

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



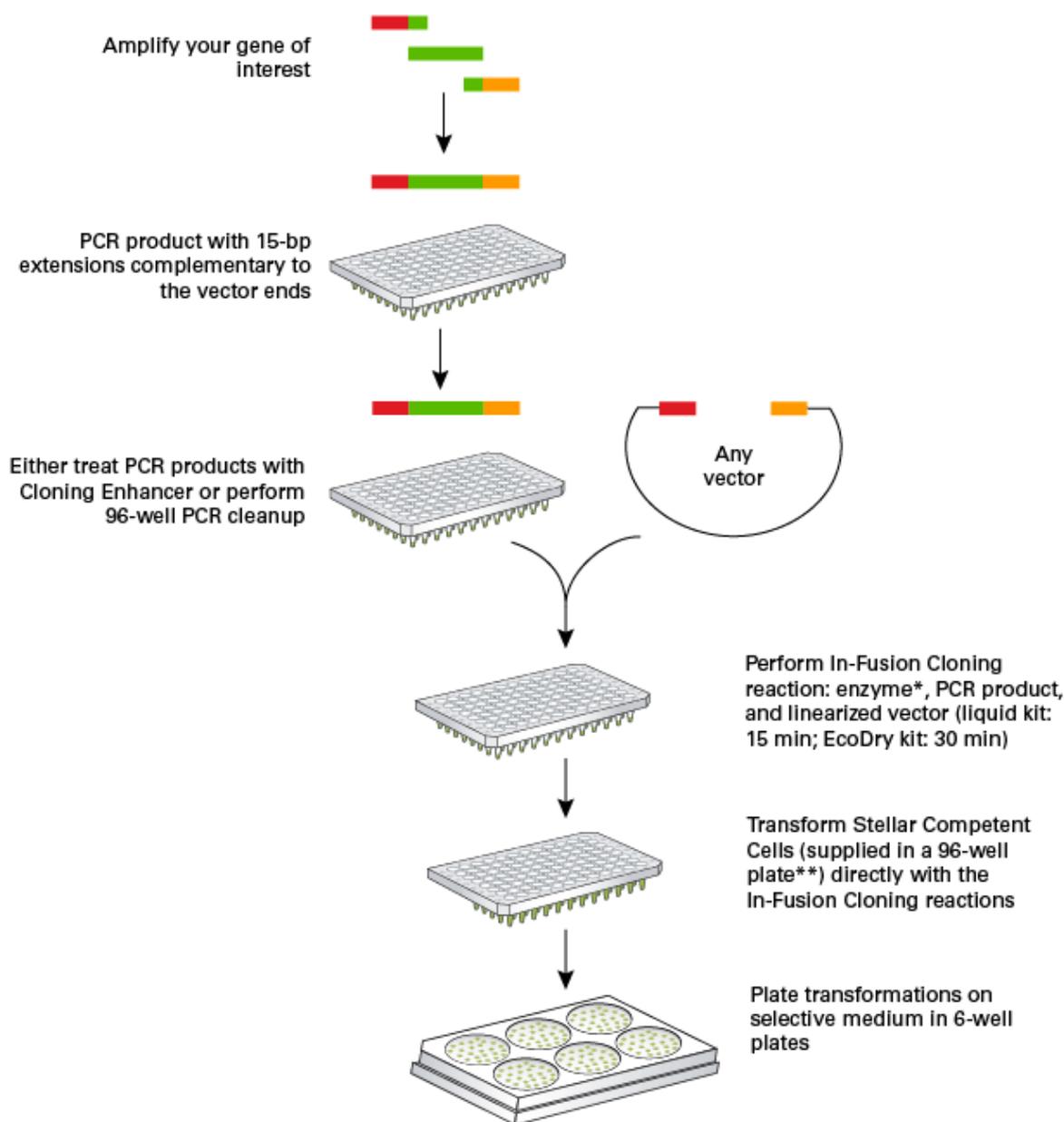
はじめに

モノクローナル抗体 (mAbs) は、さまざまな疾患の中でも特に、がんや神経変性疾患の分子標的療法の治療薬として注目されています。その開発のためには、最初のスクリーニングに何千ものモノクローナル抗体を検討することがあり、効率的かつ迅速にクローニングや発現、スクリーニングする方法の開発が極めて重要です。近年、B 細胞から可変領域の cDNA を抽出し、この領域を発現ベクターにクローニングする開発フローが主流になってきました。この手法は 1 回のクローニングで発現プラスミドの作製が完了しますが、従来のクローニング手法や発現プロトコールを使用した場合、作製できる抗体の種類数が限られてしまう可能性があります。

さらに、従来クローニング法はいくつかの制約があります。それは、効率の低いリガーゼ反応 (特に大きい DNA フラグメントを使用する時)、不要ヌクレオチドの付加、インサートの方向性の欠如、そして手間のかかるベクター・インサートの調製などが挙げられます。リガーゼ反応とマルチステップでのフラグメント調製作業は数日間に渡り、不要ヌクレオチド付加と方向性の欠如は、目的インサートのフレームシフトの原因となったり、間違った向きでインサートがクローニングされてしまうといった深刻な問題を引き起こします。一般的にこれら従来法は、実験のセットアップやコロニースクリーニングにかなりの時間を費やします。さらに、実験のスケールアップを行う場合、このような問題点やトラブルシューティングへの対応が増えてしまいます。これらの問題を最小限に抑えることは、何千ものクローンをスクリーニングする上でとても重要です。

In-Fusion クローニングはライゲーションフリーで、従来のクローニング手法に見られる問題点を解決できる高効率なテクノロジーです。このクローニング法は、どのような PCR フラグメントでも目的のベクターに 95% の確率で、迅速かつ正確にさらにシームレスでクローニングすることが可能です。In-Fusion クローニングはベクターとインサートの末端相同性によって行われ、バックグラウンドが低く、インサート方向も正しくクローニングされます。クローニング結果の信頼性や、In-Fusion クローニングのプロトコールのスピードとシンプルさから、ハイスループット化へ容易に適応させることが可能です。

以下の図は、96-well プレートを用いた In-Fusion の基本的なワークフローを示したものです。このワークフローには、推奨するステップ (形質転換大腸菌をプレート上で培養するステップ) が含まれていますが、以下に詳述する研究において Morphotek 社の研究者らは、このステップを省略しています。高精度の In-Fusion クローニングを使うことで、迅速に抗体精製を行うための独自のハイスループットプロセスを開発し、ワークフローをさらに合理化しました (Spide, J.L et al. 2016)。



*Enzyme can be added to PCR/vector mix plate as a liquid reagent. Alternatively, PCR/vector mixes can be added to In-Fusion Cloning EcoDry plate.

**Cells can also be custom ordered in deep-well plates.

結果

クローン化しない簡便ワークフロー

Spidel らは他のクローニング手法も評価した結果、そのシンプルさと高確率でポジティブクローンを得られることから In-Fusion クローニングを選択しました。この方法は従来の制限酵素処理やライゲーションよりも明らかに優れています。In-Fusion テクノロジーによって、Gateway クローニングではなしえなかったシームレスクローニングも可能になりました。

“

In-Fusion を用いることで従来の制限酵素処理やライゲーションよりも、高い割合のポジティブクローニングが得られました。これにより形質転換後の培養が不要になり、実験プロセスの合理化とスループットを向上させることが可能になりました。全てのプラスミドにインサートが組み込まれているため、形質転換した大腸菌を直接ミニプレップすることができます。”

—Jared L. Spidel, MORPHOTEK, INC.

抗体可変領域の cDNA は B 細胞由来の RNA から増幅しました。cDNA 合成用 PCR プライマーは、増幅産物が目的のベクターの末端と 15 bp の相同な配列をもつよう設計しました。この相同性により In-Fusion のクローニング反応が起こり、線状化ベクターへクローニングされます。In-Fusion テクノロジーは PCR で増幅したインサートを、後処理する必要がないため、96-well プレートを用いたクローニングにスケールアップすることが可能です。

In-Fusion クローニングは高効率でバックグラウンドがほとんどないため、形質転換大腸菌をプレート上で培養する必要がなく、形質転換溶液から直接、半クローン化した組換え体プールで培養可能です。通常、リコンビナントクローンをスクリーニングする作業は最も時間がかかるプロセスですが、In-Fusion クローニングを使うことで、正しいクローンで実験を進められていることが明らかのため、実験フローの大変な作業を回避することができます。筆者らは、目的インサートが正確に組み込まれていることを確認することにより、この手法の評価を行いました。従来のライゲーションクローニングでは、低効率で、多くの DNA 操作が必要なため、In-Fusion クローニングのような手法は実現不可能です。

結論

モノクローナル抗体の迅速な作製のためのハイスループットの需要が増加すると共に、正確かつ簡単なクローニングテクノロジーは、実験をスケールアップする上で極めて重要なものになりました。In-Fusion クローニングを用いることで高効率かつ迅速なシームレスクローニングを行うことができ、実験に合わせたワークフローのカスタム化が可能になり、信頼できる結果が得られます。

方法

抗体の可変領域 (V 領域) cDNA は B 細胞由来の RNA を RT-PCR で増幅することで得ました。PCR に用いたプライマーは 5'末端にシグナル配列や定常領域 (C 領域) と相同な 15 bp の配列を含んでいます。今回行っ

TECH NOTE

た In-Fusion クローニングは、V 領域の cDNA をインサートとし、C 領域のベクターにクローニングしました。大腸菌への形質転換後、TB 培地が 1 ml 入った 96-well deep-well プレートに形質転換産物を 50 µl 加え、オーバーナイトで振とう培養しました。培養後はプラスミド抽出を行い、目的のインサートがクローニングされたか確認するためにシーケンス解析を行いました。In-Fusion クローニングの効率を確認するために、グリセロールストックをプレートにストリークし、コロニーPCR を行いました。

詳しい方法は、下記の論文をご覧ください。

参考文献

Spidel, Jared L., *et al.* Rapid high-throughput cloning and stable expression of antibodies in HEK293 cells. *Journal of Immunological Methods* **439** (2016).

*Jared Spidel's testimonial is based on his opinions and not those of Morphotek, Inc./Eisai Inc.; he is not being compensated by Takara Bio for providing the testimonial

関連製品

製品コード	製品名	容量
639650	In-Fusion® HD Cloning Kit	100 回
638911	In-Fusion® HD Cloning Plus	100 回
638920	In-Fusion® HD Cloning Plus	96 回
638918	In-Fusion® HD Cloning Plus CE	100 回
638919	In-Fusion® HD Cloning Plus CE	96 回
639691	In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit	96 回
638915	In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Plus	96 回
636767	Stellar™ Competent Cells (96-well plate)	20 µl×96

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。