

第7回実験研修会報告(2)

大腸菌プラスミドベクターへの遺伝子導入実験プロトコール

1. 培地作製及び試薬の調整

実験に先立ち、以下の培地を用意する。

基本的にはオートクレーブ滅菌をし、抗生物質を添加する場合は培地の温度が 60℃以下に下がってから入れる。

(1) LB/アンピシリン液体培地

1L 程度作成し、使用時に 4mL ずつに分注(容器は corning 社の 10mL 滅菌遠沈管を使用)。

表 1 LB 及び LB/アンピシリン培地の組成

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast Extract	5g
Bacto Agar	15g
NaCl	10g
5N NaOH	0.2mL
蒸留水	1L
Ampicilin(50mg/mL)	1mL
(LB 培地では Ampicilin を添加しない)	

(2) LB/アンピシリン寒天培地

1L 程度作成し、10cm の滅菌プラスチックシャーレに約 20mL ずつ分注する。

室温で水平に静置して培地が寒天状に固まるのを待つ。

表 2 LB/アンピシリン寒天培地の組成

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast Extract	5g
Bacto Agar	15g
NaCl	10g
5N NaOH	0.2mL
Bacto Agar	15g
蒸留水	1L
Ampicilin(50mg/mL)	1mL

(3) SOC 液体培地

100mL 程度作成する。60℃以下に冷えた滅菌済み LB 液体培地 1L に対して、1mol/L のグルコースを 20mL 加えて作製。

大腸菌(Competent cell)への形質転換溶液作製の際に用いる。

表 3 SOC 液体培地の組成

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast Extract	5g
Bacto Agar	15g
NaCl	10g
5N NaOH	0.2mL
蒸留水	1L
1mol/L グルコース	20mL

(4) 形質転換溶液

Competent cell への Transformation 直前に作製する。

表 4 形質転換溶液の組成

1mol/LのMgCl ₂ 溶液	100 μL
1mol/LのMgSO ₄ 溶液	100 μL
SOC培地	10mL

(5) TE バッファー溶液

DNA 濃度を測定する際に用いる。

1mol/L の Tris-HCl と 0.5mol/L の EDTA 溶液を作り、混合後、希釈して用いる。

250mL 程度作製する。また、市販品を用いてもよい。

表 5 1mol/LのTris-HCl溶液の組成

30.3g トリス	30.3g
35% HCl	10mL
蒸留水	250mL

トリス: トリスヒドロキシアミノメタン

表 6 TE バッファー溶液の組成

1mol/L Tris-HCl	2mL
0.5mol/L EDTA	0.4mL
蒸留水	200mL

(6) 50 倍濃度 TAE バッファー溶液

電気泳動とエチジウムブロマイド染色の際に 50 倍に希釈して使用する。

50 倍希釈の TAE バッファー溶液は 2L 程度作製(電気泳動槽 1 台あたり 500mL、エチジウムブロマイド染色に 500mL 必要)。

市販品を用いてもよい。

表7 50倍濃度TAEバッファー溶液の組成

トリスヒドロキシアミノメタン	60.5g
氷酢酸	14.3mL
0.5mol/L EDTA	25mL
蒸留水	200mL

(7) 電気泳動用0.7%アガロースゲル

電気泳動の際にTAEバッファーを用いて0.7%濃度のアガロースゲルを作製する。

表8 0.7%アガロースゲルの組成

アガロース	1.4g
50倍希釈TAEバッファー	200mL

(8) 10 μ g/mL エチジウムブロマイド溶液

電気泳動後のアガロースゲルを染色する際に用いる。

使用の際は、300mLのTAEバッファー溶液に対して30 μ L添加する。

発癌性があるので、マスクとゴム手袋などを用意して取り扱いには注意する。

表9 10 μ g/mLエチジウムブロマイド溶液

エチジウムブロマイド	2g
50倍希釈TAEバッファー	200mL

(9) その他(エタノール沈殿用)試薬類

100%エタノール	10mL
70%エタノール	10mL
3mol/L 酢酸ナトリウム	10mL
10mg/mL グリコーゲン	10mL

2. 購入すべきベクターや酵素類、キット

(1) ベクターと大腸菌(Competent cell)

PcDNA3.1(+) Invitrogen V79020
E. coli DH5 α Competent Cells タカラバイオ TKR9057

(2) 制限酵素

EcoR I	タカラバイオ	TKR1040A	10,000U
BamH I	タカラバイオ	TKR1010A	10,000U

(3) キット類、調製済み試薬類

DNA Ligation kit Ver2.1 タカラバイオ TKR6022
QIAprep Spin Miniprep kit QIAGEN 27106
500 bp Molecular Ruler BioRad 170-8203

DNA Loading Buffer 和光純薬 ニッポンジーン 313-90111 10mL
TAE Buffer (50X) コスモバイオ DCB 423499 500mL
TE Buffer (100X) コスモバイオ NDS EC862 25mL

3. 装置と器具類

振盪培養器
ウオーターバス
エッペンドルフチューブ用冷却超遠心機
小型卓上紫外線照射装置 (UV イルミネーター)
電気泳動装置 Mupid-2puls ADVANCE(株) M-2P
電気泳動ゲルメーカーセット-HR ADVANCE(株) GM-HR
可視紫外分光光度計
ピペットマン 0.1~2.0 μ L GILSON 社 P-2
ピペットマン ~200 μ L GILSON 社 P-200
ピペットマン ~1000 μ L GILSON 社 P-1000
ダイヤモンドチップ ~10 μ L 用 DIAMOND® D10
ダイヤモンドチップ~200 μ L 用 DIAMOND® D200
ダイヤモンドチップ 1000 μ L 用 DIAMOND® D1000
ボルテックス・ミキサー VORTEX-GENIE 2 Mixer 1.5mL エッペンドルフチューブ
15mL Corning プラスチック遠心チューブ
50mL Corning プラスチック遠心チューブ
20mL プラスチックピペット
エタノール消毒用霧吹き
紫外線保護メガネ
アルミホイル
エッペンドルフチューブ立て (水に浮くもの)
遠心チューブ立て
つまようじ又はループ
スプレッター
ディスポーザブル手袋

4. 実験プロトコール

<1日目>

(1) pcDNA3.1 の制限酵素 EcoR I による処理

pcDNA3.1	1 μ L
EcoR I	0.3 μ L
BamHI	0.3 μ L
10×制限酵素 (KBuffer)	1 μ L
滅菌蒸留水	7.4 μ L
	(total 10 μ L)

↓
37°Cで2時間反応させる

↓
エタノール沈殿

DNA 溶液(10 μ L)、100%エタノール (25 μ L)、3M 酢酸ナトリウム (4 μ L)、10mg/mL グリコーゲン (1 μ L) を加える。これらをボルテックス攪拌機で強く混ぜた後、室温で 10 分静置した後、10,000rpm×10分間遠心し、液体を捨てる。

その後、70%エタノールを1mL加え、軽く容器を振り、10,000rpm×2分間遠心、容器を逆さまにして十分に水分を取り除く。

(2) 制限酵素で切断したプラスミドに目的の DNA を Ligation

プラスミド:

導入遺伝子溶液 (EGFP 190 μ g/ μ L) 3 μ L

(プラスミドと導入遺伝子のグラム比が 1:3~10 になるようにする。)

Ligation buffer DNA 液と同量 3 μ L

(Takara DNA ligation Kit ver2.1)

↓
16°Cで30分間反応

(3) Competent cell へのプラスミドの Transformation

SOC 培地を 37°Cに加熱する。

↓
約 100 μ L に分注され-80°Cで凍結保存された Competent cell を氷上で溶かす。

↓
溶けた Competent cell をプラスミド DNA に加え、ゆっくりピペットで混合する。

↓
15分間、氷上で静置する。

↓
42°Cの恒温槽で45秒間、プラスミド DNA を加えた Competent cell を軽く振りながら加熱する (ヒートショック)。

↓
氷上に2分間 Competent cell を静置する。
この間に、SOC 培地に10mlあたり 1M MgCl₂ 100 μ L、1M MgSO₄ 100 μ Lを加える。

↓
SOC 培地を 1ml、Competent cell に加えチューブを振って混ぜる。

(4) Competent cell の LB 培地シャーレへの塗布
ガスバーナーの炎の下で、スプレッダーを用いて、抗生物質の入った LB プレートに、Competent cell を均等になるように塗り付ける。

(5) 培養

37°Cにて、8~16時間培養する。

<2日目>

(1) 大腸菌コロニーの採取

LB 培地シャーレから大腸菌コロニーを滅菌した爪楊枝で採取し、LB 培養液に入れる。

(2) LB 培養液で大腸菌を振盪培養

遠沈管のふたをはずし、パラフィルムで管口をおおう。ガス交換ができるように、パラフィルムに爪楊枝で5~6箇所をあけておく。

↓
37°C、8~16時間振盪培養する。

<3日目>

(1) アガロースゲル (0.7%) の作成

TAE 溶液 (Tris-Acetate-EDTA 溶液) 200ml を三角フラスコに入れ、アガロース 1.4 g を加える。

↓
サララップで三角フラスコの入り口を覆い電子レンジで軽く沸騰させる。

↓
手で触れる程度に温度が下がったら、ゲル作成器に流し込み、コームを立てる。

(2) 大腸菌からプラスミドを精製 (QIAGEN 社 QIAprep Spin Miniprep kit を使用)

15ml チューブ内の大腸菌を培養した LB 培養液 4ml のうち 1ml を 1.5ml 遠心チューブに移す。

↓
4°C、5000rpm で5分間遠心する (この遠心分離により大腸菌が沈殿する)。

↓
上清の液体を 1000 μ L マイクロピペットで吸引

し捨てる。

↓
 プラスミド精製キットの P1 液 250 μ L を加え、沈殿した大腸菌を溶解する。

↓
 プラスミド精製キットの P2 液 250 μ L を加え、チューブを 5~6 回反転させ、混ぜる。

↓
 プラスミド精製キットの P3 液 350 μ L、マイクロピペットで十分に混ぜ、さらにチューブを 5~6 回反転させる。

↓
 白濁した浮遊物を遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 10 分遠心し、上清をカラムに通し、プラスミドを付着させる。

↓
 1000 μ L マイクロピペットを用いて、上清の液体を QIA Prep カラムに移す。

↓
 遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 1 分間遠心する。

↓
 QIA Prep カラムの下のチューブに溜まった液体を捨てる。

↓
 再度、遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 1 分間遠心する。

↓
 プラスミド精製キットの PB 溶液 500 μ L を QIA Prep カラムに加える。

↓
 遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 1 分間遠心する

↓
 QIA Prep カラムの下のチューブに溜まった液体を捨てる

↓
 プラスミド精製キットの PE 溶液 750 μ L を QIA Prep カラムに加える。

↓
 遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 1 分間遠心する。

↓
 QIA Prep カラムを 1.5ml 遠心チューブの上に置き、プラスミド精製キットの EB 溶液 100 μ L をカラムの中央に加える。

↓
 1 分間静置する。

↓
 遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 1 分間遠心する。

遠心分離機で 4°C、10,000rpm \times 1 分間遠心する。

↓
 エタノール沈殿

カラムの下の 1.5ml 遠心チューブに、3M 酢酸ナトリウム 10 μ L と 100%エタノール 250 μ L を加え、ボルテックス攪拌機で強く混ぜる。

(10mg/ml グリコーゲン を 1 μ L を加えると沈殿が見えやすくなる。)

↓
 室温で 10 分静置した後、4°C、10,000rpm \times 10 分間遠心し、液体を捨てる。

↓
 70%エタノールを 1ml 加え、軽く容器を振り、10,000rpm \times 2 分間遠心する。

↓
 容器を逆さまにして十分に水分を取り除く (10~15 分)

↓
 TE 溶液 30 μ L で DNA を溶かす

(3) 採取したプラスミドの制限酵素 EcoR I による処理

DNA 液	8.8 μ L
EcoR I	0.2 μ L
10 \times 制限酵素 Buffer	1 μ L
	(total 10 μ L)

↓
 37°C で 60 分間反応させる。

(4) アガロースゲルで電気泳動

制限酵素で処理した DNA 液 10 μ L を約 1.5 μ L の Loading Buffer とピペットで混濁させる。

↓
 先に作成したアガロースゲルを電気泳動槽 (ミューピット) にいれ、TAE 溶液を十分にいれ、ゲルの穴に Loading Buffer を添加した DNA 液を注入する。

外側の穴には分子量マーカーを注入する。

↓
 30~40 分、電気泳動する。

(5) 紫外線でゲルを観察し、目的の DNA がプラスミドに組み込まれているかを確認

エチジウムブロマイド 2g を TAE 溶液 200ml に加え 10 μ g/ml 溶液を作り、そのうち 30 μ L を TAE 溶液 300ml に入れて、30 分間振盪し、アガロースゲルを染色する。

紫外線イルミネーター(312nm)の上にサララップを敷き、ゲルを載せ、DNAの発光を観察する。
pcDNA3.1は約4,500bp、EGFPは約700bpである。
うまく遺伝子導入できていれば2本のバンドが確認される。

(6) DNA濃度の測定

3日目の実験で、大腸菌からプラスミドを精製した際などに、調べてみるとよい。

目的のDNA溶液1 μ LをTE溶液(Tris-EDTA溶液)99 μ Lに加え100倍に希釈。

↓

分光光度計260nmで吸光度を測定

同時に280nmの吸光度も測定し、DNAの純度を確認する。

260nmの吸光度 $\times 5$ を計算する。これが希釈率100倍のときのDNA濃度(μ g/ μ L)。

260nmの吸光度の値を280nm吸光度で割る。きちんとDNAが取れていれば、この値が1.8~2.0ならばDNAの純度は正常。それ以下ならタンパク質が混入している可能性がある。

5. 実習を安全に行うために

(1) 試薬が肌に接触したり、眼に入らないように、「保護メガネを着用!」、「手袋を着用!」、「実験着を着用!」が原則。

特に水酸化ナトリウム(QIAprep Spin Miniprep kitのP1液)、今回は使わなかったがタンパク質を変性させる「フェノール・クロロフォルム溶液」は危険であるので、保護メガネを着用する。

(2) 紫外線は眼の炎症を起こすため、紫外線イルミネーターを使用する際は、紫外線カットの保護メガネを着用!。

(3) 実習に用いる大腸菌、ベクターなどは安全なものであるが、微生物実験の基本である感染防止の観点から、「マスクの着用!」、「手洗いの励行と消毒!」、「飲食厳禁!」。

(4) 化学物質には未知の危険性があると考え、試薬の取り扱いには慎重に。特にエチジウムブロマイドのように発癌性が指摘されている試薬は細心の注意を持って取り扱うこと。

(5) 実験終了後の組換え体などは、自然界への拡散防止の観点から、オートクレーブ滅菌(121 $^{\circ}$ C、15分間)が原則。実験器具等でオートクレーブ滅菌が困難なものは、70%エタノールや塩素剤(次亜塩素酸ナトリウム溶液)で滅菌する。

(6) 実験に用いた試薬類は、試薬の性質、微生物

のコンタミネーションの有無などを考えて、適切に処理するか、処理が困難な場合は業者委託まで保管する。

※「大腸菌プラスミドベクターへの遺伝子導入実験プロトコール」は、東京大学環境安全研究センターの刈間理介先生が、JST支援の理数系教員指導力向上研修のために作成されました。

このプロトコールを大阪府高等学校生物教育研究会会誌原稿用に一部改変して掲載させて頂きました。