

Dyne HT Cloning Kit

사용 설명서

Catalog No.	Product Name	용 량
DYK1270	Dyne HT Cloning Kit	10rxn
DYK1272		20rxn
DYK1274		40rxn
DYK1280	Dyne HT Cloning core Kit	10rxn
DYK1282		20rxn
DYK1284		40rxn
DYK1290	Dyne HT Cloning Kit (Dry Type)	8rxn
DYK1292		16rxn
DYK1294		96rxn
DYK1300	Dyne HT Cloning core Kit (Dry Type)	8rxn
DYK1302		16rxn
DYK1304		96rxn

Dyne HT Cloning Kit Manual

목 차

I. 개요	3
II. 장점 및 특징	3
III. Dyne HT Cloning Kit 구성 및 보관	4
IV. 간편 프로토콜	5
V. 상세 프로토콜	7
VI. 문제 해결 가이드.....	오류! 책갈피가 정의되어 있지 않습니다.0

Dyne HT Cloning Kit Manual

I. 개요

Dyne HT Cloning Kit는 연구자들이 PCR 로 증폭한 DNA 조각 (insert DNA fragment)을 어떠한 클로닝 벡터 (cloning vector) 에도 빠르고 간편하게 클로닝을 할 수 있도록 제작되었습니다. 한 개 또는 여러 개의 DNA를 사용하여도 일정한 방향으로 클로닝 벡터에 삽입할 수 있습니다. Dyne HT Cloning Kit는 PCR 산물과 선형 벡터 DNA (linearized vector DNA)를 각각의 끝부분에 존재하는 18-nt의 동일 염기서열 (homologous DNA sequence)을 인지하여 단 하나의 염기서열의 손실 없이 연결합니다. 또한 매우 긴 DNA를 효과적으로 클로닝 할 수 있습니다.

II. 장점 및 특이점

- 짧은 insert DNA 부터 긴 insert DNA 까지 클로닝 가능
- 클로닝 벡터의 모든 위치에 클로닝 가능
- 여러 개의 insert DNA 를 한 반응튜브에서 단일 반응으로 동시에 클로닝 가능
- Ligation 을 필요로 하지 않아 낮은 백그라운드 및 높은 성공률
- 염기서열 변화가 없는 최종 클로닝 산물

Dyne HT Cloning Kit Manual

III. Dyne HT Cloning Kit 구성 및 보관

(1) Dyne HT Cloning Kit 구성

Dyne HT Cloning KIT	DYK1270	DYK1272	DYK1274
	10 rxns	20 rxns	40 rxns
5X Dyne HT Cloning PreMIX	20 μ l	40 μ l	80 μ l
pUC19 Control Vector, linearized (50 ng/ μ l) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 μ l	20 μ l	40 μ l
2 kb Control Insert (40 ng/ μ l) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 μ l	20 μ l	40 μ l
Sterile water	0.5 ml	1 ml	2 ml
^{a)} DH5 α Chemically competent E. coli	100 μ l x 11 ea	100 μ l x 21 ea	100 μ l x 42 ea

Dyne HT Cloning KIT(Dry Type)	DYK1290	DYK1292	DYK1294
	8 rxns	16 rxns	96 rxns
5X Dyne HT Cloning PreMIX	8 tubes	16 tubes	96 tubes
pUC19 Control Vector, linearized (50 ng/ μ l) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 μ l	20 μ l	20 μ l
2 kb Control Insert (40 ng/ μ l) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 μ l	20 μ l	20 μ l
Sterile water	0.5 ml	1 ml	1 ml
^{a)} DH5 α Chemically competent E. coli	100 μ l x 11 ea	100 μ l x 21 ea	100 μ l x 105 ea

※ 위 구성품 중 DH5 α Chemically competent E. coli 가 제외된 Dyne HT Cloning core Kit (DYK1280, DYK1282, DYK1284)와 Dyne HT Cloning core Kit(Dry Type, DYK1300, DYK1302, DYK1304)도 있습니다.

(2) Dyne HT Cloning Kit 보관 방법

DH5 α Chemically competent E. coli 는 -80 $^{\circ}$ C 에 보관하고, 나머지 구성품은 -20 $^{\circ}$ C 보관하십시오.

Dyne HT Cloning Kit Manual

IV. 간편 프로토콜

1. 클로닝 벡터에 클로닝 하고자 하는 부위를 선택하고, 제한효소 또는 inverse PCR 을 이용하여 선형 DNA 를 만듭니다. 일반적으로 클로닝 벡터를 제한효소로 잘라서 만드는 방법과 동일합니다. (그림 1. 1 단계: Vector 준비 참조)
2. 선형 벡터 양쪽 말단의 제한효소서열을 포함하는 18-nt 를 (제한효소 서열 6-nt + 제한효소 서열을 제외한 벡터 말단 서열 12-nt) 포함하는 두 primer (forward/reverse) 를 디자인합니다. 따라서 각 primer 는 제한효소서열을 포함하는 벡터 말단 18-nt 서열과 유전자 증폭용 20-nt 로 구성됩니다.
3. 목적 유전자 DNA 를 증폭합니다. 전기영동을 통해 PCR 산물이 원하는 크기의 정확한 PCR 산물인지 확인합니다. (그림 1. 3 단계: Insert 준비 참조)
4. PCR 산물을 정제합니다. 증폭이 잘된 PCR 산물은 이 단계를 생략할 수 있습니다.
5. 준비가 된 벡터와 정제된 PCR 산물을 이용하여 다음과 같은 반응물을 조합합니다.

조성	반응양
5X Dyne HT Cloning PreMIX (Dyne HT Cloning DryMIX)	2 μ l (1 tube)
^{a)} 선형 벡터	x μ l
^{a)} 정제된 PCR 산물	y μ l
멸균수 (as needed)	up to 10 μ l

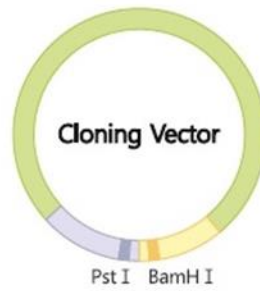
^{a)}벡터와 insert DNA 의 부피가 합계 6 μ l 이상일 경우, DNA 를 포함하는 버퍼의 조성에 따라 (EDTA, Glycerol 등) cloning 반응이 저해 될 수 있습니다. 이 경우 DNA 를 고농도로 다시 준비하거나, 멸균수에 녹여진 DNA 를 사용하십시오.

6. 위 반응액을 잘 섞어 50°C 에서 15 분 반응하고 얼음 위에 놓습니다.
* 15 분을 초과해 반응을 지속할 경우 클로닝 효율이 감소됩니다. 60 분 반응 시 15 분 반응한 경우와 비교해 효율이 최대 1/10 까지 감소할 수 있습니다. 반응 시간을 정확히 지켜주십시오.
7. 형질전환을 수행합니다. Dyne HT Cloning 반응물은 -20°C 에 수 일간 보관할 수 있습니다.

Dyne HT Cloning Kit Manual

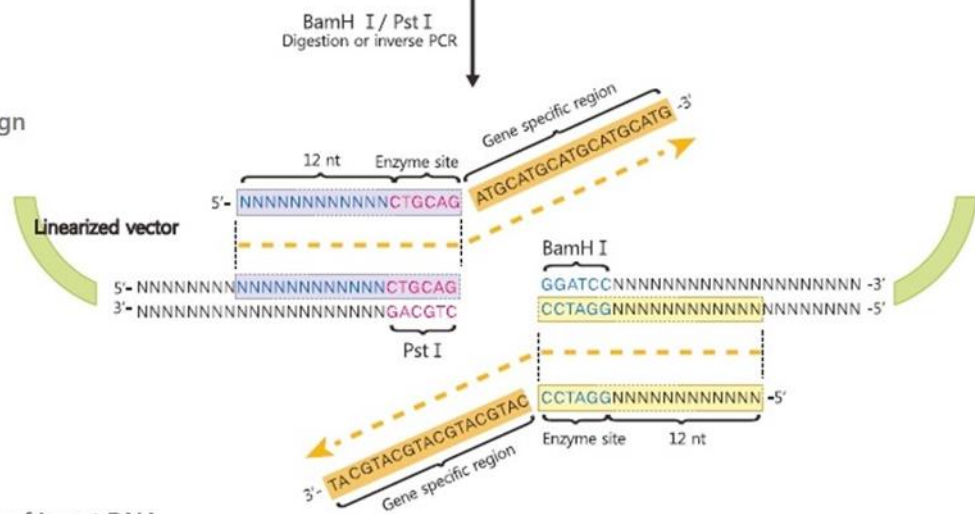
Step 1

Preparation of Linearized Vector



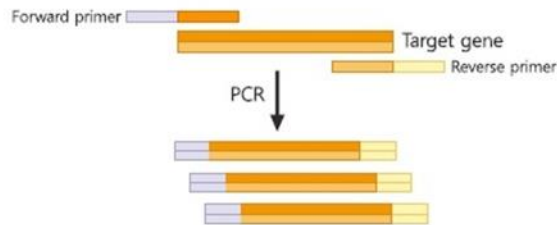
Step 2

Primer design



Step 3

Preparation of Insert DNA



Step 4

Dyne HT Cloning Reaction



그림 1. Dyne HT Cloning Protocol 개요도

Dyne HT Cloning Kit Manual

V. 상세 프로토콜

(1) 클로닝을 위한 선형 벡터 준비

보통의 제한효소를 이용한 클로닝과 마찬가지로 클로닝 벡터의 원하는 부위를 하나 또는 두 개의 제한효소를 사용하여 절단합니다. 이 절단된 부위 사이에 PCR 로 증폭된 DNA 를 클로닝합니다. 또한 선형 벡터는 inverse PCR 반응으로도 제작할 수 있습니다.

제한효소의 절단이 완벽할수록 백그라운드 콜로니가 적습니다. 이는 절단되지 않은 극미량의 supercoiled 또는 circular plasmid 의 형질전환 효율이 높기 때문입니다. 따라서 다음과 같은 조건을 사용하여 주의를 기울여 클로닝 벡터를 절단합니다.

- ① 부득이하게 클로닝 부위가 하나 밖에 없는 경우를 제외하고는 가급적 두 개의 다른 효소로 벡터를 절단하는 것이 좋습니다. 두 개를 사용하여 절단할 경우 supercoiled 또는 circular plasmid 의 비율이 현저히 감소합니다.
- ② 제한효소 공급업체에서 제시한 조건을 준수하여 제한효소 반응을 수행하여야 합니다. 제한효소의 순도가 높아 과량으로 장시간 절단하여도 문제가 없다고 확인된 경우, 3~12 시간 절단하면 백그라운드를 최소화할 수 있습니다. 당사에서 공급하는 제한효소는 이러한 품질을 보증합니다.
- ③ 절단 후, 정제 kit 을 이용하여 선형 벡터를 정제하십시오. 제한효소를 열변성으로 완벽히 불활성화 시킬 경우 이러한 정제 과정이 필요 없을 수 있습니다.

(2) PCR primer 설계

Primer 디자인은 Dyne HT Cloning 반응에 가장 중요한 요소입니다. 먼저 일반 PCR primer 처럼 두 primer (forward 및 reverse 용) 를 디자인합니다. 이 두 primer 의 5' 말단 쪽에 위에서 준비한 선형 클로닝 벡터 말단과 동일한 18 개의 염기서열을 갖도록 추가합니다. 동일한 염기서열을 갖는 말단끼리의 연결에 의해 클로닝이 이루어집니다.

※ Dyne HT Cloning Kit 를 위한 primer 의 두 가지 중요 특징

- ① Primer 의 5' 말단 쪽은 벡터의 말단과 동일한 18-nt (제한효소서열 6-nt + 제한효소서열을 제외한 벡터말단서열 12-nt)를 포함합니다.
 - '제한효소서열'의 길이는 해당 제한효소의 인식부위 길이에 따라 조절하십시오.
 - '제한효소서열을 제외한 벡터말단 서열' 은 9-nt 까지 줄여도 클로닝 효율에 큰 영향이 없습니다
- ② Primer 의 3' 말단 쪽은 증폭하고자 하는 목적 유전자에 특이적인 염기서열을 포함합니다.
(그림 1. 2 단계: Primer design 참조)

Dyne HT Cloning Kit Manual

(3) Insert 의 PCR 증폭 및 순수 분리

길이는 20-nt 내외로 하고 40~60% GC 비율을 갖도록 합니다. 이럴 경우 대부분 T_m 은 58~65°C 사이가 됩니다. 두 primer 사이의 T_m 이 크게 차이 (4°C 이상)가 나지 않도록 하는 것은 일반 PCR primer 디자인과 같습니다. 각 primer 3' 말단의 마지막 5 개 염기가 G 또는 C 를 2 개 이상 포함하지 않도록 하면 비특이적인 DNA 증폭을 최소화할 수 있습니다.

Dyne HT Cloning 방법은 어떠한 PCR 효소로 증폭한 insert 도 클로닝이 가능합니다. 당사에서는 증폭된 DNA 의 에러를 최소화 하기 위해 *n*Pfu-Forte (Cat.# DYP1180) 를 사용할 것을 추천합니다.

특이적인 DNA 증폭 및 DNA 의 농도를 측정하기 위해 전기영동으로 PCR 산물을 분석하십시오. 동일한 아가로스 겔 상에서 정량용 standard DNA 와 비교 측정함으로써 DNA 를 정량 할 수 있습니다. 원하는 크기의 단일 밴드를 나타내는 특이적 DNA 가 증폭되었다면 spin-column 으로 정제하십시오 (주의: PCR 에 사용된 template plasmid 와 목적 벡터의 항생제 selection marker 가 동일하다면 Dpn I 으로 처리한 후 정제하십시오. Dpn I 은 template plasmid 를 분해하여 백그라운드 콜로니 생성을 현저히 줄입니다). 그러나 겔 상에서 비 특이적인 백그라운드나 여러 개의 밴드가 관찰된다면 gel extraction 으로 목적 산물만을 분리하여 정제하십시오.

Dyne HT Cloning Kit Manual

(4) Dyne HT Cloning 반응 및 형질전환

Dyne HT Cloning Kit 의 정확한 성능의 확인을 위해 반드시 음성 (negative) 및 양성 (positive) 대조군 반응을 동시에 수행하여야 합니다. 음성 대조군은 클로닝 벡터만을 사용한 반응이며, 양성 대조군은 Dyne HT Cloning Kit 에 함께 제공된 DNA 를 사용하여 반응물을 만듭니다.

① 아래의 표를 참고하여 반응액을 조합합니다.

Dyne HT cloning 반응			
반응 성분	클로닝 반응액	양성 대조군	음성 대조군
^{a)} 클로닝 벡터 (제한효소절단)	50~200 ng	1 µl (Control Vector)	1 µl
^{b)} Insert DNA (PCR 증폭 DNA)	10~200 ng	2 µl (Control Insert)	
5X Dyne HT Cloning PreMIX	2 µl	2 µl	2 µl
^{c)} 멸균수	up to 10 µl	up to 10 µl	up to 10 µl

^{a)} 클로닝 벡터 사용량

: 10 kb 이하는 50~100 ng, 10 kb 이상은 50~200 ng 사용을 추천합니다.

^{b)} Insert DNA 사용량

: Vector 와 Insert 비율은 1 : 2 비율로 사용해주시기 바랍니다.

: insert 사용량 = (insert size) / (vector size) x (vector 사용량) x 2

^{c)} 벡터와 insert DNA 의 부피가 합계 6 µl 이상일 경우, DNA 를 포함하는 버퍼의 구성에 따라 (EDTA, Glycerol 등) cloning 반응을 저해할 수도 있습니다. 이 경우 DNA 를 고농도로 다시 준비하거나, 멸균수에 녹여진 DNA 를 사용하십시오.

② 50°C 에서 15 분 반응하고 얼음 위에 놓습니다.

③ 2.5 µl 의 Dyne HT Cloning 반응물을 Competent cell 에 넣고 형질전환 시킵니다. 벡터의 항생제 selection marker 에 맞는 배지를 준비하여 키웁니다. 클로닝 반응과 더불어 양성 대조군과 음성 대조군을 함께 형질전환 할 것을 권장합니다. 형질전환 효율이 1×10^8 cfu/µg 이상인 competent cell 을 사용합니다. 당사에서는 형질전환 효율을 최대화 하기 위해 DH5α Chemically competent *E. coli* (Cat.# DY01350) 을 해당 제품의 protocol 에 따라 사용할 것을 추천합니다.

(5) 예상 결과

효율이 1×10^8 cfu/µg 인 competent cell 을 사용하면 양성 대조군에서는 보통 수백 개 이상의 흰색 콜로니가 자라납니다. 음성 대조군에서는 콜로니가 수 개 이하로 나와야 합니다.

Dyne HT Cloning Kit Manual

- 양쪽 모두 콜로니 수가 적을 (보통 십여 개) 경우: 반응물을 너무 많이 넣고 형질전환을 하였거나, DNA/primer 의 품질이 좋지 않은 경우입니다. 또한 primer design 에 문제가 있을 수도 있습니다.
- 음성 대조군에서 콜로니가 많은 (보통 수백 개) 경우: 벡터가 제대로 잘리지 않은 경우입니다.

Dyne HT Cloning Kit Manual

VI. 문제 해결 가이드

만약 예상했던 결과를 얻지 못했다면, 다음의 문제 해결 방법들을 적용해 보십시오.

A. 형질 전환 후 콜로니가 나타나지 않거나 거의 없을 때

증상	해결 방법
형질전환 효율이 낮다	Competent cell 100 μ l에 Dyne HT Cloning 반응액을 10 μ l 이상 넣지 마십시오.
	Dyne HT Cloning 반응을 15분 이상 진행하지 마십시오. 오래 반응 시 클로닝 효율이 감소됩니다.
	몇 가지 세포주에서는 Dyne HT Cloning 반응액을 TE 버퍼에 최대 100 μ l까지 희석하여 사용하는 것이 좋을 수 있습니다.
	형질전환 효율을 확인하십시오. 효율이 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g 이상인 competent cell을 사용하십시오.
DNA 조각에 질적인 문제가 있다	Dyne HT Cloning 반응은 가능한 높은 농도의 DNA를 준비하는 것이 중요합니다. 크기에 따라 100~400 ng의 벡터를 사용하는 것이 좋습니다.
	만약 gel extraction 과정을 통해 insert를 준비하셨다면 가능한 높은 농도의 DNA 농도로 준비하여 Dyne HT Cloning 반응에 사용하십시오. 정제된 벡터와 insert의 합은 6 μ l 이내로 사용하는 것이 좋습니다.
	벡터에 삽입되는 위치 주변부의 염기서열이 primer 서열과 동일한지 확인하십시오.

B. 많은 수의 콜로니를 얻었으나 insert 가 없을 때

증상	해결 방법
많은 수의 콜로니를 얻었으나 insert가 없다	Dyne Cloning 반응을 진행하기 전에 잘려지지 않은 벡터를 제거하는 것이 중요합니다. 필요하다면 벡터를 다시 절단하고 gel extraction을 수행하십시오.
	Plasmid를 주형으로 사용해 insert를 PCR 하였다면 원형 DNA가 정제 과정을 통해 클로닝 반응에 포함되었을 수 있습니다.
	a) Plasmid 오염을 완전히 제거하기 위해 PCR을 수행하기 전에 주형 DNA를 잘라 선형화 하는 것을 추천합니다.
	b) Insert를 spin column을 통해 정제한다면 PCR 산물을 정제 전에 Dpn I 으로 처리하여 주형 DNA를 제거합니다.
	항생제가 포함된 배지가 새 것인지 (제조한지 한달 이내) 확인하십시오. 실험에 사용된 DNA의 항생제 내성을 다시 한번 확인하십시오.

C. 클론들이 잘못된 insert를 포함하고 있을 때

증상	해결 방법
많은 수의 콜로니를 얻었으나, 잘못된 insert를 포함하고 있다	만약 PCR 산물이 확연히 구별되는 단일 밴드로 나타나지 않았을 경우에는 올바른 insert의 클로닝을 위해 gel extraction를 수행하는 것이 필요합니다.