

バイオ実験キット Dr.ジーンシリーズ

Dr.ジーン 1 ver. 2

大腸菌形質転換キット
《LacZ発現系》

取扱説明書 第5版

株式会社ニッポンジーン

富士フイルム和光純薬株式会社

目次

ページ

| | |
|-------------------------------------|----|
| 1. 本キットについて | 3 |
| 2. キット内容の確認 | |
| 1) キット構成 | 4 |
| 2) 試薬について | 5 |
| 3) キット以外に必要な物 | 6 |
| 3. 使用上の注意 | 7 |
| 4. 「遺伝子組換え生物等規制法」について | 8 |
| 5. コンピテントセル、プラスミド、および大腸菌 JM109 について | |
| 1) コンピテントセル | 11 |
| 2) プラスミド DNA pBR322 | 11 |
| 3) pBR322-lacZ とプロモーター | 12 |
| 4) 大腸菌 JM109 株 | 14 |
| 6. 実験プロトコルについて | 15 |
| 7. 廃棄物の処理等 | |
| 1) 実験後の培地、器具等の廃棄について | 16 |
| 2) 余ったプレートを使つての実験 | 17 |
| 8. データの解析 | |
| 1) プレーターの観察 | 18 |
| 2) 考察 | 19 |
| 3) 大腸菌形質転換効率の計算 | 20 |
| 9. Appendix | 25 |
| 10. 関連製品 | 27 |

1. 本キットについて

生物の細胞内へ遺伝子を含む新たな DNA が何らかの理由で取り込まれると、この新しい遺伝情報がしばしばその生物へ新たな性質を与えることがあります。遺伝子工学における形質転換とは、新たな遺伝子により生物の性質が変化することであり、また、生物の性質を人為的に変えるためにその生物へ遺伝子を導入することを意味しています。

このような形質転換は遺伝子工学の各所で使われています。例えば農業においては、農作物に害虫や霜、薬剤に対してより強い性質を持たせるために、それらに耐性の性質を持った遺伝子を植物内に導入することが行われています。これがいわゆる遺伝子組換え作物と呼ばれているものです。微生物においても、例えばタンカーなどから海へ流出した石油を分解するというような、私たちの生活の役に立つさまざまな性質を付加された微生物が形質転換により作り出されています。さらに、医療においては、遺伝子の異常により引き起こされる病気の治療のために、この病気に関わる正常な遺伝子やその機能を補うための遺伝子を患者へ導入する遺伝子治療が行われ始めています。

このように、生物への遺伝子導入、形質転換技術は農業、環境、医療等多方面で行われており、重要な遺伝子技術の一つです。

本キットは、大腸菌のプラスミド DNA である pBR322 と、pBR322 に lacZ 遺伝子を入れた pBR322-lacZ という二種類の DNA を大腸菌 JM109 株に導入するキットです。IPTG、X-gal を含んだ培地上で pBR322 が導入された大腸菌 JM109 は白いコロニーを作り、pBR322-lacZ を導入されたものは大腸菌内で β-ガラクトシダーゼというタンパク質が発現するため青いコロニーを作ります。

また、pBR322 は抗生物質アンピシリンに対して耐性となる β-ラクタマーゼ遺伝子が組み込まれており、通常アンピシリンを含んだ培地上では生育できない大腸菌が形質転換によりアンピシリン耐性の性質を獲得し、生育できるようになることを肉眼で確認することができます。

本キットでは二通りの方法で形質転換実験が行えます。

実験方法 1：キット添付の大腸菌を用いてコンピテントセルを作製し、pBR322 プラスミドを導入して大腸菌を形質転換します。比較的短時間で実験が終了します。

実験方法 2：添付の大腸菌を寒天プレートで培養します。成長したコロニーからコンピテントセルを作製し、pBR322 プラスミドを用いて大腸菌を形質転換します。実験操作は多くなりますが寒天培地での培養という大腸菌を扱う際の基本操作を習得できます。

本キットを使って実験を行うことにより、DNA と微生物の基本的な取り扱い方や遺伝子を新たに付加するという遺伝子工学の基礎技術を体験することができます。また、導入した DNA が生物の性質を変化させるということを実際に目にすることによって、生物の性質を決定しているのが DNA（に存在する遺伝子）であるということを理解することができます。

2. キット内容の確認

この表は、キットに添付されている試薬のリスト、およびキット以外に必要な物のリストです。

本キットは6班用(一つの班につき2実験分)に構成してあります。実験を始める前に、必ず内容をご確認下さい。

1) キット構成 (6班分)

| | 容量 | 数量 | 保存 | チェック |
|-----------------|-------|---------------|-------------|--------------------------|
| pBR322 DNA | 15μl | 6本 (透明チューブ) | 凍結 (-20℃) | <input type="checkbox"/> |
| pBR322-lacZ DNA | 15μl | 6本 (黄色チューブ) | 凍結 (-20℃) | <input type="checkbox"/> |
| 大腸菌 JM109 | 100μl | 12本 (緑色チューブ) | 凍結 (-20℃以下) | <input type="checkbox"/> |
| 塩化カルシウム溶液 | 500μl | 6本 (水色チューブ) | 凍結 (-20℃) | <input type="checkbox"/> |
| SOC 培地 | 1ml | 6本 (スクリーチューブ) | 室温暗所 | <input type="checkbox"/> |
| LB 寒天培地 | | 7袋 | 室温 | <input type="checkbox"/> |
| アンピシリン | 500μl | 1本 (スクリーチューブ) | 凍結 (-20℃) | <input type="checkbox"/> |
| X-gal /IPTG 溶液 | 150μl | 6本 (透明チューブ) | 凍結 (-20℃) | <input type="checkbox"/> |
| 1.5ml チューブ | | 5本 (透明) | 室温 | <input type="checkbox"/> |
| | | 5本 (黄色) | | |
| | | 3本 (水色) | | |
| | | } ×6 | | |
| 滅菌済みシャーレ | | 80枚 | 室温 | <input type="checkbox"/> |
| コンラージ棒 | 5本/袋 | 8袋 | 室温 | <input type="checkbox"/> |
| マイクロループ | 10本/袋 | 7袋 | 室温 | <input type="checkbox"/> |
| チューブ立て | | 12個 | 室温 | <input type="checkbox"/> |
| フロート | | 6個 | 室温 | <input type="checkbox"/> |

※ 本キットは保存温度の異なる試薬で構成されています。必ずそれぞれ指定の温度で保管してください。特に、JM109 セルは超低温フリーザ (-70~-80℃) での保存をお勧めします。無い場合は冷凍庫の奥など温度変化が極力小さい場所に保管し、実験を行うまで溶けないようご注意ください。一度溶けてしまうと形質転換効率が著しく低下します。

※ 試薬、プラスチック器具類は必要数より多めに入っています。

※ 1.5ml チューブ、シャーレ、コンラージ棒、およびマイクロループは滅菌済みです。

2) 試薬について

本キットに、毒物または劇物に該当する物質は含まれておりません。

危険有害性に関する最新の情報は、安全データシート (Safety Data Sheet) を参照してください

| 構成品名 | 組成 | 備考 |
|-----------------|---|----|
| pBR322 DNA | 10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA pBR322 DNA | |
| pBR322-lacZ DNA | 10mM Tris-HCl (pH8.0) 1mM EDTA pBR322-lacZ DNA | |
| 塩化カルシウム溶液 | 塩化カルシウム Tris-HCl (pH8.0) | |
| SOC 培地 | SOC 液体培地 (混合溶液) | |
| LB 寒天培地 | LB 寒天培地 (粉末) | |
| X-gal/IPTG 溶液 | X-gal (5-Bromo-4-chloro- 3-indolyl- β -D-galactopyranoside) IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 66.6% Dimethylformamide | |
| アンピシリン | アンピシリンナトリウム水溶液 | |
| 大腸菌 JM109 | 大腸菌 JM109 株 グリセロール (50%未満) | |

3) キット以外に必要な物

マイクロピペット（～20 μ l 用、～200 μ l 用）

マイクロピペット用チップ（オートクレーブ滅菌済みのもの）

500ml 三角フラスコ 2個

500ml メスシリンダー

氷水、および発泡スチロールの箱（発泡スチロールの箱は、本キット輸送用の箱が利用できます）

42℃の水、および発泡スチロールの箱

ガスバーナー

オートクレーブ

アルミホイル

タイマー（時計）

エアインキュベーター（37℃設定） なければ水浴で代替する

温度計

油性ペン

廃棄物入れ（プラスチック用、可燃物用）

プラスチックはさらに菌体の付いているものと付いていないものに分ける。

滅菌用エタノール（70%程度のもの）

ライターまたはマッチ

ビニールテープ

カウンター（コロニー数をカウントする際にあると便利です）

白衣（用意できれば）

筆記用具

ノート

3. 使用上の注意

- ◆ 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。また、試薬についての基本的な知識を十分に理解した上で使用してください。
- ◆ 本品の取り扱い、マニュアルの記載通りに行ってください。マニュアルの記載内容と異なった取り扱いによるトラブル、事故につきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ◆ 本品の仕様は、ご使用になったお客様のご意見等を参考にして予告なく変更されることがあります。ご了承ください。
- ◆ 本キットは二種類の実験方法のうちどちらかで実習を行うことができます。**実験方法 1** (JM109 セルを直接コンピテントセル処理し、形質転換する方法) と **実験方法 2** (一度 JM109 マスタープレートを作製し、生じたコロニーからコンピテントセルを作製、形質転換する方法) では、実験操作や使用する器具の数、実験に要する時間が異なりますのでご注意ください。

4. 「遺伝子組換え生物等規制法」について

遺伝子組換え実験では本来自然界に存在しない組み合わせの遺伝子を容易に作り出すことが可能です。したがって、その有用性と共に自然界に対する予測できない危険性を含んでいることを十分理解しておく必要があります。

遺伝子組換え実験を安全に行うために、平成16年2月に「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（いわゆるカルタヘナ法または遺伝子組換え生物等規制法）」が施行されました。日本国内で遺伝子組換え実験を行うすべての研究者は、この法律の定めに従って実験を計画し、行わなくてはなりません。本キットを使って実験を行う前にも、この法律に目を通して内容を理解し、学生にもその趣旨と内容を理解させてください。

カルタヘナ法（遺伝子組換え生物規制法）につきましては、文部科学省ホームページにわかりやすく記述されております。たいへん参考になりますので、必ずご一読願います。

文部科学省ホームページ

<http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae>

物理的封じ込めと生物学的封じ込め

遺伝子組換え実験においては、組換え体を施設、設備内に封じ込めることにより、外界への拡散を防止する目的の物理的封じ込めと、特殊な培養環境以外では生存できない宿主と他の生物への伝播性のないベクターDNAの組み合わせによって組換え体の拡散防止と実験の安全性を図る生物学的封じ込めというものがあります。扱う材料によって生物学的封じ込めにはB1、B2などがあり、その安全性を総合的に判断して物理的封じ込めのレベルがP1からP4まで定められています。

Dr. ジーンシリーズで使われている材料はすべて安全性が高く、実験レベルとしてはP1-B1レベルに該当いたします。

以下に、教育目的で遺伝子組換え実験を行う際に一般的に注意すべきルールを記述いたします。

なお、本記述は文部科学省ホームページ中の「高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ」と題されたリーフレットより抜粋した内容になっております。

・ルール① 遺伝子組換え実験中の拡散防止措置をしっかりとること！

遺伝子組換え実験を行う上で最も大事なことは、実験に用いる遺伝子組換え生物を実験室の外へ拡散させないことです。この拡散を防ぐため、カルタヘナ法（遺伝子組換え生物規制法）では、実験の種類に応じた「拡散防止措置」をとるよう定めています。

しかしながら、通常の教育目的の遺伝子組換え実験であれば、この拡散防止措置は「P1」と呼ばれるものとなります。下記の「P1」チェックリストを参考に、遺伝子組換え実験を始める前に、これらの内容を全て満たすかどうかについてチェックしましょう。

| 「P1」チェックリスト | |
|---|-------|
| 拡散防止措置の内容 | チェック欄 |
| ① 実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。 | |
| ② 遺伝子組換え生物等を含む廃棄物（大腸菌などの菌液、廃液を含む。）については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 （具体例：オートクレーブ装置を用いた滅菌。70%アルコールによる殺菌） | |
| ③ 遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再使用（あらかじめ洗浄を行う場合にあつては、当該洗浄。）の前に②と同様に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 | |
| ④ 実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等不活化するための措置を講ずること。 （具体例：70%アルコールによる拭浄） | |
| ⑤ 実験室の扉については閉じておくこと（実験室に出入りするときを除く。）。 | |
| ⑥ 実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずること。 | |
| ⑦ すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。 （具体例：白金耳を菌のついた状態で焼かないこと（焼く前に70%アルコールに浸すと良い）。） | |
| ⑧ 実験室以外の場所で遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときなど、実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等の漏出や、拡散が起こらない構造の容器に入れること。 | |
| ⑨ 遺伝子組換え生物等が付着し、又は感染することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等の必要な措置を講ずること。 （具体例：実験の前後の手洗い、実験中に髪をさわらない） | |
| ⑩ 実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。 （具体例：「遺伝子組換え実験中につき関係者以外立入禁止」などの表示） | |

- ・ルール② 保管中の拡散防止措置をしっかりとること！

数週間にわたって実験を行う場合、作製した遺伝子組換え生物を保管する必要がありますが、この場合には、A. 遺伝子組換え生物が漏出しない容器に入れ、容器に遺伝子組換え生物である旨の表示をすること、B. 冷蔵庫など決められた場所に保管し、見やすい箇所に遺伝子組換え生物である旨の表示をすること（つまり、AとBの2カ所の表示をしなければなりません）、を守る必要があります。

- ・ルール③ 体制を整備すること！

カルタヘナ法（遺伝子組換え生物規制法）では、遺伝子組換え実験を行う際に、その安全な取扱いについて検討する委員会を設置し、検討を行うように求めているところですが、通常の教育目的の実験であれば、安全管理が容易なことから、こうした委員会の設置は必須ではありません。

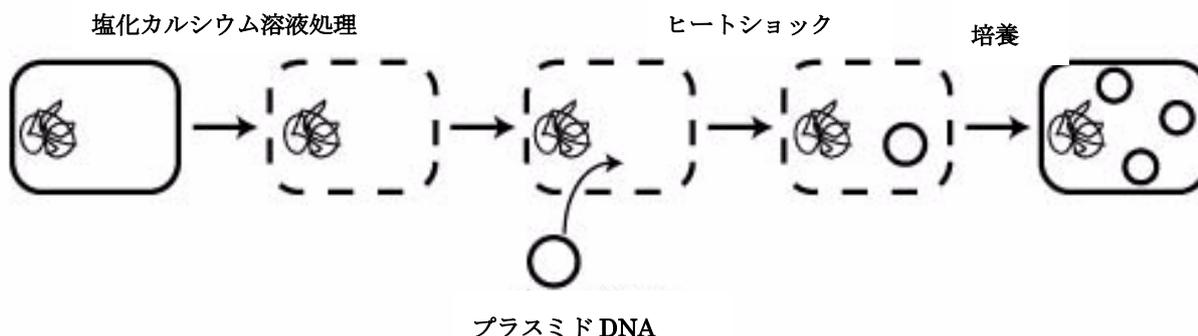
しかしながら、遺伝子組換え実験の内容や安全管理の方法などを組織として十分に把握した上で、実験を行うことが必要であると考えられています。また、実験を指導する方々は、遺伝子組換え生物等の取扱いについて十分な経験を有していることが望まれます。

5. コンピテントセル、プラスミド、および大腸菌 JM109 について

1) コンピテントセル

大腸菌は哺乳類の腸内細菌であり、細胞膜および細胞壁をもつ原核生物です。大腸菌は増殖速度が早く、簡単な培地で生育するので遺伝子工学における最も基本的な生物として使われています。

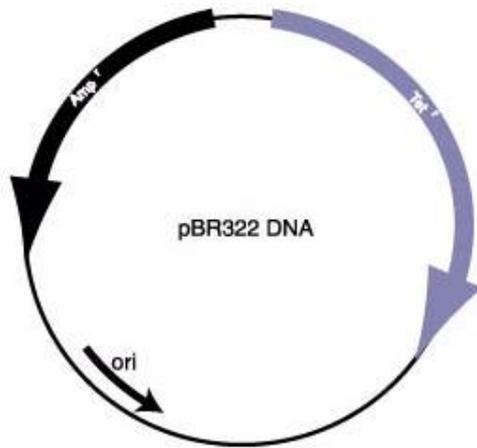
通常、大腸菌はプラスミド DNA (環状の DNA) のような大きな分子を細胞内に取り込むことはできません。しかし、大腸菌を塩化カルシウム溶液で処理するとプラスミド DNA は菌体内へ取り込まれやすくなり、一般にコンピテントセルと呼ばれる状態になります。大腸菌の形質転換のときは、この Ca イオンにより DNA のマイナス荷電が中和され、同様にマイナスの荷電を持った細胞表面からの反発が小さくなるので、プラスミド DNA が大腸菌内に取り込まれるようになると考えられています。実験に際しては、42℃で熱処理 (ヒートショック) すると更に導入効率を上げることができます。



2) プラスミド DNA pBR322

大腸菌には自己のゲノム DNA の他に小さな環状 DNA を持っているものがあります。この環状の DNA はプラスミドといいます。プラスミド DNA は大腸菌内で自己複製し増殖できます。したがって、組換え DNA 技術を用い、プラスミド DNA に外来遺伝子を導入すれば、新たな遺伝情報を持った大腸菌を作り出すことができます。この様にプラスミド DNA は遺伝子を細胞内へ導入する運び屋 (ベクター) として利用されています。

pBR322 は抗生物質であるアンピシリンとテトラサイクリン耐性遺伝子を持ったプラスミド DNA です。このプラスミドが大腸菌内に取り込まれると、アンピシリン耐性遺伝子から β -ラクタマーゼというアンピシリン分解タンパク質が発現し、大腸菌はアンピシリン存在下でも生育できるようになります。

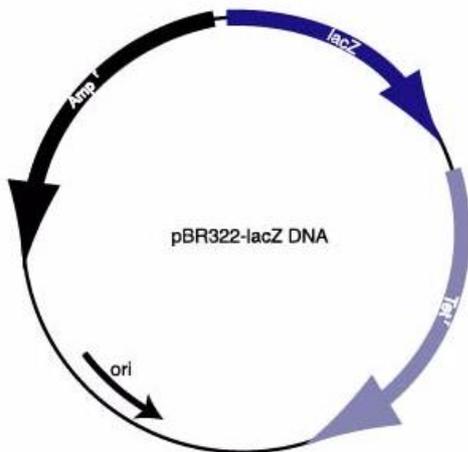


pBR322 形質転換プレート
(白いコロニーが形成される)

3) pBR322-lacZ とプロモーター

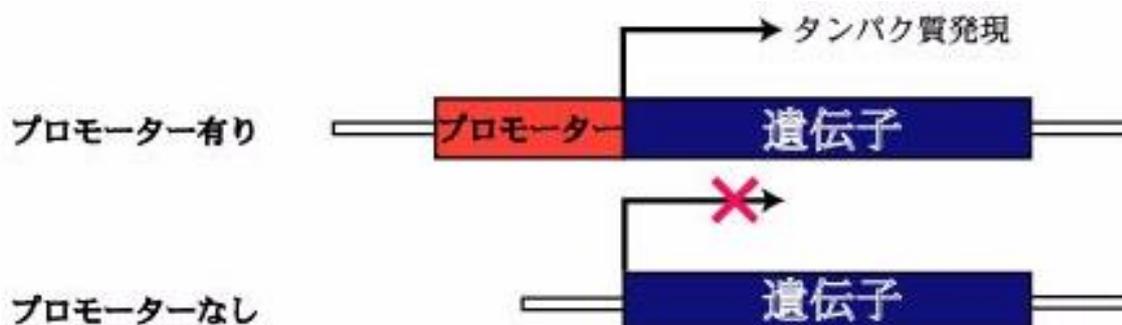
pBR322-lacZ は pBR322 プラスミドの中に lacZ という遺伝子を組み込んであります。このプラスミドは pBR322 同様アンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子を持っています。

IPTG という物質の存在下でこの lacZ 遺伝子を導入した大腸菌 JM109 を培養すると β-ガラクトシダーゼタンパク質が作られます (発現します)。培地中に β-ガラクトシダーゼタンパク質の基質である X-gal という試薬を入れておくと、この X-gal が大腸菌内に取り込まれ、発現した β-ガラクトシダーゼタンパク質により分解されます。菌体内で分解された X-gal は青色に発色する物質に変わるため大腸菌が青く見えるようになります。

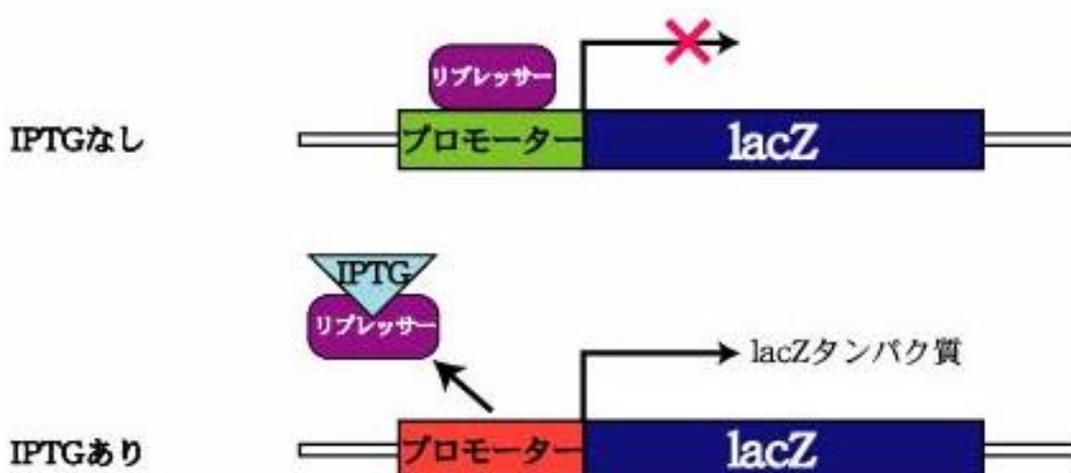


pBR322-lacZ 形質転換プレート
(LacZ タンパク質が発現してコロニーが青くなる)

本キットでは lacZ 遺伝子が大腸菌内で発現させますが、通常、この lacZ 遺伝子に限らず、ただ遺伝子のみを組み込んで大腸菌内に導入しただけではタンパク質を作らせることはできません。発現させたい遺伝子の前にプロモーターと呼ばれる、タンパク質を作る指令を出すための DNA 配列が必要になります。



本キットでは lacZ 遺伝子を発現させるために特殊なプロモーターを使用しています。通常は、このプロモーターにはリプレッサーと呼ばれるタンパク質が結合して、プロモーターの機能を抑えているため遺伝子はほとんど発現していません。しかし IPTG を培地中に添加すると、菌体に取り込まれた IPTG がそのリプレッサーと結合し、リプレッサーがプロモーター領域からはずれます。リプレッサーの外れたプロモーターはその機能を回復して lacZ 遺伝子の転写を促進するため、タンパク質が作られる仕組みになっています。



4) 大腸菌 JM109 株

大腸菌には様々な種類があり、大腸菌 O-157 株のように強い毒性を持ったものもありますが、通常、組換え DNA 実験には毒性が無く安全性の高い大腸菌 K-12 株由来のものが使われています。

組換え DNA 実験に使われる大腸菌は、組換え体が誤って外部環境へ漏れてしまった時に備えて、限られた条件下でしか生育できないように改造されています。さらに、組換え体を扱うのに便利のように大腸菌が本来持っているいくつかの遺伝子に変異を入れてあります。本キットで使用する JM109 株も K-12 株由来の大腸菌で、安全性が高く、組換え体を扱いやすいように遺伝子を改変してあります。

本実験では、大腸菌に lacZ 遺伝子を導入し、その遺伝子発現を大腸菌の色の変化で観察します。

一般の大腸菌は β-ガラクトシダーゼ遺伝子を持っているため、このような実験には使用できません。しかし、JM109 株は β-ガラクトシダーゼ遺伝子に変異を入れてあるため、完全な形の β-ガラクトシダーゼタンパク質を発現していません。形質転換によりこの大腸菌 JM109 株に lacZ 遺伝子を導入すると、この lacZ 遺伝子が β-ガラクトシダーゼ遺伝子の変異を補い、完全な形の β-ガラクトシダーゼタンパク質が発現するようになります(これを α-コンプリメンテーションと呼びます)。

このように、lacZ 遺伝子を導入し、発現させることによってこの大腸菌 JM109 株は、β-ガラクトシダーゼ活性を持つようになり、基質である X-gal を分解して青色を呈するようになるのです。

6. 実験プロトコルについて

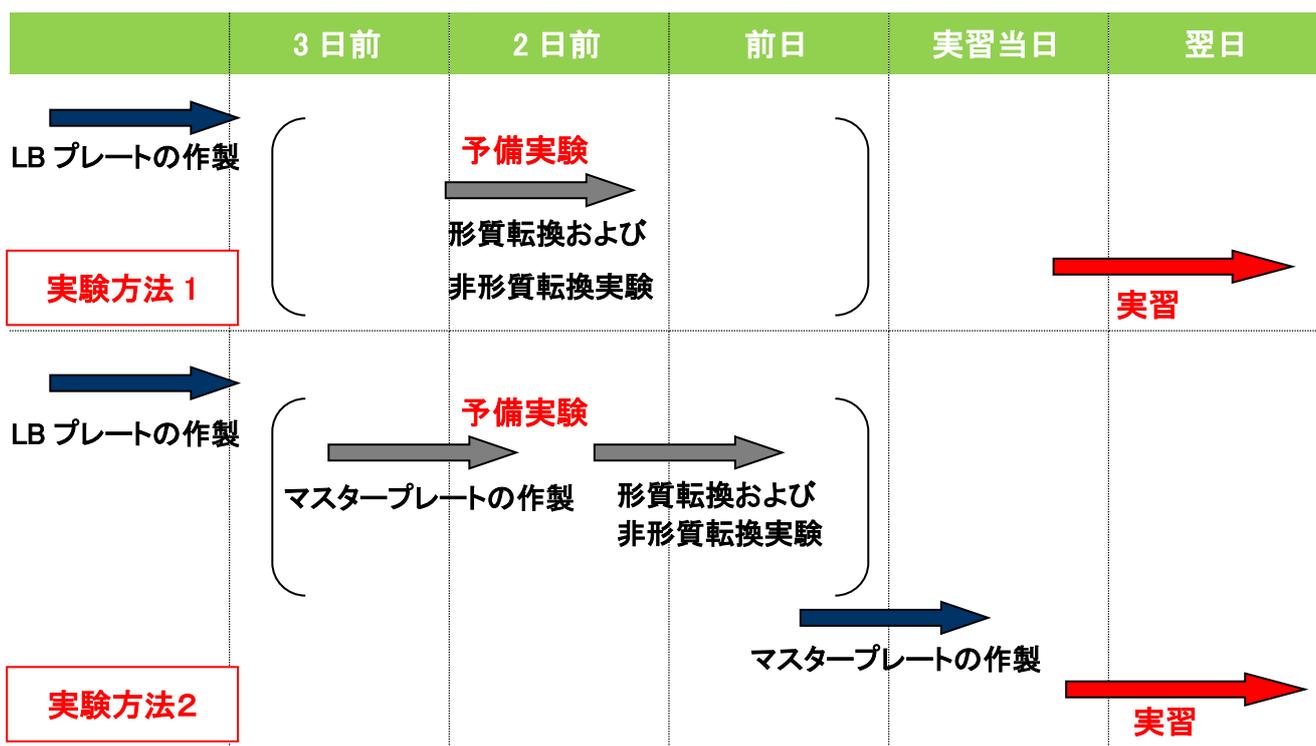
本キットでは、**2通りの実験方法**が行えます。

実験方法1（別冊1参照）

キット添付の大腸菌 JM109 を直接処理し、実験に使用するコンピテントセルを作製します。実験方法2 と比べ簡単に短時間で形質転換実験を行うことができます。

実験方法2（別冊2参照）

キット添付の大腸菌 JM109 を一度プレート上で培養します。その後生じた大腸菌 JM109 コロニーを用いてコンピテントセルを作製し、形質転換の実験を行います。実験方法1 と比べ作業は多くなり時間がかかりますが、大腸菌を扱う基本操作（プレート上での培養）を習得できます。



実習の始まる前に、あらかじめ予備実験を行っておくことをお勧めします。

予備実験はスケジュール表の通りに行う必要はなく、実習前のいつ行ってもかまいません。ただし、本キットには予備実験のための試薬等は含まれておりません。予備実験の際には本キットの一部を使用して行っていただくことになります。

キットに含まれる大腸菌 JM109 は凍結融解を行うと形質転換効率が著しく低下します。

予備実験の際は必要な分だけ取り出し、他の大腸菌を溶かさないう注意してください。

7. 廃棄物の処理等

1) 実験後の培地、器具等の廃棄について

実験に使用した培地、器具は必ずオートクレーブ、あるいは消毒液などで滅菌してから廃棄します。

プレートはゴム手袋などをはめて、プレートから培地を取り除き、ディッシュと培地とに分け、それぞれをオートクレーブ専用の袋に入れます（なお、取り扱い方によってはオートクレーブの袋が破けてしまう恐れもありますので念のため二重にしておく良いでしょう）。

オートクレーブ滅菌は 121℃、20 分を行います。オートクレーブ後の廃棄については、各々の施設の規則、各自治体の指示に従い捨ててください。

オートクレーブが無い場合、あるいはオートクレーブが使用できない器具はヒビテンなどの消毒液で十分滅菌してから廃棄、あるいは洗浄します。

2) 余ったプレートを使っての実験

余った LB プレート (Amp⁻) のプレートを二枚用意します。

机の上や椅子など周囲の物を手で触った後で、プレートに指を軽く押し付けます。

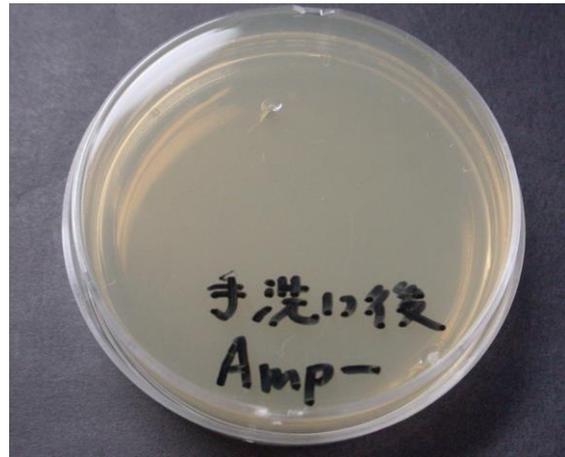
今度は手を石鹸でよく洗い、ティッシュペーパーで水を拭き取った後に、別のプレートに指を軽く押し付けます。

この二枚のプレートを 37℃ のインキュベーター中に翌朝まで放置し培養してみます。

生えてきた細菌の数を比べてみると、手を洗うことでかなり細菌の数が減少することが分かります。



手を洗う前



手を洗った後

私たちの周囲には非常にたくさんの細菌が存在しています。

私たちの皮膚などにも非常にたくさんの細菌が付着していますが、それら細菌は全てが毒性を持ったものではありません。一部には常在菌と言われ、ヒトと共生することでヒトの身体を守る働きを持った細菌もあります。また、多少毒性があっても、私たちは体内にそれら細菌を排除する免疫システムを持っているため、通常発病することはほとんどありません。

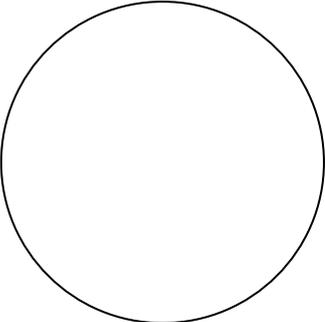
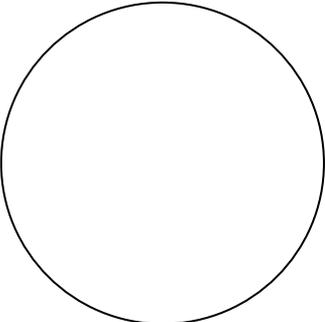
手を洗うことで付着していた細菌の数はかなり減少しますが、逆にいえば、いくら手を洗っても付着している細菌がまったくいなくなるということはありません。通常の生活において、この程度の細菌が付いていることは普通で、問題が起こることはほとんどありませんので過剰に反応する必要はまったくありませんが、私たちの周囲には多くの細菌がいるということと、手を洗うことでかなりきれいになるということがこの実験で理解できます。

8. データの解析

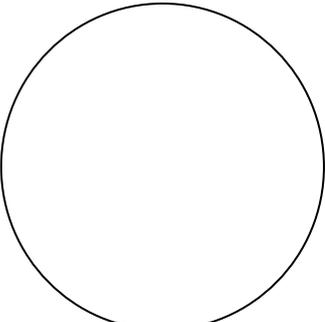
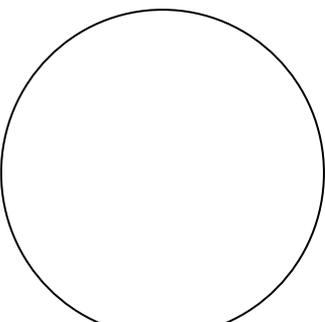
1) プレートの観察

下の円内に各プレートの様子をスケッチして下さい。また、コロニー数、コロニーの色、その他気が付いた点について記載してください。

1) 大腸菌形質転換実験

| | |
|--|---|
|  | <p><u>pBR322 形質転換プレート</u></p> <p>コロニー数 コロニーの色 その他プレートの様子</p> |
|  | <p><u>pBR322-lacZ 形質転換プレート</u></p> <p>コロニー数 コロニーの色 その他プレートの様子</p> |

2) 非形質転換大腸菌の培養実験

| | |
|---|--|
|  | <p><u>JM109 セル Amp-プレート</u></p> <p>コロニー数 コロニーの色 その他プレートの様子</p> |
|  | <p><u>JM109 セル Amp+プレート</u></p> <p>コロニー数 コロニーの色 その他プレートの様子</p> |

※ コロニー数が多いときは、プレートの面積 1/4 のコロニーを数えてから、4 倍すると簡単に全コロニー数を出すことができます。

2) 考察

- 1: アンピシリンー(マイナス)プレートとアンピシリン+(プラス)プレートに播いた大腸菌 JM109 株を比較してその違いと、その結果から JM109 株の性質について分かることは何ですか。

解答例 :

抗生物質アンピシリンー (マイナス) プレート上では大腸菌 JM109 セルはコロニーを形成し生育しているが、抗生物質アンピシリン+ (プラス) のプレート上では大腸菌 JM109 セルは全く生育していない。つまり大腸菌 JM109 株が本来アンピシリンに対する抵抗性を持っていない。

- 2: pBR322 形質転換プレート(Amp+)と非形質転換 JM109(Amp+)プレートを比較して、異なっている点とその理由について説明してください。

解答例 :

非形質転換 JM109 株は抗生物質アンピシリン+ (プラス) のプレート上で生育していないが、pBR322 形質転換プレート上では白いコロニーを形成して生育している。

これは導入された pBR322 によって、大腸菌 JM109 が抗生物質アンピシリンに対して耐性を持つような性質が加えられたためと考えられる。つまり、pBR322 の持つアンピシリン耐性遺伝子が菌体内で発現していることを示している。

- 3: pBR322 形質転換プレートと pBR322-lacZ 形質転換プレートを比較してその違いと、そこから考えられることは何ですか。

解答例 :

pBR322 で形質転換した大腸菌 JM109 は白いコロニーを形成して生育しており、pBR322-lacZ で形質転換した大腸菌 JM109 は青いコロニーを形成して生育している。したがって、両者とも抗生物質アンピシリンに対して耐性を持つように性質が変化したことがわかる。また、pBR322-lacZ で形質転換した大腸菌 JM109 が青いコロニーを形成していることは、培地中の X-gal が大腸菌によって分解されていることを示している。つまり大腸菌内で lacZ 遺伝子が発現したため X-gal が分解され、コロニーが青くなったと考えられる。

逆にいえば、大腸菌 JM109 株は lacZ 遺伝子を持っておらず、通常は β-ガラクトシダーゼ酵素を発現していないことが分かる。

3) 大腸菌形質転換効率の計算

A: 形質転換効率について

形質転換効率とは、1 μ g の DNA を形質転換したときに生じるコロニー数のことを指します。したがって、形質転換効率は下記のような式で表すことができます。

$$\text{形質転換効率 (cfu /}\mu\text{g)} = \frac{\text{プレートに生えたコロニー数 (個)}}{\text{プレートに播いた DNA 量 (}\mu\text{g)}}$$

cfu : colony forming unit (コロニー形成単位) の略

すなわち、形質転換効率を算出するには、

①「コロニー数を計測する」、②「プレートに播いた DNA 量を算出する」ことが必要となります。

B: 形質転換効率の算出例

濃度 2ng/ μ l の pBR322 DNA 5 μ l にコンピテントセル 50 μ l を加え、ヒートショック操作を行った。その後、SOC 培地 200 μ l を添加し 37 $^{\circ}$ C で 10 分培養した。培養後、X-gal/IPTG が 30 μ l 入ったチューブへ培養した大腸菌液 100 μ l を添加し、アンピシリンプレートへ 130 μ l 全量を塗布した。プレートを 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌朝、プレートにはコロニーが 200 個生えていた。上記の結果が得られた時の形質転換効率を求めてください。

①コロニー数 : 200 個

②プレートに播いた DNA 量

初めの DNA 量のうち、実際に播いた DNA 量はどれだけかを計算します。初めの DNA 全量を播いていないことに注意して下さい。全体の体積 (μ l) とプレートへ使用した体積の割合から DNA 量を求めることができます。

$$2 \text{ (ng /}\mu\text{l)} \times 5 \text{ (}\mu\text{l)}$$

初めの DNA 量

×

$$\frac{100 \text{ (}\mu\text{l)}}{255 \text{ (}\mu\text{l)}}$$

プレートへ播いた量 チューブ内の量

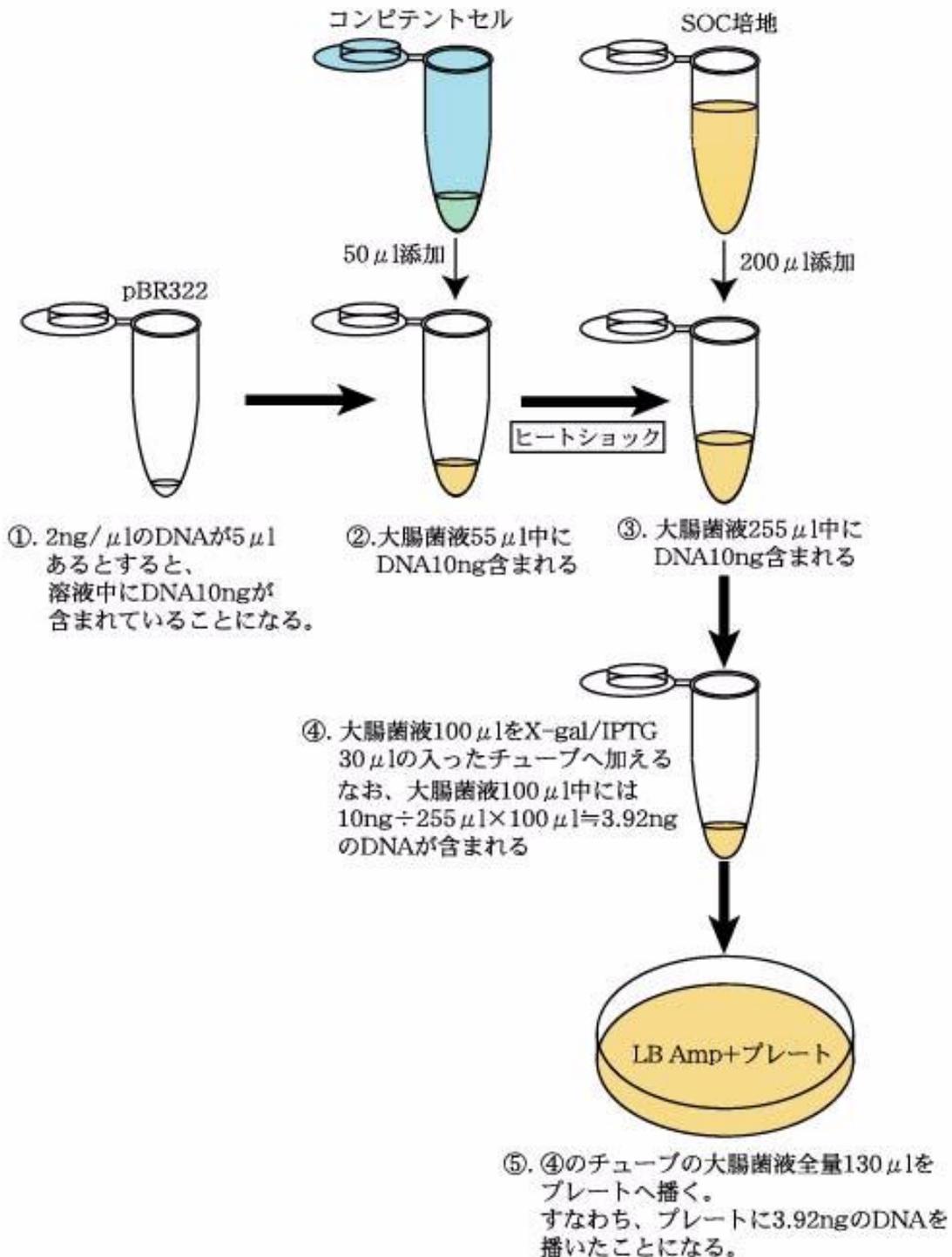
プレートへ播いた割合

$$\doteq 3.9 \text{ (ng)}$$

したがって、3.9ng の DNA をプレート上へ播いたこととなります。

(次ページの図を参照して下さい)

【大腸菌形質転換操作の各段階におけるDNA量】



①コロニー数 ②プレートに播いた DNA 量の算出の結果から

$$200 \text{ (コロニー数)} \div 3.9 \text{ (ng)} = 51 \text{ (コロニー数 / ng)}$$

この実験では 1ng の pBR322 DNA あたり 51 個のコロニーが生じたこととなります。

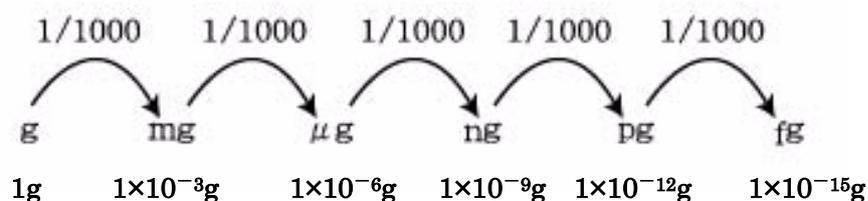
形質転換効率とは DNA 1 μ g を使用して形質転換した際に生じるコロニー数 (cfu / μ g) なので、51(コロニー数 / ng)を 1,000 倍します。したがって、

$$\text{形質転換効率} = 51 \text{ (個 / ng)} \times 10^3 \text{ (ng / } \mu\text{g)} = 5.1 \times 10^4 \text{ (cfu / } \mu\text{g)}$$

ということになります。

【参考】質量の単位について

10³ 下がるごとに g (グラム)、mg (ミリグラム)、 μ g (マイクログラム)、ng (ナノグラム)、pg (ピコグラム)、fg (フェムトグラム) と変わっていきます。



C: pBR322 及び pBR322-lacZ の形質転換効率

① コロニー数はいくつでしたか？

pBR322 形質転換プレート : _____ 個

pBR322-lacZ 形質転換プレート : _____ 個

② プレートに播いた DNA 量を求めて下さい。

pBR322 形質転換プレート : _____ ng

計算式 :

pBR322-lacZ 形質転換プレート : _____ ng

計算式 :

③ 上記の値をもとに形質転換効率を計算してください。

pBR322 形質転換プレート : _____ cfu/ μ g

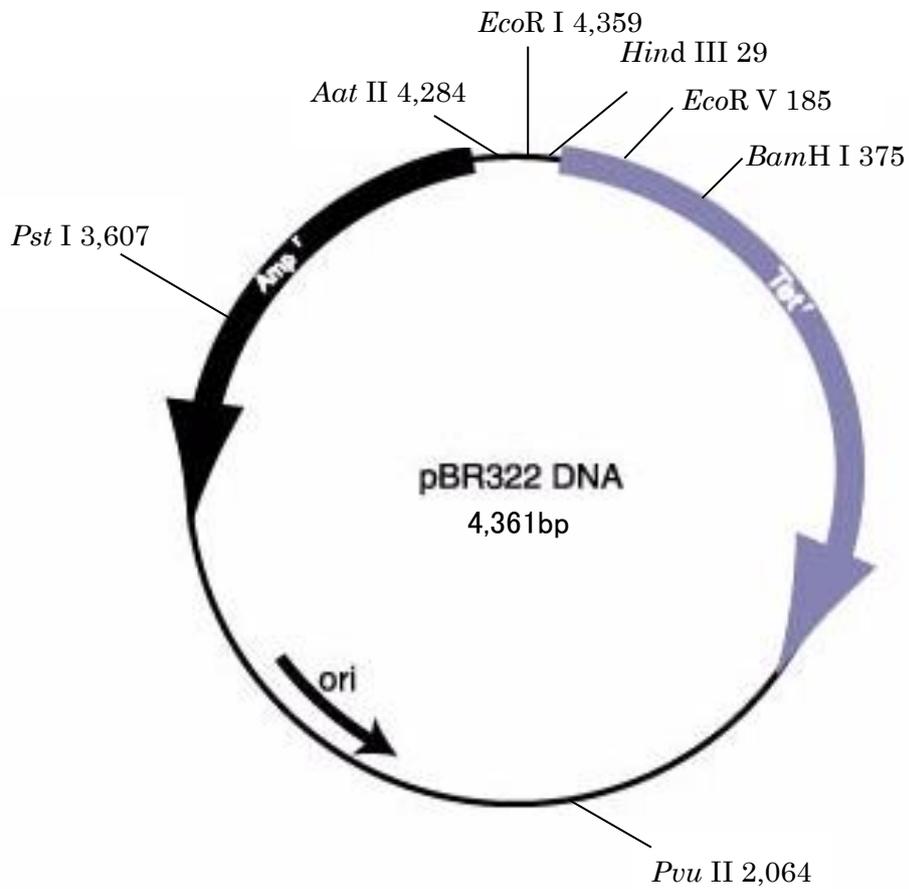
計算式 :

pBR322-lacZ 形質転換プレート : _____ cfu/ μ g

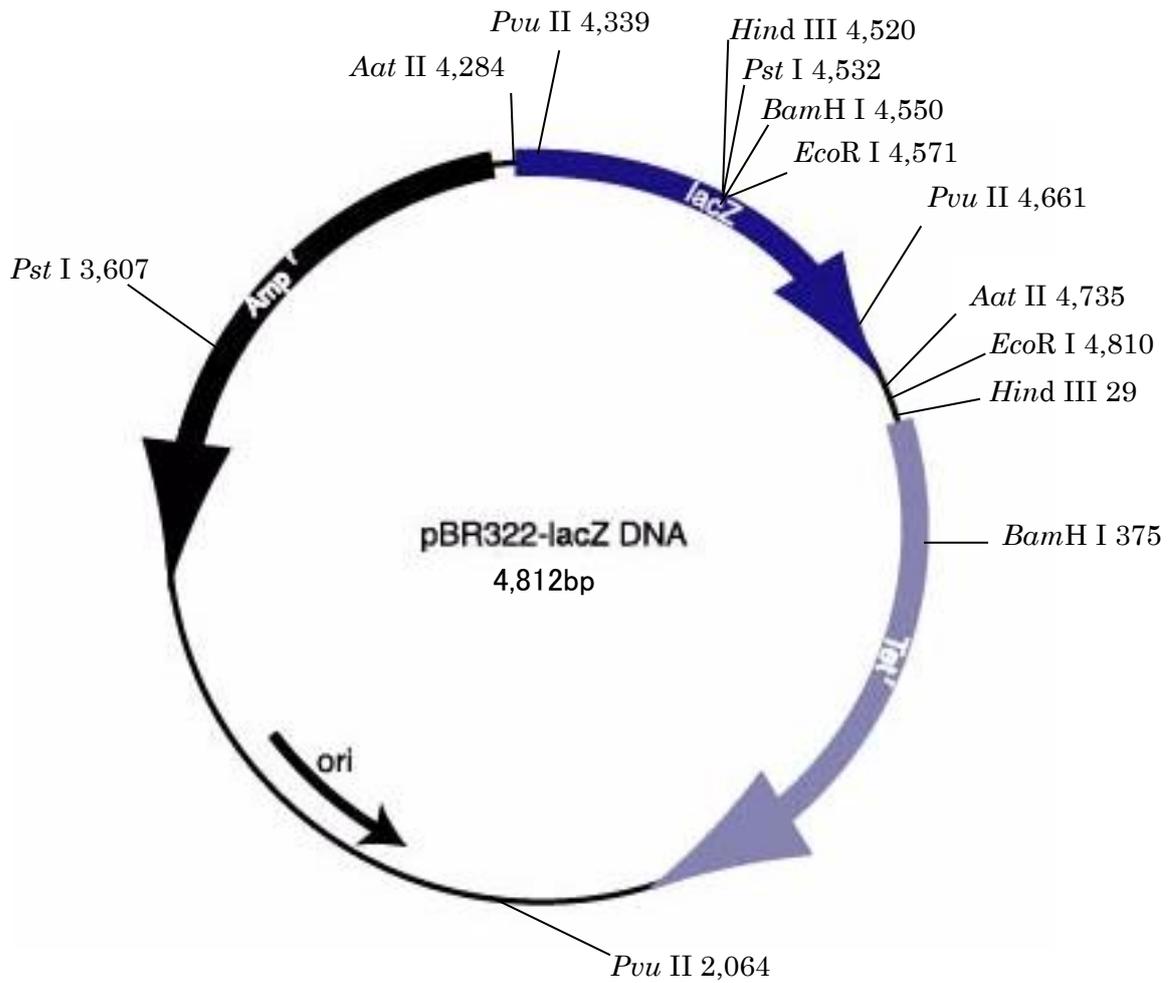
計算式 :

9. Appendix

pBR322 の主な制限酵素地図 (数字は *EcoR* I 認識配列の最初の T を 1 としている)



pBR322-lacZの主な制限酵素地図 (数字はEcoR I 認識配列中の最初のTを1としている)



10. 関連製品

教育用バイオ実験

| 教育用バイオ実験キット「Dr. ジーン」 | Code No. | 容量 |
|--|-----------|--------------|
| Dr.ジーン 1 ver. 2 (大腸菌形質転換キット・LacZ 発現系) | 310-06351 | 12 反応用(6 班用) |
| Dr.ジーン 2 (アガロースゲル電気泳動キット) | 318-05431 | 12 反応用(6 班用) |
| Dr.ジーン 6 (大腸菌形質転換キット・GFP 発現系) | 314-08451 | 1 Kit (6 班用) |
| Dr.ジーン 7 (植物多型解析 PCR キット) | 311-08461 | 1 Kit (6 班用) |
| Dr.ジーン 8 (DNA 鑑定キット) | 318-08471 | 1 Kit (6 班用) |
| Dr.ジーン 9 (アガロースゲル電気泳動セット) | 315-08481 | 1 Set (6 班用) |
| ISOHAIR Jr. | Code No. | 容量 |
| ISOHAIR Jr. (毛髪からの DNA 抽出試薬、PCR 用試薬、電気泳動試薬のセット) | 314-04431 | 30 回用 |
| | 310-04433 | 60 回用 |

DNA

| 品名 | Code No. | 容量 |
|------------------------|-----------|-------|
| pBR322 DNA (プラスミド DNA) | 319-00444 | 15 µg |

「ニッポンジーン」は商標登録されています。

製品についてのお問い合わせ先

富士フイルム和光純薬株式会社

フリーダイヤル: 0120-052-099

フリーFAX: 0120-052-806

株式会社ニッポンジーン

TEL: 076-451-6548

FAX: 076-451-6547

<https://www.nippongene.com/siyaku/index.html>