

Cloning 실험에 대한 모든 것

Cloning 실험 : Ligation부터 Directional Cloning까지

Cloning의 개요

타겟 유전자(Target gene)를 임의의 vector에 넣는 cloning 실험은 유전자 공학실험의 기초 기술 중 하나이며 현재도 다양한 연구분야에서 이용되고 있다. 제한효소 발견과 그 응용에 의해 cloning은 범용성이 높은 기술로 이용되어 오고 있지만, 근래에는 제한효소 처리없이 진행되는 cloning 방법(TA cloning, In-Fusion cloning)의 개발에 의해 한층 더 편리하게 활용할 수 있게 되었다. 또 cloning 실험에서는 샘플로부터 게놈 DNA 혹은 RNA의 추출 및 정제, 역전사 반응에 의한 cDNA 합성, PCR에 의한 DNA 단편 증폭 등을 통해 insert DNA를 얻는 것도 중요한 과정이다. 본 내용에서는 제한효소를 이용한 전통적인 cloning 방법(p17), 범용적인 TA cloning 방법(p19), 최신 방법인 In-Fusion cloning(p21)은 물론, cloning 전후에 필요한 실험과정(Agarose gel 전기영동(p26), DNA 정제, cDNA 합성 (p25), PCR, colony PCR 등)도 아울러 소개하고 있다.

Cloning 방법	Insert DNA의 말단구조	Vector 준비
제한효소 / Ligation	DNA 단편의 양끝에 제한효소 사이트가 필요하며, 서로 다른 제한효소를 이용하면 방향성이 있는 삽입이 가능하다.	DNA 단편 양끝을 적절한 제한 효소로 처리한다. 처리 후, 정제나 탈인산화가 필요한 경우가 있다
TA Cloning	3' 말단에 dA tailing이 가능한 PCR 효소로 반응을 실시한다. 평활말단 증폭 산물에는 dA를 첨가하는 반응이 필요하다. 삽입 방향은 결정할 수 없다.	3' 말단에 dT가 부가되어 있는 vector 이용한다.
In-Fusion Cloning	Vector의 말단 15 base와 상보적인 서열을 부가한 PCR primer로 타겟 유전자를 증폭한다. 어떤 vector로도 방향성 있는 삽입이 가능하다.	어떤 vector든지 사용 가능하며 vector를 제한효소 처리나 PCR을 이용해 linear 형태로 준비한다.

표 1. 각 Cloning 방법의 특징

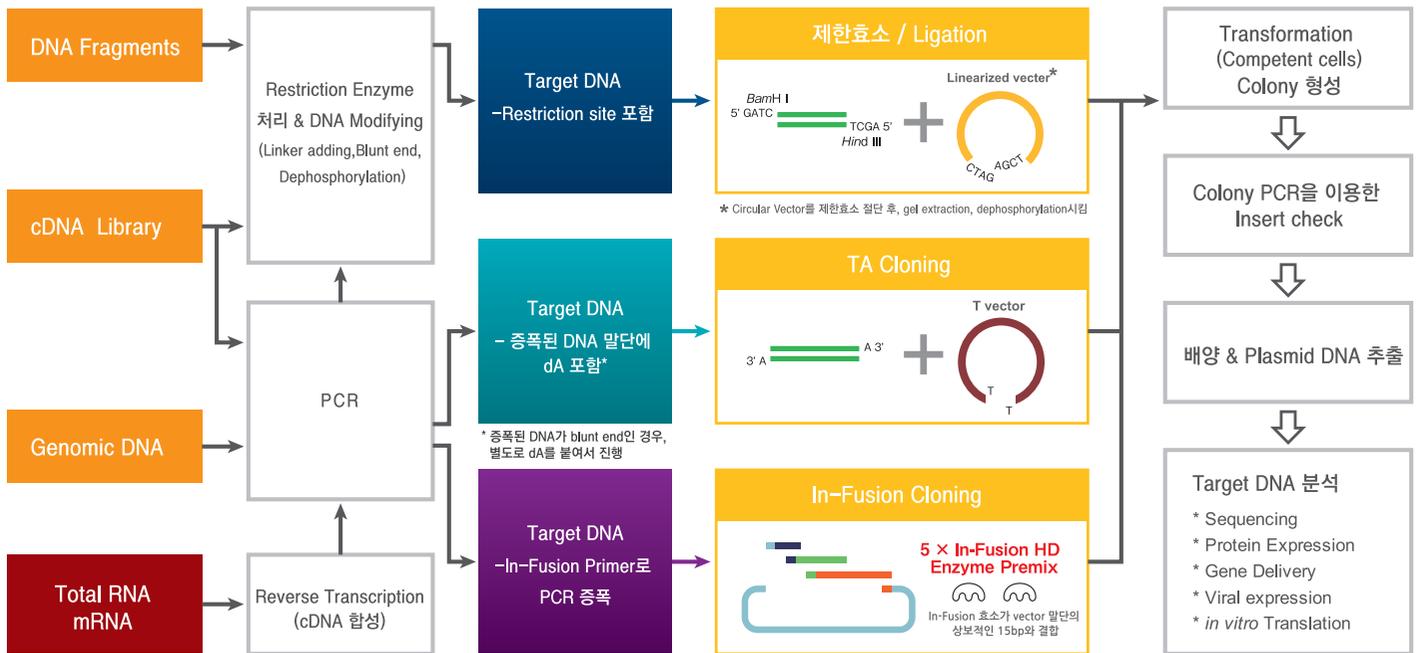


그림 1. Cloning 실험의 기본적인 흐름