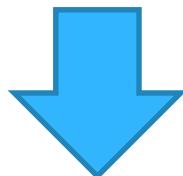


遺伝子を理解する分子生物学 実験実習会(基礎編)

細菌を用いた形質転換実験 Protocol (プロトコル)

目的:

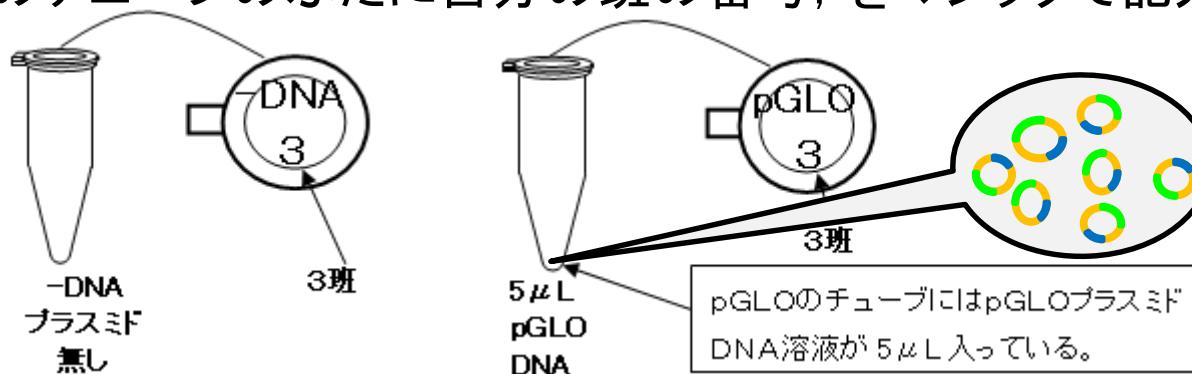
大腸菌(細菌)に緑色に光るタンパク質をつくる遺伝子(GFP遺伝子)を導入して、大腸菌の性質(形質)を緑色に光るように変化(転換)させる。



大腸菌の**形質転換**実験

チューブに大腸菌を入れる

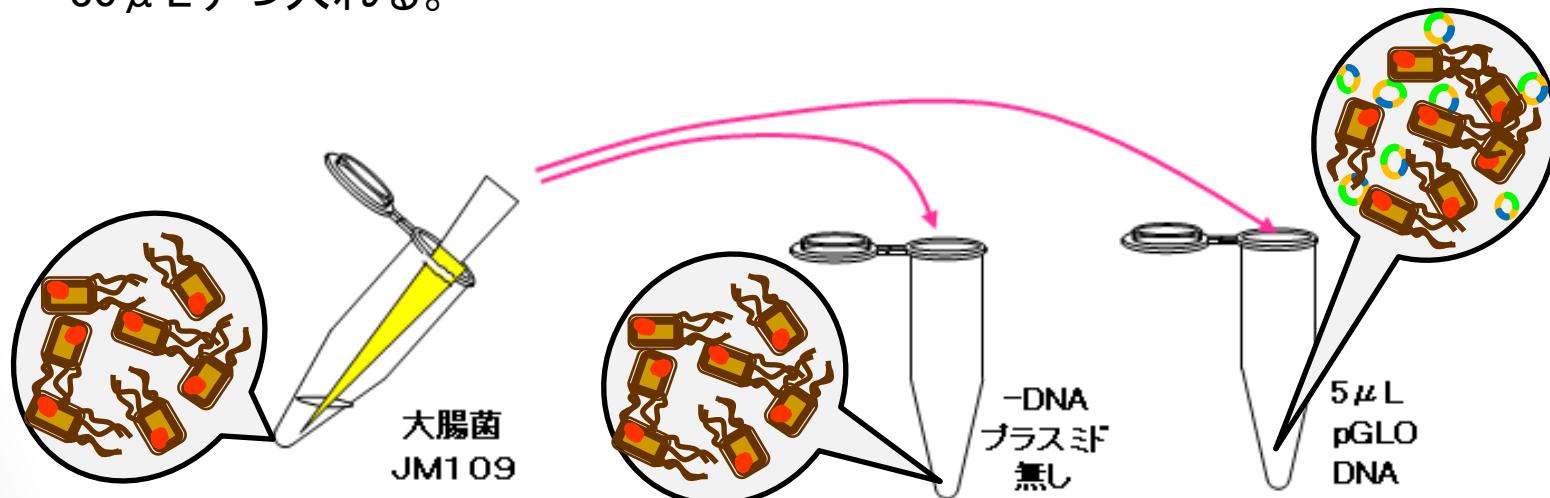
- 1 LB培地(黄色い液体)の入ったマイクロチューブ1本,
pGLOと記載のあるチューブ1本・何も記載の無いチューブ1本を確認。
記載のないチューブのふたに-DNA(マイナスDNA)と自分の班の番号を
マジックで記入。
- pGLOのチューブのふたに自分の班の番号, をマジックで記入。



pGLOのチューブにはpGLOプラスミドDNA溶液が5 μ 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 $30\mu\text{L}$ ずつ入れる。



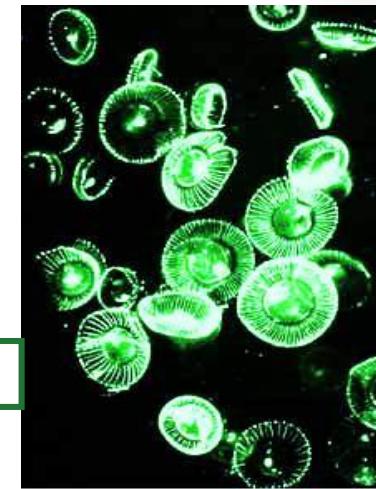
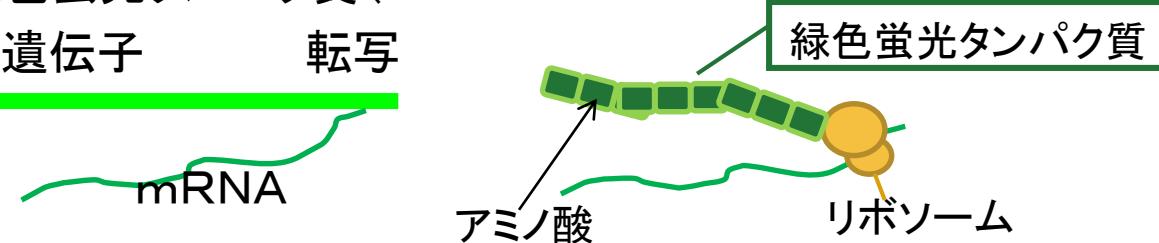
- 4 マイクロチューブのフタを閉め、チューブの底を軽くタッピングし溶液を混ぜる。
- 5 チューブを氷に刺す。20分間置く。

GFP遺伝子

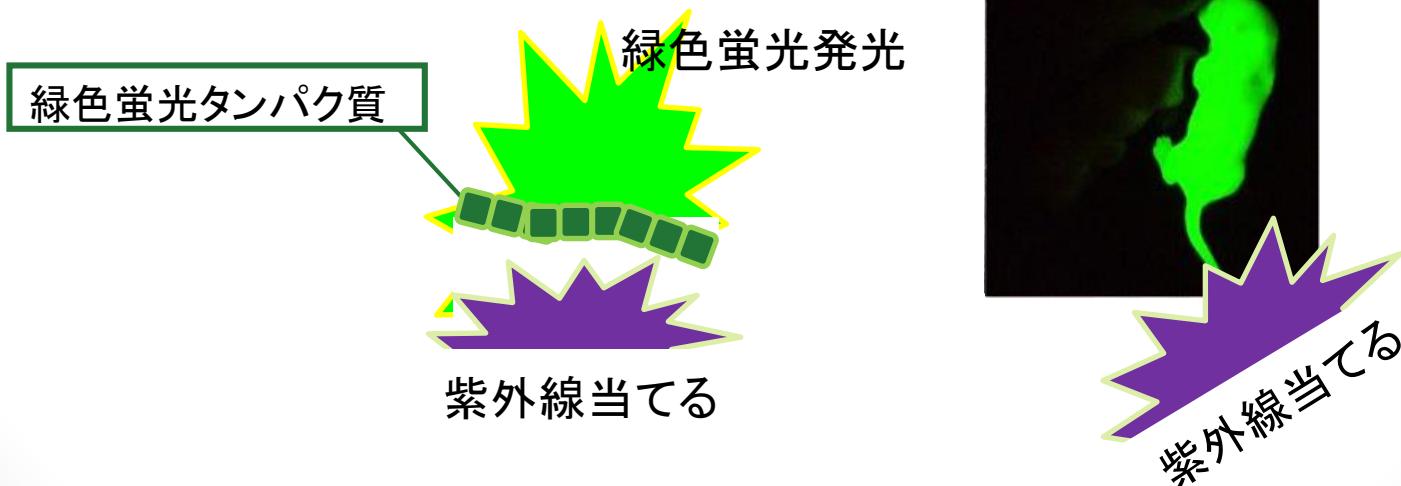
オワンクラゲの持つ蛍光タンパク質をつくる遺伝子からできるタンパク質

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

GFP遺伝子 転写



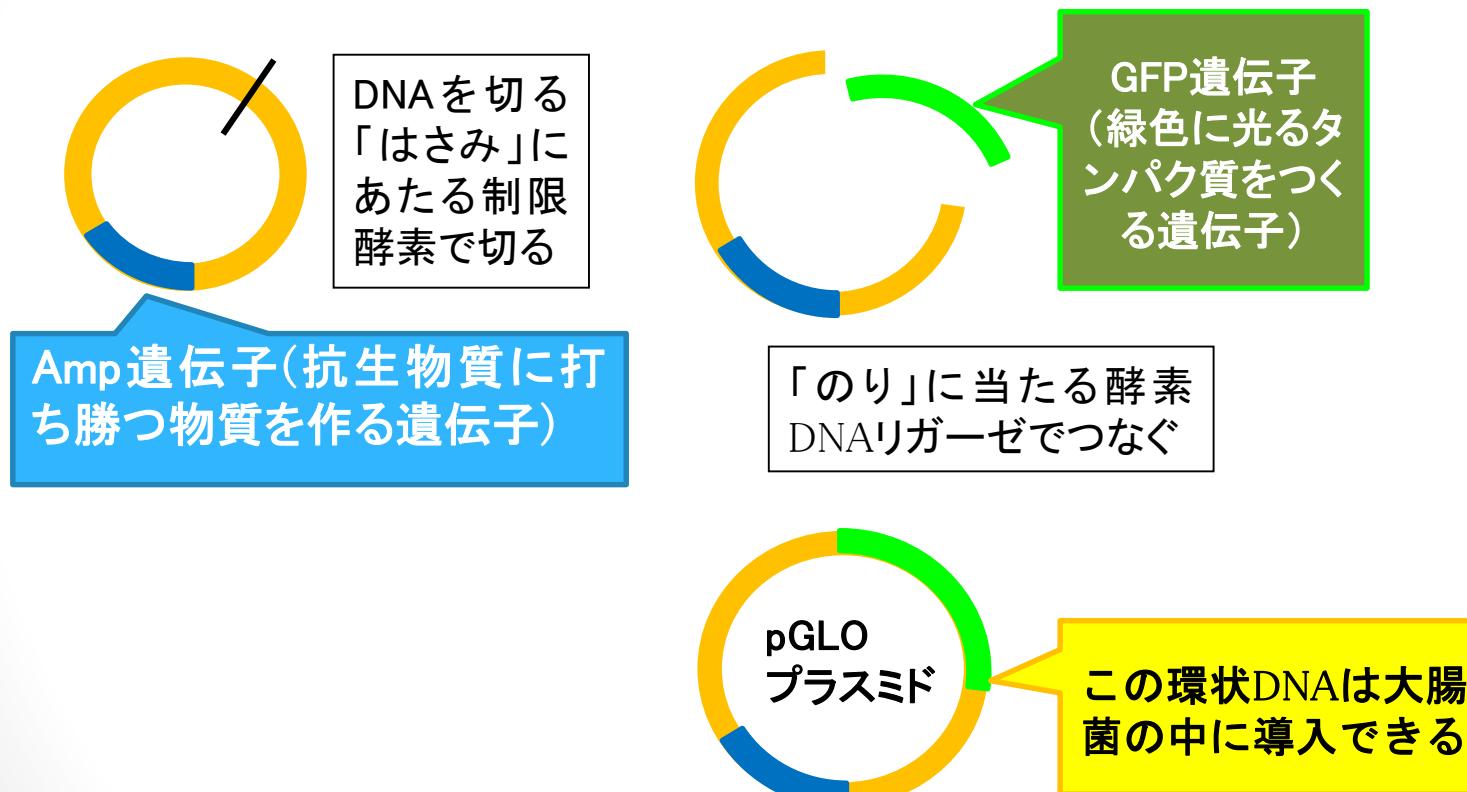
紫外線が当たると緑色に光る



実験の原理 1

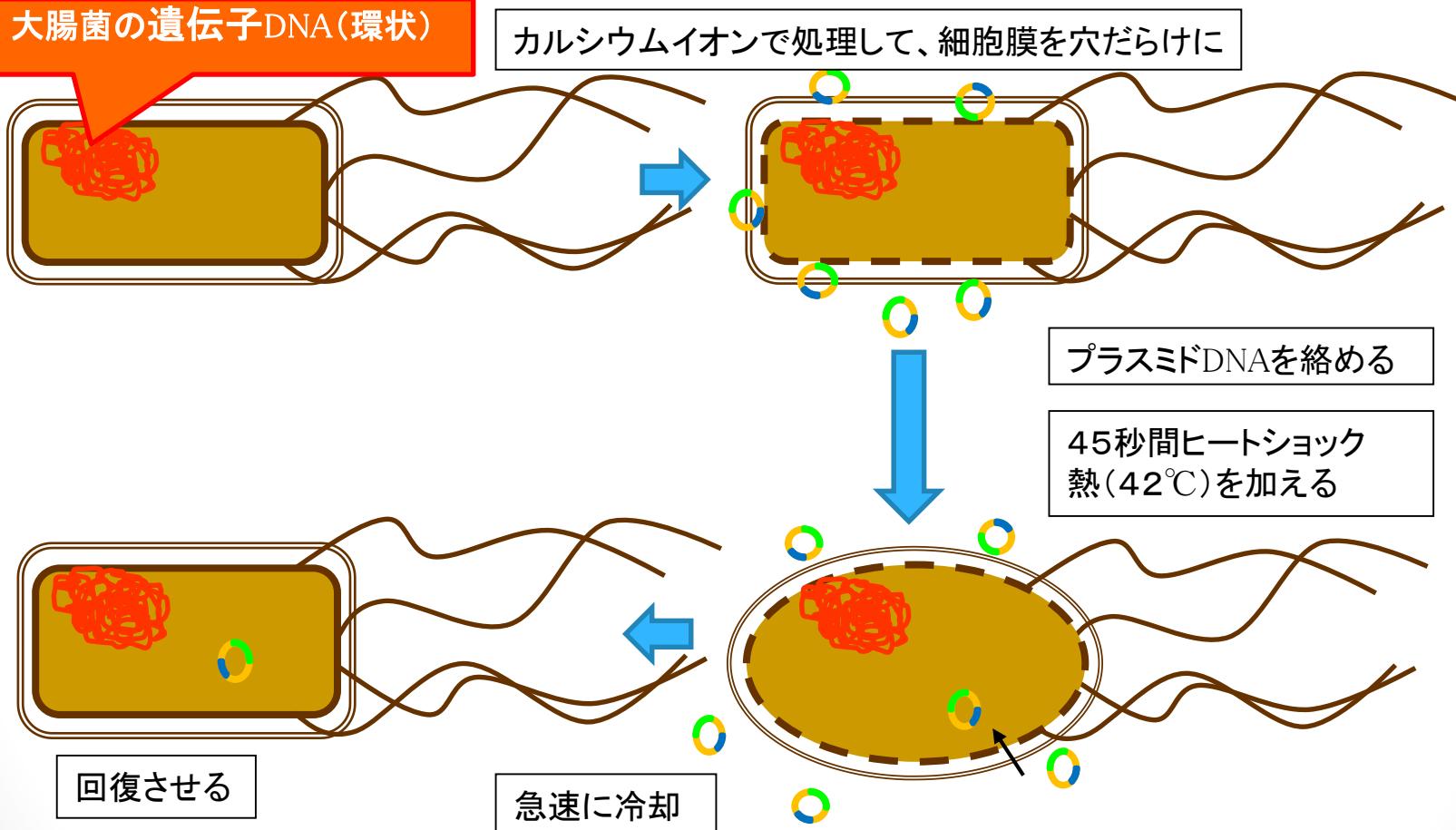
遺伝子（GFP遺伝子）を導入するための準備

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。

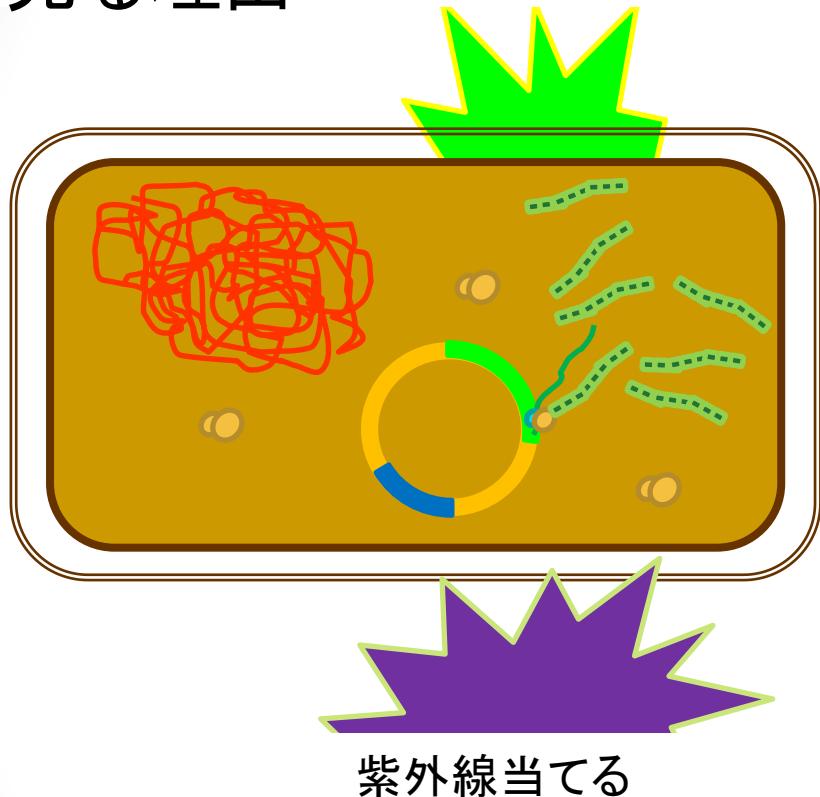
実験の原理 2 大腸菌にプラスミドDNAを入れるには



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

緑色蛍光発光



大腸菌がアラビノースを取り込む

GFP遺伝子の転写が活性化する

GFPタンパク質が多量にできる

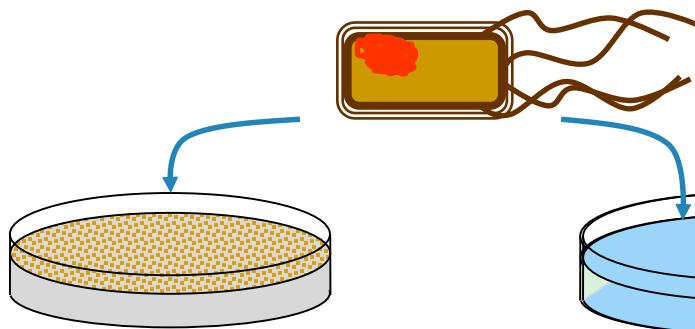
実験の原理4 GFP遺伝子の転写に必要なもの

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

100,000個の大腸菌



アンピシリンの
入ってない培地

100,000個の大腸菌生育

抗生物質とは、
細菌を殺す薬剤

Amp (アンピシリ
ンの入った培地)

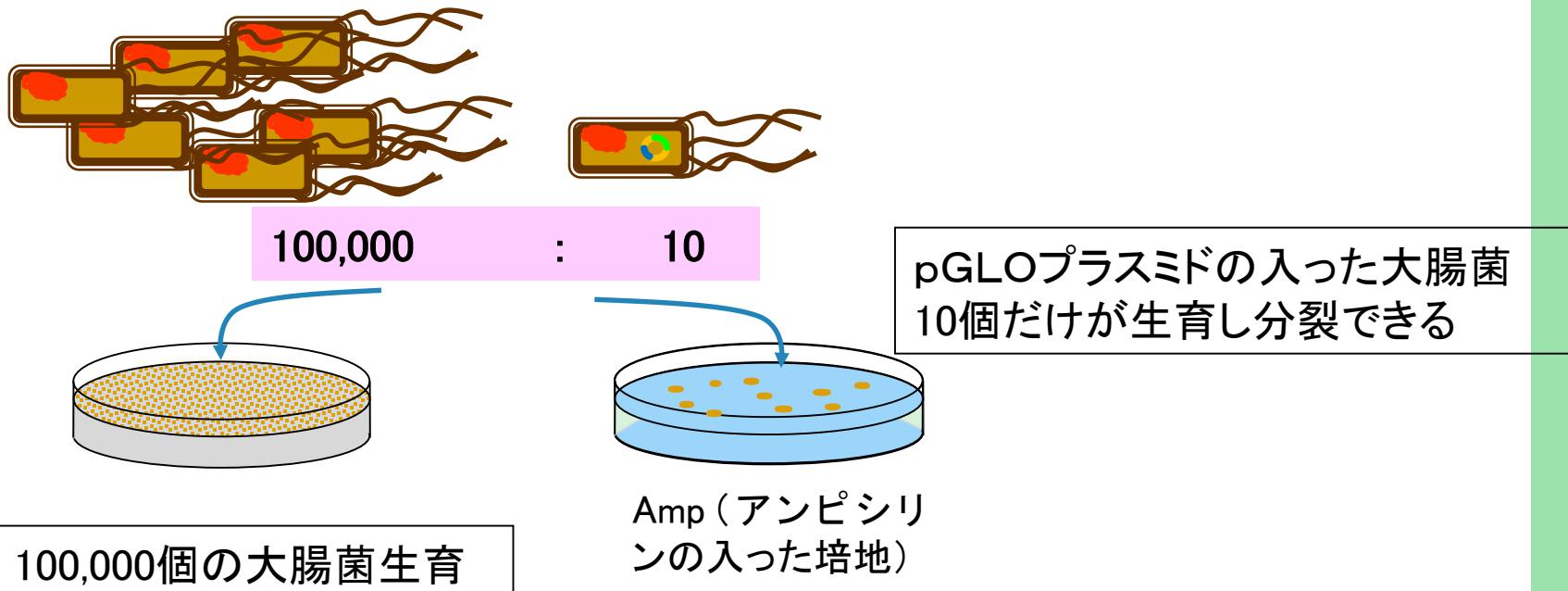
全ての大腸死滅

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

抗生素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。

LB
佐藤・鈴木-DNA

LB/Amp
佐藤・鈴木-DNA

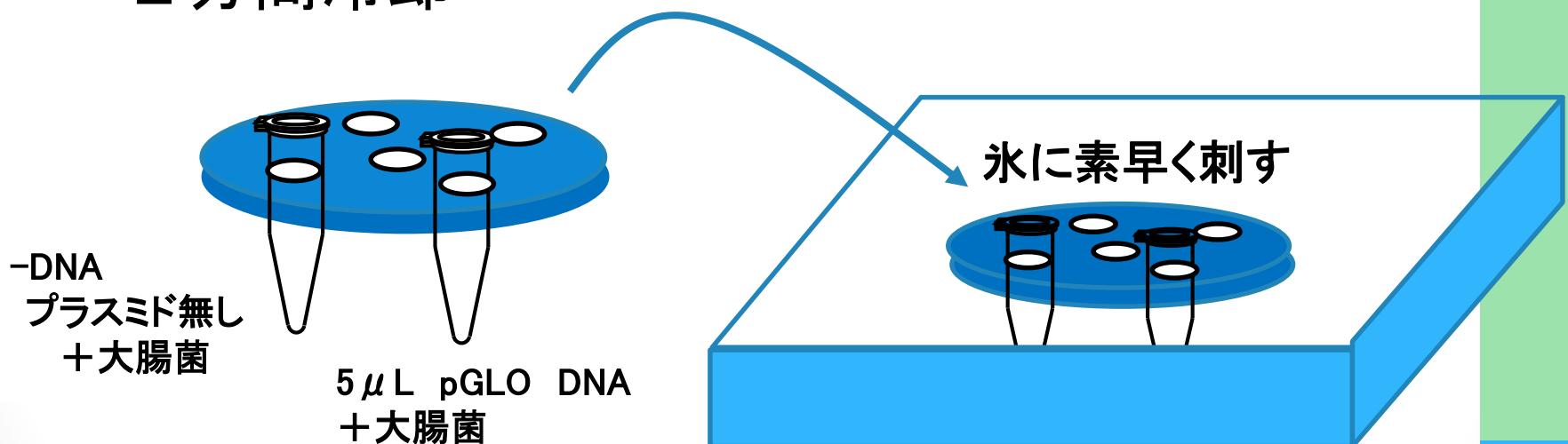
LB/Amp
佐藤・鈴木 pGLO

LB/Amp/ara
佐藤・鈴木pGLO

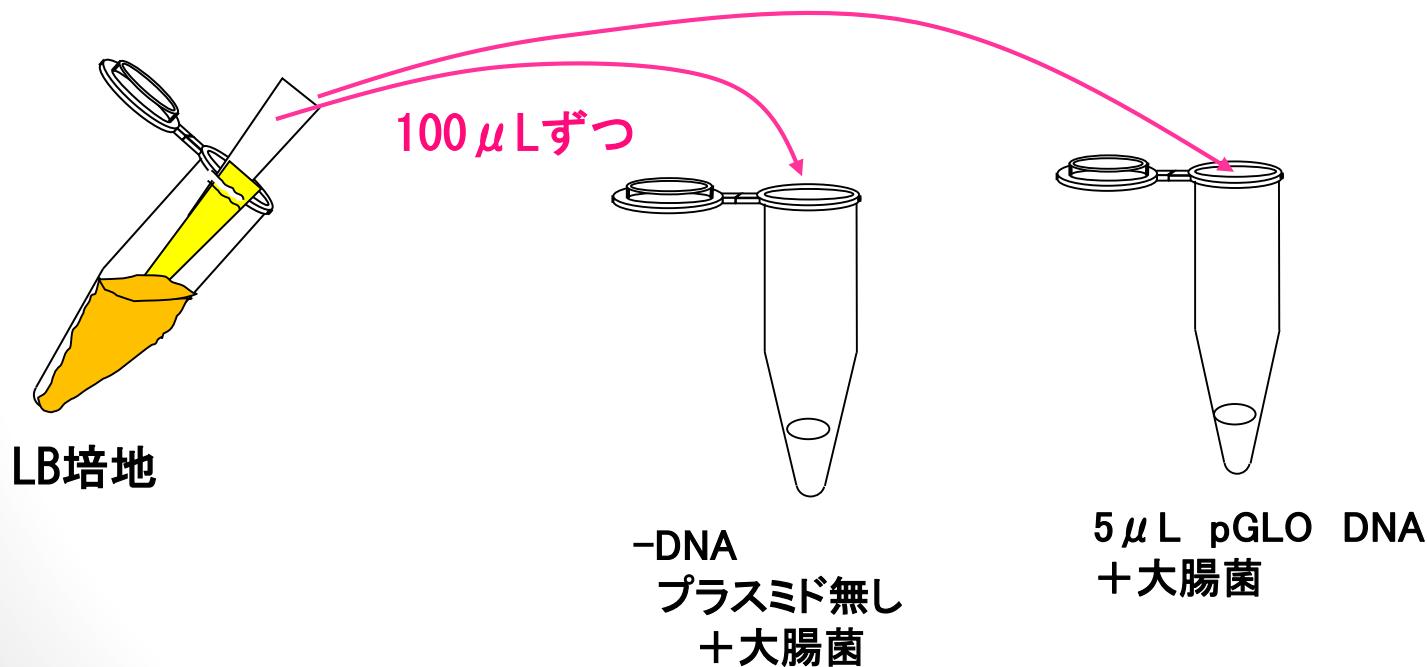
- 6 ヒートショック（熱を加える）を行う。
42°Cのホットバスに45秒間入れる。

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

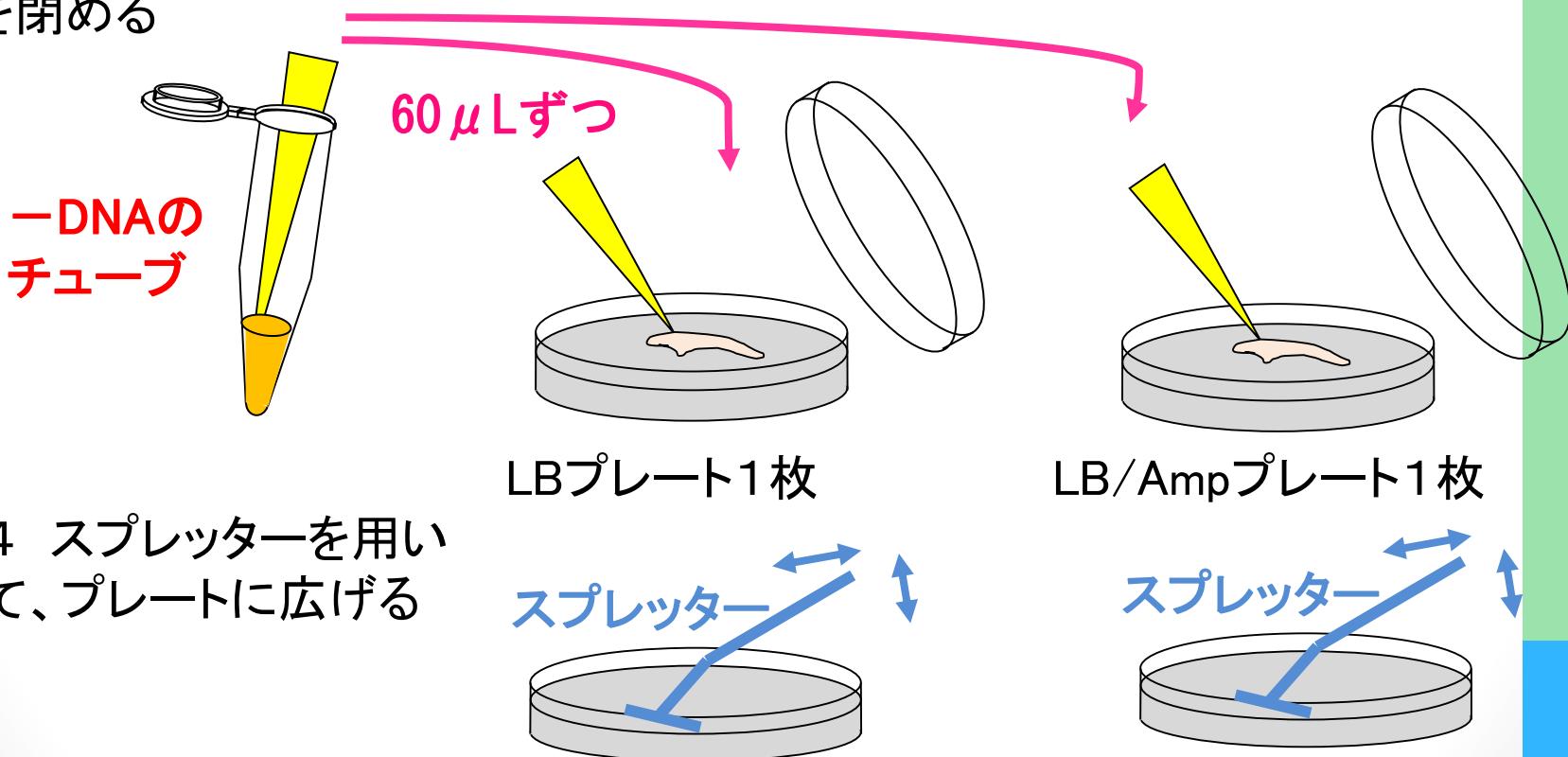


8 チューブのフタを開け、マイクロピペットを使って2本のチューブにLB培地を $100\mu\text{L}$ ずつ入れ、フタを閉める。



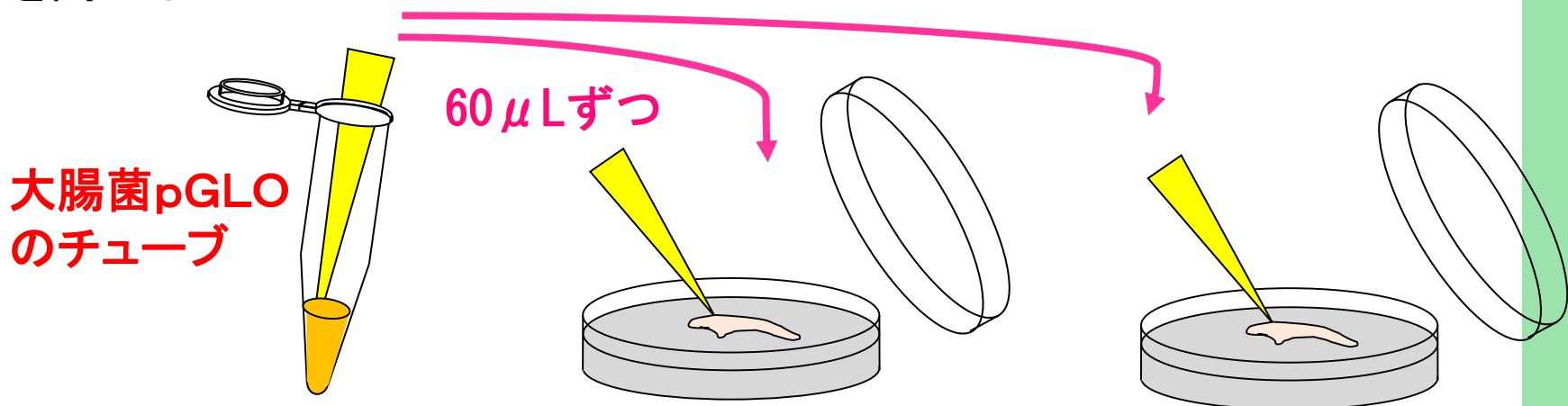
大腸菌をプレートに広げて形質転換実験の結果を確かめる

- 1 LBプレート1枚、LB/Ampプレート1枚 の計2枚と大腸菌ー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 $60\mu\text{L}$ 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



- 4 スプレッターを用いて、プレートに広げる

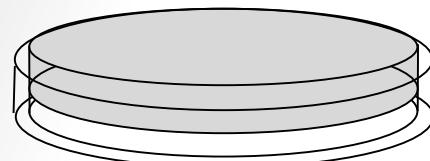
- 5 LB/Ampプレート 1枚 LB/Amp/araプレート 1枚の計2枚と大腸菌pGLOのチューブ
- 2 チューブを軽くタッピングして溶液を混ぜる
- 3 サンプルを $60\mu\text{L}$ 吸い取り、フタを開けそれぞれのプレートに滴下してフタを閉める



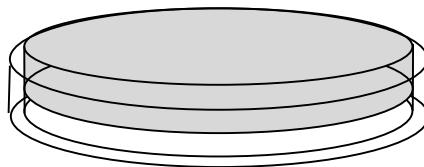
- 4 スプレッターを用いて、プレートに広げる



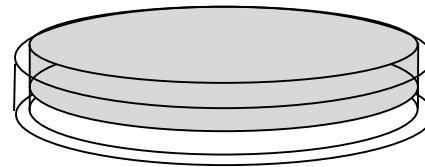
7 4枚のプレートに大腸菌のサンプルを広げたら、プレートを裏返しにして積み上げテープでくくり、班の名前を書いて37°Cのインキュベーターに入れ翌日まで培養する。



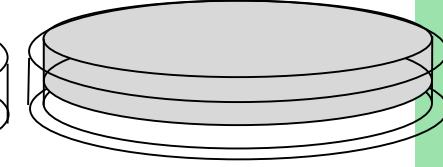
LB
-DNA 大腸菌のみ



LB/Amp
-DNA 大腸菌のみ



LB/Amp
pGLO+大腸菌



LB/Amp/ara
pGLO+大腸菌

大腸菌が育つ栄養のみ

抗生素質も入っている

抗生素質も入っている

抗生素質とGFP遺伝子の
転写を開始させる物質
araが入っている。

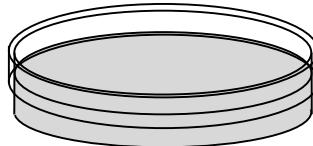
8 使用した、チューブ、チップ、スプレッターなどは、オートクレーブ(120°C 20分)で滅菌処理する。

実験により遺伝子を導入した大腸菌は“組換え体”

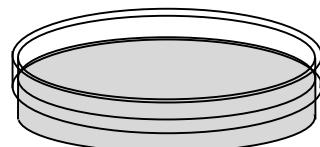
実験室から持ち出したり、ゴミ箱にそのまま捨てて実験室外で生育したりしないように処理する必要があり

細菌を用いた形質転換実験 結果予想と実験結果

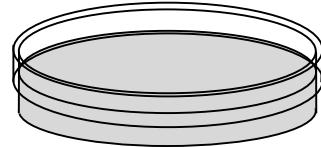
目的:大腸菌(細菌)に緑色に光るタンパク質をつくる遺伝子(GFP遺伝子)を導入して、大腸菌の性質(形質)を緑色に光るように変化(転換)させる。



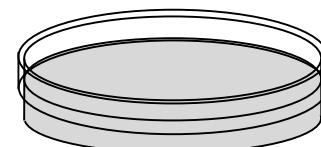
LB
-DNA 大腸菌のみ



LB/Amp
-DNA 大腸菌のみ



LB/Amp
pGLO+大腸菌



LB/Amp/ara
pGLO+大腸菌

大腸菌が育つ栄養のみ

抗生素質も入っている

抗生素質も入っている

抗生素質とGFP遺伝子の転写を開始させる物質araが入っている。

○形質転換実験結果の予想に書き込もう

