

## ポリエチレングリコールによる大腸菌の形質転換法

山本 義治, 小保方潤一\*

(京都大学植物生態研究施設,

\*北海道大学遺伝子実験施設)

## 1. はじめに

最近の polymerase chain reaction (PCR) 法の普及によりその価値が若干下がったきらいはあるにせよ、大腸菌の形質転換は、DNA を扱う研究室においては基本的な実験技法のひとつである。方法としては①Ca法<sup>1)</sup>、②Hanahan法<sup>2)</sup>が一般的であり、これらをベースに各研究室で細かな改良や簡略化が行われているようである。大腸菌の形質転換が可能であることがわかり、それがごく普通に行われている今となつては、この技術に求められているのは、1) 簡便であること、2) 効率がよいことの2点であろう。昨年この二つの条件をかなり満たしていると思われる③ポリエチレングリコール (PEG) 法<sup>3)</sup>が発表された。これは表1にあるように従来法に比べきわめて手軽に行えるのが特長である。そこで早速PEG法での形質転換効率や、それにかかる手間暇などについて従来法と比較検討してみた。

## 2. 実験例

## 2.1 手法

## 2.1.1 コンピテントセルの調製

①Ca法<sup>1)</sup>: 対数増殖期初期 (Klett 値=20) の菌を遠心して集菌し、適当量の 50 mM CaCl<sub>2</sub> に懸濁後再び遠心し、もとの培養液の 1/40 量の CaCl<sub>2</sub> 溶液に懸濁する。

②Hanahan法<sup>2)</sup>: 対数増殖期初期 (Klett 値=20) の菌を集菌し適当量の TFB 液 (TFB: 10 mM MES, 100 mM RbCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 20%

Transformation of *E. coli* with polyethylene glycol  
Yoshiharu Yamamoto and Junichi Obokata\* (Laboratory for Plant Ecological Studies, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606 and \* Research Center for Molecular Genetics, Hokkaido University, Sapporo 060)

投稿受付: 1990年8月15日

グリセロール) に懸濁後再び遠心し、もとの培養液の 1/40 量の TFB 液に懸濁する。

③PEG法<sup>3)</sup>: 対数増殖期初期 (Klett 値=20) の菌を 2×TSS 液 (TSS: 10% PEG, 25 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5% ジメチルスルホキシド (DMSO), 1×LB 培地) に懸濁する。

## 形質転換

2 μl の pUC18 (=2 ng) と 200 μl のコンピテントセルを薄手のポリプロピレンチューブ (Falcon 2059) 内で混合し 30 分氷冷する。①, ②についてはその後ヒートショック (42°C, 90 秒) を与えすぐに氷冷, ③についてはヒートショックは省略。そして 2 ml の LB 培地を加えて 37°C で 60 分置き、いったん氷冷してから液量 2.2 ml のうち 200 μl を LB プレート (Amp, IPTG, X-gal 入り) に順次スプレッダーを用いてプレプレティング。一晚 37°C で培養した後青いコロニーをカウントした。

## 2.2 結果

大腸菌の菌株については JM105 および JM109, PEG は Sigma 社製 (P3640 MW=3350), 半井社製 (169-09125 MW=7500), 和光社製 (282-22CP MW=7800-9000) のものを用いたところ、結果は図1(A) のようになった。

一般に菌株は JM105 より JM109 のほうが形質転換効率は良いようである。PEG法で用いる PEG は 3 社の間で著しい差はみられなかったため、わざわざ原報にある Sigma 社のものを使う必要はないといえる。③について原報にある簡便法では思ったほど転換効率がよくなかったため、細胞濃度をあげて追加実験してみた (図1B)。

## 3. まとめ

PEG法において細胞濃度をあげることにより TFB 法の 5 倍 (9×10<sup>7</sup> 形質転換体/μgDNA) の形質転換効率が

## テクニカルノート

表 1 PEG 法による形質転換の概略

1. 大腸菌を培養し、対数増殖期初期になったら氷冷する。
2. PEG を含むストック液 (2×TSS) を等量加える。
3. 導入したい DNA を加える。
4. 氷上に 30 分ほどおく。
5. プレーティングする。

得られたので、当研究室では早速この方法を用いることにした。以下にプロトコールの一例を示す。

## プロトコール

## 0. ストック液

LB 培地: 0.5% 酵母抽出物, 1% トリプトン, 1% NaCl

2×TSS: 20% PEG, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 1×LB 培地

DMSO: ジメチルスルホキシド (HPLC 用) 小分けして -20°C で保存

1. 大腸菌 JM109 株を LB 培地 50 ml に植継ぎ, 37°C, 160 rpm で振とう培養する

2. Klett 値=20 (OD<sub>550</sub>=0.4) になったら氷冷する

3. 遠心して集菌し (1,000×g, 5分, 4°C), 上清を捨てる

4. 沈殿 (大腸菌) をあらかじめ氷冷しておいた LB 培地 2.5 ml に懸濁する

5. 2×TSS (氷冷しておく) 2 ml, DMSO 0.5 ml を加え, 軽く混ぜる (コンピテントセルのできあがり) このまま凍結保存するときは 100 μl ずつ分注し, そのままドライアイス/エタノールバスで凍結させたのち -70°C の冷凍庫に保存する

6. コンピテントセル懸濁液 100 μl と導入したい DNA を含む溶液 (10 μl 以下) を混合する

7. 氷浴上で 0.5~1 時間放置

薬剤耐性による選択を行うときは LB 培地を 1 ml 加えて 37°C で 1 時間おく

8. LB プレート (必要なら抗生物質を加える) にプレーティング

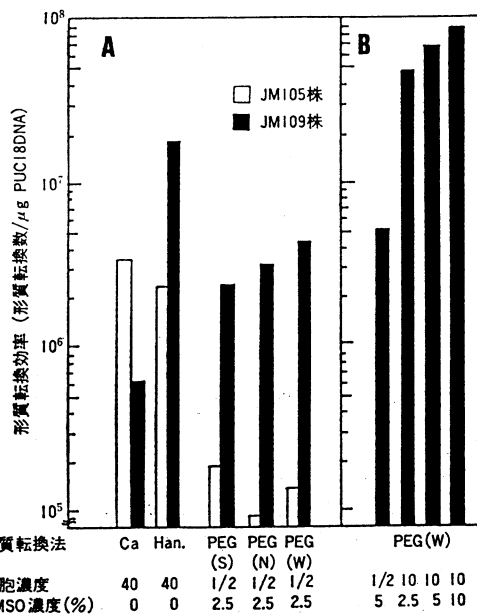


図 1 Ca 法, Hanahan 法, PEG 法による形質転換効率の比較

PEG 法については各社の PEG を比較した: (S), Sigma; (N), 半井; (W), 和光。細胞濃度は Klett=20 の状態を 1 とし, たとえば 2 倍に希釈した場合は 1/2 と表した。

## 追記

この方法により M13RF DNA を大腸菌 JM109 に導入しトップアガーを用いてプレーティングしたところ, Hanahan 法に比べて低い転換効率しか得られなかった。前述のようにスプレッダーを用いてプレーティングする場合は問題ないが, トップアガーを用いるプレーティングのやり方は PEG 法には向かないらしい。PEG 法によるコンピテントセルは熱に対して敏感になっているのかもしれない。

- 1) Mandel, M. & Higa, A. (1970) *J. Mol. Biol.* 53, 154-162
- 2) Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580
- 3) Chung, C.T., Niemela, S.L., & Miller, R.H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 2172-2175