

Product News Letter 4호



User's Guide for

Ligation Independent Cloning Inspect into "Overlap Cloner"

- ✓ Cloning의 일반적인 방법
- ✓ 미래 기술 Recombineering
- ✓ "Overlap Cloner"의 원리와 응용분야
- ✓ 자주하는 질문
- ✓ Trouble Shooting



고객상담전화

042-581-8448

(주)엘피스바이오텍은 단백질
전문 생명공학 기업입니다

Cloning의 일반적 방법

Gene cloning은 현대 분자생물학의 핵심 기초기술로서 유전자의 기능, 구조 연구는 물론 유용단백질의 기초연구 및 산업적 활용분야에 이르기까지 필수적으로 사용되는 가장 기초적이면서 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 기술입니다. 1970년대 초반, 제한효소 (restriction enzyme) 그리고 DNA ligase와 같이 유전자의 절단과 연결에 필수적인 효소들이 발견되면서 독립적인 두 DNA 분자를 절단하거나 연결할 수 있는 유전자 조작의 방법적 가능성이 제시되고, 환상 DNA의 제작과 대장균으로의 형질전환방법이 확립되면서 cloning으로 명명되는 본격적인 유전자 조작의 시대가 열리게 되었습니다.

제한효소와 DNA ligase를 사용하는 이와 같은 전통적인 cloning 방법은 현재까지도 널리 사용되는 가장 기초적인 유전자 조작방법이지만 다루고자 하는 DNA 조각의 크기에 한계가 있다는 점과 함께 제한효소자리의 유무가 모든 것을 결정하는 치명적인 제약을 가지고 있었고 또한 절단/연결로 이어지는 과정에서 정제/조작/정제의 순환반복으로 인한 시간적 소모성이 크다는 단점이 있었습니다. 또한 연결하고자 하는 DNA의 중간부분에 사용할 제한효소자리가 하나 또는 그 이상으로 존재하는 경우, 적합한 다른 제한효소를 찾아보거나 중간의 제한효소자리를 변형/제거하는 지루한 작업으로 인해 cloning의 완성도는 실험자의 경험과 지식에 따라 달라지는, 즉 유전자 디자인의 완성도에 따라 결과의 품질이 달라지는 양상을 보여 왔습니다.

현대 분자생물학의 또 다른 핵심기반 기술인 PCR (polymerase chain reaction) 방법의 발전과 함께 cloning 방법도 비약적으로 발전하였으나 여전히 제한효소/DNA ligase를 이용하는 시스템의 전라적 변화 없이 50년의 세월이 흘렀습니다. PCR 산물의 cloning에 오랜 동안 사용되어온 TA cloning 방법 역시 제한효소/ligase를 이용하는 틀을 벗어나지는 못한 기술이었고 ligase independent 기술의 일종인 Topo cloning 방법은 여전히 마이너 기술로서 이를 대체하지 못하고 있는 실정입니다. 이러한 점에 주목하면서 cloning 방법의 일반적인 방법들을 개발 순서 별로 정리해 보고 최근 미래기술로 각광받고 있는 "recombineering"의 장점과 중요성에 대해 부각함으로써 본 글에서 강조하고자 하는 overlap cloning 방법의 장점과 편리성 그리고 중요성에 대해 말씀드리고자 합니다 .

앞서 언급한 대로 제한효소/DNA ligase를 이용하는 유전자 조작방법은 지금도 여전히 cloning 목적의 실험방법에 있어서는 대세를 이루고 있으며 어떤 방법이 제시되더라도 가장 보편적인 유전자조작 틀로서의 위치는 확고하여 앞으로도 크게 변하지 않을 것으로 예측하고 있습니다. 그러나 예전과 달리 다량의 유전자를 다뤄야 하는 상황이 많아지고 유전자들의 정보가 기하급수적으로 쌓이면서 보다 간단하고 조작이 용이하며 한번이라도 손이 덜 가는 새로운 방법들에 대한 끊임없는 탐구가 이루어져 왔습니다. 특히 한번에 많은 유전자들의 기능을 같은 조건에서 살펴보고자 하는 high-throughput 분석시스템들이 lab수준에서 이루어지는 기능연구는 물론 기업체가 주도하는 의약학분야에서도 활발히 적용되면서 새로운 cloning 방법의 필요성은 더 절실해지고 있는 실정입니다.

90년대 초반에 Aslanidis와 de Jong에 의해 제시된 LIC (ligation independent cloning) 방법은 T4 DNA polymerase의 exonuclease 활성을 이용하여 상보적인 base pairing을 만들어준 후 두개의 DNA 조각을 이어 붙인다는 원리에 근거를 두고 완전히 엉뚱한 방향의 cloning 방법을 제시하였지만 vector를 준비하는 과정이 비교적 까다롭다는 이유로 실험자들의 외면을 받을 수 밖에 없었습니다. 이후 uracil DNA glycosylase (UDG) 효소를 이용하는 방법, exonuclease 효소를 이용하는 방법, type IIIs 제한효소를 이용하는 방법, circular PCR을 이용하는 방법 등 다양한 방법들이 꾸준히 제시되어 왔으나 논문으로서만 그칠뿐 실제로 제품화되고 상용화된 기술은 T4 DNA polymerase를 이용하는 방법 정도였습니다.

또 다른 방향에서는 topoisomerase를 이용한 PCR cloning system 개발과 이를 이용한 directional cloning 방법의 개발이 꾸준히 이루어져 왔고, Cre/loxP, Flip/Flop, lambda Integrase/excisionase 등의 site-specific recombinase 효소들을 이용하는 system 들이 거의 동시간 대에 개발되어 다수의 유전자조각들을 빠르게 cloning하고 분석할 수 있는 기술적 실마리를 얻게 되었습니다. 현재 다양한 제품들이 상용화 되어 판매되고 있지만 (Invitrogen사의 Gateway, Clontech사의 Creator, Gene Bridges사의 Red/ET) 사용자의 수적 측면에서는 이 방법들 또한 여전히 제한적인 것 또한 사실입니다. 필자의 경우에도 site-specific recombination 방법인 lambda Integrase/excisionase 효소를 이용하는 시스템을 10여 년전 완벽히 구축해 놓고도 일절 사용하지 않았습니다. 그 이유는 재조합과정에 반드시 있어야 하는 DNA 특이서열의 추가로 인해 불필요한 아미노산 군더더기 서열이 붙을 수 밖에 없는 구조라는 점이 너무나 큰 단점으로 대두되었기 때문입니다. 결과적으로 native 상태의 최종 단백질 산물을 얻기 위해서는 별도의 subcloning 작업을 거치거나 또는 군더더기를 없애기 위한 추가 작업을 해야 하는 번거로움이 오히려 방법 자체의 편리성보다 더 강한 단점으로 작용한 결과라 할 수 있습니다. 다만 실험적 편리성에 있어서는 기존의 제한효소/DNA ligation 방법에 비해 월등한 진보가 있었음을 부정할 수는 없을 것입니다.

이후 상동서열의 재조합 기술을 이용한 다양한 제품들이 출시되었고 (Clontech사의 In-Fusion, System Biosciences사의 Cold Fusion, GenScript사의 CloneEZ), 기존의 site-specific recombination 방법들의 단점들을 보완할 수 있는 대체기술로 떠오르고 있습니다. 그러나 가격적인 문제와 함께, 서열의 크기와 DNA의 조각의 갯수 제한 그리고 까다로운 반응조건 등이 약점으로 평가되고 있습니다. 하지만 2000년대 이후 꾸준히 제시되어 온 sequence & ligation-independent cloning (SLIC) 기술에 가장 근접한 기술들로 평가할 수 있습니다.

결론적으로, 현재 cloning 기술은 1) 빠르며 2) 조작이 간단하고 3) 정확하며 4) 한번에 많은 sample을 다루는데 불편함이 없고 또한 5) cloning하고자 하는 DNA 조각의 크기 제한이나 6) DNA 조각의 갯수 제한이 적은 조건들을 충족할 수 있는 방향으로 개발되고 있습니다. 한 vector로 부터 목적 vector로의 유전자 전달 즉 subcloning이 한층 간편하고 유전자 조각들 끼리의 hybrid fusion이 쉬우며 cloning error가 적은 새로운 유전자 cloning 방법의 개발은 향후 유전자를 이용한 의약학 생물산업의 발전에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하게 될 것으로 믿어 의심치 않습니다. 이러한 관점에서 저희 엘피스바이오텍에서 개발하여 제품으로 출시하게 된 Overlap Cloning 기술은 보다 편리하고 정확한 cloning 방법의 새로운 패러다임을 제시해 드릴 것입니다.

미래 기술 Recombineering

재조합을 의미하는 Recombination과 공학을 의미하는 Engineering의 합성어인 "Recombineering"은 생물체가 가지고 있는 다양한 재조합방법들이 밝혀지면서 이를 인위적으로 이용하여 생물의 염색체 수준에서 특정 유전자 서열을 추가 또는 제거, 변형하는 등 인위적인 조작을 가하거나 또는 유전자 조각을 보다 간편하게 다루고자 하는 목적을 위해 지속적으로 개발되어 왔습니다. 간단하게는 bacteriophage의 recombination system을 이용한 방법들에서부터 최근 소개되어 각광을 받기 시작한 CRISPR/Cas9 system에 이르기 까지 다양한 방법들과 기술들이 개발되어 왔으며 폭넓은 분야로 적용범위를 넓히고 있는 상황입니다.

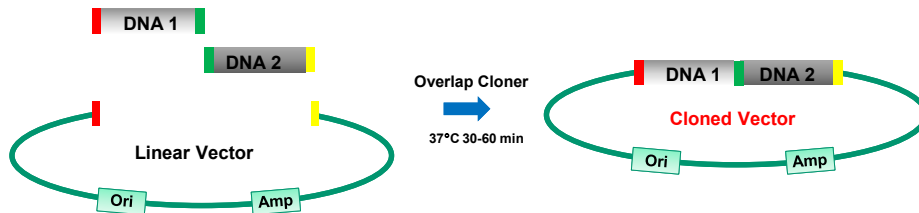
Recombineering을 이용한 유전자 조작기술은 기존의 방법들이 할 수 없었던 거대 유전자의 조작을 가능하게 하였으며, 염색체 수준에서의 염기서열 조작을 용이하게 했고, 무엇보다도 간단한 원리와 조작과정으로 인해 실험적 편리성을 제공하고 있기 때문에 향후 미래의 전략기술로 사용될 가능성이 점점 더 높아지고 있습니다. 이는 제한효소/ligation 시스템으로는 영두도 내지 못하던 일들이었기 때문에 그 가치는 더 높아질 것으로 예상하고 있습니다.

생물체는 다양한 재조합 시스템을 가지고 있으며 이를 *in vitro* 에서 적용하기 위한 연구의 발전 속도와 recombineering의 발전속도는 비례해 왔다고 볼 수 있습니다. 유전체를 대상으로 하는 분야는 본 글의 핵심을 벗어나는 분야이므로 recombineering 분야 전체보다는 범위를 축소하여 *in vitro* 에서 적용가능하고 누구나 하고 있는 일이지만 항상 어렵게만 느껴지는 기존의 cloning 방법들을 대체하여 사용할 수 있는 기술을 위주로 설명하고자 합니다.

Overlap Cloner의 원리와 응용분야

Overlap Cloner는 유전자의 상동재조합 (homologous recombination)을 *in vitro* 에서 구현한 기술로서 DNA 조각의 각 말단에 15 bp 이상의 크기로 동일 서열을 갖는 두 유전자 조각을 이어 붙이는 방식에 기초하고 있습니다. 이 방식의 유전자 연결방법은 site-specific recombination을 이용한 방법에서 처럼 attB/P나 loxP와 같은 특별한 염기서열을 필요로 하지 않으며 제한효소 자리의 유무에 영향을 받지 않고 또한 유전자를 실험자의 의도에 맞게 맞춤 재단으로 임의 조작할 수 있다는 큰 장점을 가지고 있습니다. 또한 말단에 상동서열만 있으면 중간서열이 다른 두 개 이상의 유전자 조각을 한 tube에 섞어준 후 한번 반응하는 것만으로도 어렵지 않게 여러 DNA 조각들을 이어 붙일 수도 있기 때문에 다수의 서로 다른 유전자 조각들을 이어 붙여, 기존에는 존재하지 않았던 새로운 유전자를 재창조할 수 있다는 기술적 이점도 제공하고 있습니다.

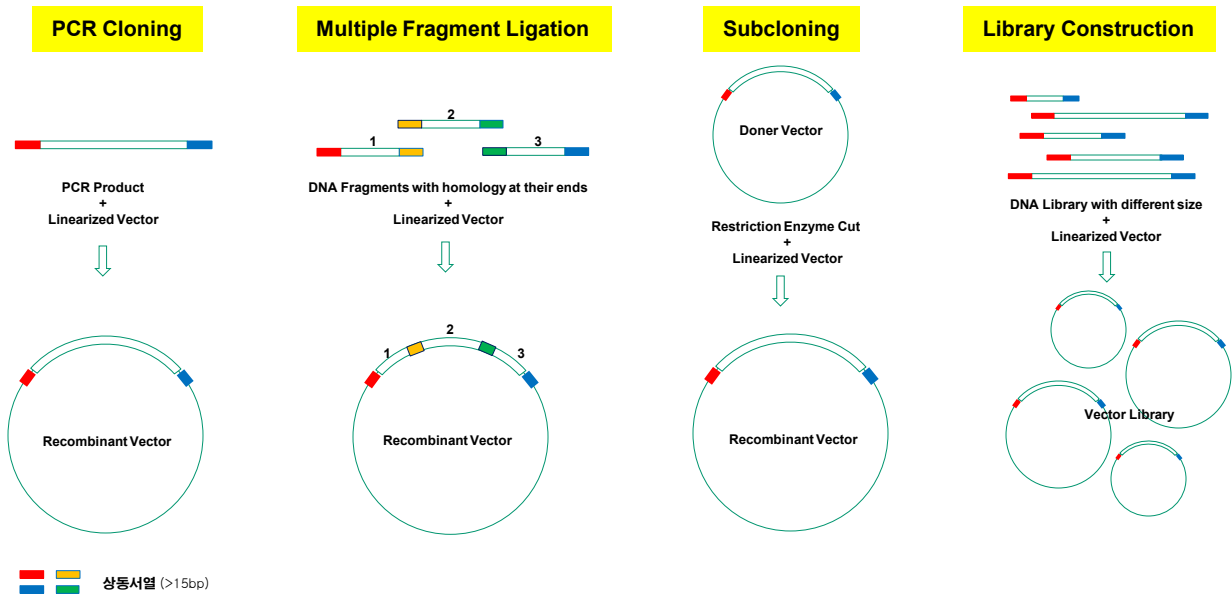
지금까지 두세 개 이상의 유전자를 이어 붙여야 하는 경우에 흔히 사용하던 방법들은 일련의 subcloning 과정을 반복하거나 또는 overlapping PCR 방법을 사용하는 것이 고작이었으나 두 가지 방법 모두 결과가 나오기 전까지는 성공여부를 가능하기가 어려웠습니다. 그 이유는 이러한 방법들이 실험자의 손을 많이 타는 실험방법이라는 것과 또한 최종 산물을 얻기까지의 시간이 오래 걸린다는 단점을 가지고 있었기 때문이었습니다. 이러한 문제점들을 한방에 해결한 기술이 Overlap Cloner 기술입니다. 저희 연구실에서 성공 가능한 DNA 단편의 최대수를 시험해 본 결과 4개 조각까지는 90% 이상의 효율로 연결이 가능하며 6개 조각의 경우는 transformation 효율이 떨어지지만 제대로 이어진 클론을 얻는데 문제가 없는, 성공적인 결과를 얻을 수 있었습니다.



제한효소자리를 이용하거나 또는 site-specific recombination을 이용하는 경우에 대두되는 또 하나의 문제점은 유전자 조각이나 또는 발현산물인 단백질에 불필요한 염기서열이나 아미노산 서열이 추가된다는 점입니다. 가장 간단하게 하더라도 6 bp를 인식하는 제한효소 자리는 두 개 이상의 아미노산을 최종 발현단백질에 추가하게 되는데 최종적으로 완벽한 native 조건의 단백질을 얻고자 하는 경우라면 제한효소자리에 의한 아미노산의 추가가 충분히 문제될 수도 있는 상황으로서 이를 원래의 native 조건으로 만들기 위해서는 protease를 사용하는 등의 복잡한 추가과정을 거쳐야만 했습니다. Site-specific recombination을 이용하는 방법에 있어서는 attB에는 8개 그리고 LoxP에는 11개의 추가 아미노산들이 발현단백질에 추가되며 이 정도 크기의 추가 아미노산들은 발현단백질의 본래 기능에 영향을 줄 수도 있는 크기나 구조를 형성할 가능성도 있습니다. 그러나 Overlap Cloner를 이용하는 유전자제작 방법에서는 불필요한 염기서열의 추가 없이 100% native 조건의 발현산물을 얻을 수 있으며 그 여부는 실험자의 서열디자인에 따라서 완벽하게 결정된다는 것입니다. 즉 원하는 모든 서열을 100% 임의 조작 가능하다는 얘기이며 그 어떤 방법보다도 가장 깔끔한 cloning 결과를 얻을 수 있는 방법이기도 합니다.

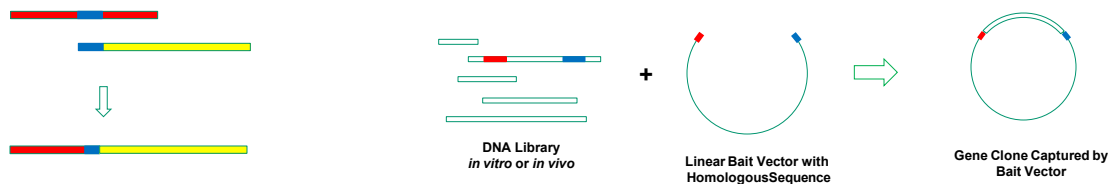
실제로 Overlap Cloner 방법을 이용하여, 상용화된 vector 내에서 불필요한 서열들을 임의로 제거함으로써 정확한 기능의 최소 단위로 이루어지는 깔끔한 vector를 만드는데 현재 이용하고 있으며, vector의 각 활성서열들을 카세트 (gene cassette)로 제조하여 필요에 맞게 맞춤 vector를 만들기도 하고 있습니다. 세계적으로는 합성생물학 (synthetic biology) 분야에서 새로운 유전자 또는 유전자 복합체의 인위적 합성에 많은 연구를 하고 있으며 최소유전자 단위를 biobrick으로 합성하고 이를 재조합 하고자 하는 노력을 진행하고 있습니다 (Shetty et al., Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. J. Biol. Eng. 2, 5 (2008)).

다음의 모식도는 Overlap Cloner를 이용해 적용 가능한 실험들의 예를 보여주고 있습니다. 가장 보편적이며 많이 사용하는 실험적 내용만을 요약한 것으로서 Overlap Cloner의 적용분야는 무궁무진하며 이는 실험자의 상상력에 따라 그 영역이 달라질 수 있습니다.



Overlap Cloner는 또한 DNA의 양 말단이 100% 일치하지 않는 경우, 즉 불일치 서열이 말단 쪽으로 추가되어 있는 경우에도 작동하며, 효율은 불일치 서열의 길이에 비례하여 줄어드는 경향을 보이지만 기존의 다른 cloning 기술들을 이용해서는 상상도 할 수 없었던 다양한 유전자 조작의 기술적 실마리를 제공하고 있습니다. 그 예 중 하나가 gene fishing의 가능성을 열어주었다는 것입니다. 본 회사의 연구실에서는 gene fishing 가능성에 대해 현재 다각도의 연구를 진행하고 있습니다.

Gene Fishing



Products	Qty	Cat. No.	가격(₩)
OVERLAP CLONER DNA Cloning Kit	25 rxn	EBK-1011	200,000
	100 rxn	EBK-1012	600,000

No Restriction, No Ligation, 10~40 kbp의 큰 DNA까지, 4개까지의 유전자 조각도, 90% 이상의 높은 효율로, 짧은 시간 동안, 완전 정확하게, 그리고 저렴하게 Cloning을 할 수 있습니다

제품문의 : 042-581-8448
 E-mail : elpis@elpisbio.com

- 샘플은 5회 사용량으로 제공됩니다.
- 본 제품에는 competent cell이 포함되어 있지 않습니다.
- 1,000회 분량 이상도 저렴한 가격에 구매 가능합니다.
- Kit 구성 : - Overlap Cloner Enzyme Mix
 - Overlap Cloner 10x Reaction Buffer
 - Control Vector
 - Control Insert (LacZ DNA)

Overlap Cloner를 이용한 실험 예

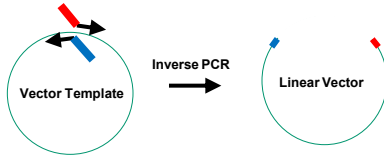
Vector DNA의 준비 :

1. 제한효소 절단을 이용한 vector 준비 :

Cloning에 사용하고자 하는 vector를 제한 절단하여 선형화 한 후 반응에 사용할 수 있습니다. 이 때 가능하면, 두 가지 다른 종류의 효소를 이용하여 절단하는 것이 self-ligation을 방지하여 효율을 높일 수 있는 방법입니다.

2. Inverse PCR을 이용한 linear vector 준비 :

적절한 제한 효소 위치가 없는 경우이거나 또는 임의의 상동 부위를 넣어주고 싶은 경우, inverse PCR을 수행하여 vector를 준비할 수 있습니다. Cloning 하고자 하는 부위의 염기 서열과 insert DNA의 말단 상동성 부위 (15 bp 이상)를 포함한 primer를 이용하여 vector를 template로 PCR 하는 방법입니다. 이 때 PCR에는 PCR error가 적은 Pfu 계열의 중합효소 사용이 필수적이며 반응에 사용하기 전 template를 Dpn I 제한효소로 제거해 주는 과정이 필수적입니다.



Insert DNA의 준비 :

1. 제한효소를 이용하는 경우 :

Insert DNA를 잘라낼 수 있는 양쪽의 제한 효소를 이용하여 자른 후 gel extraction을 통해 단일 DNA 조각으로 정제한 후 cloning에 사용합니다. 이 때, 양쪽 말단에 vector DNA 말단과 상동 서열을 가지고 있어야 하며, 서열의 확보가 용이치 않은 경우 다음과 같이 PCR을 이용하는 방법으로 inset DNA를 준비합니다.

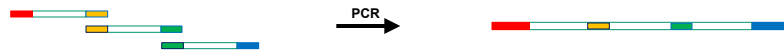
2. PCR을 이용하는 경우 :

PCR을 이용하여 vector를 준비하는 방법에서 처럼, vector의 말단 부위와 상동부위 (15 bp 이상)를 가질 수 있도록 primer를 합성하여 PCR을 한 후 정제하여 cloning 반응에 이용할 수 있습니다. 이 때, 재조합에 사용되는 추가 서열에 제한 효소 위치를 넣어주면 cloning의 성공여부를 확인하는 과정에서 유용하게 사용될 수도 있습니다 .



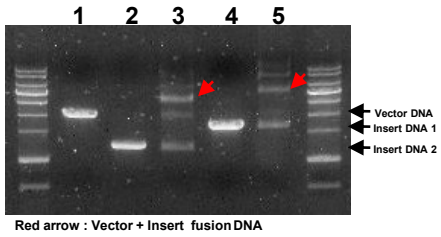
3. 두 개 이상의 insert DNA를 이어 붙이고자 하는 경우 :

Overlap Cloner의 가장 중요한 장점인 여러 조각의 DNA를 추가부분 없이 이어 붙이고자 하는 경우, 각 DNA의 상동 부위를 그림과 같이 순서대로 만들 수 있도록 디자인된 primer를 이용해 PCR을 하고 vector DNA와 섞은 후 반응하여 cloning하면 됩니다. 이때, 각 상동 부위가 유사하지 않도록 하는 것이 클로닝 효율에 도움을 줍니다.



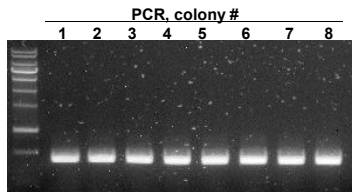
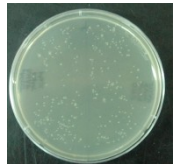
실험 예 1 : Subcloning

한 vector에 들어 있는 insert DNA를 다른 vector로 옮기고자 하는 경우로서 vector내에 존재하는 상동서열에 대한 primer로 vector DNA를 inverse PCR로 준비하고 insert DNA를 PCR로 준비한 후 DNA 단편을 정제하고 Overlap Cloner로 반응하여 *E.co*에 transformation 하였음.



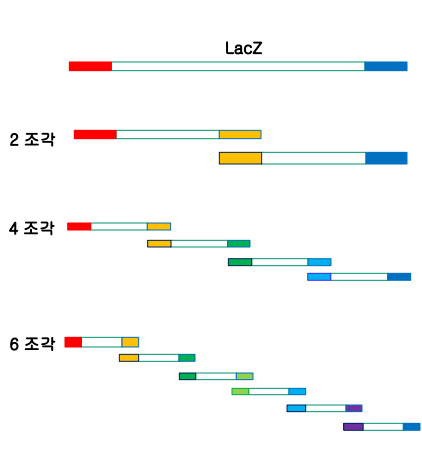
- Ligation reaction by overlap cloner
- 1. Vector DNA : prepared by PCR
- 2. Insert DNA 1 : prepared by PCR
- 3. Vector + Insert DNA 1 : Overlap Cloner
- 4. Insert DNA 2 : prepared by PCR
- 5. Vector + Insert DNA 2 : Overlap Cloner
- 37°C, 30 min, 10 µl reaction
- 1 µl transformation to DH5α competent cells
- Colony picking & growth
- PCR with specific primer pair

Transformation,
Overnight growth on
LB/Amp plate,
Colony picking & growth,
Colony PCR

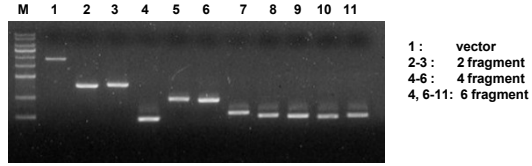


실험 예 2 : Multi Fragments Fusion Ligation

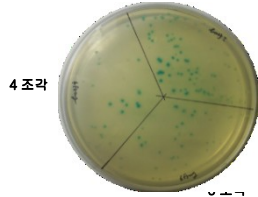
3 kbp의 LacZ 유전자 서열을 20 bp정도의 상동서열을 가지도록 여러 조각으로 나눈 후, linearized vector와 섞고 하나의 tube에서 반응하여 LacZ 활성을 갖는 정상적인 LacZ 유전자가 만들어 지는지의 여부를 blue/white screening 방법으로 확인함.



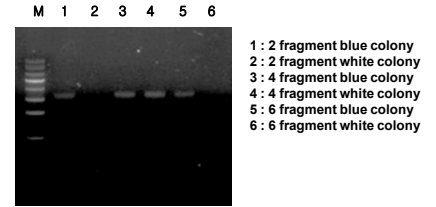
DNA preparation



Transformation : Blue colonies



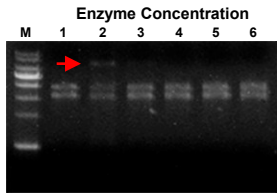
Colony PCR assay



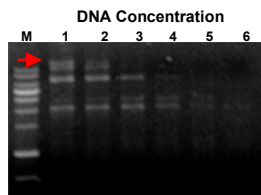
실험 예 3 : Overlap Cloner 반응의 최적화 : DNA 농도, 반응온도, 반응시간 등

3 kbp의 LacZ 유전자를 실험모델로 하여 Overlap Cloner 반응의 최적 조건을 확인함. kit에 제공하는 enzyme 1 μ l를 사용했을 때, 약 300-400 ng의 DNA를 사용하고 37°C에서 30-60 분 반응하는 조건이 최적임을 알 수 있었음. (단, vector와 insert DNA의 크기에 따른 양과 시간이 다를 수 있으므로, 별도의 최적화 실험이 필요할 수 있음.)

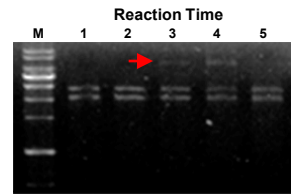
Overlap Cloner의 반응조건에 따른 효율 변화



M : marker
1 : control
2 : 1 μ l
3 : 0.5 μ l
4 : 0.25 μ l
5 : 0.125 μ l
6 : 0.0625 μ l
* DNA 농도는 동일

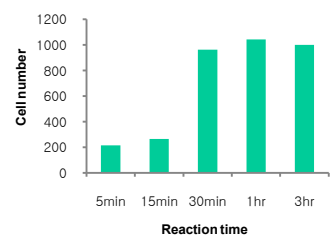
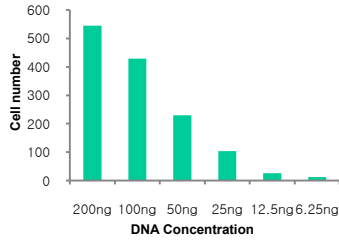
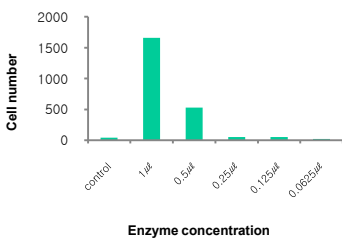


M : marker
1 : 200ng
2 : 100ng
3 : 50ng
4 : 25ng
5 : 12.5ng
6 : 6.25ng
* Enzyme 농도는 동일



M : marker
1 : 5min
2 : 15min
3 : 30min
4 : 1hr
5 : 3hr
* Enzyme, DNA 농도는 동일

* Red arrow : Vector + Insert fusion DNA



관련 제품

Products	Qty	Cat. No.	가격 (₩)
Pfu Plus DNA Polymerase	500 unit	EBT-1402	200,000
Pfu Plus 5x PCR Master Mix	1 ml (250 rxn)	EBT-1403	120,000
Dpn I	500 unit	EBR-1045	70,000
Gel Extraction Kit (spin-type)	200 prep	EDB-1005	180,000

자주하는 예상 질문

1) 제한효소/ligase를 이용한 방법과 비교하여 Overlap Cloner를 이용한 cloning 효율이 더 좋은지요?

저희 엘피스바이오에서 제공하는 Overlap Cloner Cloning Kit는 완전히 새로운 개념의 cloning 방법으로서 기존의 방법들과는 원리부터가 다른 제품입니다. Overlap Cloner의 특징은 일반적인 ligation 방법과는 달리 어느 위치든지 cloning이 가능하고 여러 DNA 조각들도 한번에 이어 붙여서 cloning할 수 있다는 것입니다. 어느 반응이나 마찬가지로 Overlap Cloner의 사용에 있어서도 최적의 조건이 이에 따라 나오는 효율은 달라질 수 있습니다. 보편적인 ligation 방법의 경우에도 DNA의 상태나 반응 조건에 따라 효율적인 측면에서 많은 편차를 보이듯이 Overlap Cloner를 사용할 때 또한 최적화 조건에 따라 효율이 달라질 수 있으므로, 효율적인 측면에서는 두 가지 방법을 직접 비교할 수는 없고, 반응이 간편하다는 점에서 정수를 더 주어야 할 것으로 판단됩니다. 또한 Overlap Cloner를 이용하는 cloning에서는 제한효소자리를 찾는 데 귀중한 시간을 낭비하지 않아도 됩니다. 또한 여러 조각을 이어 붙이는 실험에서 제한효소 자리를 찾느라 골머리를 싸매지 않아도 됩니다.

2) 상동 서열의 길이가 꼭 15 bp 이상 이어야 하는지요?

Overlap Cloner에 사용하는 enzyme mix의 기본적인 기능 테스트 결과 최소한의 상동 서열이 15 bp 이상 이어야 하는 것을 알 수 있었습니다. 일반적으로, 15-20 bp가 적당한 길이로 되어 있으며, 그 이상의 상동 서열도 가능하나, primer 제작과 PCR 반응으로 cloning에 사용할 insert DNA를 얻어야 하므로 이에 따른 효율 문제 등을 고려했을 때, 본 연구소에서 권장하는 상동 서열의 길이는 최소 15 bp에서 20 bp 정도입니다. 제한효소를 이용해 vector와 insert DNA를 준비하는 경우 overlap서열은 100 bp 이상이 되어도 무난하지만 overlap 서열이 길어질 수록 transformation 효율은 감소하는 경향을 보이고 있습니다. 따라서 DNA를 준비하는 최소비용을 고려하고 효율극대화를 고려했을 때 최소 15-20 bp의 overlap 서열을 이용하는 것이 최상의 조건이라 할 수 있습니다. DNA의 말단에 비매칭 서열이 존재해도 cloning은 되지만 비매칭서열의 길이에 따라 효율은 급격히 감소합니다.

3) Transformation 후 colony 갯 수가 매우 적은 경우엔 무엇이 문제인가요?

Overlap Cloner는 일반적인 cloning 방법과 마찬가지로 vector DNA와 insert DNA의 기본적인 반응 양 (50 - 100 ng)과 물비 (1:1) 등의 최적화 조건을 필요로 하는 방법입니다. 따라서, 이러한 조건들이 맞지 않을 경우, transformation 효율이 매우 낮아질 수도 있습니다. 10 µl 표준반응용액에서는 vector의 양을 50 - 100 ng으로 사용하는 것이 가장 효율적입니다. 반응의 전체 볼륨을 늘려야 하는 경우에는 vector DNA는 물론 insert DNA의 양도 늘려주는 enzyme mix의 양도 비례하여 늘려주어야 합니다. 더불어 vector DNA와 insert DNA의 물비 (양적 비율이 아닙니다)는 항상 1:1로 맞춰주는 것이 가장 높은 효율을 얻는 방법입니다. Transformation 효율이 낮아질 수 있는 또 하나의 원인은 cloning을 위해 준비한 DNA들의 정제도에 문제가 있는 경우입니다. DNA에 오염될 수 있는 phenol, ethanol과 같은 유기용매는 효소반응을 방해하며, EDTA는 효소반응을 정지시킬 수도 있습니다. 따라서 충분한 wash를 거쳐 PCR purify 또는 gel extraction을 한 DNA를 사용해야 합니다.

4) Insert DNA의 크기에는 제한이 없는지요?

Overlap Cloner는 insert DNA의 크기 제한 없이 사용할 수 있습니다. 50 bp 미만의 크기부터 수 kb의 크기를 가진 insert DNA를 사용해도 무방합니다만 크기가 커질 수록 대장균의 transformation 효율이 급격히 떨어지므로 이점을 사전에 충분히 감안해서 실험을 해야 합니다. 일반적인 ligase를 이용한 방법과 비교했을 때, 크기가 큰 insert DNA의 경우 cloning 효율이 더 좋으며, 이론적으로는 수십 kb의 insert DNA도 기존의 방법보다 높은 효율로 cloning 할 수 있습니다. 10 kb정도의 insert DNA는 어렵지 않게 cloning 되는 결과를 얻었습니다. 다만 문제는 대장균의 transformation 효율이 DNA의 크기에 비례하여 떨어진다는 점입니다.

5) Vector와 insert DNA의 비율은 어떻게 계산해야 하나요?

Vector와 insert DNA의 비율은 molar ratio (몰비) 1:1로 하는 것이 가장 좋은 효율을 보입니다. 일반적으로 vector와 insert DNA의 크기가 같을 경우 같은 양의 비율로 반응 시키면 됩니다. 그러나 보통 insert DNA의 크기가 vector DNA와 다를 경우가 더 많으므로 크기에 따른 몰비를 계산해서 1:1 정도가 되게 맞추어 반응시키는 것이 좋습니다. 이를 수식으로 만들어보면 다음과 같습니다

$$\text{Insert DNA 양} = (\text{Insert DNA 크기} / \text{Vector DNA 크기}) * \text{vector DNA 양}$$

예를 들어, vector DNA 크기가 3 kbp, insert DNA가 1 kbp 크기라면, 100 ng의 vector DNA를 사용하고자 할 때, insert DNA는 33 ng을 넣어주면, 물비가 1:1이 됩니다.

6) 일반적인 ligation방법에서 처럼 overnight 반응도 가능한지요?

기존의 유사한 kit들의 경우엔 짧은 반응시간 또는 높은 온도 등의 까다로운 반응조건들을 제시하고 있지만, 저희 엘피스바이오의 Overlap Cloner는 37°C 온도에서 반응시간의 제약 없이 그리고 전처리나 후처리 과정 없이도 충분한 cloning 효율을 보이고 있으며, overnight 반응 시에도 주목할만한 효율의 변화가 없는 것으로 확인되고 있습니다. 이러한 점에서 타사 제품들과는 차별화된다고 볼 수 있습니다.

7) Vector와 insert DNA 모두 정제 후 사용해야 하는지요?

Overlap Cloner의 경우에는 DNA의 정제 후 사용을 필히 권장하고 있습니다. 그 이유는 PCR buffer나 제한 효소 buffer에 포함된 성분들이 cloning 반응의 저해요소로 작용할 수 있기 때문입니다. 또한, PCR를 이용해 DNA를 준비하는 경우 template로 사용한 DNA의 오염이 background로 나타날 수 있으므로 template DNA를 제거하는 과정(가령 Dpn I의 처리), gel extraction 또는 PCR purification을 병행하여 DNA를 정제한 후 cloning 반응에 사용하는 것이 좋습니다.

8) Transformation을 하기 전 효소반응을 정지시키는 과정이 필요하거나 또는 반응산물의 정제과정이 필요한가요?

Overlap Cloner는 상당히 안정적인 효소반응을 이용하므로 heat inactivation과 같은 효소반응 정지과정이 불필요하며 반응산물을 ice에 둘 필요도 없습니다. 반응이 끝난 후 바로 transformation에 이용하거나 또는 장기보관할 경우 반응산물을 -20°C에 보관하시었다가 나중에 사용하시면 됩니다. 또한 반응 후 반응산물을 특별히 정제해 사용할 필요도 없습니다. 반응산물 1-2 µl를 직접 transformation에 사용할 수 있으며 정제를 해도 transformation 효율에는 크게 영향을 주지 않습니다. Electro transformation을 하는 경우, 반응용액에 존재하는 salt가 spark를 일으킬 수 있으므로 정제를 권하지만 40 µl의 electro competent cell을 사용하고 단지 1 µl 미만의 반응산물만을 transformation에 사용하는 경우라면 굳이 정제를 하지 않더라도 salt에 의한 spark는 일어나지 않습니다.

9) 반응으로 생성된 hybrid DNA는 어떤 형태인가요?

Overlap Cloner를 이용하여 만들어진 DNA hybrid는 ligation을 이용한 반응에서 처럼 두 DNA 분자가 공유결합으로 붙어 있지 않은 상태입니다. 상동서열의 DNA 교환에 의해 수소결합으로 base pairing이 되어 있고 양끝에 nick이 형성되어 있는 상태이므로 반응산물의 온도를 높이면 두분자는 그대로 떨어지는 구조입니다. 따라서 반응산물에 높은 온도를 가하게 되면 두 DNA는 떨어지므로 transformation 효율에 영향을 줄 수 있습니다. Nick을 가지고 있는 plasmid DNA는 대장균내로 들어가 repair과정을 거쳐 정상적인 closed circle 형태의 온전한 plasmid가 됩니다

10) Overlap Cloner kit의 보관 기준은 어떤지요?

본 kit의 보관은 일반 효소의 경우처럼 -20°C에서의 보관을 권장하고 있습니다. -20°C에서는 최소 1년간은 뚜렷한 활성저하를 보이지 않습니다. 모든 효소제품들과 마찬가지로 반복적인 제품의 온도변화는 효소의 활성에 치명적인 영향을 줄 수도 있습니다.

Trouble Shooting

문제점	가능한 원인	해결방안
Transformation 후 colony 숫자가 매우 적거나 거의 없는 경우	Transformation 효율이 너무 낮은 경우	보유한 competent cells의 transformation 효율을 pUC19와 같은 표준 plasmid를 이용해 확인해 봅니다. 최소 $1 \times 10^7/\mu\text{g}$ DNA 이상의 효율을 보이는 cells을 이용하기 바랍니다.
	적절한 antibiotics를 사용하지 않은 경우	Antibiotics selection을 통한 cloning을 위해서는 사용한 vector DNA가 가지고 있는 antibiotics resistance 유전자에 해당하는 antibiotics를 사용해야 합니다. 일반적으로 pUC19 계열의 vector는 ampicillin을 사용하며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 LB plate에 넣어줘야 합니다.
	너무 많은 양의 반응액을 transformation에 사용한 경우	일반적인 transformation protocol에 따라 DNA 양을 사용하고, 경우에 따라 반응액이 competent cell에 toxic 할 수 있으므로, TE buffer나 증류수에 희석해서 (1:5-1:10) 사용하여 결과를 보기 바랍니다.
	Vector 또는 insert DNA의 양이 너무 적은 경우	Overlap Cloner는 상동 서열을 인지하여 연결해 주는 기작으로 작동하기 때문에 충분한 DNA의 양이 필요합니다. 따라서, 최소 50 ng 이상의 vector DNA와 insert DNA가 필요하며, 권장 양인 50-200 ng의 DNA를 이용하여 반응시키기 바랍니다.
	Vector 또는 insert DNA에 최소 15 bp 이상의 상동 서열이 존재하지 않는 경우	기존 vector를 제한 효소로 잘라 이용한 경우, cloning 위치에 상동 염기 서열이 존재하는지 확인해야 합니다. PCR을 이용하여 vector 또는 insert DNA를 준비한 경우, 사용한 primer의 염기 서열이 제작한 염기 서열과 맞는지 확인해봐야 합니다. 중간 또는 말단에 맞지 않는 염기 서열이 의도치 않게 들어가 있으면, cloning 효율이 급감합니다. 준비 과정에서 DNA에 손상이 생길 수 있으며 이 경우에도 같은 문제가 발생할 수 있습니다. DNA 준비 과정에도 주의가 필요합니다.
	Overlap Cloner enzyme mix가 적절히 보관되지 않은 경우	Overlap Cloner enzyme mix는 -20°C 에서 보관해야 하며, 장시간 상온 보관시 성능이 크게 떨어지며, 또한 반복된 freezing 과 thawing으로 인해 성능이 떨어질 수 있습니다.
	Overlap Cloner의 반응온도와 반응 시간이 적절치 않은 경우	Overlap Cloner enzyme의 반응 시간은 본 연구소의 테스트 결과 overnight 반응시에도 크게 떨어지지는 않으나, 약 3 시간 이내에서 가장 높은 효율을 얻을 수 있고, 37°C 온도에서 가장 효율이 높은 것으로 확인 되었습니다. 따라서 이에 준하는 조건에 맞춰 반응을 하는 것이 좋습니다.
대부분의 transformation colony가 insert DNA를 가지고 있지 않거나 또는 다른 서열의 DNA를 가지고 있는 경우	Vector DNA가 완전히 linearized 되어 있지 않은 경우	Overlap Cloner에서 vector의 linearization은 매우 중요합니다. 완전히 linear 되어 있지 않은 vector 또는 남아 있는 template DNA는 반응 전에 모두 제거되어야 합니다. 문제가 생기면 다시 cutting하고 정제해서 사용할 것을 권장합니다. Vector의 오염여부를 확인하기 위해서는 vector만을 가지고 transformation을 수행하여 colony가 형성되는지 확인해야 합니다.
	Contaminated DNA가 반응에 포함 되었을 경우	PCR을 이용해 얻은 vector나 insert DNA에는 template DNA가 완전히 제거되지 않고 남아 있을 수 있습니다. Circular 형태의 DNA는 transformation에 우선적으로 사용되므로 이러한 DNA의 오염이 있는 경우 얻어지는 대부분의 colony는 의도하지 않았던 다른 DNA를 가지고 있을 확률이 높아집니다. 가급적 size구분이 가능한 gel purification 방법으로 DNA를 준비하는 것이 유리하며, vector DNA는 methylated template를 구분하여 자르는 Dpn I 같은 효소로 미리 처리한 후 정제하여 사용하는 것이 좋습니다. 또한 정제 과정이나 DNA 준비과정에서 각종 시약이나 전기영동 장치에 오염되어 있던 DNA가 반응에 오염되어 transformation후 엉뚱한 colony로 출현할 가능성도 있습니다. 주변환경은 언제나 청결해야 합니다.
	Insert DNA가 비특이적 PCR 반응물인 경우	비특이적 PCR 산물을 반응에 그대로 사용한 경우 예상했던 것과는 완전히 다른 서열의 cloning 결과를 얻을 수도 있습니다. PCR 조건이 적절하지 확인을 해야 합니다. Primer 조건이나, annealing 온도, 사이클 조건 등 최적화 조건을 확인하고, 최종 산물을 제한 효소 절단 같은 방법을 통해 미리 검증한 후 반응에 사용하면, 이런 문제를 줄일 수 있습니다.

ELPIS-Biotech. Inc.
www.elpisbio.com

보다 자세한 자료를 원하시면 www.elpisbio.com 을 방문하시거나 이메일 elpis@elpisbio.com 또는 전화 042-581-8448로 문의를 주시면 성심껏 답변을 드리겠습니다