

In-Fusion™ System

ユーザーの方から In-Fusion Systemを使用した感想を頂きましたのでご紹介いたします。

In-Fusion PCR Cloning Kitは制限酵素やりガーゼ、平滑末端処理を必要とせず、PCR産物のクローニングを迅速かつハイスループットに行えるように設計された大変簡便な製品です。実際にお使い頂いた方からも簡便だったという感想をいただきましたので、ご紹介いたします。

今回、大腸菌でのタンパク発現用コンストラクトを作るにあたって、Clontechの In-Fusionシステムを初めて使用した。というのも、通常の場合であれば、制限酵素サイトを付加したプライマーを設計してPCRで目的遺伝子を増幅、制限酵素で切断してフレームを合わせて発現用ベクターに挿入するというのが王道なのであるが、今回は目的とする遺伝子配列中に使用したい制限酵素サイトが入ってしまうので、酵素で切って挿入という方法を避けたかったからである。(実際には、pET-21ベクターに挿入するために、Nde I あるいはNhe I でインサートを切断して挿入したが、両制限酵素サイトが目的の遺伝子配列中に存在した。) カタログによると In-Fusionシステムは、独自の3' 5'エキソヌクレアーゼ酵素によってベクター側およびインサート側にcohesive endを作りだすことでアニーリングを行うらしい。すなわち制限酵素でcohesive endを作る必要がない。そこで In-Fusionシステムを使用するに至ったわけである。

実際の手順としては、まずマニュアルに従ってプライマーの設計を行った。ベクターと相同的な配列15塩基に続いて目的遺伝子と相同的な配列15塩基、計30merのプライマーを上流、下流用に1セット設計した。このプライマーを用いてPCRを行い、

目的遺伝子を増幅させる。PCR産物がシングルバンドになっているかの確認のために反応液を1~2μlほど泳動してチェック、ついでにDNAの定量(目測)。反応液は余分なプライマーなどを除くためにカラムにかけて精製した。あらかじめベクター側については、挿入したい部位の制限酵素サイトで切断しておき、フェノクロ処理、エタ沈処理をしておく。こちらも切れ残りのチェックおよび定量(目測)のために一部を泳動して確認。ここまでは通常のクローニングの方法と何ら変わらない。インサートとベクターの準備ができたところで、In-Fusionの反応である。反応はいたって簡単。添付バッファーと添付のBSA、インサート(約50ng)、ベクター(約200ng)を混ぜておき、あらかじめ希釈しておいた酵素を加えて37で15分放置、引き続き50に移して15分放置。以上である。ライゲーション反応は必要ない。あとは反応液の一部をそのままトランスフォームに持っていけばよい。翌日、コロニーPCRを行い、インサートの有無を確認した(図1)。16個のコロニーを拾ってPCR反応がうまく行ったものが11個。そのうちインサート有4個、インサート無7個、約40%の効率であった。多少の切れ残りベクターが存在するであろうこと、インサートの定量などがいい加減(目測)であること、また初めて行った実験である事を考えると、割と良い効率であったと思う。(カタログによると90%近い効率が可能らしい。)

使用した感想としてはまず、反応時間30分という簡便さが一番であろう。さらに今回の目的としては、やはり酵素で切らなくてもよいのがポイントであった。目的遺伝子中に制限酵素サイトがある場合、パーシャ

品名	サイズ	カタログ番号	価格
In-Fusion PCR Cloning Kit	50回	631774	¥110,000
	100回	631775	¥180,000

価格は予告なしに変更する場合があります。

In-Fusion Kit 内容

- In-Fusion Enzyme concentrate
- In-Fusion Enzyme Dilution Buffer
- 10X In-Fusion Reaction Buffer
- 10X BSA
- pDNR-Dual, linearized
- 1.1-kb Control Insert

ルに切ったり、ダブルインサートでのライゲーションなどをしないで済むのは大変ありがたい。また、これは実際に試してないのでわからないが、In-Fusionシステムの原理によると、酵素により長めのcohesive endが作製されるので、TAクローニングベクターによるクローニングよりも効率がいいのではないかと考えられる。さらに原理にはPCR産物がフレッシュでなくてもOKであるのもうれしい。長めのプライマーを必要とする、またベクターごとにプライマーを変えなければならないという弱点はあるが、逆に言えばTAクローニングベクターがなくても、手持ちのベクターを利用して効率のよいクローニングが行えるということである。原理的にはどんなベクターにも適用可能であり、またカタログによると長いインサートのクローニングにも適しているとのことなので、TAベクターに変わるシステムとして In-Fusionシステムを検討してみるのもよいのではないかと思う。(慶應義塾大学医学部医化学教室 金子晴美)

レポートをお寄せ頂きました慶應義塾大学医学部医化学教室 金子晴美先生に深謝いたします。



図1 インサートの確認結果

実験レポート募集中

Clontech製品を使用した感想をお待ちしております。本誌に掲載させて頂きました場合には、粗品を進呈いたします。