

# iVEC : in Vivo E. coli Cloning

## 解説

最近、相同な配列間の組換え反応を使い PCR 断片をベクターへクローニングする方法が活用されています。いわゆるシームレスクローニングです。20 bp ほどの相同な配列を付加した PCR プライマーを合成し、挿入 DNA 断片とベクターをまずは PCR 増幅させます。その後、精製した組換え酵素の in vitro 反応で PCR 断片をベクターへクローニングするというものです。この組換え反応に関連する試薬は、現在ではさまざまなメーカーから商品化されています。Gibson Assembly Master Mix、In-Fusion® HD Cloning Kit、GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix などです。

**でも、とある大腸菌の変異体を使えば、PCR 増幅した挿入 DNA 断片とベクター DNA を同時にトランスフォームするだけでクローニングができるのです。**

今回、この in vivo E. coli Cloning が可能な大腸菌の変異体を NBRP 大腸菌リソースから紹介します。

### 概要

NBRP 大腸菌リソースに寄託されている AQ3625 は sbcA23 変異により、Rac プロファージ領域の RecE、RecT レコンビナーゼが過剰発現していて騒動組換えの効率が上昇している。この菌株を使ってシームレスクローニングを行うことができる。DNA は PCR の反応液をそのままを AQ3625 株のコンピテントセルに直接加えるだけで良く、精製などする必要はない。特別な試薬も使うこともなく、非常に簡単なクローニング方法である。決して新しい方法ではなく実は 1993 年にはすでに報告されている (Oliner et al., Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 225192-5197, 1993) .

### **AQ3625 遺伝子型:**

thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 ara-4 xyl-5 mtl-1 proA2 his-60 argE3 rpsL31  
tsx-33 supE44 recB21 recC22 sbcA23

我々はこの菌株に形質転換効率を上昇させる変異を導入してさらに効率よくクローニングを行える菌株 ME9783 を作製した。

**ME9783 遺伝子型:**

thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 galK2 ara-4 xyl-5 mtl-1 proA2 his-60 argE3 rpsL31  
tsx-33 supE44 recB21 recC22 sbcA23 ΔhsdR::frr

**ME9783 大腸菌株の入手先:**

ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 大腸菌のホームページ

<https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/>

から、ME9783 を検索して本大腸菌株を購入してください。

本株の使用にあたっては、指定の形質転換方法で行うことが重要です。カルシウム法  
やリチウム法による形質転換では期待通りの結果を得られません。指定の方法は別途  
NBRP 大腸菌ホームページよりダウンロード可能です。

iVEC に関する問い合わせなどは NBRP 大腸菌 まで

国立遺伝学研究所 NBRP 大腸菌

4 1 1-8 5 4 0 三島市谷田 1111 番地

ホームページ <https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/>

メールアドレス genkaku@nig.ac.jp

## iVEC 法の相同領域の長さでクローン化の効率

### 1. PCR 用の合成 DNA プライマー

PCR 用の合成 DNA プライマーはベクター側と 20~30 bp 程度の相同的な配列、いわゆる“のりしろ”を持つように設計する。

図 1 に pUC19 ベクターへの pACYC184 由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子をクローニングする時に使用したプライマーの例を示す。

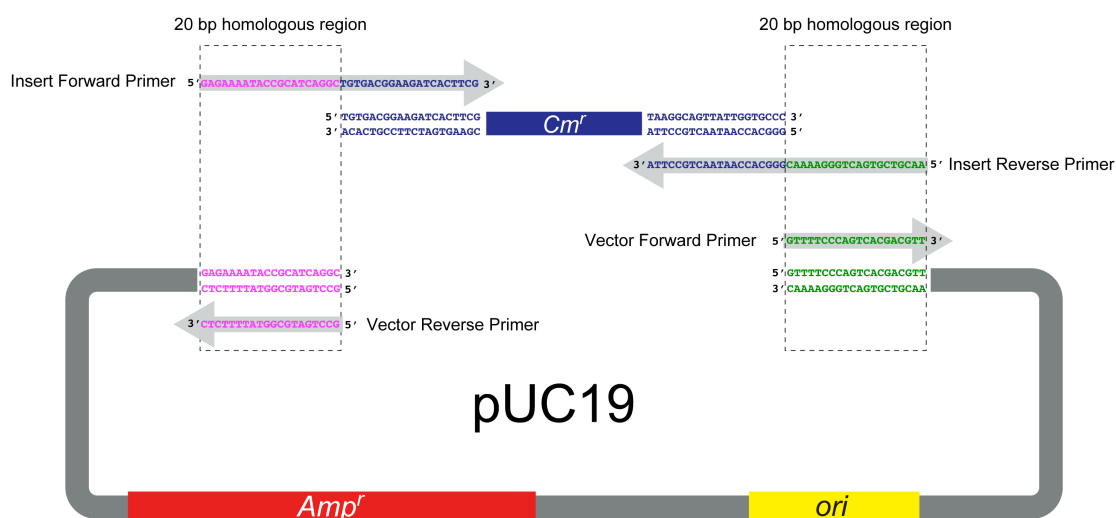


図 1: プライマーデザインの例

このクローニングで、のりしろの長さを 12 bp から 30 bp まで変えて、形質転換効率がどのように影響するかを調べた。ベクターは 2.6kb、インサート DNA は 1kb でこのインサート DNA の両端に付加するベクターとの相同配列長を変えた。

インサート DNA とベクターの PCR 産物のアガロースゲル電気泳動の結果を図 3 に示す。ベクター及びインサート DNA の 1  $\mu$ l あたりの量はそれぞれ 80 ng (0.05pmol) 及び 100 ng (0.15 pmol) であった。iVEC 形質転換には未精製 DNA のまま、この PCR 反応液 1  $\mu$ l を直に使用した。

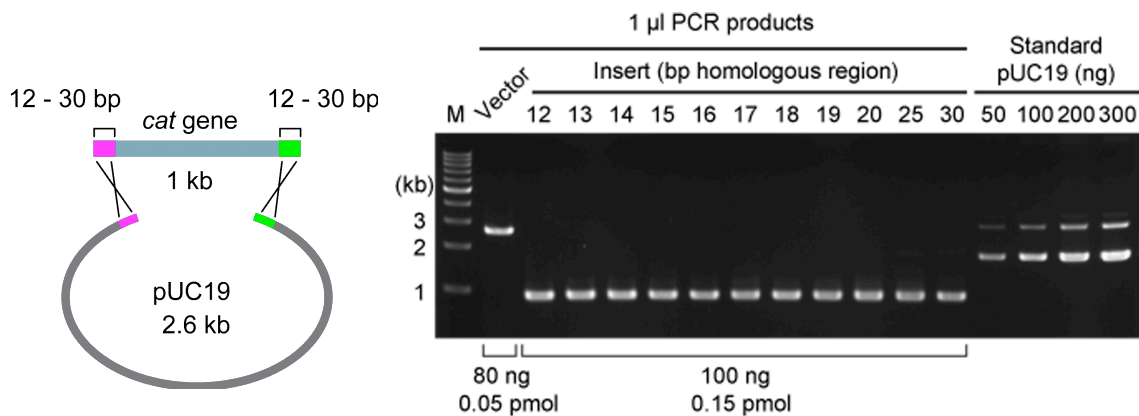


図 2: 形質転換に使用した DNA

## 2. 相同領域長とクローン化の効率

上記の未精製 PCR 産物を 1 µl ずつ用いて、AQ3625 の形質転換を TSS 法により行った結果を図 3 に示す。のりしろの長さが 12 bp であっても形質転換体が得られた。また、のりしろを 20 bp、30 bp と長くするにしたがって、得られる形質転換体の数が 10 倍、100 倍程度と増加した。形質転換体のうちインサートを含むプラスミドの割合は、のりしろの長さにはあまり影響されず、多くの場合で 90% 以上の高い割合で目的クローンが得られた。

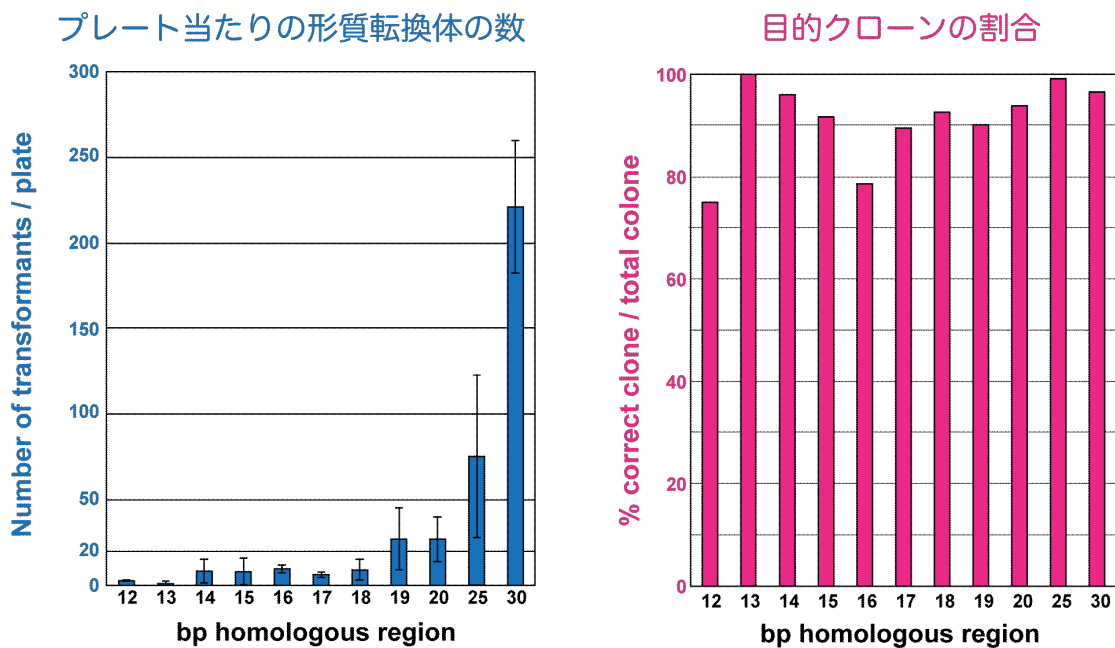


図 3: のりしろの長さとお換え効率

### 3. マルチインサート DNA のクローニング

2 断片及び 3 断片の PCR 産物の同時クローニングについて、のりしる部分の長さを 20 bp, 25 bp, 30 bp に変えて調べた結果を図 4 に示す。凍結保存用のプロトコルを用いて、1  $\mu$ l ずつの未精製の PCR 産物を用いて行った。いずれの場合も、のりしる部分が長くなるほど形質転換体の数が増加した。2 断片のクローニングでは、90 % 程度の高頻度で形質転換体の中から目的クローンが得られた。3 断片のクローニングでも、プレート当たり数個から 10 個程度と少ないながらも形質転換体を得られた。また、30 bp の“のりしる”部分を持たせた場合では、70 % の割合で目的クローンを得ることができた。

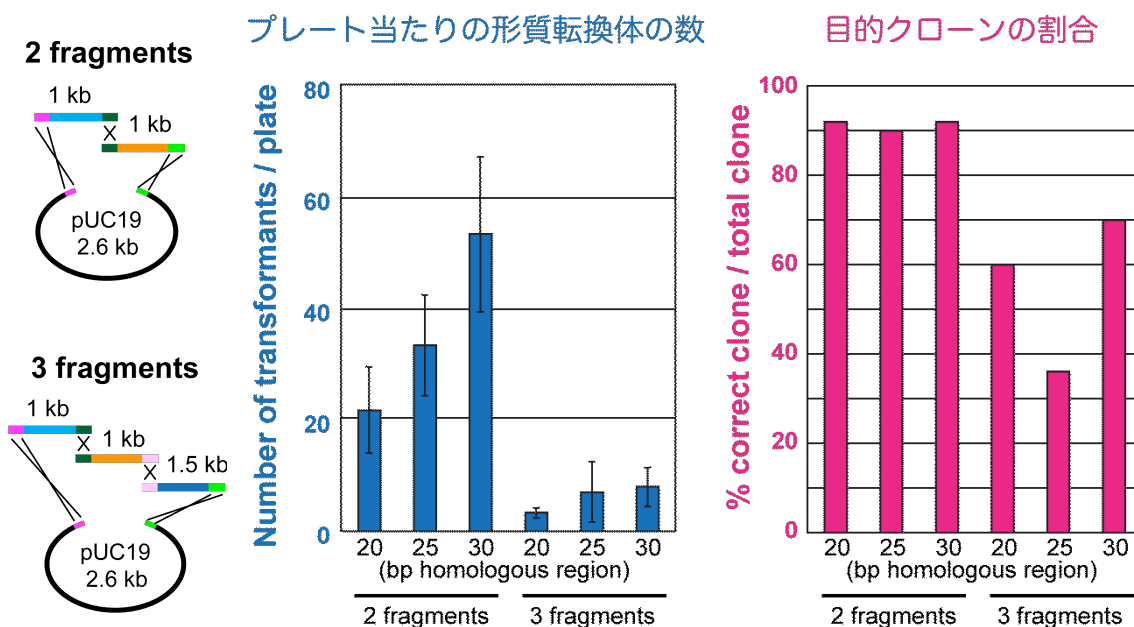


図 4: 複数断片のクローニング

### 4. プラスミド DNA のマルチマー化

AQ3625 で調整したプラスミドではラダー状のバンドがあらわれる (図 5)。これは大腸菌内でプラスミド同士が組換えを起こし生じたマルチマー DNA によるものである。従って、このプラスミド内に 1 箇所の認識部位を持つ BamHI で処理すると、全て同じ長さの一本鎖 DNA になる。

タンパク質発現に良く使われる BL21(DE3) のような recA+ 株でもダイマー、マルチ

マーは生じている (図 5)。BL21 (DE3) で調整したプラスミドも特に問題なく使用できることから、プラスミドのマルチマー化は発現などには支障はない。

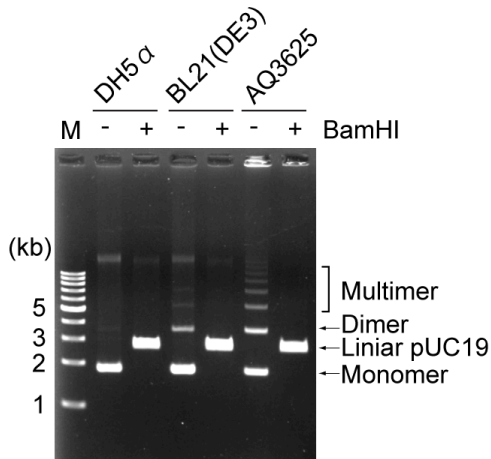


図 5: DH5α、BL21 (DE3)、AQ3625 で調整した pUC19

### 5. 組換えに伴う PCR プライマー配列領域での点突然変異

AQ3625 株でのクローニング産物をシークエンスした結果を図 6 に示す。pUC19 へのクロラムフェニコール耐性遺伝子のクローニングでは、8 クローン調べて、変異が入ったものは一つもなかった。pET28a への *spo0J* 遺伝子 (枯草菌の染色体分配に関わる遺伝子) のクローニングではインサートが入ったものを 5 クローン調べて全てのクローンでのりしる付近の N 末側に変異が入っていた。

#### ① pUC19 への *Cm<sup>r</sup>* 遺伝子のクローニング



インサートが入ったものを 8 クローン調べて、変異が入ったものは一つもなかった。

#### ② pET28a への *spo0J* 遺伝子 (枯草菌の染色体分配に関わる遺伝子) のクローニング



インサートが入ったものを 5 クローン調べて、いずれも N 末側のみに変異が入っていた。

図 6: のりしる付近での変異

C 末側の相同配列や内部の spo0J の配列にも変異は見られなかったことから、N 末のプライマー内の配列依存的に変異が入ったと考えられる。また、Gibson Assembly による精製組換え酵素の反応によっても 8 クローン中の 7 クローンで同様の変異が生じていた。これらのことからこれは組換え反応中に変異が生じたものと思われる。変異が生じたプライマーでは、パリンドローム構造がありその部位に変異が集中していた。おそらくそれが原因と推定される。相同配列とそれに隣接するプライマーの配列の中にパリンドローム構造を入れないようにした方が無難と思われる。