

Cloning은 Clontech과 함께

In-Fusion[®] HD Cloning Kit



- Vector 종류와 제한효소 사이트에 관계없이 cloning 가능
- 정확한 방향성의 directional cloning으로 목적 clone 선별 용이
- 목적 유전자의 제한효소 처리, vector의 phosphatase 처리 불필요
- 복수의 단편 cloning이나 point mutation 제작 가능

In-Fusion Cloning의 특징

Any Vector, Any Insert

- Vector 종류나 삽입 위치의 제한 없이 cloning 가능
- 특정 vector나 특정 cell 없이 In-Fusion 효소만 있으면 가능

짧고 간편한 반응

- 50°C, 15 분이면 In-Fusion 반응 완료
- 목적유전자(insert)에 A tailing이나 제한효소 처리 또는 vector의 phosphatase 처리 불필요

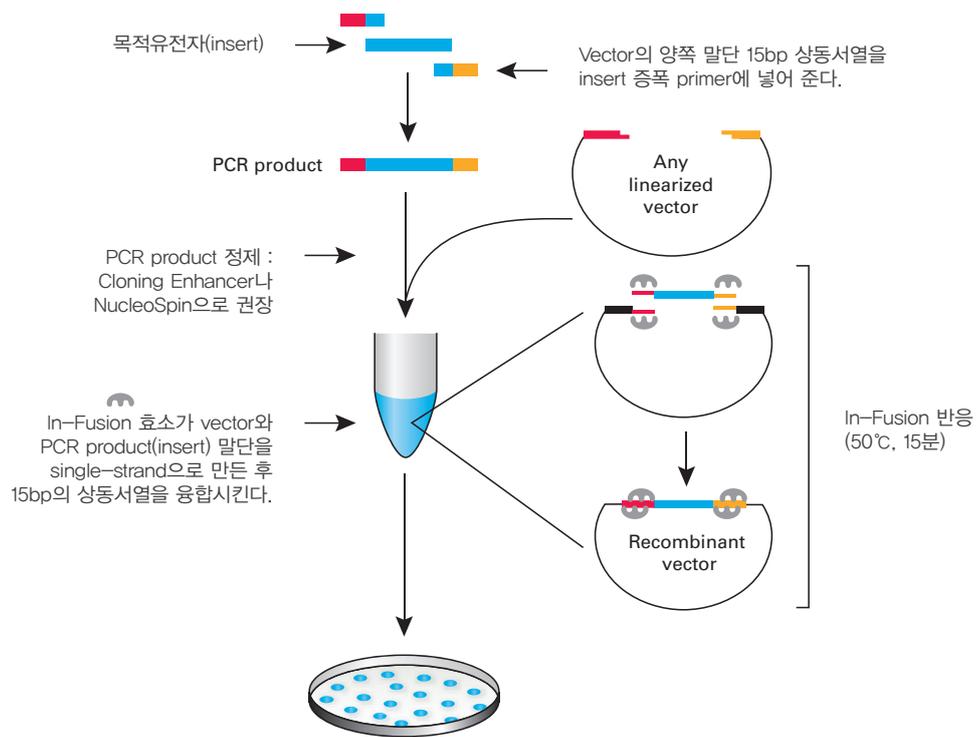
뛰어난 cloning 효율

- 방향성이 유지되는 directional cloning으로 clone 스크리닝 효율이 높음

다양한 실험에 적용 가능

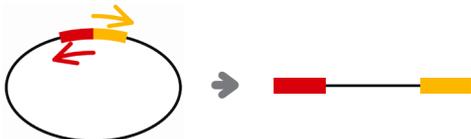
- 복수 DNA도 동시에 cloning 가능하며 전용 vector나 cell이 불필요
- 긴 단편 DNA(~ 15 kb)의 cloning, mutagenesis이나 modular vector 제작에도 효과적

In-Fusion Cloning 개요



Vector 준비 : vector 선형화 (linearize)

- 제한효소 처리 : 2 종류의 제한효소로 처리하는 경우 더 효과적이다
- Inverse PCR : PCR로 vector를 증폭 중폭시 high-fidelity PCR 효소 사용을 권장한다.

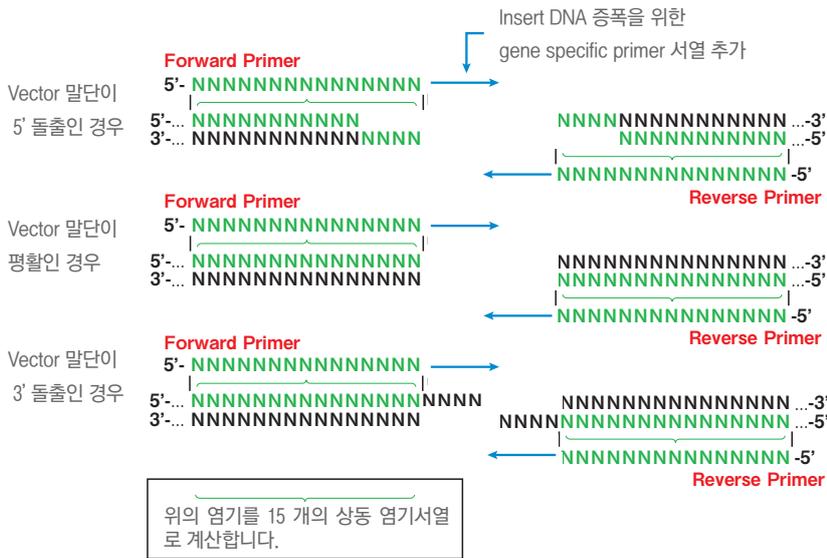


Insert 준비 : In-Fusion primer로 PCR

In-Fusion primer는 gene specific primer(—)에 vector의 5' 말단과 상보적 서열(※ : 15 bp)을 부가한 primer이다.



In-Fusion Primer 디자인



Cloning Enhancer

- 1) PCR 산물을 그대로 In-Fusion 반응에 사용하기 위한 전처리 시약
- 2) PCR 산물의 정제가 필요 없어 정제단계의 샘플 손실 방지
- 3) 반응 : PCR 산물에 Cloning Enhancer를 첨가한 후 incubation [37°C, 15분 + 80°C, 15분]

※ Cloning Enhancer 처리는 단일 밴드의 PCR product일 때 가능하며 multi-band일 경우 gel extraction을 권장한다.

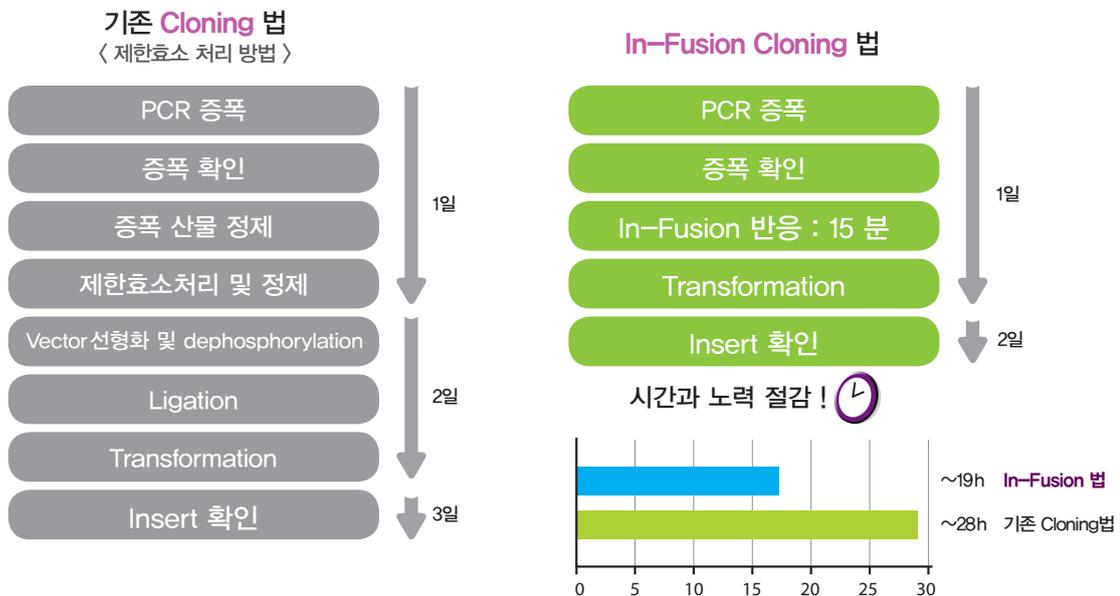
NucleoSpin Extract II

PCR 산물이 multi-band인 경우 NucleoSpin으로 gel extraction을 이용하여 PCR clean-up하는 것을 권장한다.



In-Fusion Primer 디자인 온라인 사이트 : <http://bioinfo.clontech.com/infusion/>

기존 Cloning 법 vs In-Fusion Cloning 법



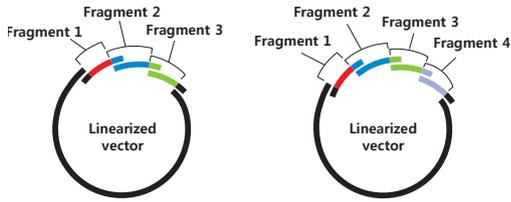
Advantage HD Polymerase Mix (Code 639241) 는 최고의 fidelity와 높은 증폭 효율로 cloning하고자 하는 목적 유전자의 증폭은 물론 vector의 선형화에도 추천한다. 또한 긴 단편 증폭용 high fidelity PCR 효소인 **PrimeSTAR GXL DNA Polymerase** (Code R050A)를 이용하면 6kb 이상의 유전자를 효율적으로 증폭할 수 있다.

In-Fusion 반응은 목적 DNA(insert)를 PCR 증폭한 후 별도의 제한효소 처리 과정 없이 vector와 In-Fusion 효소를 첨가하여 50°C에서 15분간 반응하면 insert와 vector의 15bp 상동서열이 융합된다(EcoDry type 반응 시간 : 37°C, 15분+50°C, 15분).

In-Fusion Cloning을 이용한 다양한 적용 실험

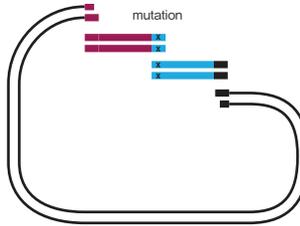
- ① Standard Cloning
- ② Multiple Insert Cloning
- ③ Long Insert Cloning
- ④ Site-Directed Mutagenesis
- ⑤ BioBrick Construction

Multiple Insert Cloning



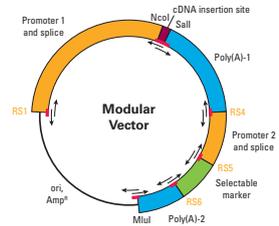
복수의 DNA 단편을 1회의 cloning 반응으로 원하는 clone을 얻을 수 있다.

Site-Directed Mutagenesis



In-Fusion primer를 활용하면 point mutation 제작에도 유용하다.

BioBrick Construction



In-Fusion 방법은 modular vector와 같은 바이오 모형을 쉽게 제작할 수 있다.

In-Fusion Cloning 제품 리스트

Type	제품명	Code	용량	Core Kit	정제	Cells
Liquid	In-Fusion HD Cloning System	639645	10 회	○	NS	○
	In-Fusion HD Cloning System CE	639636	10 회	○	CE	○
	In-Fusion HD Cloning Kit	639648	10 회	○	—	—
	In-Fusion HD Cloning Kit w/Cells	639642	10 회	○	—	○
	In-Fusion HD Cloning Kit w/NS	639639	10 회	○	NS	—
	In-Fusion HD Cloning Kit w/CE	639633	10 회	○	CE	—
Drydown	In-Fusion HD EcoDry Cloning System	639684	8 회	○	NS	○
	In-Fusion HD EcoDry Cloning Kit	639689	8 회	○	—	—
	In-Fusion HD EcoDry Cloning Kit w/Cells	639678	8 회	○	—	○

* Core Kit : In-Fusion HD Enzyme과 Control(vector, insert) 포함 CE : Cloning Enhancer NS : NucleoSpin Cells : Stellar Competent Cells
 * Liquid type 용량은 10회, 50회, 100회이며, Drydown type은 8회, 24회, 96회로 구성됨.

In-Fusion Cloning 관련 제품 리스트

제품명	Code	Size	특징
Stellar Competent Cells	636763	10 x 100 μ l	형질전환 효율 : $> 5 \times 10^8$ cfu/ μ g
Advantage HD Polymerase Mix	639241	200 회	≤ 8 kb 증폭 최적의 high fidelity PCR 효소
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	R050A	250 U	≤ 30 kb 증폭 최적의 high fidelity PCR 효소

Cloning에서 competent cell은 매우 중요한 요소 중 하나이다.

일반적인 cloning보다 효율이 떨어지는 multiple insert cloning과 같은 실험을 진행하는 경우 형질전환 효율이 cloning의 성패를 좌우할 수도 있다. 따라서 Stellar Competent Cells과 같은 형질전환 효율 10^8 cfu/ μ g 이상의 cell 사용을 권장한다.

* Stellar Competent Cells(Code 636763)은 높은 형질전환 효율로 긴 단편 DNA 형질전환에도 유용하며 같은 유전자형의 다른 competent cell 보다 콜로니 형성 속도도 빠르다. pUC계 plasmid의 형질전환시에는 β -galactosidase의 α -상보성을 이용해 X-Gal을 첨가하면 재조합체의 Blue/White 선별을 할 수 있다.