

毎号、テーマを絞って製品トレンドをお伝えします

はじめに：シームレスクローニング法は、その圧倒的な簡便さにより、様々な研究分野の多くの研究者に支持されています。

今回の「クロンテック通信」では、シームレスクローニング法として世界中の研究者にお使いいただいている **In-Fusion Cloning** の応用例及び関連製品に関する情報をお届けします。

In-Fusion Cloningの特長

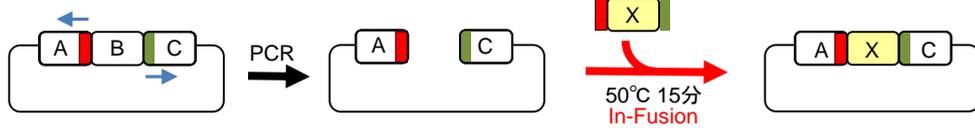
- ✓ どんなベクターのどんな位置にもディレクショナルクローニングが可能
- ✓ 目的遺伝子の制限酵素処理が不要、制限酵素サイトの悩みなし
- ✓ 短鎖から長鎖(50 bp~15 kb)まで効率よくクローニング
- ✓ 一挙に複数DNA断片を挿入するマルチクローニングが可能
- ✓ In-Fusion反応はわずか15分



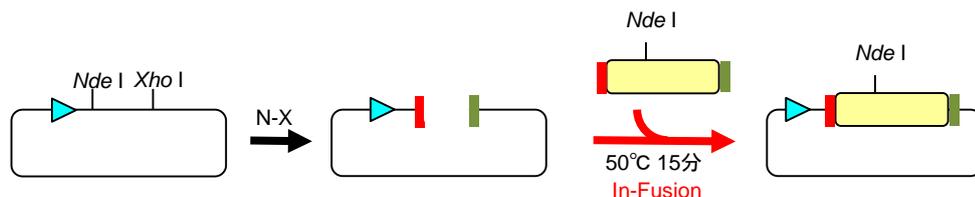
In-Fusion Cloningは様々なクローニングを可能にします。

制限酵素を用いる通常のクローニング法では困難な実験例

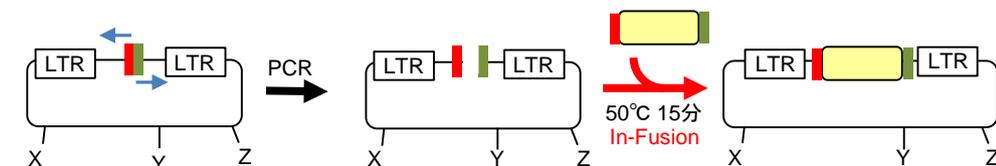
① 目的タンパク質の特定ドメイン(例えば、ドメインB)を、別の生物種由来のドメインXにシームレスで置換したい。



② タンパク質の発現ベクターなどでは、開始コドン用に制限酵素サイトが決まっている場合がある(Nde IやNco Iなど)。挿入遺伝子内にその制限酵素サイトがある場合、クローニングできない。



③ サイズの大きいプラスミド(レンチウイルスベクターなど)では、使える制限酵素が限られている。制限酵素サイトを気にせずクローニングしたい。

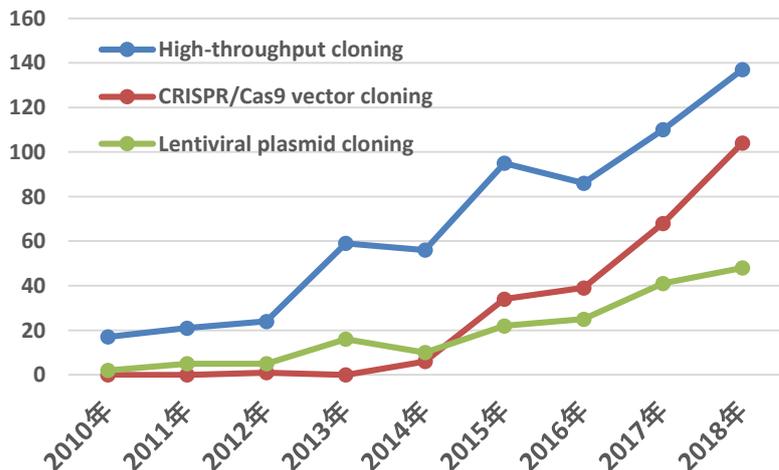


■ ■ : 15塩基の相同配列

In-Fusionで問題解決

In-Fusion Cloningの使用文献 ※

In-Fusion Cloningシステムを使用した文献数は年々増え続けています。



In-Fusion Cloningのキーワード

- ・ハイスループットクローニングのワークフロー
- ・ゲノム編集ベクターの構築
- ・レンチウイルスベクターの構築

※ 文献検索はGoogle Scholarにより2019年1月10日に集計した。

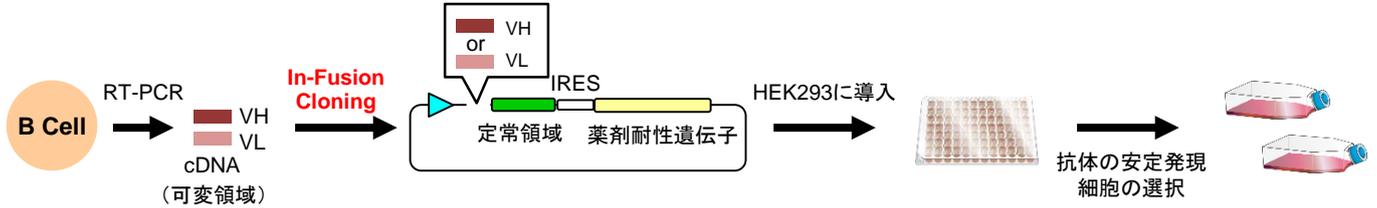
裏面: In-Fusion Cloning 応用例

文献で使用されているIn-Fusion Cloningの応用例

◆ 抗体のハイスループットクローニング

In-Fusion Cloningシステムとバイシストロニックなプラスミドを組み合わせることで、効率的な抗体の安定発現細胞を選択する手法を確立し、今までの作業時間(4~6ヵ月)をわずか4~6週間にまで短縮した。

Rapid high-throughput cloning and stable expression of antibodies in HEK293 cells.
Spidel J.L., et al. (2016) *J Immunol Methods*. 439:50-58.



RT-PCRにより B Cell から抗体可変領域 (VH & VL) を増幅

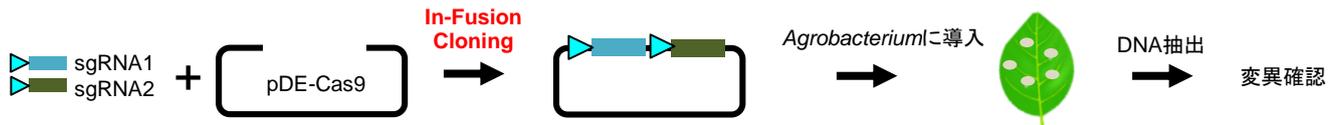
In-Fusionシステムにより VHとVL領域をそれぞれバイシストロニックなプラスミドにクローニング

プラスミド導入後、薬剤選択により安定的に抗体を産生する細胞株を選別し、拡大培養

◆ CRISPR/Cas9システムにおいて植物に効率よく複数のgRNAのクローニング

In-Fusion Cloningシステムとネガティブ選択マーカーにより1反応で植物発現ベクターに複数のgRNAを直接クローニングする手法を開発した。また、*Agrobacterium* を使用して、複数のgRNAの有効性を迅速に確認するアッセイ系を構築した。

A highly efficient ligation-independent cloning system for CRISPR/Cas9 based genome editing in plants.
Khan AA., et al. (2017) *Plant Methods*. 13:86



In-Fusionシステムにより PCR増幅したU6プロモーター(▶)とターゲットsgRNA (2分子) を植物ベクター (pDE-Cas9) にクローニングした。

構築したベクターを *Agrobacterium* に導入し、葉からDNAを抽出し、ターゲット遺伝子の変異を確認することでsgRNAの有効性を調べた。

※本論文のCas9はニッカーゼタイプであり、標的遺伝子の2箇所をターゲットするsgRNAが必要なため、2分子のsgRNAを作成している。

In-Fusion Cloningの関連製品

◆ In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit (製品コード 634933)

SMARTer cDNA合成と**In-Fusionクローニング**を組み合わせたcDNAライブラリー構築キットで、任意のプラスミドベクター上の任意の部位に高品質完全長cDNAライブラリーを構築可能

本キットによるcDNA合成、ライブラリー構築&増幅

