

PCR - base transfection screening

# Advantage<sup>®</sup> 2 PCR Polymerase

Clontech Laboratories, Inc.

Clontech에서는 특정 genomic DNA 서열을 가지고 있는 많은 클론을 동시에 스크리닝 할 수 있는 한층 더 진보된 새로운 프로토콜을 확립하였다. 단지 100~500 개의 포유동물세포 (mammalian cells)로 구성된 소량의 샘플에서도 genomic DNA 정제과정 없이 단지 짧은 열처리 단계와 원심분리 과정 만으로 PCR을 통해 직접적으로 스크리닝할 수 있다. 특히 이 새로운 프로토콜은 재조합 목적 유전자를 포함하고 있는 안정적인 형질전환체 (transfectant)를 스크리닝 하는데 유용하다. 안정적인 형질전환체의 분리를 위해서는 transfection, 성장, 단일세포 클론 분리 (isolation of single cell colonies), 양성 (positive) 클론 확인 등 다양한 과정이 요구된다.

마지막 단계에서 많은 노동력을 요구하는데 클론은 기능적인 분석 (functional assay) 또는 Western blotting을 이용하여 유전자 발현을 분석해야만 한다. 목적 유전자가 강력하게 발현하는 클론을 확인하기 위해서는 종종 많은 수의 클론 스크리닝을 필요로 하며, 이는 비용이 매우 많이 필요하고 힘들며 시간이 걸리는 과정이다. 발현분석을 위한 클론수를 제한하기 위해서 genomic PCR 이나 RT-PCR을 이용하여 사전 스크리닝을 실행해야만 한다. 그러나 이러한 실험도 많은 수의 개별적인 클론을 키워서 RNA 또는 DNA를 정제하는 과정이 필요하므로 이것 또한 시간과 인력을 필요로 한다.

Bacteria 시스템에서는 핵산 정제과정 없이 콜로니로부터 직접 DNA 단편을 증폭하는 스크리닝 방법이 유용하게 사용되고 있다<sup>1,2)</sup>. 그러나 대부분의 PCR 효소 시스템은 포유동물 세포에서 소량의 개체를 스크리닝을 하기에 충분한 효소 기능을 발휘하지 못한다.

따라서 포유동물 세포의 안정적인 형질전환체를 효율적으로 스크리닝 하기 위해 배양세포 (cultured cell) 클론으로부터 직접 DNA를 증폭하는 새로운 프로토콜을 확립하였다. 이 프로토콜은 genomic DNA 정제과정이 없이 소량의 세포를 간단한 열처리와 원심분리 단계만을 거쳐 직접 DNA 단편을 증폭하기 위해 Advantage<sup>®</sup> 2 PCR System<sup>3)</sup>을 이용하였다.

### ■ PCR에 의한 EGFP 유전자의 확인

pEGFP-C1 Vector는 CMV 프로모터에 의해 조절되는 향상된 녹색 형광 단백질 (EGFP; enhanced green fluorescent protein; 현재 AcGFP1 유전자로 대체됨; 참조확인) 유전자를 포함하고 있다, pEGFP-C1을 CHO-K1 세포에 주입하고, G418-resistant 클론을 각각 16 개 분리하였다. 10 μ 배양배지 안에 100~500 개의 세포가 함유되어 있는 각 클론의 샘플을 5 분간 원심분리 하였다. 상등액은 제거하고, pellet은 5mM Tris-HCl (pH 7.5)와 0.5 mM EDTA 용액으로 재현탁하여 현탁액을 98° C에서 6 분간 가열시킨 후, 2 분간 원심분리를 거쳐, 상등액 8 μ를 두 개의 EGFP specific primer와 (Primer 1: GGAAGCTTATGGTGAGCAAGGGC; Primer 2: GGGGAATTCCTGTACAGCTCGTC) Advantage<sup>®</sup> 2 System을 이용하여 PCR을 수행하였다. 샘플은 95° C, 3 분간 열을 가한 후 40 cycle (95° C, 20 초, 68° C, 90 초)을 수행하였다. 각 PCR 산물 5 μ를

agarose/EtBr gel에 전기영동하였으며 (그림 1), EGFP 발현을 확인하기 위해 형광 현미경을 이용하여 클론을 관찰하였다 (표 1)

16 개의 클론 중 8 개의 클론으로부터 정확한 700 bp DNA 단편이 증폭되었고 (그림 1), 모두 EGFP 발현 검증을 통해 녹색형광이 존재하는 것을 확인하였으며, 그리고 나머지 클론은 비특이적으로 증폭한 PCR 산물이거나 증폭자체가 일어나지 않았다 (표 1). 또한, 6 개의 클론에서는 EGFP DNA 단편 증폭이 일어나지 않았으며, 녹색 형광을 띄지 않았다, 이는 EGFP 유전자가 존재하지 않는다는 것을 나타낸다.

결과적으로 88%의 정확도로 EGFP의 존재유무를 예측할 수 있었다. 비록 녹색형광을 띄는 2 개의 양성클론에 대하여 PCR 증폭으로 확인할 수 없었지만, PCR 증폭을 통하여 확인된 결과는 기능적 분석 (녹색형광유무) 보다 더 신뢰할 수 있었다고 생각되며, 적어도 false positive가 존재하지 않았다는 것은 매우 중요한 사실이다.

### ■ 직접적인 증폭이 가능한 Advantage<sup>®</sup> 2

본 스크리닝 프로토콜의 핵심은 높은 성능을 발휘하는 PCR 시스템인 Advantage<sup>®</sup> 2를 사용한다는 것으로 일반적인 PCR 시스템보다 더 높은 효율로 주형을 증폭할 수 있다. Advantage<sup>®</sup> 2에는 두 개의 다른 polymerase가 혼합되어 있으며, 이 중 하나는 3' → 5' exonuclease 활성을 가지고 있다<sup>3)</sup>. 이러한 혼합 polymerase는 일반적인 PCR 실험에서 하나의 polymerase를 이용해 증폭하는 것보다 더 길게 증폭할 수 있으며<sup>4,5)</sup>, 짧은 DNA 단편을 증폭하는 경우 높은 효율로 PCR 산물을 생성하게 된다.

본 고에서 안내될 PCR-base transfection 스크리닝 방법은 Advantage<sup>®</sup> 2의 높은 효율을 이용하여 단지 100~500 개의 세포를 열처리하여 DNA를 추출하고 짧은 단편을 증폭하는 기술이다. 단지 변경된 사항은 PCR을 40 cycle로 늘린다는 것이다 (정제된 genomic DNA부터 단편 증폭은 30~35 cycle 후에 일반적으로 확인한다). PCR을 40 cycle로 확장할 수 있는 것은 Advantage<sup>®</sup> 2에 PCR 반응 셋업과 초기 가열 시간 동안 비특이적 primer 확장을 막고, polymerase 활성을 억제하는 단일클론 항체 (monoclonal antibody)인 TaqStart<sup>™</sup> Antibody가 포함되어 있기 때문이다<sup>6)</sup>. 이 hot start 기술은 비특이적 밴드의 증폭을 줄여준다. 본 실험에서 이상적인 세포수의 범위는 100~500이며, 10 보다 적거나 또는 1,000 보다 많은 세포에 적용하기에는 적절하지 못하다.

### ■ PCR에의 적용 및 결과

Transfected DNA의 part가 염색체 (chromosomal DNA) 안으로 삽입 (intergration) 되는 동안 결실될 가능성이 있기 때문에 selection marker와 목적 유전자를 모두 포함하는 클론을 선별하기 위한 사전 screening은 매우 유용하다. 한 예로 neomycin-resistant 클론의 63%만이 형광을 발현하는 (functional) EGFP 유전자를 포함하고

있다. 본 스크리닝 프로토콜은 고비용의 노동집약적이며 어려웠던 기존 방법에 비해 유전자가 형질전환되어 강하게 발현되는 클론을 확인하는데 매우 유용하다. 이는 selection marker뿐만 아니라, 목적 유전자가 형질전환된 후보 클론의 수를 좁혀나가는 데 도움을 주고, DNA 추출이 제한된 생물학적 물질에도 매우 유용하다. 본 실험법은 PCR을 위한 안정된 DNA를 얻기 위해 단지 한번의 열처리, 원심분리 단계만이 요구되기 때문에 유사한 많은 시료에서 수행하기 쉽다.

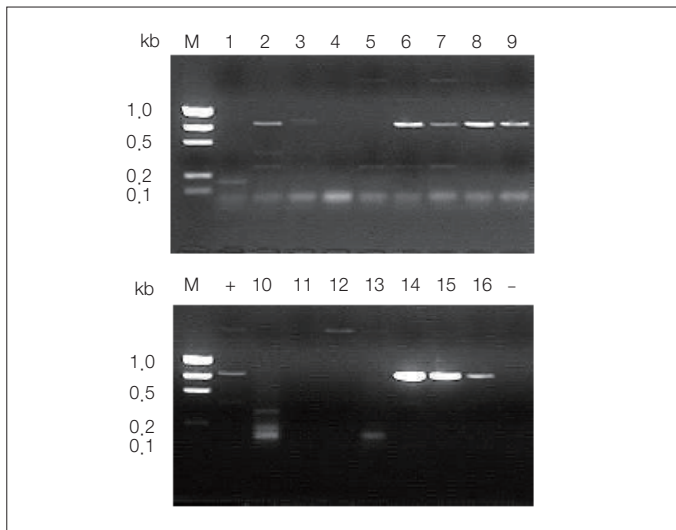


그림 1. PCR amplification of the EGFP gene from 16 CHO-K1 clones. The arrows indicate the position of the 700-bp EGFP fragment, Lanes 1-16: the 16 clones analyzed, Lane M: DNA size markers, + Positive control, - Negative control.

표 1: 형광현미경에 의한 PCR 결과 확인

Clone	PCR	Fluorescence
1	-	-
2	+	+
3	-	+
4	-	-
5	-	-
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
Advantage <sup>®</sup> 2 PCR Kit	30 회	639207
Advantage <sup>®</sup> 2 PCR Kit	100 회	639206
Advantage <sup>®</sup> 2 Polymerase Mix	100 회	639201
Advantage <sup>®</sup> 2 Polymerase Mix	500 회	639202
pAcGFP1-N1 Vector	20 µg	632469
pAcGFP1-C1 Vector	20 µg	632470

■ 참고문헌

1. Hofmann, M.A. & Brian, D.A. (1991) *BioTechniques* **11**:30-31.
2. Frothingham, R., et al. (1991) *BioTechniques* **11**:40-44.
3. Advantage<sup>®</sup> 2 PCR Enzyme Systems (October 1998) *Clontechiques* **XIII**(4):5.
4. Barnes, W. M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2216-2220.
5. Cheng, S., et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5695-5699.
6. Kellog, D. E., et al. (1994) *BioTechniques* **16**:1134-1137.

[참고사항]

실험에 사용된 녹색형광단백질 (EGFP; enhanced green fluorescent protein; 현재 종매)은 현재 AcGFP1 유전자로 대체되었습니다.

AcGFP1는 *Aequorea victoria* (AvGFP)의 근친종 *Aequorea coerulea*의 형광 단백질 유전자를 개량한 것으로, EGFP (AvGFP 변형)와 아미노산 레벨에서 94%의 상동성을 나타내고 EGFP와 동일한 응용에 사용 가능합니다. EGFP와 같이 monomer로 강한 형광을 나타내는 특성을 가지고 있어, 융합 단백질 제작에 최적입니다.

# Clontech PCR Product 선택 가이드

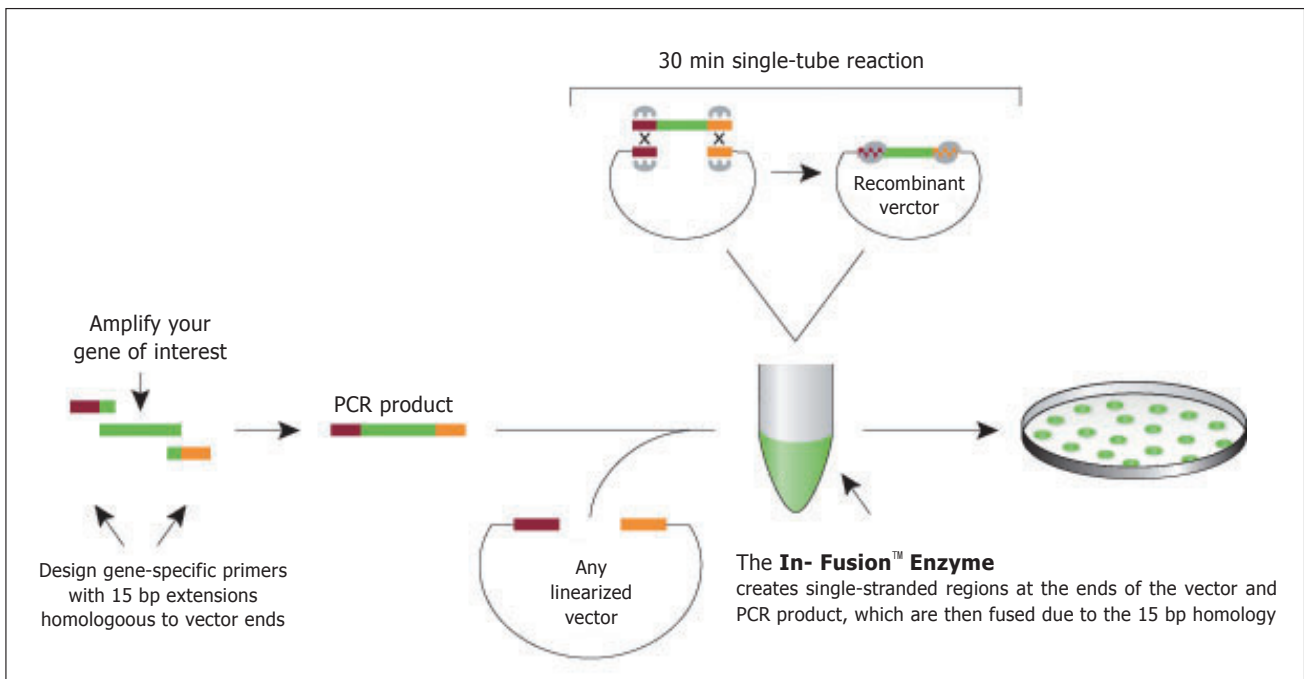
적용분야	Colony Screening, Genotyping	cDNA Amplification	Cloning, Library Construction	Direct PCR	Whole Genome SNP Arrays	High Fidelity PCR Amplification	Amplification of GC-Rich Templates	Amplification of Long Templates	Amplification of Long, GC-Rich Templates
제품명	TITANIUM Taq DNA Polymerase	Advantage 2	Advantage HD	Terra PCR Direct Polymerase	TITANIUM DNA Amplification	Advantage HF 2	Advantage GC 2	Advantage Genomic LA	Advantage GC Genomic LA
Template/Amplicon Length Guidelines									
Human Genomic DNA	0.1 - 2.0 kb	< 6.0 kb	< 8.5 kb	< 2.0 kb	0.1 - 2.0 kb	< 3.5 kb	< 6.0 kb	8.0 - 30.0 kb	8.0 - 30.0 kb
Plasmid or Lambda Lysate	0.1 - 2.0 kb	< 18.5 kb	< 28.0 kb	< 2.0 kb	0.1 - 2.0 kb	< 2.0 kb	< 6.0 kb	< 35.0 kb	< 20.0 kb
cDNA	< 4.0 kb	0.4 - 8.5 kb	< 4.0 kb	< 2.0 kb	< 4.0 kb	< 1.3 kb	< 0.5 kb	< 10.0 kb	< 10.0 kb
Performance Comparison									
Fidelity	**	***	****	**	**	*****	***	***	***
Yield	****	***	***	****	****	**	***	***	***
Hot Start	○	○	○	○	○	○	○	○	○
T/A Cloning Compatible	○	○		○	○	○	○	○	○

# 더 강력해진 신개념 클로닝 기술!!

## In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit

- 어떤 insert, 어떤 vector에도 클로닝
- Insert PCR 산물에 별도의 제한효소처리 불필요
- 불필요한 염기 첨가없는 clone 확보
- 간편한 directional cloning법 : 최대 12 kb까지 클로닝

### ■ In-Fusion cloning protocol.



※ Primer 디자인에 대한 자세한 내용은 매뉴얼을 참고하여 주십시오. In-Fusion용 primer 디자인 프로그램: <http://bioinfo.clontech.com/infusion/>

### ■ In-Fusion Advantage PCR Cloning 제품

제품명	용량*	TaKaRa Code
In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit	10 회	639619
In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit w/Cloning Enhancer	10 회	639616
In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin	10 회	639622

\*각 제품은 50 회, 100 회 용량도 있습니다.