



최고의 One-Step PCR Cloning 시스템

In-Fusion™ 2.0 Cloning System

이론적으로 PCR Cloning Kit는 다양한 사이즈의 PCR 단편들을 신속하고 간편하게 cloning할 수 있도록 설계된 kit이며, 불필요한 base-pair 추가 또는 부가적인 sub-cloning 작업없이 원하는 construct를 정확하게 만들 수 있어야 한다.

In-Fusion™ PCR Cloning 시스템은 이러한 필요에 의해 디자인 되었으며, 모든 cloning 실험을 위한 universal kit로 사용할 수 있다.

본 고에서는 In-Fusion™ 2.0 PCR Cloning Kit와 타사 PCR Cloning Kit를 이용하여 cloning에서 사용되는 가장 보편적인 size의 PCR fragment를 cloning하여 그 효율을 비교하였다. Cloning을 위해 0.5 kb 에서 6 kb 사이의 단편들을 증폭하였고, 각 cloning kit의 제조사에서 추천하는 방법으로 cloning하였다.

Simplified Cloning Strategy

In-Fusion™ 2.0 PCR cloning kit와 그 성능을 비교하기 위해 두 회사의 kit를 선정하였다. 하나는 blunt end PCR 산물을 pcDNA 3.1 vector에 directional 하게 삽입할 수 있는 Invitrogen의 pcDNA™ 3.1 Directional TOPO® Expression Kit이고, 다른 하나는 blunt end PCR 산물을 direction에 상관없이 삽입하는 Stratagene의 StrataClone Ultra™ Blunt PCR Cloning Kit이다. 두 Kit 모두 vaccinia virus에서 유래한 topoisomerase I 효소 활성을 이용한다. StrataClone Ultra kit는 bacteriophage P1의 Cre recombinase 활성도 필요하다. 이 효소는 두 개의 loxP 인식서열 사이의 재조합반응을 촉매하여 topoisomerase I을 이용하여 linear된 vector를 원형화 시킨다. 그림 1에서는 이러한 cloning 과정과 In-Fusion cloning 과정을 비교하여 모식화하였다. In-Fusion에서 사용되는 vector는 linearization 외에 어떠한 처리도 필요하지 않으며, 어떠한 vector도 사용 가능하다. 본 실험에서는 target vector로 Creator™ Cloning 시스템을 구성하는 pDNR-Dual Vector를 사용하였다.

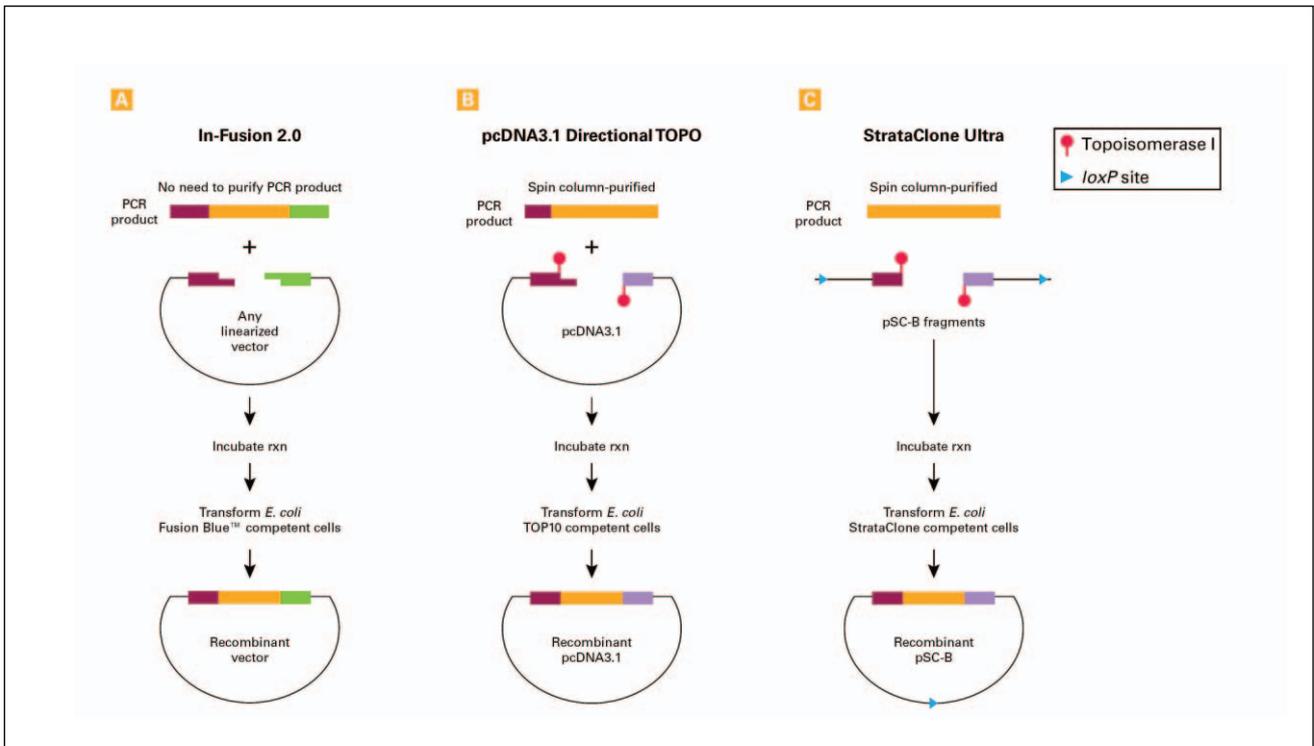


그림 1. Comparison of Clontech, Invitrogen, and Stratagene PCR cloning methods. Panel A, Clontech's In-Fusion™ 2.0 cloning method may be used with any linearized vector. The PCR product is amplified with primers that contain 15 bp extensions homologous to the ends of the linearized vector. Panel B, pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit cloning method from Invitrogen. The PCR product is amplified with a forward primer containing a 5' CACC extension. Panel C, Stratagene's StrataClone Ultra™ Blunt PCR Cloning Kit method. No primer extensions are required and cloning is not directional. The linear vector arms, in combination with the insert, are circularized by Cre recombinase after transformation into the StrataClone Competent Cells. The Invitrogen pcDNA3.1 and Stratagene vector arms are charged with topoisomerase I.

Benefits of the In-Fusion™ Cloning System

In-Fusion™ Cloning System과 비교된 다른 PCR Cloning kit들은 모두 빠른 cloning이 가능하다. 하지만, In-Fusion™ Cloning System은 다른 cloning kit와 비교하여 여러 가지 독특한 장점을 가지고 있다.

첫째, 어떠한 vector로도, 어떠한 부위로든 삽입이 가능하여 one-step으로 원하는 clone의 생성이 가능하다. 예를 들어, insert에 원하지 않는 base pair의 추가없이 N- or C-terminal tags와 프레임이 맞도록 cloning 할 수 있어 단백질 구조 유전체 연구에 적합하다. 둘째, 정확히 원하는 clone을 만들기 위한 추가적인 subcloning이 필요하지 않다. 셋째, In-Fusion™ 2.0 PCR Cloning Kit에 제공되는 cloning enhancer를 PCR product에 처리하는 것이 cloning 하기 전에 필요한 단계의 전부이다. 더 이상 gel 또는 spin-column 정제가 필요하지 않다.

Superior Cloning Efficiency for a Range of Insert Lengths

그림 1에 모식화된 실험방법을 이용하여 각 cloning kit로 cloning하기 위한 PCR insert를 합성하였다. 0.5 kb, 1 kb, 2 kb, 4 kb, 6 kb의 단편들을 증폭하였다(그림 2). In-Fusion™ 2.0 PCR Cloning Kit와 pcDNA3.1 Directional TOPO Expression Kit를 이용한 directional cloning은 목적에 맞게 insert fragment 증폭용 primer에 필요 서열을 추가해서 합성해야 한다. 높은 증폭 효율과 뛰어난 정확도 추가된 insert 길이를 고려하여 각 PCR 단편들은 Advantage® HD Polymerase를 이용하여 합성한 후 각 kit에 해당되는 실험 방법으로 처리하였다. Invitrogen과 Stratagene cloning kit는 insert를 정제하기 위해 spin-column을 사용하였다. In-Fusion™ 2.0 PCR Cloning Kit는 새로 개발된 Cloning Enhancer를 사용하여 PCR 산물을 처리하기 때문에 별도의 spin-column 정제가 필요하지 않다. Vector와 insert의 비율과 vector의 양은 각 Cloning kit의 실험방법에 따라 사용하였다.

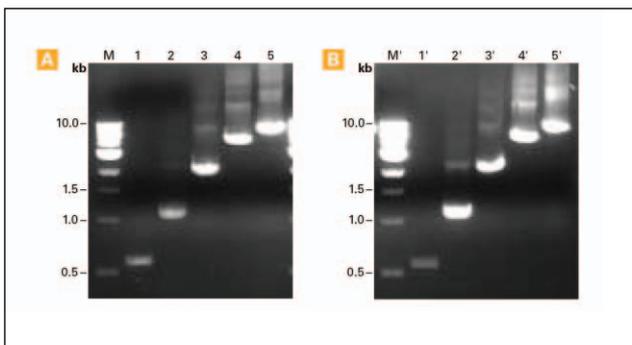


그림 2. PCR fragments amplified for comparison cloning. Fragments of 0.5 kb, 1 kb, 2 kb, 4 kb, and 6 kb were amplified using Advantage® HD polymerase. Panel A, PCR inserts generated for the In-Fusion™ 2.0 and Stratagene cloning. (Note that these inserts include the 15 bp homology extensions for In-Fusion cloning into pDNR-Dual. These extensions have no impact on Stratagene's cloning method.) Panel B, PCR inserts generated for Invitrogen cloning with the included CACC addition to the forward primer for directional cloning. 25 ng of linearized pAdeno-X was used as template for these PCR products. 1 µl of a 10 µM solution of each primer was used per 50 µl PCR reaction. Lanes M and M' : 1 kb ladder molecular weight markers; Lanes 1 and 1' : 0.5 kb fragment; Lanes 2 and 2' : 1 kb fragment; Lanes 3 and 3' : 2 kb fragment; Lanes 4 and 4' : 4 kb fragment; Lanes 5 and 5' : 6 kb fragment. The StrataClone Ultra method has no particular primer design criteria and thus any PCR product could be cloned. For this method, we chose to clone the same PCR product that was generated for the In-Fusion Cloning method.

Cloning 효율을 비교한 결과, cloning한 PCR 단편 길이에 상관없이 In-Fusion™ 2.0 Cloning Kit를 사용한 test에서 가장 많은 clone이 생성된 것을 확인할 수 있었다(표 1).

In-Fusion™ 2.0 cloning 방법은 타사의 cloning 방법과 비교했을 때 어떠한 길이의 단편이라도 많은 수의 colony를 형성하였고, 따라서 최소한의 스크리닝으로 원하는 insert를 가지고 있는 clone을 찾아낼 수 있는 가능성이 가장 높다. 이러한 사실은 타사의 방법과 비교하여 In-Fusion 방법을 사용하였을 때 insert가 올바르게 cloning 되었음을 보여주는 스크린 실험을 통해 확인할 수 있다(표 2).

표 1 : Transformation Efficiency (Number of Colonies)¹

PCR Insert Size (kb)	In-Fusion™ 2.0 (1/10 Transformation Plated)	Stratagene (1/10 Transformation Plated)	Invitrogen (Whole Transformation Plated)
0,5	~ 950	19	236
1,0	~1,600	11	164
2,0	~1,570	20	~540
4,0	~1,050	18	298
6,0	~1,480	57	101

¹ The numbers of colonies generated for the indicated inserts are shown. Note that for the In-Fusion™ 2.0 and the StrataClone products, only 1/10 of the total transformation mixes were plated. For the Invitrogen product, the entire transformation was plated.

표 2 : Ratio of Plasmids Containing the Correct Insert¹

PCR Insert Size (kb)	In-Fusion™ 2.0		Stratagene		Invitrogen	
	Ratio	%	Ratio	%	Ratio	%
0,5	8/8	100	4/8	50	6/8	75
1,0	8/8	100	0/8	0	4/8	50
2,0	8/8	100	4/8	50	0/8	0
4,0	8/8	100	0/8	0	6/8	75
6,0	4/8	50	3/8	37,5	0/8	0

¹ The ratio and percent of positive inserts relative to the number of clones sampled for each of the three products are shown. The orientation of the clones for the nondirectional StrataClone method was not determined.

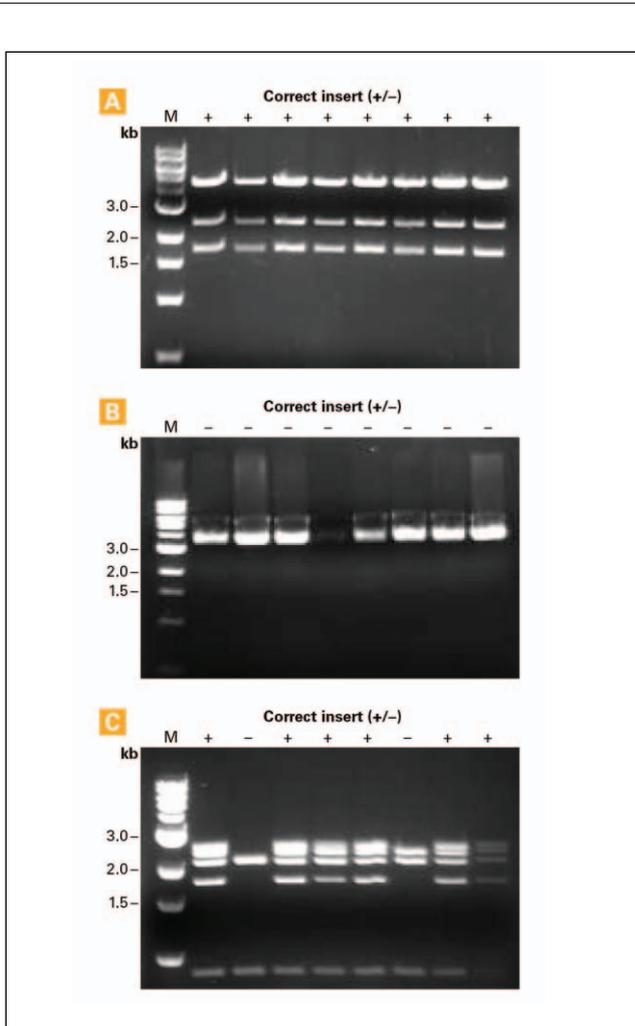


그림 3. Identification of clones containing the correct insert. The results for the 4 kb insert are shown here as representative. Eight randomly selected clones from each cloning method were digested with the restriction enzymes *Hind* III and *Sal* I to determine if the correct insert was present, (*Hind* III and *Sal* I sites were introduced in the 5' and 3' PCR primers.)

Panel A, Clontech's In-Fusion™ 2.0 Cloning System,

Panel B, Stratagene's StrataClone cloning system,

Panel C, Invitrogen's Directional Topo cloning system,

The ratios of positive clones were as follows : In-Fusion™ 2.0 : 8/8, StrataClone : 0/8, Invitrogen : 6/8, Lane M : 1 kb ladder molecular weight markers.

스크리닝은 무작위로 선별된 clone들 중에 0.5 kb ~ 1 kb insert는 PCR을 이용하였고, 2 kb, 4 kb, 6 kb insert는 plasmid DNA 정제 후에 제한효소를 처리하여 확인하는 방법으로 진행하였다. 4 kb insert를 스크리닝한 결과, In-Fusion™ 2.0 방법을 사용하였을 때 100%의 Cloning 효율을 나타냈다(그림 3).

전체적으로 테스트한 결과, insert 길이에 상관없이 In-Fusion™ 2.0 Cloning system을 사용하였을 때 cloning 효율이 매우 높고 안정적이었다.

In-Fusion™ 2.0 Cloning Kit는 다양한 길이의 PCR 단편을 cloning할 때 매우 편리하면서도 다재 다능한 cloning방법이다. In-Fusion™ Cloning은 간단하게 cloning하고자 하는 linearization vector 양쪽 말단 15 bp의 sequence를 insert 합성용 primer에 추가해주면 된다. In-Fusion™ Cloning은 전적으로 directional cloning을 위한 vector와 insert의 homology에 의존하며, insert와 vector의 종류에는 민감하지 않다.

In-Fusion™ Cloning은 다양한 사이즈의 PCR 단편을 합성할 때 어려움을 최소화하고 더 나아가 정확한 clone을 만들기 위해 Advantage® HD Polymerase Mix와 함께 사용할 것을 권장한다.

In-Fusion™ 2.0 Dry- Down PCR Cloning kit Components

- pDNR-CMV (linearized control)
- 1,1kb 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)

Product	Size	Cat.No
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
Advantage® HD Polymerase Mix	200 rxns	639241

※ 본문 중 제품에 해당하는 라이선스 확인사항은 [License Notice] 참조 (1), (21), (23), (26)