遺伝子の働きを知ろう

組換えＤＮＡ実験

大腸菌の形質転換

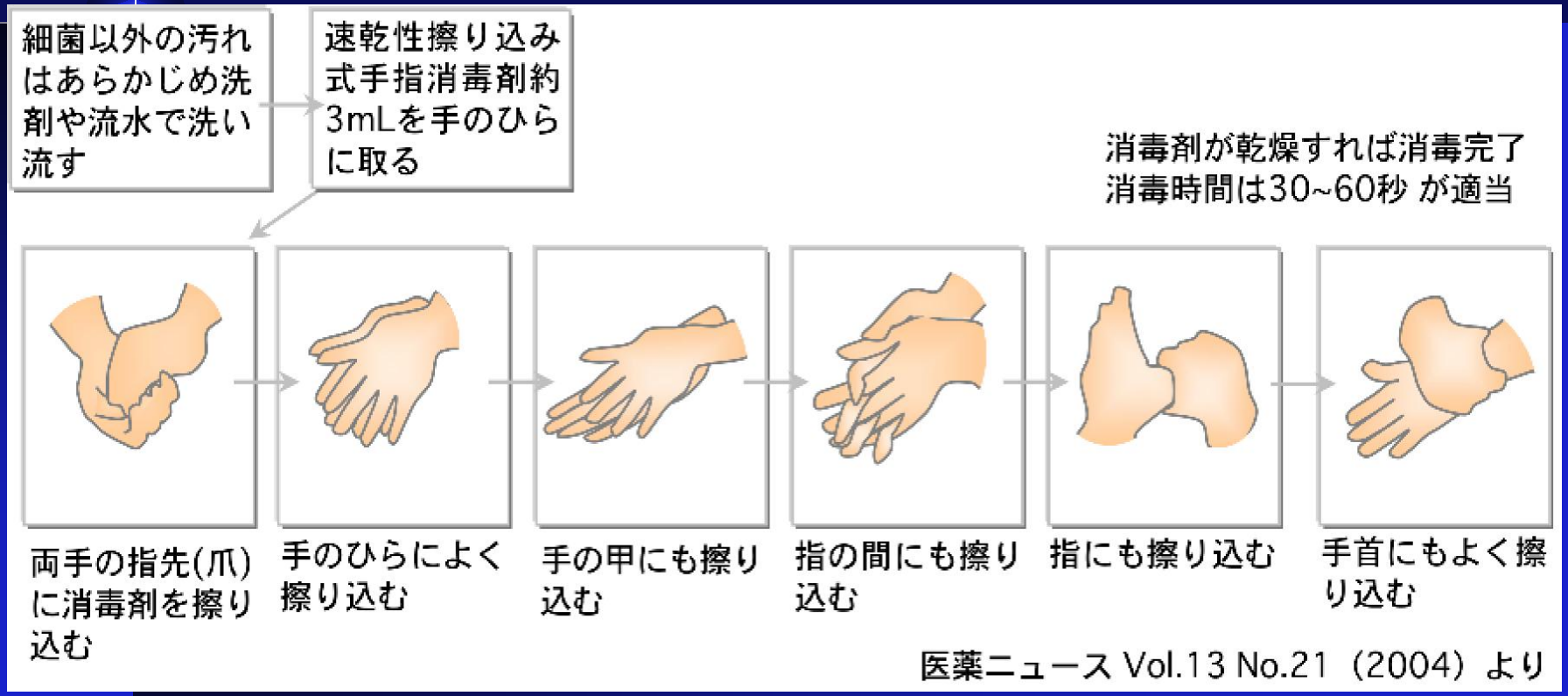
―遺伝子からタンパク質へ―

組換えDNAを使用する際の注意事項

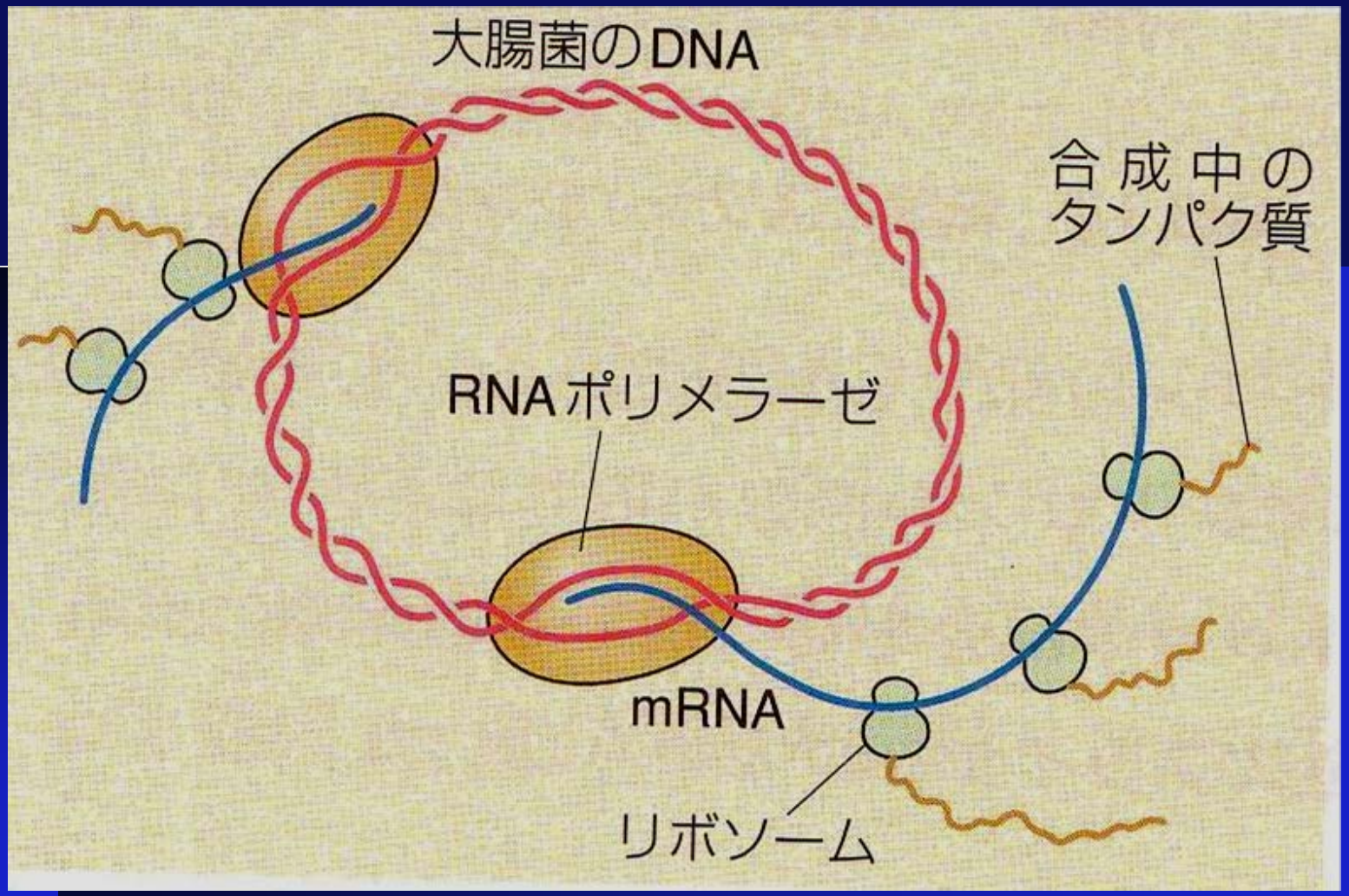
(1) 実験の前後には、手指の消毒を行う
(2) 実験中は白衣を着用
(3) 組換え体の持ち出しをしないこと
(4) 実験器具は滅菌して廃棄すること

手指の消毒について

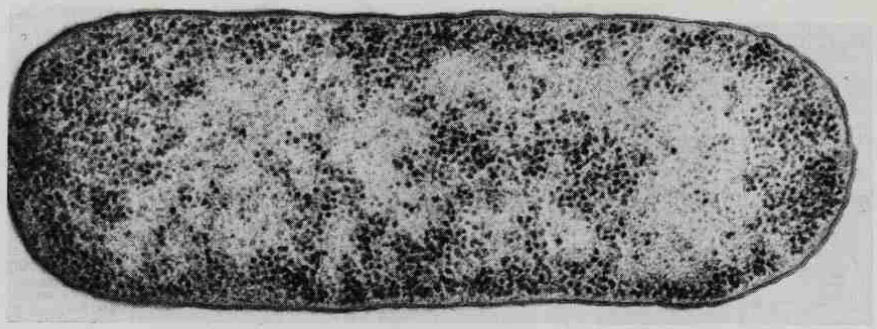
- 手を細菌などで汚染したときは
- 机の上の消毒液を入れたディスペンサーから薬剤を取り、手を消毒しましょう



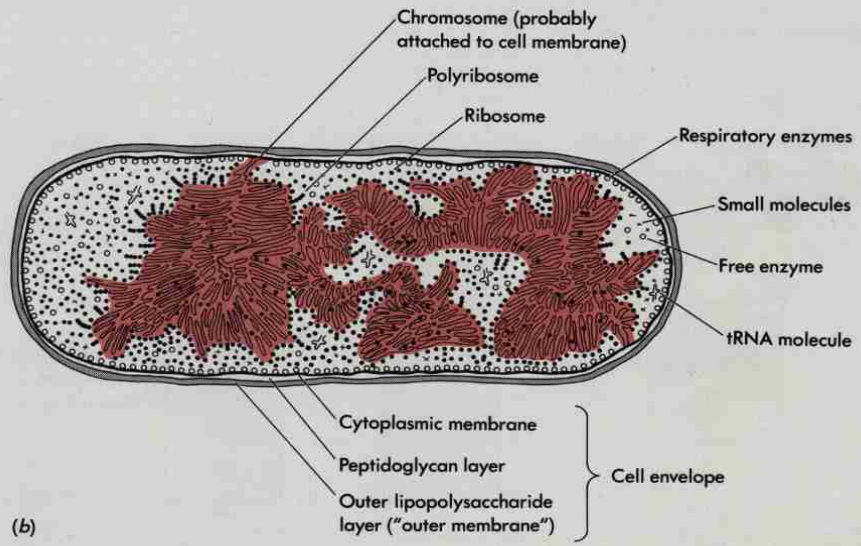
大腸菌の遺伝子発現



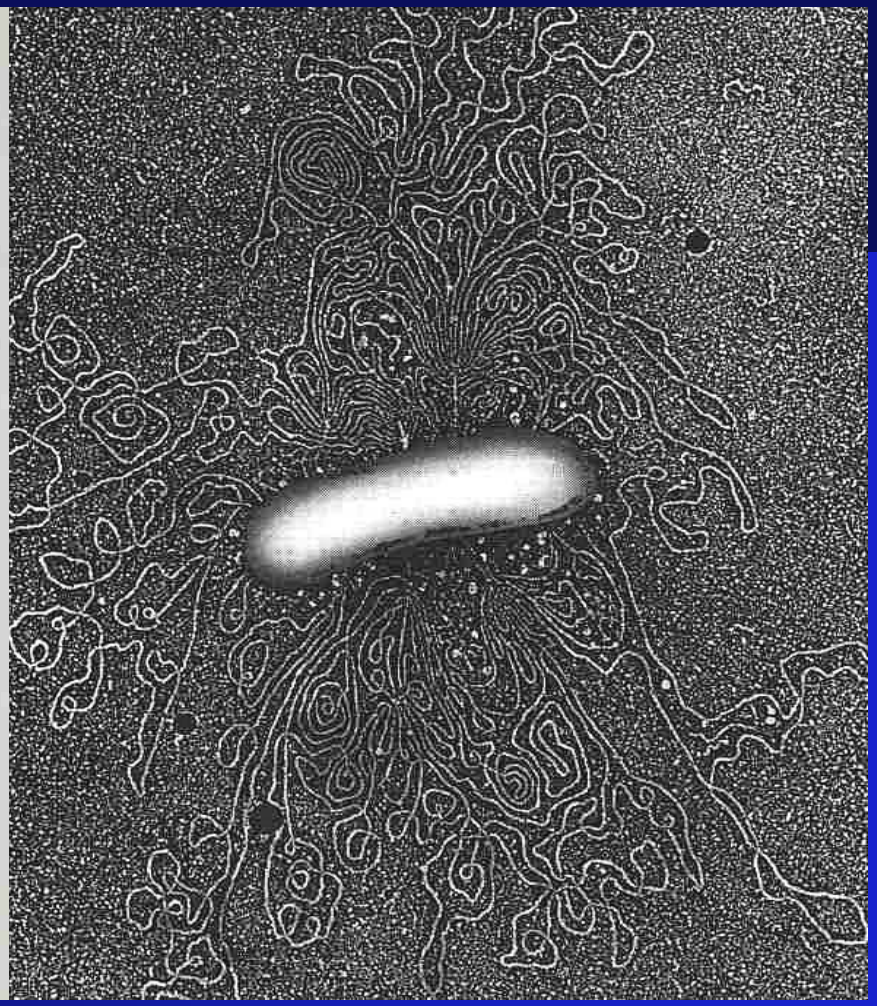
大腸菌



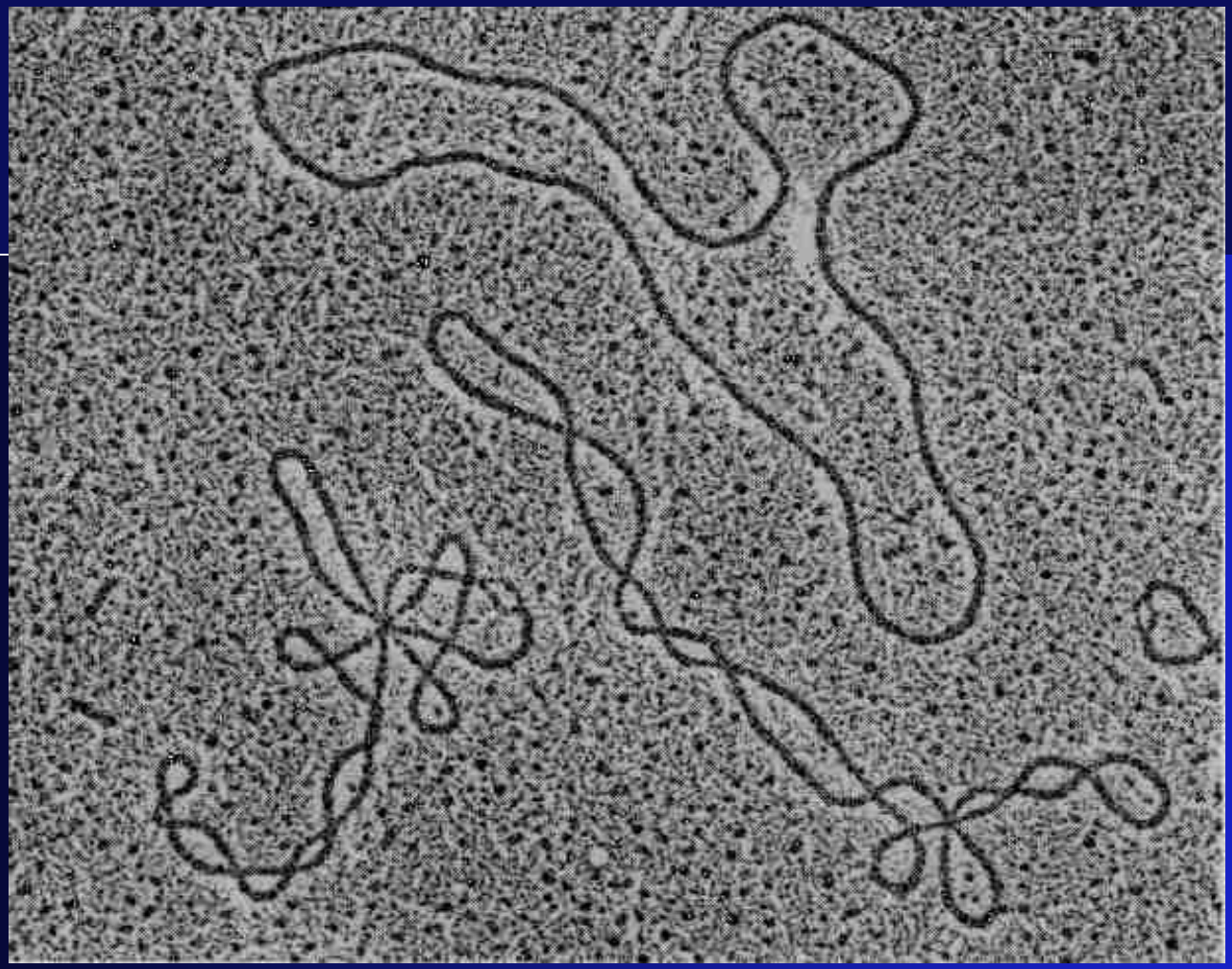
(a)


Chromosome (probably attached to cell membrane)
Polyribosome
Ribosome
Respiratory enzymes
Small molecules
Free enzyme
tRNA molecule
Cytoplasmic membrane
Peptidoglycan layer
Outer lipopolysaccharide layer ("outer membrane")
Cell envelope

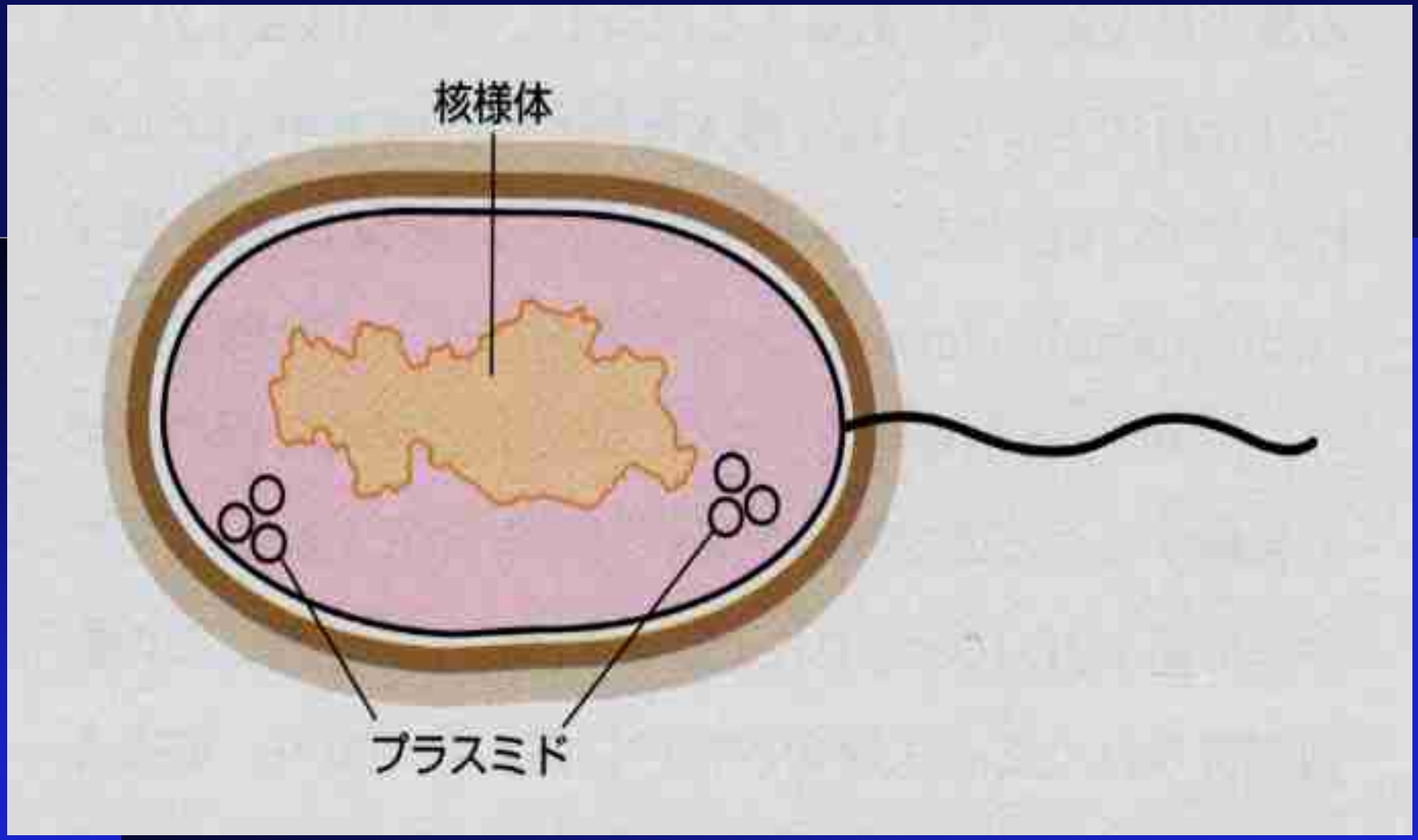
(b)



大腸菌のプラスミド DNA



大腸菌の染色体DNAおよびプラスミドDNA

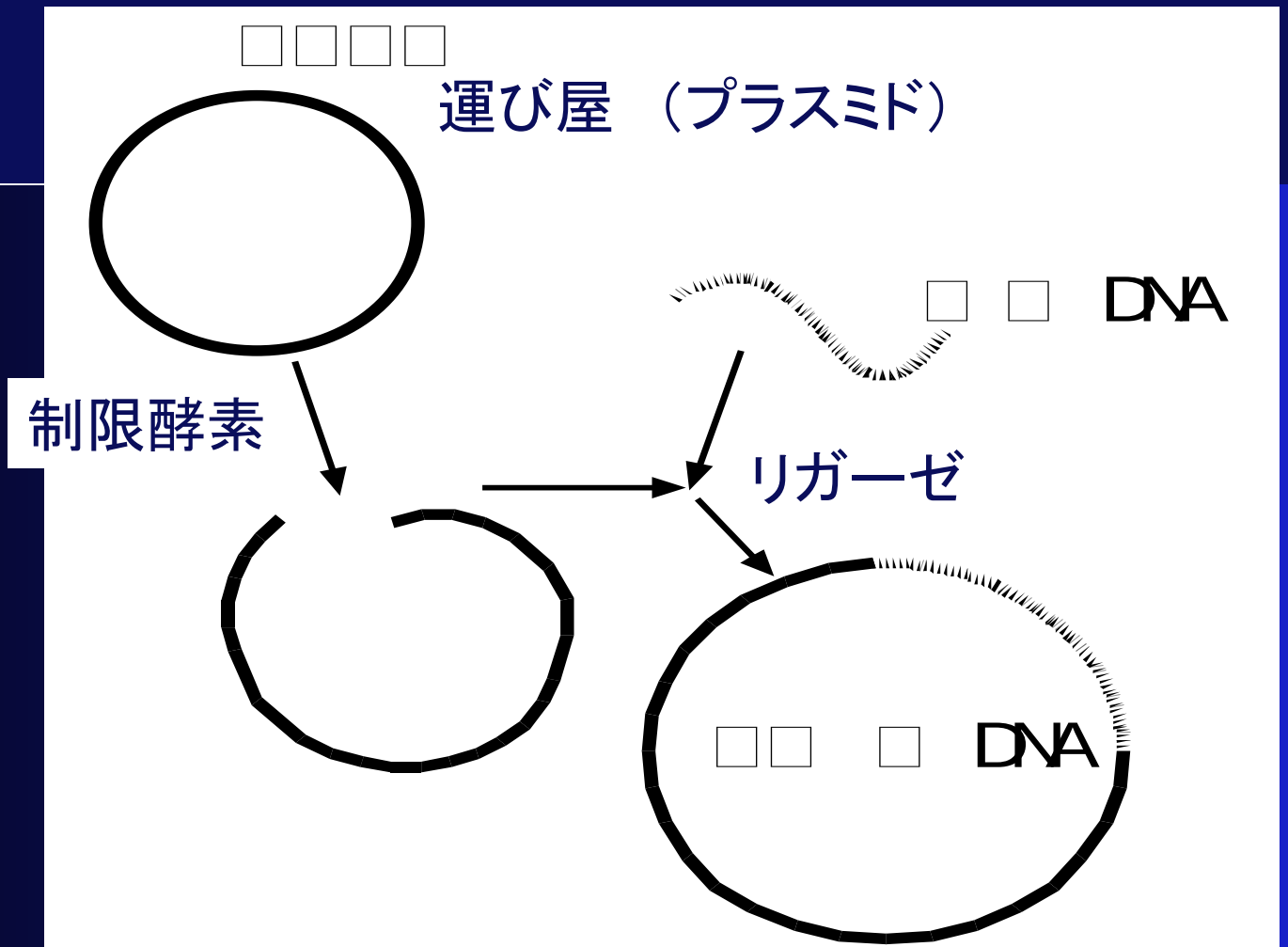


組換えDNA分子とは

- ある生細胞内で複製可能なDNAと異種のDNAとを、試験管内で結合させることによって作製したDNAをいう。
- RNAその他の遺伝物質でも同じ。

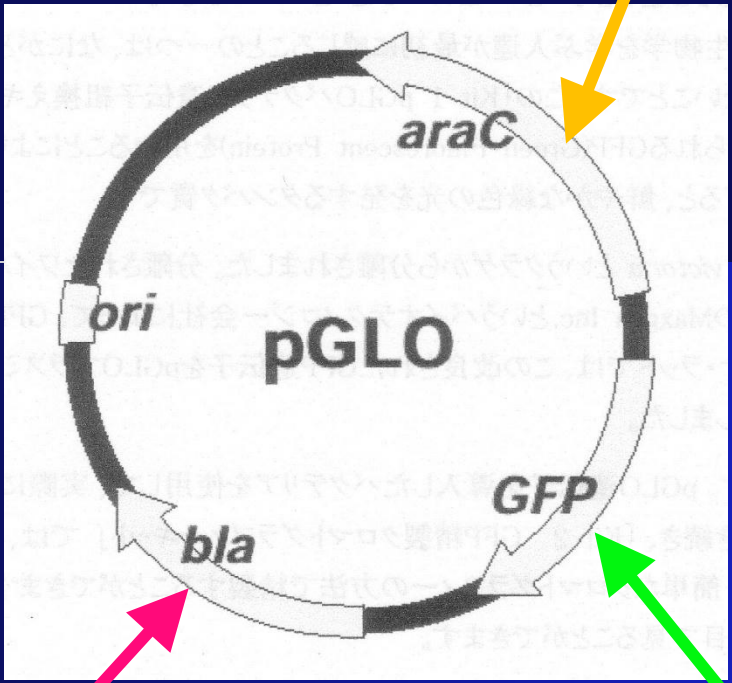
例えば

- プラスミドやウィルスに遺伝子DNAを組み込みます



今回使用するプラスミド DNA

アラビノース分解酵素遺伝子



ＧＦＰ遺伝子

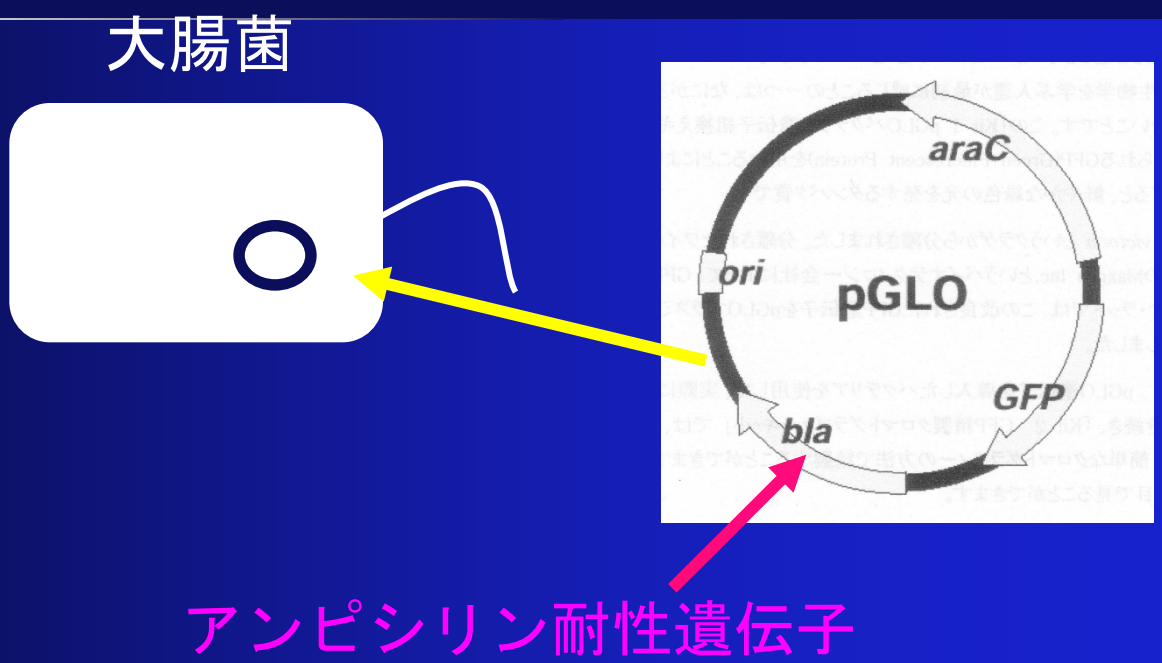
アンピシリン耐性遺伝子

大腸菌の形質転換とは（１）

大腸菌の性質が変化すること
抗生物質Ampがあっても生育できるように変化する

大腸菌の中にpGLOが入ると

プラスミドDNA上のアンピシリン耐性遺伝子が転写・翻訳され抗生物質アンピシリンがある培地でも生育できるようになる

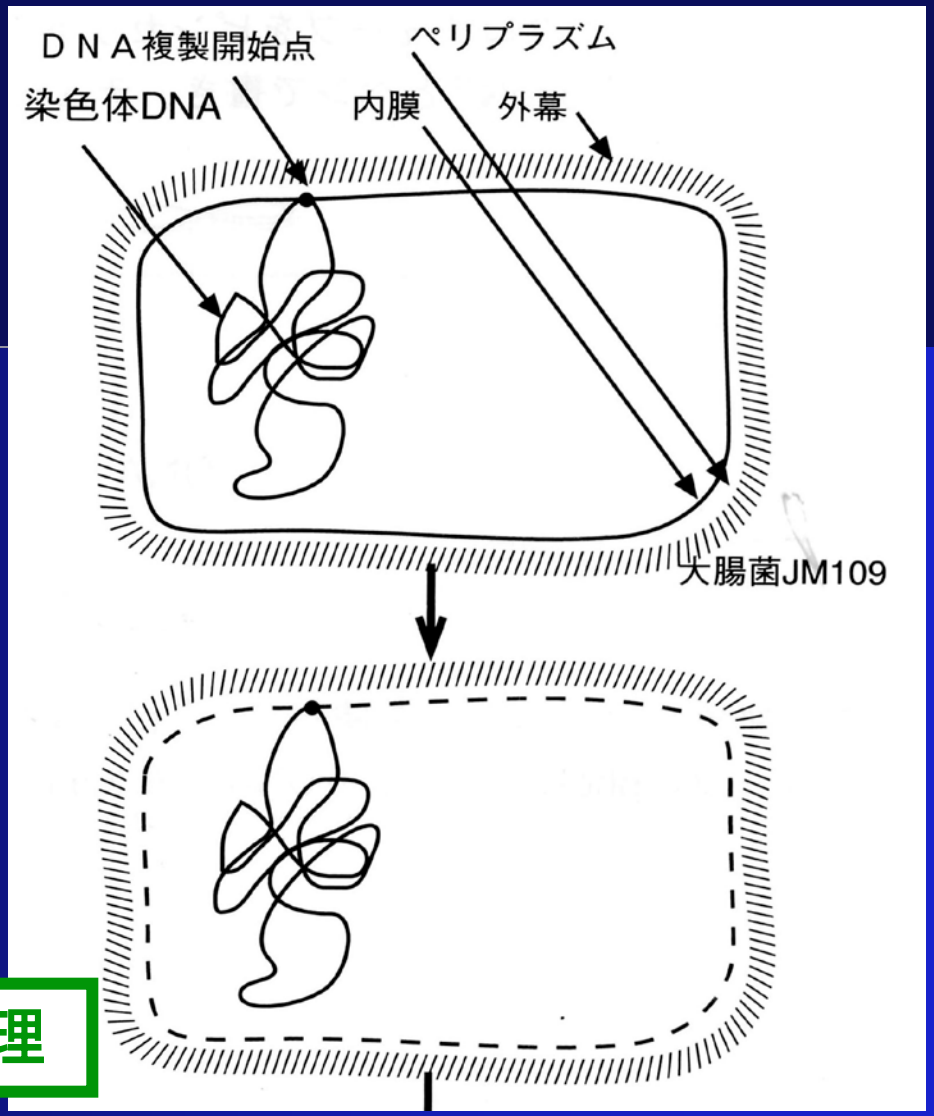


実験の流れ

(1) 大腸菌のコンピテントセルを作る

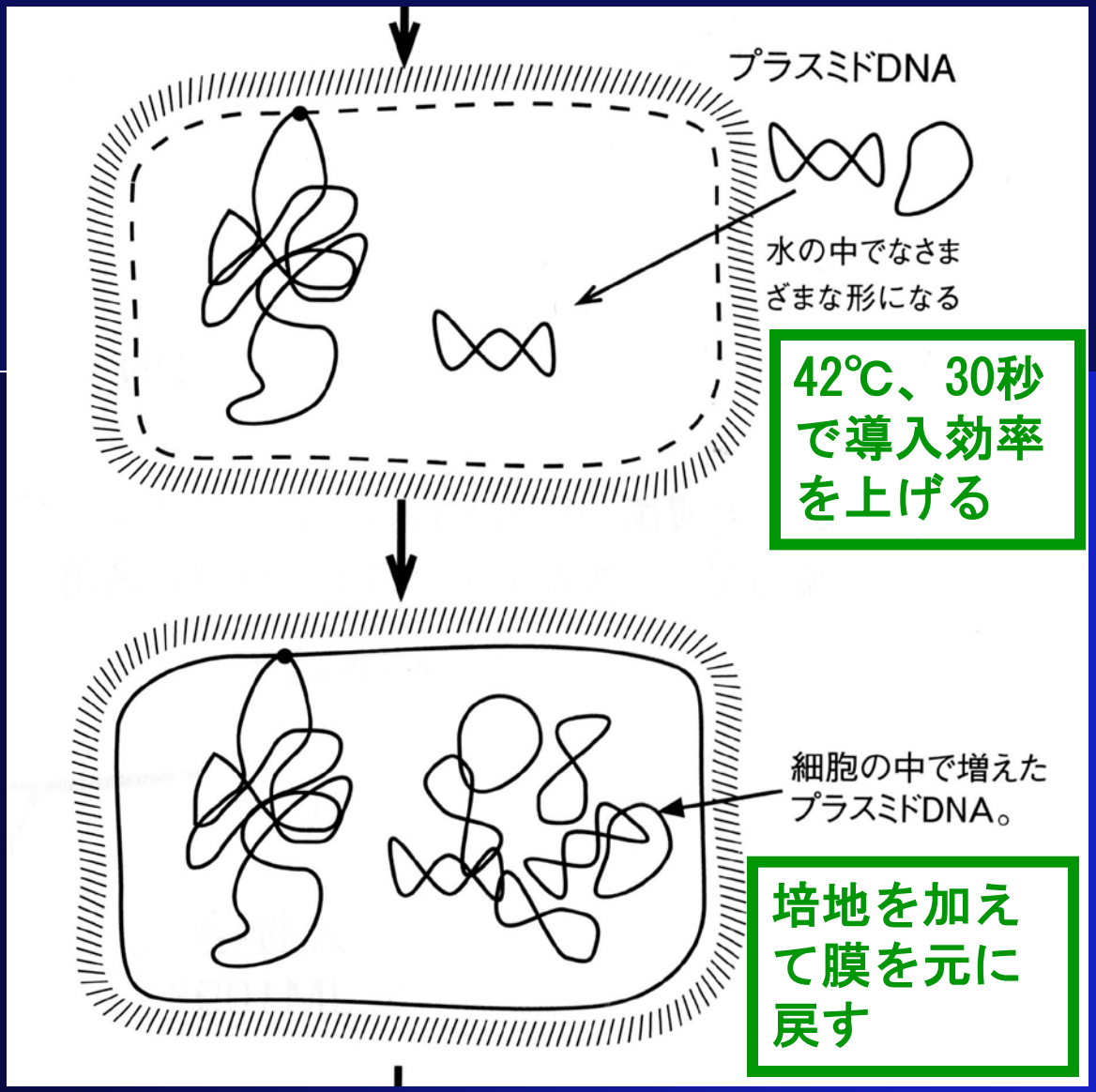
細胞膜の透過性を狂わせてプラスミドDNAを取り込みやすい状態にした細胞のこと

ここまでできています



カルシウムイオンで処理

(2) プラスミド DNA の導入



42℃、30秒で導入効率を上げる

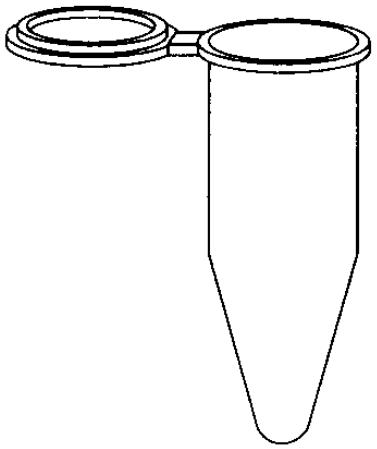
培地を加えて膜を元に戻す

(3) 形質転換した大腸菌がプレートにコロニーを形成

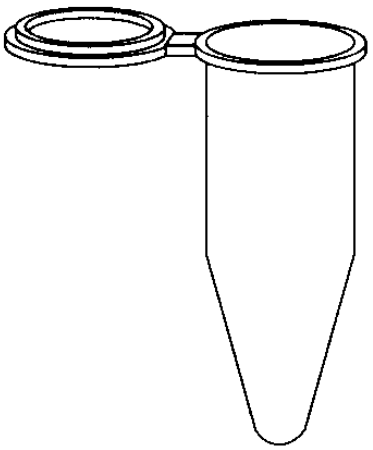
組換えDNAを使用する際の注意事項

(1) 実験の前後には、手指の消毒を行う
(2) 実験中は白衣を着用
(3) 組換え体の持ち出しをしないこと
(4) 実験器具は滅菌して廃棄すること

1. 1.5 mlのマイクロチューブにサンプル名と氏名を記入します



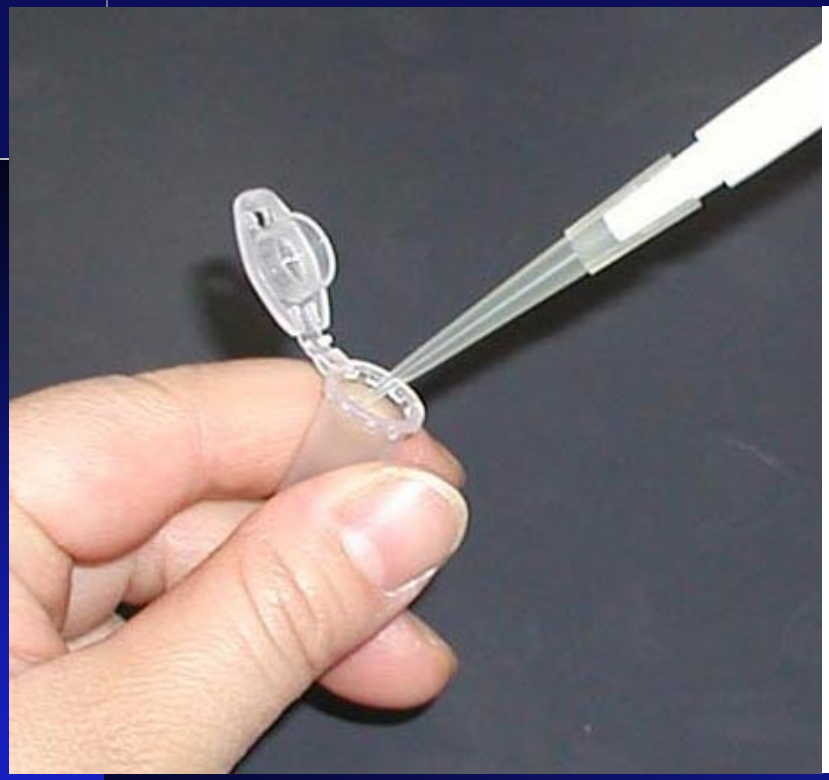
-DNA

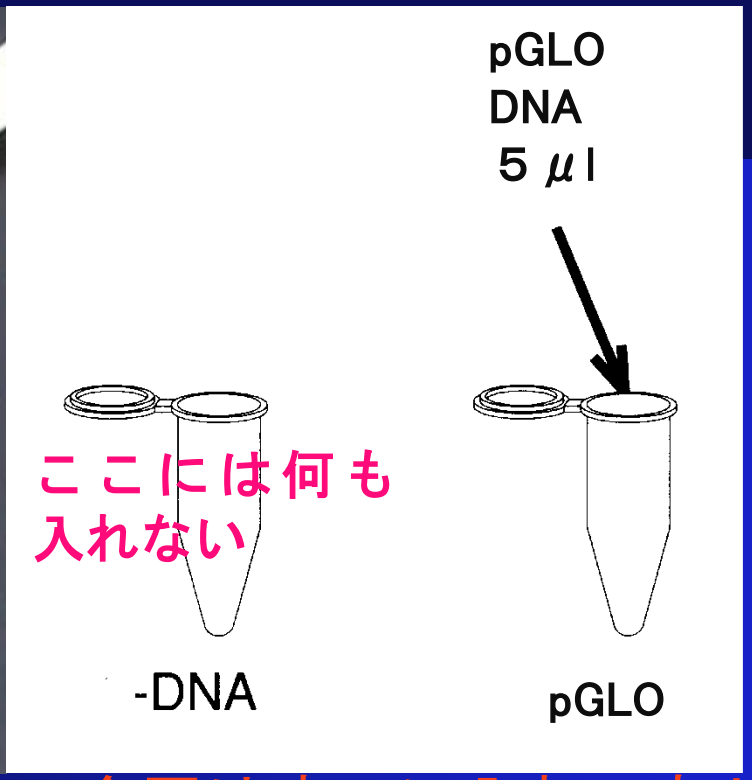


pGLO

マジックで記入します

2. マイクロピペットを使ってそれぞれのチューブにプラスミドDNA溶液を5μl入れます

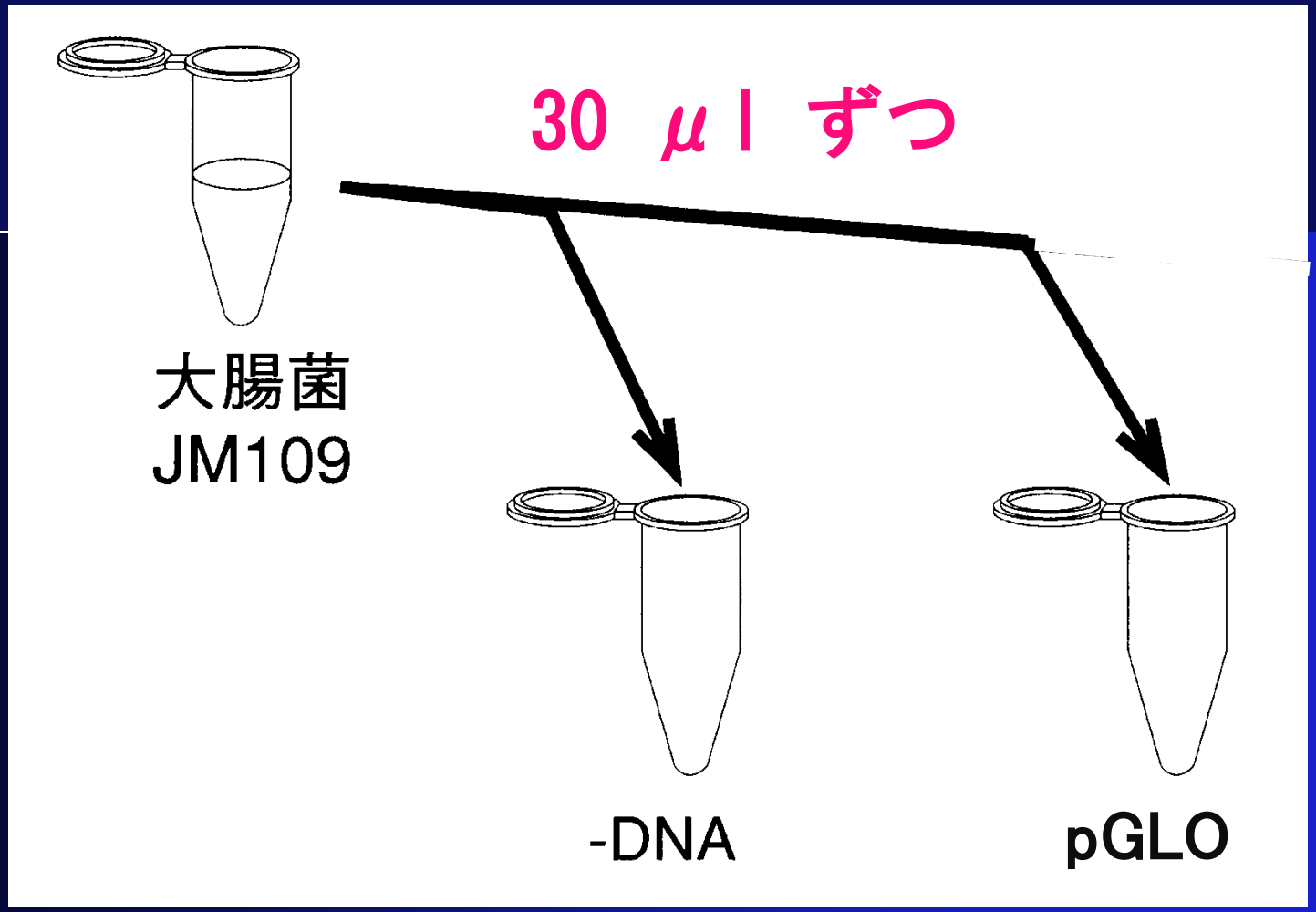




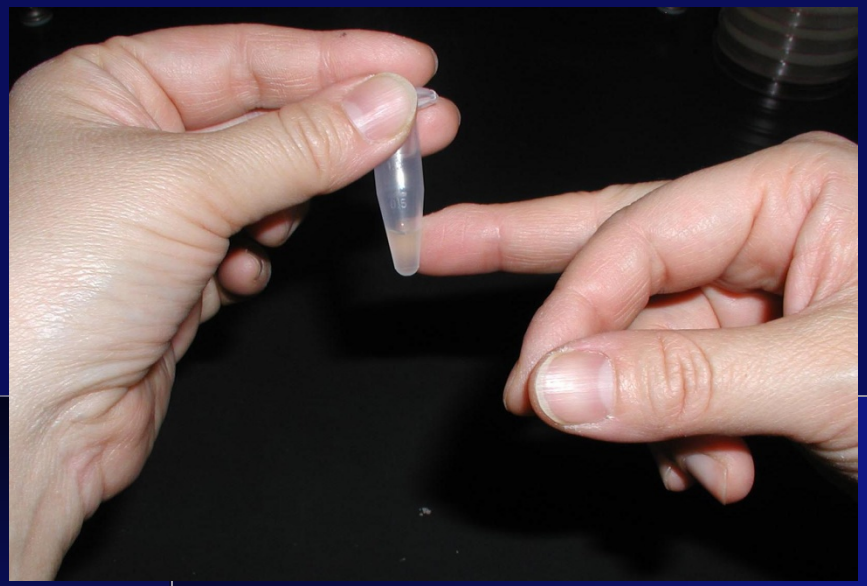
今回はすでに入れてあります。

3.　大腸菌JM109のコンピテンセルの入ったチューブを軽くタッピングします

4.　2本のマイクロチューブに大腸菌液を30μl ずつ分注します

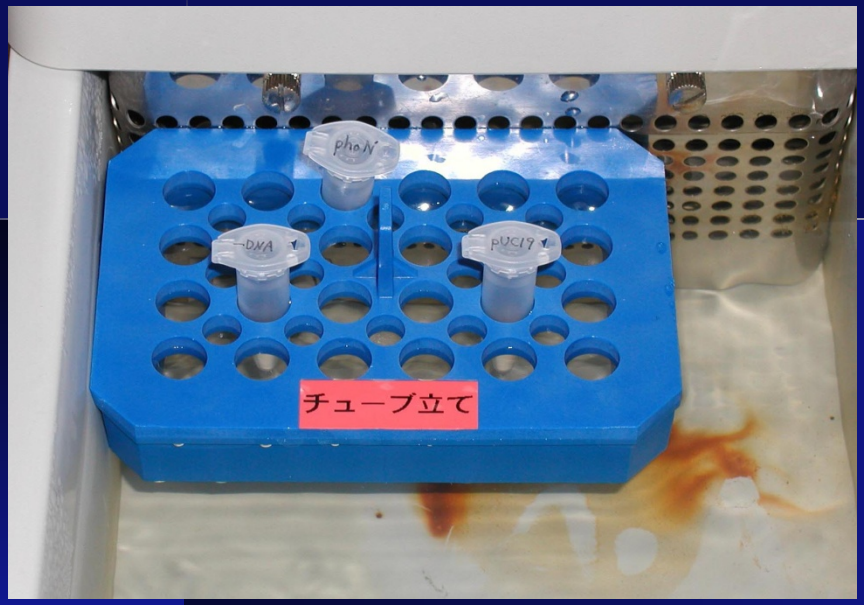


5. タッピング後、氷上に置きます



10分間以上

6. ヒートショック後、氷上に移します



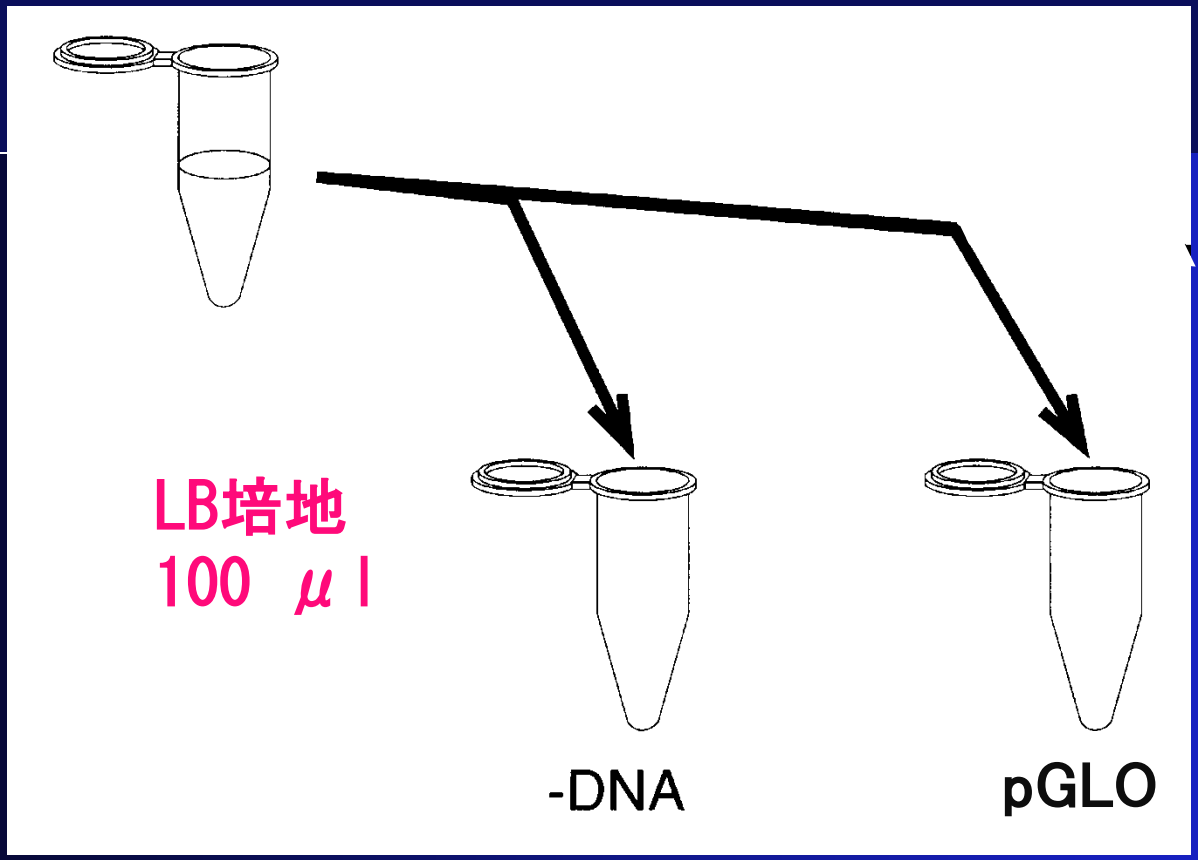
42℃、30秒

重要

→

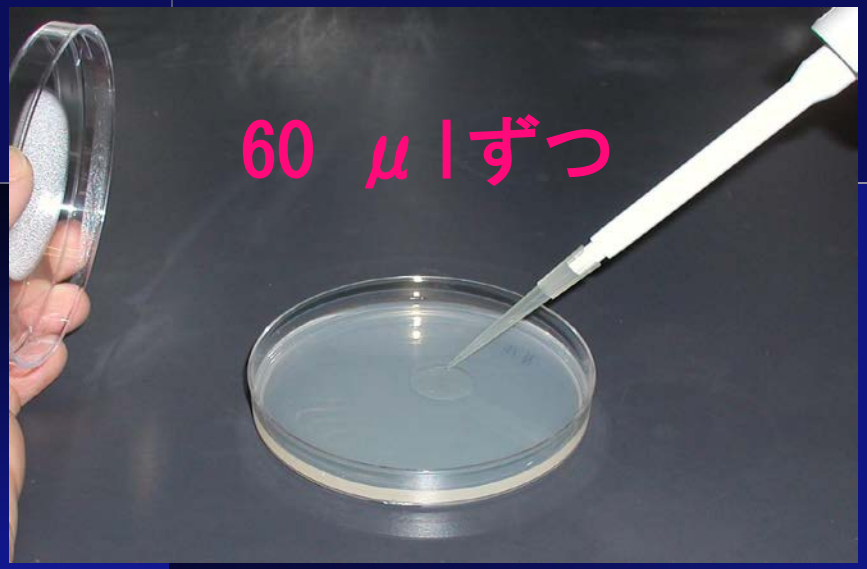
氷上2 分

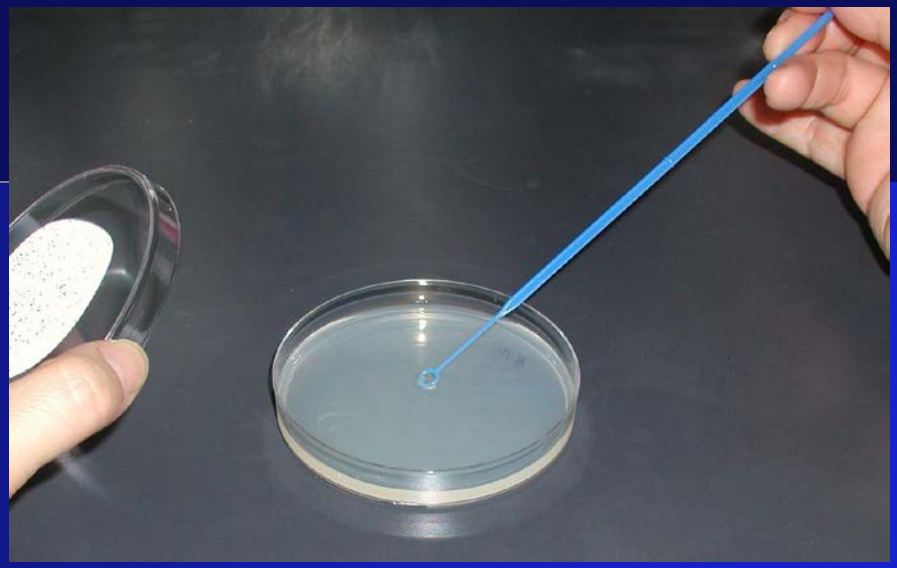
7. マイクロピペットを使ってLB培地を各チューブに100μlずつ加え、タッピングして溶液を混ぜます



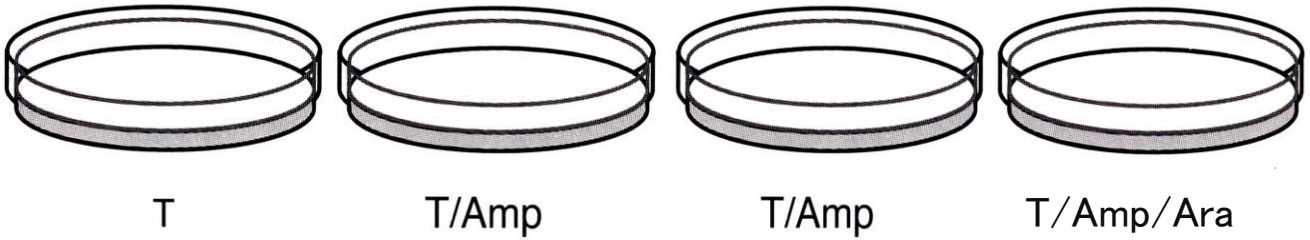
8. 各プレートにサンプルを60 μl滴下し、植付け用ループで広げます

培地に穴を開けないように
植付け用ループを斜めに！





4枚のプレート広げる



T	T/Amp	T/Amp	T/Amp/Ara
60μL	60μL	60μL	60μL

裏に必ず　−DNA,pGLO　T,T/Amp,T/Amp/Araを記入

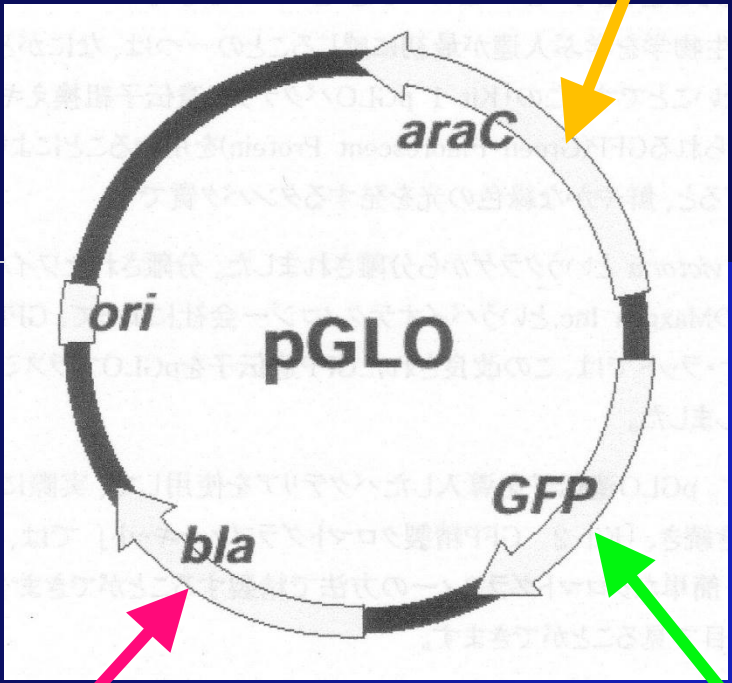
9. プレートを裏返し、 37℃で保温します

さあ、コロニーは出るかな？
明日、コロニーの数や色を観察しておきましょう！

復習

今回使用したプラスミド DNA

アラビノース分解酵素遺伝子



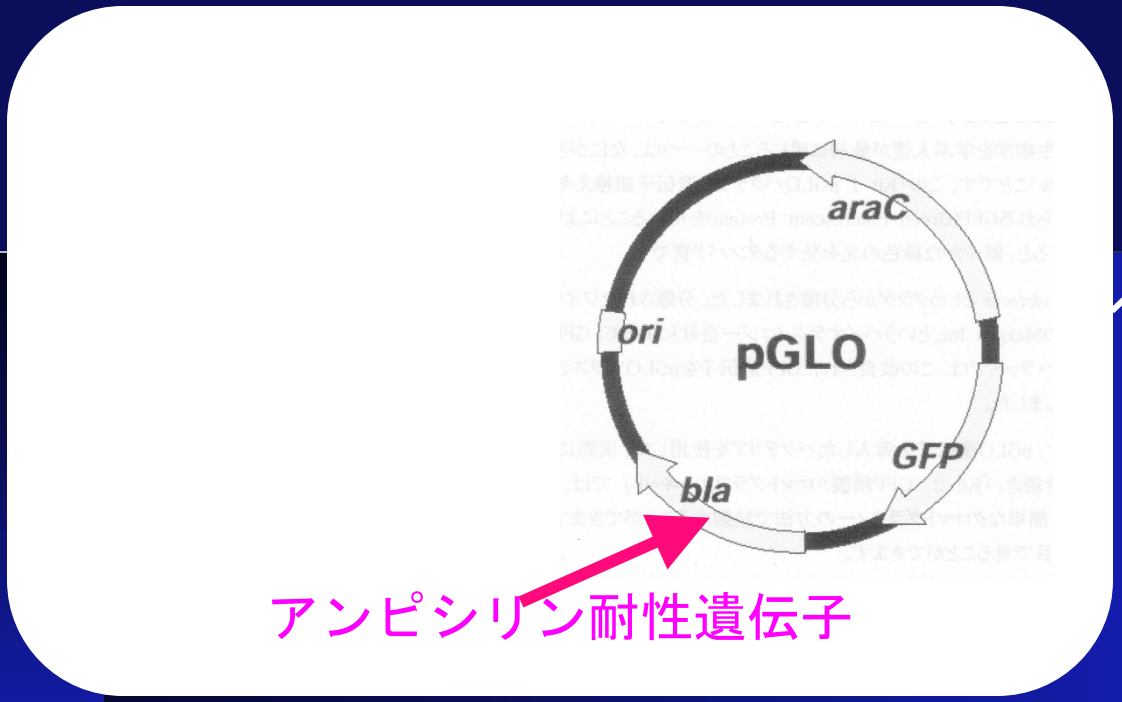
ＧＦＰ遺伝子

アンピシリン耐性遺伝子

形質転換してない大腸菌

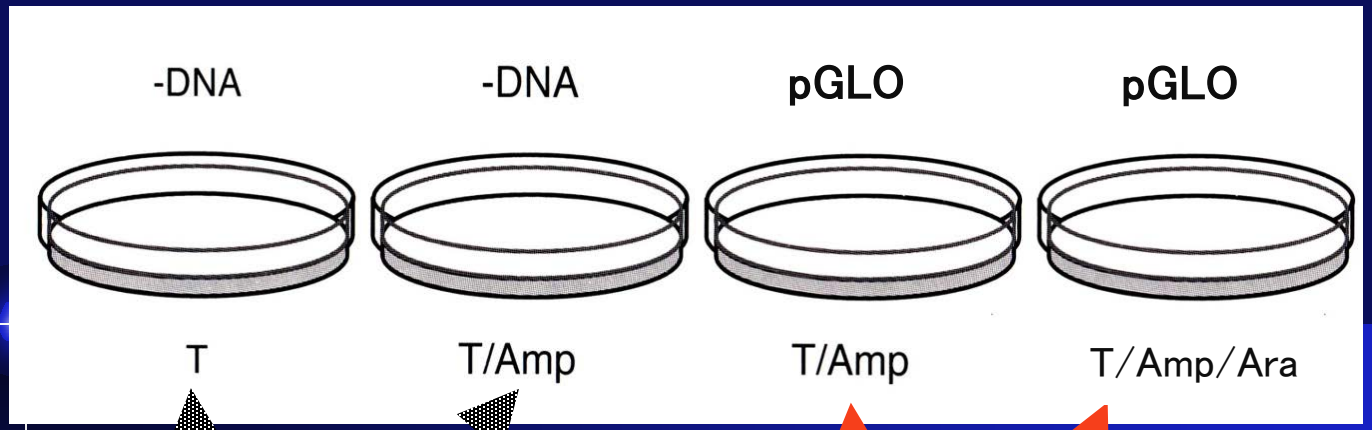
培地中にアンピシリンがあると生きられない

形質転換した大腸菌ーその１



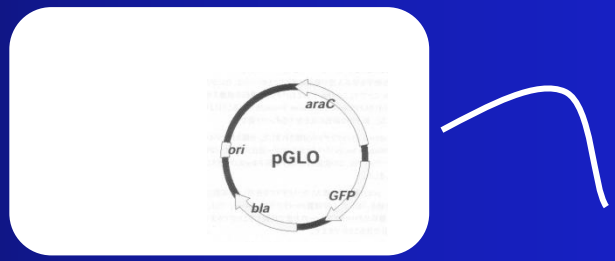
培地中にアンピシリンがあっても生きられるようになります

実験結果を予想してみよう
コロニーは出るか？　何色か？



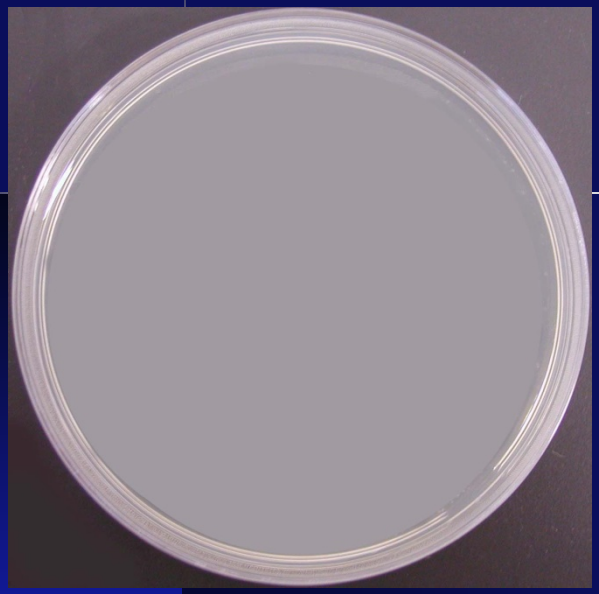
大腸菌

大腸菌とpGLO

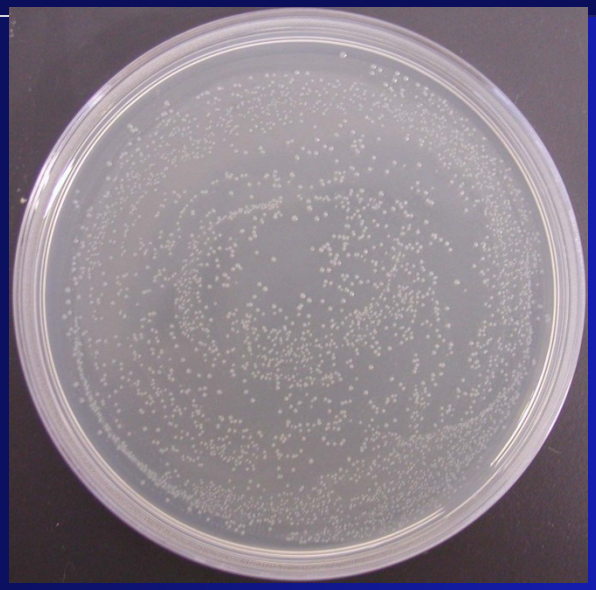
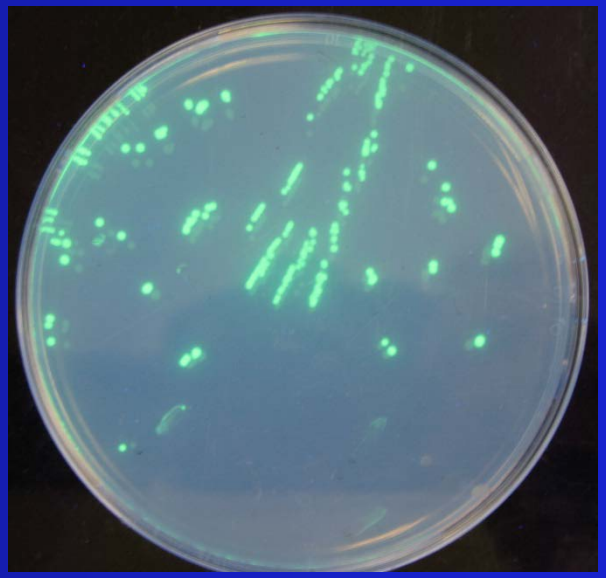


実験結果予想

コロニーでない



白色コロニー



紫外線露光で緑色
蛍光発色コロニー