

# 電氣的形質轉換法を用いた cDNA ライブラリーの作製

田中國介, 若浦 誠, 増村威宏\*, 藤井昭治

KUNISUKE TANAKA, MAKOTO WAKAURA, TAKEHIRO MASUMURA,  
and SYOJI FUJII

Construction of cDNA library using electro-transformation

要旨: 電氣的形質轉換法を用いプラスミド DNA を導入することにより大腸菌を形質轉換した。我々は高効率を得る工夫をし, この方法を用いることでコンピテントセルを用いる形質轉換法 (Hanahan 法) では出せない高効率を得ることが可能になった。ここではこの方法で登熟期イネ胚乳及びホウレンソウ芽生えより cDNA ライブラリーの作製に成功した。

## 緒 言

大腸菌の形質轉換法は, 特定のタンパク質に対する cDNA や DNA 断片のクローニング等遺伝子解析に必須の技術である。しかし,  $Ca^{2+}$  法など従来のいわゆるコンピテントセルを用いる方法<sup>1)</sup>は, 熟練を要し, 効率もファージベクターを用いる方法に比べ低い。これに対して, 高電圧パルスを用いた DNA の直接導入法<sup>2)</sup>は従来のように DNA を受ける側の細胞膜に化学的処理を必要としないため技術に熟練を要せず, 簡便でしかも従来の方法に比べて効率も 10 ~ 100 倍は高いという利点がある。

高電圧パルスを用い細胞を穿孔するメカニズム<sup>3)</sup>及び哺乳類細胞への遺伝子導入<sup>4)</sup>に関してはすでに詳しく述べた総説があるが, 大腸菌への遺伝子の直接導入に関しては Dower らの報告<sup>2)</sup>が始めてであり, このなかでこの方法を電氣的形質轉換法と名付けているが, この方法を用い cDNA ライブラリーを作製したという報告は未だなされていない。

今回筆者らは, Dower らの報告に基づきさらに

形質轉換の効率を高める工夫を行い, 質の高い cDNA ライブラリーを作製することに成功したので報告する。

## 材料及び方法

### 1. DNA および菌株

形質轉換に用いた DNA はプラスミド pUC 118 / 119 を水もしくは TE (10mM Tris-Cl pH8.0, 1mM EDTA) に溶かして用いた。濃度は電気泳動及び波長 260 nm の吸光度から求めた。

形質轉換用宿主菌には, 大腸菌 *E. coli* MV 1184 を用いた。

### 2. 宿主菌体の調製

大腸菌 MV 1184 を 50 ml の L 培地 (1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl) を用い 37 °C にて波長 600 nm の吸光度が 0.5 ~ 1.1 まで振とう培養したものを遠心分離して用いた。培養は 200 ml のエーレンマイヤーフラスコを用い, 遠心管は Corning 社の 50 ml スクリューキャップ

京都府立大学農学部生物化学教室

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606 Japan.

\* 日本ケミカルリサーチ株式会社

Japan Chemical Research Co. Ltd., Hyogo, 673-02 Japan

平成元年 8 月 14 日受理

ブ付き遠心管を用い、TOMY RD-20Ⅲ遠心機  
4 N-Ⅱローターで4℃下で行った。(Fig. 1)

調製した菌体は、およそ150倍の濃度となり、  
-80℃で約6カ月使用可能である。

1. Incubate host cells with 50 ml L-Broth at 37 °C for 3.5 hr.
2. Cool on ice, 15 ~ 30 min.
3. Centrifuge, 4,000 xg for 15 min at 4 °C
4. Suspend with 50 ml/25 ml sterilized H<sub>2</sub>O, then centrifuge.
5. Resuspend with 1 ml 10 % glycerol, then centrifuge again.
6. Resuspend with 150 μl 10 % glycerol.
7. Distribute to eppendorf tubes (40 μl).
8. Freeze on dry ice.
9. Store at -80 °C.

Fig. 1 Host cell preparation protocol

### 3. 電氣的形質転換

パルス発生には Bio-Rad 社 Gene Pulser™ を  
用いた。

パルス印加は専用キュベット (電極間: 0.2 cm)  
を用い、キュベットチャンバーは予め水で冷却して  
おいた。パルス印加条件は、2.5 kV (12.5 kV/cm),  
25 μF, 200 Ω である。(パルス印加時間は、およそ

5 mS となる)

パルス印加後の培養は 1 ml の SOC 培地 (2%  
Bacto trypton, 0.5% Yeast extract, 10 mM  
NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>,  
20 mM Glucose) を用い、10 ml の FALCON チュー  
ブで行った。振とう器は、大洋サービスセンター  
R-30 mini を用いた。(Fig. 2)

1. Thaw stocked host cells (40 μl) at room temperature.
2. Keep ice coldness until pulsing.
3. Add 1 μl of plasmid DNA (10 pg ~ 10 μg), then mix gently.
4. Put on ice exactly 1 minute.
5. Transfer into cuvette. (pasteur pipette)
6. Put cuvette into cuvette-chamber (cooled with ice).
7. Pulse and then immediately add 1 ml of pre-heated medium  
(SOC etc.). (pasteur pipette)
8. Transfer suspension solution into 10 ml FALCON tube.
9. Incubate 1 hr, 37 °C, 217 rpm.
10. Spread after 20 to 50 times dilution on LB-plates  
(usually containing antibiotics).
11. Incubate 37 °C overnight.
12. Count colonies and then calculate the efficiency.

Fig. 2 Electro-transformation protocol

なお、形質転換体の選択は、Ampicillin (50 μg  
/ml) を用いた。

#### 4. 米ぬか及び小麦ふすま抽出液の調製

Hara ら<sup>5)</sup>の報告に従い、小麦ふすま及び、米糠  
より抽出物を得、凍結乾燥した後これを SOC また  
は LB 培地に加え、オートクレーブ滅菌後、沈澱物  
を濾過で除き濾液を実験に用いた。

#### 5. cDNA ライブラリーの構築

ホウレンソウ (*Spinacia Oleracia* L. cv. オー  
ライ) (タキイ種苗) 及び、登熟期イネ (*Olyzae*  
*Sativa* L. cv. 日本晴) より Guanidium/Cesium  
Chloride 法<sup>6)</sup>により RNA を抽出し、Oligo d(T)  
cellulose column chromatography<sup>6)</sup> 及び、  
messenger Activated Paper<sup>7)</sup> により Poly (A)<sup>+</sup>  
RNA を精製し、これを Gubler-Hoffman 法<sup>8)</sup>に  
従い cDNA を合成し、ベクタープラスミド pUC

118 に EcoRI を site としてプラスミド cDNA を構築した。

## 結 果

### 1. 形質転換条件の至適化

#### 1) 電圧条件の至適化

形質転換をするためには、細胞壁に穿孔せねばな

らないが、穿孔にはある程度の電圧をかけてやる必要があるであり臨界電圧と呼ばれる値を超さなければ穿孔されない。この条件を探るため、他の条件 (capacitance, resistance) を一定にし検討した。

なお capacitance = 25  $\mu$ F, resistance = 200  $\Omega$  とし、この際の Time constant (電圧が初期値の 37% になるまでの時間) は約 5 msec である。

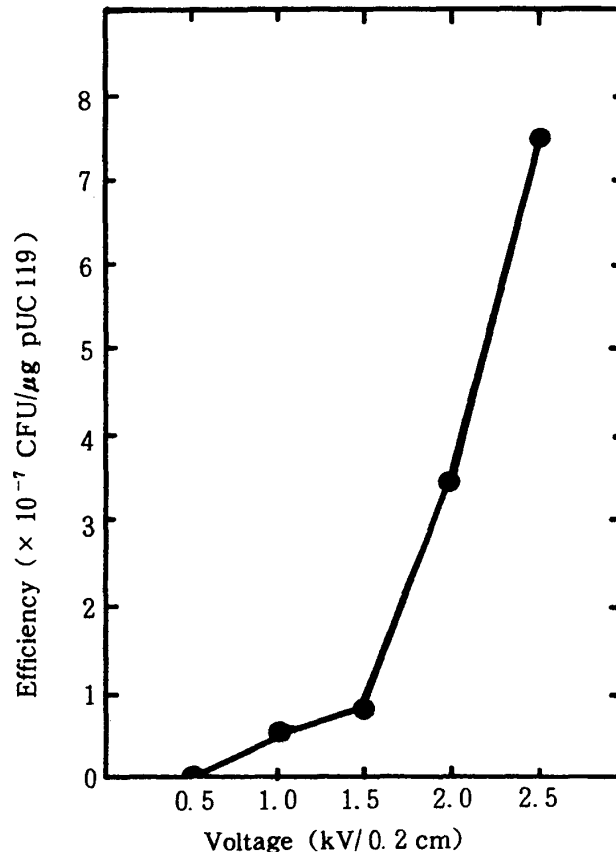


Fig. 3. Effect of voltage for electvo-transformation.

Fig. 3 から明らかなように 2.5 kV の電圧, すなわち 12.5 kV/cm の電圧において最も形質転換効率が高かったが、これ以上の高圧印加はキューベツト内放電を招く危険があり、使用できなかった。なお臨界電圧はおよそ 1 kV の値であることがわかる。

#### 2) 温 度

パルス印加後加える 1 ml の SOC 培地を、予め加温しておくことにより、無処理のものに比べ、数倍の高い形質転換効率を得られることが判明したので、その温度を変え、形質転換の効率の変化をみた。

設定した温度にて予め 10 分ないしはそれ以上培地を加温し、パルス印加後加え培養し、その効率を示したものを Fig. 4 に示す。

尚、DNA は、pUC119 を 1 ng 使用した。

Fig. 4 に示されるとおり、37  $^{\circ}$ C で予め加温しておくことにより、その効率が、室温 20  $^{\circ}$ C に比べ非常に高められることが判明した。

#### 3) アミノ酸、ポリアミン、化合物等の添加効果

材料及び方法に示したように準備した形質転換宿主菌を用い、パルス印加後加える SOC, LB 培地に対する種々の化合物及びポリアミン、アミノ酸等の添加効果を検討した。

尚効果を見るためにこれらの物質は LB 培地に加えた。また加える培地は、予め 37  $^{\circ}$ C にて加温した。

Table 1 で扱った化合物では、Na-Succinate 以外は、LB での効率に比べその効果が上昇してい

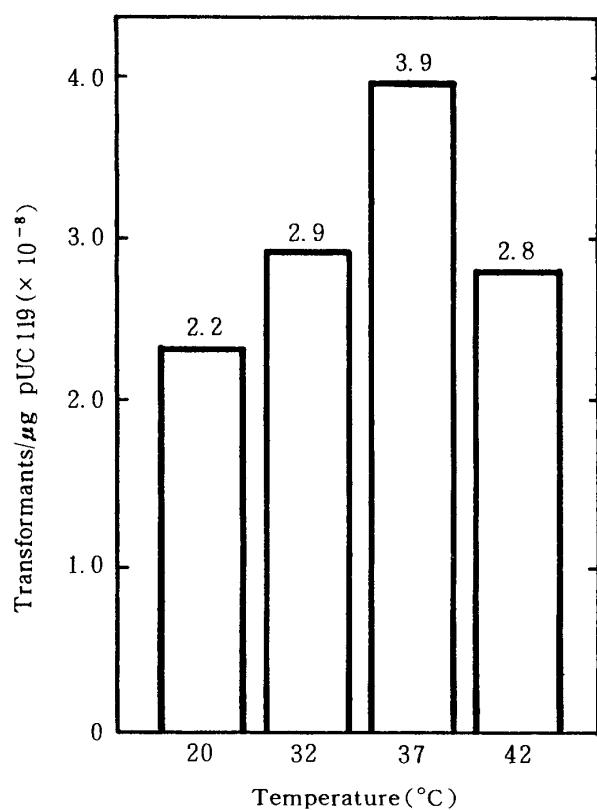


Fig. 4. Effect of preheating of the suspending solution.

Table 1 Effect of chemicals and biological materials on electro-transformation

Chemicals and Biological materials	Relative efficiency (%)
1 mM Na-Acetate	112.4
1 mM Na-Bicarbonate	224.7
1 mM Na-Succinate	54.1
1 mM NH <sub>4</sub> Cl	112.4
1 mM KCl	125.0
1 mM Ornithine	107.1
1 mM Spermidine	9.64
1 mM Poly-L-lysine	0.27
1 mM Pantoyl lactone	281.7
1 mM Phytic acid	67.4
0.5 % Sucrose	81.0
1 % Glucose	90.5
5 % Rice-bran <sup>a)</sup>	56.7
5 % Wheat-bran <sup>a)</sup>	43.3

a) 材料と方法参照

\* Chemicals and biological materials were added to LB medium to make indicated concentration. Control transformation efficiency was about  $2.6 \times 10^8$  CFU/μgDNA. (CFU: Colony Formation Unit)

る。また同じNa塩でも Bicarbonate では約2倍の上昇であるのに比べ、Succinate では逆に約1/2である。またアミノ酸等の効果ではわずかにオルニチンのみで多少の効率の上昇がみられるが、他のものでは逆に阻害的である。パントイン酸ラク톤は Adler H. ら<sup>9)</sup>により UV 照射に対する生存率を高めることが報告されているが、電気的形質転換でも同様の効果が認められた。米ヌカ、小麦ふすまはフィチン酸が多く含まれており、フィチン酸のみのものに比べると効率が高くなっているが、これは他にア

ミノ酸等の成分が含まれているためと考えられる。

## 2) cDNAライブラリー作製

こうして得られた  $10^8 \sim 10^9$  という高い効率を利用して実際にホウレンソウ芽生え及び、登熟期イネ胚乳より精製した Poly (A)<sup>+</sup> RNA に対して作製した cDNA (材料及び方法参照) を *E. coli* の電気的形質転換に用いた。尚、培地は SOC 培地を予め 37 °C にて加温したものをを用いた。

Table 2 にその結果を、Fig. 5 に確認した insert を示す。

Table 2 Construction of cDNA Library

	cDNA used (ng)	Transformants	Recombinants	R/T (%)
Rice	133	11 (x10 <sup>5</sup> )	5.8 (x10 <sup>5</sup> )	52
	67	8.9	4.5	50
Spinach	22	4.1	1.6	39
	43	9.3	3.1	33
	32	12	4.9	39

\* Transformation efficiency used in this experiments was  $1.3 \times 10^9$  CFU /  $\mu$ g pUC119

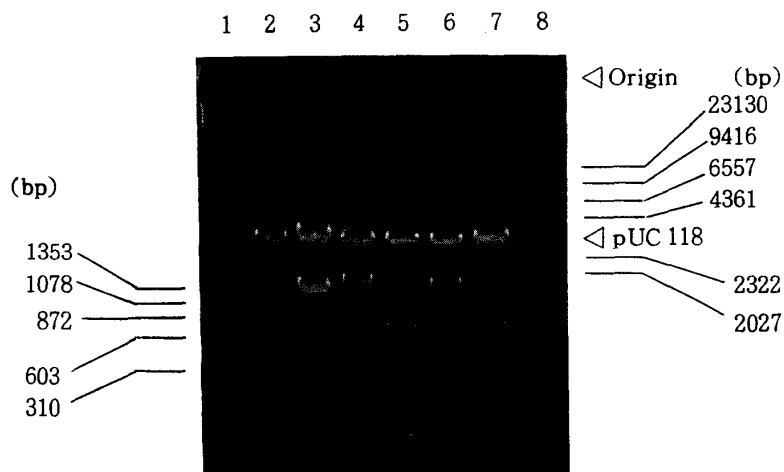


Fig. 5 Electrophoresis of the cDNA inserts obtained from arbitrarily selected plasmids from electro-transformed rice embryo cDNA libraries

lane 1, 8 : M.W. markers

lane 2 ~ 7 : EcoRI digested

Table 2 からこの形質転換系 (菌体サスペンション 40  $\mu$ l) において cDNA 量約 30 ng を使用することにより形質転換体の数がほぼ飽和してくることが判る。即ちホウレンソウ cDNA 32 ng を使用す

ることにより  $4.9 \times 10^5$  個の組み換え体が得られた。またこの結果から宿主菌の集菌法、操作の簡便さ、効率の高さを用いるプラスミド cDNA 量どれも従来行ってきた Hanahan 法に比べ優れており、Fig. 5

に示したようにインサートも約 2 kbp 以上と Hanahan 法と変わらない大きさのものが導入されていることも確認できた。実際サブクローニングし 4 kbp 程度の導入が確認できた。

## 考 察

形質轉換の効率を上げるには大きく分けて 2 つの要因が考えられる。一つはパルスによる大腸菌の細胞膜の穿孔の効率の上昇, もう一つは穿孔, 損傷を受けた膜の修復の効率の上昇である。

第一の要因, 即ちパルスによる大腸菌細胞膜の穿孔に関連した形質轉換の効率化は, さらに宿主菌体と DNA の量の至適化とパルス条件の至適化の 2 つの要因に分けることができるだろう。菌体と DNA の量に関しては, DNA の量に対して大過剰の菌体を加えた方が形質轉換効率が上がるという報告<sup>2)</sup>もあるが, 10 ng, 1 ng, 100 pg での DNA を用いた実験系では有意な差は認められなかった(データ未発表)。またパルス条件の至適化に関しては, 現在のところ穿孔には高電圧で短時間のパルスと低電圧で長時間のパルスの 2 つの方法がとられているが, 本報告は前者の部類に入るだろう。しかしこれもまだどちらの方法が膜の穿孔に優れているか結論は出ていないようである。筆者らはこれとは別に 2 回のパルスを重ねることにより穿孔した膜の拡大等を期待してこの実験も行っているが, 2.5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  のパルスを単純に 2 回かけるだけでは 1 回の場合の約  $\frac{1}{2}$  の効率しか得られず, 2 回パルスに関しては今後さらに条件の検討が必要であると考えている。

一方高電圧パルスによる穿孔を受けた菌体膜の修復に関してであるが, Table 1 に示したように, アミノ酸, ポリアミンよりも他の化合物で高い効果を示している。またパントイン酸ラク톤は, UV 照射菌体の生存率を高めるという報告<sup>9)</sup>にあるように, 細胞膜の繊維質の修復に関する効果を持つ物質であるため形質轉換に対し高い効果がみられるものと考えられる。形質轉換に及ぼす温度については, パルス印加直前までは DNase 活性の抑制及び穿孔後の膜構造の維持等なるべく低温の方がよい。しかし, 膜の修復にはむしろ高い温度の方がよくパルス印加後できるだけ速やかに適温の SOC 培地を加えることが高い形質轉換率を得るポイントとなる。結果にも示したが, 加える SOC 培地も予め加温しておくことにより加温しない場合に比べはるかに高い形質轉換効率を得た。この他にパルス印加後 42

°C に 90 秒, その後直ちに氷上に 5 分間置く方法や, micro wave による急激な加熱なども検討したがどれも 37 °C による preheat に簡便さ, 効率で及ばなかった。

本報告では MV1184 を宿主菌体を用いたが, これはクローン解析の際一本鎖 DNA が得られデレージョンがかけられるプラスミド pUC118/119 をベクターとして用いるためである。LE392 や, DH5  $\alpha$  を用いた報告<sup>2)</sup>もあり, MV1184 を用いる場合より高い形質轉換効率が得られている。コンピテントセルでの形質轉換効率の高いとされる宿主菌を用いる方が, 電気パルスを用いる本方法でも一桁くらいは効率が良くなるようでもある(データ未発表)。これは細胞膜の構造に由来するようで, 今回使用した MV1184 について得られた  $5 \times 10^9$  CFU/ $\mu$ g DNA という効率は従来報告されている効率よりはるかに高く, 菌体の調製法の簡便さから考え, この方法の利点が理解できる。

cDNA ライブラリーの作製に関してはコンピテントセルでの形質轉換の際のように大量の cDNA を用いなくとも効率の高い少量の cDNA で同程度の大きさのライブラリーの作製が可能である。また逆に大量の cDNA を形質轉換に用いる場合は, cDNA をいくつかに分けて行うことによりサイズの大きなライブラリーを作製することができ, 従来と同じ量の cDNA があれば  $1 \times 10^7$  個以上の cDNA ライブラリーの作製が可能となる。insert の長さに関しては,  $\lambda$  ライブラリーのサブクローニング等で 4 kbp 以上のものを確認しておりこの点でも問題のないことが証明されている。ただ, やはり, コンピテントセルの場合と同様に短い insert をもつプラスミドの方が入りやすいことは変わらないが, これもさほど問題にならないと思われる。

上に示したように, 電氣的形質轉換法で cDNA ライブラリーを作製することに成功したのは, 今回が初めてであり, この方法により従来になかったような形質轉換効率の高さと簡便さを利用して迅速に, 高い組換体をもつ cDNA ライブラリーを作製することが可能になった。またベクターに pUC118/119 系を, 宿主菌体に MV1184 を用いることにより, サブクローニングすること無しにスクリーニングで得られたポジティブ クローンを直ちにシークエンス等の解析に用いることが可能となった。こうしたことより Poly (A)<sup>+</sup>RNA からシークエンスまでの全ての作業を速ければ 1 週間以内に終了することが可能になった。

## 引用文献

- 1) D.J.Hanahan, (1983) : Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids, *J.Mol. Biol.*, **166**, 557-580
- 2) W.I.Dower, J.F.Miller, C.W.Ragsdale (1988) : High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145
- 3) 葛西道生, 稲葉浩子 (1986) : 高電圧パルスによる細胞穿孔のメカニズム, 蛋白質, 核酸, 酵素, **31**, 1591-1603
- 4) 稲葉浩子, 葛西道生, 佐藤弘毅 (1987) : 電気穿孔法による哺乳細胞への遺伝子導入, 蛋白質, 核酸, 酵素, **32**, 10-21
- 5) N.Hara, S.Futo, S.Sekiguchi, M.Tsutsui, Y.Tonosaki, A.Fukuchi (1988) : A new method to obtain high DNA transformation efficiency of *E.coli* competent cells, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 8727
- 6) T.Msniatis, E.F.Fritsch, J.Sawbrook (1982) : *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 187-209
- 7) D.Werner, Y.Chemla, M.Herzberg (1984) : Isolation of Poly (A)<sup>+</sup>RNA by Paper Affinity Chromatography, *Anal. Biochem.*, **141**, 329-336
- 8) U.Gubler, B.T.Hoffman (1983) : A simple and very efficient method for generating cDNA libraries, *Gene*, **25**, 263-269
- 9) H.I.Adler, A.A.Hardigree (1964) : Analysis of gene controlling cell division and sensitivity to radiation in *Escherichia coli*, *J.Bacteriol.*, **87**, 720-726

## Summery

To transform *Escherichia coli* a plasmid DNA was introduced by electroporation. We improved transformation efficiency adding several chemicals, biological materials and/or preheating of the buffer solution which was added just after electrodischarge. The improved method gave higher transformation efficiency comparing with that of Hanahan's. cDNA libraries for mRNAs appearing in the developing rice seeds and spinach seedlings were constructed using this method.