

見えない敵は菌株と培養条件だった！

人工遺伝子合成では、設計した配列を正しく合成し、目的のベクターに挿入した後、大腸菌を形質転換するクローニングを行います。しかし、正しい配列を適切に組み込んだにもかかわらず、変異が入ってしまうなど目的のクローニングがうまく進まないケースがしばしば報告されています。

この原因の一つとして、**大腸菌の菌株の特性や培養条件**が挙げられます。特定の配列は、大腸菌にとって不安定であったり、増殖に影響を与えたりすることがあり、その結果、目的配列の欠失や再編成が生じる可能性があります。特に、高GC含量の配列や反復配列、毒性を持つ遺伝子などは影響を受けやすくクローニングの成功率を大きく低下させることができます。弊社の人工遺伝子合成サービスでは、このような課題を考慮し、**適切な大腸菌株の選択や培養条件の最適化**を内部で実施しています。難易度の高い配列でも高い成功率でクローニングを実現できるよう、最適な条件を選択しながら遺伝子の安定的な維持を確保しています。

本アプリケーションノートでは、菌株の選択や培養条件によってクローニング結果が大きく変わる実例を紹介します。クローニング実験をより確実に進めるためのポイントを知り、実験成功率の向上にお役立てください。

菌株の選択がクローニング結果に影響を与える例

遺伝子Aとクローニングベクターを用いて、シームレスクローニングおよび制限酵素サイトでのライゲーションを実施しました。

汎用的に使用される大腸菌株DH5 α 、JM109をそれぞれ使用したところコロニーPCRの結果について大きな違いが現れました。

いずれの場合もコロニーは多数得られましたが、

①シームレスクローニングでは

DH5 α ：11クローンで逆向きの挿入、

1クローンで正しい向きの挿入だがプライマー部位に1塩基変異

JM109：11クローンで正しく挿入、1クローンで逆向きの挿入

②制限酵素サイトでのライゲーションでは

DH5 α ：全てのクローンで遺伝子Aは挿入されず、セルフライゲーション

JM109：全てのクローンで正しく挿入

という結果になりました。

⇒JM109が持つlac Zによる基底発現抑制が重要と考えられる。

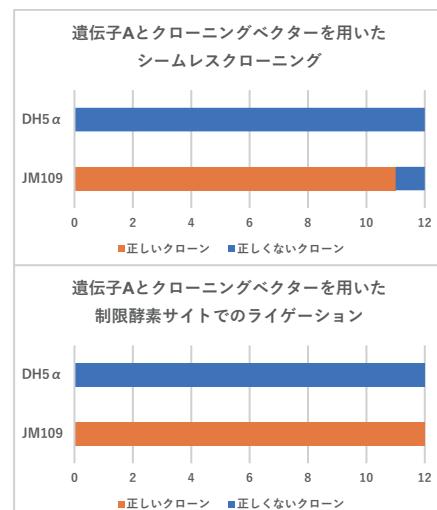


図 1 菌株によるコロニーPCRの結果の違い

培養温度の違いがクローニング結果に影響を与える例

遺伝子Bを持つプラスミドの形質転換を実施しました。菌株はDH5 α を用い、培養温度を37°Cと25°Cとでそれぞれ変えたところ、コロニーPCRの結果について大きな違いが現れました。

37°Cでは、コロニーが6個しか得られず、全て正しくないクローンでした。具体的には、遺伝子Bに、1塩基置換、大きな欠失、大腸菌ゲノムの挿入が確認されました。

一方、25°Cでは、コロニーが多数得られ、全て正しいクローンでした。

⇒低温での翻訳産物の量や活性の低下が重要と考えられる。

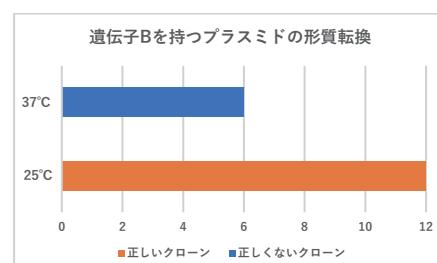


図 2 培養温度によるコロニーPCRの結果の違い

「<<意図しない変異や欠失が起きたら、菌株や培養条件を再確認しましょう！！>>