

Code 6019

---

# Takara

## Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® 국문 매뉴얼

---

본 매뉴얼은 6019\_j.pdf 일문매뉴얼을 토대로 한 한글 번역본입니다. 원문과 내용이 다를 경우 원문의 내용을 우선으로 합니다.

**Takara Korea Biomedical Inc.**

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: [support@takara.co.kr](mailto:support@takara.co.kr)

[www.takara.co.kr](http://www.takara.co.kr)



Taq DNA polymerase 기반의 PCR 효소로 증폭된 산물은 대부분 3'-말단에 데옥시리보 아데노신 (dA) 1 염기가 부가되어 있습니다. 이러한 PCR 산물을 cloning 하는 방법으로는 PCR 증폭 산물의 dA 염기와 상보적으로 결합하도록 3'-말단에 데옥시리보 티민 (dT)을 1염기 부가한 T-vector를 사용하는 TA-cloning 법이 있습니다. Mighty TA-cloning Kit (Code 6028)는 이러한 TA-cloning법으로 PCR 산물을 단시간에 간편하게 cloning하기 위한 제품이며, 본 제품은 Ligation 반응에 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code 6023)를 사용하기 때문에 간편한 조작으로 단시간에 높은 효율로 ligation 반응을 진행할 수 있습니다.

한편, PrimeSTAR® 시리즈 등의 α 형 DNA polymerase (Pyrobest, Vent® 등)에 의해 증폭된 PCR 산물의 대부분은 효소의 강력한 3'→5' exonuclease 활성에 의해 평활말단으로 되어 있어 TA-cloning에 그대로 이용할 수 없습니다. 따라서 PrimeSTAR® 시리즈에 의한 증폭 산물을 TA-cloning 하는 경우에는 3'-말단에 dA를 부가할 필요가 있습니다.

본 Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® (Code 6019)에는 PrimeSTAR® 시리즈에 의해 증폭된 PCR 산물의 3'-말단에 간편하게 dA를 부가하기 위한 시약 (A-overhang mixture)이 포함되어 있습니다. 이러한 A-overhang mixture 구성품과 Mighty TA-cloning Kit (별도 구매 시, Code 6028)를 조합하는 것으로 PrimeSTAR® 시리즈에 의해 증폭된 평활말단 PCR 산물의 TA-cloning을 편리하게 진행할 수 있습니다.

## I. 제품구성 (20 회)

Mighty TA-cloning Kit	
• pMD20-T vector (50 ng/μℓ)	20 μℓ
• Ligation Mighty Mix*1	50 μℓ x 2
• Positive Control Insert*2	10 μℓ
A-overhang mixture	
• A-overhang enzyme	10 μℓ
• 10×Buffer	20 μℓ
• dATP	10 μℓ

\*1: Ligation Mighty Mix는 DNA Ligation Kit (Code 6023)와 동일

\*2: 3'-말단에 dA overhang을 가지는 약 200 bp의 DNA fragment (10 ng/μℓ)  
(주형 *E. coli* genomic DNA를 TaKaRa Ex Taq®으로 증폭한 것)

## II. Kit 이외에 필요한 시약, 기기

- PCR 증폭 산물 회수·정제용 시약 (VI. 실험방법 (1) 참조)
- Competent cell 또는 Electroporation 용 cell
- SOC 배지
- Ampicillin/X-Gal 및 IPTG를 첨가한 LB plate

## III. 보관 -20°C

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: [support@takara.co.kr](mailto:support@takara.co.kr)

[www.takara.co.kr](http://www.takara.co.kr)



#### IV. pMD20-T vector

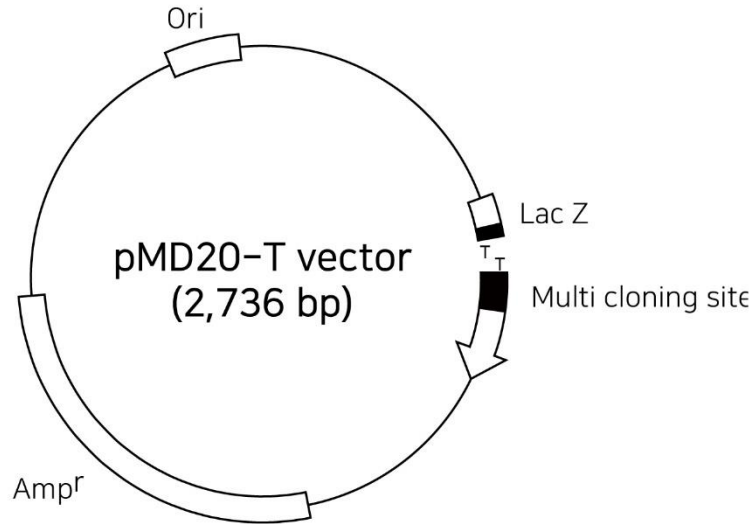


그림 1. pMD20-T vector map

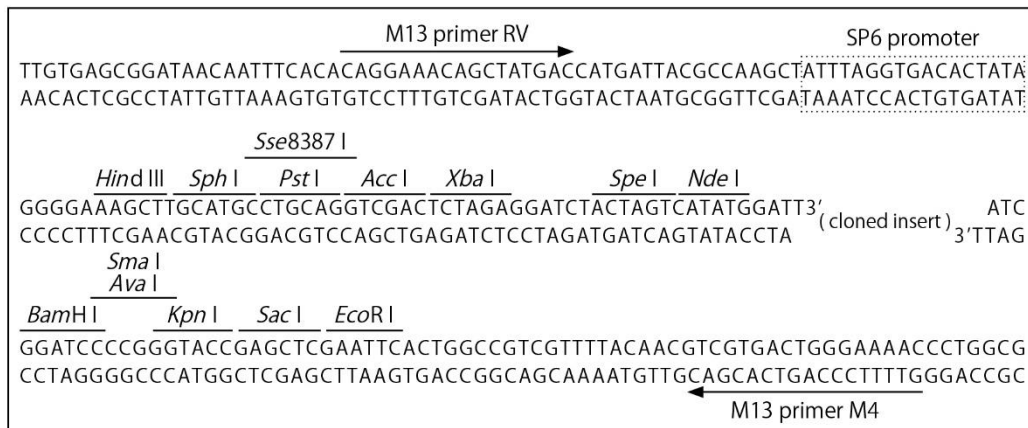


그림 2. pMD20-T cloning site

## V. 사용상의 주의

1. Ligation Mighty Mix는 얼음에서 용해하여 천천히 섞은 다음 사용하십시오.
2. Cloning이 진행되어도, insert의 길이나 방향에 따라 stop codon이 생성되거나 frame shift가 일어나지 않는 등의 이유로 color selection plate에서 열린 파란색의 colony가 생성되는 경우가 있습니다. 이 경우, colony PCR을 진행하여 insert의 삽입 여부를 확인하는 것을 추천합니다.
3. Agarose gel에서 목적인 증폭 단편을 회수할 경우, UV에 주의하시기 바랍니다.  
장시간 UV에 노출되면 DNA가 손상을 입어 cloning의 효율이 저하됩니다.
4. PCR에서 주형으로 사용한 plasmid DNA가 cloning vector와 동일한 selection marker (pMD20-T vector의 경우는 Amp<sup>r</sup>)를 갖는 경우, PCR 반응액 내의 주형 plasmid가 형질 전환되어 colony를 형성할 수 있습니다. 따라서 PCR 반응액을 전기영동 후, agarose gel에서 목적 밴드를 회수·정제하여 본 실험에 사용합니다.

## VI. 실험방법

### (1) 목적 유전자의 증폭, 정제

PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (Code R050A), PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (Code R045A) 또는 PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (Code R010A)등을 이용하여 목적 유전자 단편을 증폭한다. 이후 반응액의 일부를 전기영동하여 증폭산물을 확인한다.

- 증폭 산물이 단일 밴드인 경우 phenol/chloroform 추출 후, 에탄올 침전으로 증폭 산물을 정제한다. 또는, TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit (Code 9761A) 혹은 QuickClean<sup>™</sup> Enzyme Removal Resin (Code 631770)으로 증폭 산물을 정제한 후, (2) dA 부가 반응을 진행한다.
- Primer dimer나 비특이적인 밴드가 증폭되는 경우, 전기 영동 후 agarose gel로부터 목적 밴드를 회수한다. 이 때 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit (Code 9762A) 등을 사용하면 좋다. 이후에 (2) dA 부가 반응을 실시한다.

### (2) dA 부가 반응

1. 마이크로 튜브 내에서 이하의 반응액을 조제하여 잘 섞어준다.

회수한 DNA 용액	8 $\mu$ l
10 x buffer	1 $\mu$ l
dATP	0.5 $\mu$ l
A-overhang enzyme	0.5 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

2. 65°C에서 10 분간 반응한다.

3. 반응액을 (3) ligation 반응에 사용한다.

주의: dA 부가 반응은 가능한 한 ligation 반응 직전에 수행한다.

### (3) Ligation 반응

1. 새로운 마이크로 튜브에 dA 부가 반응을 마친 PCR 산물을 1  $\mu\text{l}^*$  넣는다.
2. pMD20-T vector 1  $\mu\text{l}$ , D.W 3  $\mu\text{l}^*$ 을 더해 섞는다.  
\* 1: 반응량 조절가능. PCR 산물과 D.W로 총 4  $\mu\text{l}$ 가 되도록 조정합니다.
3. Ligation Mighty Mix 5  $\mu\text{l}$ 를 더해 가볍게 섞는다.
4. 16°C에서 30 분간 반응한다.
5. 100  $\mu\text{l}$ 의 competent cell<sup>2</sup>에 4번 반응액 전량을 넣어 형질 전환을 실시한다.  
Electroporation법으로 형질 전환하는 경우, phenol 추출 및 ethanol 침전으로 buffer를 교환한 후 형질전환을 실시한다.  
\* 2: *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code 9128), *E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells (Code 9057) 의 사용을 추천합니다. (*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code 9128) 의 경우는 IPTG가 불필요함)
6. Ampicillin, X-Gal, IPTG를 포함한 LB plate에 도말한다<sup>3</sup>.  
\* 3: SOC 배지에 적절히 희석하여, 여러 개의 plate에 도말한다.
7. 37°C에서 하룻밤 배양한 후, blue/white screening을 실시한다.

### (4) Insert 유무의 확인

- 목적 DNA 단편이 포함된 재조합체를 확인하기 위한 간편한 방법으로는 colony PCR로 *E. coli* plasmid의 insert 사이즈를 확인하는 방법이 있다.
- pMD20-T vector는 M13 primer RV (Code 3830A)를 사용할 수 있으므로, 이 primer와 EmeraldAmp<sup>®</sup> PCR Master Mix (Code RR300A) 또는 SapphireAmp<sup>®</sup> Fast PCR Master Mix (Code RR350A)를 함께 사용하여 insert 유무를 빠르게 확인할 수 있다.
- 【실시예】** PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (Code R010A)로 증폭한 2 kb의 PCR 산물 (single band)을 본 제품의 프로토콜에 따라 dA 부가 후, pMD20-T vector에 ligation하여 *E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells (Code 9057)에 형질 전환했을 경우, 1  $\times$  10<sup>3</sup> 정도의 positive clone을 얻을 수 있었다.

## VII . Control 반응

1. 새로운 마이크로 튜브에 Positive Control Insert 1  $\mu\text{l}$  넣는다.
2. pMD20-T vector 1  $\mu\text{l}$ , D.W 3  $\mu\text{l}$ 를 더해 섞는다.
3. Ligation Mighty Mix 5  $\mu\text{l}$ 를 더해 가볍게 섞는다.
4. 16°C, 30 분간 반응한다.
5. 100  $\mu\text{l}$ 의 competent cell<sup>1</sup>에 4번 반응액 전량을 넣어 형질 전환을 실시한다.  
Electroporation법으로 형질 전환하는 경우, phenol 추출 및 ethanol 침전으로 buffer를 교환한 후 형질전환을 실시한다.  
\* 1: *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code 9128), *E. coli* JM109 Competent Cells (Code 9052) 등의 사용을 추천합니다. (*E. coli* HST08 Premium Competent Cells의 경우는 IPTG가 불필요함)
6. Ampicillin, X-Gal, IPTG 를 포함한 LB plate에 도말한다.
7. 37°C에서 하룻밤 배양한 후, blue/white screening을 실시한다.

\* 2:  $1 \times 10^8$  colony/ $\mu$ g pUC119 DNA의 형질 전환 효율을 가지는 *E. coli* JM109 competent cell (Code 9052)을 사용했을 경우, vector 50 ng에 약  $1 \sim 5 \times 10^4$ 개의 white colony를 얻을 수 있다.

## IX. 관련제품

Mighty TA-cloning Kit (Code 6028)  
Reagent Set for Mighty Cloning Kit (Blunt End) (Code 6027)  
T-Vector pMD20 (Code 3270)  
*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code 9128)  
*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (Code 9028)  
*E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells (Code 9057)  
TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit (Code 9761A)  
TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit (Code 9762A)

### < PCR 효소 >

PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (Code R010A)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (Code R050A)  
PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (R045A)

### < Insert 확인용 >

EmeraldAmp<sup>®</sup> PCR Master Mix (Code RR300A)  
SapphireAmp<sup>®</sup> Fast PCR Master Mix (Code RR350A)

## XI. 주의

- 본 제품은 연구용입니다. 사람, 동물의 의료/임상 진단용으로는 사용불가 합니다. 또 식품, 화장품, 가정용품 등으로 사용하지 마십시오.
- Takara Bio의 승인 없이 제품의 재판매·양도, 재판매·양도를 위한 수정, 상용 제품 제조에 사용하는 것은 금지되어 있습니다.
- 라이선스에 관한 최신 정보는 다카라코리아 고객센터 (Tel. 02-2081-2510, [support@takara.co.kr](mailto:support@takara.co.kr)) 로 문의바랍니다.
- PrimeSTAR, TaKaRa Ex Taq, EmeraldAmp, SapphireAmp는 Takara Bio Inc.의 등록 상표입니다. 기타 본 매뉴얼에 기재되어 있는 회사 이름 및 상품명 등은, 각 사의 상호 또는 등록 후 또는 미등록의 상표이며 이들은 각 소유자에게 귀속합니다.

Takara Korea Biomedical Inc.

Tel. 02-2081-2510

Fax. 02-2081-2500

E-mail: [support@takara.co.kr](mailto:support@takara.co.kr)

[www.takara.co.kr](http://www.takara.co.kr)

