

In-Fusion Cloning System을 이용한 site-directed mutagenesis 제작

PCR 기반의 고효율 클로닝 시스템

- 클로닝과 돌연변이 제작에 다용도로 사용 가능한 시스템
- 단일 반응으로 복수의 돌연변이가 제작 가능
- 제한효소 처리 불필요

돌연변이를 생성하도록 하는 다양한 mutagenesis kit가 판매되고 있고 서열의 제거(deletion), 삽입(insertion), 또는 교체와 같은 돌연변이가 생성 방법이 PCR을 기반으로 수행되고 있다. 클로닝과 mutagenesis를 동일한 PCR 방법을 기반으로 수행할 수 있다면 굳이 mutagenesis 제작을 위해 별도의 시스템을 추가 비용을 들여 구매할 필요가 있을까? PCR Cloning법인 In-Fusion HD PCR Cloning System(Code 639645)은 일반적인 mutagenesis kit으로 수행한 결과와 비교해도 될 만큼 효과적으로 돌연변이를 제작할 수 있다(그림1, 그림 2). In-Fusion 방법은 유전자 특이적 프라이머 서열과 돌연변이 서열을 포함한 프라이머를 제작하여 적용한다(그림 3). 환형 플라스미드(circular plasmid)를 주형으로 하여 inverse PCR 반응시 돌연변이 프라이머(mutagenic primers)를 사

용한다. 이 선형화된 vector를 In-Fusion 반응으로 다시 환형화 시키면 원하는 부위의 돌연변이가 생성된다.

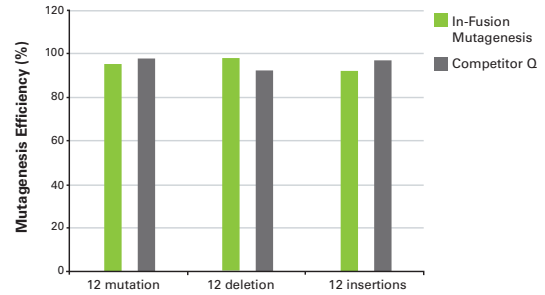


그림 2. Comparison of mutagenesis efficiency between the In-Fusion HD Cloning Kit and the leading mutagenesis kit. A 12 bp insertion, 12 bp deletion, and a 12 bp change was generated in a pUC19 vector according to the mutagenesis protocol from the supplier. The In-Fusion Kit consistently generated mutagenesis efficiencies comparable to those of the leading single-purpose mutagenesis kit.

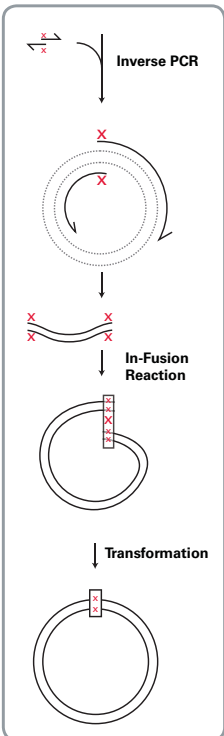


그림 1. In-Fusion DNA Mutagenesis. The mutagenic primers are used in PCR with a circular plasmid as template to generate a linear molecule that is purified and re-circularized via In-Fusion. X (in red) indicates complementary regions.

12 base change with primers

```

5' -TACTACCCGTAAGAAAACCCCTGGCGTTACCC-3'
*****
CGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3'
GCTCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCCTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGC-5'
3' -GTGACCGGCAGCAAAATGTTATGATGGGCATT-5'
*****
CGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAATACTACCCGTAAGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3'
GCTCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTATGATGGGCATTCTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGC-5'
    
```

12 base deletion with primers

```

5' -GTCGTTTTA-----TAGGAAAACCCCTGGCGTTACCCA-3'
|||||
CGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3'
GCTCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCCCTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGC-5'
3' -GCTCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAAT-----ATC-5'
CGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTATAGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3'
GCTCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATATCCTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGC-5'
    
```

12 base insertion with primers

```

5' -CCGGAAGGCTAAGAAAACCCCTGGCGTTACCCA-3'
|||||
AGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG+++++GAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3'
TCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACC+++++CTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGC-5'
3' -CAAAATGTTGCAGCACTGACCGGCCTTCCGATT-5'
AGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGCCGGAAGGCTAAGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCG-3'
TCGAGCTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTTGCAGCACTGACCGGCCTTCCGATTCTTTTGGGACCGCAATGGGTTGAATTAGC-5'
    
```

Note: all 3 mutation types result in an in-frame stop codon (in red) that truncates and inactivates lacZ.

그림 3. Sample In-Fusion primers for generating mutants with a 12 bp change (*****), 12 bp deletion (-----), and a 12 bp insertion (+++++).

돌연변이 프라이머 설계(Mutagenic Primer Design)

프라이머 디자인과 프라이머의 품질은 In-Fusion 반응을 성공시키기 위한 중요한 요소이다. 그림 3은 12 bp의 염기의 교환, 제거, 또는 삽입으로 돌연변이를 만들기 위한 In-Fusion PCR 프라이머 설계의 예이다. 그림에서 보여준 방법외 다른 돌연변이 프라이머 설계의 방법도 가능하기 때문에 유의하기 바란다⁽¹⁾.

In-Fusion PCR primer를 설계할 때 유의사항

- 모든 In-Fusion primer는 2종류의 특징을 가져야 한다.
 - Primer의 5'말단은 결합하려고 하는 DNA 단편(vector 또는 다른 insert) 말단의 12-17 bp와 상보적인 서열을 포함하고 있어야 한다. 양쪽 primer의 3'말단에는 원하는 돌연변이가 포함되어 있어야 한다.
- 양쪽 primer의 3'말단은 아래 요건을 충족해야 한다.
 - 유전자 특이적(gene specific)
 - 길이는 18-25 base, GC 함량은 40-60%
 - melting temperature (T_m)는 58-65°C

Forward primer와 reverse primer 사이의 T_m차이는 4°C 이하가 좋다. 그 이상일 경우 증폭 결과가 좋지 않을 수도 있다. T_m값은 In-Fusion용으로 디자인한 프라이머 전체를 계산하는 것이 아니라 원래의 타겟 유전자 프라이머의 3' 말단(gene-specific)을 기준으로 T_m값을 계산해야 한다. T_m값이 너무 낮으면 58-65°C가 되도록 gene specific primer 길이를 늘린다.
- Hairpin 구조나 primer dimer 방지를 위해 프라이머 사이에 상보적인 서열을 피해야 한다.
- Clontech에서는 PCR에 탈염 프라이머(desalted oligonucleotide primers)를 사용하지만 프라이머의 품질은 제조사에 따라, 제조 lot에 따라 차이가 있을 수 있다. 만약 프라이머 품질이 좋지 않거나 프라이머 길이가 45nt 이상이라면 합성서비스 업체에서 PAGE 정제를 권장할 수도 있다.

Mutagenesis 간단 프로토콜

- PCR을 위한 주형으로 plasmid vector 5-50 ng 준비한다.
- 적절한 프라이머와 Advantage HD (Code 639241) 또는 CloneAmp HiFi PCR Premix(Code 639298)와 같은 high fidelity PCR 효소를 이용하여 3-step PCR 프로토콜로 주형을 증폭한다.

95°C 3 min	} 25 cycles
98°C 10 sec	
55°C 10 sec	
68°C 1 min/kb	

- PCR 산물 50 µl에 2 µl의 Dpn I를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨다.
- 컬럼으로 정제한다.
- 스텝3에서 처리한 PCR 산물 3 µl를 반응액에 넣는다.

In-Fusion reaction :	10 µl
Dpn I-treated PCR product	3 µl
In-Fusion enzyme	2 µl
H ₂ O	5 µl

- 50°C에서 15 분간 In-Fusion 반응을 시킨다.
- 10 µl의 In-Fusion 반응액 중 2 µl를 Stellar Competent Cells (Code 636763)에 형질전환시킨다.
- 얼음에서 5 분 동안 형질전환 반응액을 인큐베이션 시킨다.
- 42°C에서 45 초간 cell에 heat shock을 준다.
- 다시 cell을 얼음에 2분간 반응시킨 후, 37°C shaking incubator에서 45분간 배양하면서 회복시킨다.
- 돌연변이 스크리닝을 위해 다양하게 희석된 cell을 플레이트에 도말한다.

References

- Zhu, B. et al. (2007) *BioTechniques* 43(3):354-359.

License Notice [L15, P1]