

In-Fusion を用いた sgRNA の簡単クローニング



はじめに

ゲノム編集実験に使用する sgRNA 配列を Cas9ベクターに組み込むための一般的なクローニング方法は、専用の試薬（例：II S 型制限酵素）を必要としたり、新しい制限酵素サイトの挿入、制限酵素処理、ライゲーション等、複数のクローニングステップを必要とする長いプロセスを伴います。このようなアプローチはクローニング効率が低くなるため、目的 sgRNA が組み込まれたクローンを同定するために時間のかかるスクリーニングを追加で行わなければなりません。これらの問題は、あるベクター上の sgRNA 配列を別のベクターに移動させることを困難にし、さらに1つのベクター上に複数の sgRNA 配列を組み込むことはほぼ不可能でした。

しかし、Khan らは [In-Fusion HD Cloning Plus](#) を利用して、Cas9/sgRNA プラスミドの作成方法を改善し、誰でも簡単に行うことが可能になったことを発表しました。彼らは、In-Fusion の1ステップ反応を用いることで、形質転換可能な1つ、あるいは複数の sgRNA を発現するプラスミドの構築を3日以内に完了させることに成功しました。

結果

Single guide RNA (sgRNA) 配列のクローニング

植物用の発現ベクター（pDE-Cas9）に簡便、迅速に sgRNA 配列をクローニングするために、著者らは1組の標的配列特異的なプライマー（R1、gF1）と、2つのユニバーサルプライマー（F1、gR1）を用いる方法を考案しました（図1）。それぞれのプライマーセットを用いて2つのフラグメントを作製します。フラグメント A は U6-26(P)プロモーターと3'末端の20 nt のプロトスペーサー配列から構成され、フラグメント B は、sgRNA とプロトスペーサー配列の3'末端の15 bp の重複配列（In-Fusion 反応に必要）から構成されます。フラグメント A と B は1つのチューブ内で、線状化された pDE-Cas9ベクターに1ステップで組み込まれます。

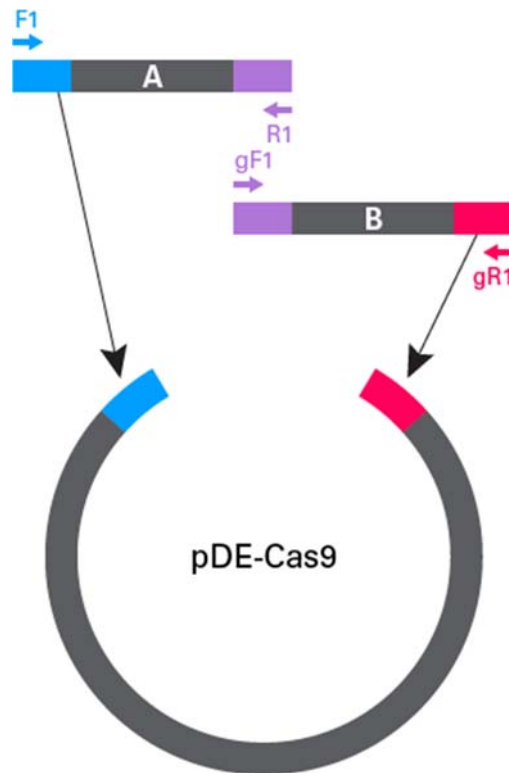


図1 .In-Fusion を用いた sgRNA の線状化ベクターへのクローニングの概略図

Fragment A と B は PCR で作製しました。その後、In-Fusion クローニングの1ステップの反応で線状化 pDE-Cas9ベクターにディレクショナルにクローニングされました。

クローニング後、制限酵素処理によるスクリーニングのために4個のコロニーからプラスミドを抽出しました。従来のリガーゼを用いる方法では、スクリーニングでポジティブクローンを見つけるために大量のコロニーの解析が必要ですが、In-Fusion で得た4個のコロニーは制限酵素処理で予想通りの消化パターンが得られました。その後、ベクター（pDE-Cas9-gYFP1）のシーケンス解析をした結果、フラグメントが正しい向きで組み込まれていることがわかりました。これらの作業は3日以内に完了し、形質転換可能なベクターが効率的に短時間で作製できました。

複数の sgRNA 配列のクローニング

著者らは前述の方法を、2組の標的配列特異的プライマーと2組のユニバーサルプライマーを用いることで、2種類の sgRNA 配列を pDE-Cas9ベクターにクローニングできるように改良しました（図2）。最初の PCR 反応で A、B、C、D、4つのフラグメントを作成します。フラグメント A と C は U6-26 (P) プロモーターと20塩基のプロトスペーサー配列で構成されており、フラグメント B と D は単一の sgRNA 配列を表しています。2回目の PCR 反応では、フラグメント A と B は結合してフラグメント AB に、フラグメント C と D が結合してフラグメント CD となります。2回目の PCR 反応後、ゲル精製されたフラグメント AB と CD は、1チューブ内で、線状化された pDE-Cas9ベクターに1ステップの In-Fusion 反応により組み込まれました。

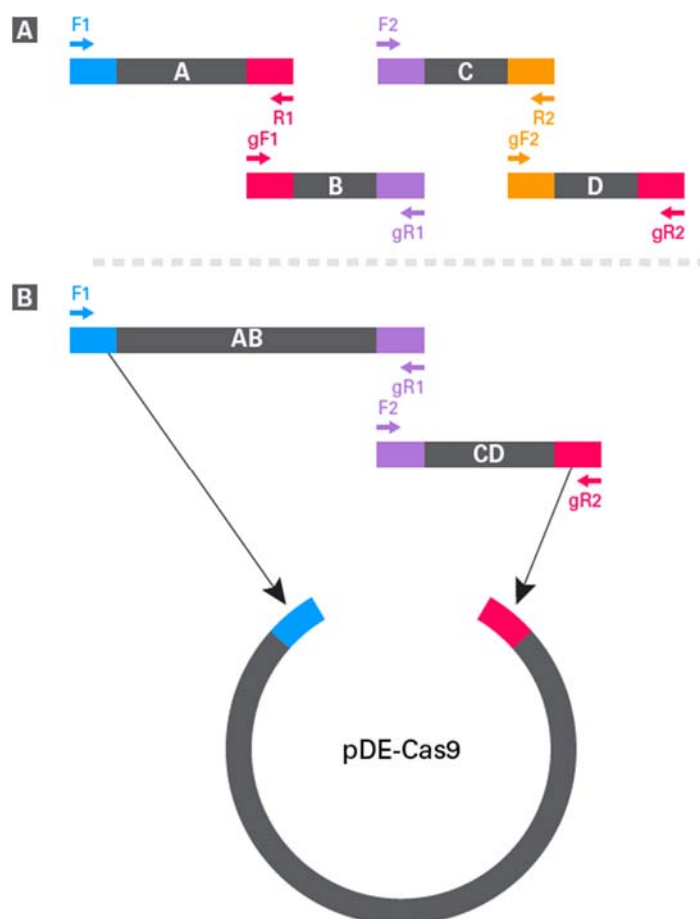


図2. In-Fusion HD Cloning Plus を用いた複数の sgRNA 配列の線状化ベクターへのクローニングの概略図

フラグメント A、B、C、D を増幅し (パネル A)、PCR によりフラグメント AB、フラグメント CD に融合します (パネル B)。その後フラグメント AB と CD は直鎖状ベクターにクローニングされました。

クローニング後、5個のコロニーを制限酵素処理により解析し、5個とも全て予想される切断パターンが得られました。その後の各クローンのシーケンス解析の結果、フラグメントは100%正しい向きでベクターに組み込まれることがわかりました。これらの作業は3日以内に完了し、1個あるいは複数の sgRNA 配列を組み込んだ、形質転換可能なベクターを効率的に作製できることを実証しました。

結論

従来の sgRNA 配列のクローニング手法は非効率的であり、時間と労力がかかります。また、ポジティブクローンを同定するために大量のコロニーのスクリーニングが必要であり、別の発現ベクターに移動させることは容易ではありませんでした。しかし In-Fusion を用いたクローニング手法はここに記されている通り、前述の問題点を改善し、1種類あるいは複数の sgRNA 配列を含んだベクターを1チューブ、1ステップで迅速かつ高効率に作製することが可能になりました。また、ユニバーサルプライマー配列を変えるだけで、様々なベクターに適合することができ、CRISPR/Cas9実験用のコンストラクトを迅速かつ高効率に作製すること

が可能となります。

In-Fusion テクノロジーを用いた sgRNA のクローニングについての詳細は [overview page](#) をご覧ください。

方法

In-Fusion のシームレスクローニング反応は、ベクターに対するインサートのモル比率を複数試しましたが、全てにおいて成功しました（インサート：ベクターの割合は2：1を推奨します）。

クローニング反応液は、フラグメント AB、あるいはフラグメント AB と CD（各フラグメント15~180 fmoles、各0.5 µl）、0.5 µl の線状化された pDE-Cas9ベクター（15~90 fmoles）、そして0.3 µl の5x In-Fusion HD Cloning mix を混合しました。これらの反応は、50°Cで15分インキュベートし、次に80°Cで10分インキュベートしました。その後、1 µl の反応液を20 µl の [Stellar Competent Cells](#) を用いて形質転換しました。

ゲル精製をしたフラグメントを使用した結果、精製していないフラグメントを使用した時と比べ、コロニー数が44倍に増加しました。具体的には、ゲル精製したフラグメントを用いた実験からは約200個のコロニーが得られたのに対し、ゲル精製していないフラグメントを用いた実験からは4、5個のコロニーしか得られませんでした。

1種類の sgRNA が入ったクローンを4個、複数の sgRNA が入ったクローンを5個選んで解析したところ、全てのクローンで予想される長さの制限酵素断片長多型解析の結果が得られました。

これらのコンストラクトのシーケンス解析から、標的のインサートが100%正しい配列、向きで組み込まれることが明らかになりました。

※詳細は User Manual をご確認ください。

参照

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

関連製品

製品コード	製品名	容量
638909	In-Fusion® HD Cloning Plus	10回
638910	In-Fusion® HD Cloning Plus	50回
638911	In-Fusion® HD Cloning Plus	100回
639648	In-Fusion® HD Cloning Kit	10回
639649	In-Fusion® HD Cloning Kit	50回
639650	In-Fusion® HD Cloning Kit	100回
636763	Stellar™ Competent Cells	100 µl×10

TECH NOTE

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。