

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit

사용 설명서

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit (Cat.EZ015T)

EZ-Fusion™ HT Cloning core Kit (Cat.EZ016T)

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit (*Dry Type*) (Cat.EZ019T)

EZ-Fusion™ HT Cloning core Kit (*Dry Type*) (Cat.EZ020T)

목 차

I. 개 요	3
II. 장점 및 특징	3
III. EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 구성 및 보관	4
(1) EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 구성	4
(2) EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 보관 방법	4
IV. 간편 프로토콜	5
V. 상세 프로토콜	7
(1) 클로닝을 위한 선형 벡터 준비	7
(2) PCR primer 설계	7
(3) Insert의 PCR 증폭 및 순수 분리	8
(4) EZ-Fusion™ HT Cloning 반응 및 형질전환	8
(5) 예상 결과	9
VI. 문제 해결 가이드	10

I. 개요

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 는 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 DNA 를 사용하여도 일정한 방향으로 클로닝 벡터에 삽입할 수 있습니다.

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 는 PCR 산물과 선형 벡터 DNA (linearized vector DNA) 를 각각의 끝부분에 존재하는 18-nt 의 동일 염기서열 (homologous DNA sequence) 을 인지하여 단 하나의 염기서열의 손실 없이 연결합니다. 또한 매우 긴 DNA 를 효과적으로 클로닝 할 수 있습니다.

II. 장점 및 특징

- 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

III. EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 구성 및 보관

(1) EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 구성

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit	Cat.EZ015TS	Cat.EZ015TM	Cat.EZ015TL
	10 rxns	20 rxns	40 rxns
5X EZ-Fusion™ HT Cloning PreMIX	20 µl	40 µl	80 µl
pUC19 Control Vector, linearized (50 ng/µl) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 µl	20 µl	40 µl
2 kb Control Insert (40 ng/µl) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 µl	20 µl	40 µl
Sterile water	0.5 ml	1 ml	2 ml
^{a)} DH5α Chemically competent <i>E. coli</i>	100 µl x 11 ea	100 µl x 21 ea	100 µl x 42 ea

EZ-Fusion™ HT Cloning Kit (<i>Dry Type</i>)	Cat.EZ019TS	Cat.EZ019TM	Cat.EZ019TL
	8 rxns	16 rxns	96 rxns
EZ-Fusion™ HT Cloning DryMIX	8 tubes	16 tubes	96 tube
pUC19 Control Vector, linearized (50 ng/µl) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 µl	20 µl	20 µl
2 kb Control Insert (40 ng/µl) (양성 대조군 반응용, positive control)	10 µl	20 µl	20 µl
Sterile water	0.5 ml	1 ml	1 ml
^{a)} DH5α Chemically competent <i>E. coli</i>	100 µl x 11 ea	100 µl x 21 ea	100 µl x 105 ea

※ 위 구성품 중 DH5α Chemically competent *E. coli* 가 제외된 EZ-Fusion™ HT Cloning core Kit (Cat.EZ016TS, EZ016TM, EZ016TL) 와 EZ-Fusion™ HT Cloning core Kit (Cat.EZ020TS, EZ020TM, EZ020TL) 도 있습니다.

(2) EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 보관 방법

DH5α Chemically competent *E. coli* 는 -80℃ 에 보관하고, 나머지 구성품은 -20℃ 보관하십시오.

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 디자인 합니다. 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 EZ-Fusion™ HT Cloning PreMIX (EZ-Fusion™ 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℃ 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. EZ-Fusion™ HT Cloning 반응물은 -20℃ 에 수일간 보관할 수 있습니다.

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 최소화 할 수 있습니다. 당사에서 공급하는 제한효소는 이러한 품질을 보증합니다.
- ③ 절단 후, 정제 kit 을 이용하여 선형 벡터를 정제하십시오. 제한효소를 열변성으로 완벽히 불활성화시킬 경우 이러한 정제 과정이 필요 없을 수 있습니다.

(2) PCR primer 설계

Primer 디자인은 EZ-Fusion™ 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.

※ EZ-Fusion™ 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)
- ③ 당사 홈페이지(www.enzynomics.com)에서 Primer 설계 프로그램을 이용하실 수 있습니다. (Technical > Tool > EZ-Fusion™ HT Cloning Kit primer design program)

(3) Insert의 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 5개 염기가 G 또는 C를 2개 이상 포함하지 않도록 하면 비특이적인 DNA 증폭을 최소화 할 수 있습니다.

EZ-Fusion™ HT Cloning 방법은 어떠한 PCR 효소로 증폭한 insert 도 클로닝이 가능합니다. 당사에서는 증폭된 DNA 의 에러를 최소화 하기 위해 *n*Pfu-Forte (Cat.# P410) 를 사용할 것을 추천합니다.

특이적인 DNA 증폭 및 DNA 의 농도를 측정하기 위해 전기영동으로 PCR 산물을 분석하십시오. 동일한 아가로스 젤 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 젤 상에서 비특이적인 백그라운드나 여러 개의 밴드가 관찰된다면 gel extraction 으로 목적 산물만을 분리하여 정제하십시오.

(4) EZ-Fusion™ HT Cloning 반응 및 형질전환

EZ-Fusion™ 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 EZ-Fusion™ HT Cloning Kit 에 함께 제공된 DNA 를 사용하여 반응물을 만듭니다.

① 아래의 표를 참고하여 반응액을 조합합니다.

EZ-Fusion™ 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 EZ-Fusion™ 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 조성에 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 μ l 의 EZ-Fusion™ 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/ μ g 이상인 competent cell 을 사용합니다. 당사에서는 형질전환 효율을 최대화 하기 위해 DH5 α Chemically competent *E. coli* (Cat.# CP010) 을 해당 제품의 protocol 에 따라 사용할 것을 추천합니다.

(5) 예상 결과

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

- 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.

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 l 에 EZ-Fusion™ HT Cloning 반응액을 10 μ l 이상 넣지 마십시오.
	EZ-Fusion™ HT Cloning 반응을 15분 이상 진행하지 마십시오. 오래 반응 시 클로닝 효율이 감소됩니다.
	몇 가지 세포주에서는 EZ-Fusion™ HT Cloning 반응액을 TE 버퍼에 최대 100 μ l 까지 희석하여 사용하는 것이 좋을 수 있습니다.
	형질전환 효율을 확인하십시오. 효율이 $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μ g 이상인 competent cell 을 사용하십시오.
DNA 조각에 질적인 문제가 있다	EZ-Fusion™ HT Cloning 반응은 가능한 높은 농도의 DNA 를 준비하는 것이 중요합니다. 크기에 따라 100~400 ng 의 벡터를 사용하는 것이 좋습니다.
	만약 gel extraction 과정을 통해 insert 를 준비하셨다면 가능한 높은 농도의 DNA 농도로 준비하여 EZ-Fusion™ HT Cloning 반응에 사용하십시오. 정제된 벡터와 insert 의 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	EZ-Fusion™ Cloning 반응을 진행하기 전에 잘려지지 않은 벡터를 제거하는 것이 중요합니다. 필요하다면 벡터를 다시 절단하고 gel extraction 을 수행하십시오.
	Plasmid 를 주형으로 사용해 insert 를 PCR 하였다면 원형 DNA 가 정제 과정을 통해 클로닝 반응에 포함되었을 수 있습니다.
	a) Plasmid 오염을 완전히 제거하기 위해 PCR 을 수행하기 전에 주형 DNA 를 잘라 선형화 하는 것을 추천합니다.
	b) Insert 를 spin column 을 통해 정제한다면 PCR 산물을 정제 전에 Dpn I 으로 처리하여 주형 DNA 를 제거합니다.
	항생제가 포함된 배지가 새 것인지 (제조한지 한달 이내) 확인하십시오. 실험에 사용된 DNA 의 항생제 내성을 다시 한번 확인하십시오.

C. 클론들이 잘못된 insert를 포함하고 있을 때

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