

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 부가한 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 ²⁺ 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 ₂ O	up to 50 μl (가볍게 탭핑)

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

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

- ② Agarose gel에 전기영동하여 증폭산물을 확인한다.
- 증폭산물이 single band인 경우는 다음단계 「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 (필요시 gel extraction kit 사용).
- ④ 회수한 DNA를 insert DNA 용액으로 한다.

2. T-Vector와 Ligation

Mighty TA-cloning Kit 사용할 경우

① 새로운 tube에 아래 구성물을 준비한다.

dH ₂ O	3 μl
pMD20-T Vector	1 μl (50 ng)
정제한 PCR산물 (Insert DNA 용액)	1 μl

- ② Ligation Mighty Mix를 5 μl 첨가하여 부드럽게 혼합한다.
- ③ 16°C에서 30분간 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 얼음속에서 30분간 방치한다.
- ③ 42°C에서 45초간 heat shock 후, 얼음에서 1~2분간 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 ₂ O	up to 50 μl

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

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

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(필요에 따라 purification kit를 선택하여 사용한다).



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 같이, α형 DNA Polymerase로 증폭한 산물을 위한 TA

cloning 시약 **Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR**(Code 6019)를 판매하고 있다. 본 키트에는 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	TaKaRa Ex Taq TaKaRa LA Taq TaKaRa Taq MightyAmp 시리즈 EmeraldAmp SapphireAmp SpeedSTAR	PrimeSTAR 시리즈



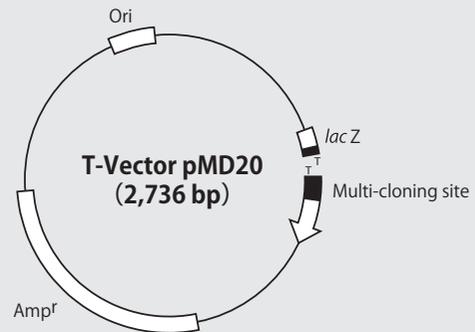
T-Vector에 대하여

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

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

5kb 이상의 PCR 산물의 Cloning

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



[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
	5003	Agarose L03「TAKARA」	100 g
전기영동	3422A	100 bp DNA Ladder (Dye Plus)	500 µl (100 회)
	3403	λ-Hind III digest	100 µg