

혁신적인 directional cloning 기술

In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit

DNA Cloning은 insert와 plasmid vector를 제한효소로 절단한 후 ligase로 연결하는 것이 보편적이다. 따라서, plasmid vector와 insert의 제한효소 자리가 중복이 되거나 없어 곤란한 경우가 종종 발생한다. 또한, 제한효소에 따라 ligation 효율이 달라지기도 하며, 부득이하게 부가적 서열을 삽입하여야 하는 경우도 있다. Clontech의 **In-Fusion Cloning system**은 이러한 기존의 cloning 방법의 제한을 극복하고 두 개의 linear DNA (insert와 plasmid vector)를 편리하고도 효율적으로 Cloning 할 수 있다. 본 system은 제한효소와 ligase를 사용하지 않는 대신 연결하고자 하는 두 linear DNA의 말단서열 15 bp가 동일하다면 두 단편을 함께 반응하는 것만으로 ligation을 완료할 수 있다. 일반적으로 동일서열을 만드는 방법은 insert를 PCR 증폭하기 위하여 사용되는 3' 과 5' -primer 말단에 연결하고자 하는 plasmid vector 말단과 동일한 15 bp를 부가적으로 삽입하여 제작한다. 또한, plasmid vector를 선형화 (linearization) 하기 위하여 제한효소를 사용하는 경우가 많은데 이 경우 제한효소로 절단한 말단 서열의 형태 (5', 3' -돌출말단, 평활말단)에 상관없이 때문에 어떠한 제한효소도 사용 가능하여 발현하고자 하는 목적 단백질의 부가적 서열을 최소화할 수도 있으며, 원하는 방향으로 insert를 삽입할 수 있다 (directional cloning).

■ In-Fusion Technology

In-Fusion기작은 ligase에 비의존적이며 독특한 poxvirus DNA polymerase I³⁾의 특성을 이용하였다. 양 말단에 상동서열을 지닌 두 linear ds DNA를 시약과 반응하면 poxvirus DNA polymerase의 3' →5' proofreading 활성으로 3' 말단부터 nucleotides가 제거되고 두 DNA 단편은 상보적으로 결합하게 되며, poxvirus DNA polymerase의 특성으로 인하여 1~5 nucleotide gap이 생기는데, 이는 대장균 (*E. coli*)에 도입되어 수복된다. Clontech의 In-Fusion의 end-joining 특성을 이용하여 4 개의 DNA 단편도 단일 반응으로 결합시킬 수 있음을 확인하였고, point mutant 제작 및 기존 vector로 특정 단편 (항생제 내성 site, promotor, 형광 단백질, 각종 tag 등)을 삽입할 수도 있어 하나의 vector를 이용하여 다양한 생물 종에서 사용할 수 있도록 조작성이 가능하며, 다양한 실험에 대응할 수 있는 plasmid vector로의 개조도 용이하다.

In-Fusion PCR Cloning Kit는 PCR로 증폭한 insert를 제한효소로 처리하여 선형화된 어떠한 벡터에라도 30 분 정도면 cloning 할 수 있다.^{4, 5)} (그림 1). Clontech의 In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit는 **NucleoSpin Column** 또는 **Cloning Enhancer**가 첨부된 형태와 첨부되지 않은 형태로 시판되고 있어, cloning 전 PCR 산물을 가장 적합하게 처리할 수 있는 방법을 선택할 수 있다. 또한, 다양한 용량과 형태로 제품이 구성되어 있어, 자신의 실험 목적에 따라 PCR cloning 반응을 최적화 할 수 있다. 사용할 벡터가 준비되지 않은 경우라면, 형광단백질을 융합하거나 재조합 단백질 정제용 6xHN tag이 있는 다양한 **In-Fusion Ready Prelinearized Vector**를 선택할 수 있다.^{6, 7)} (pAcGFP1-C In-Fusion Ready Vector, In-Fusion Ready BacPAK vector set 등). 또한, PCR cloning에 최적화된 Stellar Competent Cell을 이용하여 cloning 효율을 극대화할 수 있다.

■ 기존 클로닝 시스템의 한계를 뛰어넘다!

In-Fusion PCR Cloning 시스템은 다른 cloning 시스템에서는 보기 어려운 몇 가지 독특한 장점을 갖고 있다 (표 1). In-Fusion을 사용하면, 하나 이상의 insert를 linearized vector의 어떠한 위치에도 cloning할 수 있고, one step으로 원하는 재조합체를 만들 수 있다.

In-Fusion 방법은 A-overhang의 유무에 영향을 받지 않기 때문에 PCR 산물을 증폭할 때 정확도가 높은 thermostable DNA polymerase를 사용할 수 있다. 하지만 최상의 결과를 얻기 위해서는 정확도가 매우 높은 Advantage HD Polymerase Mix (TaKaRa code 639241) 또는 PrimeSTAR HD DNA polymerase (TaKaRa code R010A)를 사용할 것을 권장한다.

Cloning 효율을 높이기 위한 PCR 산물의 정제방법으로는 cloning에 앞서 cloning Enhancer를 사용하거나 NucleoSpin Extract II로 spin-column 정제하는 방법을 선택할 수 있다. Cloning Enhancer를 사용하면 background template DNA를 제거하여, 별도의 PCR insert 정제 단계가 필요 없다.

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

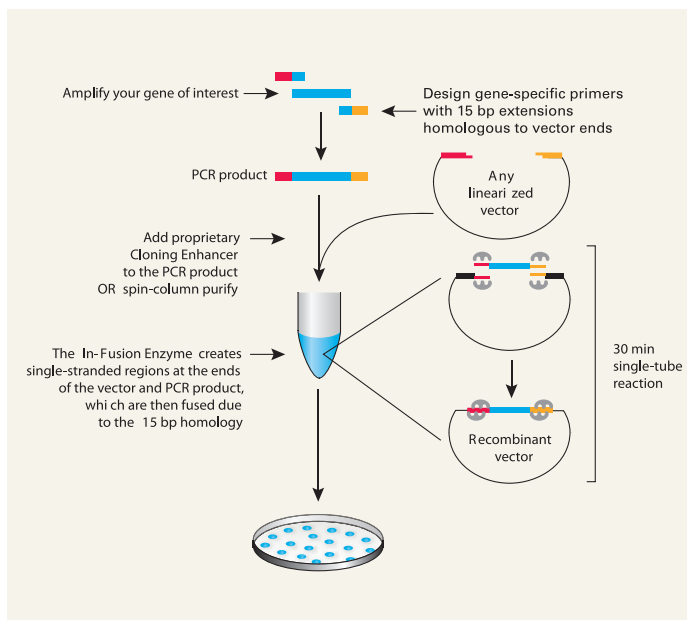


그림 1. The In-Fusion Advantage Cloning Protocol. A thermostable, high-fidelity DNA polymerase and gene-specific primers are used to generate a PCR product containing a gene of interest with 15 bp extensions homologous to the ends of vector. The PCR product is either treated with Cloning Enhancer or spin 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*.

혁신적인 directional cloning 기술

In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit

Continued...

표 1. In-Fusion PCR Cloning vs. General Cloning Systems

In-Fusion Advantage Cloning 시스템	기존 클로닝 시스템의 제한점
• PCR 산물을 선형화된 어떠한 벡터에라도 cloning 가능 (PCR 산물은 벡터의 양 말단 서열과 15 bp homology)	• Vector 선택이 제한적 • Kit에 따라 다른 벡터 사용 • Kit에 포함된 벡터만 사용
• 제한효소 처리나 ligation이 불필요	• 제한효소 처리나 ligation이 필요
• PCR 산물 내의 제한효소 사이트에 의해 cloning이 영향 받지 않음	• Vector와 insert의 제한효소 서열을 맞춰야 함 • 사용할 수 있는 제한효소 사이트가 한정적
• Subcloning이 불필요	• 복잡한 construct는 subcloning이 필요
• 단 30 분의 반응으로 복수의 PCR 산물을 원하는 벡터에 cloning 가능	• 시간이 많이 소요되고, 각각의 조정을 통한 복수의 cloning
• In-Fusion 시스템은 12 kb 까지의 insert DNA를 효율적으로 Cloning(표 2, 표 3 참조)	• 긴 insert의 경우 cloning 효율이 낮음 • 가능한 insert size가 제한적
• In-Fusion 시스템은 directional cloning이고, insert는 원하는 방향으로 위치	• Non-directional cloning의 경우에는 insert 방향 검증을 위해 construct screening 필요
• 원하지 않는 base pair의 삽입 없이 정확한 cloning	• 원하지 않는 base pair가 최종 construct에 삽입되는 경우가 생김
• In-Fusion cloning 기술은 자동화하기 적합함	• 중형, 대형 스케일의 cloning에 적합하지 않음

■ Any Insert, Any Vector 도 가능

In-Fusion cloning은 어떠한 PCR 단편이라도 선형화된 모든 벡터에 cloning이 가능하며, 이때 insert 양 말단은 선형화된 벡터의 말단 서열과 15 bp homology를 가져야 한다. 이 homology 영역은 target DNA를 증폭하기 위해 primer를 디자인할 때 primer의 5' 말단에 목적하는 벡터 서열을 삽입하면 된다. Clontech의 홈페이지에서는 In-Fusion용 primer 디자인 프로그램을 제공하고 있기 때문에 이를 사용하면 편리하게 primer를 디자인 할 수 있다 (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/>).

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

제한효소가 필요 없는 자동화된 cloning을 원한다면, PCR 증폭으로 선형화된 벡터를 준비하는 것을 추천한다⁹⁾. 벡터의 선형화 이외에 벡터에 어떠한 처리도 필요하지 않다.

■ 다양한 사이즈에 대한 탁월한 Cloning 효율

In-Fusion Cloning 시스템의 장점을 증명하기 위하여 In-Fusion PCR Cloning Kit와 타사의 PCR cloning kit를 이용하여 다양한 사이즈의 cloning을 비교하였다. 각각의 insert 사이즈에 대한 cloning 효율을 비교한 결과, In-Fusion Cloning Kit가 PCR 산물 (insert)의 길이에 상관없이 많은 수의 클론을 생성하여 그 우수한 성능을 확인할 수 있었다^{9, 10)} (표 2).

■ 소형 및 high-throughput 적용

In-Fusion Cloning 시스템은 PCR Cloning을 위한 가장 탄력적인 방법으로,

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	80	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 9, 10).

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.

자동화 cloning 시스템 적용에도 적합하다. In-Fusion 시스템은 Harvard Medical School¹¹⁾, Stanford University School of Medicine¹²⁾ 및 University of Oxford¹³⁾ 등을 포함한 다양한 high-throughput cloning 프로젝트에 사용된 실적이 있다. 액상 타입과 dry-down 타입에 대한 테스트 결과, 소형 스케일이나 high-throughput에서 동일한 cloning 효율을 보였다. 또한, 2 가지 형태 모두 12 kb까지 cloning이 가능하였다.

■ In-Fusion을 사용하면 누구나 Cloning 전문가!

In-Fusion 기술은 2개의 DNA 단편뿐만 아니라, 4개의 단편까지 한번의 반응으로 정확하게 cloning이 가능하다^{14, 15)}. 복수의 PCR 산물을 제한 효소 처리가 필요 없이, one step으로 선형화된 벡터에 동시에 cloning 할 수 있다¹⁶⁾. In-Fusion 반응은 새로운 cloning 가능성을 열어 두었다. 또한, 본 시스템을 사용하면 호환 가능한 영역을 갖는 기본 발현벡터를 제작할 수 있고, 정확한 융합 단백질 제작, DNA 단편 제거 또는 치환, point mutation 삽입, 내부 형광 융합단백질 제작, 유전자의 tag 교환 등이 가능하다^{14, 16)}. In-Fusion은 다양한 사이즈의 복수의 insert라도 빠르고 편리하게 cloning할 수 있기 때문에, 기존 Cloning 시스템에서 제한되었던 cloning을 현실화 할 수 있다.

■ 실험예 :

【Construct Design】 Murine (m) PD-L2 의 extracellular domain¹⁷⁾, murine immunoglobulin G2a (IgG2a)의 crystallizable fragment (Fc), 그리고 murine IgA tailpiece^{18, 19)}을 coding하는 DNA 서열을 Sequencher™ 프로그램 (Gene Codes)으로 포유류 발현 vector에 조합되도록 시퀀싱 하였다. 이 실험의 목적은 murine dodecameric immunoglobulin fusion protein을 만드는 것이었다^{18, 19)}. 20~30 bp의 유전자 특이적 서열에 결합될 단편과 overlap되는 15 bp를 넣어 sense와 antisense PCR primer를 디자인하였다 (그림 2와 표 3 참조). 복수의 DNA 단편들은 cloning 반응 동안 In-Fusion Enzyme이 어떠한

혁신적인 directional cloning 기술 In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit

Continued...

nucleotide도 추가하지 않기 때문에 경계선이 없이 결합되었다.
In-Fusion PCR Cloning법을 사용하기 위해 overlapping primer를 디자인하고자 한다면 Clontech의 In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit의 매뉴얼(PT4065-1, www.clontech.co.kr)을 참조하기 바란다. 또한, Clontech은 <http://bioinfo.clontech.com/infusion/>에서 primer 디자인을 위한 online tool을 제공하고 있다.

PCR로 DNA 단편을 증폭할 때는 high-fidelity의 hot start polymerase로 증폭하였으며, PCR 증폭 산물은 gel-purification하여 OD값을 측정하였다. 이 연구에서 기본으로 사용된 vector는 Nco I과 Sal I 을 사용하여 선형화(linearization) 하였지만, 15 bp overhang이 있는 vector는 high-fidelity DNA polymerase로 PCR 증폭해서 만들 수 있다.

In-Fusion 반응은 Clontech의 In-Fusion PCR Cloning Kit의 매뉴얼(www.clontech.co.kr)에 따라 이뤄졌다. 반응은 25~100 ng 사이의 vector를 사용하였고 1 mole vector 당 각각 DNA 단편 2 mole의 비율로 반응하였다. 반응 후 In-Fusion 반응물은 TE buffer로 희석하여 대장균으로 형질전환 하여 정제하고 제한효소로 확인 후 sequencing을 통하여 최종 확인 하였다.

표 3. 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'-TTCAAATCCACCATGGAGACAGACACTCTGCTAT-3'
Antisense	5'-CTTGATTGTGGGCCCTCTGGGGACTTTGGTTCCATCCGA-3'
IgG2a Fc, 678 bp PCR Product	
Sense	5'-GGGCCCAACAATCAAGCCCTGTCTC-3'
Antisense	5'-CCGGGAGAAGCTCTTAGTC-3'
IgA Tailpiece with 15 bp Overlaps to IgG2a Fc and Sall-Digested Vector, 100 bp PCR Product	
Sense	5'-AAGAGCTTCTCCCGGCTGTCTGGGTAACCCACCAATGTCAG-3'
Antisense (Sall site is underlined)	5'-AGTAACGTTAGTCGACTCAGTAGCAGATGCCATCTC-3'

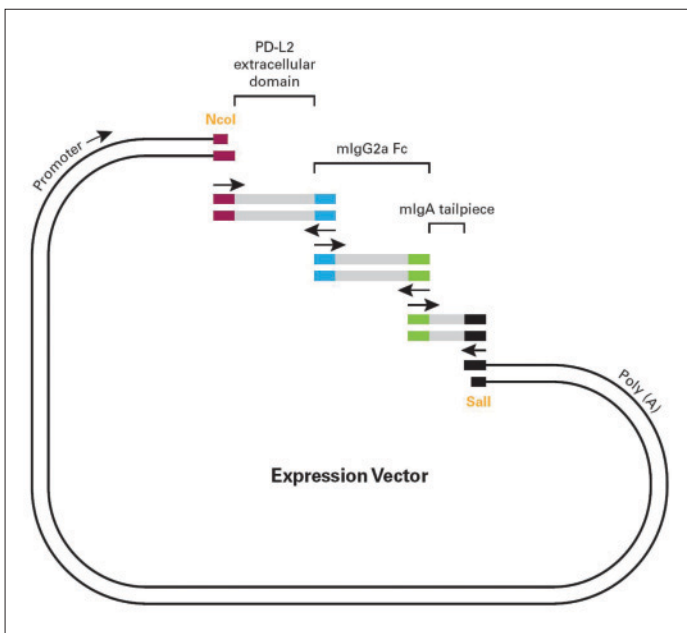


그림 2. Seamless construction of a three-domain immunoglobulin fusion protein with a four-piece In-Fusion reaction. Segments were generated by PCR using primers that contained a 15 bp overlap with the adjacent segment, and 20-30 bp of segment-specific sequence. Colored regions indicate overlap regions with 15 bp of identity. Arrows indicate PCR primers. The segments were joined to a Nco I -Sal I -digested expression vector in a ligase-free In-Fusion reaction.

【Multiple Fragment Cloning 결과】

일반적인 cloning의 가장 큰 제약 사항은 원하는 목적 단백질 이외의 원하지 않는 부가적인 아미노산이 함께 발현되는 것이다. 원하지 않는 아미노산은 구조 변화, 발현 감소, 또는 그 자체가 항원이 되기 때문에 특히 fusion protein과 recombinant antibody에 불리하게 작용한다. clontech은 제한 효소를 사용하지 않고 PD-L2 extracellular domain을 coding하는 DNA와 IgG2a Fc domain, IgA tailpiece, 그리고 DHFR selection cassette를 포함하는 expression vector까지 총 4개를 연결시켜 murine PD-L2-IgG2a Fc-IgA tailpiece fusion protein을 제작하였다. Vector를 선형화하기 위하여 Nco I과 Sal I site를 사용하였고, 선형화된 backbone의 15 bp 상보적 서열 (complementary overhang)을 이용하여 5' 쪽과 3' 쪽 단편을 결합시켰다 (표 3).

Fusion protein domain 사이에는 어떠한 제한 효소도 사용되지 않았다. In-Fusion 기술을 사용하면, insert에 어떠한 제한 효소 처리도 필요로 하지 않기 때문에 증폭되는 부분 내에 있는 Nco I과 Sal I 위치는 cloning을 저해하지 않는다. In-Fusion 반응 후 정제한 DNA는 4 개의 colony에서 분리하여 Nco I + Sal I 제한 효소 처리로 분석되었다. 4 개의 colony에서 모두 4 개의 DNA를 포함하고 있는 것이 확인되었다. 그 후 2개 clone의 염기서열을 분석한 결과, PD-L2-IgG2a Fc-IgA tailpiece fusion을 포함하는 1.5 Kb coding region에서 error가 없는 것이 확인되었다 (표 4). 다음으로 Mlu I 처리를 하여 plasmid를 선형화시키고, DHFR-deficient CHO 세포에 transfection 하여 DHFP 발현을 선별하였다. 결과적으로 정제된 65 kDa fusion protein을 12 mg/liter 얻을 수 있었다 (그림 3). 이 결과는 In-Fusion 기술이 제한 효소 사용 없이도 여러 개의 DNA를 사용하여 고발현의 수용성 재조합 항체 (recombinant antibody)를 생산할 수 있음을 보여주는 것이다.

혁신적인 directional cloning 기술

In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit

Continued...

표 4. Transformation Efficiency of a Four-Piece In-Fusion Reaction

PD-L2 Extracellular Domain	IgG2a Fc	IgA Tailpiece	Vector	Total Transformants	No. Error-Free/No. Sequenced
693 bp 6.1 ng	678 bp, 6.0 ng	100 bp 0.9 ng	11,365 bp 50 ng	120	2/2

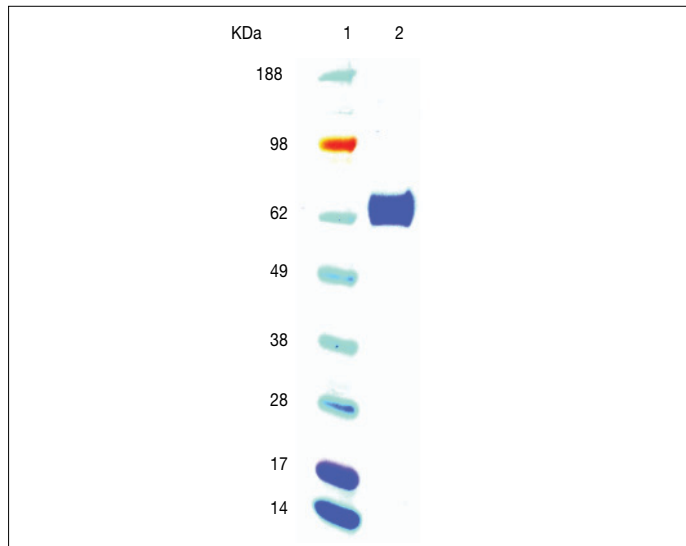


그림 3. Recombinant Antibody Protein Production.
One μ g of purified protein was analyzed using SDS-PAGE under reducing conditions and stained with Coomassie blue.
Lane 1: Protein molecular weight standards with size in kDa indicated.
Lane 2: Murine PD-L2-IgG2a Fc-IgA tailpiece fusion protein.

In-Fusion 시스템 제품

제품명	형태	용량	Cloning Enhancer Included	Spin Columns Included	TaKaRa Code
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/Stellar Competent Cells	Liquid	10 rxns			639629
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/Cloning Enhancer & Stellar Competent Cells	Liquid	10 rxns	Yes		639630
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin & Stellar Competent Cells	Liquid	10 rxns		Yes	639631
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
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin	Liquid	100 rxns	Yes		639618
	Liquid	10 rxns		Yes	639622
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin	Liquid	50 rxns		Yes	639623
	Liquid	100 rxns		Yes	639624

참고문헌

- Evans, D.H, *et al.* (2003) In patent application 20030162265, USA, pp. 1- 52.
- Hamilton, M.D, *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res*, **35**(1):143 - 151.
- Marsischky, G, & LaBaer, J, (2004) *Genome Res*, **14**(10B):2020-2028.
- In-Fusion™ PCR Universal Cloning Kits, (October 2005) *Clontechniques XX* (2):16- 17.
- In-Fusion™ 2.0 CF Liquid PCR Cloning Kits, (April 2008) *Clontechniques XXIII*(2):20-21.
- Fluorescent Protein Vectors, (April 2008) *Clontechniques XXIII* (2):11-14.
- In-Fusion™ Ready BacPAK Vector Set, (July 2006) *Clontechniques XXI* (2):16-17.
- Benoit, R, M, *et al.* (July 2006) *Clontechniques XXI* (2):21- 22.
- 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.
- Efficient Cloning of Long PCR Inserts with the In-Fusion PCR Cloning System, (April 2007) *Clontechniques XXII* (2):16-17.
- Marsischky, G, & LaBaer, J, (2004) *Genome Res*, **14**(10B):2020-2028.
- Hartman, S, *et al.* (January 2005) *Clontechniques XX*(1):26-27.
- Berrow, N,S, *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res*, **35** (6):e45.
- Zhu, B, *et al.* (2007) *BioTechniques* **43**(3):354-359.
- In-Fusion™ PCR Cloning Kits-FAQs (July 2007) *Clontechniques XXII* (3):22- 24.
- Design Genes with Ease Using In-Fusion™ Cloning, (April 2008) *Clontechniques XXIII* (2):22-24.
- Latchman, Y, *et al.* (2001) *Nature Immunol*, **2**(3):261-268.
- Hirano, N, *et al.* (2006) *Blood*, **107**(4):1528 - 1536.
- Arthos, J, *et al.* (2002) *J. Biol. Chem*, **277**(13):11456-11464.

* License Notice : [1]