

**目的** 大腸菌にアンピシリン耐性遺伝子と GFP 遺伝子を導入し、大腸菌の形質を変化させる。  
**実験の前に** 消毒・滅菌する 手、机など

### 実験の原理 1

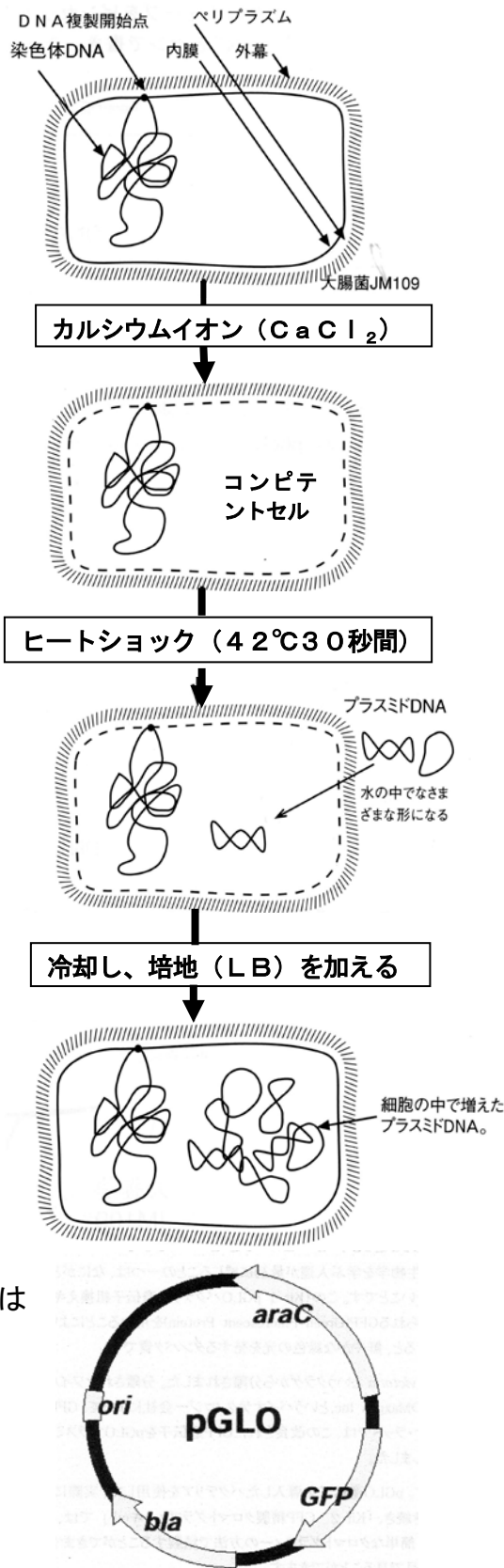
大腸菌の中に遺伝子（プラスミドDNA）を導入するには

- ・大腸菌の外膜（細胞壁に当たる）は物質が容易に通る抜けることができるのでプラスミドDNAも容易に通る抜ける。
  - ・大腸菌の内膜は細胞膜で基本的に物質を通さない。プラスミドDNAは大きな分子なので通る抜けれない。
- カルシウムイオンで処理すると膜の構造がゆるんでいろいろな物質が細胞の中に入りやすくなる。この状態の細胞をコンピテントセルという。プラスミドDNAも入りやすくなる。
- 熱を一時的加えることでよりプラスミドDNAを入りやすくなる。
- ・全ての大腸菌にプラスミドDNAが入るわけではない。多くの大腸菌にはプラスミドDNAがはいらない。たまたまプラスミドDNAが入る場合がある。条件によっても違うが大腸菌何万〜何十万個に1個の割合で入ることがある。

- 細胞膜を元に戻すために、冷却し培地を加える。  
 （カルシウムイオンが希釈される）

### 実験の原理 2

大腸菌の形質転換（トランスフォーメーション）とは形質が変化することを形質転換という。  
 大腸菌など細菌類は、アンピシリンなどの抗生物質に弱く、抗生物質があると生育できない。風邪を引くと抗生物質を含んだ風邪薬を飲むのも、風邪の細菌を退治するためです。  
 今回大腸菌内に導入する遺伝子（プラスミドDNA）は図のようなものです。



プラスミドの中にある遺伝子は大腸菌の中にはいると、大腸菌の遺伝子と同様に、菌内で転写（DNAからmRNAへ）、翻訳（mRNAからタンパク質へ）され、それぞれタンパク質を合成する。合成されたタンパク質は大腸菌内で働いて大腸菌の形質（形や性質）を変化させる。

抗生物質アンピシリンがあると生育できない



アンピシリン耐性遺伝子（*bla*）導入

↓ *bla*発現  $\beta$ -ラクタマーゼタンパク質合成（アンピシリンを不活性化）

アンピシリンがあっても生育できるようになる

（生育できない→生育できる 形質転換した）

大腸菌は緑色に光らない



GFP遺伝子（*GFP*）導入

↓ *GFP*発現 GFPタンパク質合成

GFPが大腸菌に蓄積 紫外線を照射すると緑に光る

（光らない→光る 形質転換した）

なぜアラビノースがないと発光しないのか？

pGLOプラスミドDNAには、アラビノースオペロンが組み込まれている。

アラビノース（糖の一種）があるとアラビノースを分解する酵素の遺伝子が転写されて発現するしくみになっている。

この分解酵素のかわりに、GFPタンパクの遺伝子を組み込んである。

*araC*遺伝子が発現して *araC*タンパク質ができると、アラビノースと結合しRNAポリメラーゼがDNAに結合する手助けをする。

*araC*タンパク質+アラビノース



RNAポリメラーゼが結合できる



転写開始

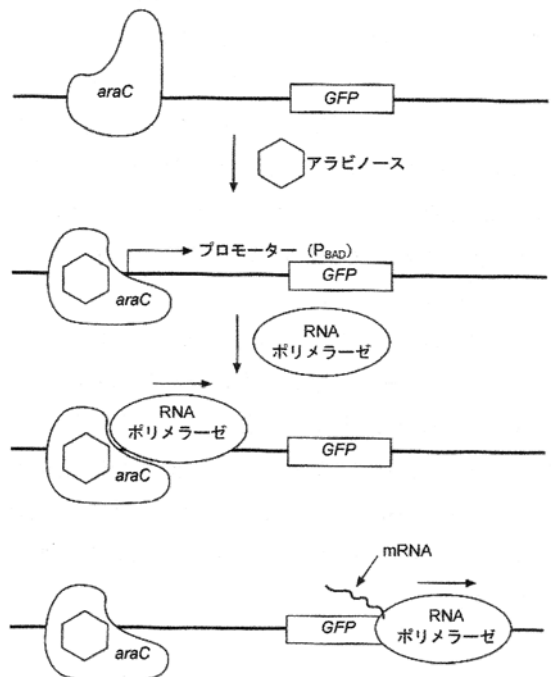


*GFP*遺伝子のmRNA合成



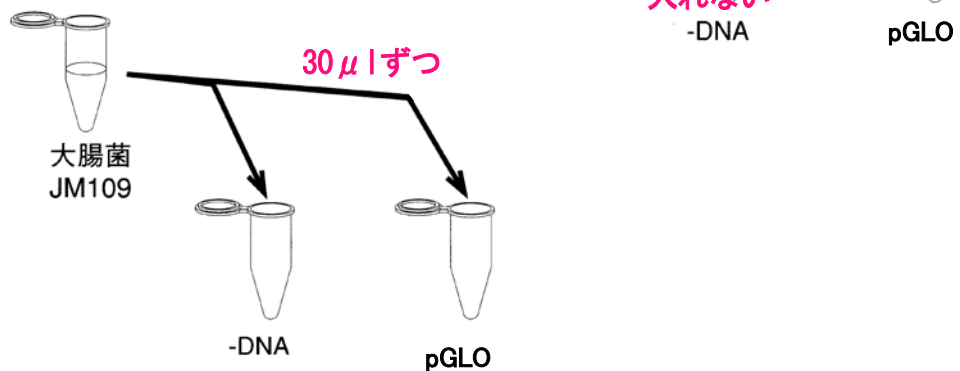
GFPタンパク質合成

### GFP タンパク質の発現

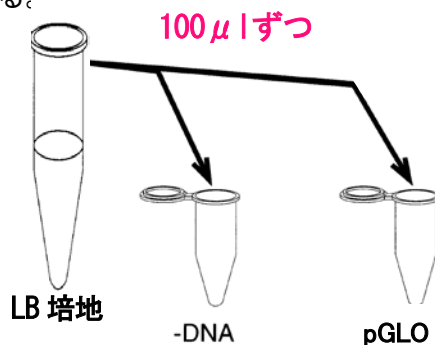


## 形質転換（トランスフォーメーション）の実験操作

- 1 マイクロピペットを使って pGLO プラスミド DNA のチューブにプラスミド DNA 溶液を  $5\mu\text{l}$  入れる。（今回はすでに入れています）
- 2 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（指先ではじく）、大腸菌を混ぜる。
- 3 マイクロピペットを使って 2 本のチューブに菌液を  $30\mu\text{l}$  ずつ入れる。



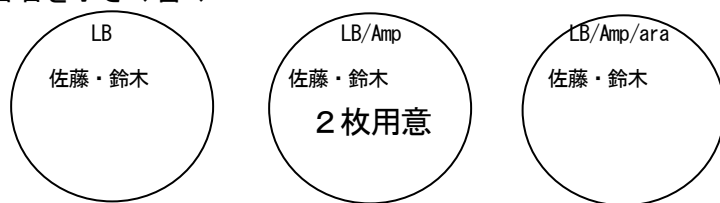
- 4 マイクロチューブのフタを閉め、チューブの底を軽くタッピングし溶液を混ぜる。
- 5 チューブを氷に刺す。10 分間置く（ストップウォッチ）
- 6 ヒートショックを行う。  
ヒートショック 42℃のヒートブロックに30秒間入れる。（時間と温度厳守）
- 7 ヒートショック後、素早く氷上にうつし冷却する。 できるだけ素早く行うこと。  
2 分間冷却（ストップウォッチ）
- 9 チューブのフタを開け、マイクロピペットを使って 2 本のチューブに LB 培地を 100  $\mu\text{l}$  ずつ入れ、フタを閉める。



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まきます。

●実験 5, 6 の待ち時間 10 分間ですること。

LB プレート 1 枚 LB/Amp プレート 2 枚 LB/Amp/ara プレート 1 枚用意し、マジックで裏にプレート名と実験者名を小さく書く

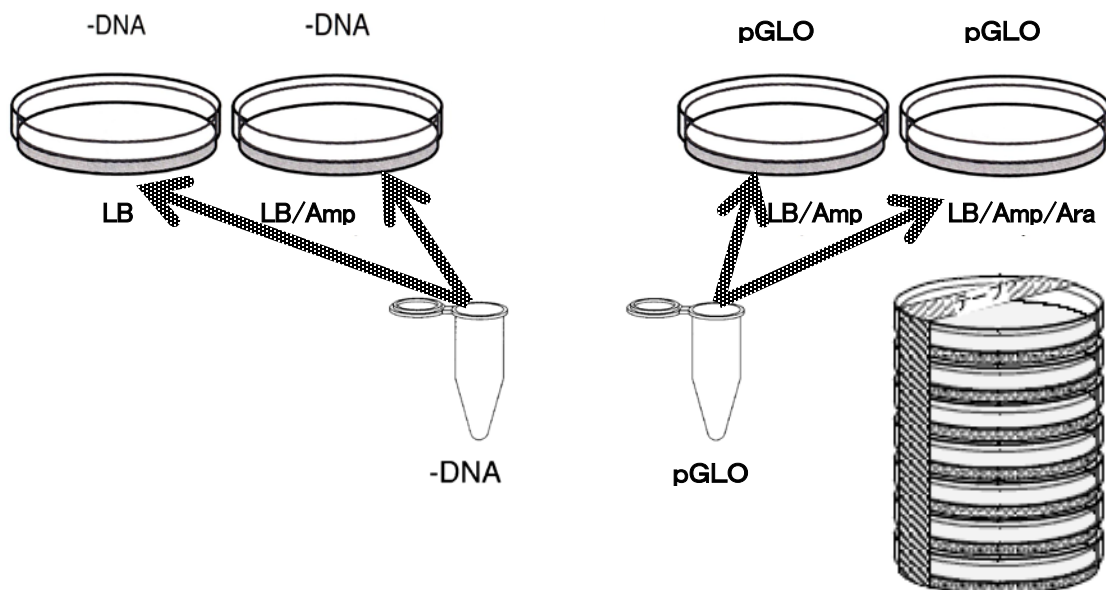


大腸菌をプレートに広げて形質転換実験の結果を確かめる

- 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。サンプルを  $60\mu\text{l}$  吸取り、フタを開けプレートに滴下してフタを閉めます。
- 3 植付け用ループや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 2・3 の同じ操作を行います。



- 4 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。
- 5 2・3 の操作を行う。



- 8 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  $37^{\circ}\text{C}$  のインキュベーター入れ翌日まで培養する。

組換え DNA 実験 大腸菌の形質転換実験結果予想と実験結果

目的 大腸菌にアンピシリン耐性遺伝子とGFP遺伝子を導入し、大腸菌の形質を変化させる。

## ○形質転換実験結果の予想

|              | サンプル名<br>-DNA<br><br>培地名 LB | -DNA<br><br>LB/Amp | pGLO<br><br>LB/Amp | pGLO<br><br>LB/Amp/Ara |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| コロニーが一番多いのは？ |                                                                                                              |                                                                                                     |                                                                                                     |                                                                                                          |
| コロニーが生じないのは？ |                                                                                                              |                                                                                                     |                                                                                                     |                                                                                                          |
| コロニーは発光するか？  |                                                                                                              |                                                                                                     |                                                                                                     |                                                                                                          |

実験を終えて ○を付ける

- |                                |             |        |
|--------------------------------|-------------|--------|
| 1 大腸菌についての知識・理解が深まった。          | できた         | できなかった |
| 2 遺伝子の発現についての知識・理解が深まった。       | 5-4-3-2-1-0 |        |
| 3 大腸菌の形質転換の原理が理解できた。           | 5-4-3-2-1-0 |        |
| 4 行った実験操作がどのような科学的意味があるか理解できた。 | 5-4-3-2-1-0 |        |
| 5 形質転換の実験操作や器具の扱いが正確に行えた。      | 5-4-3-2-1-0 |        |
| 6 実験に興味や関心を持ち、意欲的に取り組めた。       | 5-4-3-2-1-0 |        |
| 7 実験結果の予想について、考察できた。           | 5-4-3-2-1-0 |        |
|                                | わかりやすい      | わかりにくい |
| A 実験の原理の説明はわかりやすかったか？          | 5-4-3-2-1-0 |        |
| B 実験の操作の説明はわかりやすかったか？          | 5-4-3-2-1-0 |        |
| C 実験結果の予想をするための復習はわかりやすかったか？   | 5-4-3-2-1-0 |        |
| D 実験の時間は充分にあったか？               | 5-4-3-2-1-0 |        |

実験後の感想

.....

.....

.....

.....

組 \_\_\_\_\_ 番号 \_\_\_\_\_ 氏名 \_\_\_\_\_

## ●形質転換実験結果

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