

無細胞系によるトランスフェクションに適した DNA 構築と増幅

酵素法により DNA 断片またはベクターからチューブ内反応のみで 10 µg のプラスミド DNA を増幅します

1. はじめに

遺伝情報の操作については、バイオ医薬品開発の初期段階から後期段階まで、PCR や細胞ベースのクローニングに大きく依存しているのが現状です。どちらも数十年の歴史を持つ方法論であり、生物学的研究や医薬品開発のあらゆる側面に効果的に深く浸透していますが、課題も多く存在します。

PCR は、直鎖状の DNA を試験管内で合成する効率的な方法です。しかし、DNA 鎖の長さや配列組成に制限があり、各増幅サイクルの間に配列の偏りが導入される可能性があります。

細胞ベースのクローニングは、より大きな配列を増幅しようとする場合によく用いられますが、この方法には時間のかかるクローニングや、ベンチでの予測不可能な細胞毒性の問題、製造に必要な細胞バンクの条件を微調整するための反復実験など、さまざまな課題があります。また、目的の遺伝物質を分離するための適切な過プロセスを別途開発する必要があります。

さらに、PCR と細胞ベースのクローニングはいずれも人手を必要とし、増幅された製品をコスト効率よく製造するために必要な時間、材料、プロセスの最適化を考えると、自動化には容易に対応できません。

より効率的で柔軟な代替手段があれば、医薬品開発プロセスのさまざまな段階で、またさまざまな治療法や適応症において、開発期間を大幅に短縮することができます。

2. 無細胞系 DNA 増幅技術による課題解決

OriCiro 技術は、酵素法を用いた無細胞系による環状 DNA の構築および増幅能力を有し、これらの問題を解決します。

このコア技術は、OriCiro Genomics 社が開発した、大腸菌のゲノム増殖に不可欠な 20 種類以上のタンパク質に基づいて最適化された試験管内増殖プロセスに基づいています。

増幅技術は、熱サイクルを必要とせず、細胞をサポートするためのラボのセットアップや、それに対応する過ステップも必要としないため、ハイスループットの自動化が可能で、開発プロセスを大幅に短縮することができます。

Cell-Free Cloning System

2 ステップの等温反応で構成されています。OriCiro Assembly は、最大 50 個の DNA 断片と oriC (大腸菌の染色体起源) をシームレスに結合します。つぎに OriCiro® Amp による増幅を行います。この技術は PCR や大腸菌では増幅困難な長鎖環状 DNA にも対応します。最大 50 kb の長さで、研究用途に必要な十分な量の DNA をわずか 1 日で得ることができます。速くて簡単だけでなく、大きなサイズの DNA であっても、正確で機能的な DNA 増幅が可能です。

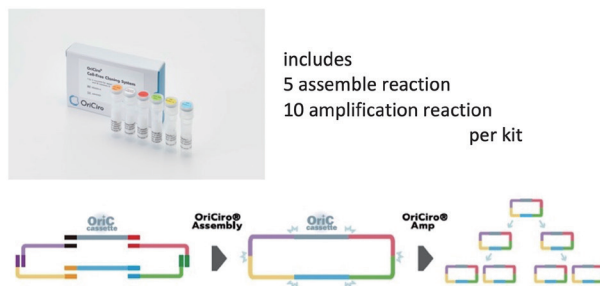


Figure 1: OriCiro®Cell-Free Cloning system

Cell-Free Switching System

すでにお持ちのベクターを従来の細胞を使った増幅から、使いやすい無細胞系の酵素反応による DNA 増幅へ切り替えることが可能です。SS OriC カセットは、2 段階の等温酵素反応によって挿入することができ、数時間で増幅を可能にしました。4 ~ 13 kb の pUC、pET、pGEM ベースのベクターで使用可能です。

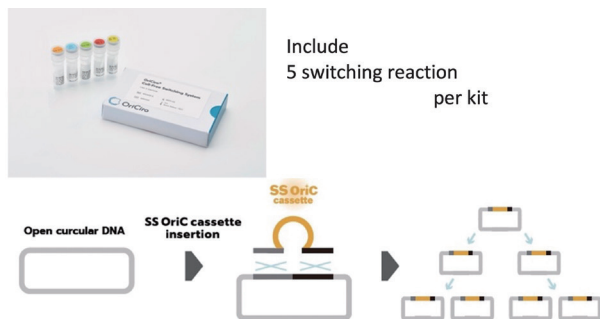


Figure 2: OriCiro®Cell-Free Switching system

3. チューブ反応でトランスフェクションに十分な量の DNA を得る

まず、Cloning System や Switching System を用いて、複数の DNA 断片から、または対応するベクターに oriC カセットを組み入れて、環状 DNA を作製します。増幅反応を行う OriCiro® Amp Kit には、大腸菌の染色体複製サイクルに必要な 20 種類以上の精製酵素により構成されています。これにより、単一の DNA 分子から oriC (大腸菌の染色体起源) を持つ環状 DNA を指数関数的に増幅します。約 6 時間で最大 100 ng DNA/μL を増幅することができます。

今回、細胞にトランスフェクションするためのプラスミド DNA として約 10 μg を得るために、標準プロトコールの 10 倍となる、100 μL スケールによる増幅反応を行いました。

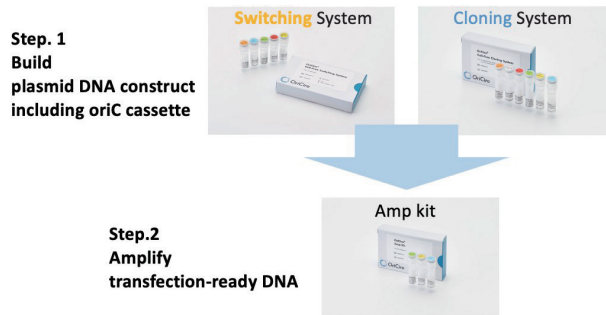


Figure 3: OriCiro Cell-Free DNA synthesis tools portfolio

4. 実験手法

今回の実験では、oriC カセットを含む 4 kb と 13 kb の環状 DNA を 10 pg/μL として用意し、以下の手順で増幅反応を行いました。

1. Thermal cycler was preheated at 33 °C (Lid was at 40 °C)
2. The following reaction mixture was prepared on ice

(μL)	10 μL 標準プロトコール	100 μL
5 X Buffer I	2	20
5 X Buffer II	2	20
10 X RE Mix	1	10
Nuclease-Free Water	4	40

3. Incubated the mixture at 33 °C for 15 minutes
4. Add plasmid DNA (10 pg/μL)
 - 1 μL of plasmid DNA into 10 μL scale
 - 10 μL of plasmid DNA into 100 μL scale
5. Incubated the mixture at 33 °C for 6 hours

6. The products was diluted two-fold with the OriCiro Amp buffer, and further incubated at 33 °C for 30 minutes (Finalization option)

5. 結果

増幅産物に Loading Buffer (25 mM Tris-HCl pH8.0, 25 mM EDTA, 0.1% SDS, 5% グリセロール, 0.1% ブロモフェノールブルー) を加え、電気泳動には 0.5% Agarose, 0.5X TBE を使用しました。

4 kb と 13 kb の両方が効率よく増幅されていることが確認されました。また、蛍光光度計を用いて DNA 濃度を測定した結果、10 μL と 100 μL のサンプル間の濃度は直線的な相関関係を示していました (Figure 4)

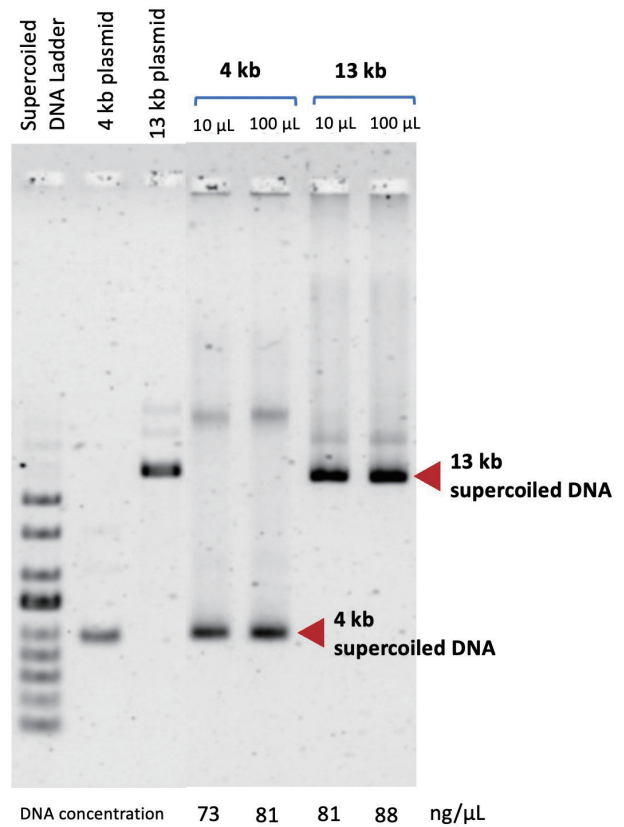


Figure 4: 蛍光光度計で DNA 濃度を測定。濃度は 10 μL と 100 μL からなるサンプル間で線形相関を示しており、その範囲は 4 kb で 73-81 ng/μL、13 kb で 71-88 ng/μL であった

6. まとめ

OriCiro の無細胞系 DNA 増幅システムは、トランスフェクションに十分な量の DNA を増幅する能力を示しました。

安全性の観点からは、抗生物質の耐性遺伝子は必要なく、エンドトキシンフリーでの増幅が可能となります。

また、GC や AT を多く含む配列や細胞毒性のある配列についても対応しています。

OriCiro 社の無細胞アプローチは、大腸菌の染色体複製に必要な成分を単離したことで、数日ではなく数時間で大規模な配列長（50kbp 以上）の増幅が可能になり、最終的にクローニングアプローチを失敗させる原因となる細胞毒性のある生成物による問題を解消することができます。

標準的な大腸菌を用いたクローニングプロセスとは対照的に、コストを大幅に削減し、スループットを向上させ、よりシンプルで効率的なプロセスにより最終製品の安全性を向上させることで、この分野に革命をもたらす可能性があります。

使用上の注意

ご使用にあたっては必ずマニュアルを参照ください

<https://www.oriciro.com/resource>