

Technical Note

In-Fusion Cloning

스크리닝용 형광 바이오센서 모형을 만드는 빠르고 효과적인 방법

Alix Herr¹, Paul Tewson², Anne Marie Quinn² & Thomas Hughes¹¹ Department of Cell Biology & Neuroscience, Montana State University, Bozeman MT 59717² Montana Molecular, 2155 Analysis Drive Suite B, Bozeman, MT 59718.

세포내 단백질 결합 가능성을 분석하는 가장 일반적인 방법 중의 하나가 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 법이다. FRET법은 단백질과 연결된 두 개의 리포터(형광물질) 사이의 결합 정도와 그 양을 측정하는 것이다. FRET법을 기반으로 하는 바이오센서를 만들는데 가장 어려운 점은 donor fluorophore와 acceptor fluorophore를 세포 기능에 영향 없이 단백질이나 단백질 도메인에 결합시키는 방법을 찾는 것이다. 본 고에서는 In-Fusion 기술을 이용하여 수 백 개의 바이오센서 모형을 신속하고 효과적으로 제작하는 방법에 대해 기술하고 있다.

서론

유전적으로 형광을 발현하는 바이오센서를 만들어 활용하면 살아있는 세포에서 시그널을 확인하기 쉽다. 현재 센서는 칼슘calcium⁽¹⁾이나 대사 물질metabolite⁽²⁾ 그리고 transmembrane voltage⁽³⁾의 변화를 측정하는데 활용되고 있다. 일반적으로 센서는 두 개의 다른 종류의 형광단백질을 시그널 단백질이나 단백질 도메인에 융합시켜 제작되며, 단백질의

형태가 변하면 FRET 효율도 변화가 나타난다. 이런 센서를 만들는데 가장 어려운 점은 donor fluorophore와 acceptor fluorophore의 적절한 위치를 찾는 것이다.

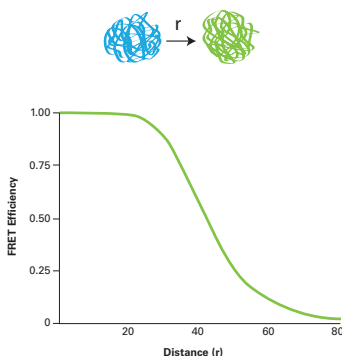


그림 1. FRET depends critically on the distance(r) between the donor and acceptor fluorophores.

FRET은 두 개의 형광물질 사이에 에너지가 전이되는 것을 의미하는데 donor의 에너지 전이로 인해 acceptor 형광단백질의 emission spectrum이 변화하게 된다⁽⁴⁾. Donor와 acceptor 사이의 거리에 따라서도 에너지 효율의 차이를 보인다(그림 1). 단백질의 배위 변화 conformational changes는 FRET에서 큰 효율의 차이를 만들어 내기 때문에 FRET 기반의 바이오센서를 만들 때 가장 중요한 것은 단백질 도메인에 donor 형광단백질과 acceptor 형광단백질을 융합시킬 최적의 위치를 찾아내는 것이다.

두 개의 형광단백질이 떨어져 있으면 FRET 현상이 발생되지 않고 두 형광단백질이 너무 근접해 있어도 거리상에 작은 변화만 가능하기 때문에 FRET에서도 변화가 적게 발생한다.

바이오센서를 만드는 과정은 수 많은 모형을 만들고 테스트하는 과정이 필연적으로 수반된다⁽⁵⁾. 종종 링커linker내의 한두 개의 아미노산 차이로 인해 수백 종의 다양한 융합단백질fusion protein이 만들어 진다. 이 모형을 만드는 일반적인 방법은 제한효소와 라이게이션ligation 방법을 이용해 클로닝cloning하는 것으로 많은 시간과 비용을 투자해야만 한다.

In-Fusion 방법을 이용하면 적은 인원으로도 신속하고 효과적으로 수 백 개의 모형을 만들 수 있다. In-Fusion 방법의 가장 혁신적이고 중요한 부분은 1회의 반응으로 3개의 다른 PCR 산물을 갖고 있는 클론을 효과적으로 제작할 수 있다는 것이다. 단, 각 PCR 산물 말단에 15 bp의 상동서열homologous sequence 이 필요하다. 그러나 이것은 한정되어 있는 제한효소 사이트를 이용하는 방법과는 다르다.

In-Fusion cloning은 3개의 PCR 산물을 동시에 클로닝 가능하므로, 1회 반응으로 시그널 단백질의 다양한 위치에 donor나 acceptor 형광단백질을 삽입하는데 매우 효과적이다. Donor나 acceptor 형광단백질을 포함하는 초기 모듈을 만들고 난 후, In-Fusion을 이용하여 교차 결합하는 다른 종류의 donor나 acceptor 형광단백질을 제작할 수 있다. 이 방법을 활용하면 많은 종류의 구조를 손쉽게 만들 수 있다.

이 기술은 여러 가지 다른 종류의 바이오센서 프로젝트에 활용되고 있다. 또한 이 두 과정은 매우 효과적이고 신뢰할 만하며 자동화를 통해 쉽게 대량으로 진행할 수 있다.

1단계 : In-Fusion 반응으로 초기 모듈 제작

첫 번째 단계는 가능한 구조 정보를 이용하거나 신중한 검토를 통해 시그널 단백질 활용에 최적이라고 예상되는 위치에 donor나 acceptor 형광단백질을 삽입하는 것이다. 시그널 단백질과 형광단백질을 코딩하는 부위를 PCR로 증폭한 후 선형화된 플라스미드linear plasmid에 In-Fusion 반응으로 한 개의 형광단백질을 클로닝 한다(그림 2). 이 후 연계되는 반응이 이 모듈에 의해 성패가 좌우되기 때문에 PCR에 의한 에러는 없는지 반드시 확인해야 한다.

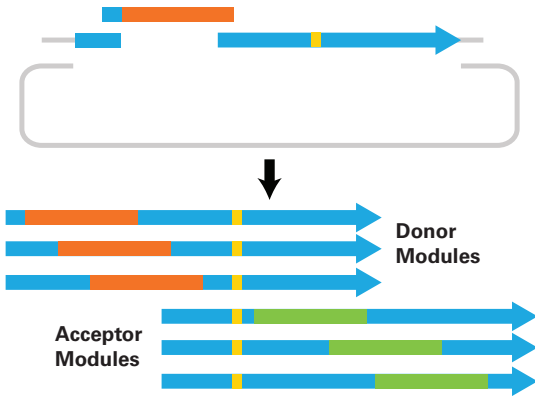


그림 2. Phase I: Four-way In-Fusion reactions produce donor and acceptor modules.

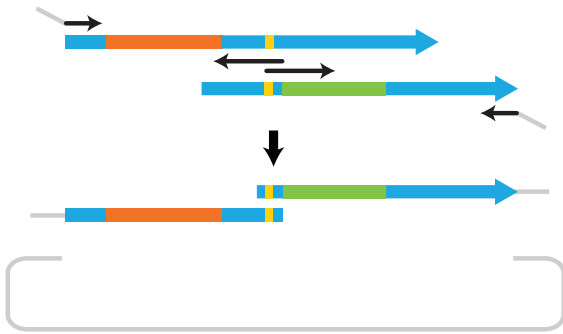


그림 3. Phase II: Three-way In-Fusion reactions cross-couple donor and acceptor modules.

2단계 : In-Fusion을 이용한 cross-coupling 모듈 모형 제작

1단계에서 만들어진 cross-coupling 모듈 제작은 자동화할 수 있다. Acceptor 모듈의 5' 말단을 증폭할 수 있는 프라이머 1쌍과 donor 모듈의 3' 말단을 증폭할 수 있는 프라이머 1쌍, 총 2쌍의 프라이머가 있다면 가능하다. 이 프라이머를 이용해 15 bp의 상동서열을 갖고 있는 2개의 단편을 증폭하고 이를 In-Fusion으로 반응하면 센서 모형이 제작된다(그림 3).

이 방법을 이용하면 donor 모듈의 수(n)와 그에 따라 결합하게 되는 acceptor 모듈의 수(m)를 곱한 만큼의 다양한 (n x m) 센서 모형을 만들 수 있다(그림 4). In-Fusion 기술을 이용하면 자동 분주 장치robotic liquid handling와 96-well PCR plate를 이용하여 대량의 실험을 쉽게 자동화할 수 있다. PCR 장비에서 In-Fusion 반응을 수행한 후 transformation 절반을 도달한 10^9 CFU cell에서 200개 정도의 콜로니가 나타났다. 에러율은 10% 미만이었고 cross-coupling 반응을 위해 2개의 콜로니를 선택해서 키웠다.

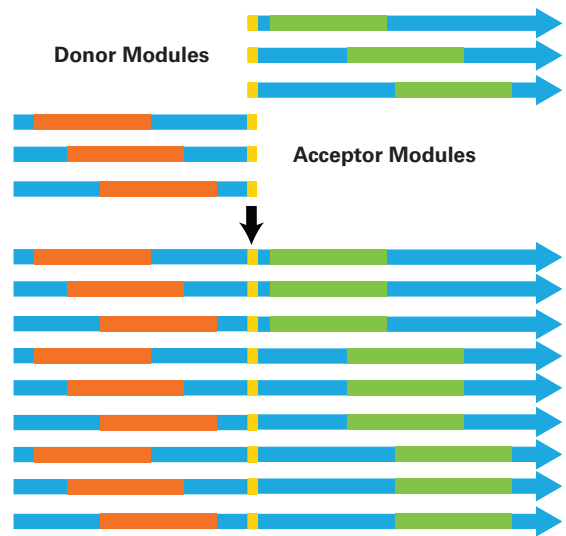


그림 4. Combinatorial complexity produces many possible biosensors.

결론

In-Fusion Cloning을 이용하면 융합단백질과 링커 사이에 15bp의 상동서열만 있다면 제한효소 사이트를 삽입하지 않고도 수 백 개의 모형도 신속하고 효과적으로 디자인할 수 있다. 또한 효과적이고 뛰어난 In-Fusion 반응을 이용하면 수백 개의 모형을 만드는데 전 과정을 자동화할 수 있다.

References

1. Miyawaki, A., et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2135-140.
2. Looger, L.L., et al. (2005) *Plant Physiol.* 138:555-57.
3. Baker, B.J., et al.(2008) *Brain Cell Biol.* 36:53-67.
4. Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (New York: Springer).
5. Shimozono, S. & Miyawaki, A. (2008) *Methods Cell Biol.* 85:381-393.