

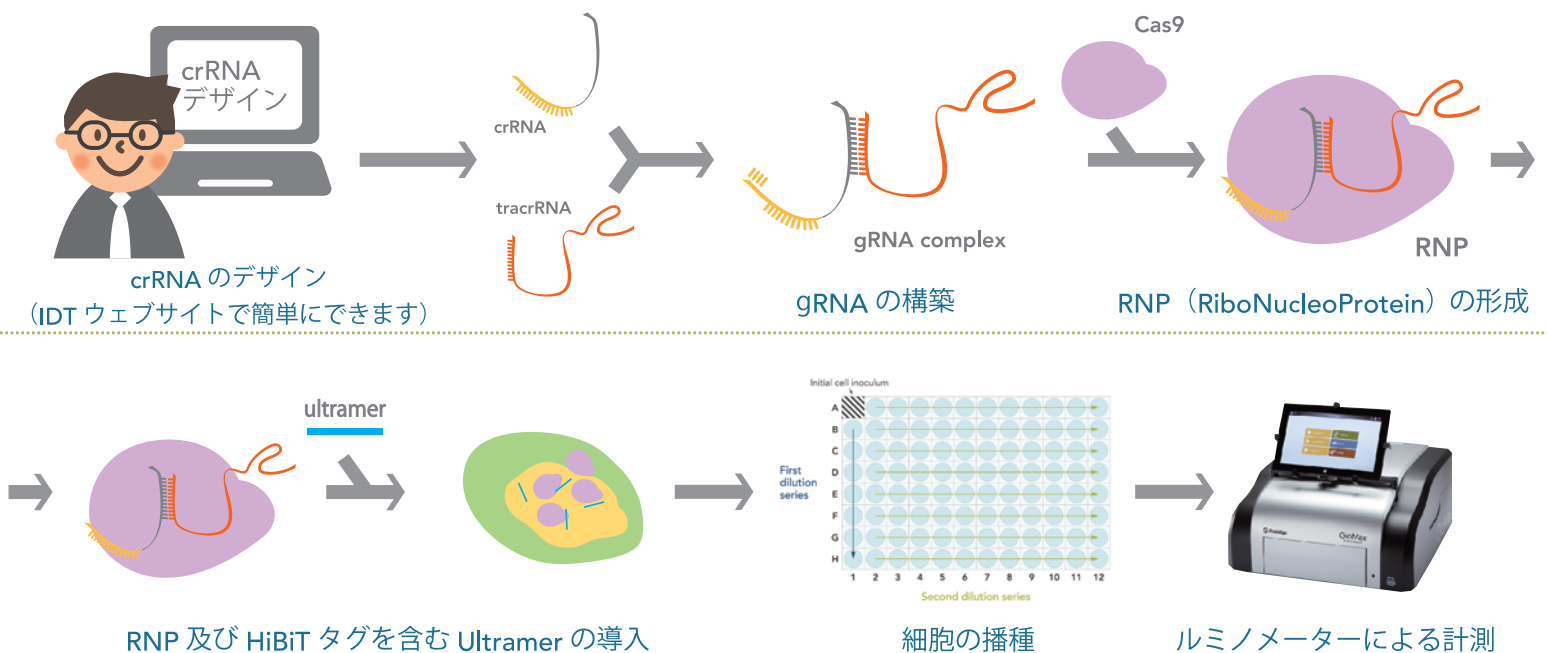
もう DNA 抽出はイラナイ！

超 HiBiT x Alt-R CRISPR シリーズによる 簡単なゲノム編集&クローニング

細胞に対してゲノム編集を行うには、クローニングの問題を避けては通れませんでした。レポーター遺伝子や薬剤耐性遺伝子の導入は、コンストラクションの準備や、遺伝子サイズの大きさから容易ではなく、酵素反応による変異確認も、各細胞から DNA 抽出を行う必要があり、膨大な手間が掛かります。しかし、昨年プロメガ社が開発した Nano-Glo® HiBiT Protein Detection System (以下、HiBiT システム) を用いれば、細胞のクローニングが極めて簡便に行える可能性があります。

HiBiT システムは、11 アミノ酸のペプチドタグ (HiBiT) と特異的に結合する約 18kDa の NanoLuc® ルシフェラーゼ断片 (LgBiT) と基質を用いた発光法によって、目的タンパク質を検出する技術です。ゲノム編集により内在性のタンパク質遺伝子に 33 ベースを付加することで、抗体を必要としないタンパク質検出を実現することができます。さらに遺伝子ノックアウト/ノックインのマーカとしても導入できるためゲノム編集後の煩雑な確認作業 (ゲノム抽出→PCR→酵素消化→電気泳動) を発光試薬を添加するだけの簡便なアッセイに変更することができます。

Alt-R x HiBiT によるゲノム編集細胞クローニングのワークフロー



Alt-R CRISPR-Cas9 System - IDT

Product	Cat#	価格
Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA, 2 nmol	-	¥ 9,800
Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNA, 5 nmol	1072532	¥ 12,000
Alt-R S.p. Cas9 Nuclease 3NLS, 100 µg	1074181	¥ 23,400
Ultramer DNA Oligos (up to 200 bases)	-	¥ 120 / base

150 塩基の HiBiT 配列を含む ultramer を合成した場合

150 bases x ¥ 120 / base = ¥ 18,000

* HiBiT 配列 (33 bases) の利用には Web 上での簡単なライセンス内容の承認登録が必要です。

(www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/)

Nano-Glo® HiBiT Protein Detection System - Promega

細胞溶解タンパク質発光検出システム	Size	Cat#	価格
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	10 mL	N3030	プロメガ社もしくは代理店様までお問い合わせ下さい。
	100 mL	N3040	
	10x100 mL	N3050	

* プロメガでは発光測定用ルミノメーター (96 ウェル) のレンタルも承ります。

CRISPR/Cas9 ゲノム編集による
HiBiT ノックインプロトコル



<http://www.promega.co.jp/hibitcrispr/>



東京医科歯科大学
システム発生・再生医学
プロジェクト助教

松島 隆英

【経歴】

- 2007 北海道大学 薬学部 卒
- 2007～2012 北海道大学 生命科学院 修士・博士課程 卒
(薬学研究院 神経科学研究室 所属)
- 2009～2012 日本学術振興会 DC1 特別研究員
- 2012～ 東京医科歯科大学 システム発生再生医学 特任助教に就任。
- 2016～ 現職

研究室 HP : <https://www.tmdusystemsbiomedicine.com>

東京医科歯科 システム発生再生

私はタンパク質の細胞内ダイナミクスに興味があり、細胞内あるいは細胞外から細胞外への各タンパク質の動態を様々なスクリーニング系を用いて解析を行っています。中でも IL1β を代表とした分泌シグナルを持たず、かつ小胞体ーゴルジ体を經由せずに細胞外へと輸送されるという非古典的分泌経路を経る分泌タンパク質に現在着目しています。

私はこの経路をとる新規のタンパク質の同定とその分泌機構の解析を目的に研究を進めていますが、肝心の分泌機構の解析には細胞外の分泌タンパク質の定性・定量解析を行うことが必須となります。

ただ分泌タンパク質解析に一般的に利用される ELISA 法などでは新たに特異的な抗体が必要となるなど様々な問題が浮上してきました。

そこで既存の手法に代わる内在性の分泌タンパク質の簡便かつ安価な定性・定量解析システムとして HiBiT システムを応用することとしました。

HiBiT は 11 アミノ酸と非常に短いペプチドタグであるにも関わらずルシフェラーゼ解析ができる画期的なシステムです。

そこで実際にプロメガ社から取得した HiBiT の配列を基にノックイン用の ssODN をデザインし、Alt-R システムを用いたゲノム編集技術により内在性タンパク質に付加を試みました (図 1)。

ただし、私が使用しているマクロファージ系培養細胞は非常にノックイン効率が低いため細胞のクローニングが必須でした。

もちろんノックイン効率が低いため従来の限界希釈法で数百個クローンを取得しても目的のクローンを得ることができませんでした。

そこで HiBiT がルシフェラーゼ解析できる利点を生かして濃縮法で行ったところ確実に HiBiT が導入された細胞を追跡できるためスムーズにノックイン細胞を樹立することができました (図 2)。

現在も各種研究に HiBiT ノックイン細胞を作製していますが、ルシフェラーゼ解析による濃縮法を導入してから細胞のクローニングの失敗は全くありません。ゲノム編集技術も Alt-R システムに ssODN を追加するだけで簡単にできますので、ぜひ皆さんの研究に応用してみてください。

現在は免疫染色などの解析も行えるように HiBiT にタンデムに FLAG タグを入れる方法なども挑戦しています (図 3)。

こちらも概ね良好な手ごたえをえています。今後も Alt-R システムと HiBiT を応用した様々な研究ツールを研究に応用出来ればと思っています。

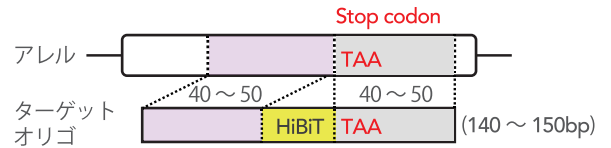


図1. HiBiTノックインのためのssODNデザイン
(Stop codon = TAAを差します。)

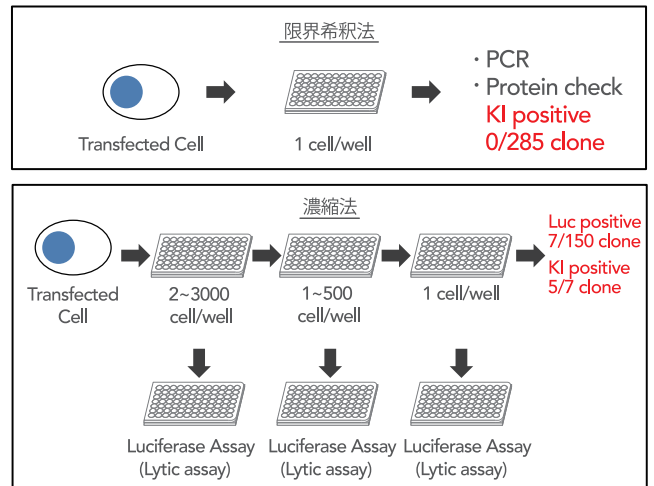


図2. HiBiTタグを応用したノックイン細胞のクローニング



HiBiT → 細胞のクローニング・解析に使用
FLAG → 解析に使用

図3. HiBiTタンデムタグ

ご注文の流れ

<http://sg.idtdna.com/jp/site/index.html>

新規登録&ログイン

Web から
http://sg.idtdna.com/jp/site もしくは [IDT DNA] で検索し IDT の HP へ。その後、[新規のご登録はこちら] をクリックして下さい。

新規登録
エクセルに必要事項を入力し、[新規登録] ボタンよりメールに添付してお送り下さい。

web からご注文

ログインして注文
登録頂いたアドレス宛に ID とパスワードをお送りしますので、IDT ウェブサイトにログインし注文して下さい。

確認書送付・合成開始

納品

弊社で行う事

代理店

お問い合わせ先 2018.04

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES 株式会社

<http://sg.idtdna.com/jp/site>

japan-cc@idtdna.com

〒108-0073 東京都港区三田一丁目4番28号 三田国際ビル24階
TEL 03-6865-1217 FAX 03-6865-1218

※本製品は研究用試薬です。それ以外の目的では使用できません。※価格は全て税別です。