Seamless 클로닝 기법을 이용한 *ABO* 엑손 2부터 엑손 7을 포함하는 증폭산물 클로닝

이석기¹ · 박 건²

조선대학교 의과대학 흉부외과학교실¹, 조선대학교 의과대학 진단검사의학교실²

Cloning of *ABO* PCR Products Including Exon 2 to Exon 7 Using Seamless Cloning Technique

Seog-Ki Lee, M.D.¹, Geon Park, M.D.²

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chosun University¹, Gwangju; Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chosun University², Gwangju, Korea

Background: Sequencing and allele separation from exon 2 to exon 7 in the *ABO* gene can be required to determine the genotype. This study used the seamless cloning technique to clone approximately 7.3 kb containing a portion of exon 2 to exon 7 of the *ABO* gene.

Methods: The previously confirmed DNA sample of the *ABO**B.01/O.01 genotype was used for seamless cloning using the Overlap Cloner DNA Cloning Kit (ElpisBio). Cloning was performed three times using the same cloning protocol. The plasmids obtained by cloning were also confirmed by sequencing.

Results: Ninety-two colonies (average of 30 colonies per culture plate) were obtained. Of the fifty colonies, 48 colonies were properly amplified. Plasmid sequencing confirmed that 31 heterozygous alleles were well separated in accordance with predictions through the BGMUT database.

Conclusion: The data suggest that the seamless cloning technique is a reliable technique that can be used to separate long-range alleles, such as the *ABO* gene. (Korean J Blood Transfus 2020;31:239-246)

Key words: *ABO*, Long PCR, Seamless cloning, Sequencing

서론

ABO 유전형을 결정하는 데 대립유전자 분리 (allele separation)가 필요할 때가 있다. 이를 위해

TA-blunt 클로닝[1], 대립유전자특이중합효소연쇄반응-염기서열분석[2], 대립유전자특이시발체를 이용한 염기서열분석[3], Dynabeads M-270 Streptavidin법[4] 등 다양한 기법이 이용되고 있으나,

Received on November 2, 2020. Revised on December 9, 2020. Accepted on December 15, 2020

Correspondence to: Geon Park, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chosun University, 365 Pilmundae-ro, Dong-gu, Gwangju 61453, Korea
Tel: 82-62-220-3272, Fax: 82-62-230-2063, E-mail: creatgeon@chosun.ac.kr, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1414-7877>

The present study was supported by academic research fund from the Chosun University (2017).

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright ©2020 The Korean Society of Blood Transfusion

대부분의 기법이 엑손 6번과 엑손 7번의 대립유전자만을 분리하고 있다[1-5]. 일부 ABO 유전형을 결정하기 위해서 엑손 2번부터 엑손 7번을 염기서열분석을 할 필요가 있다[6]. 그러나 엑손 2번부터 엑손 7번의 코딩 종료 부위까지 길이가 약 6,522 bp (NG_006669.1 참조)로 길어서 상기 기법으로는 대립유전자 분리가 어렵다. 최근 분자생물학에서 널리 이용되고 있는 seamless 클로닝 기법은 기존 TA 클로닝이나 TOPO 클로닝에 비해 더 긴 증폭산물을 높은 효율로 클로닝할 수 있고 여러 개의 삽입절편을 원하는 방향으로 클로닝할 수 있다[7-9].

이에 저자들은 엑손 2부터 엑손 7의 대립유전자를 분리하기 위해 seamless 클로닝 기법을 이용하여 엑손 2부터 엑손 7번 코딩 부분을 포함하는 7,268 bp (NG_006669.1 참조) 증폭산물을 클로닝하였기에 이를 보고하는 바이다.

대상 및 방법(Fig. 1)

1. pUC19 플라스미드 선형화(linearization)을 위한 역(inverse) 중합효소연쇄반응

총 200 µL 증폭산물을 얻기 위하여 네 개의 튜브를 이용하였고 한 개 튜브의 중합효소연쇄반응 반응액은 2X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 25 µL, 정제된 원형(circular) pUC19 플라스미드 1 ng, M13(-40)RrcF (5'-CTGGCCGTCGTTTAC-3')와 M13(-20)FrcR (5'-GTCATAGCTGTTTCCTG-3') 시발체 각 10 µM 및 증류수를 첨가하여 총 50 µL가 되도록 하였다. M13(-40)RrcF와 M13(-20)FrcR은 pUC 계열 플라스미드에 공통적으로 들어 있는 M13(-40)R과 M13(-20)F를 각각 역상보화(reverse complementation)한 것이다. Veriti 96-Well

Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 98℃에서 3분간 처리한 후에 98℃ 10초, 60℃ 10초, 72℃ 20초씩 30회 증폭하고 72℃에서 1분간 유지하였다. 주형으로 이용한 원형 플라스미드를 절단하기 위해 증폭산물을 *DpnI* (NEB, Ipswich, MA, USA)로 37℃에서 30분 처리하고 PCR Purification Kits (NucleoGen, Siheung, Korea)로 정제하였다. 선형화된 플라스미드를 정량하기 위해 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하였다.

2. 삽입절편 제작

긴 중합효소연쇄반응-직접염기서열분석으로 유전형이 확인된 ABO*B.01/O.01 DNA를 주형으로 하여 엑손 2부터 엑손 7을 포함하는 긴 중합효소연쇄반응을 기존 보고된 방법으로 시행하였다[2]. 다만 seamless 클로닝을 위해 기존 각 시발체의 5'쪽에 pUC19 플라스미드의 M13F(-20)와 M13R(-40)을 포함하는 부위 각각에 상동하는 염기를 추가한 ABOe27longM13(-20)F (5'-GTTGTAACGACGGCCAGTACTCACCTATTA TTGGCCTTTGGTT-3')와 ABOe27longM13(-40)R (5'-ACACAGGAAACAGCTATGACTAGGCTTCAG TTACTCACAACAGGAC-3')을 제작하여 삽입절편을 증폭하였다. 위 시발체에서 굵은 이탤릭체로 표시된 염기는 선형화된 pUC19 플라스미드 양 끝단과 일치하는 상동염기서열(homologous sequences)이다(Fig. 1). 간략하게 정리하면, 총 300 µL 증폭산물을 얻기 위하여 여섯 개의 튜브를 이용하였고 한 개 튜브의 중합효소연쇄반응 반응액은 2X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix 25 µL, DNA 150~200 ng, ABOe27longM13(-20)F와 ABOe27longM13(-40)R 시발체 각 10 µM 및 증류수를 첨가하여 총 50 µL가 되도록 하였다. Veriti 96-Well Thermal Cycler를 이용하여 98℃에서 3분

이석기 와: Seamless 클로닝 기법을 이용한 ABO 엑손 2부터 엑손 7을 포함하는 증폭산물 클로닝

Step 1. Preparation of linearized vectors by inverse PCR using M13(-40)RrcF and M13(-20)FrcR primers

Step 2. Design of ABO gene-specific primers for insert amplification

Step 3. Amplification for preparation of insert DNA using ABOe27longM13F and ABOe27longM13R

Step 4. Seamless cloning using overlap cloner

Step 5. Transformation

Step 6. Subcloning

Step 7. Plasmid sequencing

Fig. 1. Diagram of the seamless cloning process for cloning the long ABO insert (7,268bp).

간 처리한 후에 98℃ 10초, 72℃ 2분씩 30회 증폭하고 72℃에서 3분간 유지하였다. PCR Purification Kits (NucleoGen)로 정제 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)로 정량하였다.

3. Seamless 클로닝

클로닝 전 과정을 3회 반복 실험을 하였다. Overlap Cloner DNA Cloning Kit (Elpis Biotech, Daejeon, Korea)을 이용하여 회사 지침에 따라 클로닝을 시행하였다. 간략하게 기술하면 삽입절편과 벡터의 비율이 1:3이 되도록 삽입절편 100 ng (7,268 bp, 1.34×10^{10} copies, 22.27 fmol)과 선형화된 pUC19 벡터 100 ng (2,416 bp, 4.03×10^{10} copies, 66.98 fmol)을 이용하였다. 이와 함께 10X Overlap Cloner reaction buffer 1 µL, Overlap Cloner enzyme 1 µL 및 증류수를 첨가하여 총 반응액 용량이 10 µL이 되도록 하였다. ABI Verti thermal cycler을 이용하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액 10 µL를 DH5α Chemically Competent *E. coli* (Enzynomics, Daejeon, South Korea) 100 µL에 넣고 회사 지침에 따라 열충격(heat shock)법으로 형질전환(transformation)을 시행하였다. 항생제가 첨가되지 않은 S.O.C 액체배지 400 µL를 넣고 37℃에서 1시간 배양하였다. 최종 산물 500 µL 중 100 µL를 암피실린이 함유된 LB 한천배지(100 µg/mL)에 접종하고 미생물배양기에서 16시간 배양하였다.

4. 콜로니 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이 다형성, 계대배양 및 플라스미드-염기서열 분석

50개의 콜로니를 선택하여 콜로니 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 콜로니 일부분을 따서 1X PBS (pH 7.4) 100 µL에 부유하고 부유액 1 µL를 주형으로 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 콜로니 중합효소연쇄반응 증폭산물 중 10개를 *KpnI* (Elpis Biotech)로 처리하여 엑손 6의 261번 염기 위치에서의 결실 여부를 확인하였다[10]. 261번 염기의 결실이 있는 콜로니 2개와 결실이 없는 콜로니 2개를 계대배양한 후 NucleoGen Plasmid Purification Kit (NucleoGen)를 이용하여 회사 지침에 따라 플라스미드를 추출하였다. 추출한 플라스미드를 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek)로 농도를 150 ng/µL로 맞추고 이를 주형으로 기존 보고된 염기서열용 시발체를 이용하여 염기서열분석을 시행하였다[2].

5. 분석

염기서열분석 결과를 BGMUT 데이터베이스 (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/mhc/rbc/Final%20Archive/Excel_and_PowerPoint/abo_alleles-1a.xls)를 이용하여 대립유전자가 예상대로 분리되었는지 확인하였다. 참고로 BGMUT 데이터베이스는 현재

Fig. 2. Results of PCR-restriction fragment length polymorphism for the detection of *ABO* c.261delG in 10 colonies (C1~C10). Lane SM, 100 bp DNA size marker (TaKaRa, Shiga, Japan).

중단되었으나 위 링크에 접속하면 엑셀 파일 형태의 데이터베이스를 다운로드 받을 수 있다.

결 과

한 개의 LB 평판 배지에서 평균 30개의 콜로니가 관찰되었으며, 총 92개의 콜로니가 계수되었다. 이 중 총 50개의 콜로니에 대해 중합효소연쇄반응을 실시하였으며 이 중 48개의 콜로니에서 증폭산물이 확인되었다. 콜로니 중합효소연쇄반응 증폭산물 10개를 *KpnI*로 처리하여 절단되지 않은 6개의 콜로니와 절단된 4개의 콜로니를 찾았다(Fig. 2). 콜로니 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이다형성에 의해 확인한 두 가지 형태의 콜로니를 각 2개씩 선별하여 플라스미드-염기서열분석법을 실시하였다. 총 31개 이형접합 위치에서의 각 대립유전자에서 보인 염기를 Table 1에 정리하였다. 또한 염기서열분석으로 읽을 수 있었던 6,630 bp에서 DNA 합성효소에 의한 합성 오류는 발견되지 않았다.

고 찰

유전자 클로닝은 유전자 재조합을 위한 핵심 기술로서 기초 생물학 연구부터 재조합 단백질, 단백질 백신 그리고 유전자 치료제 생산 등의 임상적 연구까지 널리 이용되고 있다[11,12]. 클로닝을 위한 여러 기법이 존재하며 가장 널리 이용되고 있는 클로닝 기법으로는 TA 클로닝이나 TOPO 클로닝 등이 있다[13]. 두 기법 모두 삽입절편과 벡터를 준비하기 위해 제한효소 처리 과정이 없고 반응시간이 5분 정도로 짧다. 상품화된 TA 클로닝 키트에는 TA 클로닝에 바로 이용할 수 있는 TA 벡터가 포함되어 있어서 벡터 준비 과정이 필요없고 클로닝을 위해 시발체에 별

도의 염기를 추가하지 않아도 된다. TA 클로닝의 단점은 삽입절편을 원하는 방향으로 넣을 수 없으며 3 kb가 넘는 삽입절편의 경우 클로닝 성공 가능성이 낮다. 한 TA 클로닝 키트 제조사에서는 3 kb가 넘는 삽입절편을 클로닝하고자 하는 경우 특수 TA 클로닝 키트 사용을 추천하고 있다[14]. TOPO 클로닝은 TA 클로닝의 장점을 모두 가지고 있고 삽입절편을 원하는 방향으로 넣을 수 있으며 4 kb 이내의 삽입절편을 클로닝할 수 있지만, 4 kb를 넘는 경우에는 특수한 TOPO 클로닝 키트를 이용해야 한다[13].

Seamless 클로닝 기법은 제한효소와 라이게이스(ligase)를 이용하지 않는 결찰비의존 클로닝(ligation-independent cloning) 기법으로 seamless는 클로닝을 위해 벡터와 삽입절편 사이에 원치 않는 염기를 잔존시키지 않는다는 의미이다. Seamless 클로닝에는 여러 종류의 클로닝 기법이 있으며[7,9] 본 실험에 이용한 Overlap Cloner (Elpis Biotech) 역시 그 일종이다. Overlap Cloner를 이용한 클로닝을 위해 선형화된 벡터의 양 끝단과 일치하는 15 bp 이상의 상동염기서열이 삽입절편 양 끝단에 있어야 한다. 본 연구에서 증폭산물의 삽입 효율을 높이기 위하여 상동염기의 개수를 18 bp로 하였다. 본 연구에서 ABO ~7.3 kb 증폭산물이 벡터에 삽입되어 형질전환된 콜로니가 50개의 콜로니 중 48개로서 클로닝 효율은 96% (48/50)로 신뢰할 만한 클로닝 기법이었다.

이와 같이 긴 증폭산물을 얻기 위해 여러 번의 중합효소연쇄반응과 정제과정을 거치지 않아도 되는 장점이 있지만 긴 증폭산물을 삽입할 때는 주의할 점이 있다. 첫째, 클로닝 기법에 따라 삽입될 수 있는 증폭산물의 길이가 다양하므로 긴 증폭산물을 클로닝할 수 있는 기법을 선택해야 한다. 둘째, DNA 합성효소는 합성 오류를 일으킬 수 있으므로 긴 중합효소연쇄반응을 하는 경우

Table 1. Allele separation of 31 heterozygous alleles performed by seamless cloning and plasmid-sequencing

Location of alleles	Alleles	<i>ABO*B.01/O.01</i>	Plasmid type A	Plasmid type B
Intron 2	c.98+362	Y	C	T
	c.98+369	S	C	G
	c.98+396	Y	T	C
	c.98+437	Y	C	T
	c.98+539	M	C	A
	c.98+575	Y	C	T
	c.98+102	M	C	A
	c.98+1678	Y	T	C
Intron 5	c.239+336	R	G	A
	c.239+530	R	G	A
Exon 6	c.261	G/del	G	Del
	c.297	R	G	A
Intron 6	c.374+42	K	T	G
	c.374+163	Y	C	T
	c.374+179	Y	T	C
	c.374+271	R	G	A
	c.374+280	Y	T	C
	c.374+446	R	G	A
	c.374+628	R	G	A
	c.374+784	R	G	A
	c.374+786	R	G	A
	c.374+891	R	G	A
	c.374+901	R	A	G
	c.374+950	R	G	A
Exon 7	c.526	S	G	C
	c.657	Y	T	C
	c.703	R	A	G
	c.796	M	A	C
	c.803	S	C	G
	c.930	R	A	G
	c.1096	R	A	G
Intended allele result			<i>ABO*B.01</i>	<i>ABO*O.01</i>

Abbreviations: Y, C/T; S, G/C; M, A/C; R, A/G; K, G/T.

교정(proof-reading) 기능이 있어서 높은 정확도 (fidelity)를 가지는 DNA 합성 효소를 선택해야 한다. 본 연구에서 이용한 Phusion DNA 합성효소의 오류율(error rate)은 9.5×10^{-7} 로 Pfu 합성효소의

오류율보다 2~3배 더 낮다[15]. 4개의 플라스미드에서 읽을 수 있었던 6,630 bp에서 합성 오류가 없어 합성 정확도가 높다는 것을 재확인할 수 있었다. 또한 합성 속도가 빨라서 ~7.3 kb를 합성

하는 데 신장 시간(extension time)이 2분으로 충분하여 더욱 신속한 삽입절편 준비가 가능하였다 [6]. 셋째, 긴 증폭산물을 삽입할 때는 높은 형질 전환율을 가지는 competent cell을 선택해야 한다. 본 연구에서는 DH5α Chemically Competent *E. coli* (Enzynomics)를 이용하였는데 회사 매뉴얼에 따르면 이 competent cell의 형질전환율은 1×10^9 cfu/μg이다[16]. Overlap Cloner를 생산하는 Elpis Biotech에서는 competent cell의 구체적인 형질전환율 기준을 제시하지 않았으나 또 다른 seamless 클로닝 키트인 In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Madison, WI, USA)의 경우 1.0×10^8 cfu/μg 이상의 형질전환율을 요구하고 있다[17]. ~7.3 kb 증폭산물이 높은 효율로 클로닝되어 비슷한 크기의 긴 삽입절편을 클로닝하는 데 DH5α Chemically Competent *E. coli* (Enzynomics)를 이용할 수 있을 것으로 사료되었다.

상품화된 Seamless 클로닝 키트를 이용하더라도 상품화된 TA 클로닝 키트 또는 TOPO 클로닝 키트와 달리 선형화된 벡터는 연구자가 준비해야 한다. 본 연구에서는 pUC 계열 플라스미드에 공통적으로 들어있는 M13(-40)과 M13(-20)을 포함하는 부분을 상동염기서열로 이용하였다. M13(-40)과 M13(-20)을 상동염기로 활용하면 pUC 계열 플라스미드를 동일한 시발체로 선형화할 수 있다. 그리고 M13(-40)과 M13(-20)을 본 연구처럼 유전자 특이 시발체에 상동염기서열로 적용한다면 미리 제작한 선형화된 pUC19 벡터를 지속적으로 이용할 수 있어 벡터 준비 과정을 단축할 수 있을 것이다.

ABO 유전형을 결정하기 위해서 enhancer 부위를 포함한 프로모터부터 엑손 7까지 염기서열정보를 분석하고[2] 대립유전자를 분리해야 하는 경우도 있을 수 있으나, 인트론 1번이 약 13 kb 정도로 길어 ABO 유전자 전체를 클로닝하기에는 어려움이 있다. 이에 본 연구에서는 엑손 2번부

터 엑손 7번까지의 대립유전자 분리만을 목표로 하였으며 향후 한국인을 대상으로 인트론 1번 염기서열분석과 함께 ABO 유전자 전체를 클로닝하는 기법을 개발할 필요가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 저자들은 Overlap Cloner DNA Cloninig Kit (ElpisBio)를 이용한 seamless 클로닝 기법으로 ABO 유전자 엑손 2부터 엑손 7 (코딩 부분)을 포함하는 ~7.3 kb를 클로닝할 수 있었다. Seamless 클로닝 기법은 긴 영역의 대립유전자를 분리하는데 이용할 수 있는 신뢰할 만한 기법으로 사료된다.

감사의 글

Overlap Cloner 제품을 무상 제공해주신 엘피스 바이오에 감사드립니다.

요 약

배경: ABO 유전형을 결정하는데 엑손 2번부터 엑손 7번까지 염기서열분석과 대립유전자 분리가 필요할 수 있다. 이에 본 연구에서는 seamless 클로닝 기법을 이용하여 ABO 유전자의 엑손 2번부터 엑손 7번 일부분을 포함하는 약 7.3 kb를 클로닝하는 것을 목표로 하였다.

방법: 이전에 ABO*B.01/O.01 유전형으로 확인된 DNA를 Overlap Cloner DNA Cloning Kit (Elpis-Bio)에 의해 수행된 seamless 클로닝에 이용하였다. 동일한 클로닝 프로토콜을 이용하여 클로닝을 3회 반복 실시하였다. 클로닝에 의해 얻어진 플라스미드의 염기서열을 플라스미드-염기서열 분석법으로 확인하였다.

결과: 총 92개의 콜로니(한 평판 배지당 평균 30개 콜로니)가 얻어졌다. 50개의 콜로니 중 48개의 콜로니에서 증폭산물이 확인되었다. 플라스미

드-염기서열분석법으로 31개의 이형접합이 BGMUT 데이터베이스를 통한 예측과 일치되게 대립유전자가 잘 분리되었음을 확인하였다.

결론: Seamless 클로닝 기법은 ABO 유전자와 같이 긴 영역의 대립유전자를 분리하는 데 이용할 수 있는 신뢰할 만한 기법으로 사료된다.

References

1. Cho D, Kim SH, Ki CS, Choi KL, Cho YG, Song JW, et al. A novel *B_{var}* allele (547 G>A) demonstrates differential expression depending on the co-inherited ABO allele. *Vox Sang* 2004;87:187-9
2. Lee JY, Song SA, Oh SH. Molecular genetic and serologic analysis of the O allele in the Korean population. *Korean J Blood Transfus* 2019;30:124-37
3. Won EJ, Cho D, Shin MG, Kwon SY, Cho NS, Ryang DW. Two *A_{weak}B* cases with *Aw10* allele separated by allele-specific sequencing. *Korean J Blood Transfus* 2011;22:59-64
4. Zhu F, Tao S, Xu X, Ying Y, Hong X, Zhu H, et al. Distribution of ABO blood group allele and identification of three novel alleles in the Chinese Han population. *Vox Sang* 2010;98:554-9
5. Won EJ, Jang MJ, Cho D, Shin DJ, Shin MG, Ryang DW. New variant of O02 allele found in the family of Cis-AB: report of three cases in a family. *Korean J Blood Transfus* 2010;21: 148-53
6. Huh JY, Park G, Jang SJ, Moon DS, Park YJ. A rapid long PCR-direct sequencing analysis for ABO genotyping. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41:340-5
7. Liu CJ, Jiang H, Wu L, Zhu LY, Meng E, Zhang DY. OEPR cloning: an efficient and seamless cloning strategy for large- and multi-fragments. *Sci Rep* 2017;7:44648
8. Huang J, Yu Z, Li MH, Li N, Zhou J, Zheng YG. A strategy for seamless cloning of large DNA fragments from *Streptomyces*. *Biotechniques* 2015;59:193-4, 196, 198-200
9. Chao R, Yuan Y, Zhao H. Recent advances in DNA assembly technologies. *FEMS Yeast Res* 2015;15:1-9
10. Park JH, Han JH, Park G. Rapid and reliable one-step *ABO* genotyping using direct real-time allele-specific PCR and melting curve analysis without DNA preparation. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2019;35:531-7
11. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 α -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PLoS One* 2015;10:e0137466
12. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 2000;10:1788-95
13. Choi SY, Ro H, Yi H. DNA cloning: a hands-on approach. New York: Springer Publishing Company, 2019:103-4
14. Enzynomics. TOPcloner™ TA kit manual. http://www.enzynomics.com/shop/product_item.php?it_id=601001 [Online] (last visited on 9 December 2020)
15. McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Mol Biol Int* 2014;2014: 287430
16. Enzynomics. CP010 DH5 α chemically competent *E. coli* manual. http://www.enzynomics.com/shop/product_item.php?it_id=603001 [Online] (last visited on 9 December 2020)
17. Clontech. In-Fusion® HD Cloning Kit user manual. <https://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/pt5162-1.pdf> [Online] (last visited on 9 December 2020)