

バイオ実験キット Dr.ジーンシリーズ

Dr.ジーン 6

大腸菌形質転換キット(GFP発現系)

取扱説明書 第2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

1. 本キットについて	2
2. キット内容	
1) キット構成 (6 班分)	4
2) キット以外に必要なもの	5
3. 使用上の注意	6
4. 「遺伝子組換え生物等規制法」について	7
5. 実験プロトコルについて	10
6. 実験準備 (実験方法 1・2 共通)	
1) 前日までの準備 (大腸菌培養用プレートの作製)	11
2) 当日の準備	16
7. 実験の流れ	17
8. 実験方法 1 / 実験プロトコル	18
1) 実験をはじめる前に<実験方法 1>	19
2) 実験操作<実験方法 1>形質転換実験	20
9. 実験方法 2 / 実験プロトコル	29
1) 実験をはじめる前に<実験方法 2>	30
2) 実験操作<実験方法 2 : 1 日目>マスタープレートの作製	31
3) 実験操作<実験方法 2 : 2 日目>形質転換実験	35
10. データの解析	44
11. 廃棄物の処理	48

1. 本キットについて

本キットは、遺伝子組換え実験に汎用されるプラスミド DNA と、そのプラスミド DNA に新たに遺伝子を導入した DNA の二種類の DNA を大腸菌 JM109 株に導入するキットです。形質転換を中心とした遺伝子組換え実験を体験・理解することができます。実験操作は簡単で、オートクレーブ以外の特別な設備を必要としません。(オートクレーブの代用として圧力釜が使用できます。)

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、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。生物の細胞内へ新たな遺伝子を含む DNA が取り込まれると、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。

本キットでは、「大腸菌を寒天プレートで培養」、「大腸菌の細胞膜を変化させてプラスミドと呼ばれる小さな環状 DNA を細胞の中に取り込める状態にする (コンピテントセルの作製)」、「プラスミド DNA を大腸菌に導入 (形質転換)」、「形質転換により新たな性質を獲得した大腸菌を観察する」という遺伝子組換え実験を行います。

本キットで使用するプラスミド DNA に導入した新たな遺伝子は、2008 年にノーベル化学賞の受賞対象となった GFP 遺伝子です。この遺伝子を導入した DNA を取り込んだ大腸菌は、UV ライトの照射により緑色の蛍光を発します。GFP (緑色蛍光タンパク質, Green Fluorescent Protein) とは、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) より単離されたタンパク質です。GFP は、生命科学や医学などの研究分野においてもマーカー(目印用のタンパク質)として幅広く利用され、iPS 細胞の研究にも利用されています。

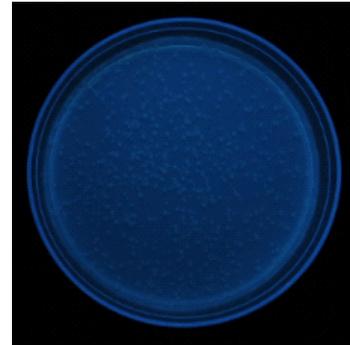
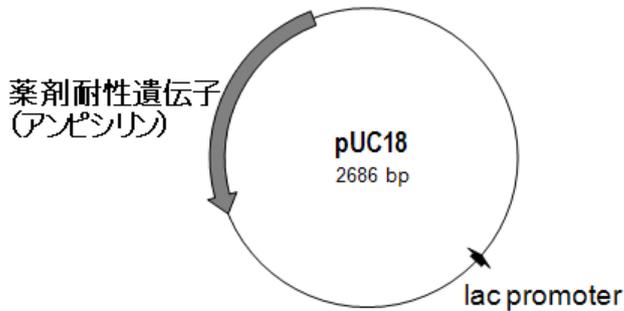
本キットでは2通りの方法で形質転換実験を行うことができます。

詳細は、**5. 実験プロトコル**についてをご参照ください。

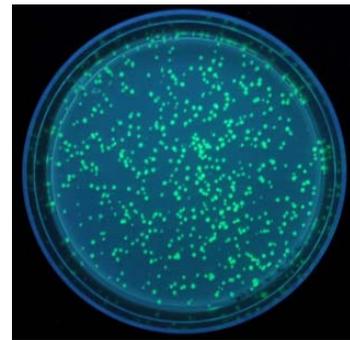
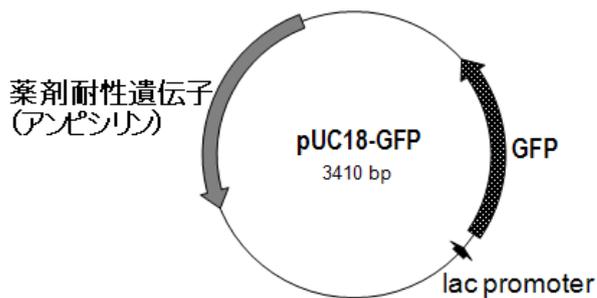
実験方法 1 : キット添付の大腸菌を用いてコンピテントセルを作製し、プラスミド DNA を導入して形質転換実験を行います。約 90 分で実験が終了します。

実験方法 2 : キット添付の大腸菌を寒天プレートで培養し、成長したコロニーを用いてコンピテントセルを作製します。形質転換実験は実験方法 1 と同様です。形質転換実験 (約 90 分) に加え、大腸菌を寒天プレートで培養する時間 (一晚) が増えますが、大腸菌を扱う際の基本操作を習得できます。

プラスミド pUC18



プラスミド pUC18-GFP



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 DNA をプラスミド DNA といいます。プラスミド DNA は大腸菌内で自己複製し増殖します。

pUC18 は、抗生物質アンピシリンに対する薬剤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により 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ます。(アンピシリンプレートでコロニーの確認ができます。)

pUC18-GFP は、pUC18 の中に GFP というタンパク質の遺伝子を組み込んであります。このプラスミドは、pUC18 同様にアンピシリン存在下でも生育できます。さらに、GFP 遺伝子の発現により、UV ライトの照射により緑色に光るコロニーを観察することができます。

本実験では、pUC18、および pUC18-GFP を取り込んだ大腸菌を作製します。

2. キット内容

1) キット構成(6班分)

内容	容量	数量	保存	チェック
pUC18 DNA	15 µl	6本 (透明チューブ)	-20℃	<input type="checkbox"/>
pUC18-GFP DNA	15 µl	6本 (黄色チューブ)	-20℃	<input type="checkbox"/>
大腸菌 JM109	100 µl	12本 (緑色チューブ)	-80℃(-20℃)	<input type="checkbox"/>
IPTG	150 µl	6本 (透明チューブ)	-20℃	<input type="checkbox"/>
塩化カルシウム	500 µl	6本 (水色チューブ)	-20℃	<input type="checkbox"/>
SOC 培地	1 ml	6本(スクリュウチューブ)	室温暗所	<input type="checkbox"/>
アンピシリン	500 µl	1本(スクリュウチューブ)	-20℃	<input type="checkbox"/>
IPTG	150 µl	6本 (透明チューブ)	-20℃	<input type="checkbox"/>
LB 寒天培地	—	7袋	室温	<input type="checkbox"/>
滅菌済みシャーレ	—	80枚	室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (透明)	5本	13本×6袋	室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (黄色)	5本		室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (水色)	3本		室温	<input type="checkbox"/>
コンラージ棒	5本	8袋	室温	<input type="checkbox"/>
マイクロループ	10本	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。特に大腸菌 JM109 は低温フリーザー(-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。一度溶けると形質転換効率が著しく低下します。

※ プラスチック器具類は必要数より多めに入っています。

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

2) キット以外に必要なもの

器具、装置など	補足	チェック
マイクロピペット	～20 μ l 用 (P20)、～200 μ l 用 (P200)	<input type="checkbox"/>
マイクロピペット用チップ	オートクレーブ滅菌済が望ましいです。	<input type="checkbox"/>
500 ml 三角フラスコ 2本	実験準備（前日までの準備）で使用します。	<input type="checkbox"/>
500 ml メスシリンダー 1本	実験準備（前日までの準備）で使用します。	<input type="checkbox"/>
ガスバーナー・ライター類	クリーンベンチ内・実験台どちらでも構いません。	<input type="checkbox"/>
アルミホイル	実験準備（前日までの準備）で使用します。	<input type="checkbox"/>
ビニールテープ	LB 寒天培地の蓋が不本意に開くのを防ぎます。	<input type="checkbox"/>
温度計	ウォーターバスの温度を測ります。	<input type="checkbox"/>
ウォーターバス	42°Cで使用します。*1)	<input type="checkbox"/>
エアインキュベーター	37°Cで使用します。	<input type="checkbox"/>
オートクレーブ	実験準備（前日までの準備）で使用します。 圧力釜での代用が可能です。	<input type="checkbox"/>
UV ライト または、ブラックライト	コロニーの蛍光観察に使用します。	<input type="checkbox"/>
UV ライト防護用ゴーグル等	UV ライトから目を守ります。コロニーの蛍光観察の際に必要なに応じて準備してください。	<input type="checkbox"/>
カウンター	結果を観察する際に使用します。無くても問題はありません。	<input type="checkbox"/>
氷、及び氷を入れる容器	各班 1 つ以上あると便利です。	<input type="checkbox"/>
油性ペン	極細が便利です。記名に使用します。	<input type="checkbox"/>
滅菌用エタノール（70%程度）	実験台を拭く際に使用します。	<input type="checkbox"/>
廃棄チップ入れ	廃棄チップはオートクレーブ等で滅菌後廃棄します。対応できるもの（ビーカーなど）をご用意ください。	<input type="checkbox"/>
手袋	実験に使用した培地を廃棄する際に、着用をお勧めします。	<input type="checkbox"/>

*1) 発泡スチロールの箱で代用できます。本キット輸送用の箱の利用が便利です。

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できません。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予告なく変更されることがあります。
- ◆ 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（大腸菌 JM109 から直接コンピテントセルを作製し、形質転換する方法）と実験方法 2（一度大腸菌 JM109 の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。

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います。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>

拡散防止措置とは

遺伝子組換え実験においては、組換え体を実験室内に封じ込め、外部に拡散させないような「拡散防止措置」を取らなくてはなりません。扱う生物や遺伝子の危険度に合わせて P1～P4 までの区分があります。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、「P1」レベルの拡散防止措置を執ることで外部への拡散を防ぐことができます。

一般的な学校の理科室であれば「P1」の要件を満たしています。

以下の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います。

- ・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に除く。）。	
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. 実験プロトコルについて

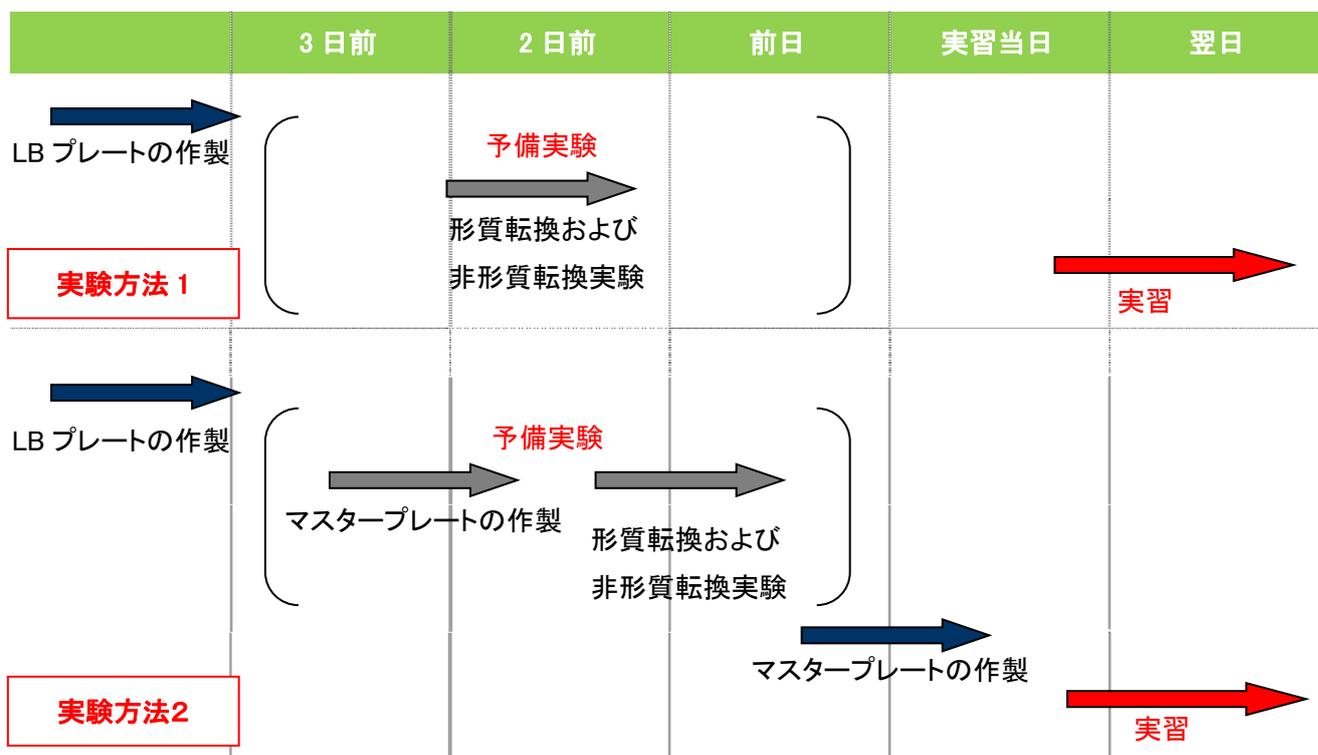
本キットでは、2通りの実験方法が行えます

実験方法 1

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

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ち注意してください。

6. 実験準備(実験方法 1・2 共通)

以下の操作はあらかじめ実験を指導する方が行ってください。

時間に余裕がある場合は学生が行っても構いません。

1) 前日までの準備(大腸菌培養用プレートの作製)

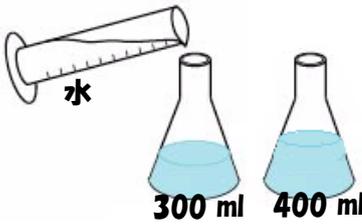
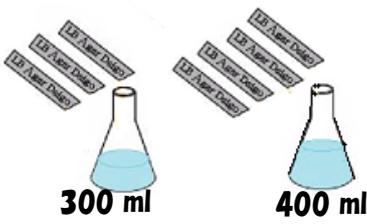
大腸菌培養用プレートは実習の前日までに作製してください。

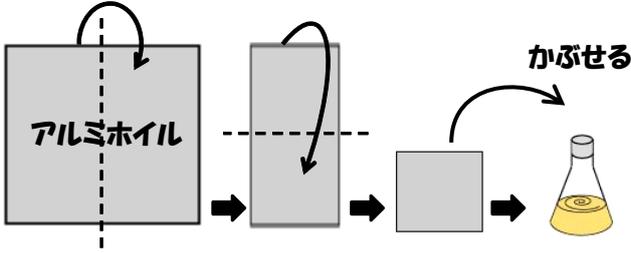
(一週間前からの作製が可能です。)

作製したプレートは 4°C (冷蔵庫)で保存し、実習の前日の夕方に実験台の上に出し、プレートの表面を少し乾かします。この時プレートの蓋は絶対に開けないでください。プレートを乾かすことで大腸菌液が培地中にスムーズに吸収され、実験が行いやすくなります。

	フラスコ	水	LB 寒天培地	アンピシリン	シャーレ
アンピシリン無プレート(Amp ⁻)	500 ml 容量	300 ml	3 袋	—	30 枚
アンピシリン有プレート(Amp ⁺)	500 ml 容量	400 ml	4 袋	400 μl	40 枚

「Amp」: アンピシリン(Ampicillin)と呼ばれる抗生物質を示します。「Amp⁻」は、Amp を培地に添加していない状態を示しています。

手順	注意点
培地の調製・滅菌	
<p>1. 500 ml の三角フラスコを 2 本とメスシリンダーを用意します。</p> <p>一本の三角フラスコに 300 ml の水を入れます。</p> <p>もう一方の三角フラスコに 400 ml の水を入れます。</p> <p>この時使用する水は、できればイオン交換水か蒸留水を使用してください。無ければ、水道水でも構いません。</p> 	<p>300 ml の培地はアンピシリン無プレート(Amp⁻)、400 ml の培地はアンピシリン有プレート(Amp⁺)を作ります。</p>
<p>2. 付属の「LB 寒天培地」を加え攪拌します。</p> <p><u>水 300 ml の三角フラスコには 3 袋</u>添加します。</p> <p><u>水 400 ml の三角フラスコには 4 袋</u>添加します。</p> 	

<p>3.</p>	<p>アルミホイルで蓋をし、フラスコを手で軽く攪拌してください。</p> 	<p>アルミホイルを四つ折りにし、二重の状態ですラスコにかぶせ、密封してください。</p>
<p>4.</p>	<p>攪拌後、オートクレーブに移し、121℃、15分間滅菌します。オートクレーブがない場合は、市販の圧力鍋を使用しても構いません。時間は20分間程度です。十分な滅菌効果を確認しています。</p>	<p>滅菌後のフラスコは大変熱くなっています。火傷に気をつけてください。</p>
<p>5.</p>	<p><u>オートクレーブが終了したら、しばらく放置し、少し温度が下がってから軽く攪拌して培地を混ぜてください。オートクレーブが終了して直ぐに培地を攪拌すると突沸してやけどをすることがあります。</u></p> <p>培地の入ったフラスコを室温に放置し、手で持てるぐらいまで（約50℃）冷まします。培地温度が下がると固まってしまうので注意してください。（*1）</p> <p><u>アンピシリン無プレート(Amp⁻)の作製</u> 300 ml の培地が入ったフラスコを用意し、手順 6 へ</p> <p><u>アンピシリン有プレート(Amp⁺)の作製</u> 400 ml の培地が入ったフラスコを用意し、手順 7 へ</p>	

- (*1) オートクレーブの中などで保温しておき、培地の温度が50℃以下にならないようにしてください。固まってしまった場合はもう一度オートクレーブへ入れて溶かしてください。この場合は溶かすことだけが目的です。121℃まで温度が上昇したらすぐにオートクレーブを止めて圧力が下がるのを待ちます。この時、培地の色が多少濃くなりますが実験には影響ありません。

アンピシリン無プレート(Amp⁻)の作製

6. この操作はクリーンベンチや安全キャビネット内で行います。無い場合は実験台の上でも構いませんが、できるだけガスバーナーの近くで行ってください。実験室の窓および扉を締め切り、実験台の上を70%エタノールでペーパータオル等を用いて拭いておきます。

(1) ガスバーナーの火をつけます。

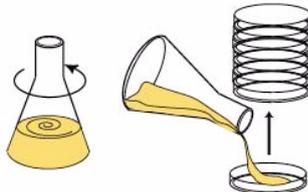
以降の操作はガスバーナーの火の周囲で行ってください。

空気中からの細菌の落下を少なくし、無菌に近い状態を作ることができます。



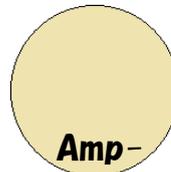
(2) 300 ml の培地が入った三角フラスコを用意します。

フラスコ上部のアルミホイルを取り、口のところをガスバーナーの火で軽くあぶります。片手で一番下のシャーレの蓋とともに上のシャーレを一緒に真上に持ち上げます。もう一方の手で培地の入った三角フラスコを持ち、シャーレに約 10 ml ずつ（シャーレの半分くらいの高さまで）培地を注ぎ込みます。

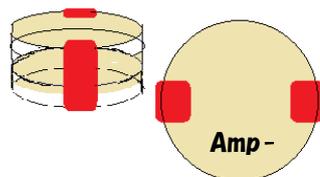


**出来るだけ素早く培地を注いでください。
(培地が冷えて固まることがあります。)**

(3) 培地が固まったら、シャーレの底面に **Amp⁻ (マ イナス)** と油性ペンで書いてシャーレを積み重ねます。



(4) プレートを手で使わない場合は、プレートにビニールテープで止め、逆さにした状態でビニール袋に入れて冷蔵庫に保存します。



<シャーレ 30 枚>

12 枚 (必要数)

・コントロール実験用

6 枚(1 枚×6 班分)

・マスタープレート用

6 枚(1 枚×6 班分)

18 枚 (予備)

火傷には十分注意してください。ガスバーナーは空気を少なくしてオレンジ色の炎が見えるようにしてください。

シャーレの袋はクリーンベンチ内で開けます。(クリーンベンチがない場合は、培地をプレートに注ぐ直前まで、シャーレの蓋は開けないでください。)

シャーレを 1 枚ずつ横にならべて培地を注いでも大丈夫です。

蓋ではなく、培地の入っている方に記入します。

ビニールテープは、予期せず蓋が開くのを防ぐために使用しています。

アンピシリン有プレート(Amp⁺)の作製

7. この操作はクリーンベンチや安全キャビネット内で行います。無い場合は実験台の上でも構いませんが、できるだけガスバーナーの近くで行ってください。実験室の窓および扉を締め切り、実験台の上を70%エタノールでペーパータオル等を用いて拭いておきます。

(1) ガスバーナーの火をつけます。

以降の操作はガスバーナーの火の周囲で行ってください。

空気中からの細菌の落下を少なくし、無菌に近い状態を作ることができます。



(2) 400 ml の培地が入った三角フラスコを用意します。

三角フラスコが手で持てるぐらいまで(約 50℃)冷めていることを再度確認します。フラスコの上部のアルミホイルを取り、ピペットを使ってキット添付のアンピシリン(スクリーチューブ)を400 μl 加え、フラスコを振って混ぜます。(*2)



<シャーレ 40 枚>

18 枚 (必要数)

・形質転換実験用

12 枚(2 枚×6 班分)

・コントロール実験用

6 枚(1 枚×6 班分)

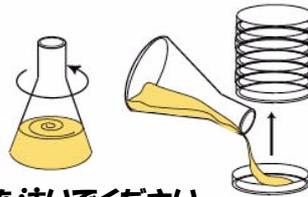
22 枚 (予備)

火傷には十分注意してください。ガスバーナーは空気を少なくしてオレンジ色の炎が見えるようにしてください。

(*2) 50℃以上の培地にアンピシリンを加えるとアンピシリンが分解し、抗菌作用を示さなくなる恐れがあります。また、温度が下がりすぎると培地が固まってしまうので注意してください。アンピシリン添加後に培地が固まり、再びオートクレーブなどで温めた場合、再度アンピシリンを添加しなければなりません。本キットには、アンピシリンは一度添加する分(400 μl+100 μl)しか入っていません。注意してください。

(3)

口のところをガスバーナーの火で軽くあぶります。片手で一番下のシャーレの蓋とともに上のシャーレを一緒に真上に持ち上げます。もう一方の手で培地の入った三角フラスコを持ち、シャーレに約 10 ml ずつ (シャーレの半分ぐらいの高さまで) 培地を注ぎ込みます。



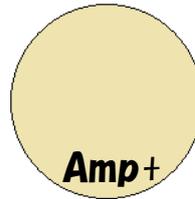
出来るだけ素早く培地を注いでください。
(培地が冷えて固まることがあります。)

シャーレの袋はクリーンベンチ内で開けます。(クリーンベンチがない場合は、培地をプレートに注ぐ直前まで、シャーレの蓋は開けないでください。)

シャーレを 1 枚ずつ横にならべて培地を注いでも大丈夫です。

(4)

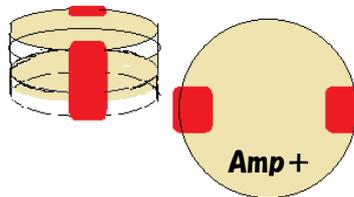
培地が固まったら、シャーレの底面に **Amp⁺** (**プラス**) と油性ペンで書いてシャーレを積み重ねます。



蓋ではなく、培地の入っている方に記入します。

(5)

プレートをすぐに使用しない場合は、プレートをビニールテープで止め、逆さにした状態でビニール袋に入れて冷蔵庫に保存します。



ビニールテープは、予期せず蓋が開くのを防ぐために使用しています。

2) 当日の準備

以下の準備は実験直前に準備してください。

① 氷の準備



可能であれば各班の分を準備します。
氷が大きい場合は氷中にチューブを差し込むことができるサイズに砕いてください。
氷水を作ります。氷が少量しか用意できない場合は、水を多くし、フロートでチューブを浮かべて使用してください。

実験中に氷が溶けないように注意してください。

② ウォーターバス、インキュベーターの準備

42℃（形質転換）用としてウォーターバス、
37℃（回復培養、およびプレート培養）用として、エアインキュベーターを用意します。
ウォーターバスが無い場合は発泡スチロール箱に42℃の湯水を作ります。
温度変化には充分注意してください。
湯水は少し高めに用意し、使用直前に水を加えて微調整すると操作が簡単です。

③ チューブの準備と試薬の融解

ラベル	保存
pUC18 DNA	氷上
pUC18-GFP DNA	氷上
IPTG	氷上
塩化カルシウム	氷上
SOC 培地	室温

実験が始まる前に左表のチューブを冷凍庫からとりだし、①で準備した氷水上に浮かべます。

塩化カルシウムは室温で融解させ、使用直前に氷上におき、よく冷やしてください。

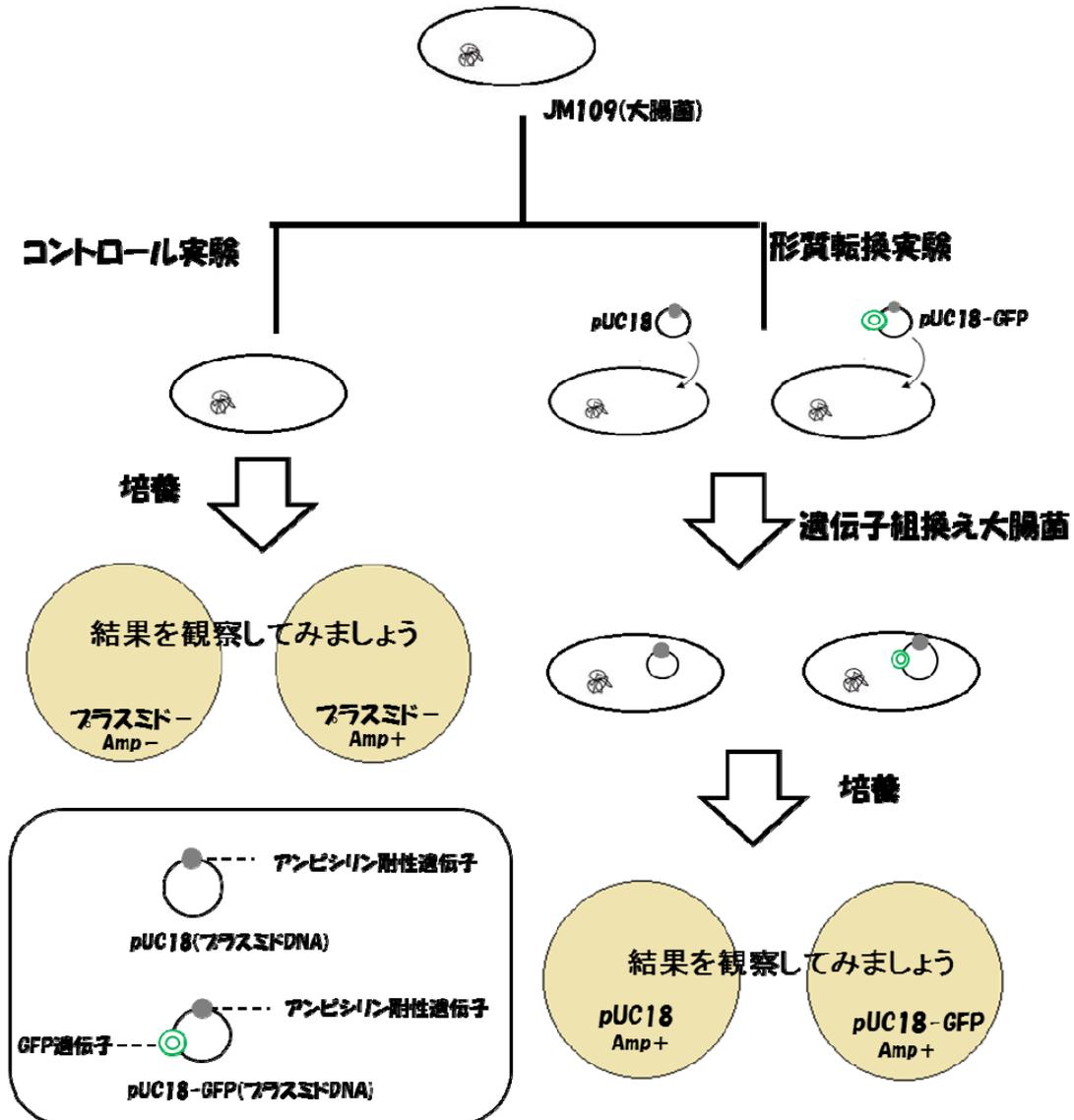
SOC 培地は室温においておきます。

チューブの蓋や側面に試薬が飛び散り、チューブの底にない場合があります。
卓上遠心機を使用し、チューブの底へ集めてください。卓上遠心機がない場合は、手で振って落としても構いません。**実験中にもチューブの底に試薬があるか注意してください。**
大腸菌 JM109 は、実験の途中で冷凍庫から取り出し、使用するまで絶対に融解させないでください。

④ 大腸菌培養用プレート

アンピシリン無プレート(Amp⁻)、アンピシリン有プレート(Amp⁺)を冷蔵庫から取り出し、室温におきます。

7. 実験の流れ



大腸菌 JM109 は薬剤耐性遺伝子を持たないため、抗生物質であるアンピシリン存在下 (Amp+)では生育できません。(コントロール実験で確認を行います。)

pUC18 は、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミド DNA です。このプラスミドが大腸菌内に取り込まれると、アンピシリン分解タンパク質が合成されるため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。

pUC18-GFP は、アンピシリン耐性遺伝子を持つ pUC18 プラスミドの中に緑色蛍光タンパク質 (GFP) の遺伝子が組み込まれています。このプラスミドが取り込まれた大腸菌は、pUC18 同様にアンピシリン存在下でも生育できます。さらに、GFP 遺伝子の発現により、pUC18 とは形質の異なるコロニーが確認されます。

遺伝子組換え実験後、pUC18 と pUC18-GFP のコロニーの違いを観察してみましょう。

8. 実験方法 1 / 実験プロトコル

	内容	温度	時間
実験準備			
<input type="checkbox"/>	必要なものがそろっているか確認	室温	5分
<input type="checkbox"/>	チューブ、プレートへの記名、準備		5分
<input type="checkbox"/>	試薬の分注	氷水上	10分
コンピテントセルの作製			
<input type="checkbox"/>	塩化カルシウム溶液を JM109 へ添加	氷水上	5分
<input type="checkbox"/>	氷冷		5分
形質転換			
<input type="checkbox"/>	作製したコンピテントセルと DNA を混合	氷水上	5分
<input type="checkbox"/>	氷冷		10分
<input type="checkbox"/>	熱処理により DNA を導入、氷冷	42°C→氷水上	3分
<input type="checkbox"/>	回復培養	37°C	10分
培養・観察			
<input type="checkbox"/>	DNA を導入した大腸菌をプレート培地にまく	室温	10分
<input type="checkbox"/>	37°Cで一晩、培養	37°C	一晩(約 16 時間)
<input type="checkbox"/>	プレートの観察、コロニーの計測	室温	—
形質転換効率の算出・考察		室温	—

※時間は目安です。実験に慣れた人であれば短くなります。

※下線部分については、時間を厳守してください。

1) 実験をはじめる前に<実験方法 1>

実験を行う際は、実験室の窓および扉は閉めておいてください。

- ①石鹸で手を洗います。
- ②ティッシュペーパーやペーパータオル等に滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭きます。
- ③以下の試薬が実験台にあるか確認してください。(一つの班に必要な試薬です)
一つの班で、pUC18 と pUC18-GFP の 2 種類の形質転換実験を行います。

【実験方法 1】

内容	容量	数量	保存	チェック
pUC18 DNA	15 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
pUC18-GFP DNA	15 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
大腸菌 JM109	100 μ l	2 本	冷凍庫	<input type="checkbox"/>
IPTG	150 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
塩化カルシウム	500 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
SOC 培地	1 ml	1 本	室温	<input type="checkbox"/>
アンピシリン有プレート(Amp+)*1)	—	3 枚	室温	<input type="checkbox"/>
アンピシリン無プレート(Amp-)*1)	—	1 枚	室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (透明)	5 本	1 袋	室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (黄色)	5 本		室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (青色)	3 本		室温	<input type="checkbox"/>
コンラージ棒*1)	5 本	1 袋(4 本使用)	室温	<input type="checkbox"/>
チューブ立て	—	2 個	室温	<input type="checkbox"/>
フロート	—	1 個	室温	<input type="checkbox"/>
マイクロループ*1)	10 本	1 袋(1 本使用)	室温	<input type="checkbox"/>

*1) 実験台上でシャーレの蓋や袋を開けないでください。使用直前にクリーンベンチ、またはガスバーナーを点火した状態で蓋や袋を開けるようにします。

実験操作における注意点

チップは使い捨てです。

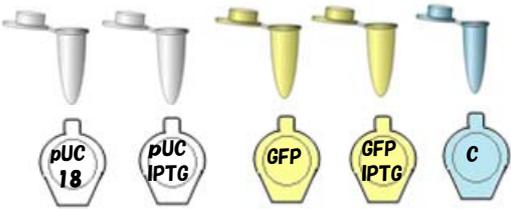
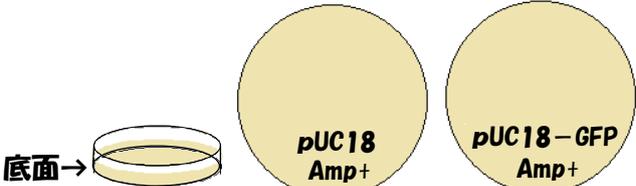
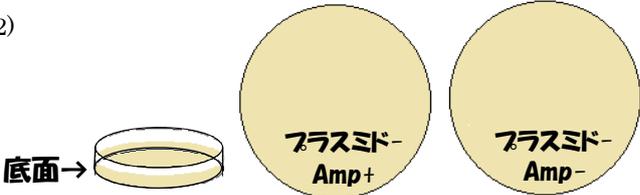
一度チューブ内へ入れたチップは捨て、毎回新しいチップを使用してください。

コンタミネーションを防止します。

コンタミネーションとは、不必要なものが混入することを意味します。

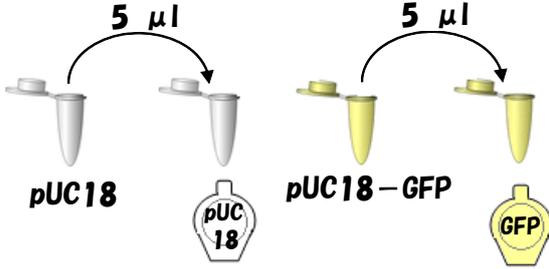
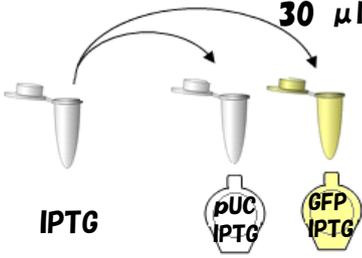
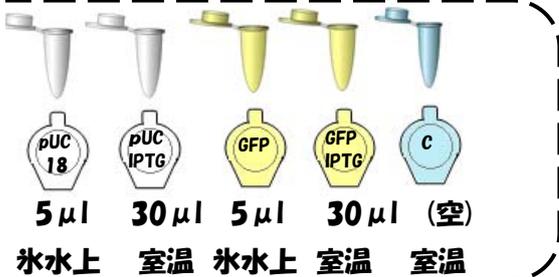
pUC18 DNA と pUC18-GFP DNA が混ざると予想される結果と異なる結果となります。

2) 実験操作 <実験方法 1> 形質転換実験

実験手順	注意点
<実験の準備>	
各チューブ・プレートにラベル名を記入する	
<p>1. 1.5ml チューブ (透明) 2本の蓋にそれぞれ「pUC18」、「pUC IPTG」、 1.5 ml チューブ (黄色) 2本にそれぞれ「GFP」、「GFP IPTG」、 1.5 ml チューブ (水色) 1本に「C」と油性ペンで記入します(*1)。</p>  <p>後で使用するアンピシリン無プレート(Amp⁻)、アンピシリン有プレート(Amp⁺)にも記入します。</p> <p><u>アンピシリン有プレート (Amp⁺) (2枚) :</u> pUC18 用 1枚、pUC18-GFP 用 1枚、計 2枚の底面に小さくそれぞれのサンプル名を油性ペンで記入します。</p>  <p><u>アンピシリン無プレート (Amp⁻) (1枚) :</u> アンピシリン有プレート(Amp⁺)を 1枚、アンピシリン無プレート(Amp⁻)を 1枚、計 2枚の底面に小さくそれぞれ「プラスミド-」と記入します。(*2)</p> 	<p>自分のチューブが分かるよう 記名してください。</p>  <p>シャーレの蓋は開けないでく ださい。</p> <p>形質転換実験用として使用し ます。</p> <p>コントロール実験用として使 用します。</p>

(*1) 「C」とは、コントロール実験を意味しています。今回の形質転換実験の対照実験(Control)として、形質転換をしていない大腸菌 JM109 が、アンピシリンを添加したプレート (Amp⁺) で生育できないことを確認するための実験です。

(*2) プラスミド-(マイナス) : プラスミド DNA を導入していないことを示しています。形質転換実験 (pUC18、pUC18-GFP の導入) と区別するために記入しています。

実験手順	注意点
<実験の準備>	
試薬の分注 (1 で記入したチューブへ)	
<p>2. マイクロピペット (P20) を使います。 プラスミド DNA を 5 μl ずつ分注します。 pUC18 (白色シール) を「pUC18」と書いた 1.5 ml チューブ (透明) へ、pUC18-GFP (黄色シール) を「GFP」と書いた 1.5 ml チューブ (黄色) へ、それぞれ 5 μl ずつ入れます。 5 μl 入れた 1.5 ml チューブは氷水上へ立てておきます。(*4)</p>  <p>3. マイクロピペットを使い、IPTG を 30 μl ずつ分注します。 IPTG を、「pUC IPTG」(透明)、「GFP IPTG」(黄色)と書いた 1.5 ml チューブへ 30 μl ずつ入れます。 入れた後はチューブ立てに立てて実験手順 12. まで室温に置いておきます。</p>  <div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>確認</p>  <p>5 μl 30 μl 5 μl 30 μl (空)</p> <p>氷水上 室温 氷水上 室温 室温</p> </div>	<p>pUC18、pUC18-GFP 溶液はチューブへ分ける前に数回ピペッティング(*3)して溶液を混合し、溶液はできるだけチューブの底の方へ入れてください。</p>

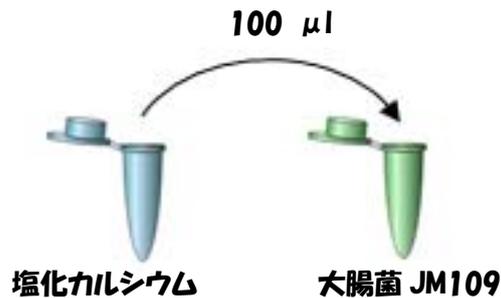
(*3) ピペッティング：マイクロピペットを用いて液をゆっくり出し入れすることです。この時できるだけ気泡ができないよう注意してください。

ピペッティングの代わりにタッピング(チューブの底を手で軽くはじき、中の溶液を混合する操作)で混合しても良いです。しかし、タッピングを行った場合、チューブ内の溶液がチューブの壁に飛び散るため、卓上遠心機を用いてチューブの底へ溶液を集めてから次の実験操作を行ってください。

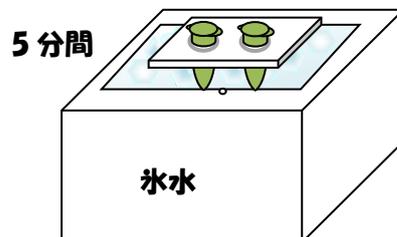
<コンピテントセルの作製>

塩化カルシウムを大腸菌 JM109 へ添加し、氷水上でインキュベートする

4. 大腸菌 JM109 を冷凍庫から取り出し、氷水上で溶かします。塩化カルシウムは数回ピペッティングして溶液を混合してから大腸菌 JM109 に添加してください。大腸菌 JM109 が溶けたら、マイクロピペットを使い、塩化カルシウム（水色チューブ）を大腸菌 JM109（緑色チューブ）へ **100 μ l** 加え、3~4 回ピペッティングして混合し氷水上に置きます。(*4)



5. 塩化カルシウムを入れたチューブをフロートに差し、氷水上で **5 分間** 放置します。
(氷水上に置く時間は多少長くなっても構いません。)(*5)



形質転換効率を上げるため、塩化カルシウムを加えた後、できるだけチューブを冷えた状態にすることが重要です。

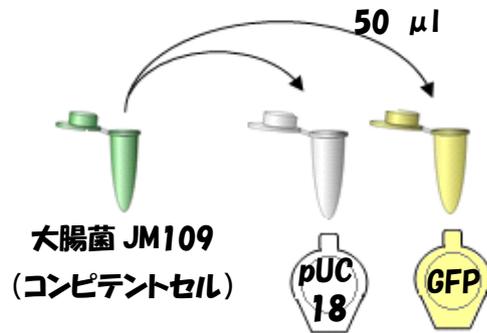
(*4) DNA は比較的安定な物質のため、氷上に放置していても問題ありません。しかし大腸菌 JM109 は使用する直前まで溶かさずにフリーザーに入れておいてください。融解したまま長時間放置すると形質転換効率が下がり、十分なコロニー数が得られない場合があります。

(*5) 氷だけでは冷却効率がよくない場合がありますので、氷に水を入れて氷水を作り、フロートにチューブを差し、氷水に浮かせて冷やしてください。

<形質転換：プラスミド DNA(pUC18, pUC18-GFP)の導入>

コンピテントセルとプラスミド DNA を混合し、熱処理にて DNA を大腸菌内に導入する

6. 5分経ったら、塩化カルシウムを加えた大腸菌（コンピテントセル、緑色チューブ）をピペッティングして混合します。
pUC18が入った「pUC18」チューブ（透明）に 50 μl 入れ、3～4 回ピペッティングして混合し氷水上に置きます。
同様に pUC18-GFP を入れた「GFP」チューブ（黄色）についても 50 μl のコンピテントセルを加え、ピペッティングで混合し氷水上に置きます。



7. 実験操作 6.でコンピテントセルを入れた 2 つのチューブをフロートの穴に入れ、氷水上で 10 分間放置します。



次の熱処理に 42°Cのお湯を使用します。
実験前に準備したお湯が 42°Cになっているか確認してください。
準備ができるまでチューブは氷水につけておいてください。
(氷水上に置く時間は長くなって構いません。)

残ったコンピテントセル(塩化カルシウム処理した大腸菌)は氷上に置いておきます。
後の、コントロール実験(非形質転換大腸菌の培養実験)に使用します。

チューブが氷に良く接しているか確認してください。

ウォーターバス、あるいは発泡スチロール箱にお湯をはって準備します。

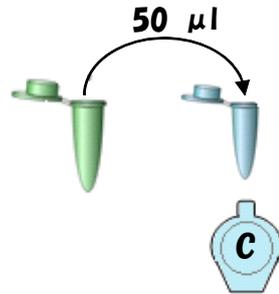
<p>8.</p>	<p>タイマーを用意します。</p> <p>実験操作 7.の2つのチューブをフロートごと、42°Cの水浴に浮かべて1分間放置します。</p> <p>1分経ったら、すぐに氷水上にチューブを移し2分間放置してください。 (氷水中に置く時間は多少長くなっても構いません。)</p> <div style="text-align: center;"> </div>	<p><u>42°C、1分間が重要。</u></p> <p>この操作を<u>ヒートショック</u>といいます。</p> <p>これにより DNA の導入効率が高くなります。この<u>処理時間と温度は厳守</u>してください。</p> <p>チューブをフロートにしっかり差し込んで、42°Cの水浴に必ず接するようにしてください。</p>
回復培養		
<p>9.</p>	<p>2分経ったらそれぞれのチューブに SOC 培地 (スクリュウチューブ) を 200 μl ずつ加え、数回穏やかにピペッティングして混合します。(*6)</p> <p>入れた後はチューブ立てに立てておきます。</p> <div style="text-align: center;"> </div>	
<p>10.</p>	<p>37°Cのエアインキュベーター内 (あるいは 37°Cの水浴中) で 10 分間インキュベートします。(*7)</p> <p>(このインキュベートは多少長くなっても構いません。)</p>	

(*6) SOC 培地を加えることで熱処理や DNA を取り込んだ際の大腸菌のダメージを回復し、形質転換効率を高めます。

(*7) エアインキュベーター：機器内を一定の温度に維持でき、大腸菌の生育に最も適した 37°Cに保温して大腸菌を培養します。

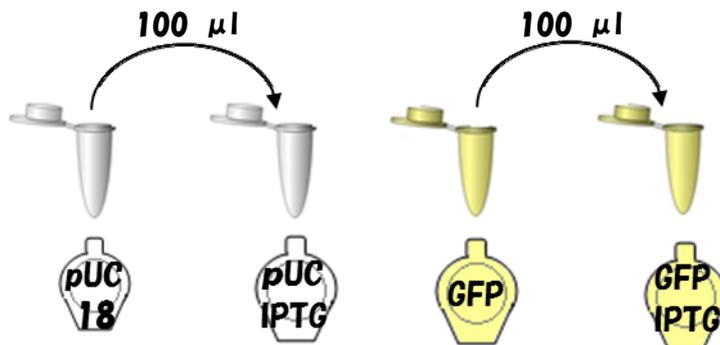
<コントロール実験>

11. インキュベーター中にコントロール実験の用意をします。
実験操作 6.で氷水の上に置いておいた残りのコンピテントセル (緑色チューブ) を実験用の「C」と書いたチューブ (水色) に **50 μ l** 入れます。(*8)



<培養・データ処理>

12. **実験操作 3.**で IPTG 溶液を入れた 2 つのチューブ、「pUC IPTG」 (透明)、「GFP IPTG」 (黄色) を用います。
 10 分後、**実験操作 10.**の 2 つのチューブ「pUC18」と「GFP」をインキュベーターから取り出し、室温で数回穏やかにピペッティングして混合します。
pUC18 形質転換大腸菌「pUC18」を IPTG 溶液の入ったチューブ「pUC IPTG」へ **100 μ l** 加え、数回ピッペティングし混合します。同様に、
pUC18-GFP 形質転換大腸菌「GFP」を IPTG 溶液の入ったチューブ「GFP IPTG」へ **100 μ l** 加え混合します。



(*8) 「コントロール実験」を分りやすくするため、あえて分注しています。

13.

ガスバーナーの火をつけます。

以下の操作はガスバーナーの近くで行うようにしてください。

火傷に注意してください。

(クリーンベンチ内で操作しない場合、ガスバーナーの近くであれば実験台の上で操作しても問題はありません。空気中からの細菌の落下を少なくし、無菌に近い状態を作ることができます。ガスバーナーの火に近づけようと、空中で操作することは絶対にしないでください。火傷の恐れがあります。)



ガスバーナーはオレンジ色の炎が見えるように空気量を調節してください。

14.

実験操作 1.で準備したアンピシリン有プレート「pUC18 Amp⁺」、
「pUC18-GFP Amp⁺」の2枚を用意します。

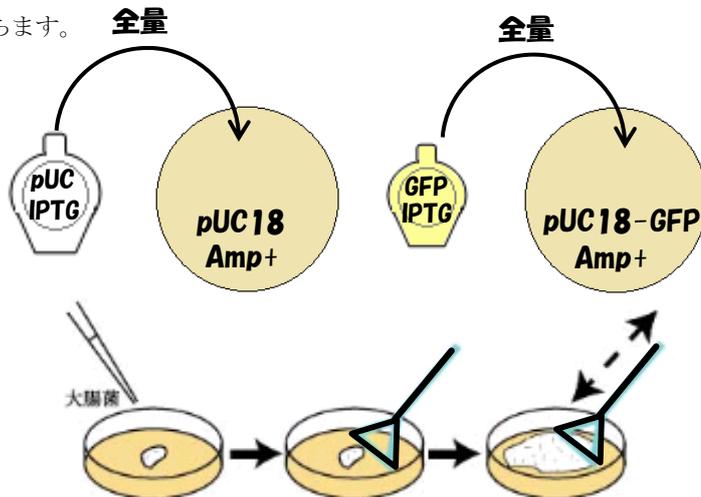
(1)

実験操作 12.で IPTG と混合した大腸菌液を塗布し、添付のコンラージ棒を用いて、プレート表面にできるだけ均一になるように大腸菌を塗布します。

アンピシリン有プレート「pUC18 Amp⁺」に IPTG 混合 pUC18 形質転換大腸菌「pUC IPTG」を全量 (およそ 130 μl) 塗布します。

アンピシリン有プレート「pUC18-GFP Amp⁺」に IPTG 混合 pUC18-GFP 形質転換大腸菌「GFP IPTG」を全量 (およそ 130 μl) 塗布します。

ほぼ全体にひろげたら、蓋をして表面の水分が培地に吸収されるのを待ちます。



チップ、コンラージ棒はプレートごとに新しいものを使用してください。

キット添付のコンラージ棒はプラスチック製です。ガスバーナーの火を近づけないでください。

(2)

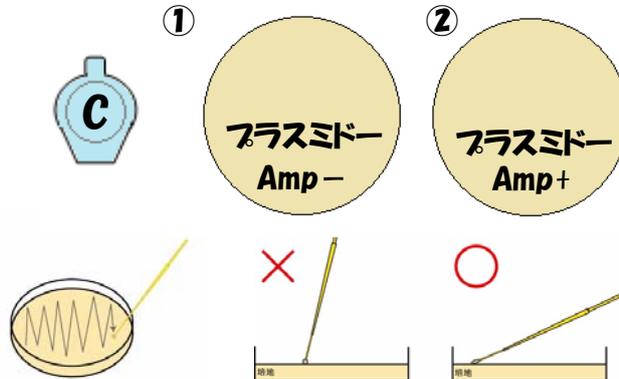
コントロール

実験操作 1. で準備したアンピシリン無プレート「プラスミド⁻ Amp⁻」1 枚、アンピシリン有プレート「プラスミド⁻ Amp⁺」1 枚を用意します。

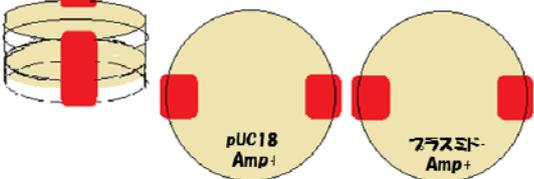
実験操作 11. で分注したコンピテントセルの入った「C」チューブ（水色）に、マイクロループの先を付けます。

大腸菌の付着したマイクロループで、まずアンピシリン無プレート (Amp⁻) 培地表面を撫でるようにジグザグの線を一定の方向に向かって引きます。(*9)

マイクロループを新しいものと交換し、同様の方法でアンピシリン有プレート (Amp⁺) へも大腸菌をひろげます。(*9)



(*9) このような画線培養は大腸菌のような細菌を扱った実験には良く使われる基本的な操作です。一般的にはこのようにジグザグにプレートへひろげることが多いですが、この実習ではとくにジグザグに線を引くことにこだわる必要はありません。大腸菌の付いたマイクロループでアンピシリン無プレート(Amp⁻)に絵や文字を書くと、翌日にはその形に大腸菌が増殖してきます。

<p>15.</p>	<p>塗布した大腸菌液の水分が培地に吸収され、表面が乾いたら2枚のプレートを重ねて一部をビニールテープなどでとめてください。<u>プレートを逆さ（蓋が下にくるよう）にして、翌日まで 37℃インキュベーター中で培養します。</u></p>  <p>実験終了後、実験台の上を滅菌用エタノールで拭き、実験室を出る前に必ず石鹸等で手を洗ってください。</p>	<p>プレート横の周囲全体にテープ等を巻かないでください。 (*10)</p> <p>培養時間 16 時間を目安にコロニーの大きさが 1 mm になるまで培養します。</p>
<p>16.</p>	<p>翌日の朝、プレートをインキュベーターから取り出し、観察するまで冷蔵庫で保存します。</p>	

(*10) 大腸菌の成長には空気が必要です。テープ等で完全に密封するとガス交換ができなくなり大腸菌は生育できません。テープは予期せず蓋が開くのを防ぐために使用しています。逆さまにして置くのは、培養中に蒸発した培地の水蒸気が蓋の裏に付き、水滴がプレートの培地表面に流れることを防ぐためです。

9. 実験方法 2 / 実験プロトコル

	内容	温度	時間(分)
<1日目>			
マスタープレートの作製			
<input type="checkbox"/>	プレートにラベル名を記載	室温	5分
<input type="checkbox"/>	シングルコロニープレートの作製		15分
<2日目>			
実験準備			
<input type="checkbox"/>	必要なものがそろっているか確認	室温	5分
<input type="checkbox"/>	チューブ、プレートへの記名、準備		5分
<input type="checkbox"/>	試薬の分注	氷水上	10分
コンピテントセルの作製			
<input type="checkbox"/>	塩化カルシウム溶液を JM109 へ添加	氷水上	5分
<input type="checkbox"/>	氷冷		5分
形質転換			
<input type="checkbox"/>	作製したコンピテントセルと DNA を混合	氷水上	5分
<input type="checkbox"/>	氷冷		10分
<input type="checkbox"/>	熱処理により DNA を導入、氷冷	42°C→氷水上	6分
<input type="checkbox"/>	回復培養	37°C	10分
培養・観察			
<input type="checkbox"/>	DNA を導入した大腸菌をプレート培地にまく	室温	10分
<input type="checkbox"/>	37°Cで一晩、培養	37°C	<u>一晩(約 16 時間)</u>
<input type="checkbox"/>	プレートの観察、コロニーの計測	室温	—
形質転換効率の算出・考察		室温	—

※時間は目安です。実験に慣れた人であれば短くなります。

※下線部分については、時間を厳守してください。

1) 実験をはじめる前に<実験方法 2>

実験を行う際は、実験室の窓および扉は閉めておいてください。

- ①石鹸で手を洗います。
- ②ティッシュペーパーやペーパータオル等に滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭きます。
- ③以下の試薬が実験台にあるか確認してください。(一つの班に必要な試薬です)
一つの班で、pUC18 と pUC18-GFP の2種類の形質転換実験を行います。

【実験方法 2】

<1日目>

内容	容量	数量	保存	チェック
大腸菌 JM109	100 μ l	1 本	冷凍庫	<input type="checkbox"/>
アンピシリン無プレート(Amp-)*1)	—	1 枚	室温	<input type="checkbox"/>
マイクロループ*1)	10 本	1 袋(1 本使用)	室温	<input type="checkbox"/>

<2日目>

内容	容量	数量	保存	チェック
プラスミド DNA(pUC18)	15 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
プラスミド DNA(pUC18-GFP)	15 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
マスタープレート (1 日目に作製)	—	1 枚	室温	<input type="checkbox"/>
IPTG	150 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
塩化カルシウム	500 μ l	1 本	氷水上	<input type="checkbox"/>
SOC 培地	1 ml	1 本	室温	<input type="checkbox"/>
アンピシリン有プレート(Amp+)*1)	—	3 枚	室温	<input type="checkbox"/>
アンピシリン無プレート(Amp-)*1)	—	1 枚	室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (透明)	5 本	1 袋	室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (黄色)	5 本		室温	<input type="checkbox"/>
1.5 ml チューブ (青色)	3 本		室温	<input type="checkbox"/>
コンラージ棒*1)	5 本	1 袋(4 本使用)	室温	<input type="checkbox"/>
チューブ立て	—	2 個	室温	<input type="checkbox"/>
フロート	—	1 個	室温	<input type="checkbox"/>
マイクロループ	10 本	1 袋(1 本使用)	室温	<input type="checkbox"/>

*1) 実験台上でシャーレの蓋や袋を開けないでください。使用直前にクリーンベンチ、またはガスバーナーを点火した状態で蓋や袋を開けるようにします。

実験操作における注意点

チップは使い捨てです。

一度チューブ内へ入れたチップは捨て、毎回新しいチップを使用してください。

コンタミネーションを防止します。

コンタミネーションとは、不必要なものが混入することを意味します。

pUC18 DNA と pUC18-GFP DNA が混ざると予想される結果と異なる結果となります。

2) 実験操作<実験方法 2 : 1日目> マスタープレートの作製

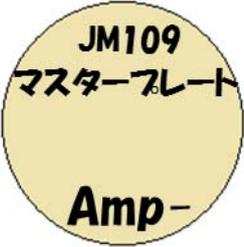
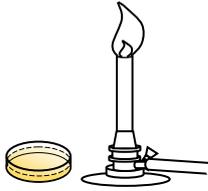
※ JM109 コンピテントセル用マスタープレートの作製は、実験方法 2 のみで実施します。

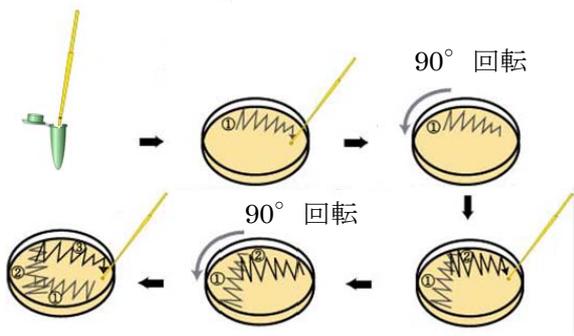
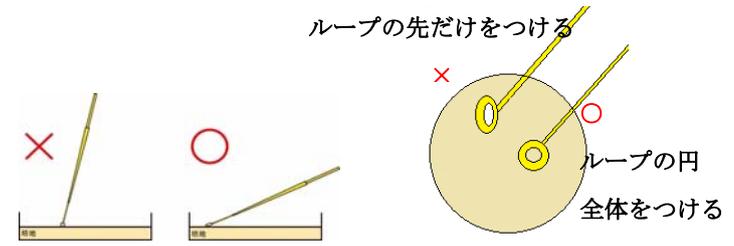
実験方法 1 では必要ありません。

コンピテントセルを作製するための大腸菌マスタープレートをあらかじめ準備します。大腸菌はできるだけ新しいものを使用したほうが形質転換効率は高くなります。したがって、JM109 コンピテントセル用マスタープレートはなるべく実習の前日に作製してください。前日に作製できない場合は、2~3 日前であればマスタープレートを冷蔵庫(4℃)に保存して使用することもできます。

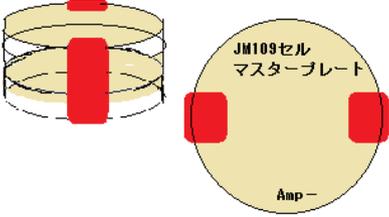
プレートの作製の際には 37℃で一晩放置して大腸菌を培養しますが、この培養時間の目安は 16 時間程度です。前日の夕方 5 時頃に培養を開始すると、翌朝の 9 時頃に大腸菌が適当な大きさになっていることとなります。

マスタープレートの作製を行う際は、実験室の窓及び扉は閉めておいてください。

実験手順	注意点
＜マスタープレートの作製＞	
<p>1. アンピシリン無プレート (Amp⁻) を室温に出します。プレート表面の露が無くなり、室温に戻ったらプレートの底面に小さく「JM109 マスタープレート」と油性ペンで書いておきます。</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>2. ガスバーナーの火をつけます。 以下の操作はガスバーナーの近くで行うようにしてください。 <u>火傷に注意してください。</u> (クリーンベンチ内で操作しない場合、ガスバーナーの近くであれば実験台の上で操作しても問題はありません。空気中からの細菌の落下を少なくし、無菌に近い状態を作ることができます。ガスバーナーの火に近づけようとし、空中で操作することは絶対にしないでください。火傷の恐れがあります。)</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">実験台上○</p>	<p>シャーレの蓋は開けないでください。</p> <p>形質転換実験で使用するマスタープレートの必要数だけ、プレートを用意してください 6班の場合は、6枚アンピシリン無プレート(Amp⁻)が必要です。</p> <p>ガスバーナーはオレンジ色の炎が見えるように空気量を調節してください。</p>

<p>3.</p>	<p>大腸菌 JM109（緑色チューブ）を冷凍庫から取り出し、氷水上で溶かします。チューブの蓋を開け、マイクロループを菌液中にさし込みます。ループを菌液中に一度差し込み、引き抜くだけで、ループに大腸菌が附着します。</p>	<p>キット添付のマイクロループはプラスチック製です。ガスバーナーの火に近づけないでください。</p> <p>大腸菌 JM109(緑色チューブ) 1本で、十分な枚数分のプレートの作製が可能です。</p>
<p>4.</p>	<p>マイクロループを毎回かえる必要はありません。ジグザグの線を書くようにプレートの培地表面を撫で一定の方向に画線します。次に、プレートを左に 90 度回転させ最初に引いた線に触れた後、またジグザグに線を引いていきます。さらに、プレートを左に 90 度回転させた後、2 番目に画線した線からジグザグに線を引いていきます。(*1)</p>  <p>マイクロループを強く培地表面に押し当て画線すると、培地に穴が開いてしまいます。培地表面を撫でるように画線して下さい。</p> 	<p>マイクロループを使用しない時は先端が実験台等に触れないよう、プレートの培地上に置いてください。</p> <p>先端が手や実験台などに触れてしまった場合は、新しいものと交換してください。</p>

(*1) ジグザグに大腸菌を広げることを画線培養と呼びます。一度画線した部分に触れた後、また線を引くことで大腸菌液が引き伸ばされ、最終的に菌体の一つずつ離れている状態になります。この菌体が1つの点の状態をコロニーと呼びます。このコロニーを得るために画線培養を行います。

<p>5.</p>	<p>蓋をして表面が乾くのを待ちます。表面が乾いたら、プレートを重ね、一部をビニールテープなどでとめてください。<u>プレートを逆さ(蓋が下にくるよう)にして</u>、翌日まで 37℃のエアインキュベーター内に投入して培養します。(*2)</p> 	<p>プレート横の周囲全体にテープ等を巻かないでください。テープは予期せず蓋が開くのを防ぐために使用しています。(*3)</p> <p>培養時間 16 時間を目安に、コロニーの大きさが 1 mm になるまで培養してください。(*4)</p>
<p>6.</p>	<p>実験終了後、実験台の上を滅菌用エタノールで拭き、実験室を出る前に必ず石鹸等で手を洗ってください。</p> <p>翌日の朝、プレートをインキュベーターから取り出し、形質転換実験を行うまで冷蔵庫で保存します。</p>	

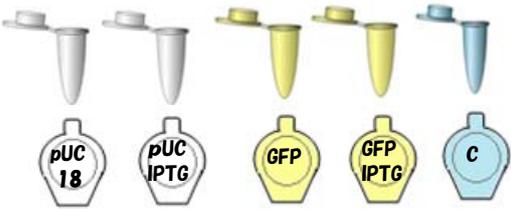
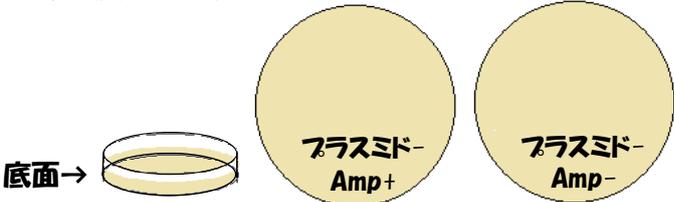
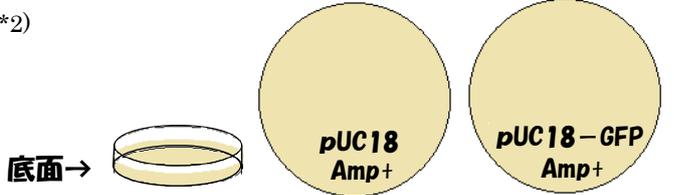
(*2) 逆さまにして置くのは、培養中に蒸発した培地の水蒸気が蓋の裏に付き、水滴がプレートの培地表面に流れることを防ぐためです。

エアインキュベーター：機器内を一定の温度に維持でき、大腸菌の生育に最も適した 37℃に保温して大腸菌を培養します。

(*3) 大腸菌の成長には空気が必要です。テープ等で完全に密封するとガス交換ができなくなり大腸菌は生育できません。逆さまにして置くのは、培養中に蒸発した培地の水蒸気が蓋の裏に付き、水滴がプレートの培地表面に流れることを防ぐためです。

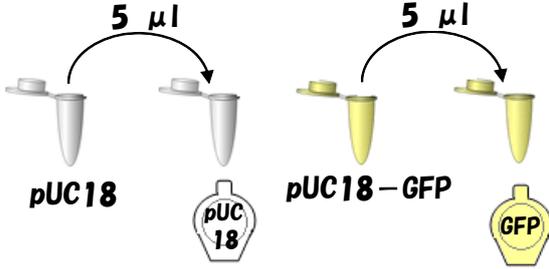
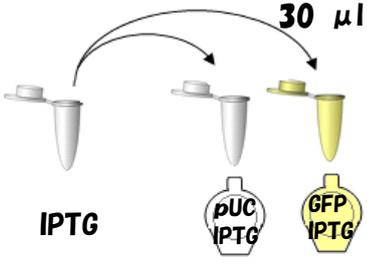
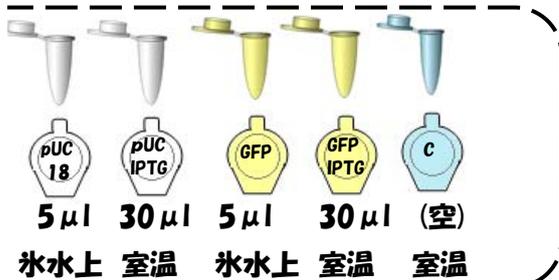
(*4) コロニーが小さすぎると次に行う形質転換で使用する大腸菌の数が少なくなり、十分な形質転換効率が得られません。また培養しすぎても大腸菌の増殖能力が弱くなり、形質転換に影響が出ることがあります。

3) 実験操作 <実験方法 2:2 日目> 形質転換実験

実験手順	注意点
<実験の準備>	
各チューブ・プレートにラベル名を記入する	
<p>1. 1.5ml チューブ (透明) 2本の蓋にそれぞれ「pUC18」、「pUC IPTG」、 1.5 ml チューブ (黄色) 2本にそれぞれ「GFP」、「GFP IPTG」、 1.5 ml チューブ (水色) 1本に「C」と油性ペンで記入します(*1)。</p>  <p>後で使用するアンピシリン無プレート(Amp⁻)、アンピシリン有プレート(Amp⁺)にも先に記入します。</p> <p><u>アンピシリン有プレート (Amp⁺) (2枚) :</u> pUC18 用 1枚、pUC18-GFP 用 1枚、計 2枚の底面に小さくそれぞれにサンプル名を油性ペンで記入します。</p>  <p><u>アンピシリン有プレート (Amp⁺) (1枚)、</u> <u>アンピシリン無プレート (Amp⁻) (1枚) :</u> アンピシリン有プレート(Amp⁺)を1枚、アンピシリン無プレート(Amp⁻)を1枚、計 2枚の底面に小さくそれぞれ“プラスミドー”と記入します。(*2)</p> 	<p>自分のチューブが分かるよう記名してください。</p>  <p>シャーレの蓋は開けないでください。</p> <p>形質転換実験用として使用します。</p> <p>コントロール実験用として使</p>

(*1) 「C」とは、コントロール実験を意味しています。今回の形質転換実験の対照実験(Control)として、形質転換をしていない大腸菌 JM109 が、アンピシリンを添加したプレート (Amp⁺) で生育できないことを確認するための実験です。

(*2) プラスミドー(マイナス): プラスミド DNA を導入していないことを示しています。形質転換実験 (pUC18、pUC18-GFP の導入) と区別するために記入します。

実験手順	注意点
<実験の準備>	
試薬の分注 (1 で記入したチューブへ)	
<p>2. マイクロピペット (P20) を使います。 プラスミド DNA を 5 μl ずつ分注します。 pUC18 (白色シール) を「pUC18」と書いた 1.5 ml チューブ (透明) へ、pUC18-GFP (黄色シール) を「GFP」と書いた 1.5 ml チューブ (黄色) へ、それぞれ 5 μl ずつ入れます。 5 μl ずつ入れた 1.5 ml チューブは氷水上におきます。(*4)</p>  <p>3. マイクロピペット (P200) を使い、IPTG を 30 μl ずつ分注します。 IPTG を「pUC IPTG」(透明)、「GFP IPTG」(黄色)と書いた 1.5 ml チューブへ 30 μl ずつ入れます。 入れた後はチューブ立てに立てて実験手順 12. まで室温に置いておきます。</p>  <div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> <p>確認</p>  </div>	<p>pUC18、pUC18-GFP 溶液はチューブへ分ける前に数回ピペッティング(*3)して溶液を混合し、できるだけチューブの底の方へ入れてください。</p>

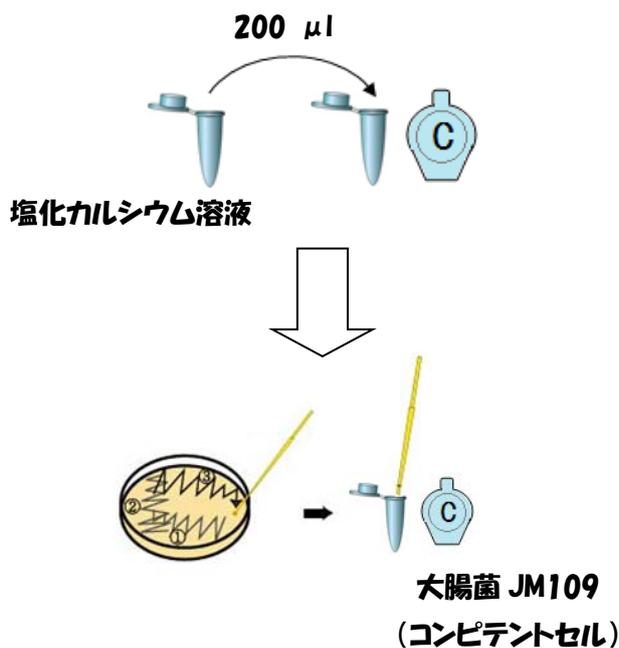
(*3) ピペッティング：マイクロピペットを用いて液をゆっくり出し入れすることです。この時できるだけ気泡ができないよう注意してください。

ピペッティングの代わりにタッピング(チューブの底を手で軽くはじき、中の溶液を混合する操作)で混合しても良いです。しかし、タッピングを行った場合、チューブ内の溶液がチューブの壁に飛び散るため、卓上遠心機を用いてチューブの底へ溶液を集めてから次の実験操作を行ってください。

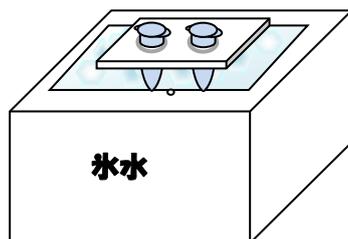
<コンピテントセルの作製>

塩化カルシウムと大腸菌 JM109 を混合し、氷水上でインキュベートする。

4. 塩化カルシウム（水色チューブ）を「C」（水色チューブ）へ **200 μ l** 加えます。次に、大腸菌マスタープレートを用意します。大腸菌マスタープレートよりマイクロループを用いてコロニーをかきとり、「C」（水色チューブ）に懸濁し、氷水中に置きます。（*4）



5. コロニーを懸濁したチューブをフロートに差して、氷水中で **5 分間** 放置します。（氷水中に置く時間は多少長くなっても構いません。）（*5）



形質転換効率を高くするためには、塩化カルシウムを加えた後も、できるだけチューブを冷えた状態にすることが重要です。

塩化カルシウムは数回ピペティングして溶液を混合してから大腸菌 JM109 に添加してください。

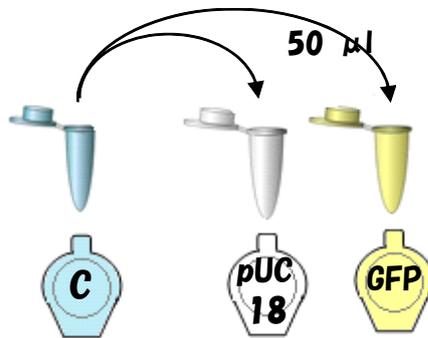
(*4) DNA は比較的安定な物質のため、氷上に放置していても問題ありません。しかし大腸菌 JM109 は使用する直前まで溶かさずにフリーザーに入れておいてください。融解したまま長時間放置すると形質転換効率が下がり、十分なコロニー数が得られない場合があります。

(*5) 氷だけでは冷却効率がよくない場合がありますので、氷に水を入れて氷水を作り、フロートにチューブを差して氷水に浮かせて冷やしてください。

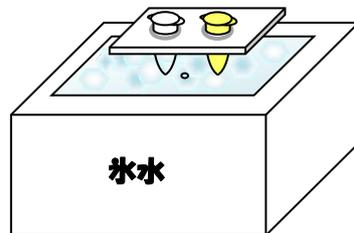
<形質転換：プラスミド DNA(pUC18, pUC18-GFP)の導入>

コンピテントセルとプラスミド DNA を混合し、熱処理にて DNA を大腸菌内に導入する

6. 5分経ったら、塩化カルシウムを加えた大腸菌「C」(コンピテントセル、水色チューブ) をピペッティングして軽く混合します。
pUC18が入った「pUC18」チューブ(透明)に 50 μl 入れ、3~4 回ピペッティングして混ぜて氷水上に置きます。
同様に pUC18-GFP を入れた「GFP」チューブ(黄色)にも 50 μl のコンピテントセルを加え、ピペッティングで混ぜて氷水上に置きます。



7. 実験操作6.でコンピテントセルを入れた2つのチューブをフロートの穴に入れて、氷水上で 10 分間放置します。

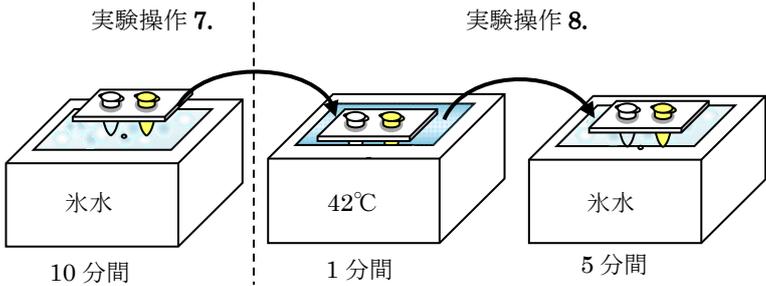
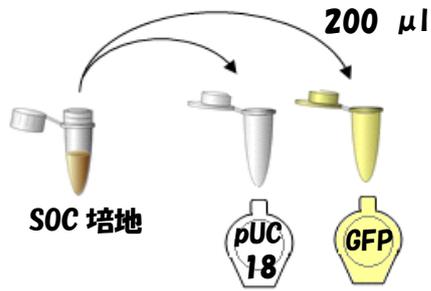


次の熱処理に 42°Cの水を使用します。
実験前に準備したお湯が 42°Cになっているか確認してください。
準備ができるまでチューブは氷水につけておいてください。
(氷水上に置く時間は多少長くなっても構いません。)

残ったコンピテントセル(塩化カルシウム処理した大腸菌)は氷上に置いておきます。
後の、コントロール実験(非形質転換大腸菌の培養実験)に使用します。

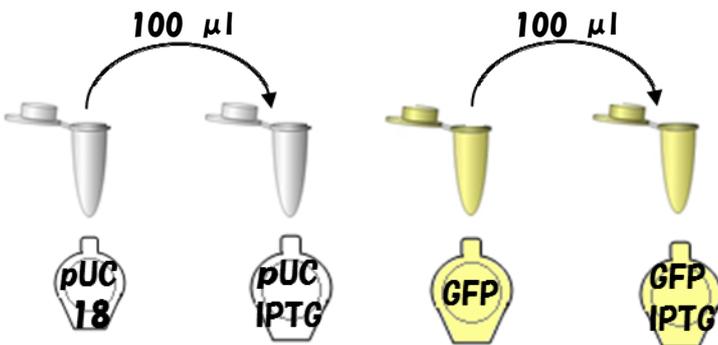
チューブが氷に良く接しているか確認してください。

ウォーターバス、あるいは発泡スチロール箱にお湯をはって準備します。

<p>8.</p>	<p>タイマーを用意します。</p> <p>実験操作 7.の2つのチューブをフロートごと、42°Cの水浴に浮かべて1分間放置します。</p> <p>1分経ったら、すぐに氷水上にチューブを移し5分間放置してください。 (氷水中に置く時間は多少長くなっても構いません。)</p> <div style="text-align: center;">  </div>	<p><u>42°C、1分間が重要。</u></p> <p>この操作を<u>ヒートショック</u>といいます。</p> <p>これにより DNA の導入効率が高くなります。この<u>処理時間と温度は厳守</u>してください。</p> <p>チューブをフロートにしっかり差し込んで、42°Cの水浴に必ず接するようにしてください。</p>
回復培養		
<p>9.</p>	<p>2分経ったらそれぞれのチューブに SOC 培地 (スクリュウチューブ) を 200 μl ずつ加え、数回穏やかにピペッティングして混合します。(*6)</p> <p>入れた後はチューブ立てに立てておきます。</p> <div style="text-align: center;">  </div>	
<p>10.</p>	<p>37°Cのエアインキュベーター内 (あるいは 37°Cの水浴中) で 10 分間インキュベートします。(*7)</p> <p>(このインキュベートは多少長くなっても構いません。)</p>	

(*6) SOC 培地を加えることで熱処理や DNA を取り込んだ際の大腸菌のダメージを回復し、形質転換効率を高めます。

(*7) エアインキュベーター：機器内を一定の温度に維持でき、大腸菌の生育に最も適した 37°Cに保温して大腸菌を培養します。

＜コントロール実験＞	
<p>11.</p>	<p>インキュベーター中に次の実験操作＜培養＞で使用するチューブを確認します。(*8)</p> <div style="text-align: center;">  </div>
＜培養・データ処理＞	
<p>12.</p>	<p>実験操作 3.で IPTG 溶液を入れた 2 つのチューブ、「pUC IPTG」（透明）、「GFP IPTG」（黄色）を使用します。</p> <p>10 分後、実験操作 10.の 2 つのチューブ「pUC18」と「GFP」をインキュベーターから取り出し、室温で数回穏やかにピペッティングして混合します。</p> <p><u>pUC18 形質転換大腸菌</u>「pUC18」を IPTG 溶液の入ったチューブ「pUC IPTG」へ 100 μl 加え、数回ピッペティングし混合します。同様に、<u>pUC18-GFP 形質転換大腸菌</u>「GFP」を IPTG 溶液の入ったチューブ「GFP IPTG」へ 100 μl 加え混合します。</p> <div style="text-align: center;">  </div>

(*8) 「コントロール実験」をわかりやすくするため、あえて確認作業をしています。

13.

ガスバーナーの火をつけます。

以下の操作はガスバーナーの近くで行うようにしてください。

火傷に注意してください。

(クリーンベンチ内で操作しない場合、ガスバーナーの近くであれば実験台の上で操作しても問題はありません。空気中からの細菌の落下を少なくし、無菌に近い状態を作ることができます。ガスバーナーの火に近づけようと、空中で操作することは絶対にしないでください。火傷の恐れがあります。)



ガスバーナーはオレンジ色の炎が見えるように空気量を調節してください。

14.

(1)

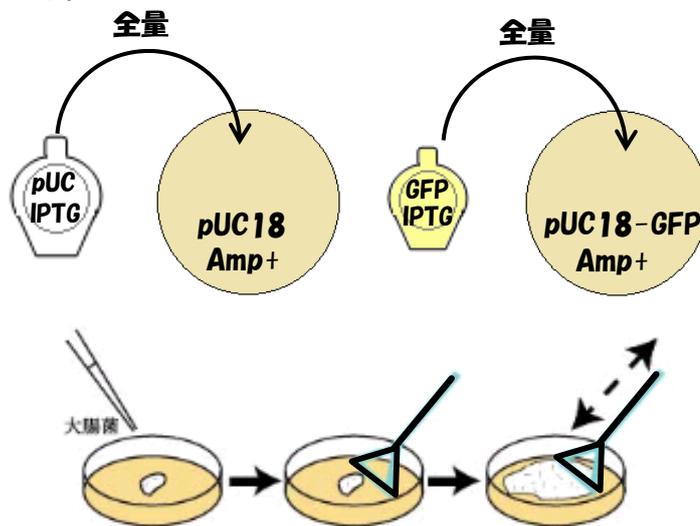
実験操作 1.で準備したアンピシリン有プレート「pUC18 Amp⁺」、
「pUC18-GFP Amp⁺」の2枚を用意します。

実験操作 12.で IPTG と混合した大腸菌液を塗布し、添付のコンラージ棒を用いて、プレート表面にできるだけ均一になるように大腸菌を塗布します。

アンピシリン有プレート「pUC18 Amp⁺」に IPTG 混合 pUC18 形質転換大腸菌「pUC IPTG」を全量 (およそ 130 μl) 塗布します。

アンピシリン有プレート「pUC18-GFP Amp⁺」に IPTG 混合 pUC18-GFP 形質転換大腸菌「GFP IPTG」を全量 (およそ 130 μl) 塗布します。

全体にひろげたら、蓋をして表面の水分が培地に吸収されるのを少し待ちます。



チップ、コンラージ棒はプレートごとに新しいものを使用してください。

キット添付のコンラージ棒はプラスチック製です。ガスバーナーの火を近づけないでください。

(2)

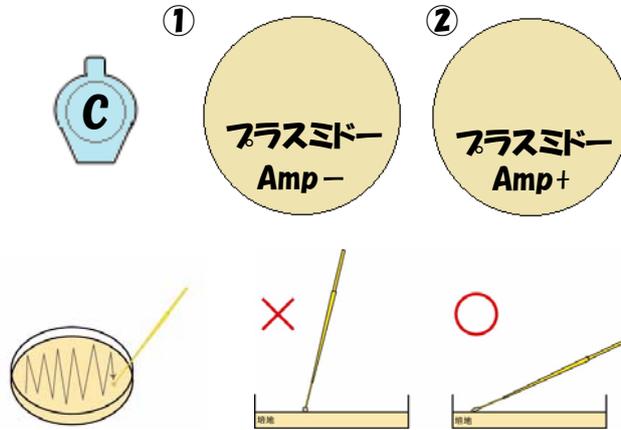
コントロール

実験操作 1. で準備したアンピシリン無プレート「プラスミド⁻ Amp⁻」1枚、アンピシリン有プレート「プラスミド⁻ Amp⁺」1枚を用意します。(Amp⁺)

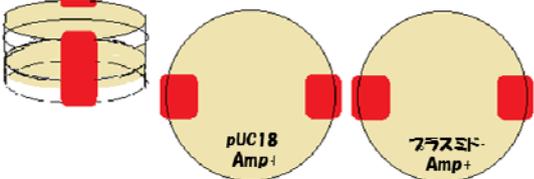
実験操作 11. で分注したコンピテントセルの入った「C」チューブ（水色）に、マイクロループの先を付けます。

大腸菌の付着したマイクロループで、まずアンピシリン無プレート (Amp⁻) 培地表面を撫でるようにジグザグの線を一定の方向に向かって引きます。(*9)

マイクロループを新しいものと交換し、同様の方法でアンピシリン有プレート (Amp⁺) へも大腸菌をひろげます。(*9)



(*9) このような画線培養は大腸菌のような細菌を扱った実験には良く使われる基本的な操作です。一般的にはこのようにジグザグにプレートへひろげることが多いですが、この実習ではとくにジグザグに線を引くことにこだわる必要はありません。大腸菌の付いたマイクロループでアンピシリン無プレート(Amp⁻)に絵や文字を書くと、翌日にはその形に大腸菌が増殖してきます。

<p>15.</p>	<p>塗布した大腸菌液の水分が培地に吸収され、表面が乾いたら2枚のプレートを重ねて一部をビニールテープなどでとめてください。<u>プレートを逆さ（蓋が下にくるよう）にして、翌日まで 37℃インキュベーター中で培養します。</u></p>  <p>実験終了後、実験台の上を滅菌用エタノールで拭き、実験室を出る前に必ず石鹸等で手を洗ってください。</p>	<p>プレート横の周囲全体にテープ等を巻かないでください。 (*10)</p> <p>培養時間 16 時間を目安にコロニーの大きさが 1 mm になるまで培養します。</p>
<p>16.</p>	<p>翌日の朝、プレートをインキュベーターから取り出し、観察するまで冷蔵庫で保存します。</p>	

(*10) 大腸菌の成長には空気が必要です。テープ等で完全に密封するとガス交換ができなくなり大腸菌は生育できません。テープは予期せず蓋が開くのを防ぐために使用しています。逆さまにして置くのは、培養中に蒸発した培地の水蒸気が蓋の裏に付き、水滴がプレートの培地表面に流れることを防ぐためです。

10.データの解析

プレートの観察

プレートに生育してきた大腸菌（コロニー）を観察します。

1) コロニーの計数

油性ペンなどでシャーレの蓋の上からコロニーに印（点）をつけながら数えると、二重に数えることを防ぐことができ正確に計数できます。

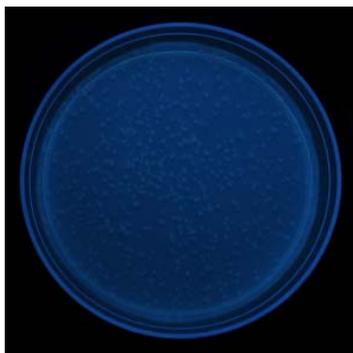
コロニー数が多い場合は、計数カウンターを使用するか、プレートにペンで線を引いて面積を4等分（あるいは8等分）してその中にあるコロニーを数えてから、4倍（8倍）して全体のコロニー数を出してください。

2) コロニーの蛍光の観察

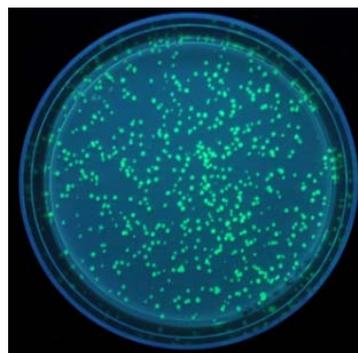
pUC18-GFP DNAを導入した大腸菌にUVライトを照射すると緑色に光って見えます。UVライトがない場合は、暗くした部屋やプレートの周りを段ボール等で囲って暗くした中で市販のブラックライトを照射することで蛍光を観察できます。

※ UVライトやブラックライトを直接目で見ないでください。必要に応じて目や皮膚を保護するためゴーグル等の防護器具を使用してください。

<UVライト照射時のコロニー>



pUC18 DNA 導入大腸菌



pUC18-GFP DNA 導入大腸菌

次ページのフォームに、コロニー数、光っているコロニー数、その他気が付いた点について記載してください。

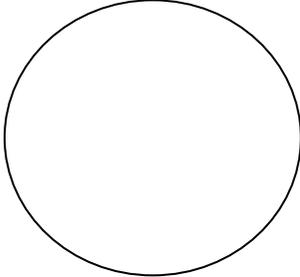
<実験結果>

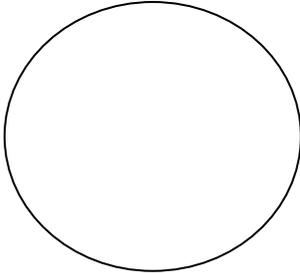
1) 大腸菌形質転換実験

pUC18 DNA 形質転換プレート (pUC18 Amp ⁺)	
コロニー数	
光っているコロニーの数	
気づいた点など	

pUC18-GFP DNA 形質転換プレート (pUC18-GFP Amp ⁺)	
コロニー数	
光っているコロニーの数	
気づいた点など	

2) 非形質転換大腸菌の培養実験(コロニーの様子を写真に撮るかスケッチしてください)

	<u>JM109Amp⁻プレート (プラスミド⁻ Amp⁻)</u>
	気づいた点など

	<u>JM109Amp⁺プレート (プラスミド⁻ Amp⁺)</u>
	気づいた点など

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 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 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: pUC18 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(+)のプレート上で生育していないが、pUC18 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 pUC18 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性質が加えられたためと考えられる。つまり、pUC18 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: pUC18 形質転換プレートと pUC18-GFP 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：

pUC18 で形質転換した大腸菌 JM109、pUC18-GFP で形質転換した大腸菌 JM109 はともにアンピシリン(+)のプレート上で白いコロニーを形成して生育している。つまり、pUC18 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。次に、両プレートに UV を照射し比較する。pUC18 で形質転換した大腸菌 JM109 に変化は見られないが、pUC18-GFP で形質転換した大腸菌 JM109 は緑色の蛍光を発色する。これは、pUC18-GFP がもつ GFP 遺伝子が菌体内で発現し、緑色蛍光物質 GFP を菌体内で作る性質が加えられたことを示している。

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 pUC18 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、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。

$$\frac{2 \text{ (ng / }\mu\text{l)} \times 5 \text{ (}\mu\text{l)}}{\text{初めの DNA 量}} \times \frac{100 \text{ (}\mu\text{l)}}{255 \text{ (}\mu\text{l)}} \div \frac{\text{プレートへ播いた量}}{\text{チューブ内の量}} = 3.9 \text{ (ng)}$$

プレートへ播いた割合

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。

11. 廃棄物の処理

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、シャーレと培地に分け、それぞれをオートクレーブ専用の袋に入れます。

(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。念のため二重にすることをお勧めいたします。)

オートクレーブ滅菌は 121℃で 20 分間行います。

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。

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

フリーファックス: 0120-052-806

株式会社ニッポンジーン

TEL: 076-451-6548

FAX: 076-451-6547

ホームページ: <https://www.nippongene.com/siyaku/>