

혁신적인 directional 클로닝 방법

In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kits

- 빠르고 쉽게 PCR 산물을 directional 클로닝
- 어떤 형태든 어떠한 벡터라도 정확히 클로닝
- 제한효소, ligase, phosphatase가 필요 없음

In-Fusion PCR Cloning Kits는 PCR로 증폭한 insert(insert)를 제한효소로 처리하여 선형화(linearized)된 어떠한 벡터에라도 30분 정도면 클로닝할 수 있다^{1, 2)} (그림 1). 새롭게 출시된 In-Fusion Advantage PCR Cloning Kits는 NucleoSpin Columns 또는 Cloning Enhancer가 포함되거나 또는 포함되지 않은 형태로 되어 있어서, 클로닝 전에 PCR 산물을 가장 적합하게 처리할 수 있는 방법을 선택할 수 있다. 또한 다양한 용량과 형태로 제품이 구성되어 있어, 자신의 실험 목적에 따라 PCR 클로닝 반응을 최적화 할 수 있다. 사용할 벡터가 준비되지 않은 경우라면, 형광단백질을 융합하거나 재조합 단백질 정제용 6xHN tags이 있는 다양한 In-Fusion Ready Prelinearized Vectors를 선택할 수 있다^{3, 4)} (pAcGFP1-C In-Fusion Ready Vector, In-Fusion Ready BacPAK vector set 등). 또한 PCR 클로닝에 최적화된 Fusion-Blue Competent Cells을 사용하면 클로닝 효율을 극대화할 수 있다.

■ 기존 클로닝 시스템의 한계를 뛰어넘다!

In-Fusion PCR Cloning 시스템은 다른 클로닝 시스템에서는 보기 어려운 몇 가지 독특한 장점을 갖고 있다(표 1). In-Fusion을 사용하면, 하나 또는 그 이상의 insert를 선형화된 벡터의 어떠한 위치에라도 클로닝할 수 있고, 단일 스텝으로 원하는 컨스트럭트를 만들 수 있다.

In-Fusion 방법은 A-overhangs의 유무에 영향을 받지 않기 때문에, PCR 산물을 증폭할 때 fidelity가 높은 thermostable DNA polymerase를 사용할 수 있다. 하지만 최상의 결과를 얻기 위해서는 fidelity 매우 높은 Advantage HD Polymerase Mix 또는 PrimeSTAR HD DNA polymerase를 사용하는 것을 권장한다.

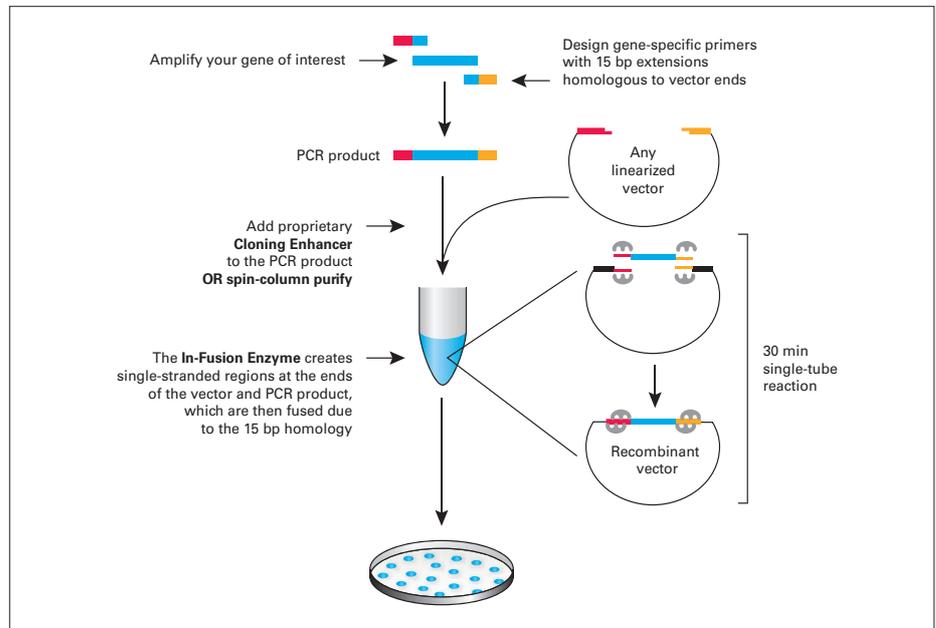


그림 1. The In-Fusion Advantage Cloning Protocol. A thermostable, high-fidelity DNA polymerase and gene-specific primers are used to generate a PCR product containing a gene of interest with 15 bp extensions homologous to the ends of vector. The PCR product is either treated with Cloning Enhancer or spin column-purified, and combined with the vector in a 30 min In-Fusion Advantage cloning reaction. The cloning reaction is then used to transform *E. coli*.

표 1. In-Fusion PCR Cloning vs. 기존 클로닝 시스템

기존 클로닝 시스템의 제한점	In-Fusion Advantage 클로닝 시스템
<ul style="list-style-type: none"> • 벡터 선택이 제한적 • 키트에 따라 다른 벡터 사용 • 키트에 포함된 벡터만 사용 	<ul style="list-style-type: none"> • PCR 산물을 선형화된 어떠한 벡터에라도 클로닝 가능 (PCR 산물은 벡터의 양말단 서열과 15bp homology)
<ul style="list-style-type: none"> • 제한효소 처리 및 ligation이 필요 • 벡터와 insert의 제한효소 서열을 맞춰야 함 • 사용할 수 있는 제한효소 사이트가 한정적 	<ul style="list-style-type: none"> • 제한효소 처리나 ligation이 불필요 • PCR 산물 내의 제한효소 사이트에 의해 클로닝이 영향받지 않음
<ul style="list-style-type: none"> • 복잡한 컨스트럭트는 서브클로닝이 필요 	<ul style="list-style-type: none"> • 서브 클로닝이 불필요
<ul style="list-style-type: none"> • 시간이 많이 소요되고, 각각의 조정을 통한 복수의 클로닝 	<ul style="list-style-type: none"> • 단지 30분의 반응으로 복수의 PCR 산물을 원하는 벡터에 클로닝 가능
<ul style="list-style-type: none"> • 긴 insert의 경우 클로닝 효율이 낮음 • 가능한 insert 사이즈가 제한적 	<ul style="list-style-type: none"> • In-Fusion 시스템은 12 kb 까지의 insert DNA를 효율적으로 클로닝 (표 2, 표 3 참조)
<ul style="list-style-type: none"> • Nondirectional 클로닝의 경우에는 insert 방향 검증을 위해 컨스트럭트 스크리닝 필요 	<ul style="list-style-type: none"> • In-Fusion 시스템은 directional 클로닝이고, insert는 원하는 방향으로 위치
<ul style="list-style-type: none"> • 원하지 않는 base pairs가 최종 컨스트럭트에 삽입되는 경우가 생김 	<ul style="list-style-type: none"> • 원하지 않는 base pairs의 삽입 없이 정확한 클로닝
<ul style="list-style-type: none"> • 중형, 대형 스케일의 클로닝에 적합하지 않음 	<ul style="list-style-type: none"> • In-Fusion 클로닝 기술은 자동화하기 적합함

continued...

클로닝 효율을 높이기 위한 PCR 산물의 정제 방법으로는 클로닝에 앞서 Cloning Enhancer를 사용하거나 NucleoSpin Extract II로 스피너 컬럼 정제하는 방법을 선택할 수 있다. Cloning Enhancer를 사용하면 백그라운드 주형 DNA를 제거하여, 별도의 PCR insert 정제 단계가 필요 없다.

In-Fusion Enzyme의 독특한 end-joining 능력으로 ligase나 제한효소 없이 클로닝이 가능하고, 불필요한 base가 추가되지 않고 정확한 클로닝 결과를 얻을 수 있다.

■ 어떤 insert, 어떤 벡터도 가능

In-Fusion 클로닝은 어떠한 PCR 단편이라도 선형화된 모든 벡터에 클로닝이 가능하며, 이때 인서트 양말단은 선형화된 벡터의 말단 서열과 15 bp homology를 가져야 한다. 이 homology 영역은 타겟 DNA를 증폭하기 위해 프라이머를 디자인할 때 프라이머의 5' 말단에 목적하는 벡터 서열을 삽입하면 된다. Clontech의 홈페이지에서는 In-Fusion용 프라이머 디자인 프로그램을 제공하고 있기 때문에 이를 사용하면 편리하게 프라이머를 디자인 할 수 있다 (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/>).

벡터의 선형화는 PCR 또는 제한효소로 처리하거나, Clontech의 pre-linearized In-Fusion Ready Vectors를 직접 사용할 수 있다.

제한효소가 필요 없는 자동화된 클로닝을 원한다면, PCR 증폭으로 선형화된 벡터를 준비하는 것을 추천한다⁵⁾. 벡터의 선형화 이외에 벡터에 어떠한 처리도 필요하지 않다.

■ 다양한 사이즈에 대한 탁월한 클로닝 효율

In-Fusion 클로닝 시스템의 장점을 증명하기 위해서, In-Fusion PCR Cloning Kits와 타사의 PCR cloning kits를 이용하여 다양한 사이즈의 클로닝을 비교하였다. 각각의 insert 사이즈에 대한 클로닝 효율을 비교할 결과, In-Fusion Cloning Kits가 PCR 산물 (insert)의 길이에 상관없이 많은 수의 클론을 생성하여 그 우수한 성능을 확인할 수 있었다^{6), 7)}(표 2). 또한, 이를 상세 분석한 결과, 높은 클로닝 효율은 물론 정확한 클론에 대한 비율도 높음이 확인되었다^{6), 7)}(표 3).

■ 소형 및 high-throughput 적용

In-Fusion 클로닝 시스템은 PCR 클로닝을 위한 가장 탄력적인 방법으로, 자동화 클로닝 시스템 적용에도 적합하다. In-Fusion 시스템은

표 2. Transformation 효율 (Number of Colonies)¹

Insert Size (kb)	In-Fusion ²	A사 S kit ²	B사 T kit
None (control)	5	2	9
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
8.0	800	0	114
12.0	360	0	84

¹ Cloning was performed according to the instructions for each kit, with transformation into the required E. coli cell lines. The numbers of colonies generated for the indicated inserts are shown. Prior to setting up the cloning reactions, PCR fragments between 0.5 kb and 6 kb in size were spin column-purified, and the 8 kb and 12 kb fragments were gel-purified. Because the Cloning Enhancer was used to treat the 0.5 kb 6 kb PCR inserts for use with the In-Fusion PCR Cloning Kit, there was no need to purify these inserts. All of the transformants were plated on LB/Amp plates^{6), 7)}.

² For the In-Fusion and S kit products, only 1/10 of the total transformation mixes were plated for the 0.5 kb, 1 kb, 2, kb, 4 kb, and 6 kb insert sizes. For all other fragment sizes and the Directional T kit, the entire transformation was plated.

표 3. 정확한 인서트를 포함하는 플라스미드 비율¹

Insert Size (kb)	In-Fusion		A사 S kit ²		B사 T kit	
	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
8.0	8/8	100	0/0	NA	1/8	12.5
12.0	8/8	100	0/0	NA	0/8	0

¹ The ratio and percentage of positive inserts relative to the number of clones sampled for each of the three products are shown. Screening was performed via PCR on randomly chosen colonies for the 0.5 kb and 1 kb inserts, and by plasmid isolation and restriction digestion for the 2 kb, 4 kb, 6 kb, 8 kb, and 12 kb inserts^{6), 7)}.

² The orientation of the clones for the nondirectional S kit method was not determined. The S Kit was incapable of cloning the 8 kb and 12 kb inserts in our experiments.

Harvard Medical School⁸⁾, Stanford University School of Medicine⁹⁾ 및 University of Oxford¹⁰⁾ 등을 포함한 다양한 high-throughput 클로닝 프로젝트에 사용된 실적이 있다. 액상 타입과 dry-down 타입에 대한 테스트 결과, 소형 스케일이나 high-throughput 에서 동일한 클로닝 효율을 보였다. 또한 2가지 형태 모두 12 kb까지 클로닝이 가능하였다.

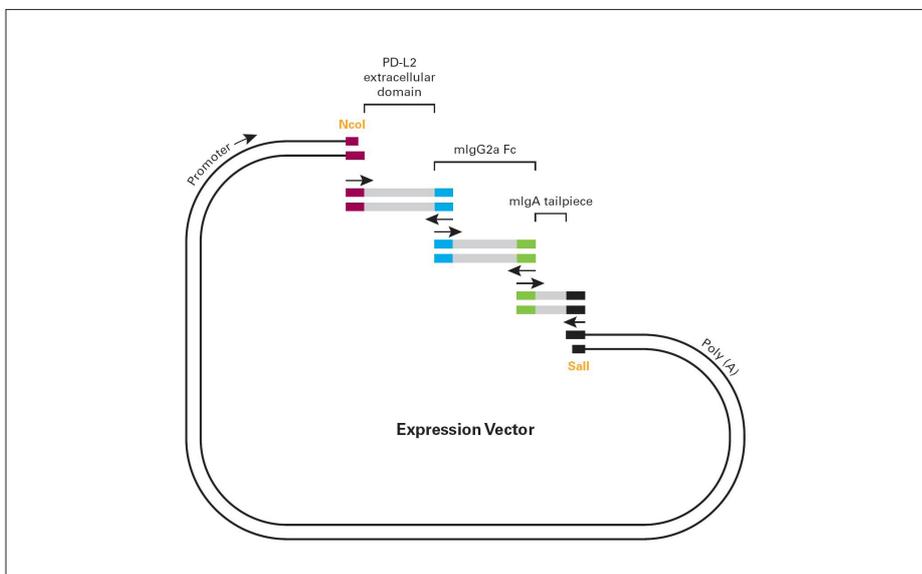
■ In-Fusion을 사용하면 누구나 클로닝 전문가!

In-Fusion 기술은 2개의 DNA 단편뿐만 아니라, 4개의 단편까지 한번의 반응으로 정확하게 클로닝이 가능하다^{11), 12)}. 복수의 PCR 산물을 제한

효소 처리가 필요 없이, 단일 스텝으로 선형화된 벡터에 동시에 클로닝할 수 있다¹³⁾(그림 2). In-Fusion 반응은 새로운 클로닝 가능성을 열어 두었다. 또한 본 시스템을 사용하면, 호환(교환) 가능한 영역을 갖는 기본 발현벡터를 제작할 수 있고, 정확한 융합 단백질 제작, DNA 단편 제거 또는 치환, point mutation 삽입, 내부형광 융합단백질 제작, 유전자의 tags를 교환하는 것 등이 가능하다^{11), 13)}. In-Fusion은 다양한 사이즈의 복수의 인서트라도 빠르고 편리하게 클로닝할 수 있기 때문에, 기존 클로닝 시스템에서 제한되었던 클로닝을 현실화 할 수 있다.

혁신적인 directional 클로닝 방법
In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kits

continued...



Primers for PCR Amplification of the PD-L2 Extracellular Domain, IgG2a Fc, and IgA Tailpiece

* PD - L2 Extracellular Domain with 15 bp Overlaps to NcoI-Digested Vector and IgG2a Fc, 693 bp PCR Product

Sense (NcoI site is underlined)
5' - TTCAAATCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTAT-3'
Antisense
5' - CTTGATTGTGGGCCCTCTGGGGACTTTGGGTTCCATCCGA-3'

* IgG2a Fc, 678 bp PCR Product

Sense
5' - GGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTC-3'
Antisense
5' - CCGGGAGAAGCTCTTAGTC-3'

* IgA Tailpiece with 15 bp Overlaps to IgG2a Fc and Sall-Digested Vector, 100 bp PCR Product

Sense
5' - AAGAGCTTCTCCCGGCTGTCGGGTAACCCACCAATGTCAG-3'
Antisense (Sall site is underlined)
5' - AGTAACGTTAGTCGACTCAGTAGCAGATGCCATCTC-3'

그림2. Seamless construction of a three-domain immunoglobulin fusion protein with a four-piece In-Fusion reaction. Segments were generated by PCR using primers that contained a 15 bp overlap with the adjacent segment, and 20-30 bp of segment-specific sequence. Colored regions indicate overlap regions with 15 bp of identity. Arrows indicate PCR primers. The segments were joined to a NcoI-Sall-digested expression vector in a ligase-free In-Fusion reaction.

■ In-Fusion 시스템 제품

제품명	형태	용량	Cloning Enhancer Included	Spin Columns Included	TaKaRa Code
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit	Liquid	10 rxns			639619
	Liquid	50 rxns			639620
	Liquid	100 rxns			639621
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/Cloning Enhancer	Liquid	10 rxns	Yes		639616
	Liquid	50 rxns	Yes		639617
	Liquid	100 rxns	Yes		639618
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin	Liquid	10 rxns		Yes	639622
	Liquid	50 rxns		Yes	639623
	Liquid	100 rxns		Yes	639624

■ 참고문헌

1. In-Fusion™ PCR Universal Cloning Kits. (October 2005) *Clontechniques* XX (2):16-17.
2. In-Fusion™ 2.0 CF Liquid PCR Cloning Kits. (April 2008) *Clontechniques* XXII (2):20-21.
3. Fluorescent Protein Vectors. (April 2008) *Clontechniques* XXIII (2):11-14.
4. In-Fusion™ Ready BacPAK Vector Set. (July 2006) *Clontechniques* XXI (2):16-17.
5. Benoit, R. M. *et al.* (July 2006) *Clontechniques* XXI (2):21-22.
6. Superior One-Step Cloning of PCR Fragments into Any Vector with the In-Fusion 2.0 Cloning System. (April 2007) *Clontechniques* XXII (2):13-15.
7. Efficient Cloning of Long PCR Inserts with the In-Fusion PCR Cloning System. (April 2007) *Clontechniques* XXII (2):16-17.
8. Marsischky, G. & LaBaer, J. (2004) *Genome Res.* 14 (10B):2020-2028.
9. Hartman, S. *et al.* (January 2005) *Clontechniques* XX (1):26-27.
10. Berrow, N.S. *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.* 35 (6):e45.
11. Zhu, B. *et al.* (2007) *BioTechniques* 43 (3):354-359.
12. In-Fusion™ PCR Cloning Kits-FAQs (July 2007) *Clontechniques* XXII (3):22-24.
13. Design Genes with Ease Using In-Fusion™ Cloning. (April 2008) *Clontechniques* XXIII (2):22-24.

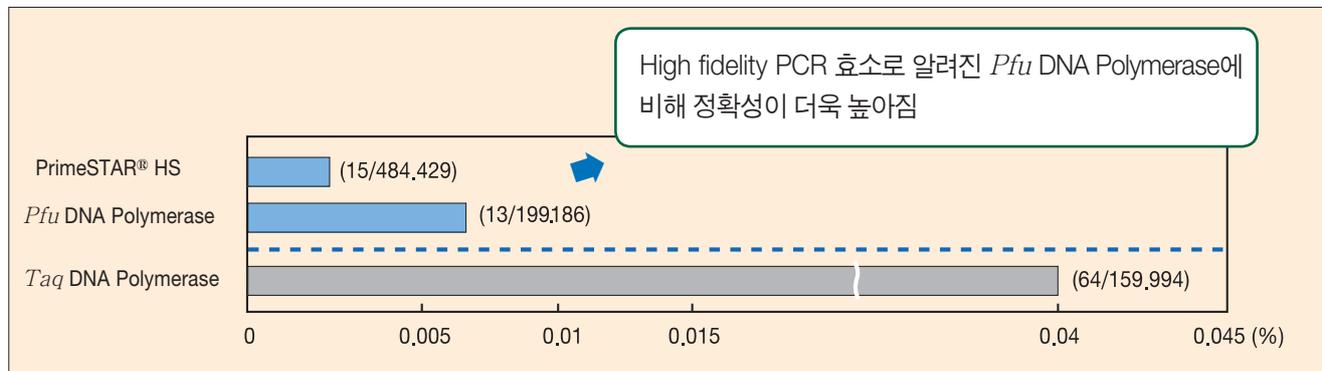
* License Notice: [11]

PrimeSTAR는 *Pfu*가 아닙니다! *Pfu*보다 더 정확한 Polymerase!

PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase

- Top 클래스의 높은 Fidelity
 - *Pfu* polymerase 보다 정확한, High Fidelity PCR 효소 중 No.1
- High Fidelity PCR 효소 중 가장 높은 증폭 효율
 - 3'→5' exonuclease 활성이 있는데도 *Taq* 보다 높은 증폭 효율
- Library로부터 복수 clone을 PCR, cDNA cloning
 - 하나의 반응 조건에서 다양한 길이의 타겟 증폭
- 높은 priming 효율, 항체를 첨가한 Hot Start PCR
 - 특이성 높은 증폭 가능

PrimeSTAR[®] HS 및 각종 PCR 효소의 정확성 비교



에러율 산출 방법 :

GC rich로 비교적 변이가 들어가기 쉬운 *Tth* 게놈 DNA를 주형으로 임의로 선택한 10 종류의 영역을 PCR 증폭 후, 각각을 벡터에 클로닝하여 각 서열에 대해 복수 클론을 픽업하고 sequencing을 실시하여 에러율을 확인하였다.

PrimeSTAR[®] HS는 sequencing한 총염기수 484,429 base에 대해 에러는 불과 15 염기만 나타났다. 이 결과는 High Fidelity PCR 효소로 잘 알려진 *Pfu* DNA Polymerase의 정확성을 크게 상회하는 것이다.

TIP!

일반적인 *Taq* 의 에러 발생율이 얼마인지 아시나요?

그렇다고 3'→5' exonuclease 활성 (Proofreading)이 있다고 완벽할 수는 없습니다!

PCR 후 expression용 cloning, site directed mutagenesis, mutation detection 등을 계획한다면, 반드시 사용하는 polymerase의 fidelity를 따져 보세요.