

Recombinant DNA technology

Recombinant DNA technology (重組 DNA 技術)自 1970 年代發表至今，已廣泛被使用在基礎研究上。所謂的重組 DNA，指的是將兩個不相干的 DNA 結合在一起。重組 DNA 得到後便可進行下游分析。簡單的來說完整的 DNA 重組技術可能涉及三個部份：(1) Cloning、(2) Gene Delivery、(3) Analysis。

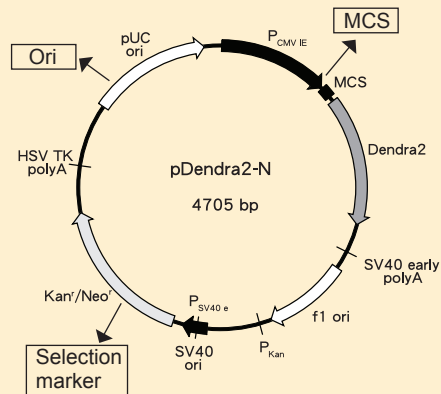
Cloning

在重組 DNA 技術上，不可或缺的是裝載重組 DNA 的載體，統稱為 Vector。最常被使用的 Vector 是能在細菌中大量增殖的 Plasmid。一個 Plasmid 至少得含有三個部份：(1) MCS (Multiple cloning site)、(2) Replication origin (Ori) 及(3) Selection marker。MCS 提供外來 DNA 接入點，Ori 則使 plasmid 能在細菌中大量繁殖複製，依複製能力還可以分為 high/ medium/ low copy number。而 Selection marker 提供挑選出成功的轉型 Plasmid 至細菌的機制，常見的 marker 包括 Ampicilin resistant gene (Amp^r) 及 Kanamycin resistant gene (Kan^r)，使用時，只需在培養基中加入適量的抗生素即可，具有 plasmid 的細菌具有抗藥性，可以大量繁殖。

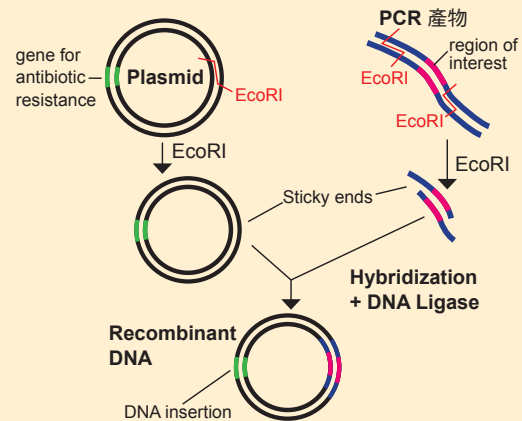
而將外來 DNA (後稱 Insert) 接入載體的過程稱之為 Cloning。Cloning 方式多樣化，常見方式還是利用 Restriction enzyme (限制酶) 及 Ligase (接合酶) 進行剪接。步驟如下：

1. Insert 的取得：常利用 PCR 外掛上合適的 Restriction enzyme cutting sequence，得到具有合適切位的 DNA 片段。並利用限制酶切出合適的端點。
2. Linear plasmid 的製備：利用限制酶將 plasmid 裁剪，產生的端點能與 insert 對應接合。若為 blunt end ligation 者，可以對 vector 進行去磷酸化反應以避免 self-ligation 的現象。
3. Ligation：將製備好的 Plasmid 及 Insert 以合適的比例混合，以接合酶進行 Ligation。

Vector Map



Cloning 簡圖



超強改版

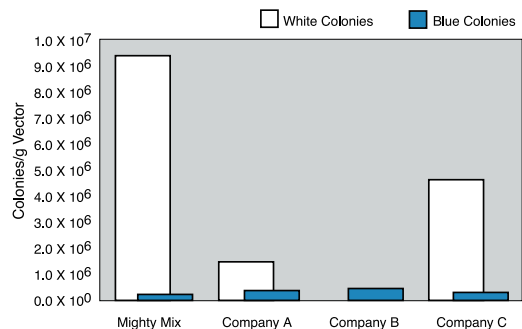
傳統 Ligation 是在 4°C 水浴槽中靜置 16 小時完成，而 TAKARA 公司最新突破，讓 Ligation 只需 5 分鐘。

Takara

DNA Ligation Kit, Mighty Mix

- 高效率，室溫僅需 5 分鐘即可完成實驗！
- 小體積，不浪費 sample！
- T/A Cloning 用讚 · Blunt end cloning 用更讚！

貨號	品名	包裝
6023	DNA Ligation Kit, Mighty Mix	75-150 rxns



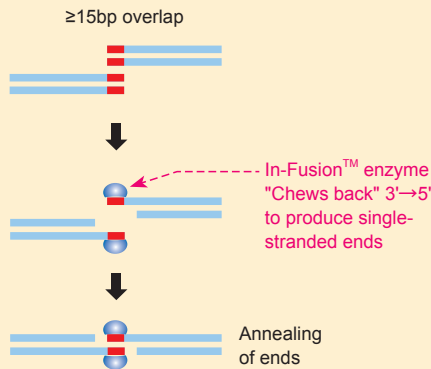
Blunt-Ended Ligation Efficiency Comparison with Takara's DNA Ligation Kit, Mighty Mix and Three Competitors. A: Promega's, LigaFast™, B: BioLine's, QUICK-STICK and C: NEB, Quick Ligation™ Kit. Each ligation reaction contained 25 fmol of BAP-treated pUC118-Hinc II vector and 75 fmol of a 500 bp insert.

當遇到下述問題時，傳統 Cloning 方式可能變得十分麻煩且失敗率大幅提高。

- 載體上限製酶切位不只一處時
- 無合適切位，僅能以 **Blunt end** 方式接合時。
- 需要多片段接合時
- 不想要有多餘序列時

此時，建議參考 Clontech 推出的 InFusion Cloning Kit。InFusion 利用任兩段線性 DNA 欲接合處具有相同的序列進行重組。簡單原理圖示如下：

簡單原理圖



InFusion 不僅能取代傳統 Cloning 並克服眾多限制，提供使用更多的便利。

以發表在 2007年 *Biotechnology* 中的文章篇作為範例：
BioTechniques® September 2007 Volume 43, Number 3: pp 354-359

作者目標是接合三個片段至一個表現載體中，分別是 PD-L2 的 extracellular domain (693 bp)，CD101 extracellular domain 序列 (2799 bp) 及 IgG3 的 Fc domain (771 bp)。根據 InFusion 原理需求，作者利用 PCR 方式，將第一段 insert 的 5 端外掛與載體端點相同的 15 bp 序列 (紅色)，其 3 端外掛上與第二段 insert 的 5 端相同的序列 (藍色)。而第三段的 insert 同樣可以 PCR 方式，使之帶有與前後 DNA 相同的序列。

Primer design

Primers for PCR Amplification of the PD-L2 Extracellular Domain, IgG2a Fc, and IgA Tailpiece

PD-L2 Extracellular Domain with 15 bp Overlaps to NcoI-Digested Vector and IgG2a Fc, 693 bp PCR Product

Sense (NcoI site is underlined)
5'-TTCAAATCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTAT-3'

Antisense
5'-CTTGATTGTGGGCCCTCTGGGGACTTTGGGTCCATCCGA-3'

IgG2a Fc, 678 bp PCR Product

Sense
5'-GGGCCCAACAATCAAGCCCTGTCTCTC-3'

Antisense
5'-CCGGGAGAAGCTCTTAGTC-3'

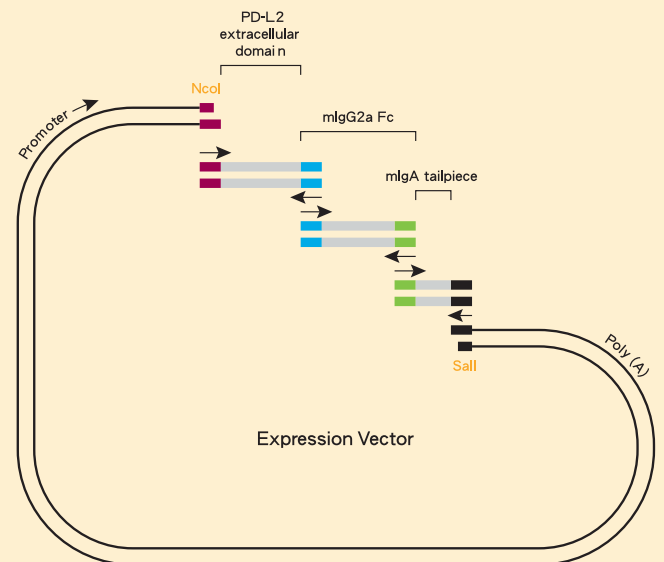
IgA Tailpiece with 15 bp Overlaps to IgG2a Fc and Sall-Digested Vector, 100 bp PCR Product

Sense
5'-AAGAGCTTCTCCCGGCTGTCTGGGTAAACCCACCAATGTCAG-3'

Antisense (Sall site is underlined)
5'-AGTAACGTTAGTCGACTCACTAGTAGCAGATGCCATCTC-3'

Overlaps are colored to match Figure 1.

Cloning 策略



Seamless construction of a three-domain immunoglobulin fusion protein with a four-piece In-Fusion reaction. Segments were generated by PCR using primers that contained a 15 bp overlap with the adjacent segment, and 20–30 bp of segment-specific sequence. Colored regions indicate overlap regions with 15 bp of identity. Arrows indicate PCR primers. The segments were joined to a NcoI-SalI-digested expression vector in a ligase-free In-Fusion reaction.

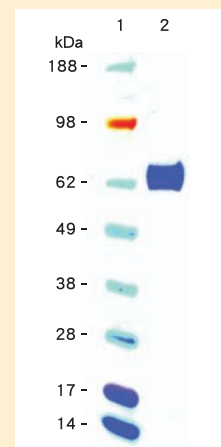
結果發表

120 顆菌落，正確率 100% (2/2)。

Transformation Efficiency of a Four-Piece In-Fusion Reaction

PD-L2 Extracellular Domain	IgG2a Fc	IgA Tailpiece	Vector	Total Transformants	No. Error-Free/No. Sequenced
693 bp, 6.1 ng	678 bp, 6.0 ng	100 bp, 0.9 ng	11,365 bp, 50 ng	120	2/2

送入 CHO Cell 中，能正確表達出抗體。



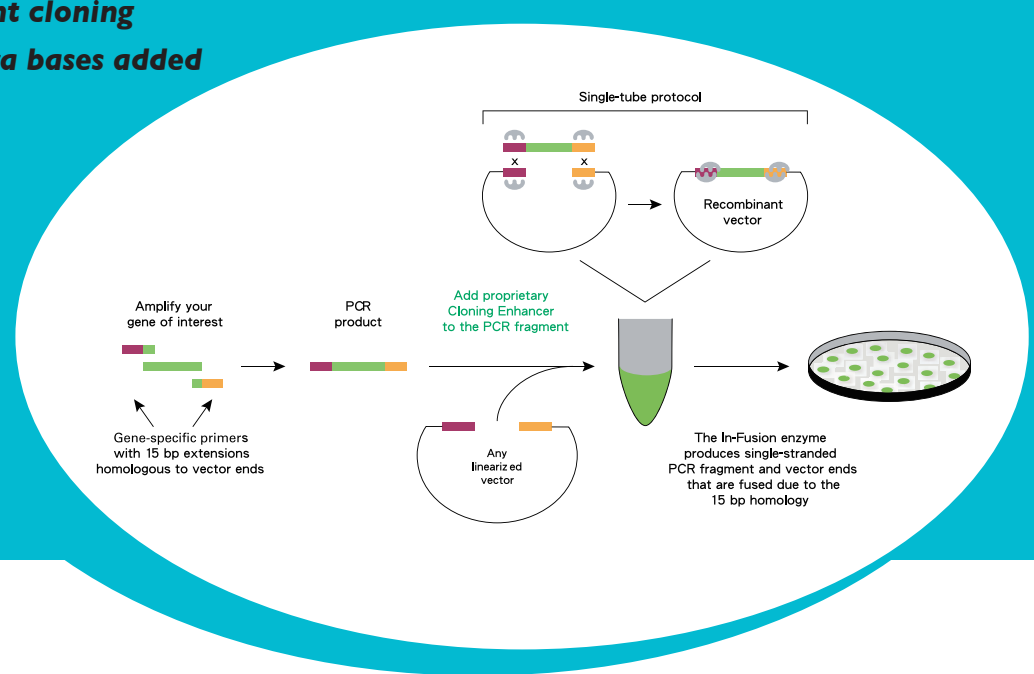
Recombinant Protein One μ g of purified protein was analyzed using SDS-PAGE under reducing conditions and stained with Coomassie blue. Lane 1: Protein molecular weight standards with size in kDa indicated. Lane 2: Murine PD-L2-IgG2a Fc-IgA tailpiece fusion protein.

Take Advantage of Improved In-Fusion™ PCR Cloning

Yes, You Can !

- **Fast, easy, directional cloning**
- **Clone ANY insert into ANY vector**
- **No ligation**
- **No subcloning**
- **Multiple fragment cloning**
- **Seamless: no extra bases added**

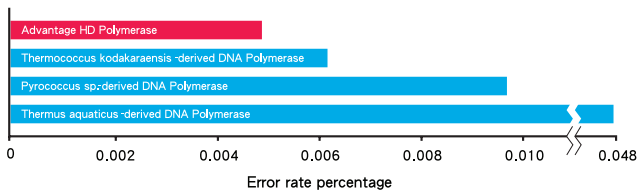
New & Improved



特別推薦

Advantage HD DNA Polymerase ~更高的校正率又不損產量

- 提高至 10 倍的校正率 (12 errors in 250 Kb)
- 提高產量
- **Excellent for cDNA**
- **Maximun 長度： 8.5 Kb from gDNA , 22 kb from IDNA**



Outstanding fidelity of Advantage HD DNA Polymerase. The error rate (mutation frequency) for Advantage HD Polymerase is lower than that of a number of commonly used DNA polymerases. Eight arbitrarily selected GC-rich regions from *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA were amplified with Advantage HD Polymerase and other polymerases. PCR products (approximately 500 bp representing each region) were cloned into suitable plasmids. Multiple clones were selected and subjected to sequence analysis to determine the error rate percentage (e.g., 1 error/100,000 bp = 0.001%)

貨號	品名	包裝	特價
639629	In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/Stellar Competent Cells	10 rxn	9900
639630	In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/Cloning Enhancer & Stellar Competent Cells	10 rxn	10500
639631	In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin & Stellar Competent Cells	10 rxn	11000
639241	Advantage HD Polymerase Mix 200 rxns	200 rxns	6800

獨家設計
一目了然



Visualize complete bacterial cell lysis with unique colored P1, P2, and P3 buffers.

New & Improved



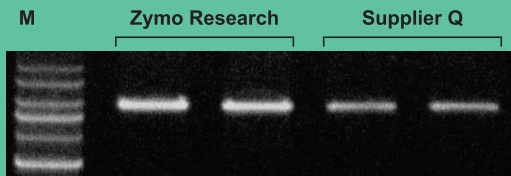
Endotoxin-free & Regular Price

Plasmid Maxi-/ Giga-prep

產品特色

- 快速：column 可離心或抽真空操作
- 高品質：plasmid 皆為 endotoxin-free
- 創新設計：利用 buffer 顏色變化，確定實驗步驟是否完成
- DNA Size Limit：up to 25 kb

品牌遠勝 Q 牌，讓您物超所值！



BamHI digestion of plasmid DNA isolated from a 150 ml *E. coli* culture using the Zippy™ Plasmid Maxiprep Kit or a kit from Supplier Q. Performed in duplicate. M, ZR 1 kb DNA Marker.

貨號	品名	包裝
D4027	ZR Plasmid Maxiprep Kit	10 prep
D4028	ZR Plasmid Maxiprep Kit	20 prep
D4057	ZR Plasmid Gigaprep Kit	10 prep

Maxi 操作流程



Bacterial cells are resuspended in P1 Buffer (pink).



The solution turns dark purple and viscous following the addition of P2 Buffer (green) indicating complete bacterial lysis.



The solution turns yellow and a precipitate forms after adding P3 Buffer (yellow) indicating buffer neutralization is complete.



The cellular debris floats to the surface following transfer of the lysate to the filter column.



Lysate clearing and wash steps are performed by vacuum filtration. (Alternatively, the cell debris can be pelleted by centrifugation.)



Plasmid DNA is recovered by placing the column within a conical tube, adding elution buffer, and centrifuging.

騰達行分生暑期營

Gene Delivery

在得到大量 Plasmid 後，便可進行基因轉殖實驗，即把 DNA 送入目標細胞內。一般說來，目前基因轉殖技術可分為：(1) Non-viral delivery 及 (2) Viral deliver。

(1) Non-viral delivery：包括 cationic liposome，electroporation，calcium phosphate precipitation 等等，其中最多人使用的方式為 Cationic liposome，但由於此試劑毒性較高常導致敏感的細胞死亡，因此對於這類細胞而言，能夠提高活率也就等於提高轉殖的效率。Clontech 新推出生物可分解的奈米粒子 -- Xfect，毒性低，在 Stem cell 上有更有驚人成果。此外，Cationic liposome 是由內吞方式進入細胞，當細胞內吞作用不活躍時，DNA 進入細胞的機率就更低了。並且，經由內吞作用進入到細胞質的 DNA，需再等待細胞進行分裂時，核膜消失再度形成時，藉機進入核內，也才有表達基因的能力。因此，若想要快速分析基因表現且克服內吞作用不活躍的問題時，Amaya 公司推出的 Nucleofection 技術便是一個很好的選擇。

(2) Viral delivery：重組病毒系統以轉殖效率高、表現量高且可以持續性表現並且隨著世代複製而受到重視。缺點在於其重組病毒有可能活化的潛在危險性，但重組技術隨著時間日新月異，在重組病毒的安全性上皆設定了重重的關卡，使病毒復活的機率微乎其微。

目前常使用重組病毒系統包括：(A) Adenovirus，(B) Retrovirus，(C) Lentivirus 等。

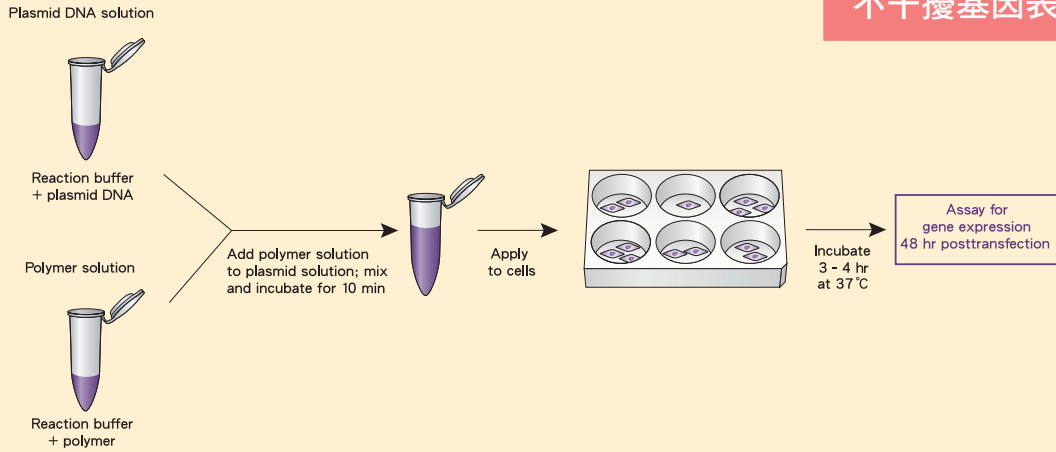
(有關各種病毒相關介紹，請參考 2009 年第四季的騰達行報報)



Xfect 最新的轉殖試劑

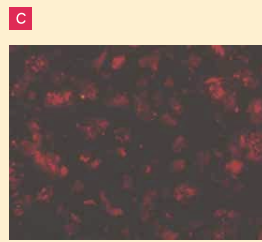
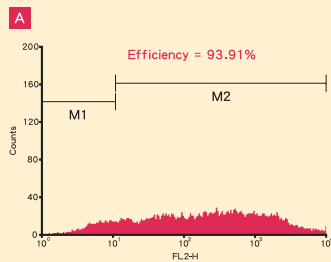
麻省理工大學研發 · Clontech 發行

- 低毒性
- 高效率
- Serum compatible
- 不干擾基因表現



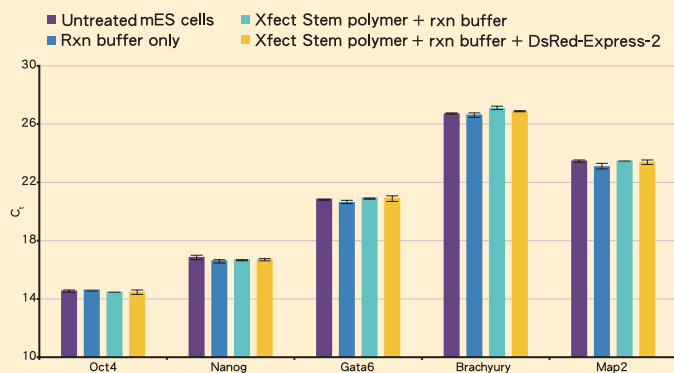
貨號	品名	包裝
631317	Xfect™	100 rxns
631320	Xfect™ Stem	100 rxns

Xfect Stem Provides High Transfection Efficiency in mES Cells



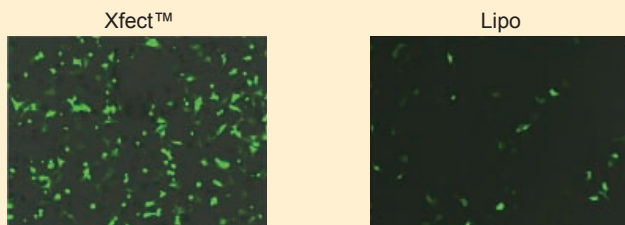
Effective transfection of embryonic stem cells with Xfect Stem. ES-E14TG2a mES cells were transfected with 5 μ g of DsRed-Express2 plasmid using 250 μ g of Xfect Stem. 48 hr posttransfection, transfection efficiency was assessed via flow cytometry (Panel A) as well as phase and fluorescent microscopy (Panels B and C respectively). As quantified by flow cytometric analysis, 93.9% of the cells transfected with Xfect Stem were positive for DsRed-Express2 expression.

Xfect Stem Does Not Affect mES Cell Pluripotency Status



Xfect Stem does not alter the pluripotency status of mouse embryonic stem cells. D3 mES cells were transfected with reaction buffer alone, Xfect Stem polymer and reaction buffer, or Xfect Stem polymer and reaction buffer plus plasmid DNA encoding DsRed-Express2, in a 6-well format. 48 hr posttransfection, total RNA from each sample was collected for first strand cDNA synthesis. The levels of expression of five genes—Nanog and Oct4 (pluripotency markers), Gata6 (endodermal marker), Brachyury (mesodermal marker), and Map2 (ectodermal marker)—in the treated samples were compared to that in the untreated D3 mES cells, using qPCR with SYBR® Advantage® qPCR Premix. The data demonstrated that Xfect Stem did not induce nonspecific differentiation or alter the pluripotency status of D3 mES cells, as the expression level of these markers remained unchanged in transfected samples when compared to untreated D3 mES.

Lung Epithelial Cells (Mv 1 Lu (NBL-7))



客戶的親身見證

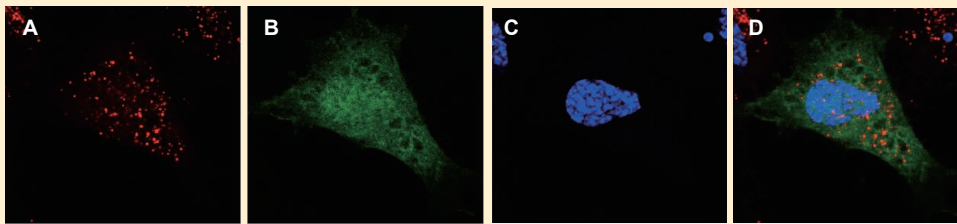
It is really amazing that this reagent works super well for mink lung cell. Usually I transfect this cells with lipofectin.....
..I should do it according the manual !

Nucleofection technology

Nucleofector™ 技術優勢

1. **直接送 DNA 入核**：一般電穿孔只能送 DNA 到細胞質，需仰賴細胞分裂時核膜的崩解才能讓 DNA 入核。所以對於細胞分裂速度很慢的血液細胞及 Primary cell，Nucleofector 才是最好選擇。Nucleofector 也大幅減短基因表現所需時間，一般來說在轉殖 2-8 小時內即可觀察基因表現。
2. **達到病毒感染般的高效率**：對於難以轉殖的細胞來說，學者往往只能考慮使用病毒感染來取代一般方法，但 Nucleofector 技術克服眾多難以轉殖的細胞，在某些細胞的轉殖率高達 90% 以上。
3. **任何小分子物質皆可運送**：對 substrate 沒有依賴性，可以轉殖 DNA、RNA、siRNA、Oligo、peptide 及小分子藥物。
4. **Specific protocol available**：amaxa 公司提供數百種細胞專屬的 protocol，讓您不必費時傷神調整合適的 condition。
5. **Transfection Database online**：amaxa 公司提供超過 678 種細胞的轉殖結果，讓您不必傷神挑選合適的試劑。
6. **Citation Database online**：目前已有近三千篇使用 Nucleofector 技術發表的文獻，讓您使用 Nucleofector 無後顧之憂。

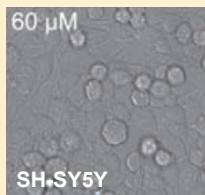
直接送 DNA 入核，2 小時即可觀察表現



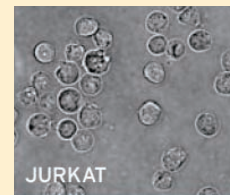
Normal human dermal fibroblasts - neonatal were transfected with 2.5 μg TMR-labeled plasmid DNA encoding eGFP. After 2 hours, cells were fixed with 3.5% PFA and analyzed by confocal microscopy. TMR label is shown in (A), GFP fluorescence in (B), DAPI nuclear staining in (C) and a merge of all three fluorescent labels in (D).

Any Substrate

轉殖 Peptide

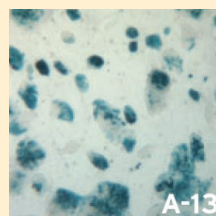


轉殖 siRNA

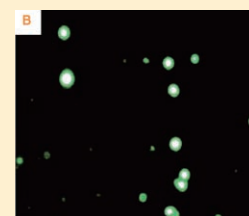
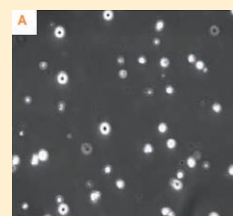


專治 Hard-to-Transfect cell

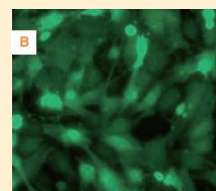
Mouse ES Cell



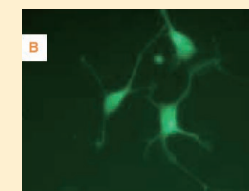
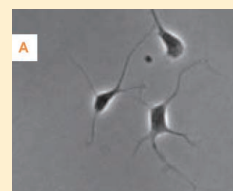
Human Dendritic Cell



Human Dermal cell



Mouse Primary Neurons



Analysis

基因轉殖完成後，首先要確認殖入基因是否正確表現，常利用 RT-PCR, Western 等方式確認。至於分析方式會根據實驗設計而有所不同。如是否影響細胞生長速率、是否誘發凋亡、是否誘導出癌化現象或是否產生毒殺細胞現象等。相關實驗繁多不及備載，在此僅介紹常見的分析包括：

1. 細胞增生實驗 (請參考本刊 P.5)
2. 細胞癌化實驗 (請參考本刊 P.3、P.7 及 P.11)
3. 細胞毒殺試驗：常見如偵測細胞膜破損後逃逸至 Media 中的 LDH 活性。在此，特別推薦另外一種利用冷光反應進行檢測，反應不只更靈敏，線性範圍更廣。
4. 誘發細胞凋亡：檢測細胞凋亡實驗眾多，在此特別薦 ApoGlow，一組試劑，可以幫您確定細胞正處於生長停滯/ 凋亡/ 壞亡狀態中。
5. 訊號傳遞路徑的分析：利用 qPCR Array 方式，可以一次檢測多種特定路徑相關基因的表現量，推測殖入的基因的活化/抑制路徑。

毒殺試驗

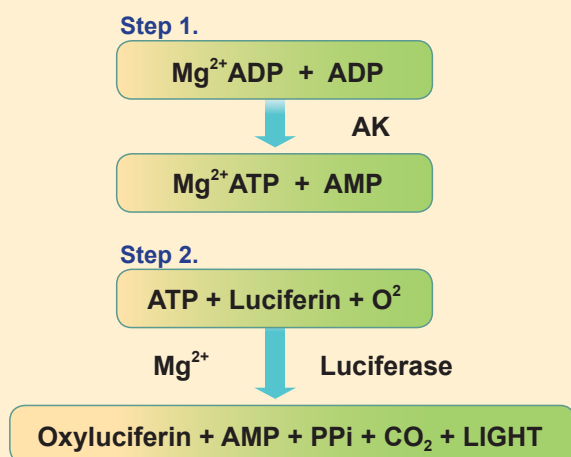
Lonza ToxiLight Non-Destructive Cytotoxicity BioAssay Kit

ToxiLight 是偵測 media 內的 AK 活性。AK (Adenylate Kinase) 存在所有的細胞裡，當細胞膜不完整的時候，會被釋放到膜外，因此 AK 可以當作一個很好的 Cytotoxicity 及 Cytolysis 的指標。

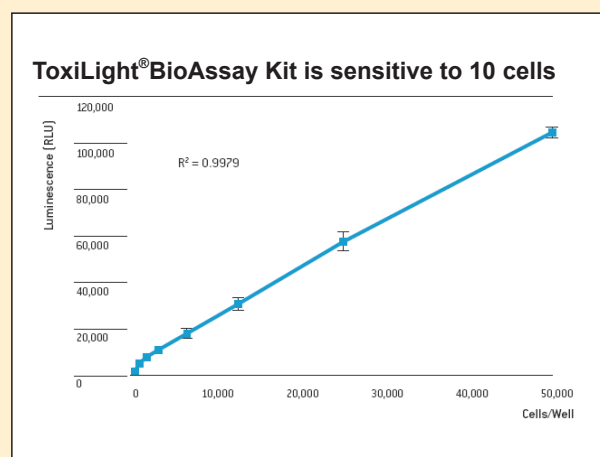
常見的 LDH 與 ToxiLight 比較表

	LDH assay	ToxiLight Assays
時間	1 hour	5 min
偵測對象	LDH (Lactose dehydrogenase, 110 kDa)	AK (Adenylate Kinase, 25 kDa)
偵測方式	呈色	冷光
靈敏度	2000 cells/well	10 cells/well
干擾物	細胞培養液中的成份會干擾 Formazan ■ Sodium pyruvate ■ pH 值 ■ DTT	NO

ToxiLight 原理



ToxiLight 靈敏度達 10 顆細胞



貨號

品名

包裝

LT17-217

TOXILIGHT

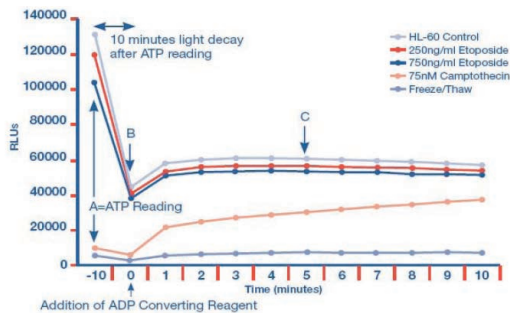
500 Assays

凋亡試驗

Lonza ApoGlow Rapid Apoptosis Screening Kit (檢測 ADP /ATP 含量)

活細胞內 ADP 與 ATP 比例維持恆定，一旦細胞發生 Necrosis 時，大量的 ATP 會下降，導致 ADP/ATP 的比例大幅升高。而當細胞發生 Apoptosis 時，ATP 含量會稍微下降，導致 ADP/ATP 比值會較正常細胞高。相對的，生長停止的細胞 (Growth arrested cells) 仍維持正常細胞應該有的比值。因此使用 ApoGlow 試劑套組，在一次實驗中，就能得知細胞正處於：(1) Necrosis (2) Apoptosis (3) Normal / Growth arrested 狀態。

- 高效能：只要一次的實驗即可以幫您確定細胞的狀況 (Apoptosis, Necrosis or proliferation)
- 簡單：實驗方法簡單，容易操作
- 高靈敏度：100 cells/well 即可偵測
- 快速：所需時間少於 30 min



將 HL-60 cells 分別處理不同的藥物及濃度引發 Apoptosis, Necrosis, Growth arrest 偵測細胞體內 ADP 及 ATP 的含量。
Freeze/Thaw 為 Necrosis control
75 nM camptothecin 誘發 Necrosis 的藥物
250 ng/ml etoposide 使細胞 Growth arrested
750 ng/ml etoposide 使細胞進入 Apoptosis
HL-60 為 viable cell control

貨號	品名	包裝
LT07-115	APOGLOW	200 Assays

訊息傳遞路徑分析

Takara PrimerArray (分析活化 / 抑制路徑)

- Data 分析簡單化：內附獨家分析軟體，可直接連結至 KEGG 網站，分析 Pathway 更簡易
- 含有 88 genes 的 primers 及 8 個 HKG primers
- Pre-validated primers (melting curve, single band on electrophoresis)
- 經濟實惠：每個 well 足夠 12 次 qPCR 使用 (96-well)
- 每個 well 皆 Premix Forward & Reverse PCR Primer (2.5 uM, 50 ul)
- Optimized for use with RR081 (SYBR Premix Ex Taq™ II)

Code	Product name
**PH001	PrimerArray™ Cytokine-cytokine receptor interaction (Human)
PH002	PrimerArray™ Cell cycle (Human)
*PH003	PrimerArray™ Cell adhesion molecules (Human)
*PH004	PrimerArray™ Jak-STAT signaling pathway (Human)
PH005	PrimerArray™ Natural killer cell mediated cytotoxicity (Human)
**PN001	PrimerArray™ Cytokine-cytokine receptor interaction (Mouse)
PN002	PrimerArray™ Cell cycle (Mouse)
PN003	PrimerArray™ Cell adhesion molecules (Mouse)
PN004	PrimerArray™ Jak-STAT signaling pathway (Mouse)
PN005	PrimerArray™ Natural killer cell mediated cytotoxicity (Mouse)

Code	Product name
PH006	PrimerArray™ Axon Guidance (Human)
PH007	PrimerArray™ Focal Adhesion Human)
PH008	PrimerArray™ T cell receptor signalling pathway (Human)
PH009	PrimerArray™ TGF -beta signaling pathway (Human)
PH010	PrimerArray™ Wnt signalling pathway (Human)
PN006	PrimerArray™ Axon Guidance (Mouse)
PN007	PrimerArray™ Focal Adhesion (Mouse)
PN008	PrimerArray™ T cell receptor signalling pathway (Mouse)
PN009	PrimerArray™ TGF -beta signaling pathway (Mouse)
PN010	PrimerArray™ Wnt signalling (Mouse)