

# Human genome functional element의 highthroughput 클로닝

Sara J. Hartman\*, Nathan D. Trinklein, Ph.D.\*,  
Elizabeth D. Anton, Simone S. Marticke, Loan Nguyen, and Richard M. Myers, Ph.D.

\* Equal contributors

Department of Genetics Stanford University School of Medicine Stanford, CA

본 연구에서는 promoter 활성의 highthroughput 스크리닝을 위하여 human genome에서 얻은 putative promoter를 가진 DNA 단편을 In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit를 사용하여 luciferase reporter vector에 대량으로 클로닝하였다. In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit는 간편할 뿐만 아니라 TITANIUM™ Taq PCR Kit와 동시에 사용하면 높은 수준의 증폭 및 클로닝이 가능하여 highthroughput PCR 클로닝에 매우 효율적인 시스템이다.

## Introduction

Human genome 내에 있는 functional element를 분류하려는 목적으로, National Human Genome Research Institute(NHGRI)에서는 Encyclopedia of DNA Elements(ENCODE)라는 이름 하에 3년간의 프로젝트를 계획하였다(1). 이 프로젝트의 일환으로 Clontech에서는 기존의 방법을 이용하여 ENCODE가 목적으로 하는 영역 내에 있는 putative promoter를 동정하였다(2, 3). TITANIUM™ Taq PCR Kit 및 In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit를 사용하여 promoter를 포함한 DNA 단편을 luciferase reporter vector의 진핵생물 promoter 및 enhancer 서열이 결실된 luciferase 유전자의 상류에 클로닝하였다. 이 luciferase/promoter의 co-transfection으로 세포내 유전자로 도입된 luciferase 활성은, 클로닝된 단편이 나타내는 promoter 활성을 의미한다.

## TITANIUM™ Taq DNA polymerase를 이용한 목적 서열의 증폭

Promoter 활성을 스크리닝하기 위하여 총 936개의 PCR 산물을 동정하였고, PCR 산물의 크기는 모두 413~600 bp(평균 사이즈  $497 \pm 30$  bp) 정도였다. 실험에 앞서 평균 23 bp 정도의 PCR primer를 설계하고 5' 말단에 클로닝 vector pGL3-Basic의 클로닝 부위(*Mlu* I 및 *Bgl* II)에 적합한 15 염기를 첨가하였다(그림 2).

Human genome DNA를 사용하여 936개를 증폭하였다. PCR 증폭은 96-well PCR plate를 사용하여 96°C에서 3분 가열한 후 PCR(45 cycle, 96°C, 30초, 72°C, 30초)1 cycle 당 0.3°C 온도를 내린 뒤 72°C에서 45초)을 하였으며, 72°C에서 7분간 반응시켰다.

총 936개의 PCR 산물 중, 874개의 PCR 산물을 얻었다(표 1). 이를 QIAquick 96 PCR Purification Kit를 사용하여 정제하였다. 936개의 PCR

산물 가운데 830개는 강한 밴드, 44개는 약한 밴드가 형성되었으며 62개에서는 증폭에 실패하였다.

## In-Fusion™법을 이용한 highthroughput 클로닝 및 스크리닝

강하거나 약한 밴드를 형성하는 874개의 PCR 산물을 In-Fusion 클로닝하였다. 96-well plate 형태의 In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit를 사용하여 pGL3-Basic vector에 클로닝 하였다. 클로닝 vector 및 PCR 단편 이외에 반응에 필요한 시약은 각 plate에 dry pellet으로 되어있다. Vector 100 ng, insert 100 ng(2 µl의 PCR 산물에 상당)를 넣고 10 µl의 증류수를 반응튜브에 첨가한 후 42°C에서 30분간 배양하였다.

PCR 산물은 96-well plate 형태의 Fusion-Blue™ Competent Cells(Cat. No.636758)을 이용하여 도입하였으며, In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit 매뉴얼(PT3754-1)에 따랐다. 각 transformation의 용량은 502.5 µl에서 101 µl로 약 80% 감소하였다. 반응이 완료된 In-Fusion 반응액을 20 µl의 TE buffer로 희석하고 희석 후 1 µl를 96-well plate에 넣은 20 µl Fusion-Blue Competent Cells에 첨가한 후 heat shock으로 유전자를 도입하였다. 80 µl의 SOC 배지를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하고, ampicillin을 첨가한 LB agar gel을 넣은 12-well 배양 plate에 spreading하였다. 각 well에서 하나의 colony를 채취하여 형질도입 유무를 PCR을 통해서 스크리닝하였다.

첫 번째 스크리닝에서 In-Fusion 클로닝의 성공률이 85.1% 이었으며, 874개의 PCR 산물 중 744개의 transformant를 얻었다(표 1). 강한 밴드를 형성하는 PCR 산물의 성공률이 매우 높았고(86.1%), 약한 밴드를 형성하는 PCR 산물의 성공률은 비교적 낮은(65.9%) 결과가 얻어졌다. 두 번째 스크리닝에서는 증폭에 실패한 PCR 산물 중, 더 많은 colony를 채취하거나 PCR 증폭을 반복하여 클로닝하였다. 이를 종합하면 TITANIUM™ Taq

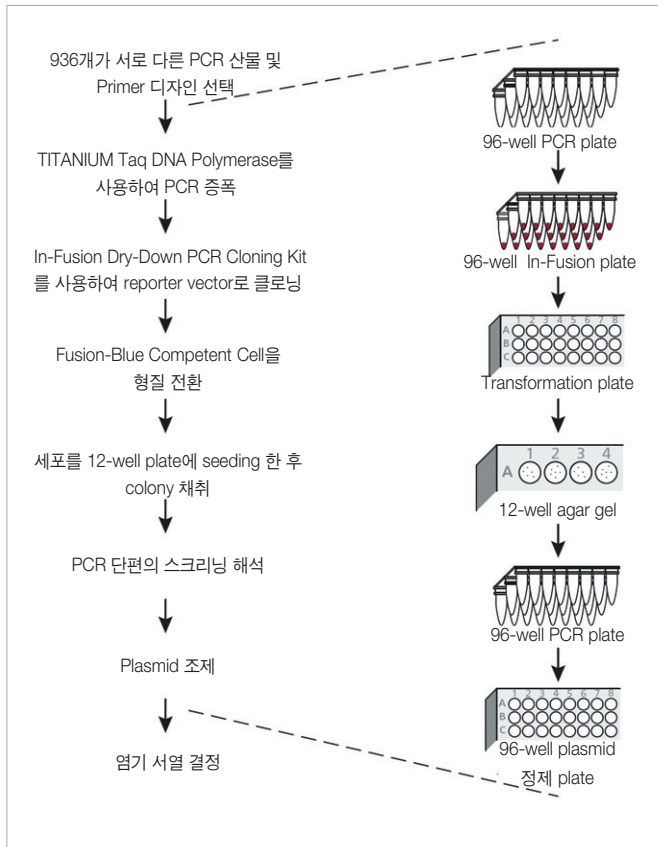


그림 1 In-Fusion Highthroughput 클로닝 및 스크리닝의 조작순서

polymerase를 사용한 첫 번째 실험에서 936개의 promoter 중, 974개 (93.4%)의 증폭에 성공하였고, 두 번째 실험 결과 성공률은 92.6%였다.

**결론**

In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit는 제한 효소, ligase, 평활말단화 없이도 PCR 산물의 highthroughput 클로닝이 가능하다. In-Fusion법은 vector의 종류, 삽입서열에 관계없이 사용할 수 있으며, 두가지 시스템 (TITANIUM™ Taq polymerase 및 In-Fusion Dry-Down)을 같이 사용하면 보다 신속하고 간편하게 클로닝 할 수 있다.

표 1 TITANIUM™ Taq의 PCR 증폭이 In-Fusion의 클로닝을 향상

	연속적 PCR 반응	첫 번째 클론 수	첫 번째 형질전환(%)	두 번째 형질전환	형질 전환체의 합계	형질전환체의 누적(%)
약한 밴드	44	29	65.9	3	32	72.7
강한 밴드	830	715	86.1	62	777	93.6
Positive 클론의 합계	874	744	85.1	65	809	92.6

**관련제품**

제품명	Size	Code
In-Fusion PCR Cloning Kit	50회	631774
	100회	631775
In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit	(1 x 8 well strip)8회	639602
	(3 x 8 well strip)24회	639604
	(96-well plate)96회	639605
In-Fusion CF Dry-Down PCR Cloning Kit	(3 x 8 well strip)24회	639606
Fusion-Blue Competent Cells	22회	636700
Fusion-Blue Competent Cells	(96-well plate)96회	636758

**참고문헌**

1. National Human Genome Research Institute -Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE):www.genome.gov/10005107.
2. Trinklein, N. D., et. al. (2003) *Genome Res.*13(2):308-312.
3. Trinklein, N. D., et. al. (2004) *Genome Res.*14(1):62-66.
4. Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Eds. Krawetz, S. & Misener, S. (Humana Press, Totowa, NJ), pp. 365-386.
5. Primer 3 includes software developed by the Whitehead Institute for Biomedical Research.

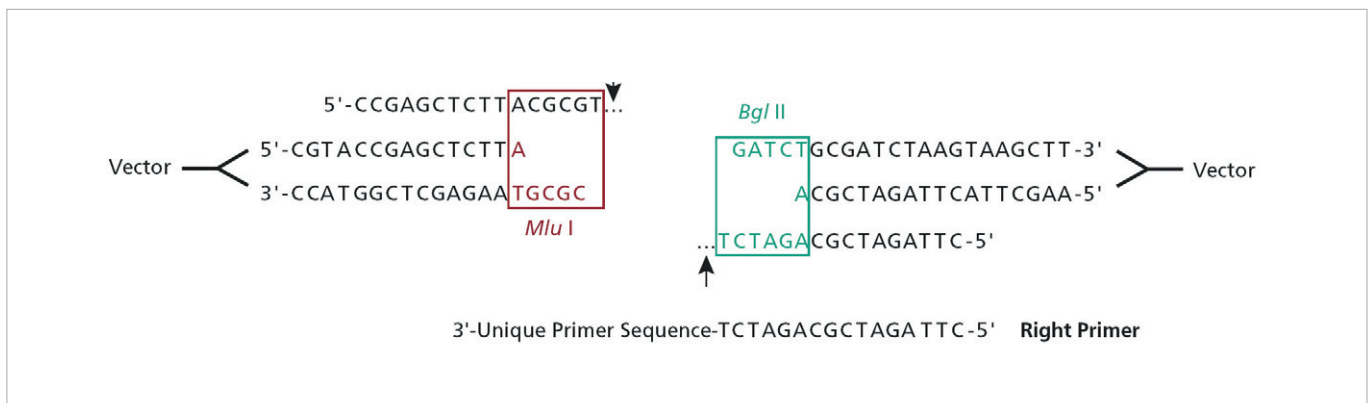
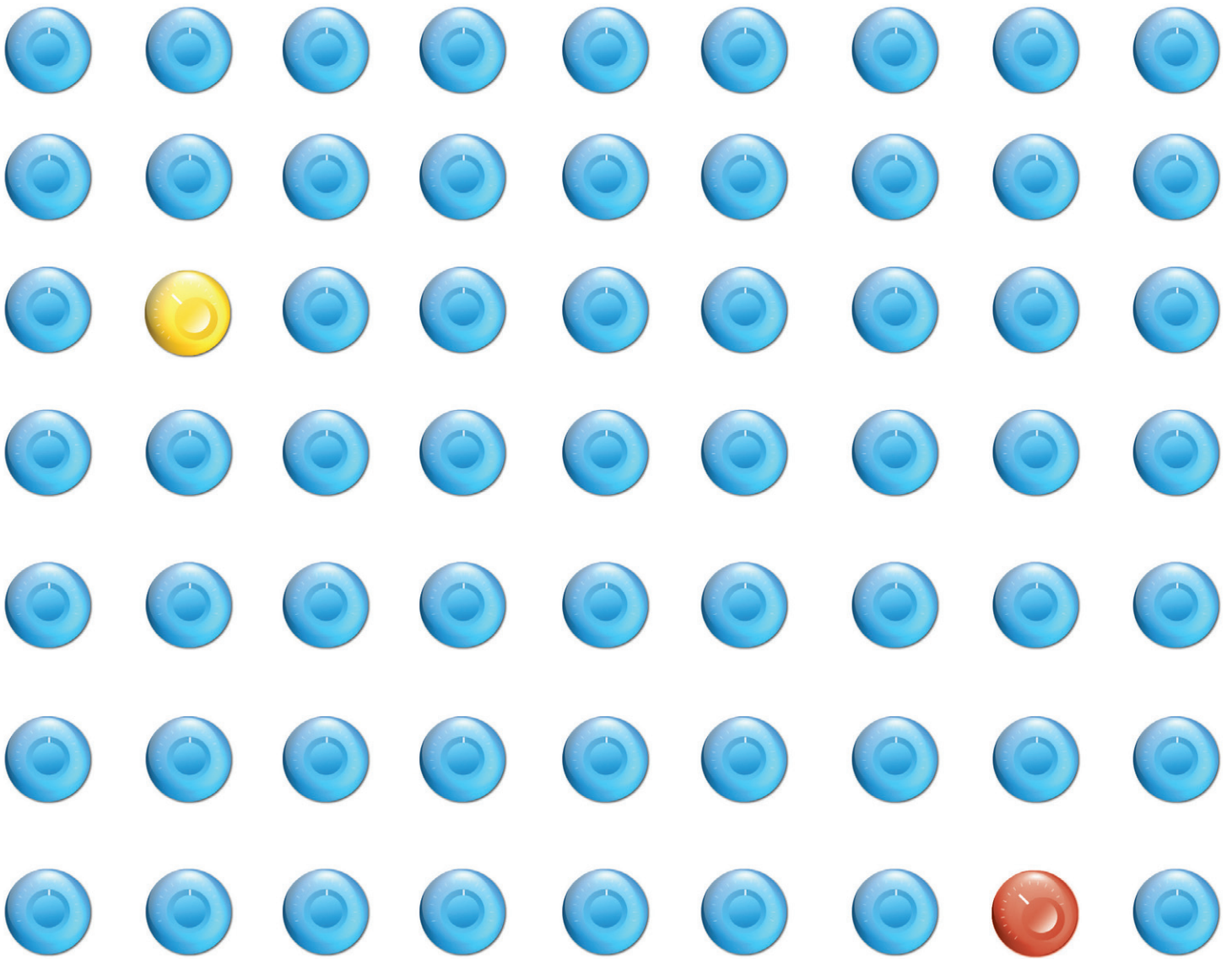


그림 2 In-Fusion Primer 설계 전략

이 그림은 promoter fragment의 In-Fusion에 사용하는 primer 설계 전략에 대하여 나타내고 있다. 각 oligonucleotide는 vector에 대한 15 염기의 상호 보완적 서열을 가지므로 유전자 조작용을 이용한 삽입을 촉진시킨다. 당사에서는 primer의 3'말단에 염기를 추가하여 새롭게 제한효소 절단부위를 제작하였다. 상호 보완적 서열로 Primer 설계용 소프트웨어 Primer3(4, 5)을 이용하여 제작한 독자적인 서열을 추가하였다. 이 결과, 확실표로 나타난 위치에서 promoter 서열의 증폭 및 삽입이 일어났다. PCR Primer 설계에 관한 정보는, In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit의 사용자 매뉴얼(PT3754-1)을 참조하기 바란다.



# Matchmaker™ System

Yeast Two Hybrid를 위한 혁신적인 System

