

企画「大腸菌の形質転換実験」

著者	上田 瑞恵, 大橋 和義
雑誌名	技術報告
巻	19
ページ	31-34
発行年	2014-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00008038

企画「大腸菌の形質転換実験」

○上田 瑞恵

技術部 教育支援部門

1. はじめに

本実験を行うきっかけは7月の東海北陸地区国立大学法人等技術職員合同研修(生物・生命)に参加したことです。そこで遺伝子組み換えの原理について学びました。そして、実際に遺伝子組み換えをしたいと考え本企画を計画しました。

2. 遺伝子組み換えとは

今日遺伝子組み換え技術はマウスやバラなど様々な生物に応用され研究されています。遺伝子組み換え方法の1つとして目的の遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌に導入することで形質転換を行う方法があります。形質転換とは宿主細胞に外来DNAを導入して、その遺伝的形質を変化させることをいいます。プラスミドDNAにより細胞を形質転換するためには、細胞に対して化学的あるいは物理的処理を施し、DNAを取り込みやすくさせる必要があります。細胞へのDNA取り込みが促進された状態の細胞をコンピテントセルと呼びます。大腸菌のコンピテントセルに対して外来DNAを連結したプラスミドDNAを加えて取り込ませたのち、適当な薬剤を含む培地上で培養します。プラスミドを取り込んで薬剤耐性を獲得した細胞のみが培地上で生育でき、コロニーとよばれる集落を形成します。[1]

3. 企画「大腸菌の形質転換」

3.1 企画概要

日時：1回目 2013年9月18日、19日

2回目 2013年11月14日、18日

場所：生物実験室 3-154

参加者：江上智恵・大橋和義・島田陽子・安原裕子（50音順 敬称略）

3.2 企画内容

1日目は遺伝子組み換えについて簡単な説明を行いました。次に使用する器具や実験手順について説明を行いました。その後、実際に遺伝子組み換えを各行いました。2日目には調製した大腸菌を播種した種々の条件のプレートの観察を行いました。

3.2.1 実験方法

①大腸菌を、プレートからそれぞれ新しいループを使用してコロニーを釣菌し、両方のチューブにそれぞれ加える。直径1mmのコロニーを使用する。大腸菌が細かく分散するようによく混ぜる（30秒）。

②氷上に5分間静置する。

③組換えを起こすチューブ（ピンク）にプラスミド溶液50 μ l（0.5mlチューブ）を、新しいピペットを使用して全量加えて混ぜる。

*プラスミド（溶液）は、チューブの蓋や壁などに付いていないことを確認してから計り取る。

④チューブ（ピンク・白）をチューブラックに挿した状態で、氷上に10分間静置する。

⑤チューブ（ピンク・白）を42℃に設定した恒温槽に1分間浸し、直ちに氷上に戻して2分間静置する。

(チューブはチューブラックに挿した状態で操作する) ⇒ヒートショック

⑥SOC 培地を新しいピペットを使用して、260 μ l ずつ両方のチューブに加える。

⑦37°Cのインキュベーターで10分間静置する。

⑧LB/amp プレート1枚にX-gal とIPTG を65 μ l ずつ加え、コンラージ棒を使用して培地全体に広げる。

⑨チューブをボルテックスミキサーでよく混ぜる(30秒)

⑩新しいピペットを使用して、下記のようにそれぞれの大腸菌混合液をそれぞれのプレートに130 μ l ずつ植菌する。

⑪それぞれ新しいコンラージ棒を使用して、プレート全体に大腸菌混合液を広げる。

⑫プレートを逆さまにして、37°Cのインキュベーターで24時間以上静置して培養する。

3.2.2 1回目の結果と考察

大腸菌が生えていませんでした。この原因として攪拌する時間が長かったことと、大腸菌が死滅期であったためと考えられます。改善策として、攪拌を転倒混和に変更し、大腸菌を前日から別のプレートで培養することによって対数増殖期の大腸菌を用いて実験することが挙げられます。実験手順を上記の部分を変更し実験を再度行いました。

3.2.3 2回目の結果と考察

表1にシャーレの調製条件と結果を示します。1はアンピシリンやIPTG、X-gal を添加していない培地に遺伝子組み換えしていない大腸菌を播種したシャーレです。シャーレー面に大腸菌が増殖していることが確認できました。2は1の培地にアンピシリンを添加した培地上に遺伝子組み換えしていない大腸菌を播種したシャーレです。全く大腸菌が増殖していませんでした。この結果から遺伝子を組み換えない大腸菌はアンピシリン耐性を持たないことが確認できました。3は2と同じ条件の培地に遺伝子を組み換えた大腸菌を播種したシャーレです。コロニーと呼ばれる菌体の塊が確認できました。この結果から遺伝子を組み換えた大腸菌はアンピシリン耐性を持っていることが確認できました。4はアンピシリンとIPTG、X-gal を添加した培地に遺伝子組を組み換えた大腸菌を播種したシャーレです。青色と白色の2種類のコロニーが観察できました。この結果から β -gal を生成する遺伝子の導入が成功しX-gal が加水分解されることにより青色に呈色したことが確認できました。また、4にUVを照射すると白色のコロニーが発光していることが確認できました。これは、発光タンパク質遺伝子の導入が成功しているためです。

4. 謝辞




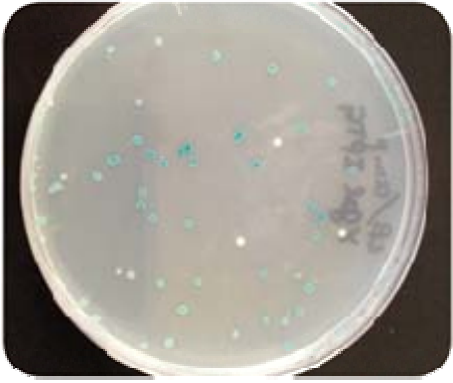
UVランプを貸与していただいたプロジェクト安全支援部門 増田 健二 様に謝意を表します。

参考文献

[1] 大倉一郎, 北爪智也, 中村聡:「新版 生物工学基礎」講談社(2002), p.98

[2] 田村隆明 編:「改訂第3版 遺伝子工学実験ノート 上 DNA実験の基本をマスターする」(1997), p.47

表1 シャーレの調製条件と結果

	No.		アンピシリン	IPTG	X-gal
遺伝子組み換えあり	1		-	-	-
	2		+	-	-
遺伝子組み換えなし	3		+	+	-
	4		+	+	+

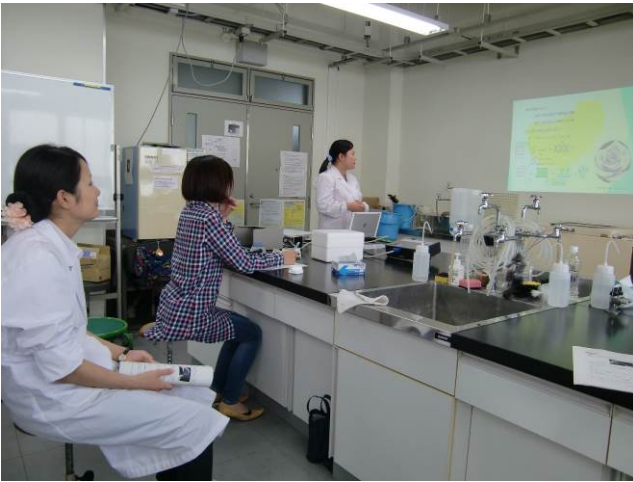


図1 説明風景



図2 実験風景

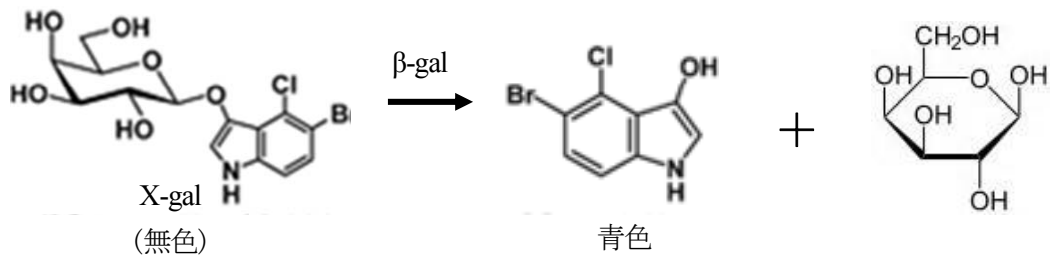


図3 X-galの加水分解[2]

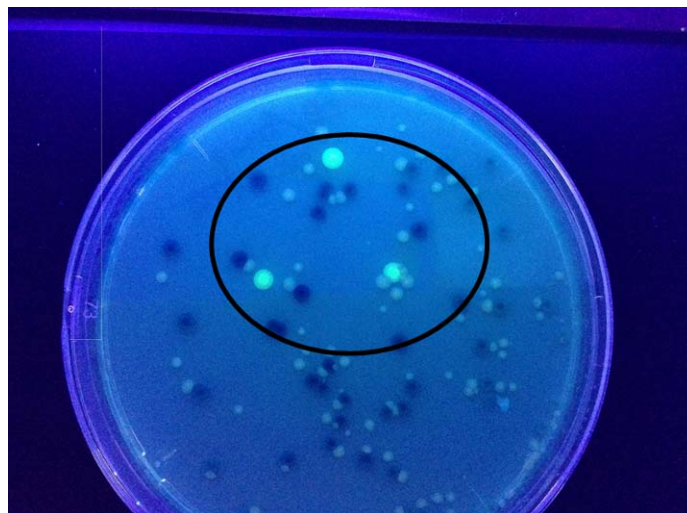


図4 発光写真