

In-Fusion™ 2.0 PCR Cloning Kits

원하는 모든 vectors에 어떠한 insert size라도 효율적으로 direct cloning

- Clones PCR fragments up to 12 kb in just minutes
- No PCR fragment purification or restriction digestion required
- Use with Advantage HD DNA Polymerase for superior accuracy and efficiency

Clontech에서는 신개념의 cloning 기술인 In-Fusion PCR Cloning Kits의 2세대 버전인 In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits를 개발하였다. 본 기술을 사용하면 사이즈가 큰 단편을 포함하여 어떠한 PCR 산물이라도 빠르고 효율적이면서 샘플 loss 없이 cloning 할 수 있다. 특히 2세대 기술에서는 별도의 PCR 산물 정제과정 없이 PCR 증폭부터 cloning까지 수행함으로써 시간 및 샘플을 절약할 수 있게 되었다.

기존의 In-Fusion PCR Cloning Kits와 같이 In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits도 연구자가 원하는 vector, linearization site에 상관하지 않고 별도의 ligation 과정 없이 directional cloning이 가능하게 설계되었다. 이런 우수한 cloning 장점은 In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits에서 In-Fusion Enzyme에 새로운 기술인 Cloning Enhancer를 추가함으로써 한층 더 진보되었다. 또한 높은 효율의 Advantage HD DNA Polymerase를 사용하면, 더 길어진 product length 뿐만 아니라 매우 뛰어난 fidelity를 보장하게 되고, In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits에 의해 단 몇 분만에 정확한 방향으로 cloning이 가능하다(그림 1).

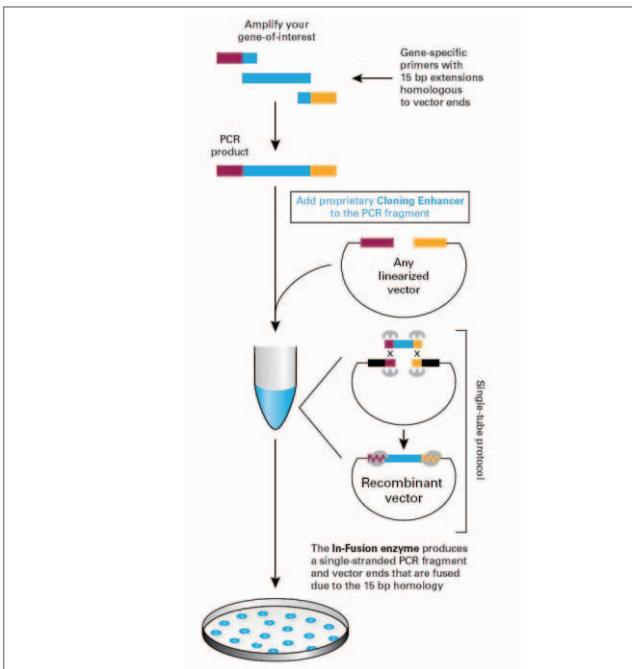


그림 1. The In-Fusion 2.0 cloning protocol.

Advantage HD DNA Polymerase is used to generate an amplified PCR fragment containing your gene of interest (GOI). Following PCR amplification, a 30 min treatment with our proprietary Cloning Enhancer (37°C for 15 min, then 80°C for 15 min) eliminates the need to purify the PCR product using spin columns. After treatment, the heat-inactivated PCR product is ready for a 30 min In-Fusion cloning reaction (37°C for 15 min, then 50°C for 15 min). The lyophilized format requires only the addition of PCR product and linearized vector prior to incubation. During the In-Fusion cloning reaction, the In-Fusion enzyme produces single-stranded regions at the ends of the PCR fragment and vector that are fused together due to the 15 bases of homology. The resulting reaction can be used to transform *E. coli* without further treatment. This simple method is well-suited for cloning a GOI contained within a large PCR fragment.

Subcloning 없이 어떠한 vector에라도 cloning

In-Fusion PCR Cloning Kits를 사용하면 연구자가 원하는 모든 plasmid의 어떠한 절단 부위여도 PCR 단편을 cloning 할 수 있다. In-Fusion cloning 프로세스는 linear DNA fragment가 양말단의 overlapping homology(~15 bp)에서 융합된다. 따라서 vector 말단과 15 bp extensions homologous를 갖는 PCR fragment는 vector와 융합하여 성공적으로 cloning 된다. DNA homology는 목적 DNA fragment를 증폭하기 위해 설계된 primers의 5' 말단에 vector와 overlap 되는 부분을 삽입하면 된다(그림 1). Overlap 되는 서열은 어떠한 서열이든 상관없기 때문에 어떤 PCR fragment라도 cloning하고자 하는 모든 linearized vector의 restriction site에도 cloning 될 수 있으며, dephosphorylation, ligation, blunt-ended polishing 단계 등은 필요하지 않다.

In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits는 PCR insert를 정제하기 위한 별도의 단계가 필요하지 않기 때문에 cloning 과정이 단순하고, cloning 효율이 향상되었을 뿐만 아니라 특히 긴 단편의 cloning까지 가능하다.

개선된 반응으로 다양한 사이즈의 단편을 cloning

In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits는 Advantage HD DNA Polymerase와 함께 사용하여 긴 단편을 cloning할 경우, 기존 In-Fusion cloning에 비해 5배 이상의 cloning 효율을 제공한다. 이 kit를 이용하면 0.5 kb부터 12 kb까지의 모든 단편을 쉽고 효율적으로 cloning 할 수 있다(그림 2).

In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits의 추가적인 장점은 PCR 반응 후에 하나의 tube에서 간단히 one-step cloning할 수 있다는 것이다. PCR 산물은 Cloning Enhancer로 즉시 처리한 후, In-Fusion Cloning reaction에 직접 적용할 수 있다. 별도의 정제과정을 거치지 않기 때문에 샘플 loss를 줄일 수 있고, 300 bp 이하의 작은 단편이나, 5 kb 이상의 큰 단편에서는 매우 유용하다. 이런 간단한 방법은 자동화된 cloning 시스템에 쉽게 적용할 수 있다.

Cloning Efficiency 향상

In-Fusion PCR Cloning은 다양한 사이즈의 PCR fragment를 cloning할 수 있는 검증된 기술이다. 새로운 In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits는 그림 3에 나타난 바와 같이 증폭된 산물의 spin column 정제 단계를 없애, cloning 효율을 높일 수 있다.

보다 좋은 cloning 결과를 위해 Clontech의 신제품인 Advantage HD DNA Polymerase를 사용하여 PCR 반응할 것을 권장한다. Advantage HD DNA Polymerase는 긴 PCR 단편을 cloning할 때 뛰어난 정확성과 높은 수율을 제공한다. 또한, Fusion-Blue™ Competent Cells을 사용하면 In-Fusion 반응의 transformation 효율을 보다 향상시킬 수 있다.

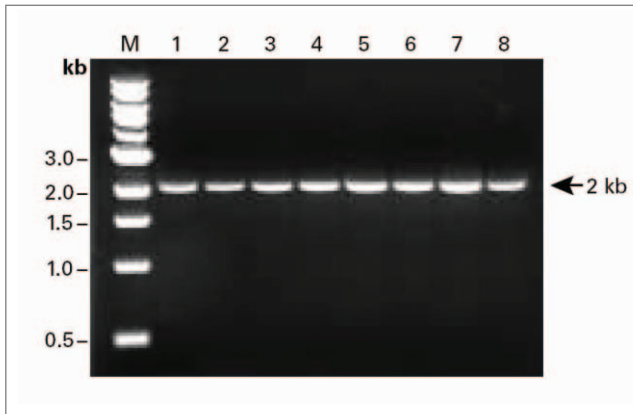


그림 2. Highly efficient cloning of a 12 kb PCR fragment using the In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kit.

A 12 kb PCR fragment was amplified from Adeno-X™ using Advantage HD DNA Polymerase. Following a proprietary Cloning Enhancer treatment, this fragment was combined in an In-Fusion cloning reaction with pDNR-Dual (4.9 kb) that had been prelinearized by digestion with *Sal* and *HindIII*. The In-Fusion reaction was then transformed into Fusion-Blue™ Competent Cells, and transformants were selected on LB/Amp plates. The resulting colonies were picked at random and screened by colony PCR, by amplifying a 2 kb fragment within the expected 12 kb fragment. Eight out of eight, or 100%, of the randomly picked clones contained the desired recombinant plasmid. Lane M : 1 kb DNA ladder molecular weight marker; Lanes 1~8: sampled colonies.

■ 검증된 Technology

Ligation 단계가 필요 없는 In-Fusion Cloning 기술은 가장 간단한 PCR cloning 시스템이며, 이는 자동화 시스템에도 적용이 가능하다. In-Fusion Cloning System은 Harvard Medical School(3), Stanford University(4, 5) 및 여러 연구소에서 수행중인 high-throughput cloning 프로젝트에 성공적으로 적용되고 있다. 새로운 In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits는 In-Fusion 제품 시리즈에서도 특징적인 제품으로, 빠르고 쉬우면서도 비용이 저렴한 cloning 방법이다. 12 kb 정도의 insert 단편을 어떠한 linearized vector에라도 효과적이고 고르게 cloning할 수 있다(6). In-Fusion 2.0 PCR Cloning Kits는 빠르고 효율적인 cloning이 필요한 모든 lab에 최적인 시스템이다.

Reference

1. In-Fusion™ PCR Universal Cloning Kits. (October 2005) Clontechiques XX(2):16~17.
2. Advantage® HD DNA Polymerase Mix. (October 2006) Clontechiques XXI(3):9.
3. Marsischky, G. & LaBaer, J. (2004) Genome Res.14(10B):2020~2028.
4. National Human Genome Research Institute Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) : www.genome.gov/10005107.
5. Hartman S., Trinklein N., et al. (January 2005) Clontechiques XX(1):26~27.
6. Lu, Q. (2005) Trends Biotechnol. 23(4):199~207.

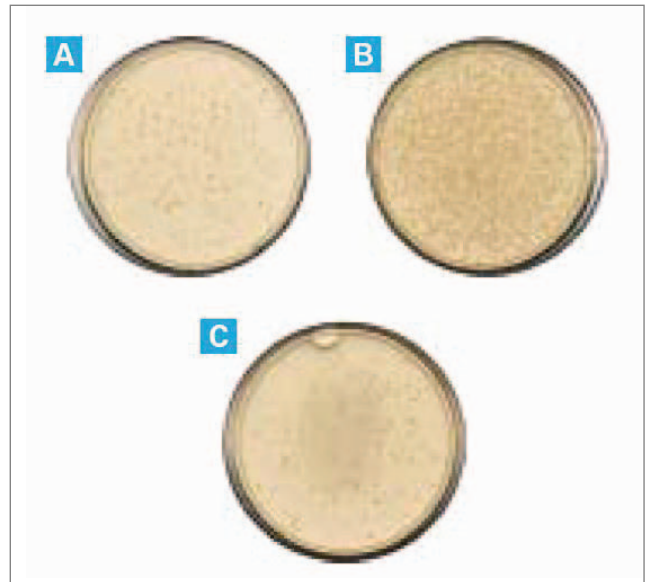


그림 3. In-Fusion 2.0 PCR cloning eliminates the need for spin column purification and provides superior cloning efficiency.

A 2 kb DNA fragment was amplified from Adeno-X using Advantage HD DNA Polymerase, and cloned into pDNR-Dual using the following three methods: Panel A. The amplified 2 kb fragment was spin column-purified and then cloned into pDNR-Dual via an In-Fusion Dry-Down reaction. Panel B. The amplified 2 kb fragment was purified using our proprietary Cloning Enhancer and then cloned into pDNR-Dual via an In-Fusion Dry-Down reaction. Panel C. The amplified 2 kb fragment was cloned into pDNR-Dual via an In-Fusion Dry-Down reaction without any prior treatment. Equivalent volumes of each In-Fusion reaction were transformed into Fusion-Blue Competent Cells and transformants were selected on LB/Amp plates. The Cloning Enhancer-treated sample (Panel B) yields significantly more recombinant clones (fivefold more) than that obtained using spin column purification (Panel A), which shows improvement over the untreated sample (Panel C).

제품명	Size	TaKaRa Code
In-Fusion 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit	8 rxns	639609
In-Fusion 2.0 CF Dry-Down PCR Cloning Kit*	24 rxns	639607
	96 rxns	639608
Fusion-Blue Competent Cells	24 rxns	636700
	96 rxns	636758
Advantage HD DNA Polymerase	200 rxns	639241

* Competent cells not included.

In-Fusion 2.0 Dry-Down PCR Cloning Kit의 구성요소

- pDNR-CMV (linearized control)
- 1.1 kb Unpurified Control Insert
- Cloning Enhancer
- In-Fusion Dry-Down Reactions (8 rxns, 24 rxns, or 96-well plate)
- Fusion-Blue™ Competent Cells (8 rxn size only)