

# In-Fusion Cloning에 관한 FAQ

**Q1.** In-Fusion 반응이 다른 클로닝과 다른점은?

**A1.** In-Fusion Cloning 시스템을 이용하면 원하는 vector의 원하는 부위에 subcloning 없이 PCR 산물을 directional cloning이 가능하다. 추가적인 ligation, dephosphorylation 등의 과정없이 1개의 tube에서 간편하고 고효율의 클로닝 반응을 수행할 수 있다.

**Q2.** 프라이머에 부가하는 서열은 15염기로 한정되는가?

**A2.** 12염기 이하, 또는 20염기 이상의 상동인 서열을 이용했을 경우 효율이 현저하게 저하된다. 따라서 프라이머에 부가하는 상동서열은 15염기를 추천한다.

**Q3.** Vector나 insert의 말단 형상에 제한이 있는가?

**A3.** 선형화된 DNA면 특별히 제한은 없어 평활 말단, 돌출 말단(A염기 1개 overhang 포함)의 어느 부위라도 사용할 수 있으나, 환형의 플라스미드 상태로는 사용할 수 없다.

**Q4.** Insert DNA를 PCR 증폭할 때 추천하는 PCR효소는?

**A4.** High-fidelity PCR효소인 Clontech의 CloneAmp HiFi PCR Premix (Code 639298), Advantage HD(Code 639241)나 TAKARA의 PrimeSTAR시리즈와 함께 사용하는 것을 추천한다. 이 효소들은 PCR에 의한 증폭 에러가 극히 적어 PCR 증폭시 염기에 돌연변이 발생 가능성이 매우 낮아 에러없는 정확한 클론을 쉽게 얻을 수 있다. 특히 CloneAmp HiFi PCR Premix (Code 639298)은 10kb 이하의 긴 단편 증폭이나 GC 함량이 높은 주형을 이용할 때 효과적이다. 그 외 여러 효소도 사용 가능하다.

**Q5.** 복수의 DNA 단편을 1회 반응으로 클로닝이 가능한가?

**A5.** 적용할 수 있다. In-Fusion HD Cloning Kit을 이용하여 2~4개의 insert까지 효율적으로 클로닝을 실시한 예가 있다.

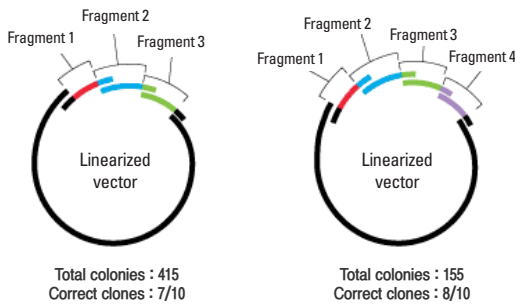


그림 1. 복수 fragment의 동시 클로닝 예. In-Fusion HD Cloning Kit을 이용해 1 kb의 DNA 단편 3개 또는 4개를 1회 반응으로 vector에 클로닝하여 충분한 콜로니를 얻을 수 있었다. 그 중 각 클론 10개를 선택하여 colony PCR을 실시한 결과, 많은 클론에 insert가 클로닝된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 In-Fusion 반응을 이용하면 복수의 DNA 단편을 1회 반응으로 간편하게 클로닝 할 수 있어 스크리닝이나 서브클로닝에 소요되는 시간을 크게 단축시킬 수 있다.

**Q6.** Vector나 insert의 사이즈에 제한이 있는가?

**A6.** In-Fusion HD Cloning 방법으로 12 kb~15 kb의 긴 DNA 단편도 고효율로 클로닝한 예가 있다. 작은 단편의 경우엔 In-Fusion HD Cloning Kit을 이용하여 50 bp이상의 PCR 증폭 단편이면 반응 가능하다.

**Q7.** In-Fusion 반응 전 vector나 insert의 정제가 필요한가?

**A7.** Insert로 사용할 PCR 산물이 단일밴드로 증폭되면 In-Fusion 제품이 포함된 Cloning Enhancer 처리 후 In-Fusion 반응에 적용할 수 있다. 그러나 타겟 이외의 산물이 증폭된 경우, 목적 밴드를 agarose gel 추출 정제하여 NucleoSpin Extract II(※일부 제품에 포함됨)로 정제하는 것을 추천한다. Vector를 제한효소로 절단하여 선형화한 경우 NucleoSpin으로 정제하는 것을 권장하며, Cloning Enhancer로 처리하지 않는다. 그러나 vector를 PCR로 증폭하여 준비한 경우에는 단일 목적 밴드일 경우 Cloning Enhancer 처리하고 복수의 밴드가 증폭되었을 경우엔 목적 밴드를 agarose gel 추출 정제하여 준비한다. Vector와 insert 모두 PCR 증폭하여 준비하고 모두 단일 밴드로 증폭되는 경우 Cloning Enhancer처리와 In-Fusion 반응을 1개의 tube에서 동시에 실시하는 것이 가능하다 (In-Fusion HD Cloning Kit의 Quick In-Fusion Cloning Protocol참조).

**Q8.** In-Fusion 반응 후의 DNA를 주형으로 PCR 반응이 가능한가?

**A8.** 반응 후의 DNA를 곧바로 PCR 주형으로 이용할 수 없다. 반드시 대장균내에서의 증폭 과정을 통해 vector와 insert DNA가 올바르게 결합하는 과정이 필요하다.

**Q9.** 메뉴얼에서 추천하는 것보다 In-Fusion 반응액을 더 많이 cell에 transformation하면 더 많은 콜로니를 얻을 수 있는가?

**A9.** 아니오. 많은 양의 In-Fusion 반응액을 첨가하면 일부 *E. coli* 균주에 대해 독성을 갖는 경우도 있을 수 있기 때문에 메뉴얼에서 추천하는 것보다 In-Fusion 반응액을 더 많이 넣는 것을 추천하지 않는다.

**Q10.** 전용 대장균이나 플라스미드가 필요한가?

**A10.** 일반적인 클로닝용 대장균이나 플라스미드는 사용할 수 있다. 그러나 대장균의 종류에 따라 형질전환 효율이 차이가 날 수 있기 때문에 Stellar Competent Cells(Code 636763 등) 또는 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells(Code 9128)의 사용을 추천한다.

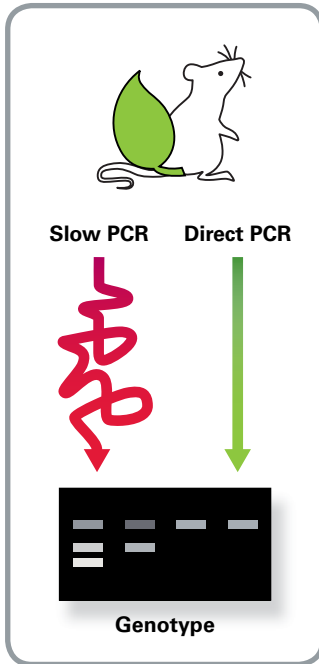
**Q11.** Electroporation으로 도입 가능한가?

**A11.** In-Fusion 반응 후 에탄올 침전에 의한 정제를 실시하면 대장균에 형질전환시 electroporation 방법을 이용할 수 있다.



# Terra™ PCR Direct

DNA 정제없이 Tissue를 이용해 PCR 반응!



## Direct PCR의 장점

DNA 정제 없이 crude extract나 소량의 tissue로부터 목적유전자 증폭. 샘플을 곧바로 PCR반응에 적용.

- DNA 정제 불필요
- 간편해진 반응 프로토콜
- DNA 정제에 소요되는 시간과 비용 절약
- 매우 극소량의 샘플만 필요
- 샘플 손실 방지



## Terra Direct PCR

DNA 추출과 정제 과정 없이 혈액, 동물/식물 조직이나 파라핀 절편 조직 등을 이용해 곧바로 PCR 반응을 진행할 수 있기 때문에 연구자들의 귀중한 시간과 연구비를 절약할 수 있다.

- 최대 2 kb까지 주형의 증폭 가능하며 70%이상의 GC 함량의 주형 증폭 가능
- Hot-start antibody 채용으로 특이성 향상되며,
- 매우 높은 민감도를 갖고 있기 때문에 극소량만 획득할 수 있는 귀중한 시료의 증폭에도 적합

### Genomes Amplified Using Terra PCR Direct

Human	Mouse	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Xenopus</i>	Yeast/Mycelia	Zebrafish
Cow	Sheep	Chicken	Lamb	Pig	Corn	Rice
<i>Arabidopsis</i>	Sugar cane	Cotton	Soybean	Mosquito	<i>Trichogramma</i>	Dragonfly
<i>H. pylori</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i>	Moss sporophytes	Chestnut	Arugula	

Code	제품명	용량
639270	Terra PCR Direct Polymerase Mix	200 rxns
639285	Terra PCR Direct Genotyping Kit	200 rxns
639284	Terra PCR Direct FFPE Kit	200 rxns
639287	Terra PCR Direct Card Kit	200 rxns