 분간 방치한다.

④ 미리 37°C로 맞춰놓은 SOC media를 최종 1 ml이 되도록 첨가한다.

⑤ 37°C shaking incubator에서 1시간 배양한다 (160 ~ 225 rpm).

⑥ LB plate(LB+Amp+X-Gal)에 적당량을 spreading 한후, 37°C에서 하루 동안 배양한다.

⑦ Blue/White colony 선별을 통해 white colony를 선택한다.

※ E. coli JM109를 사용하는 경우는 Ampicillin, X-Gal, IPTG를 첨가한 LB plate에 spreading한다. 37°C에서 하루동안 배양해 Blue/White colony 선별을 통해 white colony를 선택한다.

### 4. Insert Check PCR

#### EmeraldAmp PCR Master Mix 사용할 경우

① PCR 반응액을 준비한다.

EmeraldAmp PCR Master Mix(2 × Premix)	25 μl
Forward Primer	0.2 μM ( final conc.)
Reverse Primer	0.2 μM ( final conc.)
dH <sub>2</sub> O	up to 50 μl

② Plate 상의 colony를 tip의 앞쪽으로 극소량 긁어내어 ①의 PCR 반응액에 현탁하여 증폭한다

98°C 10 sec.  
55°C 30 sec.  
72°C 1 min/kb

30 cycles

③ PCR 반응액 일부를 agarose gel 전기영동으로 insert를 확인한다.

### 5. 배양, Plasmid 정제

① 목적 plasmid를 포함하는 colony를 2 ml LB(+Amp)배양액에 접종하여 하루 동안 배양한다

② Plasmid DNA를 정제한다(TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit).



**PCR 효소 종류와 PCR 산물 말단과의 관계**

PCR DNA Polymerase는 크게 2가지 종류로 나눌 수 있다. *Taq* DNA Polymerase로 대표되는 Pol I형(family A) 효소와 *Pfu* DNA Polymerase로 대표되는 α형(family B) 효소이다.

Pol I형 DNA polymerase와 Pol I형 기반의 개량된 PCR 효소(*TaKaRa Ex Taq* 등)의 증폭산물 대부분은 3' 말단에 deoxyadenosine (dA) 1 base가 부가된다. 이것을 이용해 PCR 산물을 그대로 TA cloning에 사용할 수 있다.

반면, α형 DNA polymerase를 이용한 PCR 증폭산물 대부분은 효소의 강력한 3' →5' exonuclease 활성에 의해 평활말단이 되므로, 그대로는 TA cloning에 사용할 수 없다. 평활말단의 PCR 산물을 TA cloning에 이용할 경우에는 3' 말단에 dA를 별도로 붙여줘야 한다.

다카라에서는 TA cloning용 시약 **Mighty TA Cloning Kit** (Code 6028)와 α형 DNA Polymerase로 증폭한 산물을 위

한 TA cloning 시약 **Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR**(Code 6019)를 판매하고 있다. 본 키트(Code 6019)에는 평활말단으로 되어 있는 PCR 증폭산물의 3' 말단에 dA를 부가하기 위한 A-overhang mixture가 첨부되어 있어 간단한 과정으로 TA cloning이 가능하다.

PCR 효소 종류	Pol I형 (family A)	α형 (family B)
증폭산물의 3' 말단	dA 부가 (TA Cloning 가능)	평활말단
효소명	<i>TaKaRa Ex Taq</i> <i>TaKaRa LA Taq</i> <i>TaKaRa Taq</i> MightyAmp 시리즈 EmeraldAmp SapphireAmp SpeedSTAR	PrimeSTAR 시리즈



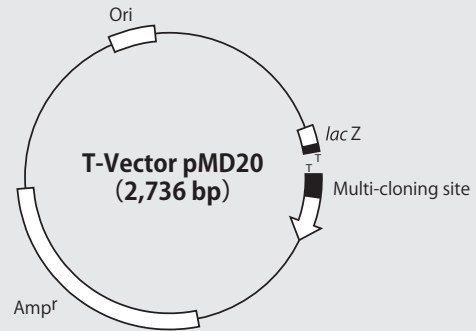
**T-Vector에 대하여**

TA Cloning Kit 외에 2 종류의 T-vector인 T-Vector pMD20과 T-Vector pMD19(Simple)을 별도 판매하고 있다. 모두 형질 전환 후 Blue/White 선별이 가능하다.

T-Vector pMD19(Simple)은 pUC19에 유래의 multicloning site의 모든 제한효소 사이트를 제거하였기 때문에, cloning 후 insert 내의 제한효소 사이트를 이용하는 경우 편리하다.

**5 kb 이상의 PCR 산물의 Cloning**

긴 단편의 PCR 산물(5 kb 이상)의 경우는 TA cloning 효율이 저하되기 때문에, 평활말단 cloning을 추천한다. **Mighty Cloning Reagent Set(Blunt End)**(Code 6027)를 사용하면 말단평활화와 인산화를 간편하게 할 수 있다.



**[관련제품리스트]**

구분	Code	제품명	용량
TA Cloning Kit 및 T vector	6028	Mighty TA-Cloning Kit	20 회
	6019	Mighty TA-Cloning Reagent set for PrimeSTAR	20 회
	3270	T-Vector pMD20	1 µg
	3271	T-Vector pMD19 (Simple)	1 µg
형질전환용 Competent cells	9128	<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 µl × 10)
	9052	<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	1 Set (100 µl × 10)
	9057	<i>E. coli</i> DH5α Competent Cells	1 Set (100 µl × 10)
Insert Check PCR	RR300A	EmeraldAmp PCR Master Mix	160 회
	RR310A	EmeraldAmp GT PCR Master Mix	160 회
전기영동	5003	Agarose L03 「TAKARA」	100 g
	3422A	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	500 µl (100 회)
	3403	λ-Hind III digest	100 µg
DNA 정제	9760A	TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit	50 회
	9761A	TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit	50 회
	9762A	TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit	50 회