

# 제한효소 / Ligation을 이용한 Cloning

목적 DNA 단편을 원하는 plasmid vector에 삽입하는 cloning 방법은 유전자 공학실험의 가장 기본이 되는 기술이다.

여기에서는 제한효소와 T4 DNA ligase(DNA Ligation Kit)를 이용한 cloning 실험을 소개하고자 한다.

## [실험방법]

### 1. Insert DNA 준비 (목적 DNA 단편 조제)

#### (a) 제한효소를 이용한 DNA의 cutting

목적 DNA 단편의 제한효소 사이트를 확인한 후, 사용할 plasmid vector의 cloning 사이트에 맞춰 사용할 제한효소를 선정한다.

#### 제한효소 *Hind* III와 *Bam*H I을 이용한 double digestion의 예

##### ① 반응액을 조제한다.

DNA	( $\leq 1 \mu\text{g}$ )
<i>Hind</i> III	1 $\mu\text{l}$
<i>Bam</i> H I	1 $\mu\text{l}$
10 x K buffer	2 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	up to 20 $\mu\text{l}$ (가볍게 탭핑)

##### ② 37°C 에서 1시간 반응한다.

##### ③ Agarose gel 전기영동으로 확인한다.

※ 반응액의 절반 정도(10  $\mu\text{l}$  정도)에 loading buffer를 첨가하여 전기영동한다.

##### ④ 목적 DNA 단편이 포함된 gel을 잘라낸다.

※ DNA의 손상을 줄이기 위해, UV 노출을 최대한 줄인다.

##### ⑤ 잘라낸 gel에서 DNA를 정제한다(필요시 gel extraction kit 사용).

##### ⑥ 정제한 insert DNA 용액을 [A]로 한다

#### (b) PCR을 이용한 증폭

Vector와의 ligation에 사용하는 제한효소 사이트를 insert primer의 5' 측에 추가\*하였다. 이 primer를 이용해서 insert DNA를 PCR 증폭한다.

\*제한효소 사이트 + 5'에 3 base 이상 nucleotide첨가

#### TaKaRa Ex Taq Hot Start Version를 사용한 예

##### ① PCR 반응액을 조제한 후 반응한다.

10 x Ex Taq Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu\text{l}$
dNTP Mixture(각 2.5 mM)	4 $\mu\text{l}$ (각 200 $\mu\text{M}$ )
primer 1	0.2~1.0 $\mu\text{M}$ (final conc.)
primer 2	0.2~1.0 $\mu\text{M}$ (final conc.)
DNA	<500 ng
TaKaRa Ex Taq HS	1.25 U
dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu\text{l}$ (가볍게 탭핑)

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

30 cycles

##### ② 제한효소를 이용하여 DNA 단편의 양쪽 말단을 절단한다.

(필요에 따라 반응용량 증가)

①의 PCR 반응액	$\leq 2 \mu\text{l}$
<i>Hind</i> III	1 $\mu\text{l}$
<i>Bam</i> H I	1 $\mu\text{l}$
10 x K Buffer	2 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	up to 20 $\mu\text{l}$ (가볍게 탭핑)

##### ③ 37°C 에서 1시간 반응한다.

##### ④ 잘라낸 gel에서 DNA를 정제한다 (필요시 gel extraction kit 사용).

##### ⑤ 정제한 insert DNA 용액을 [A]로 한다

### 2. Vector plasmid의 준비

##### ① 목적 plasmid vector (circular)의 cloning 사이트를 제한효소로 절단하여 벡터를 linear화 한다.

Plasmid DNA	( $\leq 1 \mu\text{g}$ )
<i>Hind</i> III	1 $\mu\text{l}$
<i>Bam</i> H I	1 $\mu\text{l}$
10 x K Buffer	2 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	up to 20 $\mu\text{l}$ (가볍게 탭핑)

##### ② 37°C 에서 1시간 반응한다.

##### ④ 반응액으로부터 DNA를 정제한다.

##### ⑤ TE Buffer (20 $\mu\text{l}$ 이하)에 용해하여 plasmid DNA 용액 [B]로 한다.



한 종류의 제한효소로 insert DNA 조제와 plasmid vector를 linear화하는 경우에는 linear화 한 vector의 self-ligation을 방지하기 위해 아래와 같은 탈인산화 처리한다.

#### 탈인산화 처리(self ligation 방지)

제한효소로 절단한 plasmid vector	1~20 pmol
Alkaline Phosphatase(BAP)	0.3~0.6 U
10 x BAP Buffer	5 $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu\text{l}$ (가볍게 탭핑)

↓  
37~65°C 에서 30분간 반응

↓  
Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 추출 (2회)

↓  
Chloroform / Isoamyl alcohol (24 : 1) 추출 (1회)

↓  
에탄올 침전

↓  
TE Buffer (20  $\mu\text{l}$  이하)에 용해하여 plasmid DNA 용액 [B]로 한다.

※ 5'-돌출말단의 탈인산화는 CIAP(Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)에 의한 처리로도 충분하지만, 평활말단이나 3'-돌출말단의 탈인산화에는 BAP(Bacterial Alkaline Phosphatase)의 사용을 권장한다.

### 3. Insert DNA와 linear plasmid의 ligation

#### DNA Ligation Kit(Mighty Mix)를 사용할 경우

① 반응액을 조제한다.

Insert DNA 용액 [A]	25~250 fmol
Plasmid DNA 용액 [B]	50 ng(25 fmol)
Ligation Mix	7.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	up to 15 $\mu$ l

② 16°C, 30분 반응 (또는 25°C, 5분 반응)한다.

### 4. 형질전환 (Transformation)

#### *E. coli* HST08 Premium Competent Cells를 사용하는 경우

- HST08 competent cell 100  $\mu$ l를 사용 직전에 얼음 위에서 용해해 안정화 시킨 후, 14 ml tube로 옮긴다(vortex 불가).
- Ligation 반응 용액 10  $\mu$ l를 첨가해 얼음에서 30분간 방치한다.
- 42°C에서 45초간 heat shock 후, 얼음에서 1~2분간 방치한다.
- 미리 37°C로 맞춰놓은 SOC media를 최종 1 ml이 되도록 첨가한다.
- 37°C shaking incubator에서 1시간 배양 (160 ~ 225 rpm)한다.
- LB plate(항생제 포함)에 적당량을 spreading 하고, 37°C에서 하루 동안 배양한다.

### 5. Insert Check PCR

19쪽의 「4. Insert Check PCR」 참조

### 6. 배양, Plasmid 정제

19쪽의 「5. 배양, Plasmid 정제」 참조

26쪽의 「Agarose gel 전기영동」 참조

27~28쪽의 「FlashGel System for DNA Recovery」 참조

#### [관련제품리스트]

구분	Code	제품명	용량
제한효소, 탈인산화	1060A	<i>Hind</i> III	10,000 U
	1010A	<i>Bam</i> H I	10,000 U
	2120A	Alkaline Phosphatase ( <i>E. coli</i> C75)	50 U
	2250A	Alkaline Phosphatase(Calf intestine)	1,000 U
PCR	RR006A	TaKaRa Ex Taq Hot Start Version	250 U
	6023	DNA Ligation Kit (Mighty Mix)	1 Kit
	6024	TaKaRa DNA Ligation Kit LONG	1 Kit
	9128	<i>E. coli</i> HST08 Premium Competent Cells	1 Set (100 $\mu$ l $\times$ 10)
Ligation, 형질전환	9052	<i>E. coli</i> JM109 Competent Cells	1 Set (100 $\mu$ l $\times$ 10)
	5003	Agarose L03 「TAKARA」	100 g
	3407A	100 bp DNA Ladder	500 $\mu$ l( 100 회)
	3403	$\lambda$ - <i>Hind</i> III digest	100 $\mu$ g



#### 자주하는 질문

**Q** Ligation 이나 형질전환 효율이 떨어졌을 때 변경할 수 있는 과정은?

- A**
- Ligation 반응 시간을 늘린다.
  - DNA 용액내에 염salt 농도가 높으면 ligation 효율이 저하된다. 특히 에탄올 침전시 사용되는 ammonium acetate는 ligation시 저해 작용을 하기 때문에, 에탄올 침전시에 염이 남지 않게 깨끗이 처리한다.
  - DNA 추출 kit를 사용했을 경우, 추출액을 에탄올로 침전하고 버퍼를 교환하면 ligation 효율을 올릴 수도 있다.
  - 돌출말단cohesive end의 ligation의 경우 DNA 용액(vector+insert DNA)을 60~65°C에서 2~3분 정도 incubation 후, 바로 차갑게 유지한 상태에서 Ligation Kit의 각 시약을 첨가해 반응을 하면, ligation에 효율적인 돌출말단cohesive end이 확보되어 형질전환 효율이 높아질 가능성이 있다.

위의 조작으로 ligation 효율이 개선되지 않을 경우에는 DNA 정제를 다시 하는 것을 권장한다.

**Q** 긴 단편의 cloning시 유의할 점은?

- A** 긴 단편은 ligation 효율이 저하되는 경향이 있다. TaKaRa DNA Ligation Kit LONG(Code 6024)은 긴 단편 ligation에 최적화되어 있어, 10 kb 이상의 ligation을 하는 경우에 적합하다. 또한 insert DNA를 포함한 plasmid의 전체 길이가 큰 경우 (특히, 10 kb를 넘는 경우)에는 대장균으로의 도입 효율이 낮아지고, 대장균내에서의 plasmid의 안정성도 떨어지므로, 정확한 clone을 확보하기 어려워진다. 이러한 경우에는 큰 사이즈의 DNA를 효율적으로 형질전환할 수 있는 *E.coli* HST08 Premium Competent Cells(Code 9128)의 사용을 권장한다.