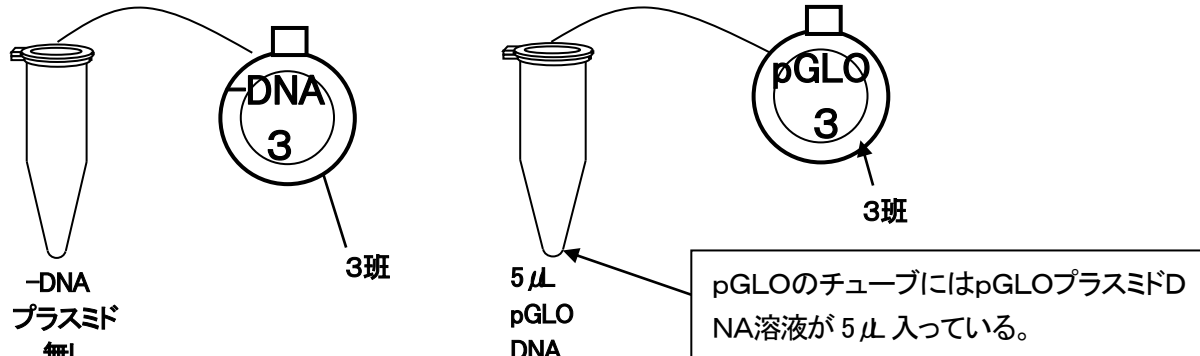


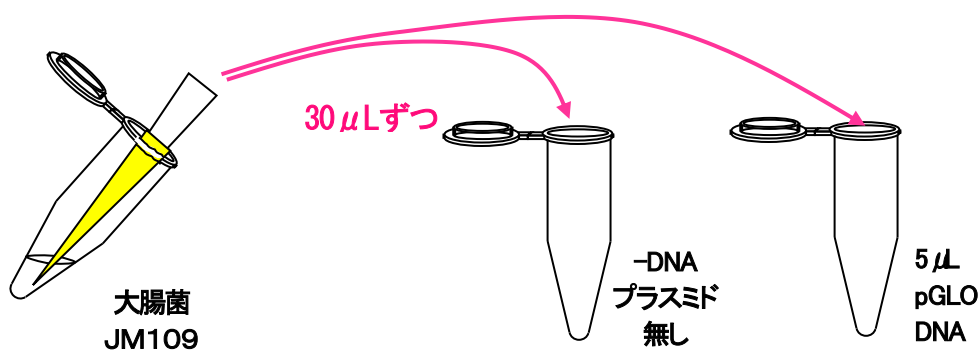
# 神戸高校実験パック連携企画 細菌を用いた形質転換実験 Protocol (プロトコル) (基礎編)

目的: 大腸菌(細菌)に緑色に光るタンパク質をつくる遺伝子(GFP 遺伝子)を導入して、大腸菌の性質(形質)を緑色に光るように変化(転換)させる。

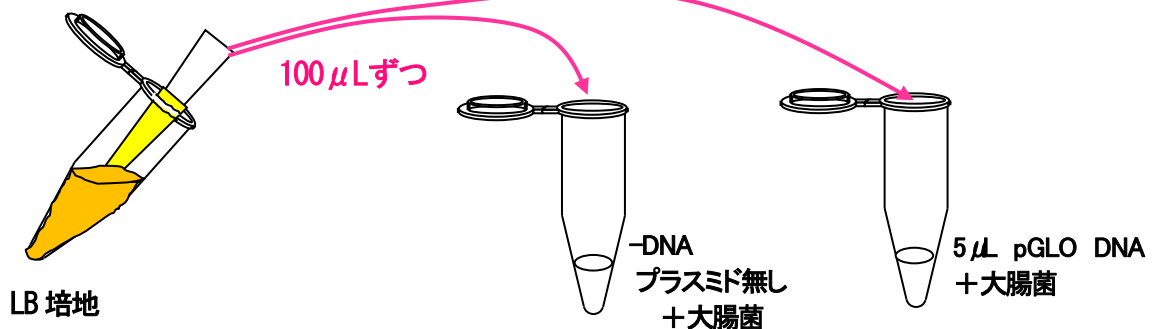
- 1 LB培地(黄色い液体)の入ったマイクロチューブ1本、pGLOと記載のあるチューブ1本・何も記載の無いチューブ1本を確認。記載のないチューブのふたに-DNA(マイナスDNA)と自分の班の番号をマジックで記入。pGLOのチューブのふたに自分の班の番号、をマジックで記入。その後軽く遠心する。



- 2 氷の中に刺して冷却中の大腸菌 JM109 のコンピテントセルの入ったチューブを軽くタッピングし、大腸菌を混ぜる。\*コンピテントセル: プラスミドを入れやすくした大腸菌細胞(後で説明)
- 3 マイクロピペットを使って-DNAとpGLOの2本のチューブに大腸菌液を 30 μL ずつ入れる。



- 4 マイクロチューブのフタを閉め、チューブの底を軽くタッピングし溶液を混ぜる。
- 5 チューブを氷に刺す。20分間置く。**この間に原理の説明を聞く**
- 6 ヒートショック(熱を加える)を行う。42°Cのホットバスに45秒間入れる。(時間と温度厳守)
- 7 ヒートショック後、素早く氷に刺し冷却する。**できるだけ素早く行うこと。**2分間冷却(ストップウォッチ)
- 9 チューブのフタを開け、マイクロピペットを使って2本のチューブにLB培地を100 μL ずつ入れ、フタを閉める。



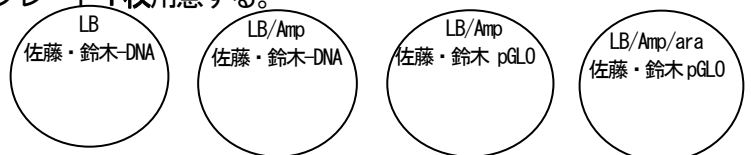
これで大腸菌の形質転換終了です。次は形質転換を確かめるためプレートに大腸菌を展開します。

●原理の説明を聞いた後、大腸菌を生育させるプレートの準備をします。

LBプレート1枚 LB/Ampプレート2枚 LB/Amp/araプレート1枚用意する。

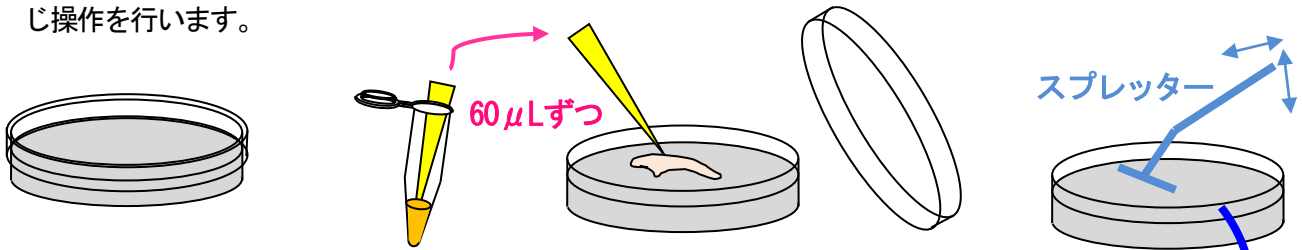
マジックで裏にプレートの種類、実験者名、どんな大腸菌を入れたか

(-DNA, pGLO)を小さく書く。

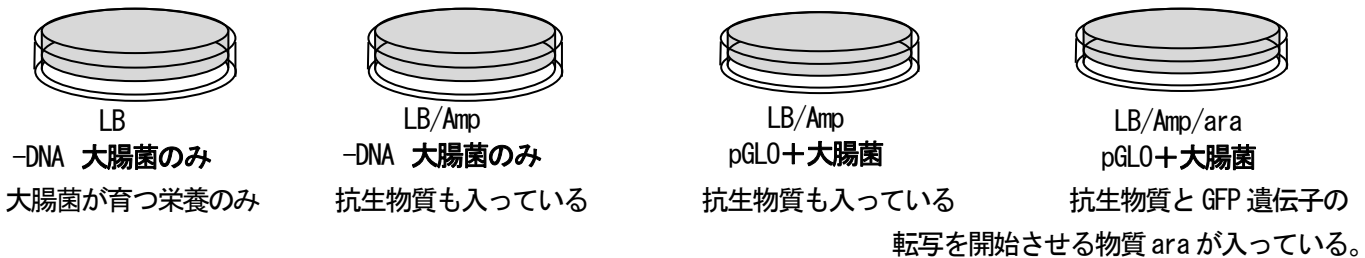


大腸菌をプレートに広げて形質転換実験の結果を確かめる

- 1 LB プレート1枚、LB/Amp プレート1枚 の計2枚と大腸菌-DNA のチューブをピペットのある机の上に用意する。
- 2 チューブを軽くタッピングして溶液を混ぜる。
- 3 サンプルを60  $\mu$ L 吸い取り、フタを開けプレートに滴下してフタを閉めます。
- 4 スプレッターを用いて、プレート表面にできるだけ広げて、フタを閉め逆さまにして完了。別な1枚も3・4の同じ操作を行います。







- 5 LB/Amp プレート1枚 LB/Amp/ara プレート1枚の計2枚と大腸菌 pGLO のチューブをピペットのある机の上に用意する。
- 6 2・3・4の操作を行う。



- 7 5枚のプレートに大腸菌のサンプルを広げたら、プレートを裏返しにして積み上げテープでくくり、班の名前を書いて37°Cのインキュベーター入れ翌日まで培養する。
- 8 使用した、チューブ、チップ、スプレッターなどは、すべてゴミ箱の中のビニールに入れる。オートクレーブ処理(120°C 20分)するためのバッグに入れ、オートクレーブで滅菌処理する。実験により遺伝子を導入した大腸菌は“組換え体”となり、実験室から持ち出したり、ゴミ箱にそのまま捨てて実験室外で生育したりしないように処理する必要があります。


### 細菌を用いた形質転換実験 結果予想と実験結果

#### ○形質転換実験結果の予想

予想されるものに全て○をつける コロニーを確認しよう	-DNA 	-DNA 	pGLO 	pGLO 
	培地名	LB/Amp	LB/Amp	LB/Amp/Ara
一番多くの大腸菌が生育するのは?				
大腸菌が生育しないのは?				
発光する大腸菌コロニーがあるのは?				

#### コロニーとは



培地上にできる大腸菌の塊  
1個の大腸菌が分裂を繰り返す、塊になる。横から見ると  盛り上がっている。  
元々一個の大腸菌なので、コロニーの大腸菌は“クローン”である。

#### ●形質転換実験結果

サンプル名	培地名	-DNA LB	-DNA LB/Amp	pGLO LB/Amp	pGLO LB/Amp/Ara
コロニーの数					

もっとも大腸菌が多いのは