

高校分子生物学実験① 形質転換実験 プロトコール

【材料】

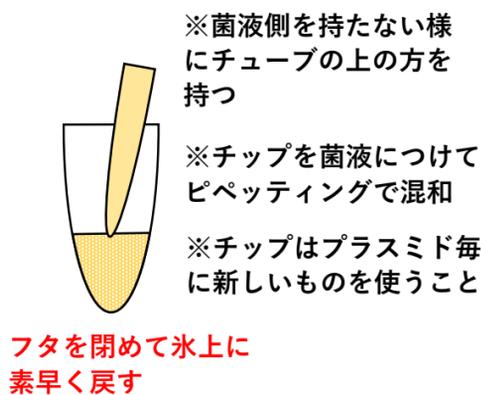
- ・ プラスミド4種類 (GFP、CFP、YFP、DsRed遺伝子をコードした発現プラスミド)
- ・ コンピテントセル (BL21(DE3) Rosetta株) 50 μ L \times 6本
- ・ LB液体培地
- ・ LB・カナマイシン寒天培地
- ・ 1 mol/L IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)

GFP : Green Fluorescent Protein
 CFP : Cyan
 YFP : Yellow
 DsRed : サンゴの一種である *Discosoma*由来の蛍光タンパク質

↓ コンピテントセルにプラスミド溶液を1 μ L入れる

- ① コンピテントセルのみ (何も入れない)
- ② コンピテントセル + GFP
- ③ コンピテントセル + GFP
- ④ コンピテントセル + CFP
- ⑤ コンピテントセル + YFP
- ⑥ コンピテントセル + DsRed

GFPを2つ作る



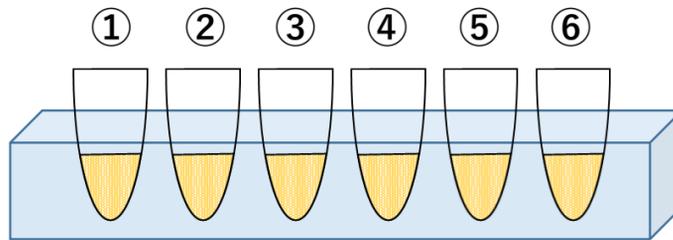
・ コンピテント (competent) とはプラスミドを導入できる能力を有する、と考える。プラスミドを取り込みやすい様に前処理を行って弱らせてあるので、くれぐれも手で温めてしまわない様にする (形質転換効率が激減します)。

・ IPTGは *lac* オペロンに対する誘導物質であり、*lac* オペロン産物である β ガラクトシダーゼの基質にはならないため、持続的に *lac* オペロンをオンにできる。

・ カナマイシンは選択マーカーとして使用。カナマイシンはアミノグリコシド系抗生物質であり、原核型のリボソーム (30Sにある16S rRNA) に作用することで、翻訳を阻害する。発現プラスミド上に目的遺伝子だけではなくカナマイシン耐性遺伝子も搭載しているため、「発現プラスミドが入ったのであれば、カナマイシンが入った培地でも生育する」ことから、目的遺伝子が入ったクローンのみを選択できる。

↓ 【ヒートショック】

42°Cでチューブごと1分間温める
 (ストップウォッチなどできちんと計測する)

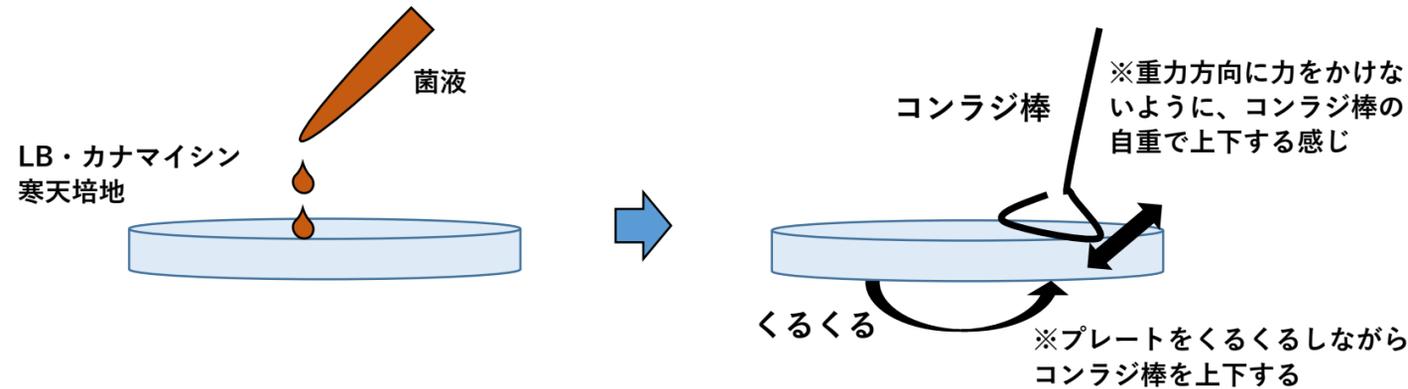


↓ チューブごと氷上に戻し2分程氷冷する
 (※その間に無菌操作の準備を行う)

↓ 【レスキュー】 150 μ LのLB液体培地を入れる

↓ 37°Cで15分、チューブごと温める

↓ 培養した菌液を全量、寒天培地にスプレッドする



・ P20ピペットの目盛を「1.0」にし、黄色のチップで1.0 μ Lを取る。

・ ヒートショックによって大腸菌は「びっくり」することでプラスミドを取り込むとされる。ヒートショック時間を長くしてしまうと、コンピテントセルはただでさえ弱らせてあることから、どんどん死滅してしまい、生育できるコロニー数が激減するので注意。

・ P200ピペットの目盛を「150」にし、黄色のチップで150 μ Lを取る。

・ ヒートショックしてイジメたのにレスキューとは変な感じであるが、選択マーカーがカナマイシンの時は必要 (対照的に教科書で良く出てくるアンピシリンの時はレスキューは別になくてもコロニーを得ることができる)。

☞レスキューが必要なのは何故か? については解説が長くなるので、wikiを見て欲しい。

・ コンラジ棒は消毒用エタノールに入れておき、使う時にバーナーであぶり、エタノールを静かにくるくるしながら飛ばす (くるくる動かさないと、エタノールが一面に溜まり、コンラジ棒が折れるため。エタノールがその辺に飛ぶと燃え移るので、静かにくるくるさせる)。

・ 熱くなったコンラジ棒は菌液を垂らしていないところで一度冷ましてから菌液をスプレッドする。

【考察ポイント1】
 何故寒天培地を使う必要があるのか?

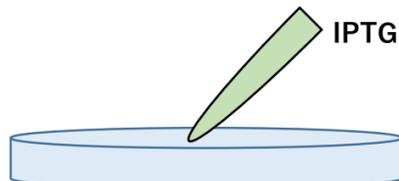
【考察ポイント2】
 ①では当然何も生えてこないと考えられるが、若しコロニーが生えてきたらどんなことが考えられるか?

【考察ポイント3】
 ②と③では誘導物質であるIPTGの有ると無いの差のみであるが、コロニーにどのような差が見られると考えられるか?

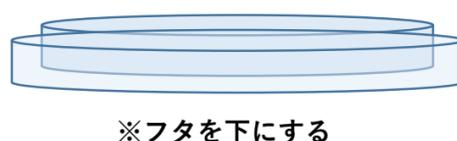
【考察ポイント4】
 誘導物質であるIPTGを中心に滴下しているが、コロニーがどのように生えてくるだろうか?

【考察ポイント5】
 プレートをフタを下にして逆さにするのは何故だろうか? 若しフタを上にしてしまうとどんなことが起こるか?

↓ ③~⑥に5 μ LのIPTGを中心に滴下する



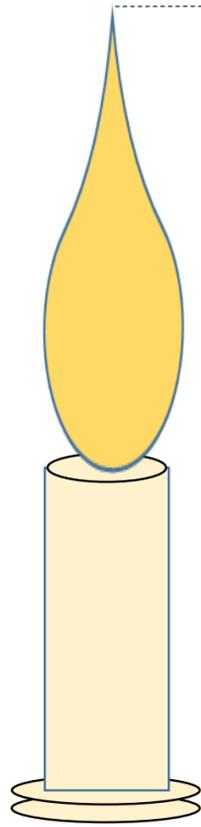
↓ プレートを逆さにして37°Cのインキュベーターに入れる
 (16~20時間後にコロニーが見えてくる)



赤字は無菌操作

【無菌操作の方法】

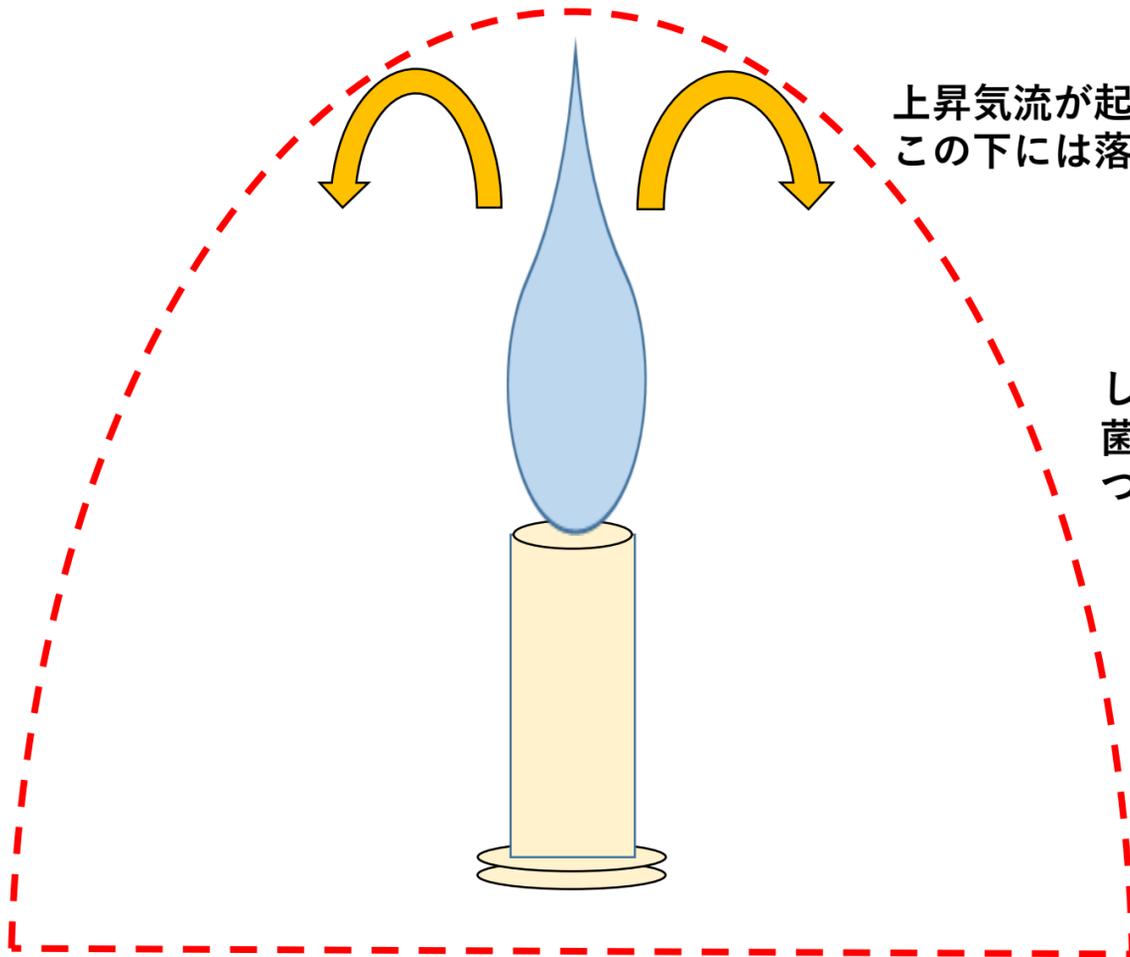
- ①実験機を消毒用エタノールで良く拭いておく
- ②ガスバーナーに点火する
- ③ガスバーナーの炎が椅子に座った自分の目線くらいになる様にする



※当然のことではあるが、
ガスバーナーを点ける際には周囲に可燃物がないことを確認する。
特にペーパータオルなどは要注意。

※ガスバーナーがついた状態で
消毒が足りなかったなどと周辺に
エタノールを振りかけるなど絶対にしないこと

- ④ガスバーナーの空気ねじを広げて、青い炎にする



上昇気流が起きるので空気中の菌やカビなどは
この下には落ちない

したがって、バーナーの麓のあたりは
菌やカビが降ってこない、
つまり無菌状態を作ることができる。

③で目線くらいまで炎を上げたのは
手の可動域を大体考慮しての目安

- ⑤無菌操作が終了したら、速やかにバーナーを消す