

In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit 를 이용한 PCR-Linearized Plasmid 내 DNA Fragment의 Directional Cloning

Roger M. Benoit, Ramon N. Wilhelm, Daniela Scherer-Becker, Christian Ostermeier
Novartis institutes for Biomedical Research, Basel, Switzerland

In-Fusion™ PCR Cloning System은 종류에 상관없이 linearization된 vector라면 PCR fragment를 정확하고 효율적으로 cloning 할 수 있다. 이 시스템은 insert 크기에 상관없이 다양하게 적용 가능하며, 실온에서도 안정한 동결건조 형태로 되어 있어 사용하기에 편리하다. In-Fusion™ PCR Cloning System은 PCR cloning을 수행하기에 가장 간단한 방법이며, cloning 자동화 방법에 최적의 시스템이다. In-Fusion법의 high-throughput cloning 적용 적합성은 Novartis institutes for Biomedical Research, Basel, Switzerland에 의해서 증명되었고, 그 적용결과는 아래 명시하였다. 연구자들은 vector와 insert를 모두 PCR법을 이용하여 제작하였고, PCR 산물을 정확하고 효율적이며 cloning 자동화 시스템에 성공적으로 적용함으로써, In-Fusion system 특징을 다시 한번 보여주었다.

관심 있는 유전자를 plasmid의 발현 영역에 도입하기 위하여 In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit를 사용하였다. 원하는 plasmid의 특정 영역에 정확하게 insert를 도입하기 위해, vector를 제한효소 처리하는 대신 PCR 방법을 이용하여 linearization시켰다. In-Fusion™ Cloning Kit를 이용하여 정확한 결과를 보기 위하여, PCR법에 의해 plasmid와 insert를 linearization 시켰다. template는 *DpnI* 처리에 의해 제거하기 때문에 linearized plasmid와 insert를 gel로 정제하지 않아도 되는 장점이 있다. 결과적으로 PCR과 liquid handling 단계만으로 이루어져 이론적으로는 high-throughput cloning 자동화 과정에 큰 가능성을 제시할 수 있다.

Introduction

구조생물학(structural biology) 분야에서는 단백질의 특별한 품질이 요구되고, 일반적으로 수 mg의 매우 순수하게 정제된 단백질이 필요하다. 또한, 단백질 종류에 따라 다르지만 통상적으로 높은 농도 (~5-20 mg/ml)에서 안정하다. 단일 아미노산 변이와 같은 작은 서열의 변화라도 결정화(crystallization)에는 많은 영향을 미칠 수 있다. 또한 단백질 도메인의 N-혹은 C- 말단 부위에 아미노산을 첨가해도 동일한 영향을 미치게 된다. 따라서 효율적이면서 완벽한 cloning 방법이 구조생물학 분야에서는 필수적인 필요한 요소이다. 대부분의 구조생물학 분야에서 결정화의 이상적인 구축 시스템은 경험에 근거를 두고 있는 경우가 많다. 따라서, 결정화시켜야 하는 많은 단백질의 medium- 혹은 high-throughput cloning 방법을 적용할 수 있는 자동화된 system이 필요하다.

이에 Clontech의 In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit(TaKaRa Code 639604)를 이용하여 *E.coli* system에서 사용되는 plasmid에 447~1,200 bp 크기의 DNA fragments를 삽입하였다. 제한효소 인식부위와 상관없이 정확하게 DNA 삽입하기 위하여 제한효소를 이용한 절단이 아닌

PCR에 의해서 plasmid를 linearization시켰다. 표준 실험방법을 이와 같이 변형함으로써 위에서 논의되었던 필요조건을 충족할 수 있었다.

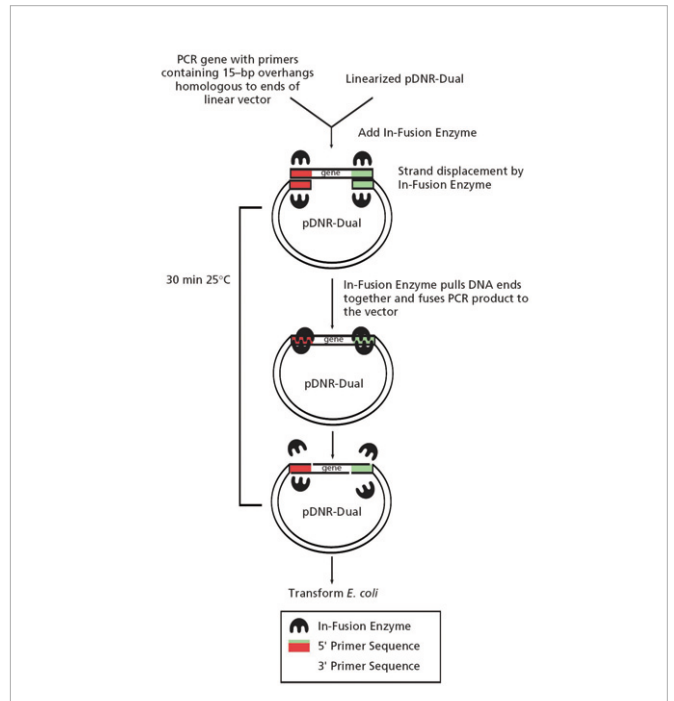


그림 1 In-Fusion 원리

표1 변형된 pET-28a(+) plasmid의 linearization에 사용된 PCR primer sets

Primer	Primer Sequence
Linearization primer 1	GGGCCCTGGAACAGAACTCCAGGCC
Linearization primer 2	GGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAA
Forward insert primer	AAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTTACAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTG
Reverse insert primer	CGGAGCTCGAATTCGGATCCGTTTGACAGCTTATCATCGAATAGC

Note : plasmid linearization primer는 변형된 Novagen pET-28a(+) plasmid(thrombin 인식부위 대신 PreScission™ protease 인식부위를 포함)의 PCR linearization을 위하여 사용되었고, 상응하는 insert 증폭 primer는 Novagen pETBlue-2의 lacZ α-peptide(promoter 포함)의 PCR 증폭을 위해 사용되었다. 20 nt의 homology 영역은 빨간색과 파란색으로 표시하였다. Insert 증폭 primer는 non-annealing 5' primer tail에 plasmid와 homology 서열을 가지고 있다. Plasmid linearization primer는 완전히 annealing 된다.

Insert DNA와 plasmid 준비

2개의 annealing primer를 이용하여 PCR 방법으로 plasmid를 linearization시켰다. Insert는 template에 직접 annealing되지 않으면서, vector의 삽입하고자 부위와 15-20 bp homology region을 가지도록 설계한 primer 세트(5' primer overhang)로 합성하였다. Primer 디자인의 예는 표 1에 나타내었고, insert 증폭용 primer와 plasmid linearization primer의 결합은 그림 2에 나타내었다. PCR 산물은 single band 인지, 원하는 크기에 합성되었는지를 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 확인한 PCR 산물은 template를 제거하기 위하여 Dpn I 으로 처리하였다. Dpn I을 처리한 PCR 산물은 column을 이용하여 정제하여 50 µl의 Tris buffer(10 mM, pH8.5) 에 녹여서 분리하였다. 대략적인 실험방법은 그림 3에 나타내었다. (자세한 실험 방법은 참고문헌 1을 참고하기 바란다.)

3'-CCGGACC **TTCAAGACAAGGTCCCGGG**-5'=Linearization primer1
5'-**AAGTTCTGTTCAGGGGCC**TTACAATTTCCATTCGCCATTCAGGCTG-3'
=Insert forward primer

Linearization primer2 = 5' - **GGATCCGAATTTCAGCTCCGTCGACAA**-3'
Insert reverse primer 3'-CGATAAGCTACTATTGACAGTTGG**CCTAGGCTTAAGCTCGAGGC**-5'

그림 2 Plasmid linearization의 homology 영역과 insert 증폭 primer의 결합

In-Fusion cloning

Column으로 정제한 linearization된 plasmid 1~2 µl(100-250 ng) 와 column으로 정제한 insert DNA 1~2 µl(50-200 ng)를 0.5 ml tube에 넣고 잘 섞었다. 이 혼합물의 최종 부피가 10 µl가 되도록 distilled H₂O를 첨가하였다. 이렇게 희석된 혼합물을 Clontech의 In-Fusion™ Dry-Down Mix(In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit의 구성물, Clontech Code 639604)와 혼합하여 42°C에서 30분간 incubation 한 후 얼음에서 5분간 방치하였다. 이 ligated DNA 혼합물 1 µl를 바로 Fusion-Blue™ chemically competent cell에 넣었다. 이 ligated DNA와 cell의 혼합물을 얼음에서 15분간 방치한 후, 42°C에서 45초간 heat-shock을 주어 transformation을 수행하였다. 각각의 tube에 200 µl S.O.C medium을 넣고 Eppendorf Thermomixer를 이용하여 37°C, 650 rpm에서 60분간 혼합하였다. Transformation 과정을 완료한 후에 LB 선택배지에서 결과를 확인하였다. 각각의 cloning 산물에서 4개씩의 colony를 선택하여 plasmid를 정제하였다. Positive clone을 알아내기 위해 analytical PCR 수행 후, 염기서열 분석을 통해 최종확인 하였다. 이 방법을 이용하여 원하는 vector에 447~1,200 bp의 DNA fragment를 성공적으로 삽입할 수 있었으며, 조작 시간도 최소화 할 수 있었고, 무엇보다 원하는 결과를 한 번의 실험으로 얻을 수 있었다.

결론

In-Fusion cloning 전략은 실험과정이 간단하고 homology region을 자유롭게 선택할 수 있기 때문에 매우 편리한 방법이다. 단지 짧은 homology region만 필요할 뿐이다. PCR에 의한 plasmid linearization은 제한효소 인식 부위에 전혀 의존하지 않는 방법이다. 이 실험에서 가장 중요한 점은 원하는 불필요한 염기의 도입 없이 어떠한 plasmid의 원하는 부위에 DNA fragment를 삽입할 수 있다는 것이다.

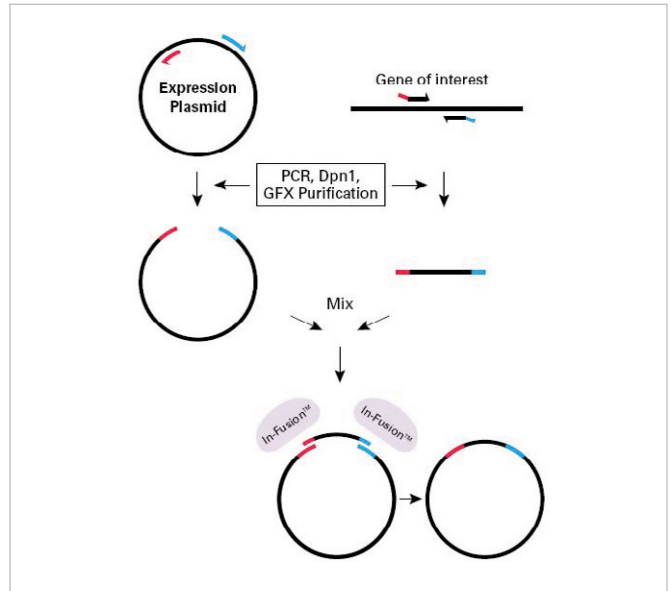


그림 3. PCR linearization plasmid를 이용한 In-Fusion cloning 모식도

Double stranded DNA는 굵은 하나의 선으로 표시하였다. Homology 영역은 빨간색과 파란색으로 표시하였다. 화살표는 primer extension의 방향을 나타낸다. Plasmid는 각각 다른 가닥에 결합하는 두 개의 primer와 합성 방향을 반대 방향으로 하여 PCR로 증폭하였고, 결과적으로 linear한 PCR 산물을 합성하였다. 목적하는 insert 유전자는 plasmid의 삽입하고자 하는 영역과 homologous한 5' primer tail을 가지도록 설계한 primer를 이용하여 PCR법으로 합성하였다. Linearization plasmid와 증폭된 insert를 Dpn I으로 처리하고 spin-column으로 정제하였다. Plasmid와 insert를 혼합한 다음 dH₂O를 이용하여 최종 부피를 10 µl로 맞추고 In-Fusion Dry-Down Mix와 혼합하였다. 42°C에서 30분간 incubation하고, 이 혼합물 1 µl를 Fusion-Blue chemically competent *E. coli* cell에 transformation하였다.

PCR에 의해 replication origin이나 항생제 저항 유전자에 변이가 생긴 산물을 삽입한 경우에는 *E. coli* cell은 선택 배지에서 colony가 형성되지 않는다. 또한 pET vector의 경우 *lac I* 과 같은 plasmid backbone region에 변이를 일으킨 경우 또한 실험에 오류를 나타낼 요소로 남아있다. 하지만 본 고에 실린 실험결과에는 아직 이러한 문제는 없었다. 끝으로, plasmid linearization 과정에는 강력한 high-fidelity proofreading 효소를 사용하기를 권장하며, promoter와 terminator를 포함한 발현 영역에 대해서는 항상 염기서열 분석을 통해 확인해야 한다.

Reference

1. Benoit, R.M., et al. *Protein Expr. (2005) Purif.* **45**(1):66-71.

관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit	8 rxns/24 rxns	639602/639604
	/96 rxns	639605
In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit	96 rxns	639605
	(no comp cell)	
In-Fusion™ CF Dry-Down PCR Cloning Kit	24 rxns	639606
In-Fusion™ PCR Cloning Kit	50 rxn/100 rxns	634774/631775
Fusion-Blue™ Competent Cells	22 transformations	636700
	96 transformations	636758
	(96 well plates)	