

혁신적인 Directional Cloning 기술

In-Fusion PCR Cloning 기술의 개요

DNA 클로닝은 insert와 plasmid vector를 제한효소로 절단한 후 ligase로 연결하는 것이 보편적이다. 그러나 vector와 insert의 제한효소 자리가 중복되거나 없어 곤란한 경우가 종종 발생한다. 또한, 제한효소에 따라 ligation 효율이 달라지기도 하며, 부득이하게 부가적 서열을 삽입해야 하는 경우도 있다. Clontech의 In-Fusion 클로닝 시스템은 이러한 기존의 클로닝 방법의 제한을 극복하고 두 개의 선형의 DNA(insert와 plasmid vector)를 간편하고 효율적으로 클로닝할 수 있다. 본 시스템은 제한효소와 ligase를 사용하지 않는 대신 연결하고자 하는 두 선형의 DNA의 말단서열 15 bp가 동일하다면 두 단편을 함께 In-Fusion 반응하는 것만으로 ligation을 완료할 수 있다. 일반적으로 동일서열을 만드는 방법은 insert를 PCR 증폭하기 위하여 사용하는 3'-과 5'-primer 말단에 연결하고자 하는 vector 말단과 동일한 15 bp를 부가적으로 삽입하여 제작한다. 또한 plasmid vector를 선형화 하기 위해 제한효소를 사용하는 경우가 많은데 이 경우 제한효소로 절단한 말단서열의 형태에 상관없이 때문에 어떠한 제한효소도 사용 가능하고 발현하고자 하는 목적 단백질의 부가적 서열을 최소화할 수도 있으며, 원하는 방향으로 insert를 삽입할 수 있다(directional cloning).

In-Fusion Technology

In-Fusion 기작은 ligase를 사용하지 않으며, 양 말단에 상동서열을 지닌 두 선형화된 dsDNA를 시약과 반응하면 3'말단부터 nucleotides가 제거되고 두 DNA 단편은 상보적으로 결합하게 되며, 일부 gap은 대장균에 도입되어 수복된다. In-Fusion의 end-joining 특성을 이용하여 3개 이상의 DNA 단편도 단일 반응으로 결합시킬 수 있고, point mutant 제작 및 기존 vector로 특정 단편 (항생제 내성 사이트, 프로모터, 형광 단백질, 각종 tag 등)을 삽입할 수도 있어 다양한 실험에 대응할 수 있는 vector로 개조도 용이하다.

In-Fusion HD Cloning Kit(Code 639648)는 PCR로 증폭한 insert를 선형화된 어떠한 vector에라도 15분 정도면 클로닝할 수 있다⁽¹⁾.⁽²⁾ (그림 1), Clontech의 In-Fusion Kit는 NucleoSpin Column 또는 Cloning Enhancer가 첨부된 형태와 첨부되지 않은 형태로 시판되고 있어, 클로닝 전 PCR 산물에 적합하게 전처리할 수 있는 방법을 선택할 수 있다. 또한 다양한 용량과 형태로 제품이 구성되어 있어, 자신의 실험 목적에 따라 클로닝 반응을 최적화할 수 있다. 사용할 vector가 준비되지 않은 경우라면, 재조합 단백질 정제용 6xHN tag가 있는 다양한 In-Fusion Ready Prelinearized Vector를 선택할 수 있다⁽³⁾. 또한, PCR 클로닝에 최적화된 Stellar Competent Cell(Code 636763)을 이용하여 클로닝 효율을 극대화할 수 있다.

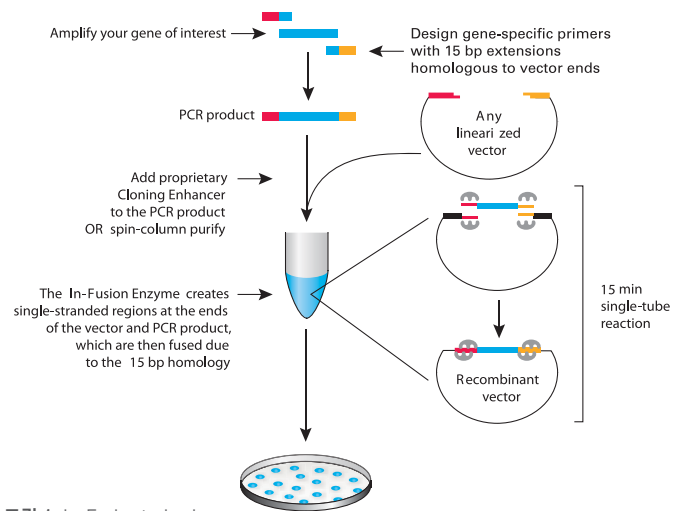


그림 1. In-Fusion technology

기존 클로닝 시스템의 한계를 뛰어넘다!

In-Fusion 시스템은 다른 클로닝 시스템에서는 보기 어려운 몇 가지 독특한 장점을 갖고 있다 (표 1). In-Fusion을 사용하면, 하나 이상의 insert를 선형화된 vector의 어떠한 위치에도 클로닝할 수 있고, 원스텝으로 원하는 재조합체를 만들 수 있다.

In-Fusion 방법은 A-overhang의 유무에 영향을 받지 않기 때문에 Advantage HD Polymerase Mix (Code 639241) 또는 CloneAmp HiFi PCR Premix (Code 639298)과 같은 정확도가 높은 DNA polymerase를 사용하여 PCR 증폭하는 것을 권장한다.

클로닝 효율을 높이기 위한 PCR 산물의 정제방법으로는 Cloning Enhancer를 사용하거나 NucleoSpin Extract II로 정제하는 방법을 선택할 수 있다. Cloning Enhancer를 사용하면 별도의 PCR insert 정제 단계가 필요 없다.

In-Fusion 효소의 독특한 end-joining 능력으로 ligase나 제한효소 없이 클로닝이 가능하고, 불필요한 염기가 추가되지 않고 정확한 클로닝 결과를 얻을 수 있다.

Any Insert, Any Vector도 가능

In-Fusion Cloning은 어떤 PCR 단편이라도 선형화된 모든 vector에 클로닝이 가능하며, 이때 insert 양 말단은 선형화된 vector의 말단 서열과 15 bp homology를 가져야 한다. 이 homology 영역은 목적 DNA를 증폭하기 위해 프라이머를 디자인할 때 프라이머의 5'말단에 목적하는 vector 서열을 삽입하면 된다. Clontech의 홈페이지에서는 In-

표 1. In-Fusion과 기존 클로닝 시스템 비교

In-Fusion Cloning 시스템	기존 클로닝 시스템의 제한 요소
<ul style="list-style-type: none"> • PCR 산물을 선형화된 어떠한 vector에라도 클로닝 가능 (PCR 산물은 vector의 양 말단 서열과 15 bp homology) 	<ul style="list-style-type: none"> • Vector 선택이 제한적 • Kit에 포함된 vector만 사용 가능하거나 다른 vector 사용 제한
<ul style="list-style-type: none"> • Insert 제한효소 처리나 ligation과정 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> • 제한효소 처리나 ligation이 필요
<ul style="list-style-type: none"> • PCR 산물내의 제한효소 사이트에 의해 클로닝이 영향 받지 않음 	<ul style="list-style-type: none"> • Vector와 insert의 제한효소 서열을 맞춰야 함 • 사용할 수 있는 제한효소 사이트가 한정적
<ul style="list-style-type: none"> • Subcloning이 불필요 	<ul style="list-style-type: none"> • 복잡한 construct는 subcloning이 필요
<ul style="list-style-type: none"> • 복수의 PCR 산물을 1회 반응으로 원하는 vector에 클로닝 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 여러번의 subcloning을 통한 복수의 클로닝
<ul style="list-style-type: none"> • 최대 15 kb 까지의 insert DNA를 효율적으로 클로닝 	<ul style="list-style-type: none"> • 긴 insert의 경우 클로닝 효율이 낮고, 가능한 insert 길이가 제한적
<ul style="list-style-type: none"> • Directional cloning이고, insert는 원하는 방향으로 위치 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-directional 클로닝은 insert 방향 검증을 위해 construct screening 필요
<ul style="list-style-type: none"> • 원하지 않는 염기 서열의 삽입 없이 정확한 클로닝 	<ul style="list-style-type: none"> • 원하지 않는 염기서열이 최종 construct에 삽입되는 경우가 생김
<ul style="list-style-type: none"> • 다량의 클로닝이나 자동화에도 적합 	<ul style="list-style-type: none"> • 중형, 대형 스케일의 클로닝에 적합하지 않음

Fusion용 프라이머 디자인 프로그램을 제공하고 있기 때문에 이를 사용하면 편리하게 In-Fusion용 프라이머로 전환할 수 있다 (<http://bioinfo.clontech.com/infusion/>).

Vector의 선형화는 PCR이나 제한효소로 처리하거나, Clontech의 prelinearized In-Fusion Ready Vector를 사용할 수 있다.

제한효소처리가 필요 없는 자동화된 클로닝을 원한다면, 선형화 vector를 PCR 증폭으로 준비하는 것을 추천한다⁽⁹⁾. Vector의 선형화 이외에 vector에 어떠한 처리도 필요하지 않다.

다양한 사이즈에 대한 탁월한 클로닝 효율

In-Fusion Cloning 시스템의 장점을 증명하기 위하여 In-Fusion PCR Cloning Kit와 타사의 PCR cloning kit를 이용하여 다양한 사이즈의 클로닝을 비교하였다. 각각의 insert 사이즈에 대한 클로닝 효율을 비교한 결과, In-Fusion Cloning Kit가 PCR 산물 (insert)의 길이에 상관없이 많은 수의 클론을 생성하여 그 우수한 성능을 확인할 수 있었다^(4,5).

소형 및 High Throughput 적용

In-Fusion Cloning 시스템은 PCR Cloning을 위한 가장 탄력적인 방법으로, 자동화 클로닝 시스템 적용에도 적합하다. In-Fusion 시스템은 Harvard Medical School⁽⁶⁾, Stanford University School of Medicine⁽⁷⁾ 및 University of Oxford⁽⁸⁾ 등을 포함한 다양한 high-throughput cloning 프로젝트에 사용되었다. 액상 타입과 동결건조된 EcoDry타입에 대한 테스트 결과, 소형 스케일이나 high-throughput에서 동일한 클로닝 효율을 보였다. 또한, 2가지 형태 모두 15 kb까지 클로닝이 가능하였다.

In-Fusion을 사용하면 누구나 클로닝 전문가!

In-Fusion 기술은 2개의 DNA 단편뿐만 아니라, 4개의 단편까지 한번의 반응으로 정확하게 클로닝이 가능하다^(9, 10). 복수의 PCR 산물을 제한효소 처리 없이, 원스텝으로 선형화된 vector에 동시에 클로닝 할 수 있다⁽¹¹⁾.

In-Fusion 기술을 통해 다방면에 적용할 수 있는 클로닝의 새로운 가능성을 열어 두게 되었다. 본 시스템을 사용하면 호환 가능한 영역을 갖는 기본 발현 vector를 제작할 수 있고, 정확한 융합 단백질 제작, DNA 단편 제거 또는 치환, 돌연변이 삽입, 내부 형광 융합 단백질 제작, 유전자의 tag 교환 등이 가능하다^(9, 11). In-Fusion은 다양한 사이즈의 복수의 insert라도 빠르고 편리하게 클로닝할 수 있기 때문에, 기존 클로닝 방법으로는 시도하기 어려웠던 클로닝을 현실화 할 수 있다.

Reference

1. In-Fusion PCR Universal Cloning Kits. (October 2005) *Clontechniques* XX (2):16 – 17.
2. In-Fusion 2.0 CF Liquid PCR Cloning Kits. (April 2008) *Clontechniques* XXIII(2):20–21.
3. In-Fusion Ready BacPAK Vector Set. (July 2006) *Clontechniques* XXI (2):16–17.
4. 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.
5. Efficient Cloning of Long PCR Inserts with the In-Fusion PCR Cloning System. (April 2007) *Clontechniques* XXII (2):16–17.
6. Marsischky, G. & LaBaer, J. (2004) *Genome Res.* 14(10B):2020–2028.
7. Hartman, S. *et al.* (January 2005) *Clontechniques* XX(1):26–27.
8. Berrow, N.S. *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.* 35 (6):e45.
9. Zhu, B. *et al.* (2007) *BioTechniques* 43(3):354–359.
10. In-Fusion PCR Cloning Kits-FAQs (July 2007) *Clontechniques* XXII (3):22 – 24.
11. Design Genes with Ease Using In-Fusion Cloning. (April 2008) *Clontechniques* XXIII(2):22–24.