

In-Fusion Cloning 기술과 High Fidelity DNA Polymerase를 이용한 다양한 Cloning 적용 예

실험예 1 : 제한효소 사이트가 없는 위치에 목적 단편의 클로닝

High fidelity PCR 효소인 PrimeSTAR Max(Code R045A)로 목적 단편을 증폭하고 In-Fusion 방법으로 클로닝하면 복잡한 클로닝 과정없이 간편하게 돌연변이 없는 목적유전자를 가진 클론을 얻을 수 있다. 본 실험에서는 제한효소 사이트가 없는 단백질 발현 vector의 개시코돈 ATG 위치에 MAP1LC3B 유전자를 부가적인 염기의 첨가없이 클로닝한 예이다 (그림 1).

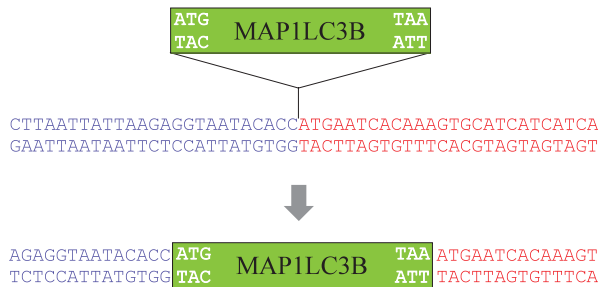


그림 1. MAP1LC3B 유전자의 클로닝 개요

제한효소 사이트가 없는 발현 vector의 개시코돈 ATG의 위치에 MAP1LC3B 유전자를 클로닝하였다.

방법

발현 vector(4.4 kb)를 주형으로 vector의 개시코돈 ATG의 상류와 하류로 설정한 vector 서열에 상보적인 프라이머와 PrimeSTAR Max를 이용하여 inverse PCR을 통해 vector를 선형화하였다. HL60 유래 cDNA를 주형으로 In-Fusion 반응용 프라이머^A와 PrimeSTAR Max를 이용해 0.4 kb의 MAP1LC3B 유전자의 ORF를 증폭해 목적 유전자로 준비했다. 전기영동으로 vector와 insert이 각각 단일 밴드임을 확인하였고^B, 이 PCR 산물을 Cloning Enhancer로 처리한 후 In-Fusion cloning 반응을 실시했다 (그림 2). 형질전환에는 Stellar Competent Cells(Code 636763)을 사용했다.

^A Gene specific primer의 5' 말단에 vector 말단과 상보적인 15 bp를 추가한 In-Fusion용 프라이머(40 mer, 39 mer)를 설계했다.

^B PCR 산물이 복수 밴드인 경우에는 agarose gel에 전기영동한 후 목적 DNA만 추출, 회수, 정제하여 In-Fusion 반응에 이용한다.

결과

In-Fusion 반응액 중 1/5을 배양하여 1202개의 형질전환 콜로니를 확보하였고, 그 중 임의로 선택한 12개의 클론을 colony PCR을 통해 insert를 검사한 결과 12개 모두 목적 사이즈의 DNA가 클로닝되었음을 확인하였다 (그림 3).

PCR 증폭하여 목적 DNA와 vector를 선형화한다.
목적 DNA PCR에는 vector의 말단 서열 15bp가 부가된 프라이머를 사용

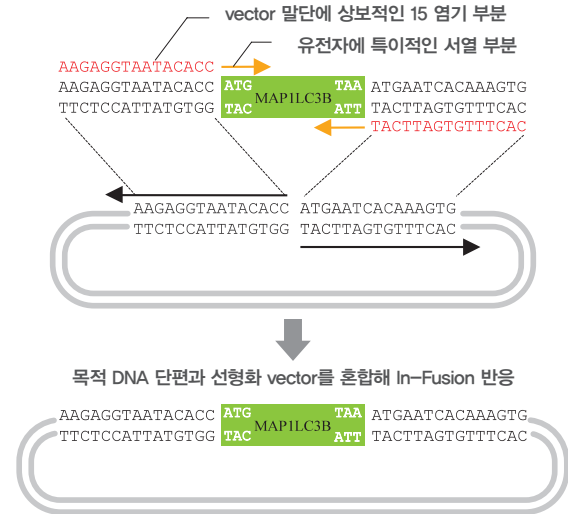


그림 2. MAP1LC3B 유전자 단편과 선형화 vector의 제작

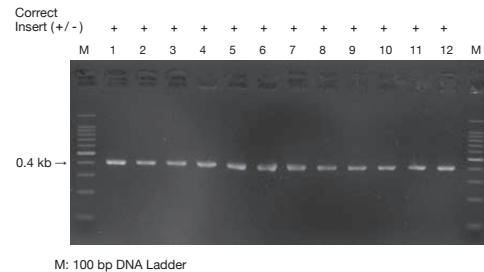


그림 3. Colony PCR에 의한 insert(0.4 kb) 확인 결과

실험예 2 : 긴 DNA 단편(12 kb)의 클로닝

높은 정확성과 긴 단편 증폭 능력이 있는 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase(Code R050A)와 In-Fusion PCR Cloning Kit w/ Competent Cells(Code 639642)을 사용하면 긴 DNA 단편이나 GC rich 영역을 증폭하여 간편하게 클로닝할 수 있다. 본 실험에서는 PrimeSTAR GXL로 증폭한 12kb의 DNA 단편을 pUC19에 클로닝한 예이다.

방법

pUC19 vector는 PrimeSTAR Max로 inverse PCR을 통해 선형화하였다. 인간 계승 DNA를 주형으로 pUC19 vector의 말단과 15 bp와 상보적인 서열을 가진 프라이머와 PrimeSTAR GXL을 이용하여 12 kb의 목적 DNA 단편을 증폭하였다. Vector와 동일하게 단일밴드는 In-Fusion 제품내 포함된 Cloning Enhancer로 처리한 후 In-Fusion 반응을 하였고 형질전환에는 Stellar Competent Cells을 사용했다.

결과

In-Fusion 반응액의 1/5을 배양한 결과 327개의 형질전환 콜로니를 확보하였고, 그 중 임의로 선택한 10개의 클론을 colony PCR을 통해 insert를 검사한 결과 10개의 클론 모두 목적 사이즈의 DNA가 클로닝 되었음을 확인하였다(그림 4).

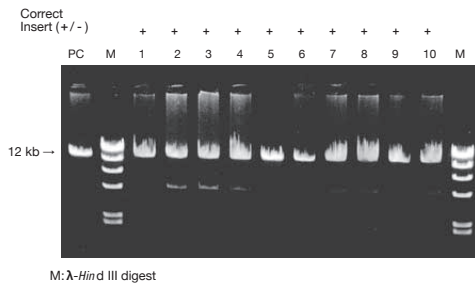


그림 4. PrimeSTAR GXL 를 이용해 insert(12 kb) 확인 결과

실험예 3 : 복수 단편의 동시 클로닝에 적용

In-Fusion PCR Cloning Kit의 프로토콜에 따라 PCR로 증폭한 목적 DNA 단편을 Cloning Enhancer로 처리(37°C, 15 분/ 80°C, 15 분) 후, 목적 DNA 단편과 선형화 vector로 In-Fusion 반응(50°C, 15 분)을 실시한다. 이번 실험에서 소개하는 간편 프로토콜은 목적 DNA와 vector를 모두 PrimeSTAR Max로 PCR 증폭해 선형화한 후 증폭된 목적 DNA 단편과 선형화된 vector를 먼저 혼합한 다음, 이 혼합액에 Cloning Enhancer 처리와 In-Fusion 반응을 1 tube에서 동시에 실시(37°C 15분, 50°C 15 분)한 후 형질전환하여 클론을 얻는 방법이다(그림 5).

<p>[표준 프로토콜] 약 60 분</p> <p>PCR 증폭한 목적 DNA 단편 ↓ CE처리: 37°C 15 분, 80°C 15 분 ↓ 제한효소로 선형화 vector DNA와 CE처리한 목적 DNA 단편 혼합 ↓ In-Fusion 반응: 50°C 15 분 ↓ 형질전환</p>	<p>[간편 프로토콜] 약 30 분</p> <p>PCR로 선형화 vector DNA와 PCR 증폭한 목적 DNA 혼합 ↓ CE처리 & In-Fusion 반응 : 37°C 15 분, 50°C 15 분 ↓ 형질전환</p> <p>*CE : Cloning Enhancer</p>
--	--

그림 5. In-Fusion 클로닝의 표준 프로토콜과 간편 프로토콜. 제한효소로 선형화한 vector를 이용하는 경우 목적 DNA 단편의 Cloning Enhancer 처리와 In-Fusion 반응은 따로 실시해야 하지만, PrimeSTAR Max로 vector와 목적 DNA 단편을 PCR 증폭하여 모두 단일밴드인 경우 CE 처리와 In-Fusion 반응을 동시에 실시할 수 있다.

방법

PrimeSTAR Max를 이용해 inverse PCR로 선형화된 pUC19 vector를 만들었고 목적유전자는 In-Fusion용 프라이머와 PrimeSTAR Max를 이용해 β -globulin 유전자 1 kb와 2 kb를 각각 PCR 증폭했다. Vector를 포함한 3개의 증폭된 단편을 표준 프로토콜(각각 CE처리 후 In-Fusion 반응)과 간편 프로토콜(3개의 DNA 단편을 섞어 CE처리와 In-Fusion 반응을 1tube에서 진행)로 In-Fusion 클로닝을 실시했다(그림

6). 형질전환에는 Stellar Cells을 사용했다. 복수의 DNA 단편이 클로닝 되었는지 확인은 colony PCR을 통해 3 kb 단편의 증폭 여부로 확인하였다.

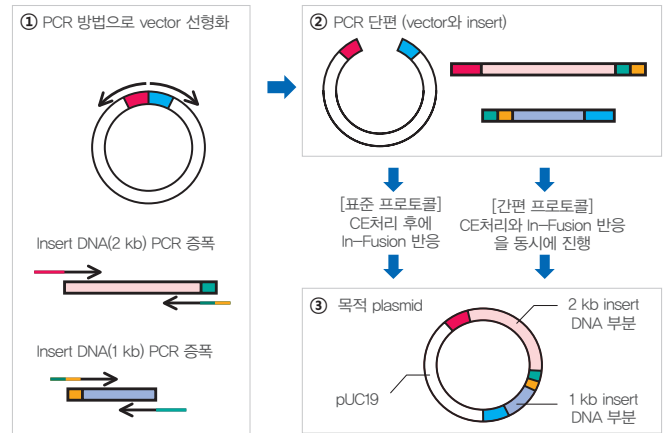


그림 6. 표준 프로토콜과 간편 프로토콜로 각각 반응하여 2개의 insert를 동시에 클로닝

결과

표준 프로토콜 In-Fusion 반응액과 간편 프로토콜 In-Fusion 반응액의 1/5을 각각 배양하였고 표준 프로토콜에서는 112개의 형질전환 콜로니를 확인하였고 간편 프로토콜에서는 407개의 형질전환 콜로니를 얻었다. 그 중 임의로 선택하여 insert를 확인한 결과, 두 프로토콜 모두 조사한 12 클론 중 9 클론이 2개의 목적단편이 동시에 클로닝된 것을 확인할 수 있었다(그림 7).

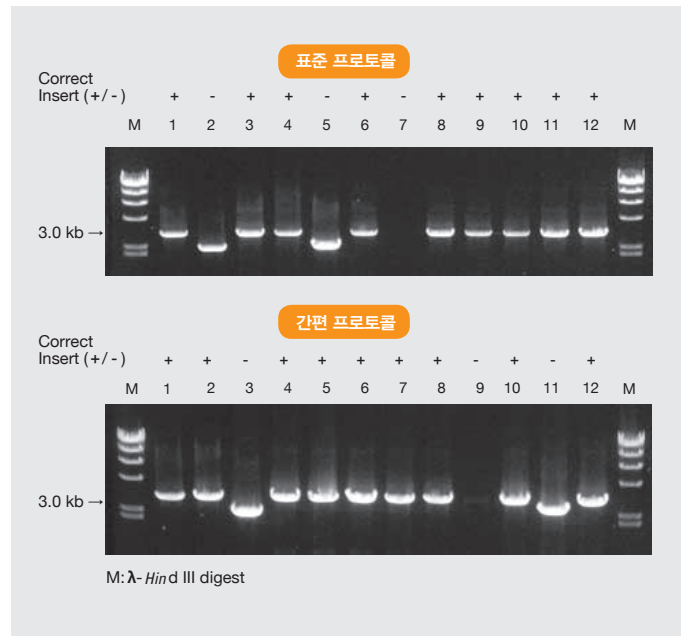


그림 7. 콜로니 PCR을 이용한 insert(3 kb)의 확인 결과. 표준 프로토콜의 Lane 2, 5와 간편 프로토콜의 Lane 3, 11에서 보이는 작은 단편은 PCR 증폭시의 비특이적 증폭산물이 클로닝된 것으로 생각된다.