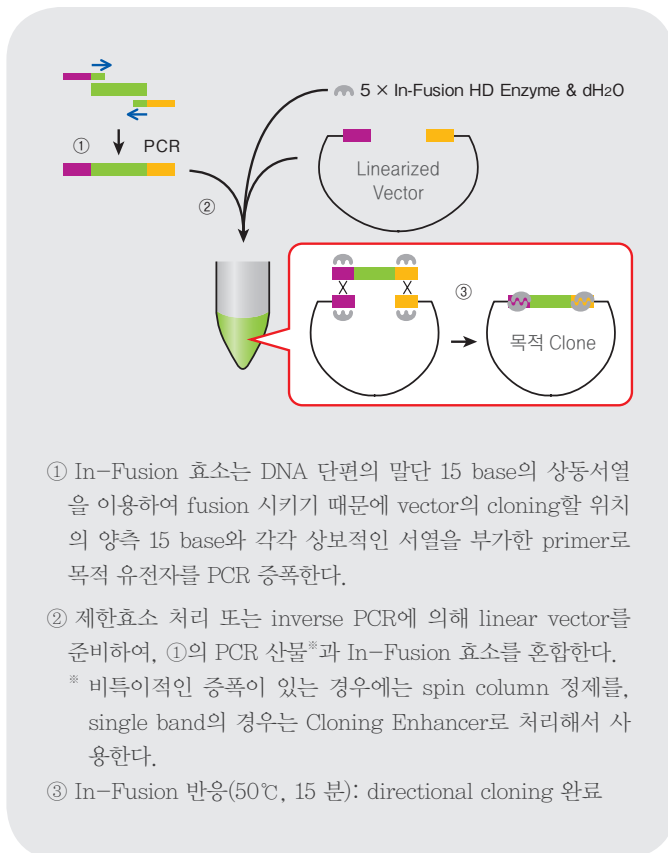


In-Fusion Cloning

Clontech의 In-Fusion Cloning 기술은 In-Fusion 효소를 이용해 DNA 단편간의 말단 15 base의 상동서열을 fusion 시켜 cloning 하는 기술이다. 사용하는 vector의 말단 서열을 이용하여 cloning 하기 때문에 모든 vector를 사용할 수 있으며, 추가로 어떤 서열도 첨가되지 않는다. 양쪽말단의 서열을 인식하므로 방향성 있는 cloning이 가능하다.

원리와 특징

- Insert 종류, cloning 부위, vector에 구애받지 않는 directional cloning
- 짧은 단편부터 긴 단편(50 bp~15 kb)까지 효율적으로 cloning 가능
- 1회의 반응으로 여러 DNA 단편을 동시에 cloning 가능
- In-Fusion 반응 시간은 불과 15 분



- ① In-Fusion 효소는 DNA 단편의 말단 15 base의 상동서열을 이용하여 fusion 시키기 때문에 vector의 cloning할 위치의 양측 15 base와 각각 상보적인 서열을 부가한 primer로 목적 유전자를 PCR 증폭한다.
- ② 제한효소 처리 또는 inverse PCR에 의해 linear vector를 준비하여, ①의 PCR 산물*과 In-Fusion 효소를 혼합한다.
* 비특이적인 증폭이 있는 경우에는 spin column 정제를, single band의 경우는 Cloning Enhancer로 처리해서 사용한다.
- ③ In-Fusion 반응(50°C, 15 분): directional cloning 완료

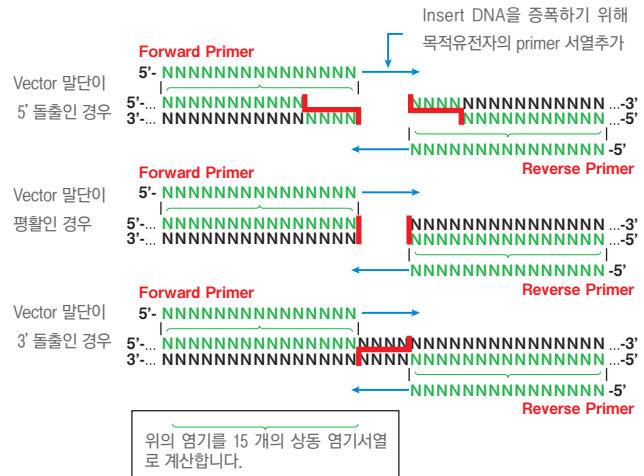
[실험방법]

(상세한 프로토콜은 반드시 제품의 사용설명서를 확인해 주세요)

1. Linear Vector 와 Insert DNA의 조제

- ① 사용하는 vector와 cloning 부위를 결정해 제한효소 처리 또는 inverse PCR로 vector를 선형화한다. : linear vector 용액 [A]

- ② Insert DNA의 PCR 증폭을 위한 In-Fusion Primer를 설계한다



In-Fusion 효소는 각 DNA 단편 말단 15 base의 상동 서열을 인식해 fusion 시킨다. 그러므로 insert를 PCR로 증폭할 때 사용하는 primer의 5' 말단에 linear vector의 말단 서열과 상동의 15 base를 추가하는 것이 핵심이다. 위의 그림과 같이 linear vector의 말단 서열에 맞춰서 In-Fusion Primer를 설계해야 한다. 덧붙여 In-Fusion Cloning 반응은 TA Cloning과 달리 증폭 산물의 A-overhang의 유무에 의한 영향을 받지 않기 때문에 PCR 증폭 산물의 A-overhang을 고려하지 않아도 된다.

- ③ Insert DNA를 PCR 증폭한다.

CloneAmp HiFi PCR Premix를 이용했을 경우

CloneAmp HiFi PCR Premix	12.5 μ l
FW Primer/RV Primer	각 0.2~0.3 μ M
주형	< 100 ng
dH ₂ O	up to 25 μ l

98°C 10 sec.	} 30 ~ 35 cycles
55°C 5 sec. (또는 15 sec.)	
72°C 5 sec/kb	



Primer 디자인 온라인 사이트

편리한 In-Fusion primer 디자인 사이트 (In-Fusion Primer Design Tool)를 이용하십시오.

다카라코리아 홈페이지 또는 Clontech 홈페이지 참조

2. Agarose gel 전기영동으로 PCR 증폭산물 확인

① 전기영동의 결과에 따라서 아래와 같이 insert DNA를 정제한다

- **비특이적 PCR 산물이 증폭된 경우 :**
 - 목적 band만을 잘라 NucleoSpin Extract II를 이용하여 spin column 정제를 한다.
- **정확한 단일 band의 PCR 산물인 경우 :**
 - Cloning Enhancer 처리 :

PCR 반응액	5 μ l
Cloning Enhancer	2 μ l
⇒ 37 °C, 15 분 → 80 °C, 15 분	

② Insert DNA 용액 [B]로 한다

3. In-Fusion Cloning 반응

5 × In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μ l	50 °C 15 분 반응 후 바로 열에 넣는다.
Linear Vector [A]	x μ l	
정제/ CE 처리 후 PCR 단편 [B]	y μ l	
dH ₂ O	up to 10 μ l	

4. 대장균으로의 형질전환

Stellar Competent Cells(Code 636763)이나 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code 9128) 등 형질전환 효율이 1×10^8 cfu/ μ g plasmid DNA 이상의 competent cell 사용을 추천한다

5. Insert Check PCR, 배양, Plasmid 정제

Insert check PCR은 31페이지를 참조한다.

형질전환 colony 수	415
Positive 형질 전환체의 비율	7/10

In-Fusion Cloning이라면 multi-fragments cloning도 효율적으로 실시할 수 있다. 각 1 kb의 DNA 단편을 In-Fusion HD Cloning Kit를 이용해 cloning한 후, colony PCR로 insert를 확인하였더니, 10개 clone 중 7개 clone가 positive clone임을 확인할 수 있었다.

Code	제품명	용량	포함제품			
			CE ^a	NS ^b	Cell ^c	PCR 효소 ^d
639642	In-Fusion HD Cloning Kit w/Competent Cells*	10 rxns			o	
638909	In-Fusion HD Cloning Plus*	10 rxns		o	o	o
638916	In-Fusion HD Cloning Plus CE*	10 rxns	o		o	o
639648	In-Fusion HD Cloning Kit*	10 rxns				
638912	In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus*	8 rxns		o	o	o

* Premix 타입의 In-Fusion HD에는 10rxns 이외에 50 rxns, 100 rxns 제품도 있다.
 * In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus는 동결건조 타입(실온, desiccator내 보존가능)이다. Micro-tube에 분주되어 있어 즉시 사용할 수 있으며, 24 rxns(8 well tube×3개), 96 rxns (96 well plate)도 있다.



In-Fusion HD 포함제품

*a. Cloning Enhancer (CE)

PCR 산물이 단일 band인 경우에 증폭 산물을 그대로 In-Fusion 반응에 이용하기 위한 전처리 시약이다. 이 처리를 하면 PCR에 사용한 primer나 주형 plasmid, dNTP의 영향을 받지 않고, In-Fusion 효소가 최대의 성능을 나타낼 수 있다.

*b. NucleoSpin Extract II (NS)

PCR 산물이 multi-band인 경우에 gel extraction과 PCR clean-up을 동시에 할 수 있는 spin column이다.

*c. Stellar Competent Cells (Cell)

높은 형질전환 효율을 갖는 competent cell로 긴 단편 plasmid DNA 형질전환에도 높은 효율을 얻을 수 있고 같은 유전자형의 다른 competent cell과 비교시 colony 형성 속도가 빠르다. pUC계 plasmid의 형질전환 시에는 β -galactosidase의 α -상보성을 이용해 X-Gal을 첨가하면 재조합체의 Blue/White 선별을 할 수 있다.

*d. CloneAmp HiFi PCR Premix (PCR 효소)

CloneAmp HiFi polymerase와 dNTP, buffer가 모두 포함된 편리한 2 X master mix 제품으로 높은 정확도와 뛰어난 증폭 효율을 지닌 high fidelity PCR 효소이다. 이 효소를 이용하면 최대 10kb까지 증폭할 수 있으며 어려움이 매우 낮아 In-Fusion PCR Cloning에 매우 이상적이다.