

BLUE Genes Expressions

In-Fusion 技術の多様性

- 万能 どのようなベクターへもクローニングが可能
- 簡便 最長8kbのインサートを容易にクローニング
- 確実 正確な方向でクローニングでき、ハイスルーブット実験に最適
- 完全 Creator™ systemと組み合わせ、直ちに発現解析が可能

In-Fusion PCR Cloning System

ClontechのIn-Fusion™

PCR Cloning Kitは市販のどのクローニングシステムとも異なり、制限酵素、リガーゼ、プラントエンド処理などを必要とせずにPCR産物をハイスルーブットでクローニングできるようデザインされています。In-Fusionは3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を主反応とする酵素であり、これがDNA末端を部分的に消化し、十数塩基でヌクレアーゼ活性が止まります。ベクター側およびインサート側にcohesive endを作製して、この末端が互いにアニーリングすることによって環状の2本鎖DNAが得られます。アニーリングは室温で安定なため、リガーゼを用いなくてもDNA断片同士が結合したままで大腸菌をトランスフォームすることができます(図1)。

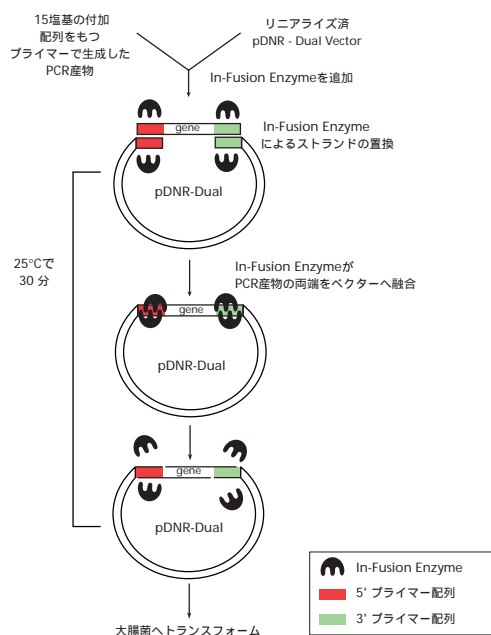


図1 In-Fusion cloning 法

汎用的なクローニングシステム

In-Fusion法の原理からすると、この方法はほとんどのベクターで使用可能と思われます。そこで、BLUEGenesでは色々なサイズのベクター(3kb~12kb)を集め、In-Fusion法を用いて、インサートの挿入を試みました。

10種類のベクターを制限酵素で消化し、Qiaquick PCR cleanup kit (Qiagen社)で不純物および短いDNA断片を取り除きました。インサートはIn-Fusion PCR Cloning Kit (#631774, #631775)添付のヒトβ-アクチンDNA断片を鋳型に増幅し(1.1kb)、Qiaquick PCR cleanup kit (Qiagen社)で不純物や未反応のprimerを取り除きました。In-Fusion反応はキット付属のマニュアルに従い行いました。

今回検討した10種類のベクター全てが、効率良くIn-Fusionでき、高いインサート率(約88%ポジティブコロニー)でのクローニングが行えました(表1)。12.0kbのベクター(pCEP4-EBNA)でも成功し、長いベクターでもIn-Fusionは問題なく行えることが確認できました。In-FusionをpDNR-Dualに限定せずに他のベクターで使用することをClontechではUniversal In-Fusionと呼んでいます。

今回の検討結果からベクターのサイズや挿入箇所付近の塩基配列などは、In-Fusion法に影響しないことが確認できました。これにより、In-Fusionは全てのベクターに応用できると考えられます。

長いインサートでも容易にクローニングが可能

短いcohesive end、blunt-endのライゲーションやTA-ライゲーション等では、長いインサートのクローニングが困難ですが、In-Fusionにはそのような問題はないと思われれます。In-Fusion法はPCR末端と線状化ベクターの間に10~20塩基の相同性があればこの部分が認識され、インサートとベクターが融合されます。認識される配列が長い場合、インサートが長くてもクローニング効率が大幅に低下することなく、長いインサートでも効率よくクローニングが可能です。実際、BLUEGenesでは2kb~8kbのインサートのクローニングに成功しています(表2)。

表1 Universal vector 検討結果

ベクター	サイズ	制限酵素	インサートチェック	結果
pAAV-IRES-GFP	6kb	BamHI-Sall	OK (5/6)	
pPD103.5	9.7kb	SmaI-XbaI	OK (12/12)	
pEGFP-d3-NotI	4.9kb	EcoRI-NotI	OK (5/6)	
pGEM-T Easy	3kb	NcoI-Sall	OK (5/6)	
pTriEx1	5.8kb	SmaI	OK (12/12)	
pIRES-hrGFP-1a	5.0kb	EcoRI-Sall	OK (7/10)	
pFB改 (pFastbac)	4.8kb	KpnI	OK (12/12)	
pCEP4-EBNA	12.0kb	KpnI-BglII	OK (4/6)	
pTRE2-hyg	5.3kb	NheI-EcoRV	OK (4/6)	
pSin-Rep5	10.0kb	XbaI-ApaI	OK (5/6)	

BLUE Genes Expressions...continued

目的遺伝子(pPD103.05 vectorをテンプレートとして使用)に相補的なプライマーをデザインし、12個(2kb~8kb)のインサートを増幅しました。PCR産物をアガロース/EtBrゲルで電気泳動して解析し、単一のDNA断片が得られていることを確認し、Qiaquick PCR cleanup kit (Qiagen社)で不純物や未反応のプライマーを取り除きました。ベクターはIn-Fusion PCR Cloning Kitに付属の線状化したpDNR-Dualベクターを使用し、In-Fusion反応を行いました(図2、表2)。

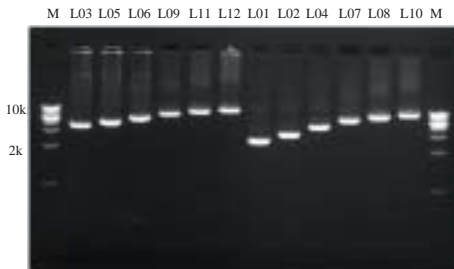


図2 増幅した長いインサート(2kb-8kb)のアガロースゲル電気泳動写真

表2 インサートサイズ一覧

コード	インサートサイズ
L01	2.5kb
L02	3.0kb
L03	3.5kb
L04	3.9kb
L05	4.0kb
L06	4.9kb
L07	5.2kb
L08	6.1kb
L09	6.3kb
L10	7.0kb
L11	7.1kb
L12	8.0kb

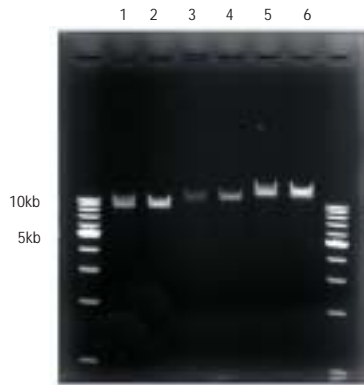


図3 長いインサートのクローニング結果 4kb, 6kb, 8kbのPCR産物をpDNR-dualベクターに挿入し、制限酵素で消化後のアガロースゲル写真 レーン1, 2: 4kb PCR産物 レーン3, 4: 6kb PCR産物 レーン5, 6: 8kb PCR産物

その結果、インサートサイズが5kbまでならば95%のクローンが目的のインサートを含んでいました。5kb以上のインサートでは、クローニング効率が低下しましたが、それでも、60%~75%の効率でクローニング可能でした。通常、In-Fusion反応は室温で30分間反応させますが、長い断片の場合は、室温の代わりに37℃で15分間と55℃で15分間の二段階反応を行うことによりクローニング効率が上がりました(図3)。

In-Fusionは、今までになかった新しいクローニング方法です。正確な方向でクローニング可能であり、あらゆるPCRポリメラーゼが使用できます。さらにCreator™ Systemのドナーベクター(pDNR-Dualなど)にクローニングしておけば、簡単に他の発現ベクターに遺伝子を移すことが可能です。これは遺伝子の機能解析においてとても有用です。実際Harvard Institute of ProteomicsではIn-Fusion技術を用いて、1,100以上のヒト遺伝子をクローニングし、92.57%の成功率でクローニングしています。

In-Fusionは最も簡便なクローニングシステムの一つです。In-Fusionでは相同配列を自由に選択することができるため、様々なベクターの様々なサイトに長いインサートを挿入できます。このような簡便で柔軟性を持つクローニング方法はこれまで存在しなかったと言えるでしょう。

製品と価格については7ページをご覧ください。

今回使用したベクターは以下の先生方にご提供頂きました。ここに御礼申し上げます。

富山医科薬科大学 医学部免疫学	岸 裕幸 先生
東海大学 医学部 分子生命科学2	築瀬 澄乃 先生
大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科 応用分子生物学研究室	杉本 憲治 先生
獨協医科大学基礎医学科生理学(液性統御)教室	若松 永憲 先生
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 形質発現分野	福原 武志 先生
三菱化学生命科学研究所 神経回路形成ユニット	高橋 浩士 先生
国立感染症研究所 感染症情報センター	新井 智 先生
千葉工業大学 工学部 工業化学科	黒崎 直子 先生
昭和大学 医学部 第一薬理学教室	小山田 英人 先生
千葉大学大学院 薬学研究院 薬物作用部門神経薬物学講座 薬効薬理学研究室	平林 哲也 先生