

## In-Fusion を用いた変異の少ない正確な目的配列のクローニング



### はじめに

シームレスクローニングを行う手法は複数存在します。各クローニング手法（Gibson Assembly、II S 型制限酵素クローニング、In-Fusion）のメカニズムはかなり異なり、同様に配列精度も異なります。どのシームレスクローニング手法も、ベクターとインサート間で不必要な塩基や変異箇所が少ないこと、複数のインサートを特定の方向に 1 回の反応でクローニングできることが利点として挙げられます。しかしこれらのクローニング手法は、正確さや効率が低下するとその機能を一部失います。特にハイスループットアプリケーションで、大規模なクローニングに適応するためにスケールアップした場合、潜在的なエラー率やバックグラウンドレベルの悪化を伴い、この問題の影響を強く受けます。

市販のいくつかのクローニングキットは、エキソヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、リガーゼの 3 つの酵素を利用してクローニングを行います（Gibson *et al.* 2009）。一方、In-Fusion のメカニズム（Irwin *et al.* 2012）はこのプロセスとは大きく異なる点があります。3 つの酵素を利用するクローニングと In-Fusion のクローニング法はどちらも、直鎖状ベクターや隣接したフラグメントと相同的な重複配列をもつ、PCR で増幅されたインサートを要します。さらに、どちらもエキソヌクレアーゼを利用して DNA 線状化フラグメントを消化し、突出末端を作り出します。これ以降のステップから実験のワークフローは 2 通りに分かれます。3 つの酵素を用いる手法では、ポリメラーゼがヌクレオチド間のギャップを埋め、DNA リガーゼが形質転換の前に、アニールされたフラグメントのニックを接着させます。このプロセスは、フラグメント同士の結合部位に配列のエラーやミスマッチが導入されてしまう危険があります。これとは対照的に、In-Fusion を用いた手法ではポリメラーゼも DNA リガーゼも使わないため、ヌクレオチドエラーの可能性を排除できます。インサートとベクターは大腸菌で結合し、クローンの配列の完全性を維持します。これらのメカニズムの違いによる影響を理解するために、マルチインサートクローニングの困難な作業、特に成功の指標となる塩基配列の正確性について検討しました。

### 結果

以下の実験では、各手法により得られたクローンの配列の正確性を評価するために、3 つの酵素を用いる手法（A 社キットと B 社キット）とプレミックス溶液タイプと凍結乾燥タイプ（EcoDry）の In-Fusion Cloning HD Plus Kit を比較しました。それぞれのクローニングキットを用いて、2.7 kb のベクターに 5 つのインサート（947 bp, 717 bp, 697 bp, 405 bp, 1,005 bp）をクローニングしました。なお、ベクター：インサートのモル比は 1：2 で行いました（Table I）。

Table I. Cloning reaction setup to achieve a vector-to-insert molar ratio of 1:2

Linear fragment	Amount
Insert 1 (947 bp)	40 ng
Insert 2 (717 bp)	40 ng
Insert 3 (697 bp)	32 ng
Insert 4 (405 bp)	20 ng
Insert 5 (1,005 bp)	45 ng
Vector (2,671 bp)	37 ng

In-Fusion でマルチクローニングをする際の推奨に従い、すべてのクローンにおいて線状化されたフラグメント同士の間には 20 bp の相同的な重複配列を付加して設計しました。各キットの反応は各社のプロトコールに従って行い、1/10 に希釈した反応液を選択培地上にプレーティングしました。その後、各キットからランダムに 20 クローンを選び、シークエンスで正確性をチェックしました。3 つの酵素を用いる A 社キットと B 社キットから得られたクローンの配列精度は平均 80% でした。これに対し In-Fusion のプレミックス溶液タイプ、凍結乾燥タイプから得られたクローンは 90% や 100% と、より高い配列精度を示しました (Table II)。

Table II. Sequence accuracy comparison for all four seamless cloning kits

Commercial kit	Sequence accuracy (average of 20 clones)
In-Fusion HD Cloning Plus (溶液タイプ)	90%
In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus (凍結乾燥タイプ)	100%
A 社キット	80%
B 社キット	80%

## 結論

In-Fusion Cloning の配列精度は、他社キットよりも一貫して高いことが示されました。この理由として、ポリメラーゼとリガーゼがエラーを起こしやすいことから、ポリメラーゼとリガーゼを使用しない In-Fusion の方が配列精度が高くなることが考えられます。特にマルチクローニングを行う際は、ヌクレオチドのミスマッチが起こり得るクローニングジャンクションが多くなるため、シーケンスエラーが問題になります。In-Fusion で得られた信頼性のある結果はハイスループットクローニングに適しており、配列の正確性が高いため、スクリーニングする量を少なくし、目的以外のクローンを減らすことができます。

## 方法

各シームレスクローニングキットは各社のプロトコールに従い使用し、反応液中のベクター：インサートのモル比は 1：2 で行いました。データの再現性を確認するために、プレミックス試薬タイプの In-Fusion Cloning Kit を除く 3 つのキットは、3 回反応を行いました。反応後の大腸菌への形質転換は、各社の推奨するコンピテントセルを使用しました。In-Fusion HD Cloning Plus と In-Fusion HD EcoDry Cloning Plus は、Stellar Competent Cells を用いて形質転換を行いました。その後、形質転換後の各溶液を 1/10 に希釈し、選択培地上にプレーティングしました。そこから 20 クローンをランダムに選択し、サンガーシーケンスを用いて配列の正確性をチェックしました。

## 参考文献

Gibson D.G., *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods* **6**(5): 343–345 (2009)

Irwin C.R., Farmer A., Willer D.O., Evans D.H. In-Fusion Cloning with Vaccinia Virus DNA Polymerase. *Vaccinia Virus and Poxvirology (Methods and Protocols)*. **890**:23–35 (2012)

## 関連製品

製品コード	製品名	容量
638909	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Plus	10 回
638910	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Plus	50 回
638911	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Plus	100 回
638920	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Plus	96 回
638916	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Plus CE	10 回
638912	In-Fusion <sup>®</sup> HD EcoDry <sup>™</sup> Cloning Plus	8 回
638913	In-Fusion <sup>®</sup> HD EcoDry <sup>™</sup> Cloning Plus	24 回
638914	In-Fusion <sup>®</sup> HD EcoDry <sup>™</sup> Cloning Plus	48 回
638915	In-Fusion <sup>®</sup> HD EcoDry <sup>™</sup> Cloning Plus	96 回
639648	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Kit	10 回
639649	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Kit	50 回
639650	In-Fusion <sup>®</sup> HD Cloning Kit	100 回
636763	Stellar <sup>™</sup> Competent Cells	100 $\mu$ l $\times$ 10

※“Plus シリーズ”には Stellar<sup>™</sup> Competent Cells が含まれています。

本紙で紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。タカラバイオの承認を得ずに製品の再販または譲渡、およびこれらのための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。本紙に記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。