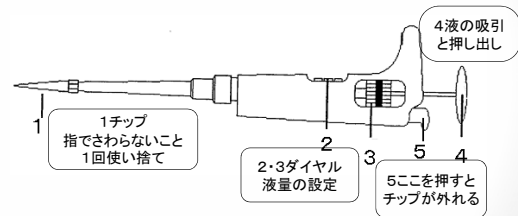


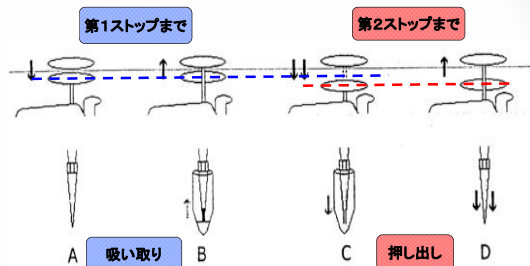
遺伝子を理解する分子生物学 実験実習会(基礎編)

マイクロピペットの使い方

- * 押し出しに2段階あることを確かめる。



マイクロピペットの使い方



課題1: マイクロピペットのメモリを $30\mu\text{L}$ [030]に合わせる。
第1ストップ 第2ストップの二段階の感覚をしっかりとつかむ。

実験の基本操作

- 課題2: イエローチップ(黄色)を装着
マイクロピペットを真上から垂直にチップに差し込む。
マイクロチューブに入った水を $30\mu\text{L}$ 吸う。
別のマイクロチューブに移す。
1回移したら、チップをゴミ箱捨てる。
- 課題3: さらに $30\mu\text{L}$ を2回移す。
チューブ内の水を合計 $90\mu\text{L}$ とする。
メモリを $90\mu\text{L}$ [090]に合わせる。
チューブに入った $90\mu\text{L}$ の水を全て吸って戻す。
- 課題4: タッピング
指先でチューブをはじきマイクロチューブ内の溶液を混ぜる。
混ぜた後、チューブを振って溶液をチューブの底に落とす。

細菌を用いた形質転換実験 Protocol (プロトコル)

目的:

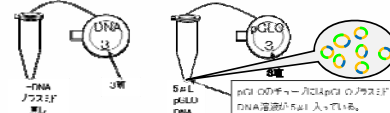
大腸菌(細菌)に緑色に光るタンパク質
をつくる遺伝子(GFP遺伝子)を導入して、
大腸菌の性質(形質)を緑色に光るよう
に変化(転換)させる。



大腸菌の形質転換実験

チューブに大腸菌を入れる

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。



pGLOのチューブにはpGLOプラスミドDNA溶液が $5\mu\text{L}$ 入っている。

チューブに大腸菌を入れる

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30μL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。

GFP遺伝子

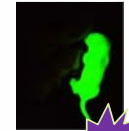
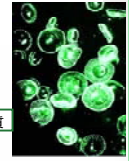
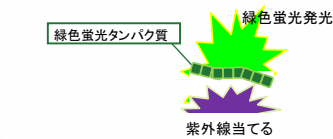
オワンクラゲの持つ蛍光タンパク質をつくる遺伝子からできるタンパク質

「緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP)」

GFP遺伝子 転写 緑色蛍光タンパク質



紫外線が当たると緑色に光る

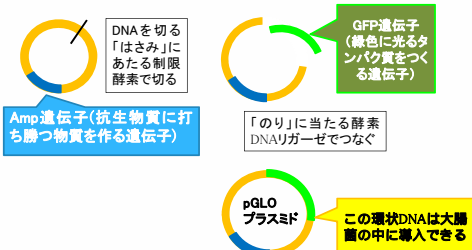


紫外線当てる

実験の原理 1

遺伝子 (GFP遺伝子) を導入するための準備

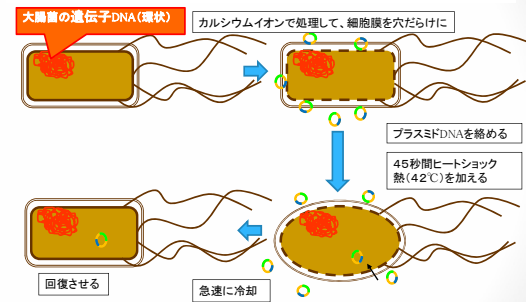
大腸菌の細胞内にGFP遺伝子を入れるにはプラスミドを使う。



今回使うプラスミド pGLO は遺伝子組換えによりできた“組換えDNA”です。

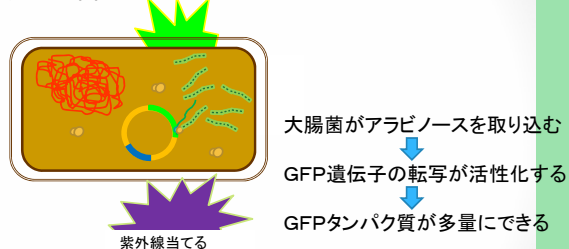
実験の原理 2

大腸菌にプラスミドDNAを入れるには



実験の原理 3

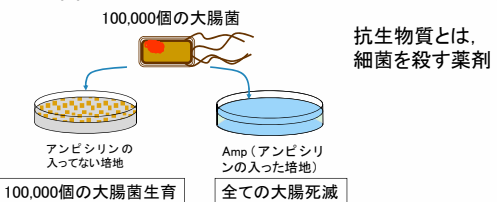
プラスミドDNAが導入された大腸菌が緑色に光る理由



実験の原理4 GFP遺伝子の転写に必要なもの
培地にアラビノースという糖が必要

実験の原理 5

抗生物質アンピシリン耐性をもつ遺伝子を入れる理由

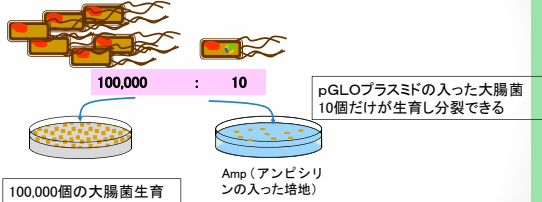


アンピシリンのある培地では、大腸菌は細菌なので生育できません。

実験の原理 5

抗生物質アンピシリン耐性をもつ遺伝子を入れる理由

例えば100,000個の大腸菌のうち、10個だけにpGLOプラスミドが導入されたとする

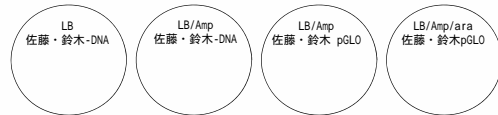


LBプレート 1枚

LB/Ampプレート 2枚

LB/Amp/araプレート 1枚

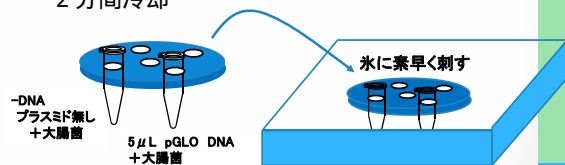
マジックで裏にプレートの種類、実験者名、どんな大腸菌を入れたか(-DNA, pGLO)を小さく書く。



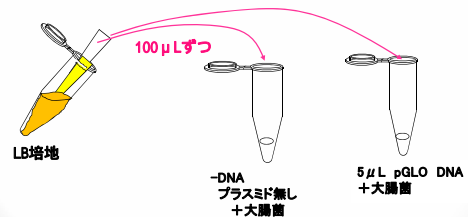
6 ヒートショック（熱を加える）を行う。
42 のホットバスに45秒間入れる。

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

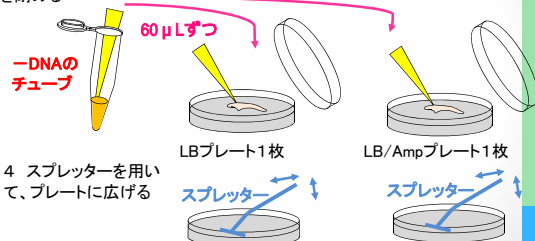


8 チューブのフタを開け、マイクロピペットを使って2本のチューブにLB培地を100 µLずつ入れ、フタを閉める。

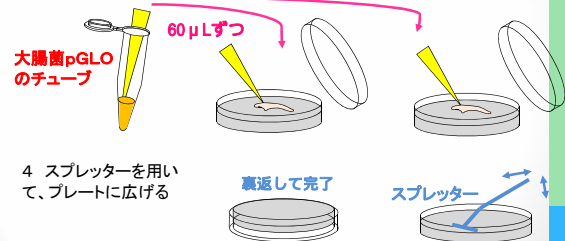


大腸菌をプレートに広げて形質転換実験の結果を確かめる

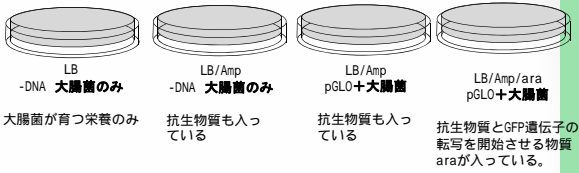
- 1 LBプレート1枚、LB/Ampプレート1枚の計2枚と大腸菌-DNAのチューブ
- 2 チューブを軽くタッピングして溶液を混ぜる
- 3 サンプルを60 µL吸い取り、フタを開けそれぞれのプレートに滴下してフタを閉める



- 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
- 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 µL吸い取り、フタを開けそれぞれのプレートに滴下してフタを閉める



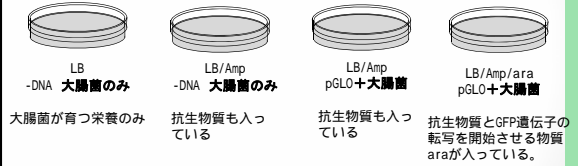
7 4枚のプレートに大腸菌のサンプルを広げたら、プレートを裏返しにして積み上げテープでくくり、班の名前を書いて37°Cのインキュベーター入れ翌日まで培養する。



8 使用した、チューブ、チップ、スプレッターなどは、オートクレーブ(120°C 20分)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”
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

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。



○形質転換実験結果の予想に書き込もう

