

In-Fusion クローニングガイド 2019-2020

“In-Fusionに出会ったことで、研究の進捗速度が大幅に変わりました。
これ一つで、コスト削減だけでなく時間も短縮される、私にとってこれは
魔法の製品です。使わないと損です。”

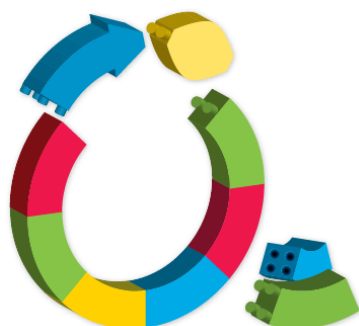
— ユーザー様実施例より一部変更して掲載 —

— 実験の生産性の向上に、In-Fusionをご活用ください！ —



— Contents —

- 巻頭特集① In-Fusionにまつわる3つの誤解を解く P.1, 2
- 巻頭特集② In-Fusion成功のポイント P.3
- 巻頭特集③ In-Fusionでベクター改変のススメ P.4
- In-Fusionクローニングの特長 P.5, 6
 - ユーザー様実施例(1)～(9) P.7～14
 - ユーザーズボイスのご紹介 P.15, 16
 - 他社同タイプキット比較データ P.17, 18
 - 製品リスト P.19 (裏表紙)



In-Fusionにまつわる3つの誤解を解きます！

おかげ様で多くのユーザー様にご愛用いただいているIn-Fusion®ですが、一方で誤った認識によって、知っているけれど使ったことはないという方もいらっしゃいます。そのような皆様にも是非お使いいただきたく、In-Fusion®に関してよくお聞きする「3つの誤解」についてご説明いたします。

よくあるお話し 1 In-Fusionには専用のベクターが要るんでしょ？

よくあるお話し 2 In-Fusionはコストが高いんでしょ？

よくあるお話し 3 マルチクローニングができるって聞いたけど、難しいんでしょ？



すべて誤解です！ 詳しくは以下で…

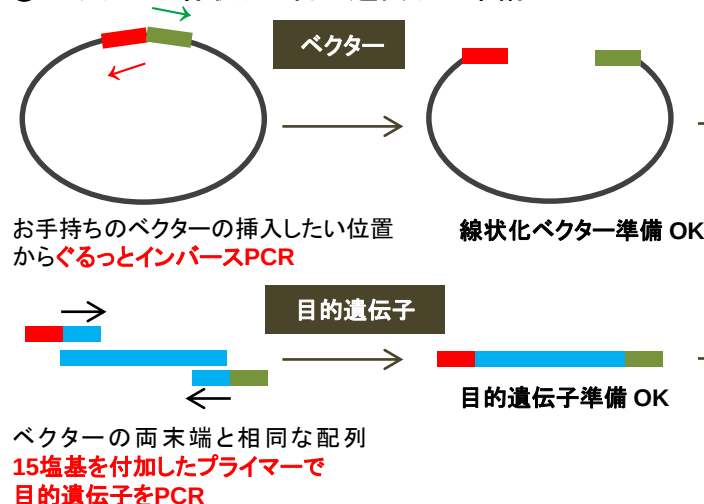
誤解 1 In-Fusionには専用のベクターが要るんでしょ？

回答 1

いいえ、インバースPCRでベクターの線状化を行いますので、お手持ちのベクターがそのまま使え、しかも適当な制限酵素サイトがないベクターでもクローニングが可能です。これは、「ベクター上の挿入したい位置の両側15塩基と相同な配列が、目的遺伝子の両末端にあればよい」というIn-Fusionクローニングのルールによるもので、好きなベクターの好きな位置にディレクショナルにクローニングが行えます。余分な配列も付加されません。

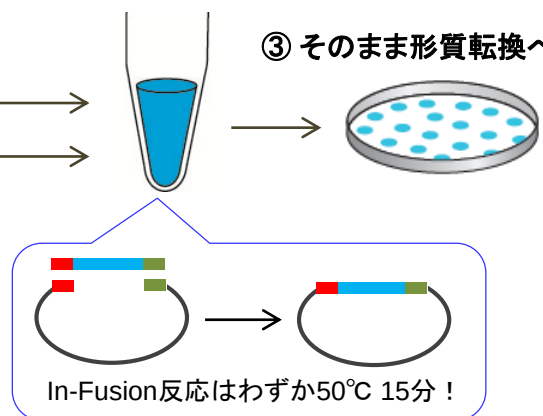
In-Fusionクローニングの流れ

① ベクターの線状化と目的遺伝子の準備



② 5× In-Fusion® HD Enzyme Premix & dH₂Oにベクターと目的遺伝子を加えてIn-Fusion反応

③ そのまま形質転換へ！



★ ワンポイントコメント★ PCRに高正確性酵素「PrimeSTAR®」を使用すればエラーも気になりません！
(詳しくはP.6をご覧ください)

誤解 2 In-Fusionはコストが高いんでしょ？

回答 2

通常のライゲーションキットに比べると、確かに反応単価は高いです。しかし、ライゲーションキットより反応時間が約1日短縮できる、成功率が高いので失敗してやり直す時間や試薬のムダが抑えられる、制限酵素を買わなくてもいいなど、キット価格以外のさまざまなコストを勘案すると決してそのトータルコストは高くありません。
実際にIn-Fusionを使用した方のコストや手間に関するコメントをご紹介します。

◆ N大学 T様

初めは、コツが分かるまで上手いかないだろうと思っていましたが、説明書に記載されている通りにただで、2断片のライゲーションのみならず、3断片のライゲーションも一発で上手いきました。これならルーチンに使えます。はやく使っておけば良かった。DNAクローニングやベクター構築の時間や労力を大幅に減らすことができます。また、多様な用途に利用できます。おすすめです。

◆ T大学 Y様

通常の制限酵素を使った方法では何か月もうまくいかなかったのが、この商品を使ったら一発で構築できました。やはり複数の配列を一度に連結できるのはIn-Fusionの強みですね！

◆ M大学 K様

確かにうまくいった。技術の進歩にびっくり(ケチケチせずに、新しいkitを使った方が、寧ろ節約になる)。

◆ M大学 K様

初めての時はとにかく驚きました。3つの断片をベクターに組み込んだり、変異、欠失を導入したり、それまで site-directed mutagenesis やオーバーラップ領域を使ったPCRでの遺伝子融合で苦労していた部分があったという間に解消しました。まずは、試してみてください。ベクター構築のための苦労が長かった人程、その凄さが実感できると思います。制限酵素による切断端を使ってライゲーション反応で遺伝子をつなげるプロセスがないので、制限酵素サイトに悩まされることも少なくなりますし、なにより若手実験者の失敗が激減します。

誤解 3 複数のインサートを一気に入れるマルチクローニングができるって聞いたけど、難しいんでしょ？

回答 3

確かに、インサートが1種類の場合に比べて難易度は上がりますが、2種類、3種類のインサートを使ったマルチクローニングは実際に多くのユーザー様が成功されています。本パンフレットのユーザー様実施例でマルチクローニングの成功例を多数ご紹介していますので、ご覧ください。



マルチクローニング成功のためのワンポイントアドバイス

2種類以上のインサートを同時に入れるマルチクローニングの場合、通常15塩基の相同配列を20塩基にすると目的クローンの取得効率Upにつながるというプロトコルがクローンテックより提供されています。詳しくはタカラバイオウェブカタログのIn-Fusion®製品ページで公開している「In-Fusion® HD Multiple-Insert Cloning Protocol-At-A-Glance」をご覧ください。

注：シングルフラグメントのクローニングの場合は、従来通り、まずは相同配列を15塩基にしてお試ください。ワンクローニングがうまくいかないときは、相同配列を20塩基にすることで改善する場合があります。

In-Fusion成功のポイント！

元々成功率の高いIn-Fusion®クローニングキットですが、それでもうまくいかない場合があります。そういったときに、ご確認いただきたい「In-Fusion成功のポイント」をいくつかご紹介いたします。目的のクローンが効率よく取得できないときには、ぜひこれらのポイントをチェックしてください。

① ベクターの調製法

制限酵素切断して線状化ベクターを調製した場合、1カ所切断だとバックグラウンドが出やすい傾向があります。可能であれば、2種類の制限酵素で切断するか、インバースPCRで線状化ベクターを調製してください。

② In-Fusion反応でのベクターとインサートフラグメントの使用量

ベクターとインサートフラグメントの使用量も重要です。下記の推奨使用量の範囲でお試してください。

＜推奨使用量＞

ベクター		インサートフラグメント		
10 kb以下	10 kb以上	0.5 kb以下	0.5～10 kb	10 kb以上
50～100 ng	50～200 ng	10～50 ng	50～100 ng	50～200 ng

③ インサートフラグメント増幅用プライマーの設計法

インサートフラグメント増幅用プライマーの設計は基本的に通常のPCRプライマーの設計と同じですが、唯一の違いは、利用するベクターの末端配列に相同な15塩基をプライマーの5'末端に付加することです。間違いがないよう、設計には便利で簡単な専用の無料オンライン設計ツールの使用をお勧めします。

★無料オンライン設計ツールはこちら⇒ <https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools>

④ コンピテントセルに加えるIn-Fusion反応液量

50 µlのコンピテントセルに2.5 µlの反応液が推奨の使用量です。5 µl以上用いると形質転換に阻害がかかる場合がありますので、入れすぎにはご注意ください。

コンピテントセルの種類によっては、さらにIn-Fusion反応液を希釈したほうがよい結果が得られる場合があります。形質転換効率が低い場合は、In-Fusion反応液を5～10倍に希釈してお試してください。

⑤ 使用するコンピテントセル

特に専用のものではなく、標準的なクローニング用のコンピテントセルであればどれもお使いいただけます。ただ、形質転換効率が高いタカラバイオの*E. coli* HST08 Premium Competent Cells(製品コード 9128)やクロンテックのStellar™ Competent Cells(製品コード 636763など)を使用することで、目的クローンの取得効率が改善する場合があります。

特に長鎖のDNA(10 kb以上)のクローニングには、上記のコンピテントセルの使用をお勧めします。

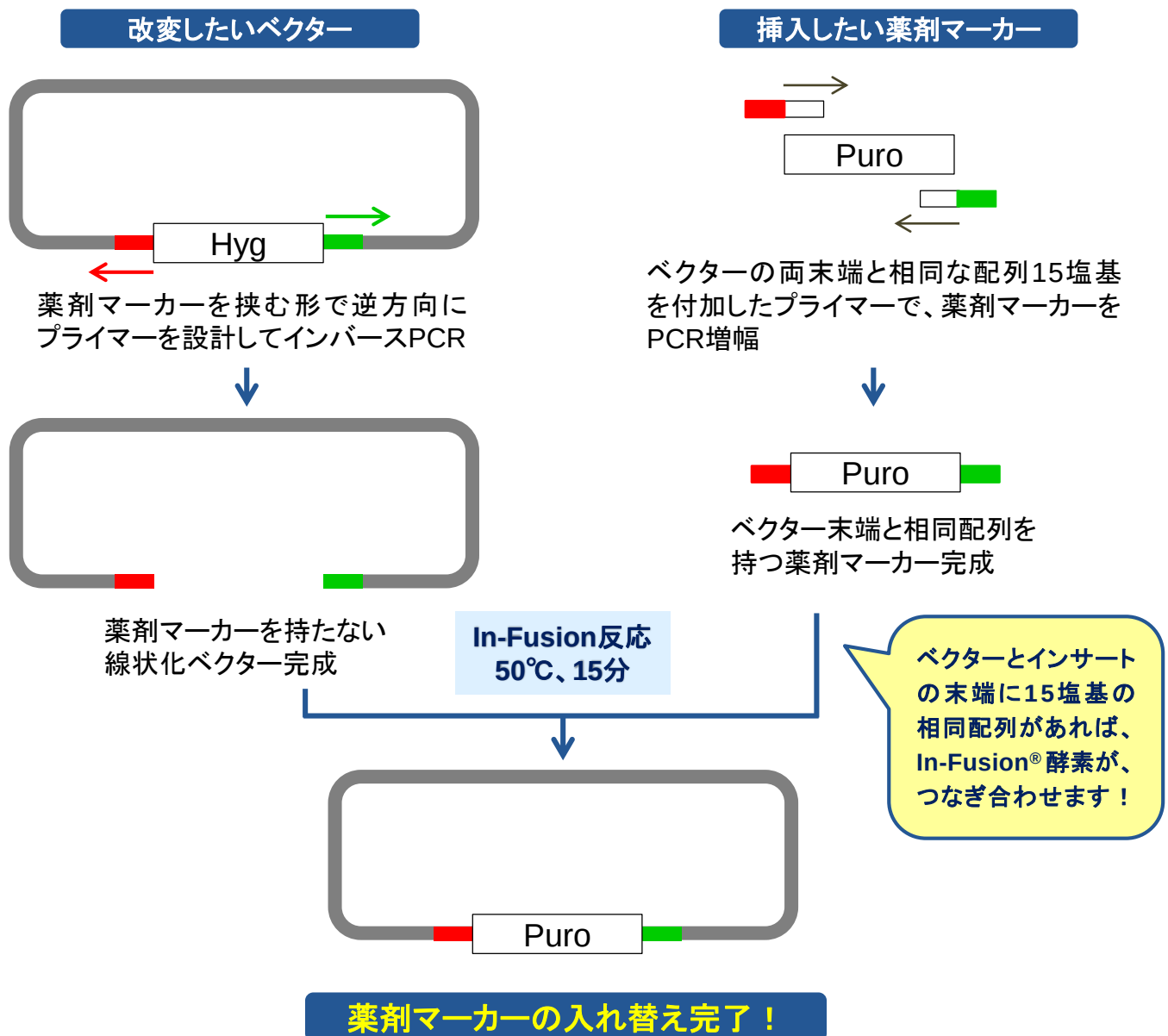
In-Fusionでベクター改変！のススメ

In-Fusion®はクローニングではありません。

PCRでベクターの線状化や挿入カセットの準備を行えば、面倒な切り貼りすることなく簡単にベクターの改変ができます。

使い方次第で多くの可能性が広がるIn-Fusion®を、ぜひあなたのラボでもお使いください！

－（例）薬剤マーカーの入れ替え－



In-Fusionテクノロジーで従来法より格段に簡単なベクター改変を、ぜひお試しください！

In-Fusionクローニングの特長

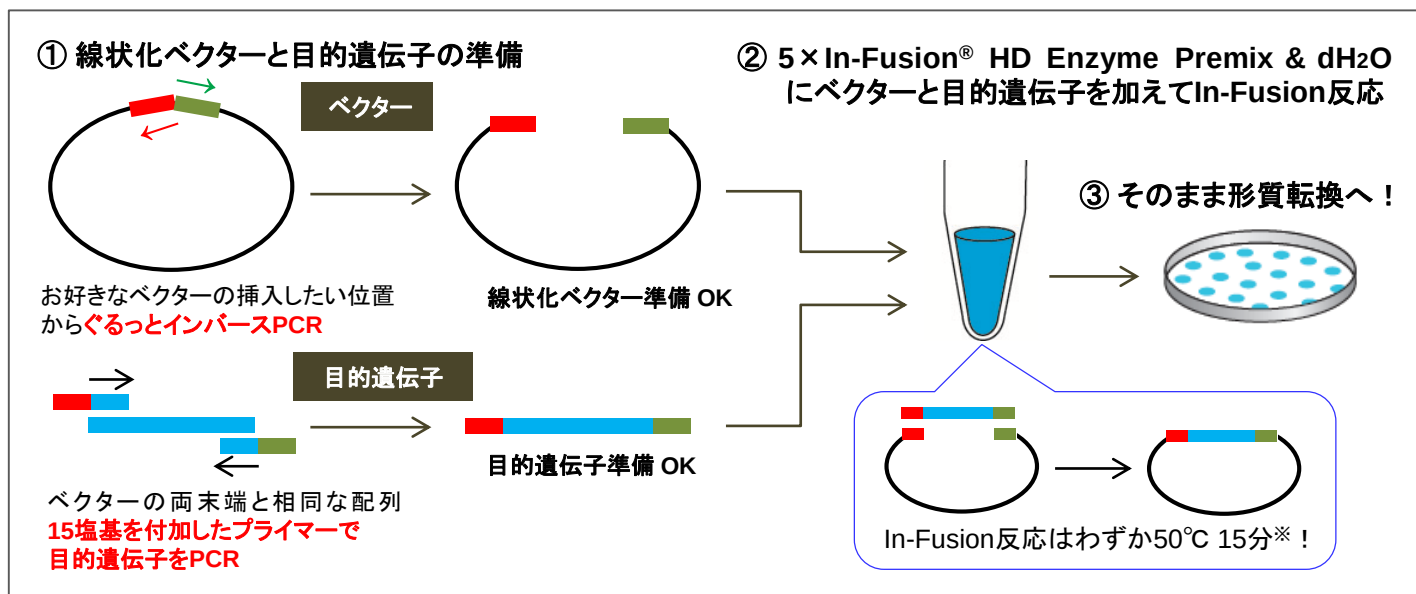
特長

- ✓ 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
- ✓ 短鎖から長鎖(50 bp~15 kb)まで効率よくクローニングが可能
- ✓ 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分で完了

In-Fusion クローニングが 簡単な理由

ベクター上の挿入したい位置の両側15塩基と相同な配列が
挿入したい断片の両末端にあれば、
それが融合してクローニングができるという原理だから

In-Fusion反応にそのまま使える線状化ベクターと目的遺伝子が**PCRで簡単に準備できる**、
これが**In-Fusionクローニングが簡単な理由**です！



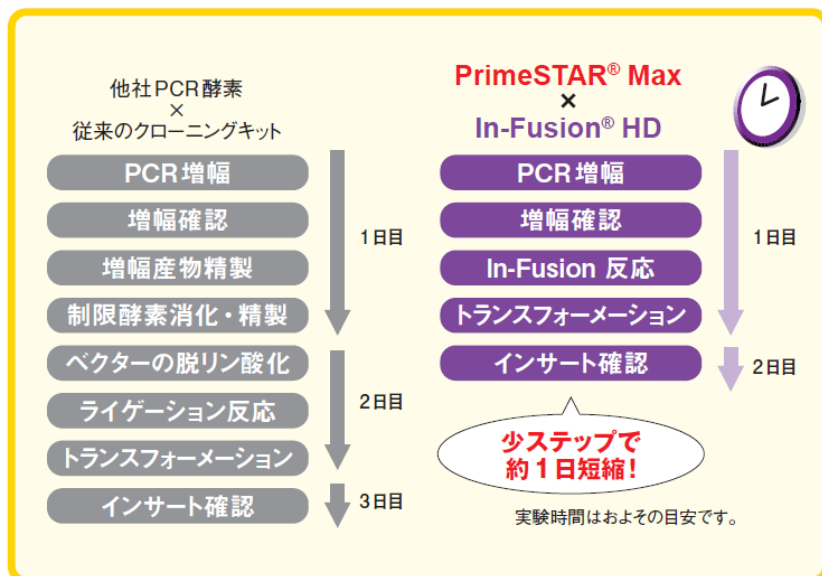
※EcoDryタイプの場合は37℃15分+50℃15分です。



PCRを使用したIn-Fusionクローニングを行えば、**制限酵素やライゲーションキットによる切り貼りが一切必要ありません。**
また、専用のベクターを必要とせず、**ご自身のベクターが使用でき、お好きな位置にクローニング可能**で余分な配列も付加されません。
だからIn-Fusionクローニングは**簡単&便利、そしてスピーディー**なのです！

In-Fusionクローニングの特長

事実、PCRを使ったIn-Fusionクローニングで実験にかかる時間を約1日短縮できます！



極めて高い正確性に加え、5秒/kbの伸長能をもつ PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(製品コード R045A/B)は、5 kbのPCR増幅が約60分(※1)で完了します。

目的DNA断片の増幅はもちろん、PCR増幅によるベクターの線状化にもおすすめです。

また、In-Fusion酵素によるディレクショナルクローニングでは、目的DNA断片の制限酵素処理が不要なため、PCR増幅した目的DNA断片とベクターを混合してIn-Fusion反応(15分)を行うだけでベクターへの挿入が完了し、大腸菌へのトランスフォーメーションに進めます(※2)。

※1: 鋳型によっては1分/kbの伸長反応が必要です。詳しくは説明書をご確認ください。

※2: ベクターの線状化は制限酵素処理でも可能です。脱リン酸化は不要です。

でも、不安も...

不安①: ベクターの調製にPCRを使ってエラーは大丈夫？

不安②: 長い配列やGCリッチ領域もちゃんと増やせるの？



大丈夫です。高正確性と高反応性を兼ね備えたPCR酵素「PrimeSTAR®」を使ってベクターや目的遺伝子のPCR増幅を行えば、そんな心配は無用です。



推奨するPrimeSTAR®の特長

製品名	特長	容量(※)	製品コード	価格(税別)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase	ヒトゲノムDNAなら約30 kbまで増幅OK。 GCリッチ領域にも強く高い汎用性をもつ。	250 U	R050A	¥41,000
		1,000 U (A × 4)	R050B	¥121,000
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	最も高い正確性を誇り、高速反応が可能。 ヒトゲノムDNAなら約6 kbまで増幅OK	100回	R045A	¥35,000
		400回 (A × 4)	R045B	¥112,000

※回数表示は50 µl反応系での回数です。

【注】 In-Fusion® Plusシリーズには、PrimeSTAR® Maxに相当するクローンテックの高正確性PCR酵素「CloneAmp™ HiFi PCR Premix」がコンポーネントとして含まれています。In-Fusion®製品リストは、最終ページを参照してください。

ご存知ですか？ その優れた特長からIn-Fusion®は世界中の研究室で広く利用されています

- ・ CRISPRシステムにおいて、In-Fusion® HD Cloning Kitを用いてCas9発現ベクター構築した例
CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.
Gilbert LA *et al.*, *Cell*, (2013) Jul 18; **154**(2):442-451
- ・ ハイスループットで4分子解析を行うために、In-Fusion® HD Cloning Kitを用いて
プラスミドライブラリーを構築した例
High-throughput tetrad analysis.
Ludlow CL. *et al.*, *Nat Methods*. (2013) Jul; **10**(7):671-675
- ・ In-Fusion®とPrimeSTAR®を用いてプラスミドを構築した例
Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination.
Kondo T *et al.*, *Nature* (2013) Feb 7; **494**(7435):125-129



★弊社ウェブカタログでこのほかにも「使用文献」をご紹介します。

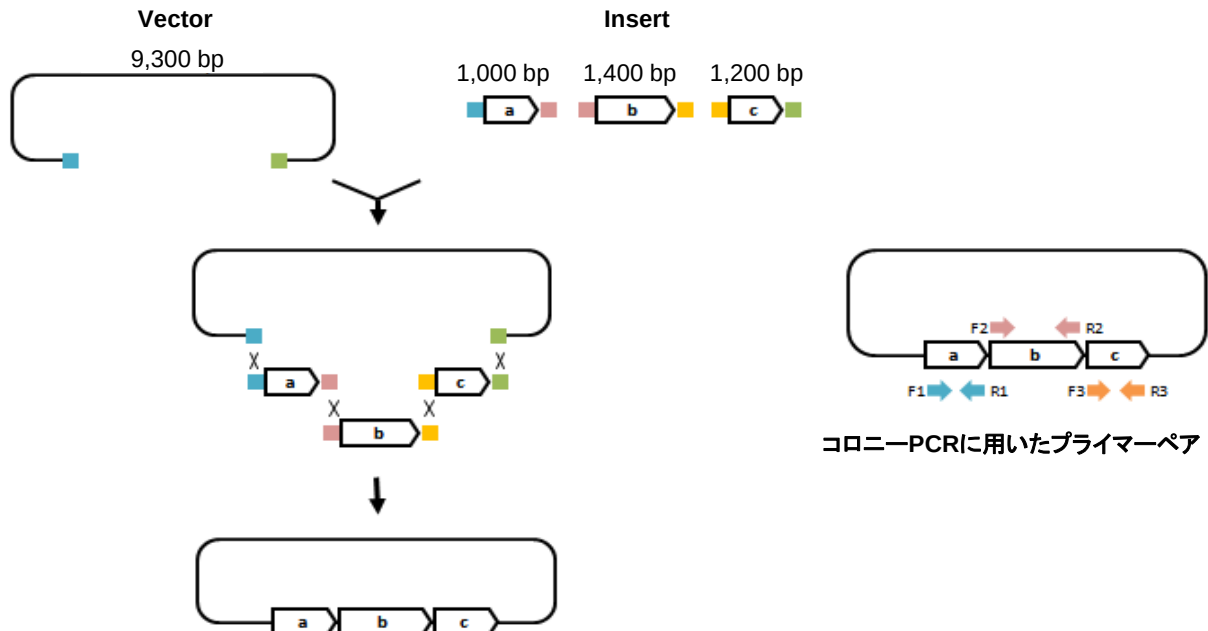
ユーザー様実施例(1)

■ 3つのインサートをIn-Fusion® Cloning Systemで同時にクローニング(B社同タイプキットとの比較)

【データご提供】京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 様

実施内容

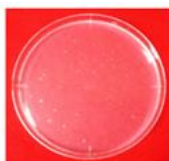
In-Fusion® HD Cloning KitおよびB社同等キットを用いて9,300 bpのベクターと1,000 bp、1,400 bp、1,200 bpの3断片のインサートをクローニングし、合計12,700 bpのベクターの作製を試みた。コンピテントセルは、いずれもクローンテック社Stellar™ Competent Cellsを用いた。



結果

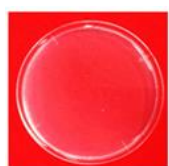
クローニングキットにIn-Fusion® HD Cloning Kitを用いた場合、40個のコロニーが出現した。そのうち10個のコロニーにおいてコロニーPCRを行った結果、全てのコロニーにおいてインサート3断片の正しい挿入が確認された。一方、B社同タイプキットを用いた場合、1個のコロニーが出現し、コロニーPCRを行った結果、インサート3断片の正しい挿入が確認された。

In-Fusion® HD Cloning Kit



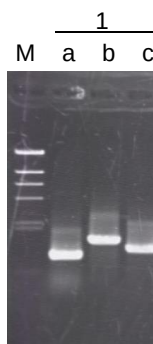
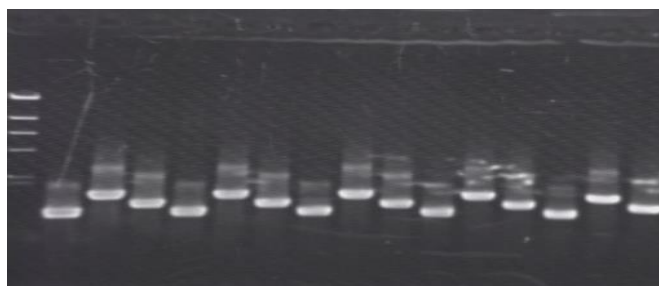
コロニー数
40個

B社同タイプキット



コロニー数
1個

1 2 3 4 5 コロニー番号
M a b c a b c a b c a b c a b c インサート断片名



M:λ-Hind III digest

ユーザー様実施例(2)(3)

■ 4つのインサートをIn-Fusion® Cloning Systemで同時にクローニング

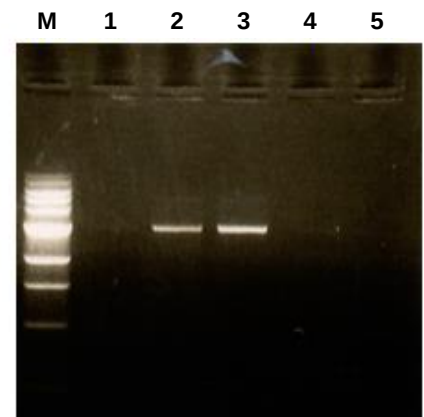
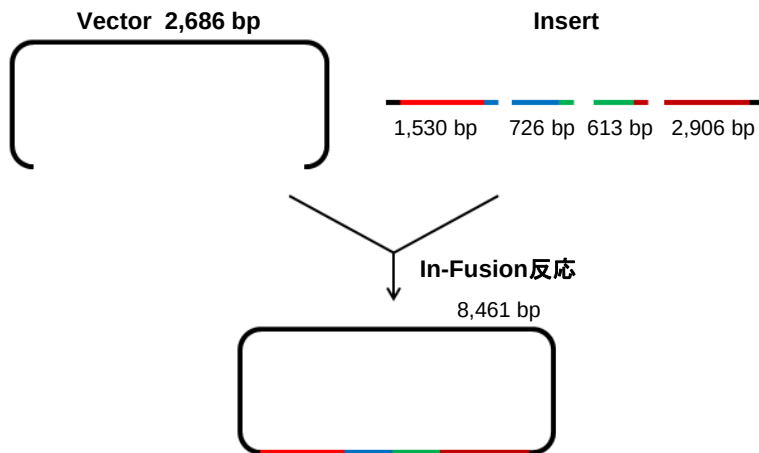
【データご提供】東京大学 農学生命科学研究科 様

実施内容

pUC19 DNA(製品コード 3219)をBamH Iで切断した後、In-Fusion® HD Cloning Kitを使用して1,530 bp、726 bp、613 bp、2,906 bpの4断片の同時クローニングを試みた。

結果

出現した約100個のコロニーの中から5個をピックアップしコロニーPCRを行ったところ、うち2個について方向性も正しくインサートが挿入されていることを確認した。



Marker : 1 kb ladder

■ In-Fusion® Cloning Systemを用いたゲノム編集ノックイン用ドナーベクターの構築 (3断片のマルチクローニング)

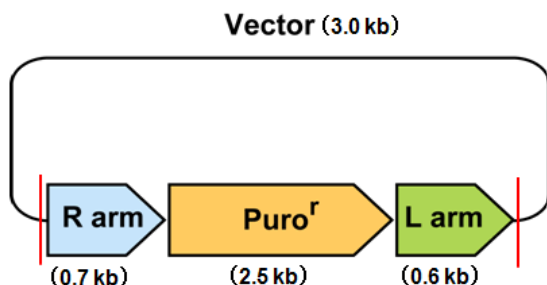
【データご提供】九州大学大学院医学研究院 様

実施内容

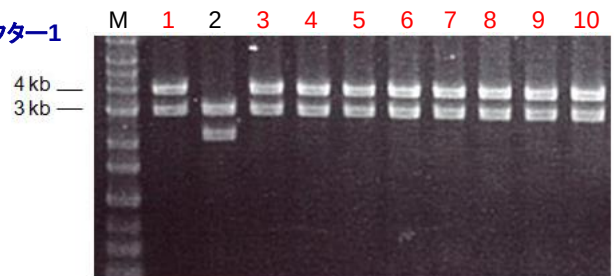
In-Fusion® HD Cloning Kitを用いて、3.0 kbのベクターにPuromycin耐性遺伝子カセット(2.5 kb)、CRISPR/Cas9 切断部位のRightおよびLeft arm(それぞれ0.7/0.6 kb)の3断片のインサートDNAをクローニングした。図中の赤線で示す部位を制限酵素で切断してインサート確認を行った。

結果

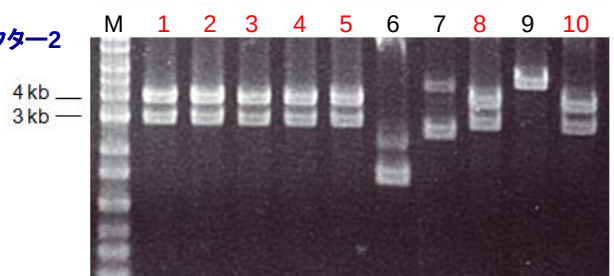
X-Gal/IPTGによる青白選択より得られた多数のコロニーのうち10個の白色コロニーをピックアップして、制限酵素およびシーケンシングによりインサート確認を行ったところ、種類の異なるドナーベクター1および2においてそれぞれ9/10および7/10の高効率で目的のDNAコンストラクト(赤字番号のレーン)を得た。



ドナーベクター1



ドナーベクター2



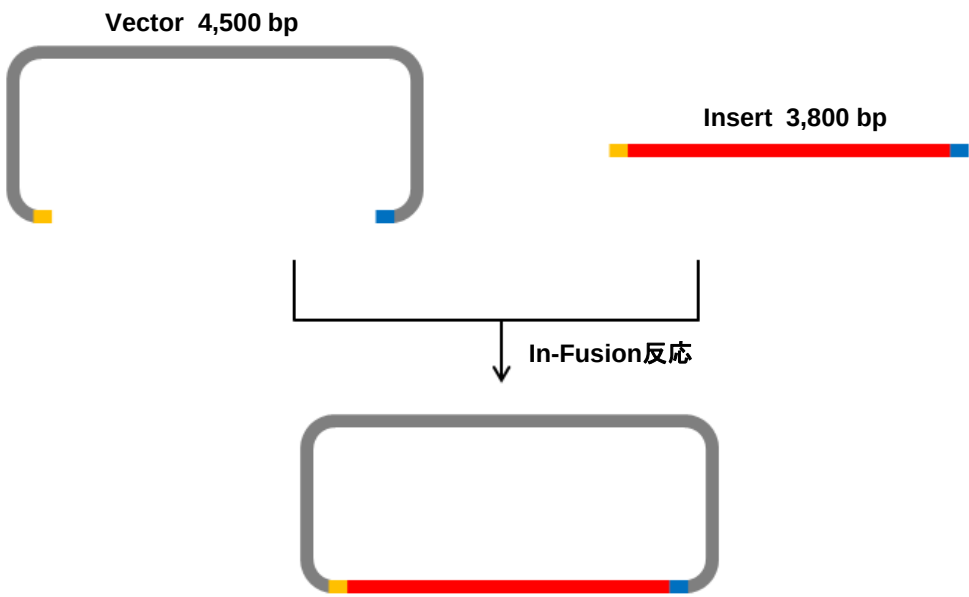
ユーザー様実施例(4)

In-Fusion® Cloning Kitと他社同タイプキットの比較実施例

【データご提供】九州大学大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門 様

実施内容

In-Fusion® HD Cloning Kitと他社同タイプキットを使用して、PCRにより線状化したベクター4,500 bpに3,800 bpのインサート断片のクローニングを行った。
反応時間は、In-Fusion® HD Cloning Kitは推奨の15分、他社同タイプキットは推奨である15～60分の中から、15分、50分のそれぞれで行った。
反応後、各条件で出現したコロニーの中から各6個ずつをピックアップし、コロニーPCRにより目的遺伝子の有無を確認した。



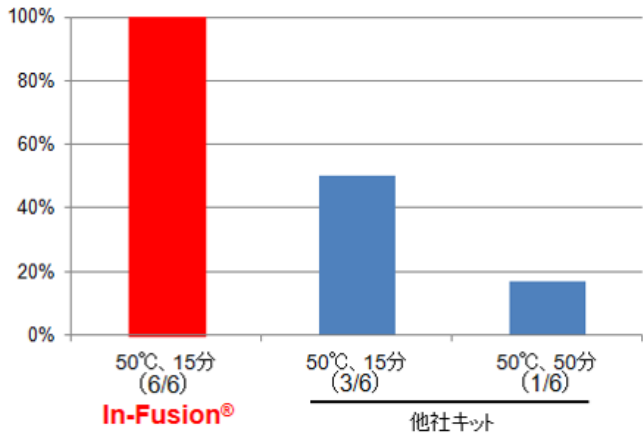
結果

出現したコロニー数は、In-Fusion®キットの方が他社キットよりも多かった。各反応条件において6個のコロニーをピックアップしてコロニーPCRで目的遺伝子を確認したところ、In-Fusion®キットは100%の割合で目的クローンが得られたが、他社キットの目的クローンの取得率は50%以下だった。

<出現した形質転換コロニー数>

	In-Fusion HD	他社キット	
反応条件	50℃、15分	50℃、15分	50℃、50分
出現したコロニー数	169	56	60

<目的クローンの割合>



ユーザー様実施例(5)

■ 遺伝子のクローニング

【データご提供】広島大学大学院医系科学研究科 木下 恵美子 様

実施内容

ヒトの細胞から調製したmRNAから、逆転写酵素を用いて、DNA-RNAハイブリッドを作成した。それをテンプレートに、150種類の遺伝子を増幅して、クローニングを試みた。

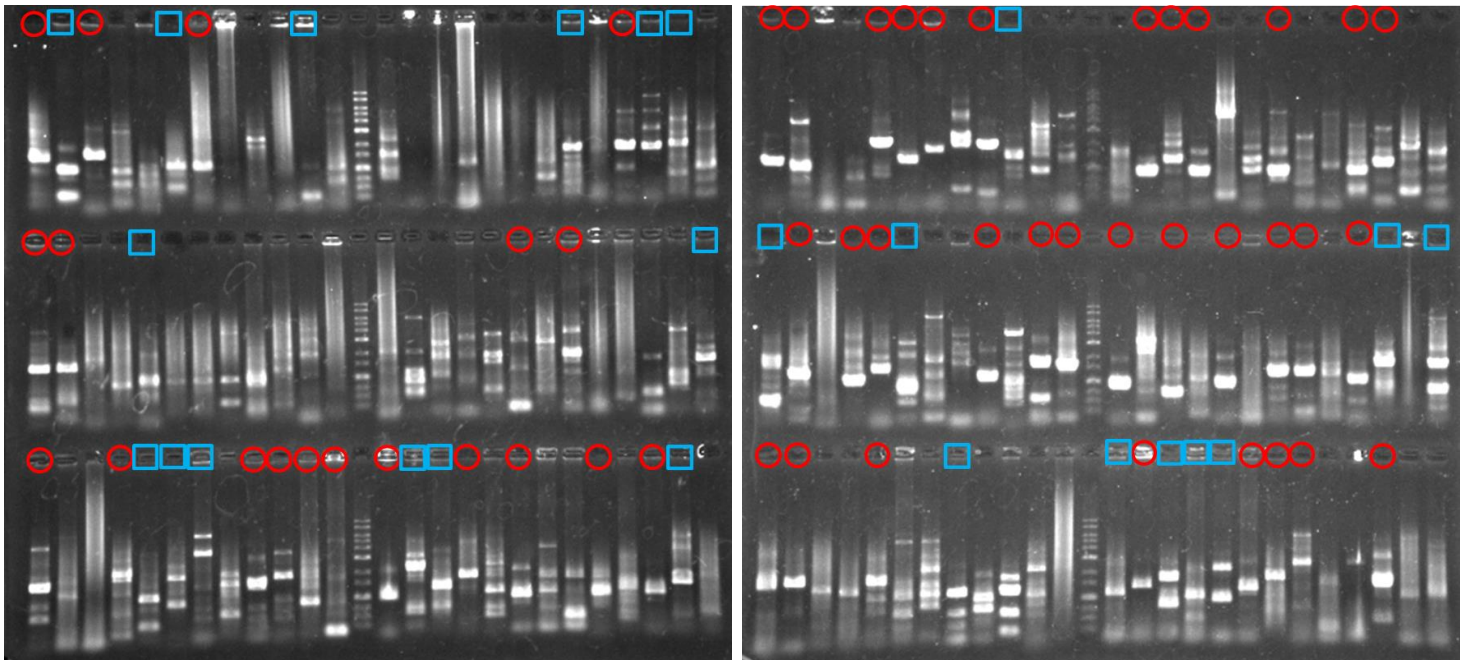
結果

○ は、精製せずに、Cloning Enhancer処理をしてIn-Fusion反応を行い、クローニングに成功したもの。

□ は、ゲル精製をしてIn-Fusion反応を行い、クローニングに成功したもの。

(印のないもので、ゲル精製をしてからPCRをやり直すことで特異的バンドが明瞭に観察できたものがあり、最終的にIn-Fusionで101種類のクローニングに成功した。)

目的断片よりも低分子側に非特異的増幅がある場合は特に、コロニーの当たり率が低いので、精製などをしたほうが良いと思った。



In-Fusionを使った感想はいかがでしたか？

遺伝子を目的のベクターに簡単に入れることができる。多数の遺伝子を短期間でクローニングできたので、非常に有用だと思う。

In-Fusionを使ってみれば、もう制限酵素で切り張りするようなクローニングには戻れない。

In-Fusionを使用したことがないユーザー様に一言

キットの値段が高いと思われるが、反応の液量を減らすなどの工夫もできるし、簡単なので、結局、時間と労力とコストの削減になる。

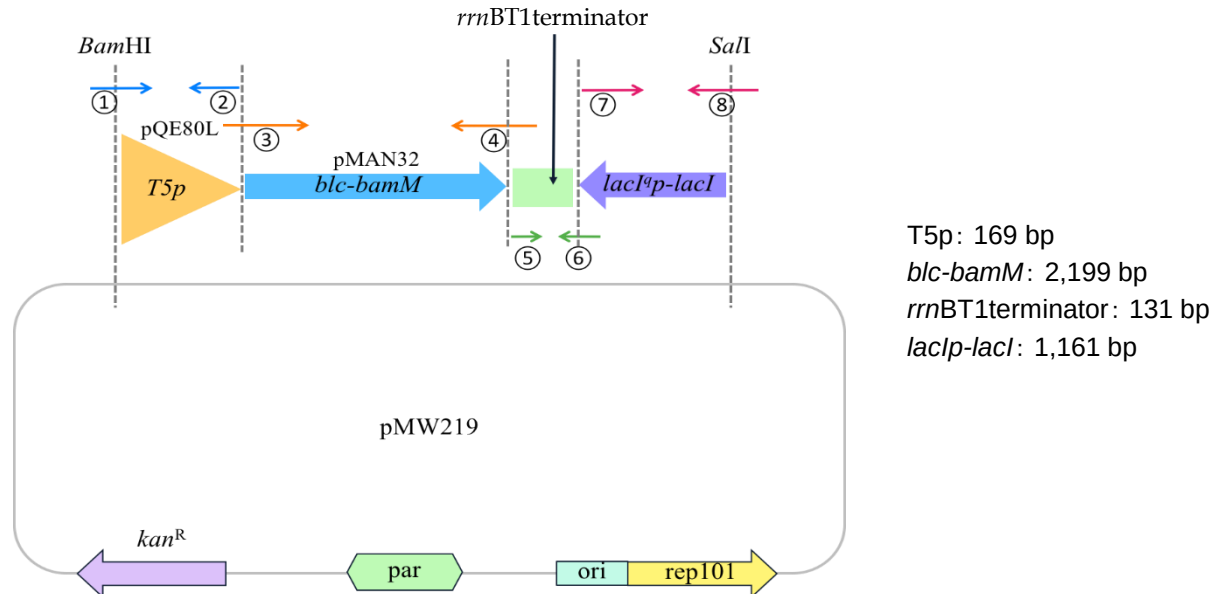
ユーザー様実施例(6)

In-Fusion® Cloning Kitを用いた4断片マルチクローニングの成功

【データご提供】京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科 応用生物学専攻 微生物工学研究室 西村 真波 様

実施内容

pMW219をBamHIとSalIでリニア化し、In-Fusion® Cloning Kitを用いて4断片を同時にクローニングした。



結果

4コロニーを得ることができ、全てをコロニーPCRで確認した。その結果、4コロニー中3コロニーで正しくインサートが挿入されていた。



In-Fusionを使った感想はいかがでしたか？

作製に1ヵ月以上かかっていた4断片挿入を1週間程度でクローニングできてしまう、作製時間の短縮に脱帽しました。また、時間短縮されるだけでなく成功率の高さに驚いています。制限酵素によるクローニングよりも成功率が高く、“使わなければ損”だと感じました。

In-Fusionを使用したことがないユーザー様に一言

In-Fusion® Cloning Kitに出会ったことで、研究の進捗速度が大幅に変わりました。これ一つで、コスト削減だけでなく時間も短縮される、私にとってこれは“魔法の製品”です。「使わないと損」です。

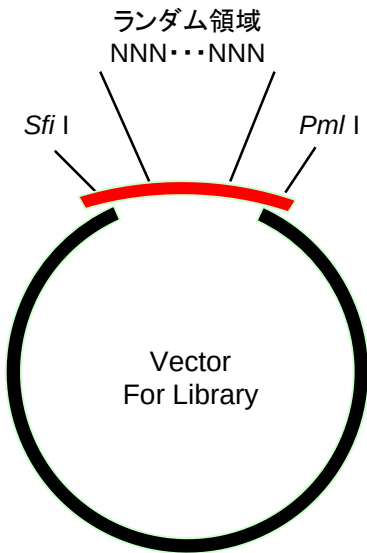
ユーザー様実施例(7)

■ 人エライブラリの作製(他社製品との比較)

【データご提供】T大学 ○ 様

実施内容

ランダム塩基配列を持つ遺伝子断片(75 bp)をベクター(制限酵素*Sfi* I, *Pml* Iで切断、約5,900 bp)にクローニングして、ペプチドライブラリを作製する予備検討を行った。切断したベクター 50 ng、インサート 0~20 ngを10 µlの系で反応させ、1/10量をエレクトロポレーションにより大腸菌に導入した。1/10量をプレートに播種して、生じたコロニー数をIn-Fusion® HD、他社製品A、他社製品Bで比較した。



結果

生じたコロニー数は表のようになった。他社製品Aは、コロニー数は多いものの、インサートなしの場合でもコロニー数が多く、ライブラリとしては不適であると判断された。In-Fusion® HDおよび他社製品Bが、vector : insert = 5 : 1の条件において、同程度のコロニー数の出現で極大値となった。今回のベクターや配列の条件では、In-Fusion® HDと他社製品Bに大きな差は見られなかったが、価格面や使用時の手軽さ(他社製品Bは凍結しているので使用前に溶解が必要、複数回の凍結融解での活性低下が心配であった)を考慮し、今回はIn-Fusion® HD、5 : 1の条件を採用してライブラリ調製を行うこととした。

		vector 50 ngに対するinsert量 (ng)						
		0	0.5	1	2	5	10	20
コロニー数	In-Fusion® HD	1	0	2	2	44	89	34
	他社製品 A	11	98	87	98	51	383	299
	他社製品 B	0	2	12	10	43	78	47

In-Fusionを使った感想はいかがでしたか？

3種類のキットを用いてIn-Fusion® HDをすることになったが、このような比較実験はあまりしたことがなかったので興味深かった。末端のオーバーラップ配列や、断片長によっては他のキットの方が効率の良い場合がある(同僚の話)ようだが、これまでの経験上、第一選択はIn-Fusionで問題ないと思う。

In-Fusionを使用したことがないユーザー様に一言

クローニングの際に制限酵素サイトに悩むことがなくなります。また、ライゲーションよりも効率が良いので、特にライブラリ構築の際にはおすすめです。

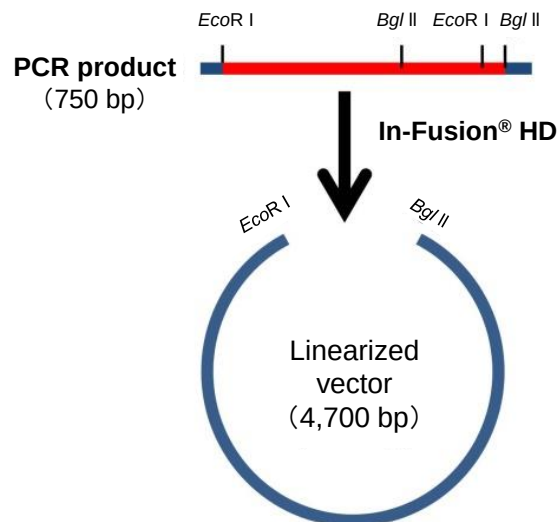
ユーザー様実施例(8)

■ 訳あって、PCR産物を制限酵素処理できない時

【データご提供】明海大学歯学部生化学分野 坂東 健二郎 様

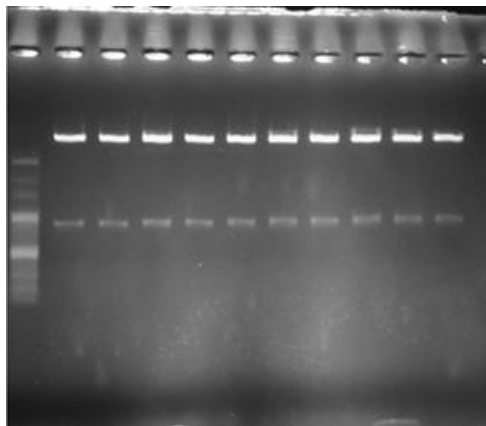
実施内容

PCR産物をベクターにライゲーションしようとしたところ、PCR産物中に用いようとした制限酵素のサイトがある事が判明した。PCR産物を制限酵素処理すると、断片化してしまうため、In-Fusion® HD Cloning Kitを使う事にした。



結果

充分な数のコロニー(およそ700)が得られたので、そのうちの10クローンをEcoR I処理し、1%アガロースゲルで電気泳動した。すべてのクローンで正しいインサートと思われる750 bpくらいのバンドが認められた。



In-Fusionを使った感想はいかがでしたか？

PCR産物中の制限酵素サイトを気にせずにベクターを構築できるのがよい。
PCR産物の制限酵素処理が不要なので、酵素処理後の精製によるPCR産物のロスが防げるのがよい。
効率もいいので、2~3クローンをミニプレップすれば十分かもしれない。

In-Fusionを使用したことがないユーザー様に一言

T4リガーゼよりも高価ですが、効率がいいので、失敗してやり直す事を考えると、逆にコストダウンになるかもしれません。

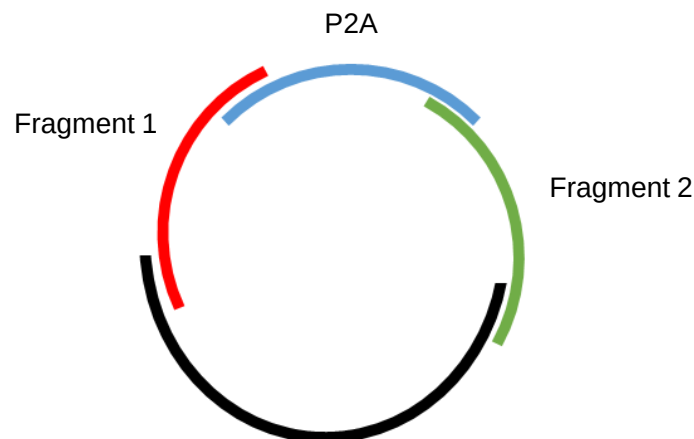
ユーザー様実施例(9)

P2A配列の挿入

【データご提供】自治医科大学分子病態治療研究センター 遺伝子治療研究部 瀬原 吉英 様

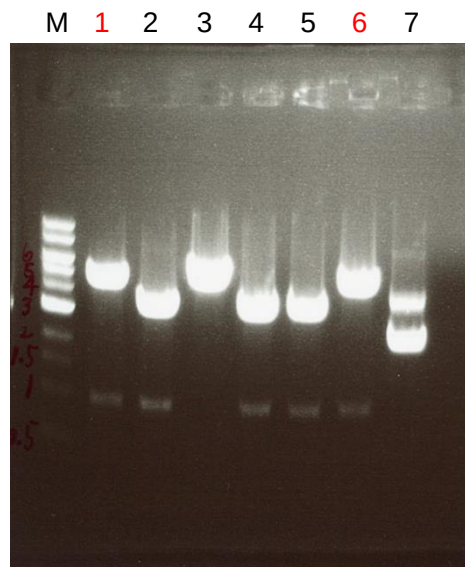
実施内容

2つの遺伝子配列の間にP2A配列を挿入する際にIn-Fusionクローニングで行いました。P2A配列はDNA合成を＋鎖と－鎖について行い、annealing bufferで2本鎖とし、適切な濃度に希釈して用いました。P2A配列は57塩基ですが、15塩基ずつのFragment 1(717 bp)とFragment 2(513 bp)へのoverlap配列を付加し、3つの配列を一度にIn-Fusionしました。



結果

7つのコロニーのうち2つで目的のプラスミド(赤字)を認めました。



Marker: 1 kb ladder

In-Fusionを使った感想はいかがでしたか？

クローニングが自由自在です。

In-Fusionを使用したことがないユーザー様に一言

時間の短縮と効率の高さという点でお勧めです。

Q. 「In-Fusion」を使ってみた感想は？

◆ T大学 I様

宣伝どおりで成功率が高かった。

◆ I大学 K様

目的の遺伝子をPCRで増幅し、cloning enhancer試薬を処理してIn-Fusion反応を行うだけで、100%の確率で陽性コロニーを得ることが出来ました。面白い原理に基づいたクローニング方法だなと思っていたけど、実際に使ってみて本当に高い確率でクローニングが出来、有用な手段だなと思いました。

◆ T大学 Y様

クローニングの実験ってCase by caseでうまくいかないことが多いですが、本製品を使ってから安定性が高まりました！

◆ H大学 T様

成功率ほぼ100%。ライゲーションの失敗もIn-Fusionで即解決。

◆ K大学 I様

ゲノム編集用ドナーベクターの構築において、時間・労力・費用の大幅な節約になるので使っています

◆ T大学 H様

複数断片をクローニングしても効率よく当たりが取れるので使ってよかった！

◆ K株式会社 A様

10kbを超えるようなプラスミドを作製する際にも成功率が高く、非常に助かります。

◆ K大学 K様

何回やってもうまくいかなかったクローニングが1回で成功しました。insertとvectorの準備も簡単で、作業にかかる日数も1日少なく終わることができました。

◆ M大学 N様

プライマーは長くなるが、インサート側の内部制限酵素配列を気にする必要がないのは大変便利。また、PCR後すぐにインフュージョン反応に持ち込めるため、仕事が早い。

◆ N大学 N様

添付されてきたPrimeSTAR MAX polymeraseの特異性も高く、非常に高効率でクローニングが完了して素晴らしい一言です。

◆ N大学 O様

相変わらず安心して使用できる。これからも使い続けたい。

◆ N大学 K様

初めての時はとにかく驚きました。3つの断片をベクターに組み込んだり、変異、欠失を導入したり、それまでsite-directed mutagenesisやオーバーラップ領域を使ったPCRでの遺伝子融合で苦労していた部分があっという間に解消しました。

◆ T大学 K様

今回、目的のコンストラクトに無駄な配列を入れたくなくて、制限酵素での切り貼りでは無理だったので、初めてIn-Fusionを使いました。1回で成功してビックリしました。今後も使っていきたいです。

◆ S研究所 A様

PCR product のベクターへのクローニングがどうしてもうまくいかず、一ヶ月以上を費やしてしまった。やむにやまれず、In-Fusionを試してみたら、一発で入った。もっと早くに使えばよかったと後悔している。

◆ T大学 O様

便利すぎる！制限酵素を利用したトラディショナルなクローニングにはもう戻れない！！

◆ S大学 Y様

入れたいところに入れられる、末端の切断処理も不要、反応時間も短い、1液になっている、・・・良いことばかりで大満足で使っています。

◆ T大学 F様

初めてIn-Fusionを使ったが、コロニーがちゃんと生えてきたのでよかった。

◆ S大学 S様

5断片のligationに使っていましたが、成功して驚いています。

Q. まだ使われたことがない方に対して、一言お願いします。

使って
よかった！



◆ I大学 K様

制限酵素とligaseを用いたクローニングに比べて、プライマー作製分程度 割高かもしれませんが、実験が1回で完了するならコストパフォーマンスは高いと思います。特に大きな遺伝子の組込などに有用です。

◆ T大学 I様

他社でも同等品があるが安定しているのをお勧め。

◆ N大学 T様

DNAクローニングやベクター構築の時間や労力を大幅に減らすことができます。また、多様な用途に利用できます。おすすめです。

◆ K大学 I様

まず、使ってみましょう！

◆ S大学 S様

3断片以上をつなぎたい場合は、OneStepでできるIn-Fusionをオススメします。実験時間が大幅に節約されます。

◆ T大学 Y様

騙されたと思って！

◆ N大学 N様

特別なベクターなどが必要なわけでもなく、プライマーを設計してPCRかけるだけでクローニングが簡単にできる。こんな便利な試薬は使わないと損です。うちのラボではもう制限酵素処理なんてしてません！

◆ T大学 Y様

1つの配列をベクターに入れるのも良いですが、複数の配列をベクターに入れたいときには是非オススメです！

◆ K大学 K様

プロトコルも簡単で素早くできるので、クローニングに悩んでいたは是非おすすめします。

◆ T大学 S様

翌日、ポジティブコロニーを見るのが楽しみになります。

◆ N研究所 W様

プライマーにちゃんとサイトと冗長を加えてもなかなか切れないインサートの制限酵素処理がばかしくなります。自分なんぞ、一度TAクローニングしてプラスミドで増やしてから制限酵素処理してましたから。制限酵素サイトも不要でベクター側もPCRで増やせるインサート・ベクターの両方に同一配列の15 bpの「のりしろ」があれば自由に接続できます。絶対に使うべきです。

◆ N研究所 I様

一度使ったら、やめられなくなるかもしれません。時は金なり。



たくさんのコメントありがとうございました！

In-Fusionのテクニカルノートをウェブで公開しています！

- 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
- モノクローナル抗体開発のための迅速、確実なハイスループットクローニング
- In-Fusionを用いたsgRNAの簡単クローニング など



★ 詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください…

In-Fusion Technical Note

検索

他社同タイプキット比較データ

他社同タイプキットとの比較(1) — 目的クローンの割合 —

In-Fusion®とA社キットを比較して、どちらのキットが目的のクローンがきちんと得られるかを検証

方法

- ・クローニングベクター：BamH Iで切断したpUC19を使用した。
- ・反応条件：それぞれ推奨のプロトコールに従った。
A社キットの反応時間は15～60分であるため、マルチクローニングの場合のみ60分の反応条件でも行った。
- ・形質転換：Stellar™ Competent Cells（製品コード 636763等）を使用した。
- ・目的クローンの割合：「Vector + Insert」で出現したコロニーから26個をピックアップしてシーケンスを行い、正しい配列のコロニー数から算出した。

(1) マルチクローニングの場合

2.7 kbのベクターに、MBP (1.1 kb)、PROF12 (0.7 kb)、AcGFP (0.7 kb) の3種類のインサートDNAを同時にクローニングするマルチクローニングを行った。

結果

	In-Fusion® HD Cloning	A社キット	
反応条件	50℃、15分	50℃、15分	50℃、60分
Vector + Insert	89コロニー	111コロニー	392コロニー
Negative Control (no insert)	1コロニー	39コロニー	78コロニー
目的クローンの割合	100% (26/26)	19% (5/26)	73% (19/26)

- ・In-Fusion®に比べ、A社キットではNegative Controlのコロニー出現数が圧倒的に多かった
- ・50℃、15分における反応において、目的クローンの割合はIn-Fusion®では100%だったが、A社キットは19%と低かった。

(2) シングルクローニングの場合

2.7 kbのベクターに、1種類のフラグメント (MBP: 1.1 kb) のシングルクローニングを行った。

結果

	In-Fusion® HD Cloning	A社キット
反応条件	50℃、15分	50℃、15分
Vector + Insert	635コロニー	401コロニー
Negative Control (no insert)	1コロニー	39コロニー
目的クローンの割合	100% (26/26)	96% (25/26)

- ・シングルクローニングの場合も、In-Fusion®は目的クローンの割合が100%だった。
- ・In-Fusion®に比べ、A社キットではNegative Controlのコロニー出現数が多かった



ここが大事！

In-Fusion®とA社キットは同じような製品に見えますが、クローニングにおいてのどれをとってもIn-Fusion®が優っていました。
無駄のない、効率的で正確なクローニングのために、In-Fusion®をぜひお使

他社同タイプキットとの比較(2) — 変異の入りにくさ —

In-Fusion®とA社キットを比較して、どちらのキットで変異が入りにくいかを検証

方法

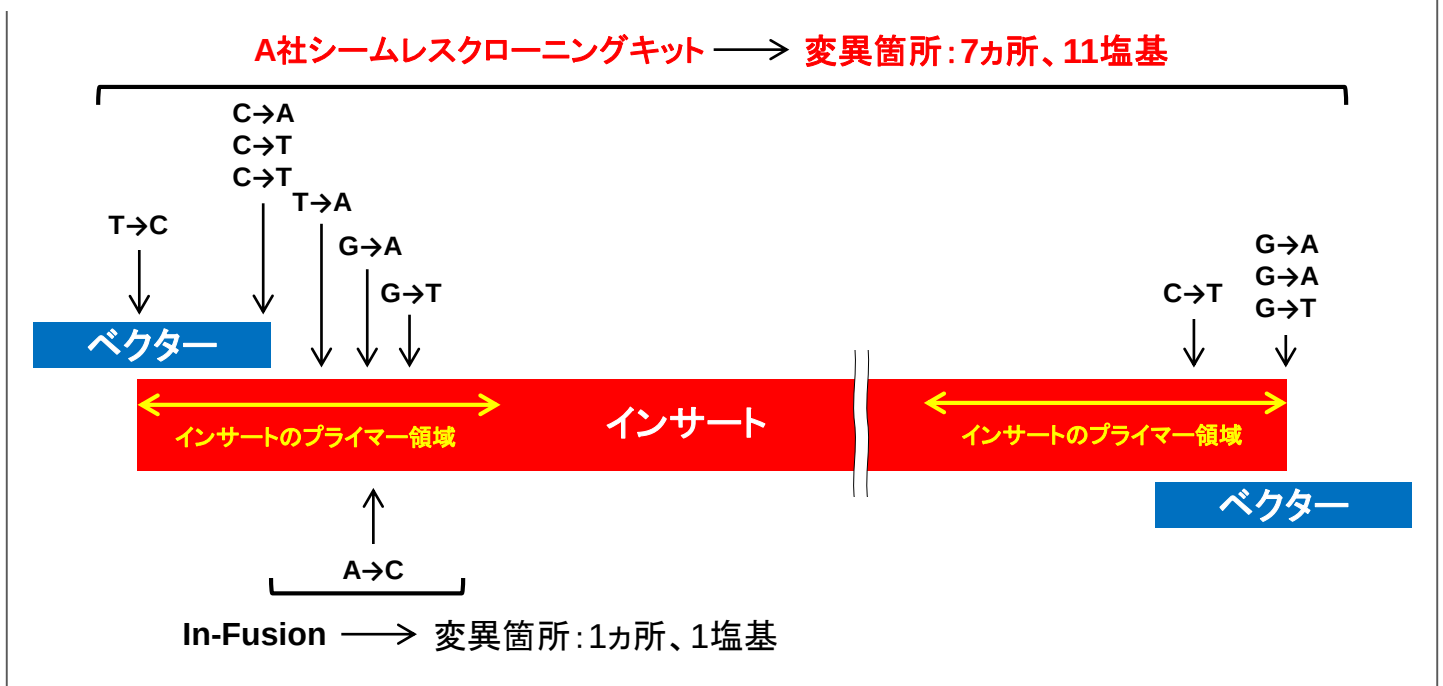
非常に正確性の高いPrimeSTAR®シリーズの酵素を用いてPCR増幅したベクターおよびインサートを、両キットのクローニング反応に使用した。

- ・クローニングベクター：pUC19をPrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（製品コード R050A/B）でPCR増幅して線状化
- ・インサート(5 kb)：PrimeSTAR® Max DNA Polymerase（製品コード R045/B）でPCRを行い増幅
- ・反応条件：それぞれ推奨のプロトコールで行った（相同配列部分：15 bp、反応：50℃、15分）
- ・形質転換：Stellar™ Competent Cells（製品コード 636763等）を使用した。
- ・変異の確認：それぞれ96個の形質転換体からプラスミドを調製してシーケンスを行い、変異が入った部分を確認した。

結果

96個のプラスミドのシーケンスを行い、変異が見られた箇所を模式的に示した。上側がIn-Fusion®、下側がB社キットの変異箇所を表している。

<変異箇所を示した模式図>



プラスミド 各96個のシーケンスを行ったところ、In-Fusion®は1カ所、1塩基しか変異がなかったのに対し、A社キットは7カ所、11塩基の変異が見られた。共通のベクター、インサートを用いてクローニングを行った結果であり、変異はベクターとインサートを結合する際に起こったものと推察される。In-Fusion®の連結反応は変異が入りにくい反応であると考えられる。

大切な「目的クローンの割合」、「バックグラウンドの低さ」、「変異の入りにくさ」
 ください！

In-Fusion クローニングガイド

【In-Fusion®主要製品リスト&キット付属品】

製 品 名	容量	製品コード	価格 (税別)	キット付属品				備考
				Cloning Enhancer	精製用 カラム NucleoSpin	Stellar Competent Cell	CloneAmp HiFi PCR Premix	
In-Fusion® HD Cloning Kit	10回	639648	¥25,000	—	—	—	—	既にタカラバイオの 高 正 確 性 PCR 酵 素 「PrimeSTAR シリー ズ」をお使いの方は こちらがオススメです。
	50回	639649	¥119,000					
	100回	639650	¥204,000					
In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer	10回	639633	¥29,000	●	—	—	—	
	50回	639634	¥131,000					
	100回	639635	¥233,000					
In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit ※	8回 × 3	639690	¥74,000	—	—	—	—	
	96回	639691	¥219,000					
In-Fusion® HD Cloning Plus	10回	638909	¥56,000	—	●	●	●	In-Fusion キットを 初めて使用される方、 特にオールインワン キットをご要望の方は こちらをどうぞ！
	50回	638910	¥199,000					
	100回	638911	¥314,000					
In-Fusion® HD Cloning Plus CE	10回	638916	¥54,000	●	—	●	●	
	50回	638917	¥187,000					
	100回	638918	¥302,000					

※ In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kitは、凍結乾燥タイプ(室温、デシケーター内保存可能)の In-Fusion® HDキットです。マイクロチューブに分注済みのため直ちに使用することができます。



In-Fusion® HD付属製品

Cloning Enhancer

PCR産物がシングルバンドの場合、Cloning Enhancerで前処理をすることで、精製することなく、そのままIn-Fusion反応に用いることができます。簡単なIn-Fusionクローニングをさらに簡単に、ぜひ併せて使っていただきたいコンポーネント。

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

PCR産物が複数バンドの場合にゲル精製を行うスピンカラム

Stellar™ Competent Cells

高い形質転換能を持つコンピテントセル。長鎖プラスミドDNAの形質転換においても高い効率を得られ、同様の遺伝子型を持つ他のコンピテントセルと比較してコロニー形成速度が速い。pUC系プラスミドでの形質転換の際には、β-ガラクトシダーゼのα-相補性を利用し、X-Gal添加による組換え体の青／白選別を行うことができる。

CloneAmp™ HiFi PCR Premix

正確性が極めて高いPCR酵素。In-Fusionクローニングにおいて、インサートDNAをPCR増幅する場合に最適である。
本製品は、In-Fusion HD Cloning Plusシリーズに添付されている。

- ・本パンフレット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、臨床診断用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・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
- ・本パンフレットに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- ・本パンフレット記載の価格は2023年12月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2024年7月修正N

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
Website <https://www.takara-bio.co.jp>
Facebook <https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店