

Dr. ジーン 1 Ver. 2

大腸菌形質転換キット<LacZ 発現系>

別冊 1 実験方法 1

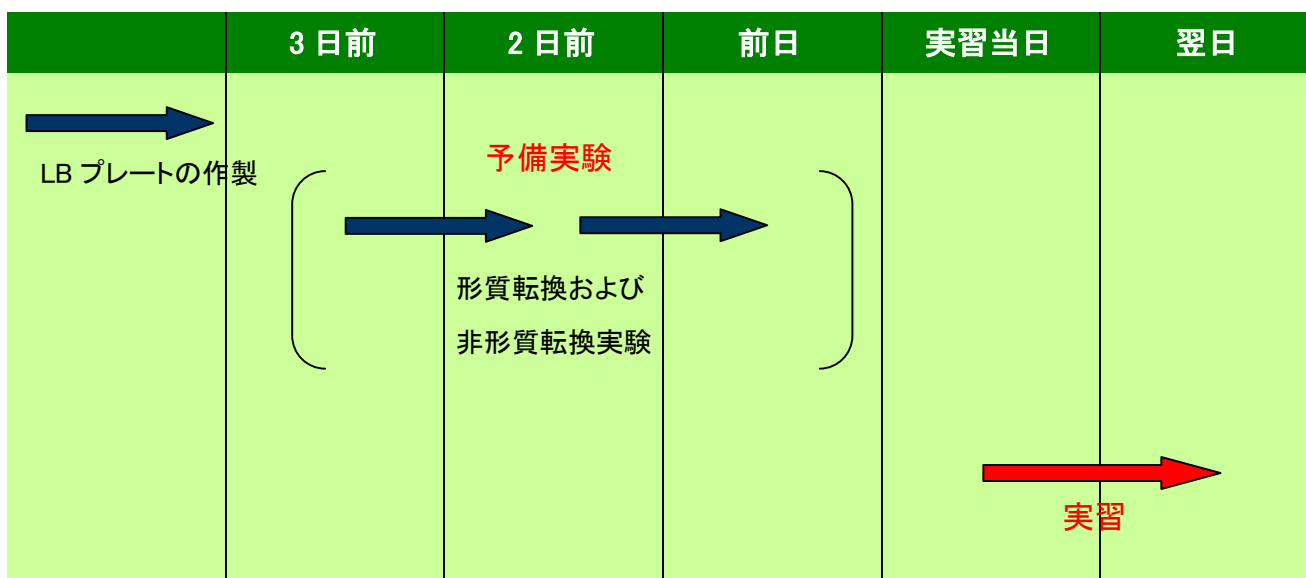
Code No. 310-06351 1 Kit (キット構成：6 班分、12 反应用)

- 実験方法 1/ 実験準備
 - 1) 実験日程
 - 2) 大腸菌培養用プレートの作製
 - 3) 氷の準備
 - 4) 37°Cと 42°Cの水浴
- 実験方法 1/各班の試薬等のチェック
- 実験方法 1/実験プロトコル
 - 1) 大腸菌形質転換実験
 - 2) 非形質転換大腸菌の培養
- 実験プロトコルについて

株式会社ニッポンジーン

実験方法 1 / 実験準備

1) 実験日程



実習の始まる数日前までに、あらかじめ**予備実験**を行っておくことをお勧めします。それによって、キットの性能を確認するとともに、実際に実習をどのように進めていけばよいか確認することができます。

予備実験は上の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**。プレートやプラスチック器具は多少余裕を持たせた包装になっていますが、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。

また、**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素早く取り出し、他の大腸菌を溶かさないうち注意してください。

以下の操作はあらかじめ指導する先生が行ってください。時間に余裕があるのであれば実習を受ける人が行ってもかまいません。

2) 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3日から7日前までに作製して下さい。作製したプレートは室温で2日間放置して、プレートの表面を少し乾かします。その後は使用するまで冷蔵庫で保存して下さい。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。

① LB プレート作製の準備

500ml の三角フラスコにメスシリンダーを用いて 300ml の水を入れ、その後、付属の LB 寒天培地 3 袋を加え攪拌します。もう一方の 500ml 三角フラスコには水 400ml を入れ、その後、付属の LB 寒天培地 4 袋を加え攪拌します。300ml の培地はアンピシリン無しのプレートを、400ml の培地は後からアンピシリンを加えてアンピシリン入りのプレートを作ります。

(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下さい。無ければ、水道水でもかまいません)



メスシリンダーで水を入れる

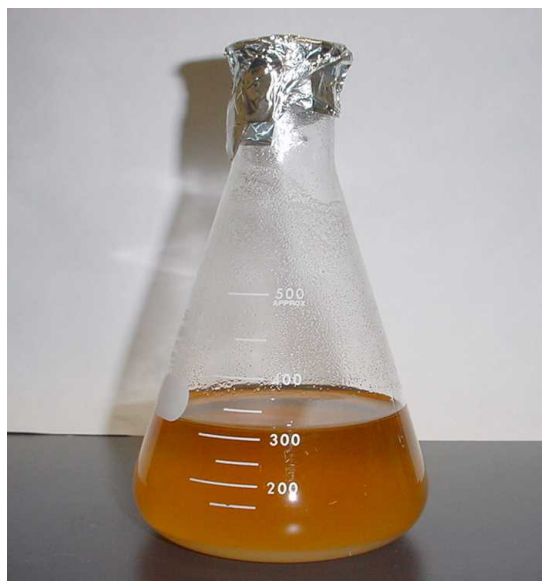


LB 寒天培地を加える

プレート作製に必要な器具と試薬

	フラスコ	水	LB 寒天培地	アンピシリン	プレート数
Amp^rプレート	500ml	300ml	3 袋	—	30 枚
Amp^r+プレート	500ml	400ml	4 袋	+ (400μl)	40 枚

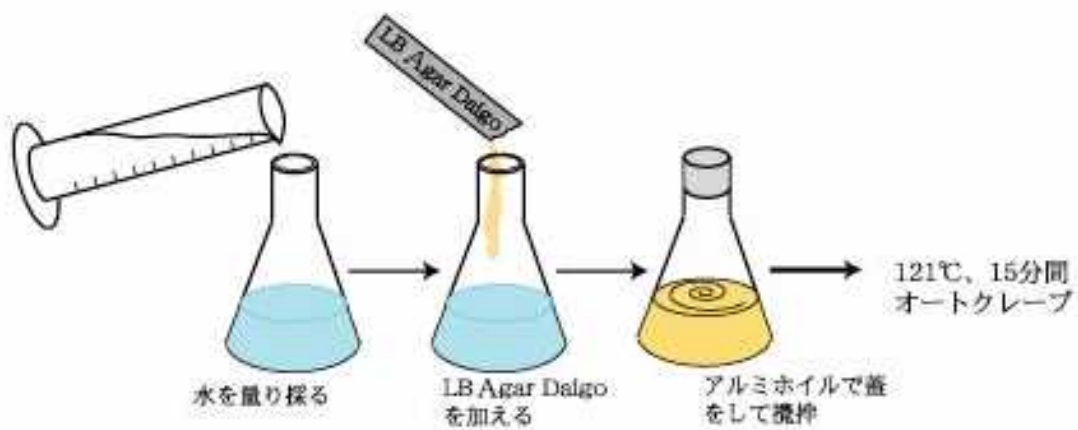
三角フラスコの口にアルミホイルで蓋をし、軽く撹拌します。



アルミホイルで蓋をする



撹拌する



撹拌後、オートクレーブに移し、121℃、15分間滅菌します。

オートクレーブが終了したら、軽く撹拌して培地を混ぜて下さい。培地の入ったフラスコは室温に放置して手で持てるぐらいまで（約50℃）冷まします。



オートクレーブにかける



攪拌する

- 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。少し温度が下がってからオートクレーブから出し、攪拌するようにしてください。
- 培地温度が 27℃以下に下がると固まってしまうので注意して下さい。温度が下がりすぎて培地が一部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ので、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。
- プレートへ培地を注ぎ込むときの温度の目安は、フラスコの外側から培地の入っているところに手を当て、ずっと触ってはいられないぐらいの熱さです（やけどには十分気を付けてください）。熱すぎるとプレートが変形したり、後から加えるアンピシリンが分解してしまう可能性があります。また、温度が低すぎるとプレートへ流し込んでいる途中で培地が固まってしまうます。

② LBプレート(アンピシリン無し)の作製

アンピシリンの入っていないプレートを作製します。この操作はできればクリーンベンチや安全キャビネット内で行ってください。無い場合は実験台の上で、ガスバーナーの火をつけた状態で行ってください。

まず、実験室の窓および扉を締め切り、実験台の上を70%エタノールをしみ込ませたティッシュペーパーやきれいな布等で拭きます。

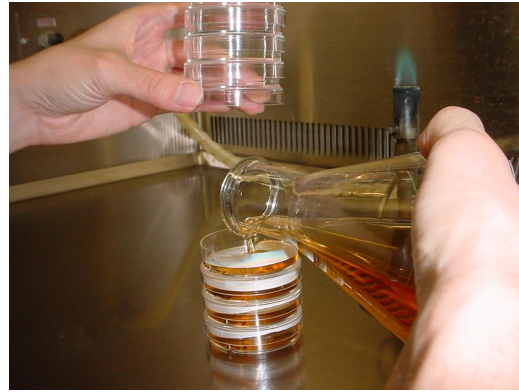
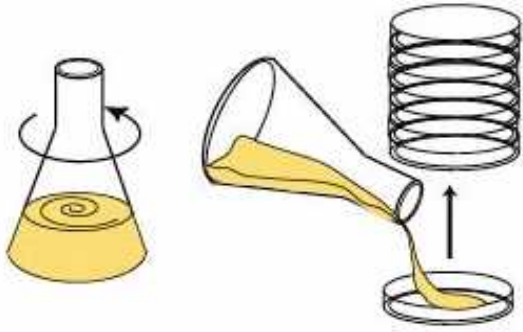
次に、ガスバーナーの火をつけます。後の操作はガスバーナーの火を中心とした約50cmの範囲で行ってください。これにより、空気中からの細菌の落下を少なくし、無菌に近い状態を作ることができます。



ガスバーナーの火をつける

シャーレ30枚(必要なのは24枚で残り6枚は予備)を取り出し、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。

300mlの培地が入った三角フラスコを用意します。まず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10mlずつ培地を注ぎ込みます(シャーレの半分ぐらいまで)。一番下のシャーレへ培地を注ぎ終わったら、同様に次々と上のシャーレへ培地を注ぎ込んでいきます。



シャーレへ培地を注ぐ

培地を注ぎ終えたプレートは固まるまで静置しておきます。

- この操作はできるだけ素早く行ってください。時間がかかると培地が冷えて固まってしまうことがあります。
- LB プレート作製中にアンピシリン入りプレート用の培地 (400ml 入り) が冷えて固まらないように注意してください。LB プレートの作製に時間がかかるようであれば、オートクレーブの中などで保温しておき、50℃以下に温度が下がらないようにしてください。

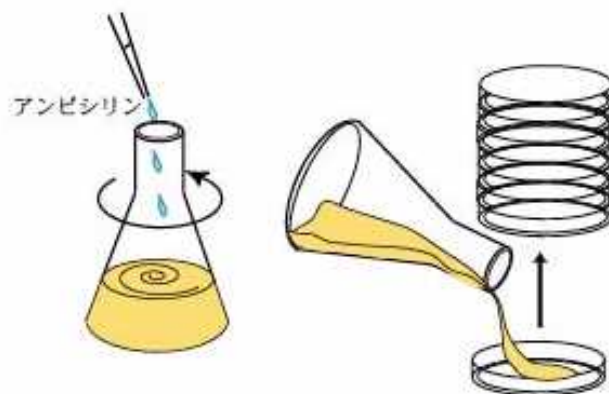
③ アンピシリン入り LB プレートの作製準備

400ml の培地の入った三角フラスコが手で持てるぐらいまで (約 50℃) 冷めていることを確認し、ピペットを使ってキット添付のアンピシリン (スクリュージュ) を 400 μ l 加え、フラスコを振って混ぜます。

- 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てしまうおそれがあります。また、27℃以下に下がると培地が固まってしまうので注意して下さい。



アンピシリンを添加する

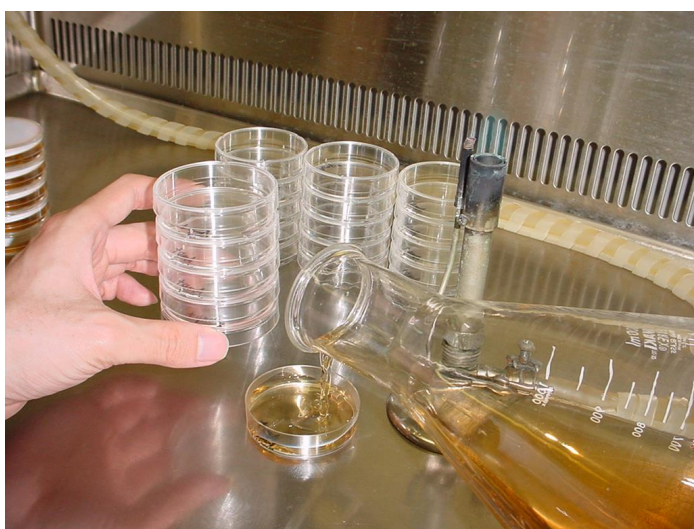


④ アンピシリン入り LB プレートの作製

シャーレ 40 枚(必要なのは 36 枚で残り 4 枚は予備)を取り出しシャーレの底面に **Amp+(プラス)** と油性ペンで書いてシャーレを積み重ねます。(プレートに書くのはシャーレに培地を注いでプレートが固まった後でもかまいませんが、アンピシリン無しのプレートと間違わないようにしてください)

先の操作と同様に後の操作はガスバーナーの火をつけ、その周囲で行って下さい。

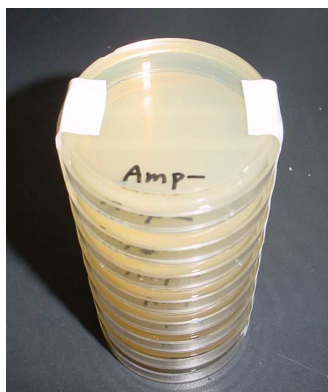
LB プレートを作製した時と同様にシャーレを 5 枚位ずつ積み重ねます。一番下のシャーレの蓋と上のシャーレを一緒に真上に持ち上げます。片手で培地の入った三角フラスコを持ち、シャーレに培地を注ぎ込みます (約 10ml)。一番下のシャーレへ培地を注ぎ終わったら、同様に次々と上のシャーレへ培地を注ぎ込んでいきます。



アンピシリン入りプレートを作製する

⑤ プレートの保存

培地が固まったプレートはできるだけ埃などがかからない場所 (扉の付いた棚の中など) に 2 日間置いておきます。その後は、すぐに使用するか、プレートをビニールテープで止めて逆さにした状態でビニール袋に入れ、冷蔵庫に保存して下さい。



LB プレート Amp-



LB プレート Amp+

3) 氷の準備

実験に使用する氷は、製氷器等で作った粒の細かいものを使用して下さい。氷が大きいと氷に触れないチューブがあり冷却効率が悪くなります。氷が大きい時は、金槌などで小さく砕いたものを使用するようにして下さい。

氷が、少量しか用意できない時は、発泡スチロールの箱等に氷と水を入れ、そこにフロートでチューブを浮かべておく方法もあります。



発泡スチロール箱へ砕いた氷を入れておく

4) 37℃と42℃の水浴

水槽のインキュベーターを使用して下さい。無い場合は発泡スチロール箱に37℃と42℃の水を作ります。

実験開始前に作ると使用するときには冷めてしまいます。各班熱処理する準備ができてから作って下さい。

実験方法 1 / 各班の試薬等のチェック

本キットは一班 2~6 人で各班 2 実験分、6 班分の試薬が入っています。試薬は一つのチューブに 2 実験分は入っています。実験者は、必要量の試薬をそれぞれの実験台に置かれた試薬チューブからマイクロピペットで取り実験を行います。

2 実験分

	容量	数量	チェック
pBR322 DNA	15μl	1 本 (透明チューブ)	<input type="checkbox"/> (氷に浸けておく)
pBR322-lacZ DNA	15μl	1 本 (黄色チューブ)	<input type="checkbox"/> (氷に浸けておく)
SOC 培地	1ml	1 本 (スクリュウチューブ)	<input type="checkbox"/>
塩化カルシウム溶液	500μl	1 本 (水色チューブ)	<input type="checkbox"/>
X-gal /IPTG 溶液	150μl	1 本 (透明チューブ)	<input type="checkbox"/>
大腸菌 JM109	100μl	2 本 (緑色チューブ)	<input type="checkbox"/>
1.5ml チューブ (透明)		5 本	<input type="checkbox"/>
1.5ml チューブ (黄色)		5 本	<input type="checkbox"/>
LB プレート		2 枚	<input type="checkbox"/>
LB アンピシリンプレート		6 枚	<input type="checkbox"/>
コンラージ棒		1 袋	<input type="checkbox"/>
マイクロループ		1 袋	<input type="checkbox"/>
チューブ立て		2 個	<input type="checkbox"/>
フロート		1 個	<input type="checkbox"/>
タイマー (時計)			<input type="checkbox"/>
ガスバーナー			<input type="checkbox"/>
マイクロピペット (~20μl 用、200μl 用)			<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み)			<input type="checkbox"/>
氷水			<input type="checkbox"/>
42℃の水浴			<input type="checkbox"/> (各班共通でも可)
37℃の水浴			<input type="checkbox"/> (各班共通でも可)
温度計			<input type="checkbox"/>
油性ペン			<input type="checkbox"/>
滅菌用エタノール			<input type="checkbox"/>
廃棄物入れ			<input type="checkbox"/>
ライターまたはマッチ			<input type="checkbox"/>
ビニールテープ			<input type="checkbox"/>
カウンター			<input type="checkbox"/> (各班共通でも可)

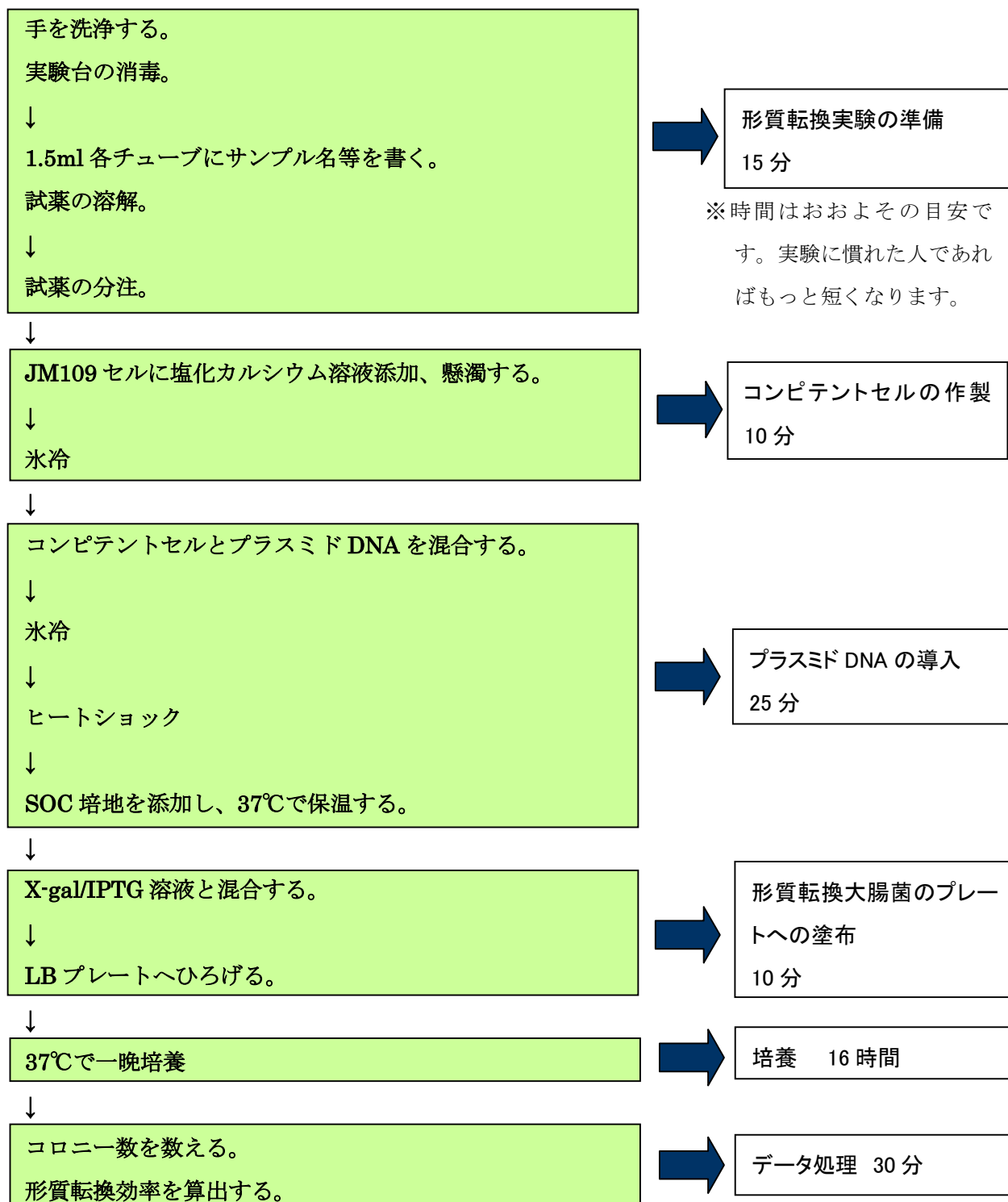


一班 2 実験分の試薬、器具

実験方法 1 / 実験プロトコル

1) 大腸菌形質転換実験

実験の流れ



実験操作

実験を行う際は、実験室の窓及び扉は閉めておいてください。

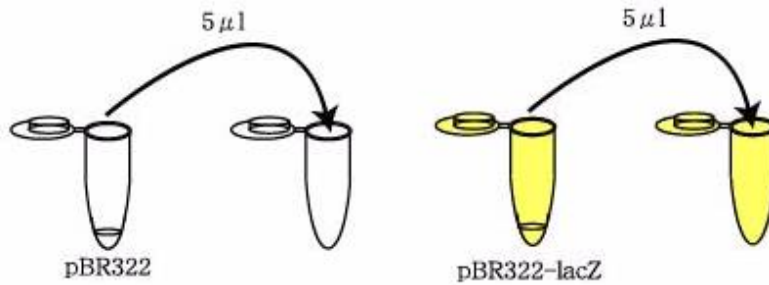
ここでは **1 実験分** の操作について説明します。本キットは 6 班で各班 2 実験分を想定していますが、試薬によっては一つのチューブに 2 実験分入っているものもありますので間違わないように注意してください。

1. 石鹼で手を洗います。
2. ティッシュやガーゼなどに滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭きます。
3. 塩化カルシウム溶液（水色チューブ）を氷上または室温で溶かしておきます。室温で溶かした場合は、必ず氷に浸けてよく冷やしておいてください。
 - 塩化カルシウム溶液は実験前に予め溶解して氷に浸けておいてもかまいません。
4. 1.5ml チューブ（透明）2本の蓋にそれぞれ“pBR322”、“pBR X/I”、1.5ml チューブ（黄色）2本にそれぞれ“lacZ”、“lacZ X/I”と油性ペンで書き、必要であれば班名も書いておいて下さい。
5. アンピシリンプレート 2枚を冷蔵庫から出して室温に置いておきます。
6. pBR322（透明チューブ）と pBR322-lacZ（黄色チューブ）、JM109 セル（緑色チューブ）を氷上で溶かして下さい（5分程度で溶けます）。

■ DNA は比較的安定な物質です。pBR322、および pBR322-lacZ は実験前に予め溶解して氷に浸けておいてもかまいませんが、JM109 セル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下さい。溶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。

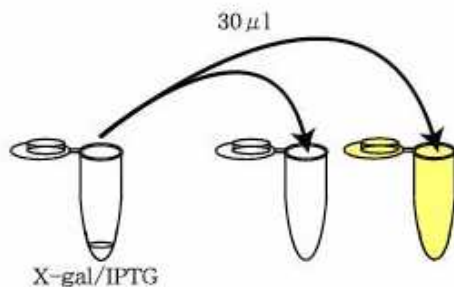
■ 二つの DNA 溶液はチューブの底に溶液があるかよく確認してください。無ければチューブの蓋か、横の壁に付いている可能性がありますので卓上遠心機で軽く遠心するか、手でチューブを振って溶液をチューブの底へ落としてください。

7. マイクロピペットを使って、pBR322 (透明チューブ) を“pBR322”と書いた 1.5ml チューブ (透明) へ、pBR322-lacZ (黄チューブ) を“lacZ”と書いた 1.5ml チューブ (黄色) へそれぞれ 5 μ l ずつ入れます。DNA を入れた 1.5ml チューブは氷上へ立てておきます。

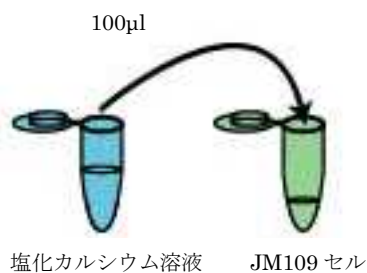


- pBR322、pBR322-lacZ 溶液はチューブへ分ける前に数回ピペッティングして溶液を混合し、分取した溶液はできるだけチューブの底の方へ入れてください。以降の操作においても同様に行います。

8. X-gal/IPTG 溶液を、もう一つの“pBR X/I”、“lacZ X/I”と書いた透明と黄色の 1.5ml チューブへ 30 μ l ずつ入れます。入れた後はチューブ立てに立てて室温に置いておきます。



7. JM109 セルが溶けたら、マイクロピペットを使って、塩化カルシウム溶液 (水色チューブ) を JM109 セル (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ぜて氷上に置きます。



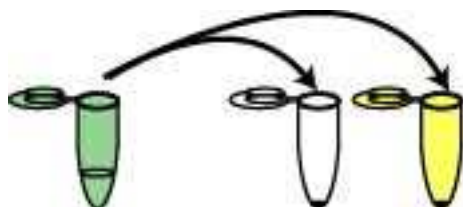
形質転換効率を高くするためには、塩化カルシウム溶液を加えた後、大腸菌を懸濁してヒートショックまでの操作をできるだけチューブの冷えた状態で行うことが重要です。そのためには氷だけでは冷却効率がよくない場合がありますので、氷に水を入れて氷水を作り、フロートにチューブを差して氷水に浮かせて冷やしておいてください。

- 塩化カルシウム溶液は JM109 セルに添加する前に数回ピペッティング(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)して溶液を混合してください。

11. 氷水中で 5 分間放置して下さい。(氷水中に置く時間は多少長くなっても構いません)



12. 5 分経ったら、塩化カルシウム処理した大腸菌 (コンピテントセル) (緑色チューブ) をマイクロピペットでピペッティングして軽く混合した後、pBR322 が入った 1.5ml チューブ (透明) に 50 μ l 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。ピペットのチップを取り替え、同様に pBR322-lacZ を入れた 1.5ml チューブ (黄色) にも 50 μ l のコンピテントセルを加え、ピペッティングで混ぜて氷上に置きます。



- 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) は後の、非形質転換大腸菌の培養実験に使用します。非形質転換実験を行うまで、氷上に置いておいて下さい。

13. 氷水上で **10 分間** 放置して下さい (写真 3)。この時、チューブは氷によく接するようにしておきます。この間に、発泡スチロール箱に次の熱処理のための **42°C** の水を準備します。水浴の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)



写真 3 氷上で 10 分間置く

14. フロートの穴にコンピテントセルを入れた 2 つのチューブを入れて、**42°C** の水浴に浮かべて **1 分間** 放置して下さい (写真 4)。

この操作をヒートショックといい、これによって DNA の導入効率が高くなります。

この処理時間と温度は厳守して下さい。

- チューブの底がフロートから出ているのを確認して、**42°C** の水浴に必ず接するようにしておいて下さい。

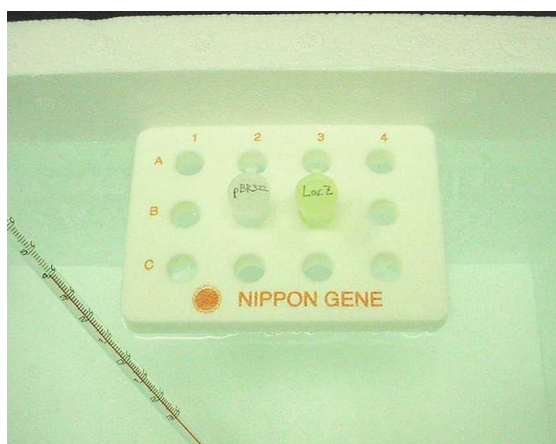
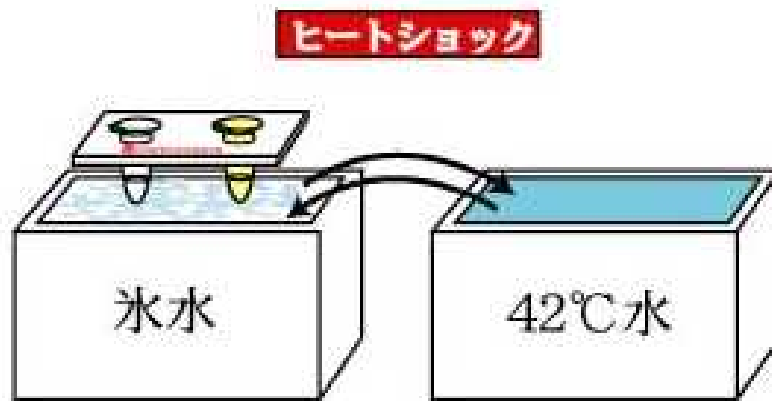


写真 4 42°C で 1 分間、ヒートショックを行う

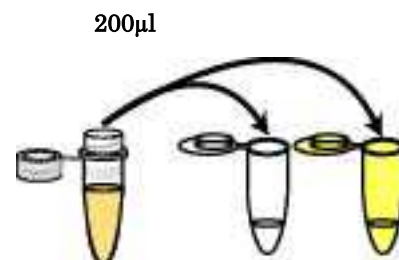
15. 1分経ったら、すぐに氷水上にチューブを移し2分間放置して下さい。(氷水中に置く時間は多少長くなっても構いません)



16. 2分経ったらそれぞれのチューブにSOC培地（スクリーチューブ）を200 μ lずつ加え、数回穏やかにピペティングして混合します（写真5）。入れた後はチューブ立てに立てておきます。



写真5 ヒートショック後、SOC培地を加える



- コンタミネーション防止のため、チップは一回ごとに新しいものを使用してください。
- 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。

17. 37°Cのエアー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（写真 6）。



写真 6 37°Cで保温する

18. インキュベート中にアンピシリン入り LB プレート **Amp⁺** (pBR322 用 1 枚、pBR322-lacZ 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書いておきます（写真 7）。

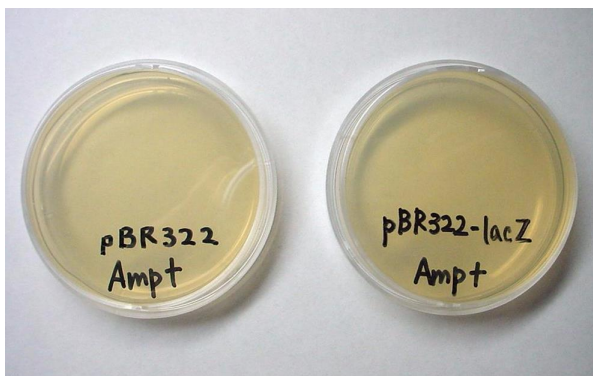
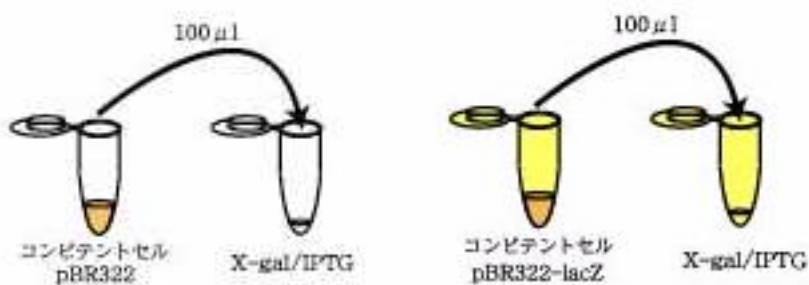


写真 7 プレートにサンプル名を書く

19. インキュベート後、室温で大腸菌液を数回穏やかにピペッティングして混合します。pBR322 形質転換大腸菌を X-gal/ IPTG 溶液のチューブ（透明、pBR X/I と表記）へ 100 μ l 加え、数回ピッペティングし混合します。同様に、pBR322-lacZ 形質転換大腸菌を X-gal/ IPTG 溶液のチューブ（黄色、lacZ X/I と表記）へ 100 μ l 加え混合します。



20. ガスバーナーの火をつけます (写真 8)。以下の操作はガスバーナーの火を中心とした約 50cm の範囲内で行うようにして下さい。



写真 8 ガスバーナーの火を点ける

21. プレート上に X-gal/IPTG と混合した大腸菌液を全量 (~130 μ l) マイクロピペットを用いてのせます (写真 9)。



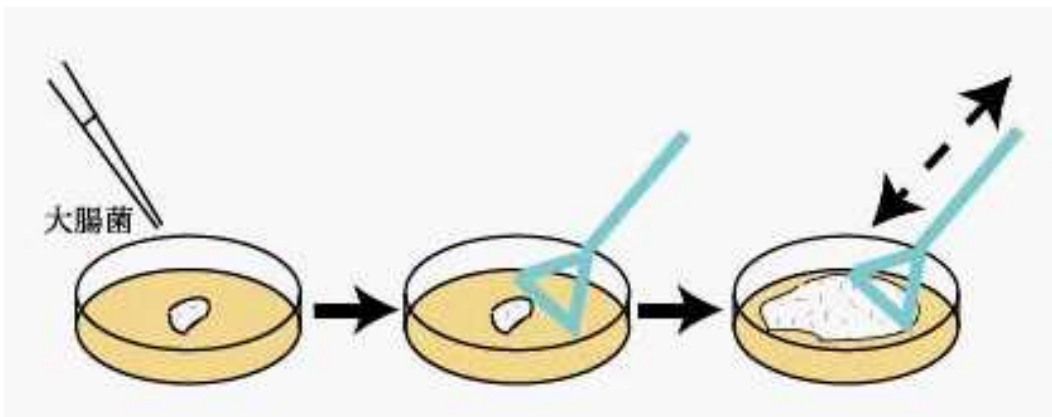
写真 9 サンプルをプレートへのせる

22. 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 (写真 10)。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。コンラージ棒はプレートごとに新しいものを使用するようにして下さい。

■ コンラージ棒はポリスチレン製です。ガスバーナーの火には近づけないで下さい。



写真 10 コンラージ棒でプレート表面にひろげる



23. 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ビニールテープなどで止めて下さい。テープにはクラス名、班名等を書いて下さい。プレートを逆さ（蓋が下にくるよう）にして（写真 11）、翌日まで 37°C インキュベーター中で培養します。



写真 11 テープでプレートを固定する

- 決してプレートの横の周囲にテープ等を巻いたりしないでください。大腸菌の成長には空気が必要です。テープ等で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。
- 逆さまにして置いておくのは、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てくることを防ぐためです。

24. 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。
25. 翌日の朝、プレートをインキュベーターから取り出し（写真 12、13）、観察するまで冷蔵庫で保存します。

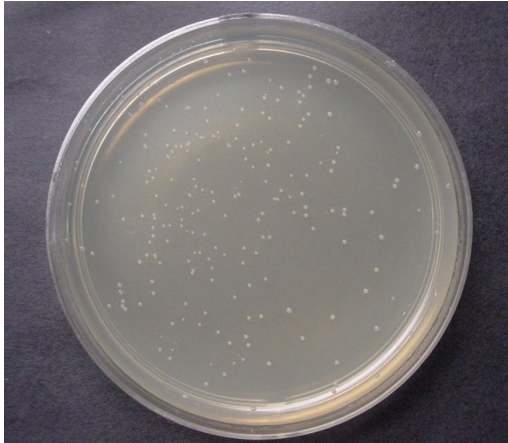


写真 12 pBR322 を形質転換したもの

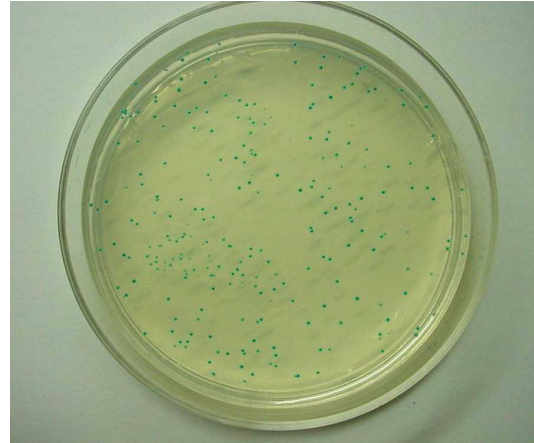
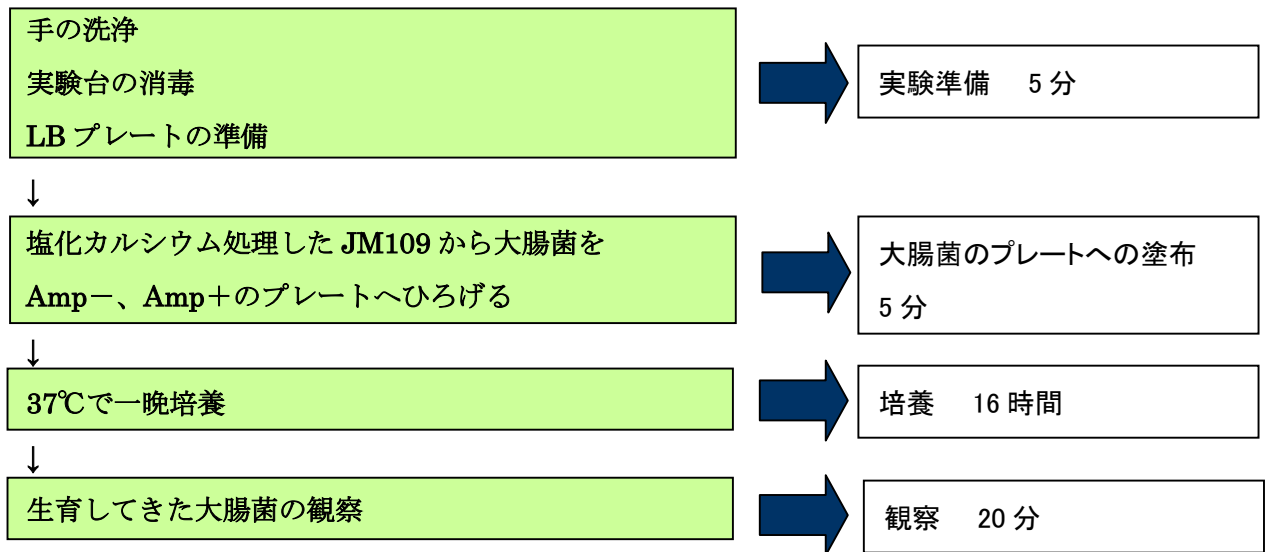


写真 13 pBR322-lacZ で形質転換したもの

2) 非形質転換大腸菌の培養

実験の流れ



実験操作

1. 手を石けんできれいに洗い、実験台をエタノールで消毒します。

LB プレート (Amp⁻) 1 枚と LB アンピシリンプレート (Amp⁺) 1 枚を準備します。プレートにはそれぞれ DNA⁻ (マイナス) と書いておきます (写真 1)。



写真 1 プレート

2. ガスバーナーの火をつけます。

■ 形質転換の実験とは違い、本実験では抗生物質の入っていないプレートも使用します。直接手で培地に触れるとコンタミネーション (他の細菌が繁殖する) の原因になります。また唾などもコンタミネーションの原因となりますので、できるだけ作業中は話をせずに行うようにしてください。

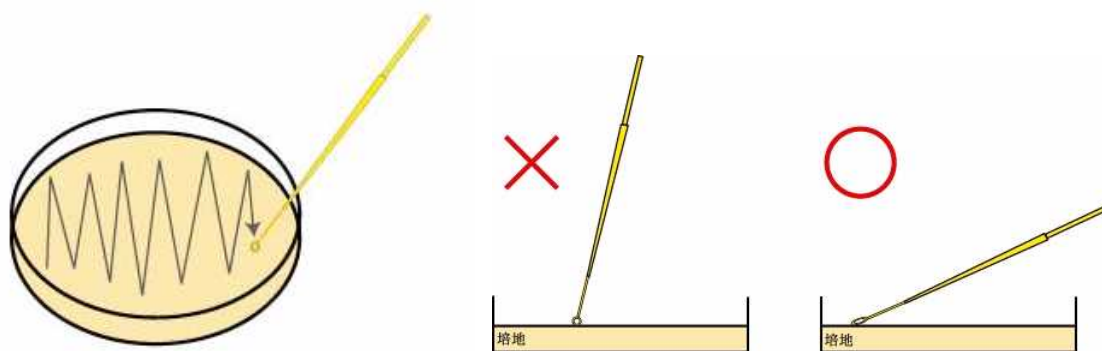
3. 大腸菌形質転換実験で塩化カルシウム処理した JM109 セル（コンピテントセル）に、マイクロロープの先を付けます。

■ マイクロロープはポリスチレン製です。ガスバーナーの火には近づけないで下さい。

4. 大腸菌の付着したマイクロロープで、まずアンピシリン無しの LB プレート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。

マイクロロープを新しいものと交換し、同様の方法でアンピシリン入りプレートへも大腸菌をひろげます。

■ プレートへはマイクロロープを斜めにして軽く表面を撫でるようにして大腸菌をひろげて下さい。



【参考】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のですが、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ロープでプレート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。

5. 2枚のプレートを重ねて蓋が開かないようにビニールテープで止めて下さい (写真2)。テープにクラス名、班名を書いておきます。プレートを逆さ(蓋が下にくるように)にし、翌日まで37℃インキュベーター中で培養します (写真3)。



写真2 テープをして逆さにする



写真3 37℃で培養

6. 終了後、実験台の上を滅菌用エタノールで拭き、実験室を出る前には必ず石鹸等で手を洗って下さい。
7. 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て下さい。(写真4、5)



写真4 Amp+ プレートで培養した大腸菌



写真5 Amp-プレートで培養した大腸菌

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・本紙参照

実験方法 1 はキット添付の大腸菌 JM109 セルを直接処理し、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

実験方法 2 はキット添付の大腸菌 JM109 セルを一度プレート上で培養します。その後生じた JM109 大腸菌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。

実験方法 1 と **実験方法 2** では実験に要する時間や、実験方法、準備が異なります。また、非形質転換大腸菌培養実験も実験プロトコルが異なりますのでご注意ください。

「余ったプレートを使つての実験」や「データの解析」については、本キットの製品マニュアルをご参照ください。

製品マニュアルはニッポンジーンの[ホームページからダウンロード](http://nippongene.com/siyaku/)できます。