

大腸菌の形質転換 ～オワンクラゲのGFP遺伝子を組み込む～

第1日目

【目的】

遺伝子組換え操作の一部を行い、その結果を自分の目で確認するとともに、実験結果の考察を通して、考える力を養うことに取り組む。実習手順については英語版テキストを用い、科学英語を学習する機会とする。

【準備物】

あらかじめ準備・調整されているもの

- ・大腸菌スタープレート … 1枚/班
- ・培地調整済みのシャーレ … 4枚/班
- ・調整済「pGLOプラスミド」溶液 … 全員で共用する

各班のテーブルに用意されているもの

- ・上記の5枚のプレート
- ・マイクロチューブ … 3本 (LB・+・-)
- ・植え付け用ループ (黄色)
- ・マイクロピペット (200μl)
- ・チップ
- ・クラッシュアイスボックス
- ・ガラス瓶 (使用済みのピペットやマイクロチューブを入れる)
- ・70%エタノール (滅菌用に随時使用する)

【注意事項】

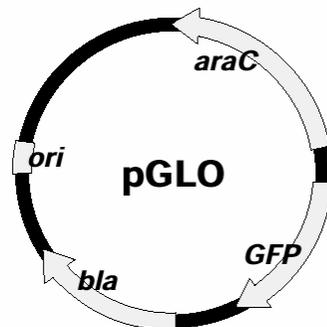
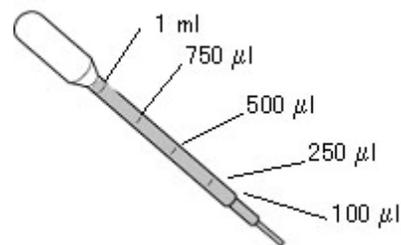
本実習は、P1レベルで実施することが義務づけられており、下記の点に留意すること。

- ・出入り口、窓の封鎖 (入り口への表示)
- ・実習者の特定
- ・実習室を出るときの洗浄
- ・扱う微生物の不活性化 (→実習後、滅菌して処理する)

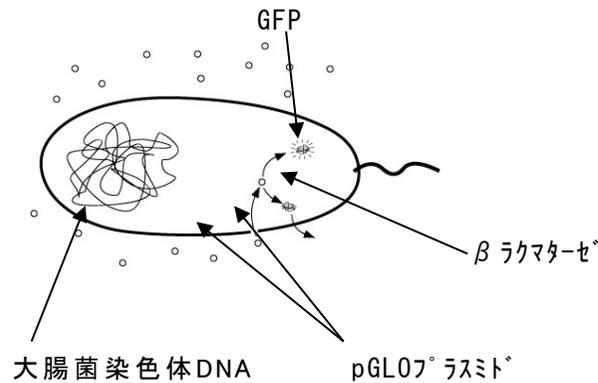
⇒ **白衣の着用、洗浄の徹底 ※真剣に、慎重に取り組むこと。**

【方法】 (別紙参照：英語版)

- ・ピペットの目盛りは以下のようにつけられています。
- ただし今回の実験ではマイクロピペットを代わりに使用します。



1. 「大腸菌」と「プラスミド (pGLOプラスミド)」と「GFP遺伝子」の関係



※大腸菌には染色体DNAと環状DNA (プラスミド) の両方が含まれている。

※pGLOプラスミドは事前に調整されたもので、今回の操作で菌体内に取り込ませる。このpGLOプラスミドにはGFP遺伝子が組み込まれている。

☆ pGLOプラスミド

このプラスミド (環状DNA) には、オワンクラゲのDNAから切り取ってきた **GFPというタンパク質をコードする遺伝子** と、抗生物質アンピシリン耐性を発揮する **βラクターゼというアンピシリン分解酵素をコードする遺伝子** が組み込まれている。

2. pGLOプラスミドを大腸菌内に導入する方法

- ・ヒートショック … 【 ice→42°C/50seconds→ice 】
- ・形質転換用溶液 (CaCl₂を含む)

3. 培地に添加したアンピシリン (amp) とアラビノース (ara) について

アンピシリン … 抗生物質の一種。これを添加したプレートでは、アンピシリン耐性をもつ菌類しか生育できない。

アラビノース … 糖の一種。エネルギー源や炭素源となる。今回の実験では、アラビノースの存在によってGFP遺伝子が発現するように「pGLOプラスミド」が調整されている。

{実験を成功させるためのポイント}

コンタミネーションを防ぐ ヒートショックが成否の鍵

実験日	組	番号	氏名
年 月 日			

大腸菌の形質転換① ~オワンクラゲのGFP遺伝子を組み込む~

第2日目

【実験結果を予想しよう！】

1 形質転換されていない大腸菌（-DNAチューブ）をまいた2枚のプレートについて、それぞれのプレートには大腸菌が増殖していますか。

プレート	プラスミド導入の有無	増殖の有無
LB	-DNA	()
LB / amp	-DNA	()

上記のように予想した理由を書きなさい。

2 プラスミドを導入した大腸菌（+DNAチューブ）をまいた2枚のプレートについて、それぞれのプレートには大腸菌が増殖していますか。

プレート	プラスミド導入の有無	増殖の有無
LB / amp	+DNA	()
LB / amp / ara	+DNA	()

上記のように予想した理由を書きなさい。

【実験結果をまとめる】

1. 4つのプレートを観察して、それぞれのプレートの様子をまとめなさい。左側には、大腸菌のコロニーの様子を絵で描きなさい。右側には、その他気づいた点を文章で記載しなさい。

(例.コロニーの色、コロニーの数など)

Observations					
Transformation plates	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 15%; padding-right: 5px;">+pGLO LB/amp</td> <td style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 5px;">+pGLO LB/amp/ara</td> <td style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px;"></td> </tr> </table>	+pGLO LB/amp		+pGLO LB/amp/ara	
+pGLO LB/amp					
+pGLO LB/amp/ara					
Observations					
Control plates	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 15%; padding-right: 5px;">-pGLO LB/amp</td> <td style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px;"></td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 5px;">-pGLO LB</td> <td style="text-align: center; border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 60px; height: 60px;"></td> </tr> </table>	-pGLO LB/amp		-pGLO LB	
-pGLO LB/amp					
-pGLO LB					

プレートの種類	+ p G L O LB/amp	+ p G L O LB/amp/ara	- p G L O LB/amp	- p G L O LB
コロニー数				

2. 紫外線を照射したとき、光って見えるコロニーが含まれるのはどのプレートですか。

そのプレートで光って見えるものは何ですか。

実験日	組	番号	氏名
年 月 日			

大腸菌の形質転換② ~オワンクラゲのGFP遺伝子を組み込む~

第2日目

【実験結果の考察】

1. 次の2つのプレートの様子（紫外線照射時）の違いは、なぜ生じるのですか。
『+DNA LB/amp』 と 『+DNA LB/amp/ara』

2. 4つのプレートの様子（実験結果）を比較することで、どのようなことがわかりますか。4つのプレートから2つを選び、その比較からわかることを考えましょう。
(プレートの選択については、対照実験となる組み合わせを考えること)

(例) AとBのプレートを比較すると、「……………」ということがわかる。

(1)

(2)

3. 形質転換（遺伝子導入）は、どの程度の割合で生じているのでしょうか？

(1) 各班で、「LB/amp/ara」のプレートに現れたコロニー数に違いはないですか。

1班	2班	3班	4班	5班	6班	7班	8班	9班	10班

(2) (1)の結果は、どのようなことに起因すると考えられますか。

4. 形質転換効率を求めよう！

形質転換効率は・・・

プレートに生えたコロニー数をプレートにまいたDNA量で割って求める。

* 情報提供します。

プラスミド DNA 濃度	80 mg/l (ng/μl)
プレート1枚に加えたプラスミド DNA 添加量	10 μl

計算してみよう！ 単位は 『菌体数(コロ-数) / μg of DNA』 です。

※生物学者がこの手法で実験をした場合、形質転換効率は、 $8.0 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^3$ です。

5. 感想等

実験日 年 月 日	組	番号	氏名
--------------	---	----	----

