

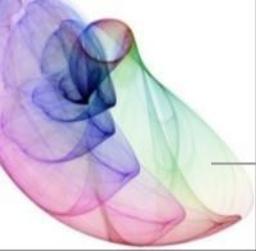
Gene Cloning 이란?

-Cloning이란 복제한다는 의미로써 Gene cloning은 DNA의 특정 유전자를 대량으로 복제한다는 의미.

Gene Cloning 방법

2. Cold fusion cloning

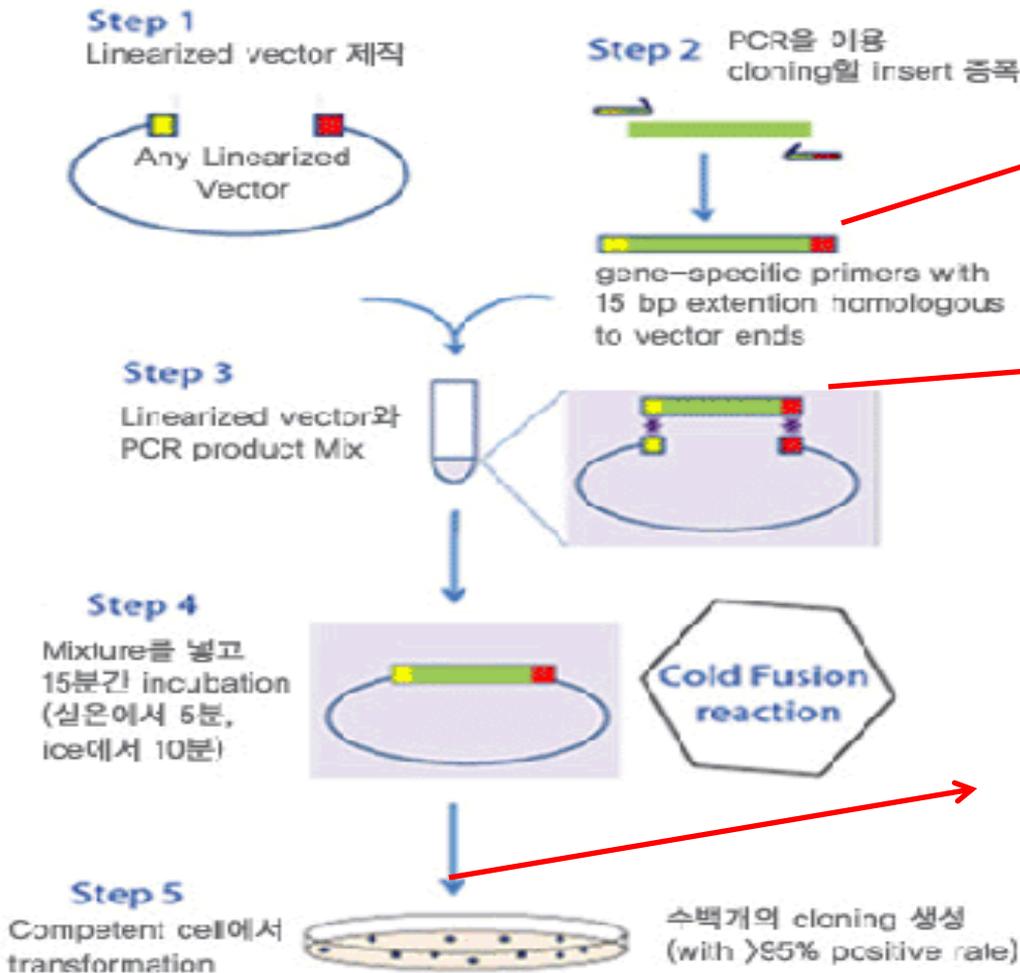
- > Cold fusion cloning은 상용화 되어있는 kit을 사용합니다. 물론 TA cloning 또한 상용화 되어있는 kit을 사용하거나 실험실 내에서 vector를 제작하여 사용할 수 있습니다. Cold fusion cloning은 기존의 T-vector system에서는 한계가 있었던 big size PCR product의 cloning에 주로 사용합니다.
- > 사용 방법은 우선 vector는 linear form으로 제작을 합니다. Enzyme 처리, PCR에 상관없이 linear form이면 됩니다. 그리고 PCR product의 primer를 제작할 때 vector 말단의 시퀀스 약 15bp이상을 붙여서 제작을 하고 PCR을 진행 합니다. 이렇게 해서 얻어진 product를 gel purification을 한 후 vector, insert, cold fusion master mixture를 넣고, 실온 5분, Ice 10분 incubation을 하고 competent cell 에 transformation을 합니다. 이 cloning 방법은 성공률도 높고, Ligation 시간이 짧기 때문에 실험 시간을 줄이는 데 유용합니다. 하지만 vector 제작은 어렵지 않으나 ligation mixture의 성분과 조합을 모르기 때문에 kit을 구매하여야 하는데 비용이 많이 듭니다. 다음 장의 그림으로 kit의 사용 방법을 설명합니다.



Gene cloning 방법

Cold fusion cloning

[Cold Fusion Simple & Rapid Protocol]



Vector sequence 15bp 이상을 양 primer 끝에 넣어서 primer합성을 진행한다.

PCR product는 양 말단에 vector sequence를 가지게 되며 Ligation시 Insert가 vector 시퀀스와 fusion되며 Plasmid를 형성하게 된다.

Fusion된 plasmid를 competent cell에 Transformation 하고 항생제첨가 한천배지plate에 배양 콜로니를 확인한다.
콜로니 확인 후 picking하여 LB broth (항생제첨가)에서 12~16시간 배양 Miniprep 하여 cloning 성공 여부를 확인한다.