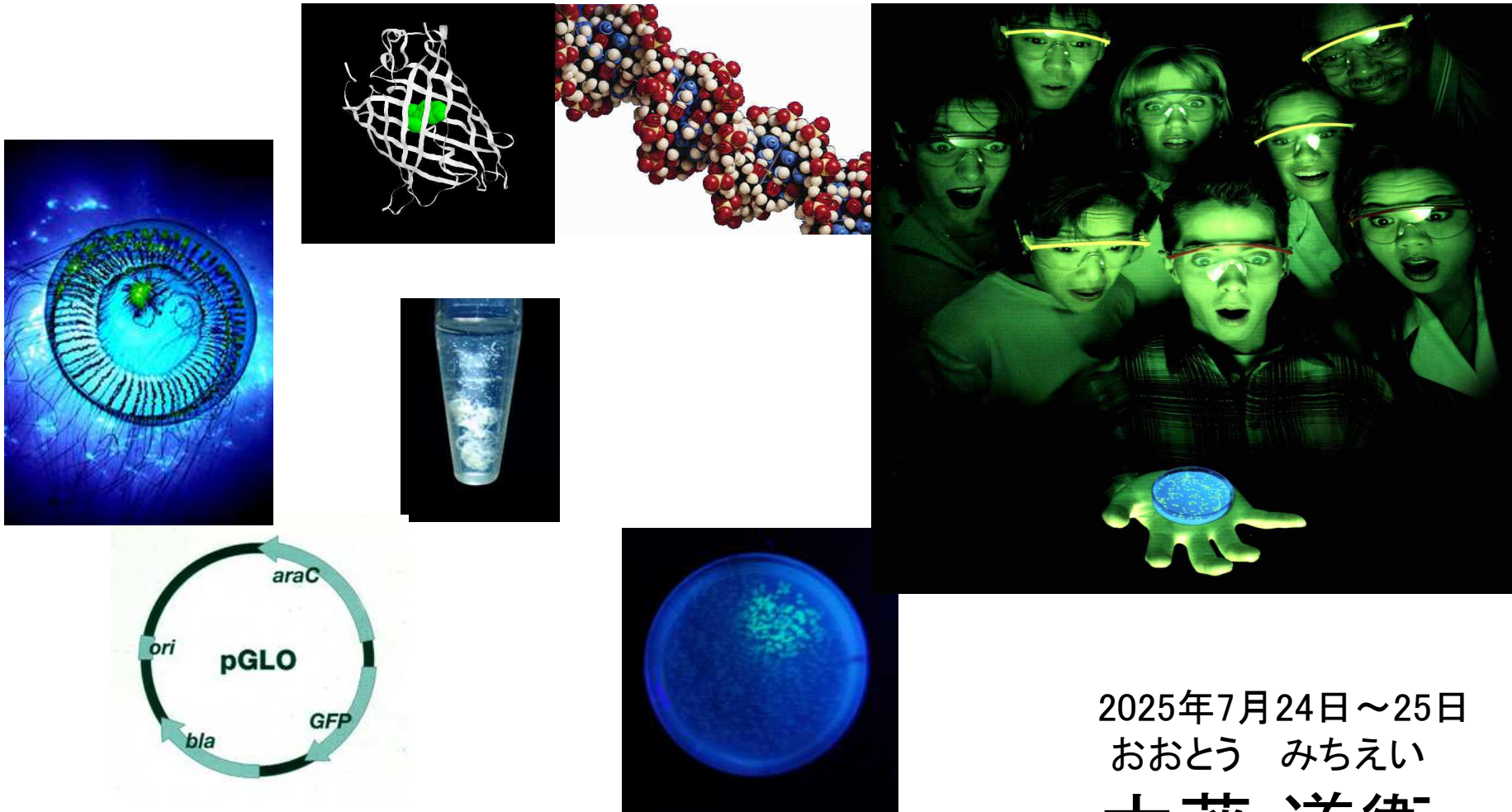


東京農工大学遺伝子実験施設  
第24回「教員のための遺伝子組換え実験教育研修会」  
GFP遺伝子による大腸菌の形質転換



2025年7月24日～25日

おおとう みちえい

大藤 道衛

# 遺伝子組換え実験(講義と実習)

## 1日目

### 講義

#### 実験の背景・原理

遺伝子組換え実験、pGLOプラスミドと遺伝子発現  
形質転換実験(遺伝子組換え実験)操作

### 実習

形質転換実験: プラスミドDNAの大腸菌への導入と培養開始

GM検知実験: 食材からのDNA粗抽出とPCR反応開始

### 講義

遺伝子リテラシー教育と米国の教育教材

# 遺伝子組換え実験(講義と実習)

## 2日目

### 実習・演習

形質転換結果判定と考察

GFP遺伝子発現実験

### 講義と討論

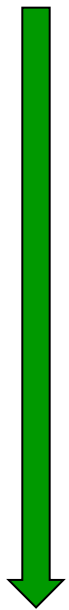
実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

廃棄物処理方法

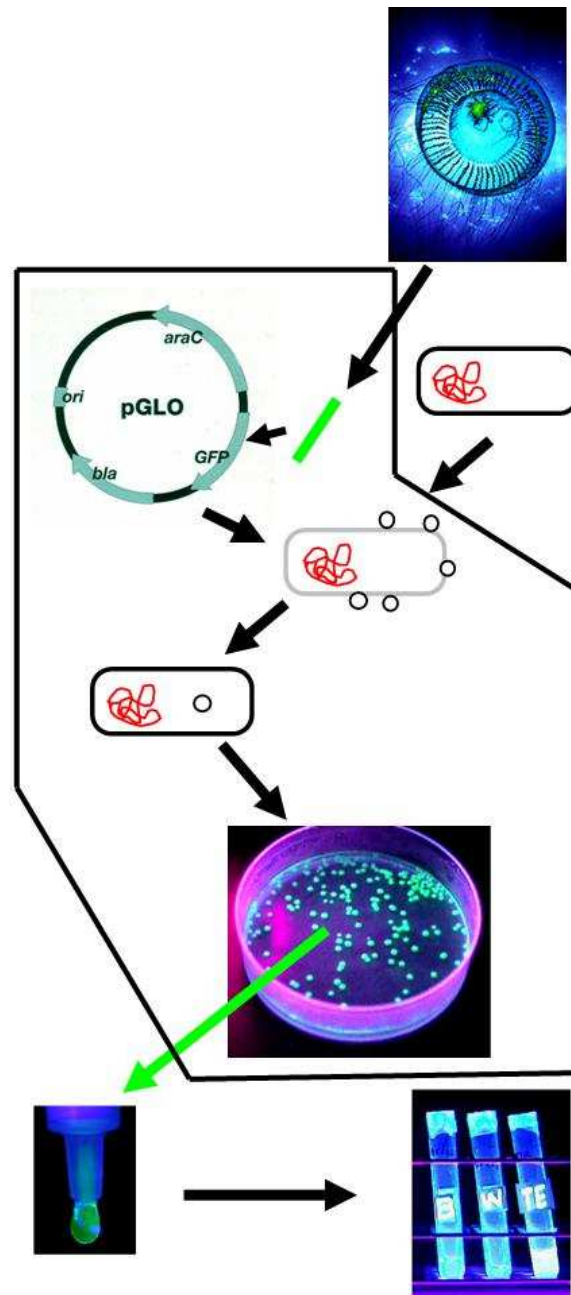
発展的実験授業展開

# GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

情報  
(DNA)

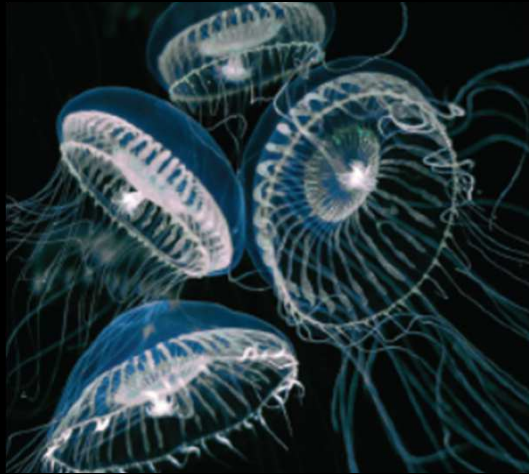


機能分子  
(タンパク質)



# オワンクラゲとは

テキスト21ページ



可視光



紫外線(UV)

写真提供: Bio-Rad Laboratories

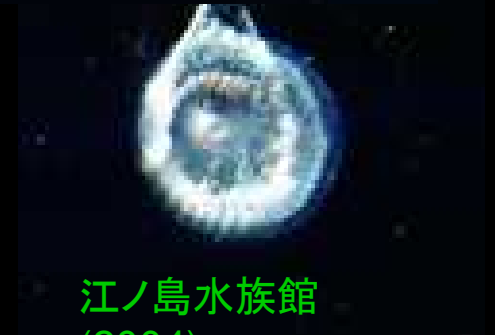
## ヒドロ虫綱クラゲ

傘の直径20cmくらいになる、傘の中央が口  
暗闇での刺激により発光する

シアトルに生息(最近はいなくなった。)

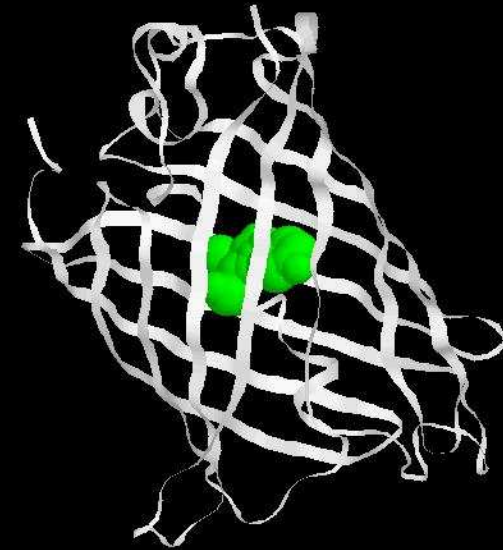
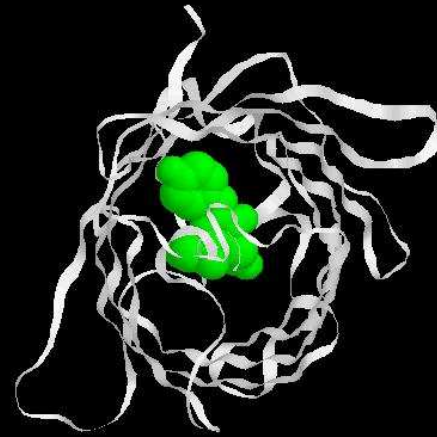
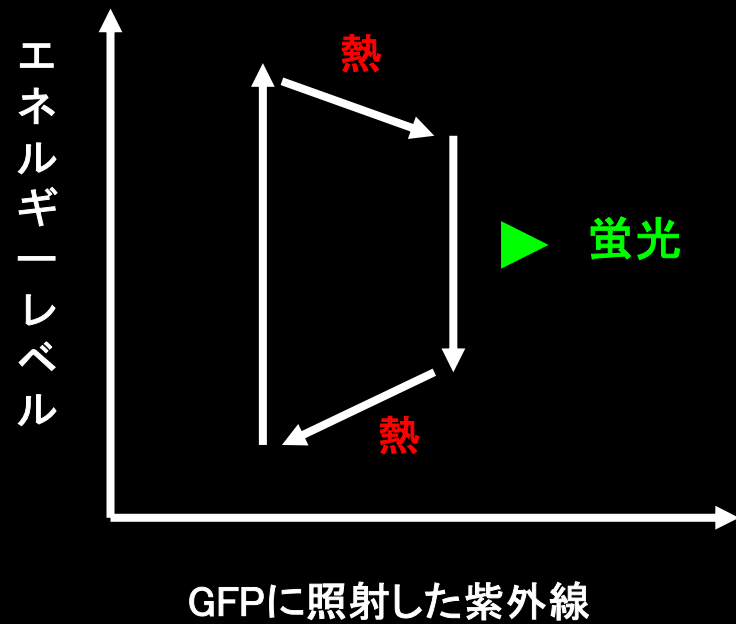
江ノ島でも春～夏生息といわれている

オワンクラゲの学名は、*Aequorea aequorea*, *Aequorea forskalea*,  
*Aequorea victoria* (太平洋北東海域のバンクーバー島周辺に生息),  
*Aequorea coerulescens* (日本近海に生息).



江ノ島水族館  
(2004)

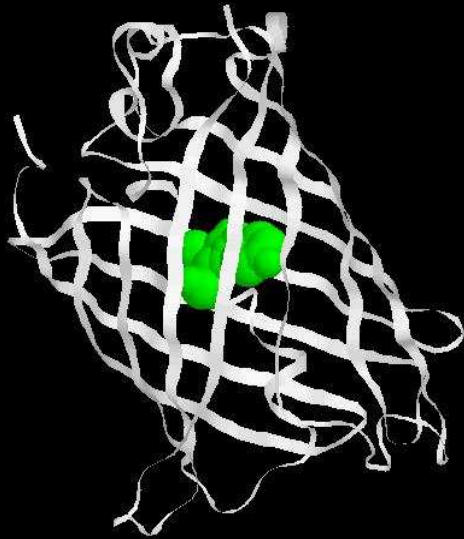
# GFPとは



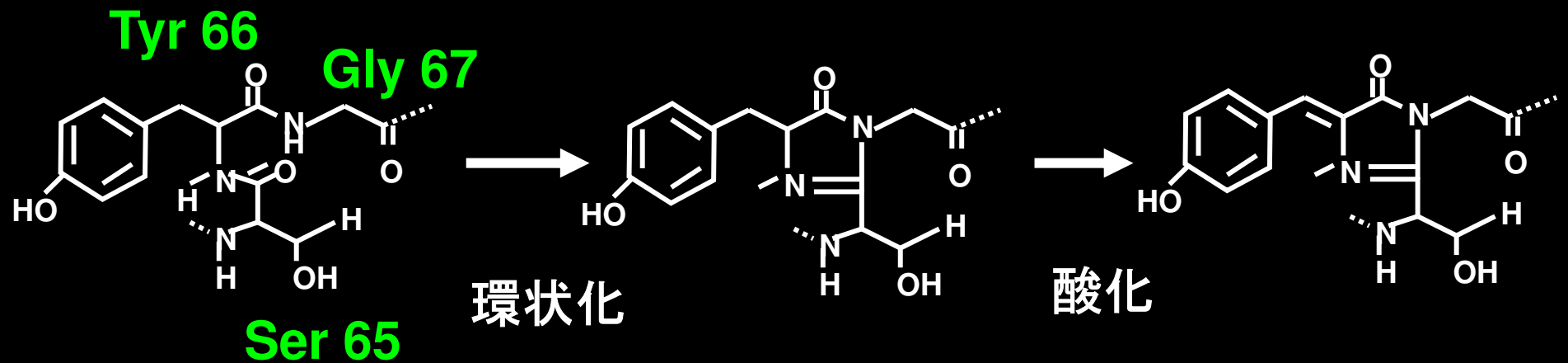
テキスト21-22ページ、60-61ページ



# GFPの発色団



Ser-Tyr-Gly  
65 – 66 - 67



テキスト60-61ページ

# "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"



The Nobel Prize in Chemistry 2008

Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien

Share this: [f](#) [G+](#) [t](#) [+](#) [e](#) 66

## The Nobel Prize in Chemistry 2008



Photo: U. Montan  
**Osamu Shimomura**  
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan  
**Martin Chalfie**  
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan  
**Roger Y. Tsien**  
Prize share: 1/3

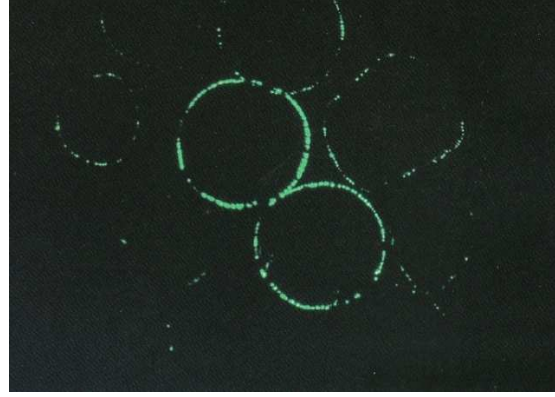
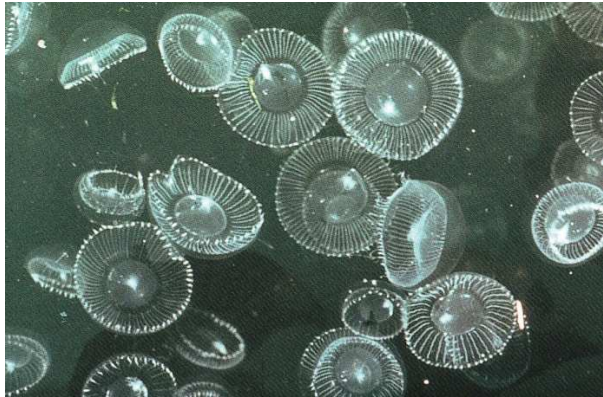
The Nobel Prize in Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien *"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"*.

Photos: Copyright © The Nobel Foundation

[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html)



# くらげの採取とGFPの精製(下村先生 in 米国シアトル)



# イクオリンからGFPへのエネルギー転移

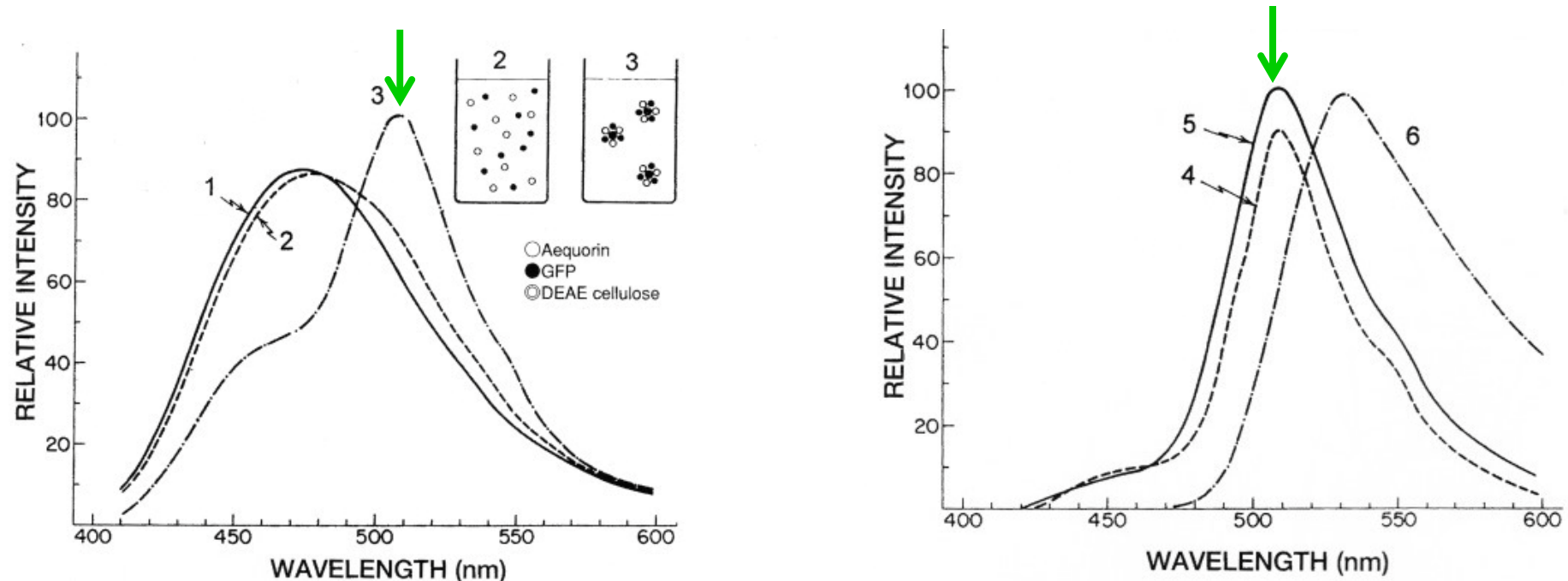


図5 イクオリンからGFPへのエネルギー転移を示す実験

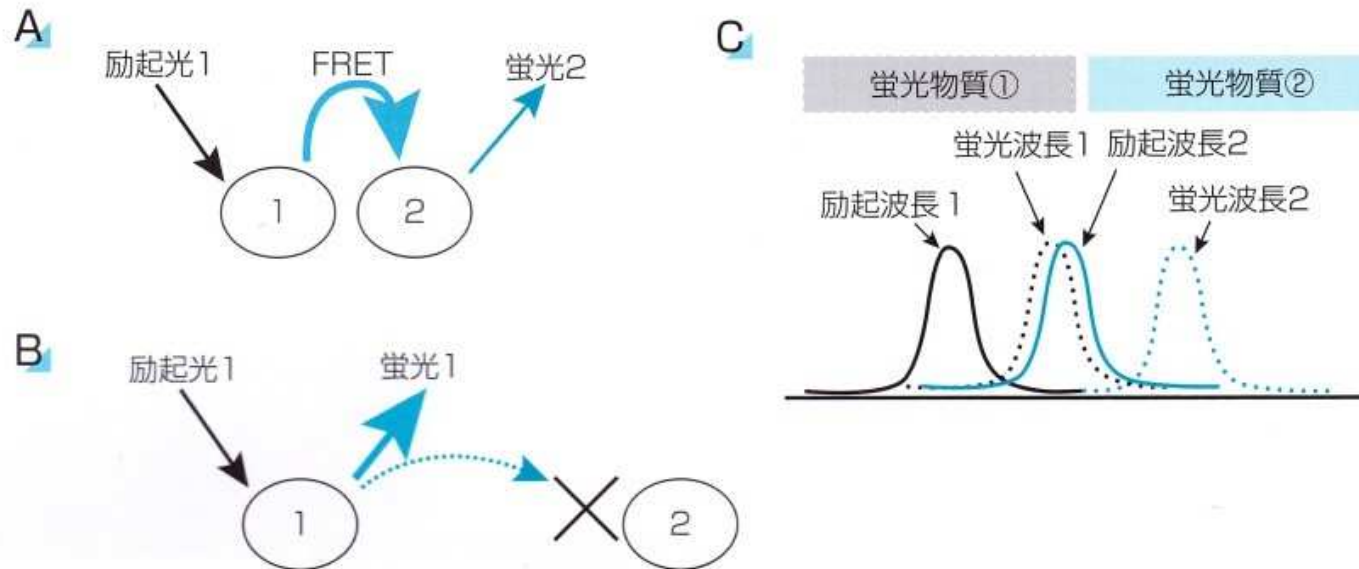
イクオリンを種々の条件下で微量のカルシウムイオンで発光させてスペクトルを測定<sup>24)</sup>。

(1) イクオリンの発光、(2) イクオリン+GFP、(3) イクオリン+GFP+DEAEセルローズ、(4) 3を遠心し沈澱をバッファーに再懸濁、(5) オワンクラゲの発光スペクトル、(6) イクオリン+FMN+DEAEセルローズを遠心し沈澱をバッファーに再懸濁。(2) と (3) では使用したイクオリン量も GFP量も全く同じである。

\*DEAE cellulose  
陰イオン交換樹脂



# エネルギー転移(FRETの原理)



## A) fluorescent resonance energy transfer (FRET)

ある蛍光色素 (②) の蛍光エネルギーとして励起状態になった別の蛍光色素 (①) のエネルギーが利用される場合、1つの蛍光色素 (①) を励起させることにより他の蛍光色素 (②) にエネルギーが転移し結果として他の蛍光色素から蛍光が発せられる。この現象は、2つの蛍光物質が十分に近づいている場合に起こる

## B) クエンチャーに FRET した場合

相手方の物質がクエンチャー [消光物質 (②)] の場合、蛍光物質 (①) を励起させても FRET によりそのエネルギーは消光物質に転移し蛍光は発せられない。しかし、消光物質 (②) が離れている場合 (離れてしまった場合) には、消光されず蛍光物質 (①) の蛍光が発せられる

## C) FRET と蛍光波長

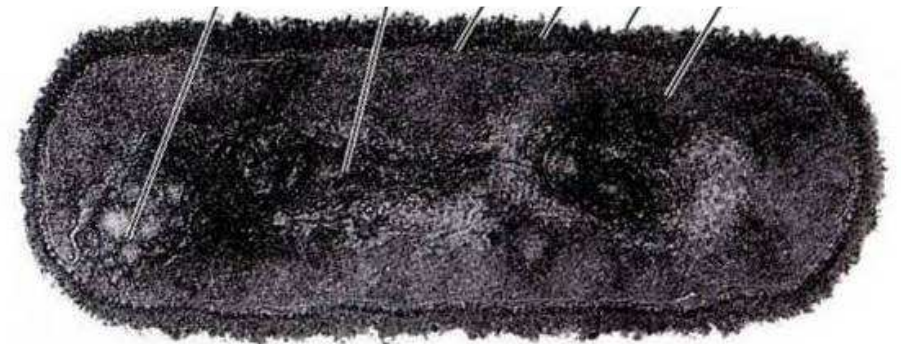
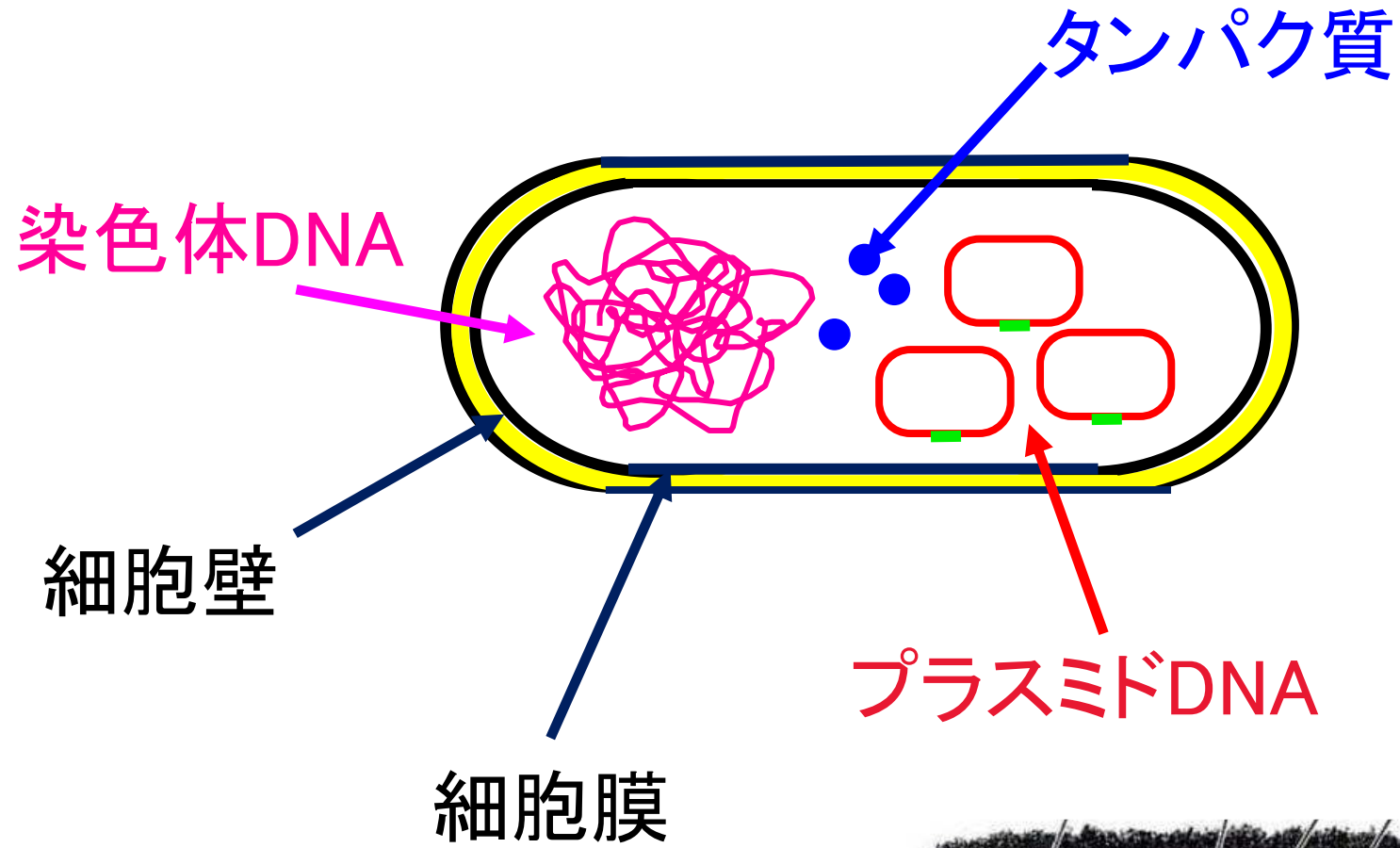
FRET が起こる場合、蛍光物質①の蛍光波長と蛍光物質②の励起波長が重複している。このため励起状態の蛍光物質①から、蛍光として利用されるエネルギーは蛍光物質②の励起に利用される

大藤道衛 「最適な実験を行うためのバイオ実験の原理」羊土社(2006) 198ページ

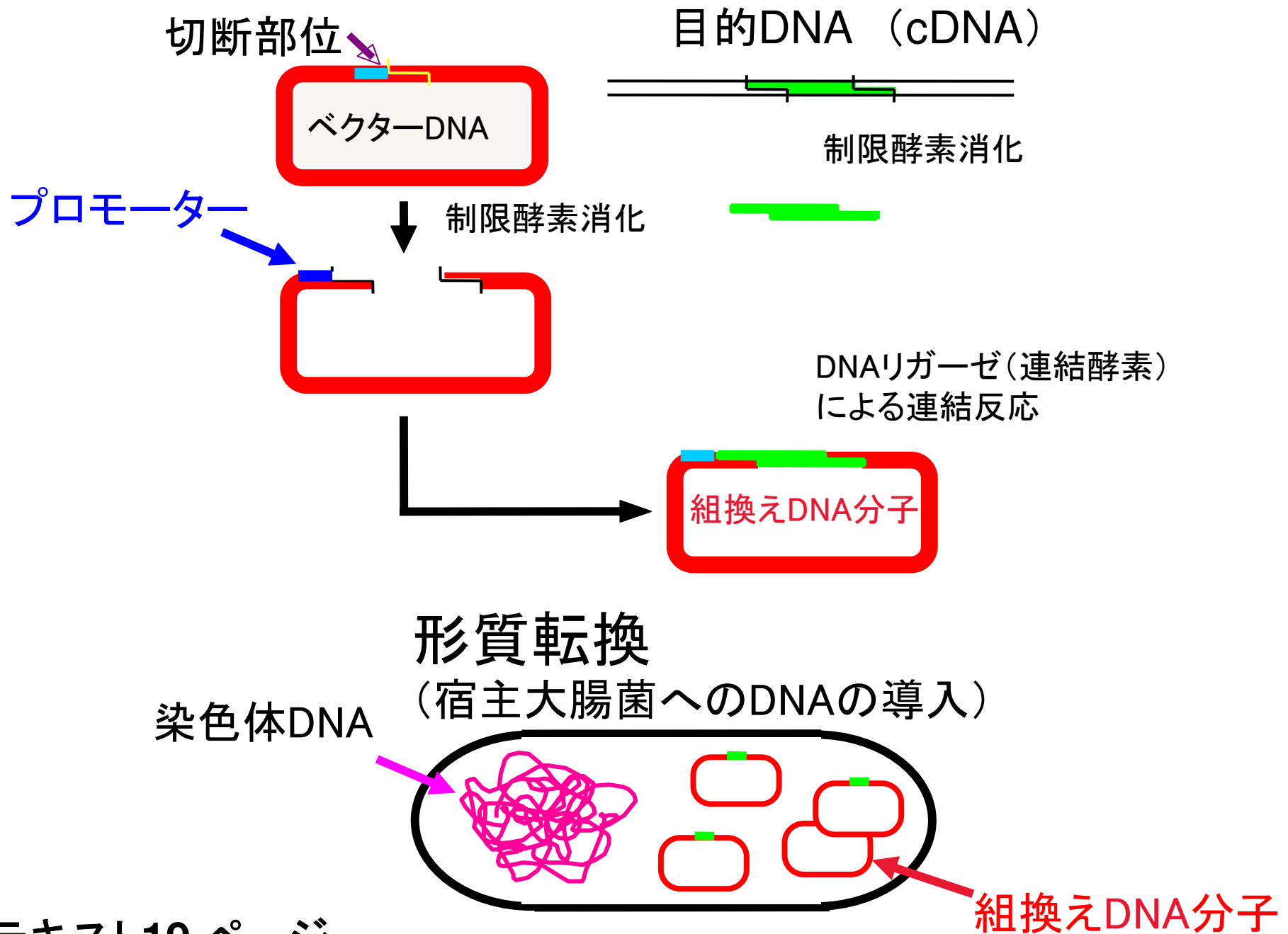
注:FRETの"F"は、発見者のTheodor Försterの"F"である。

IUPACは、Förster resonance energy transfer (FRET)の呼称を薦めている。

# 大腸菌の構造



# 遺伝子組換え実験(組換えDNA実験)





# Paul Bergによる遺伝子組換え実験のはじまり

1975年2月 アシロマ会議

Asilomar Conference on Recombinant DNA



## Paul Berg

### 1972年 組換えDNA技術

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*  
Vol. 69, No. 10, pp. 2904-2909, October 1972

**Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli***

(molecular hybrids/DNA joining/viral transformation/genetic transfer)

DAVID A. JACKSON\*, ROBERT H. SYMONS†, AND PAUL BERG

Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305

Contributed by Paul Berg, July 31, 1972

*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*  
Vol. 69, No. 11, pp. 3365-3369, November 1972

**Cleavage of Simian Virus 40 DNA at a Unique Site by a Bacterial Restriction Enzyme**

(DNA mapping/adenovirus-SV40 hybrid/T4 gene 32 protein/electron microscopy/double-strand cleavage)

JOHN F. MORROW AND PAUL BERG

Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305

Contributed by Paul Berg, August 16, 1972



James Watson, Sydney Brenner

Herbert W Boyer (UCSF)

Stanley Norman Cohen

Venture capitalist: Robert A Swanson

## 1976年Genentech設立

## バイオベンチャーの始まり

1978年組換えInsulin

1979年組換え成長ホルモン

写真: Wikipedia

<https://www.sciencehistory.org/historical-profile/paul-berg>

<https://fnih.org/our-people/board-of-directors/paul-berg>

# 遺伝子研究における指針・法律

## 遺伝子組換え実験（組換えDNA実験）

### 1975年アシロマ会議

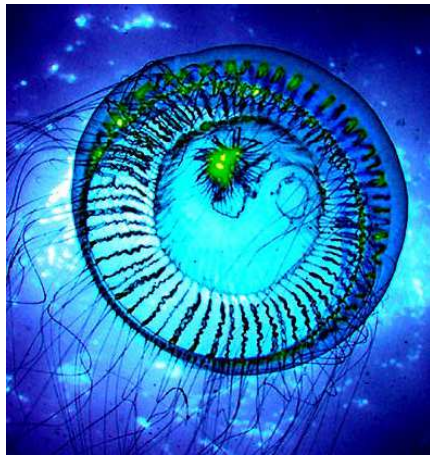
日本：1978-9年各省庁における「組換えDNA実験指針」

### 1999年バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書

- ①生物多様性の保全
  - ②生物資源の持続可能な利用
  - ③生物遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ公平な配分
- 地球上の生物は、進化の過程で多様に分化しバランスを持っている（生物多様性）。  
組換え生物（新しい生物）の環境への導入を適切に管理し多様性を維持する。

### 日本：2004年「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」施行

# 遺伝子組換え実験 (組換えDNA実験)



+



=

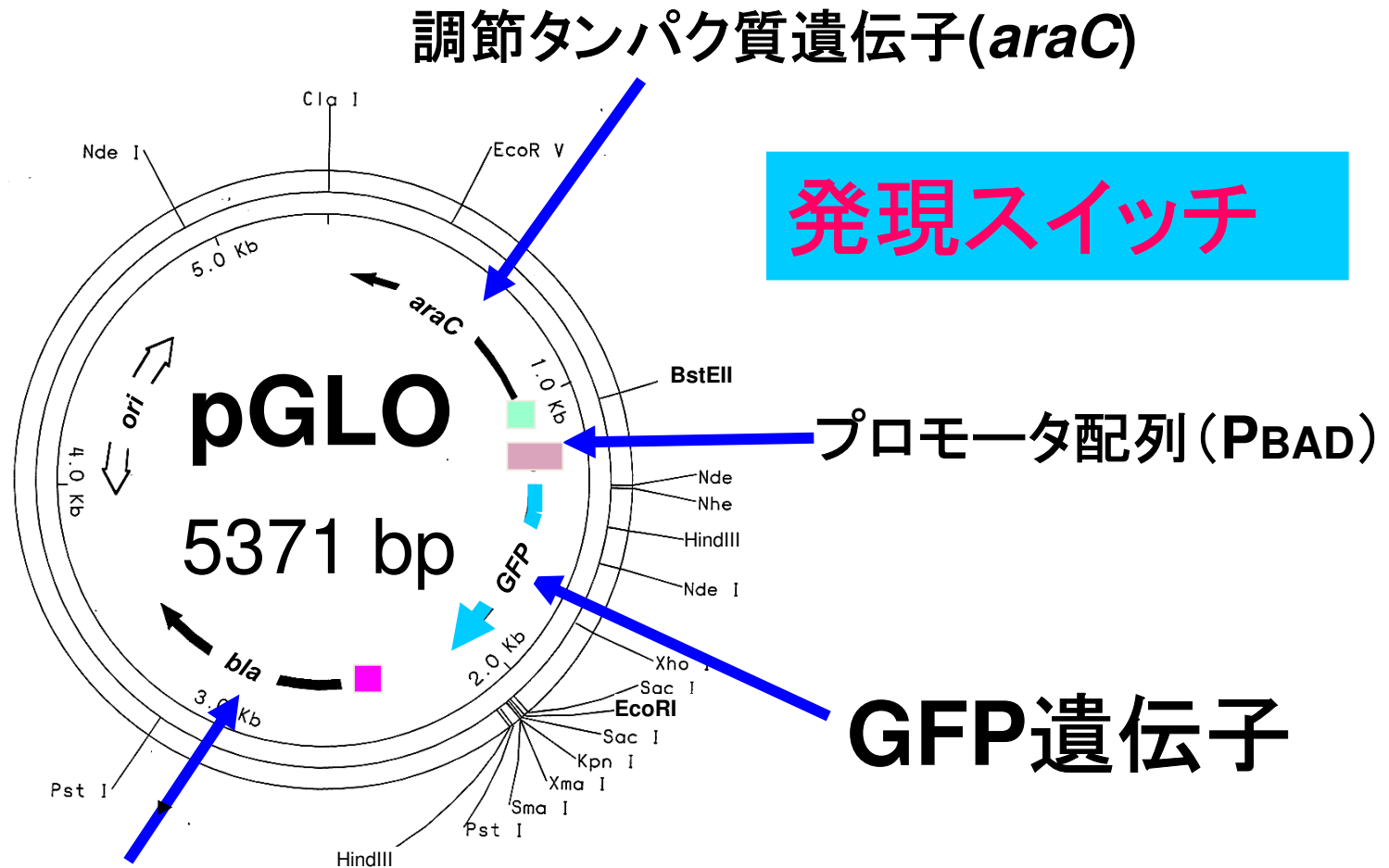
発現ON



発現OFF



# プラスミドDNA pGLOの構造

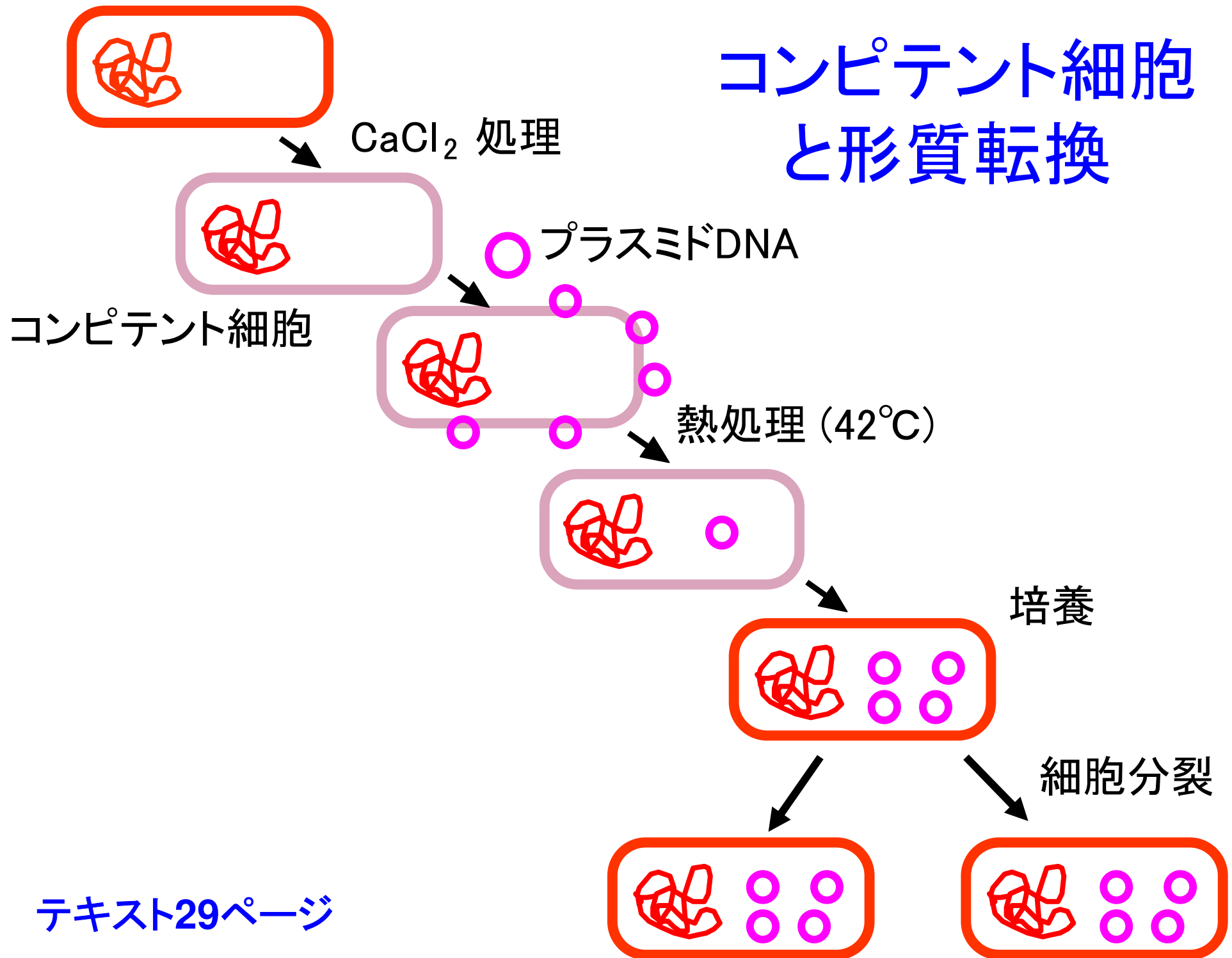


アンピシリン耐性遺伝子  
( $\beta$ ラクタマーゼ (beta lactamase) の遺伝子)

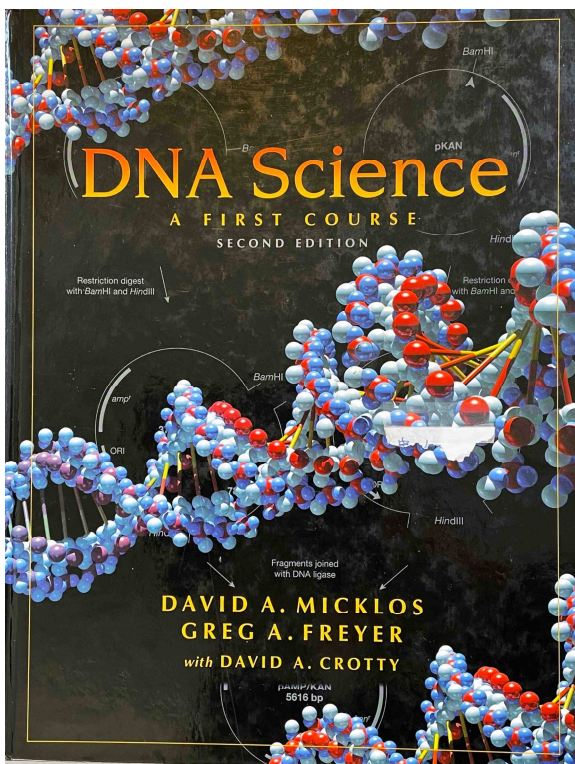
テキスト23ページ

pGLOプラスミドDNAの塩基配列: テキスト55-60ページ

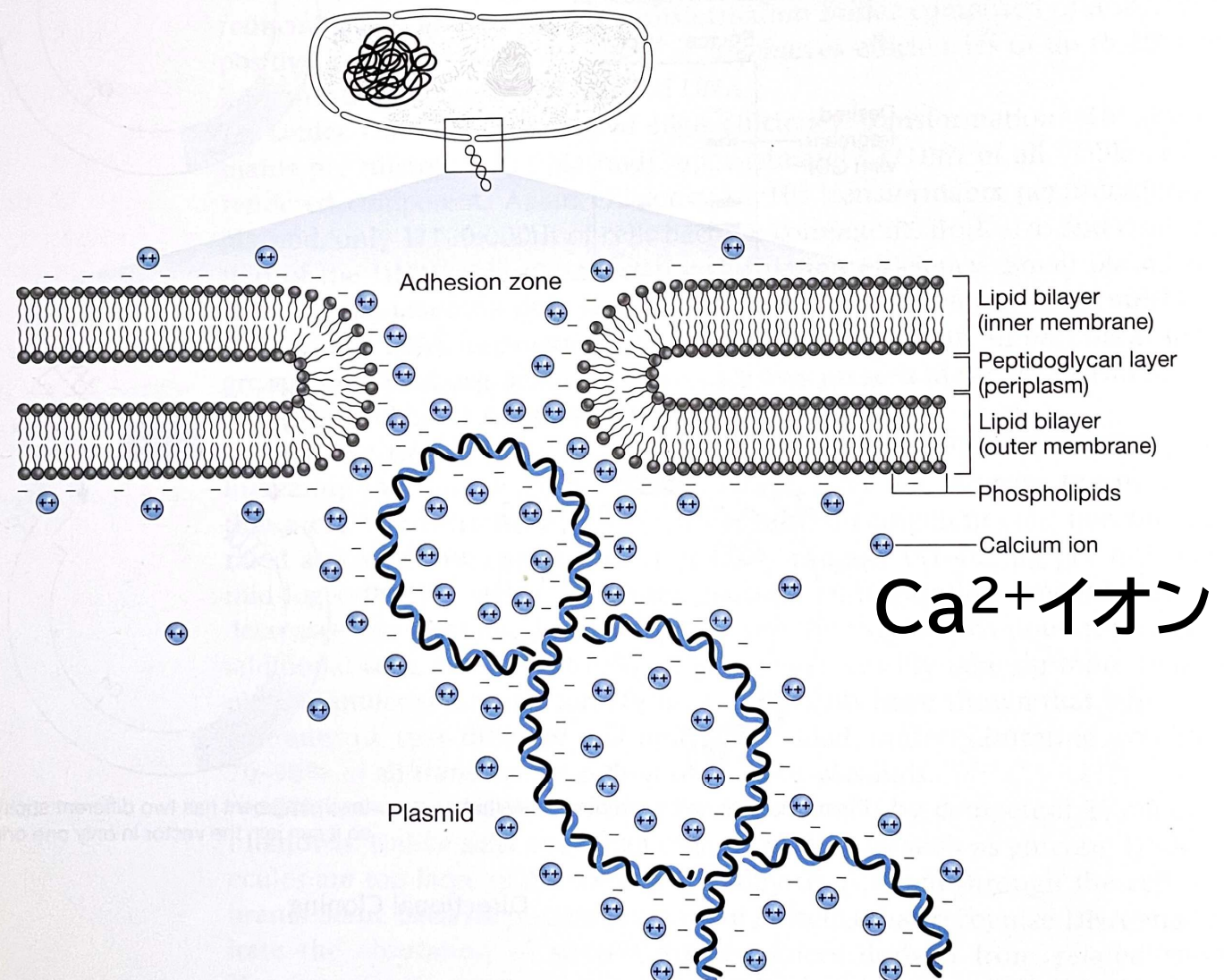
# コンピテント細胞 と形質転換







# CaCl法 Adhesion zone仮説



Proposed Molecular Mechanism of DNA Transformation of *E. coli*

Calcium ions (++) complex with negatively charged oxygens (-) to shield DNA phosphates from phospholipids at the adhesion zone.

参考資料

# Transformation of Escherichia coli Made Competent by Calcium Chloride Protocol

Created: Monday, 08 September 2008

**Author** • Anh-Hue T. Tu



米国微生物学会

## Theory

-----Many channels or **zones of adhesions** are formed by the fusion of the outer membrane and the inner membrane through the cell wall layer. **Although the transformation mechanism is not known, previous studies indicate that these channels allow for the transport of DNA molecules across the cell membrane (3, 15).**

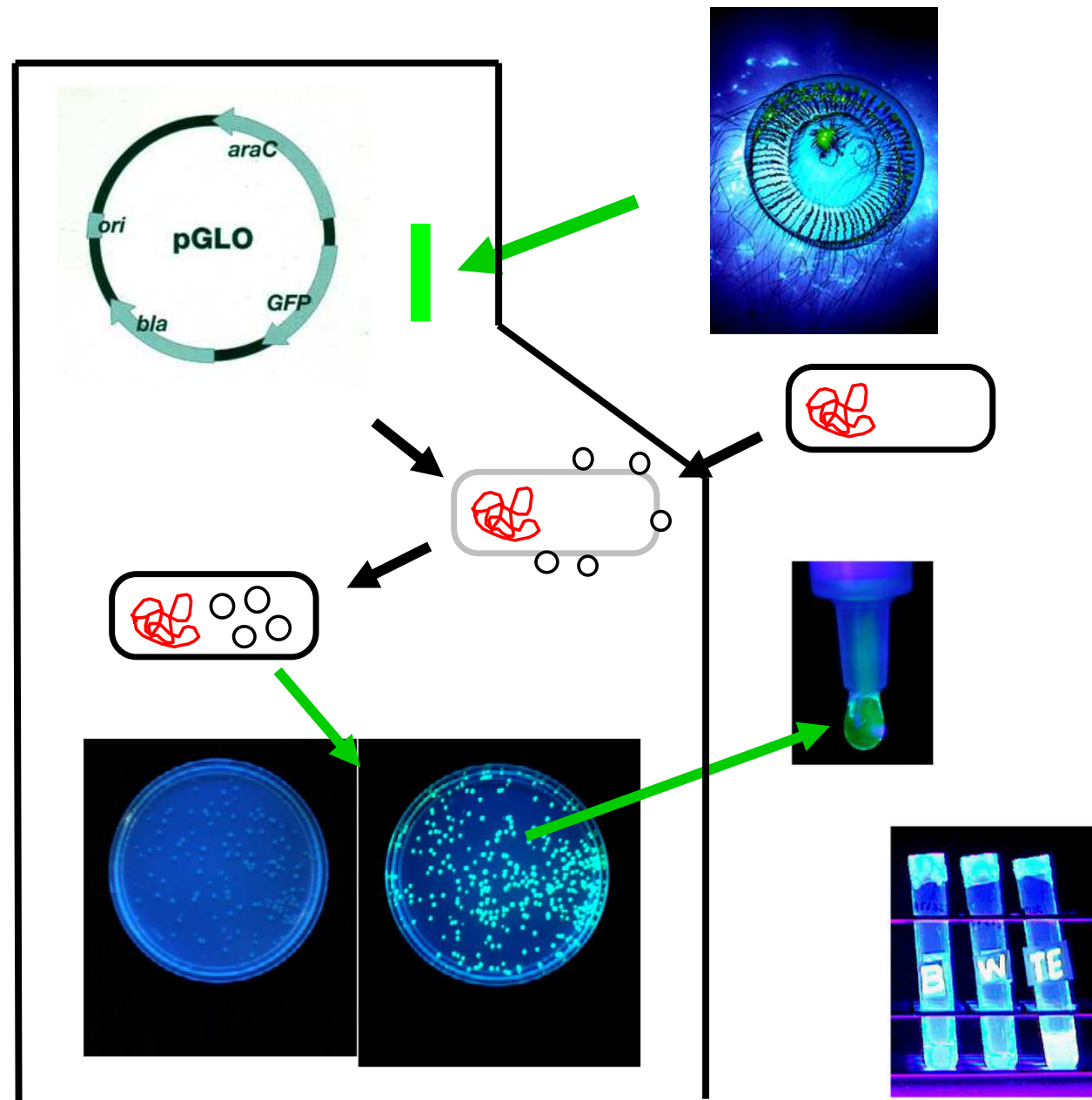
(形質転換の仕組みはわかっていないが、これまでの研究結果は接着ゾーン(zones of adhesions)などのチャンネルを通じたDNA分子の膜透過(輸送)を示唆している。)

The negative charges of the incoming DNA, however, are repelled by the negatively charged portions of the macromolecules on the bacterium's outer surface. The addition of  $\text{CaCl}_2$  serves to neutralize the unfavorable interactions between the DNA and the polyanions of the outer layer. The DNA and competent cells are further incubated on ice for thirty minutes to stabilize the lipid membrane and allow for increased interactions between calcium ions and the negative components of the cell. The reaction mixture is then exposed to a brief period of heat-shock at  $42^\circ\text{C}$ . **The change in temperature alters the fluidity of the semi-crystalline membrane state achieved at  $0^\circ\text{C}$  thus allowing the DNA molecule to enter the cell through the zone of adhesion** (温度変化により $0^\circ\text{C}$ で半結晶状態だった膜の流動性が変化し、DNA分子が接着ゾーン( zones of adhesions )を通過して細胞内に入ることになる。)

# GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

情報  
(DNA)

# 機能分子 (タンパク質)



# 遺伝子の役割

1. 遺伝情報を伝える役割  
⇒ 遺伝 (世代から世代へ)  
複製 (細胞から細胞へ)
2. 遺伝情報を働かせる役割  
⇒ 遺伝子発現

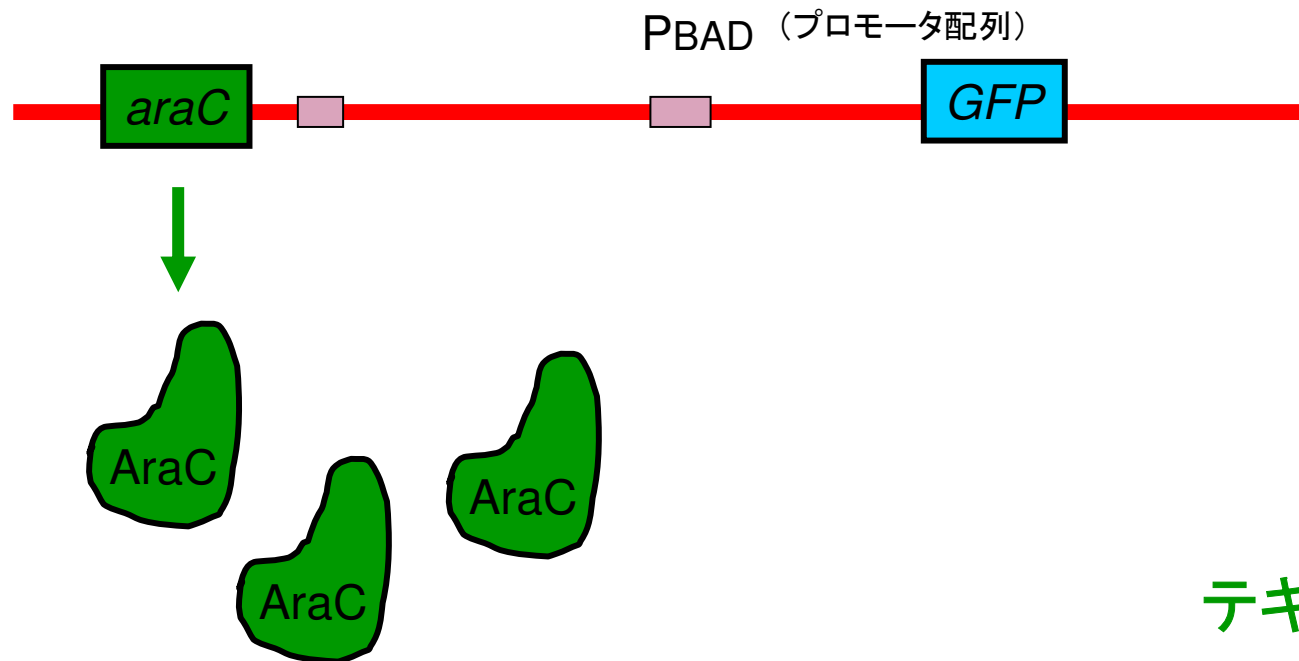
遺伝

**Heredity**

遺伝子

**Gene**

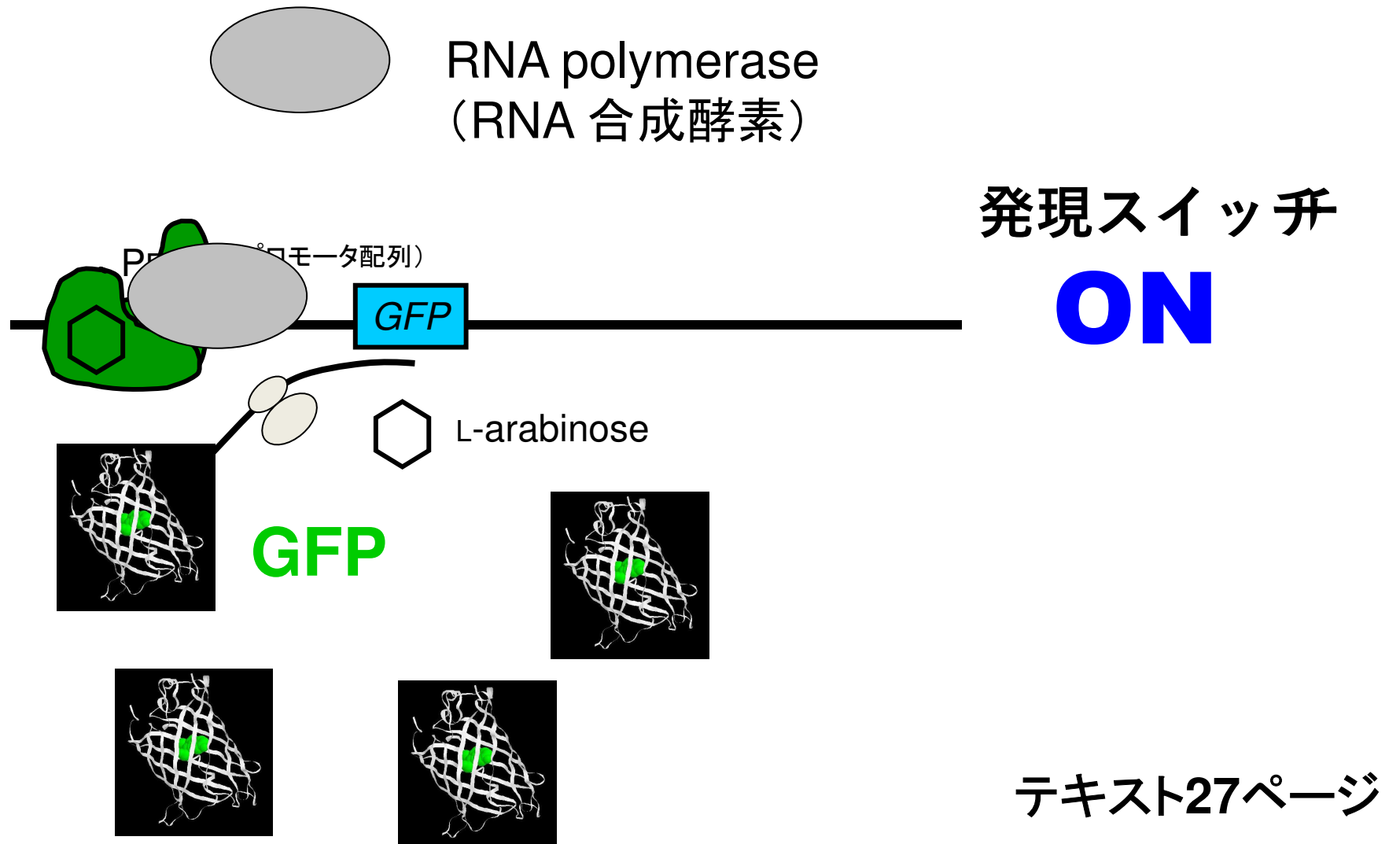
# AraC遺伝子、GFP遺伝子とプロモータ配列



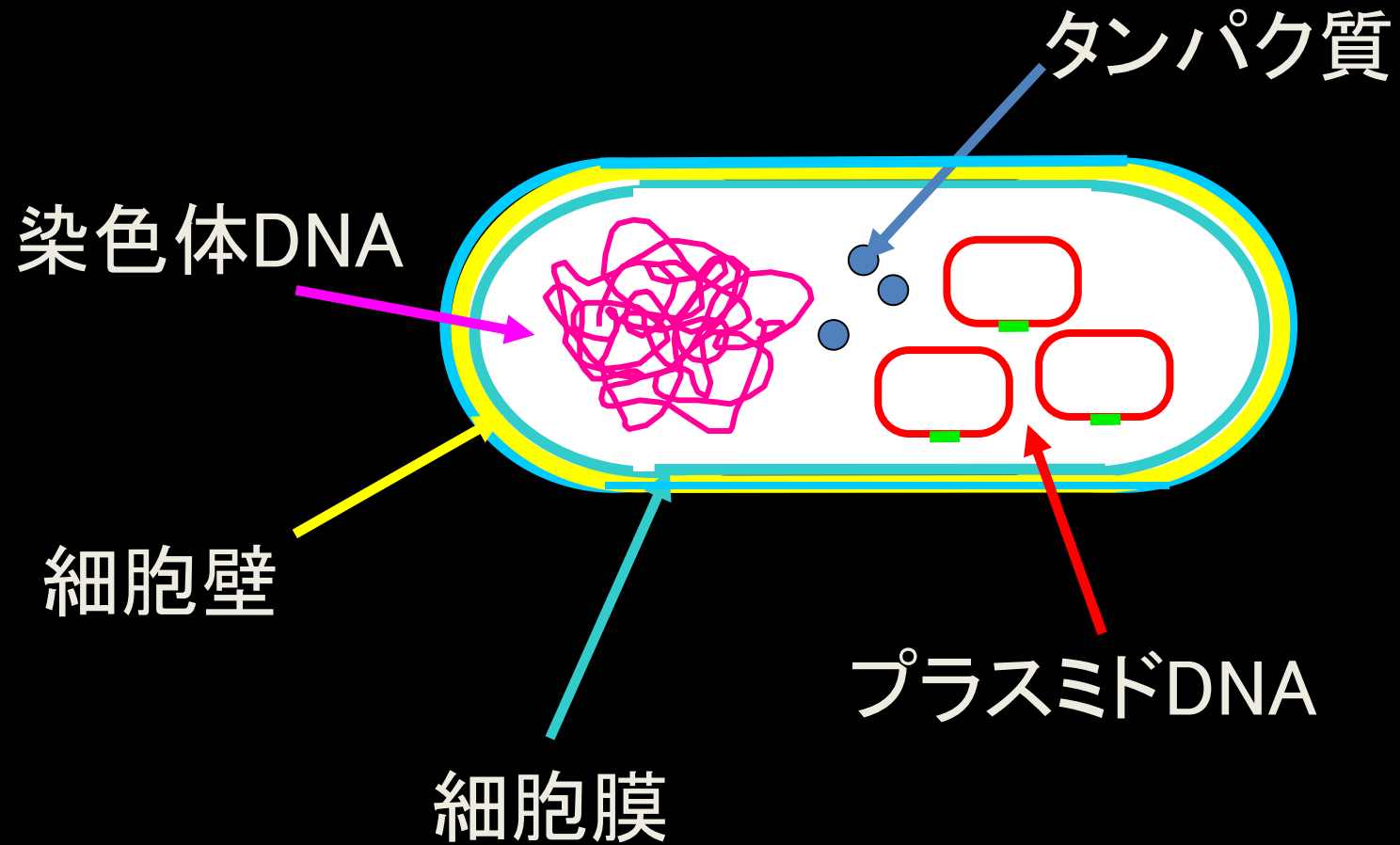
テキスト27ページ



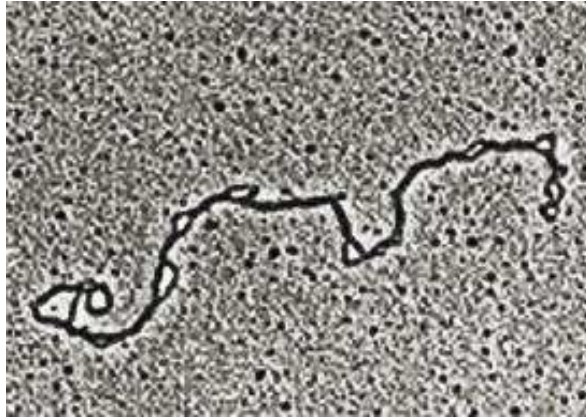
# GFPタンパク質の発現調節



# 大腸菌の構造



# プラスミドDNAの構造



covalently closed circular DNA:  
cccDNA

閉環状DNA、超らせんDNAとも呼ばれ、  
ニックが入っていない自然の環状DNA



Linear DNA

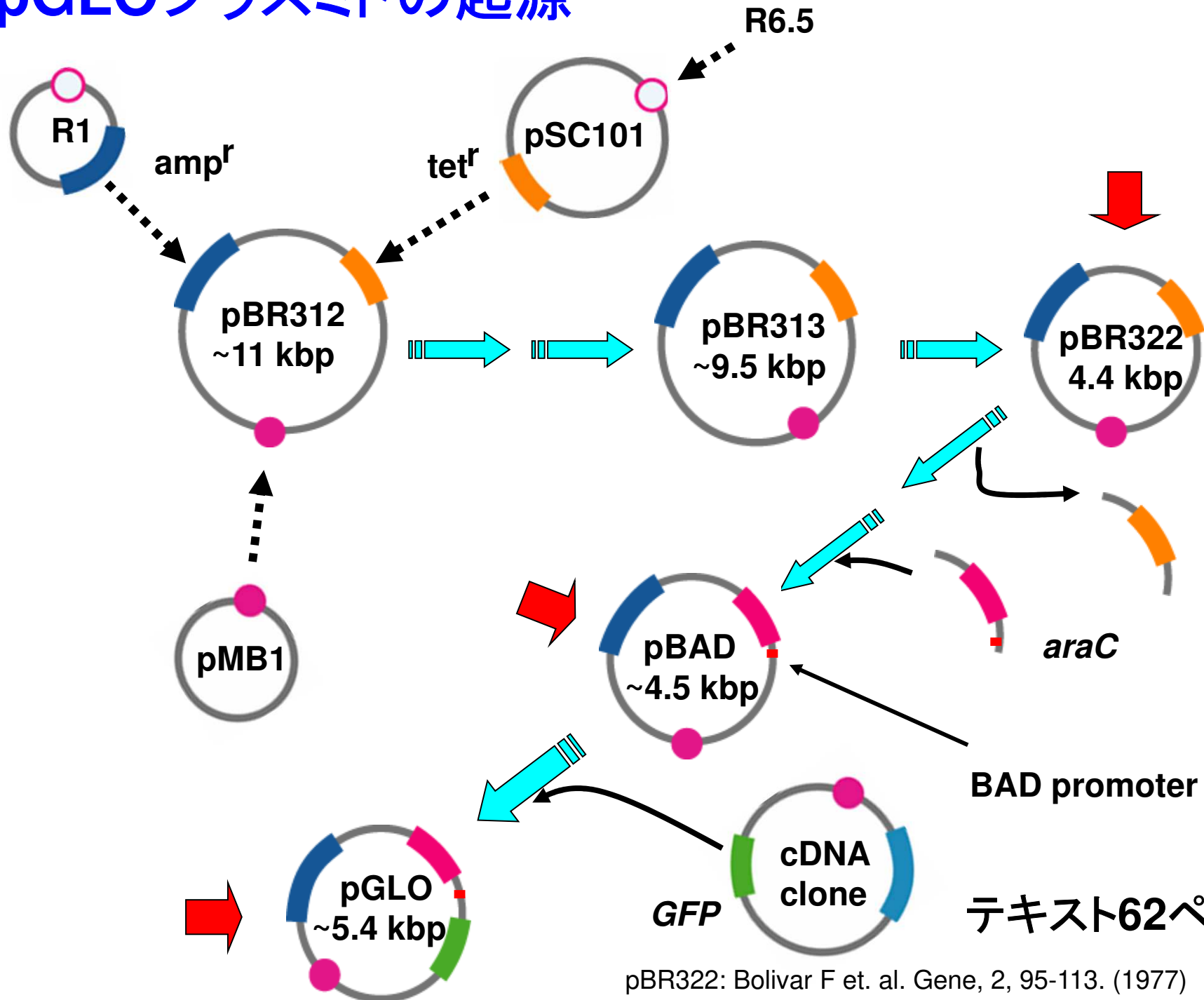
DNA分解酵素により切断され環状から  
直線状となったDNA(直鎖状DNA)



Open circular DNA: ocDNA

片方の鎖にニックが入り環状を保ったまま  
開環状となったDNA(開環状DNA)

# pGLOプラスミドの起源

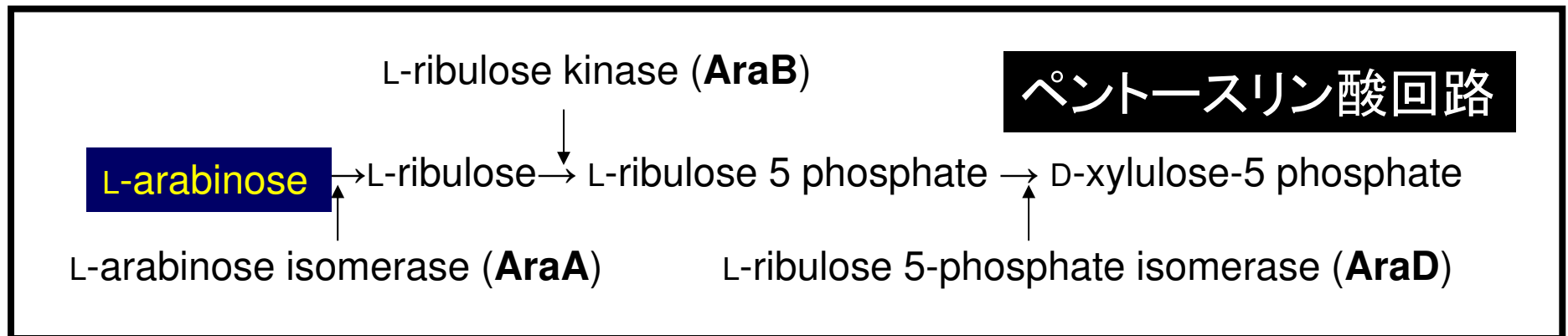


テキスト62ページ

pBR322: Bolivar F et. al. Gene, 2, 95-113. (1977)

pBAD: Guzman LM et. al. J. Bacteriol., 177, 4121-4130. (1995)

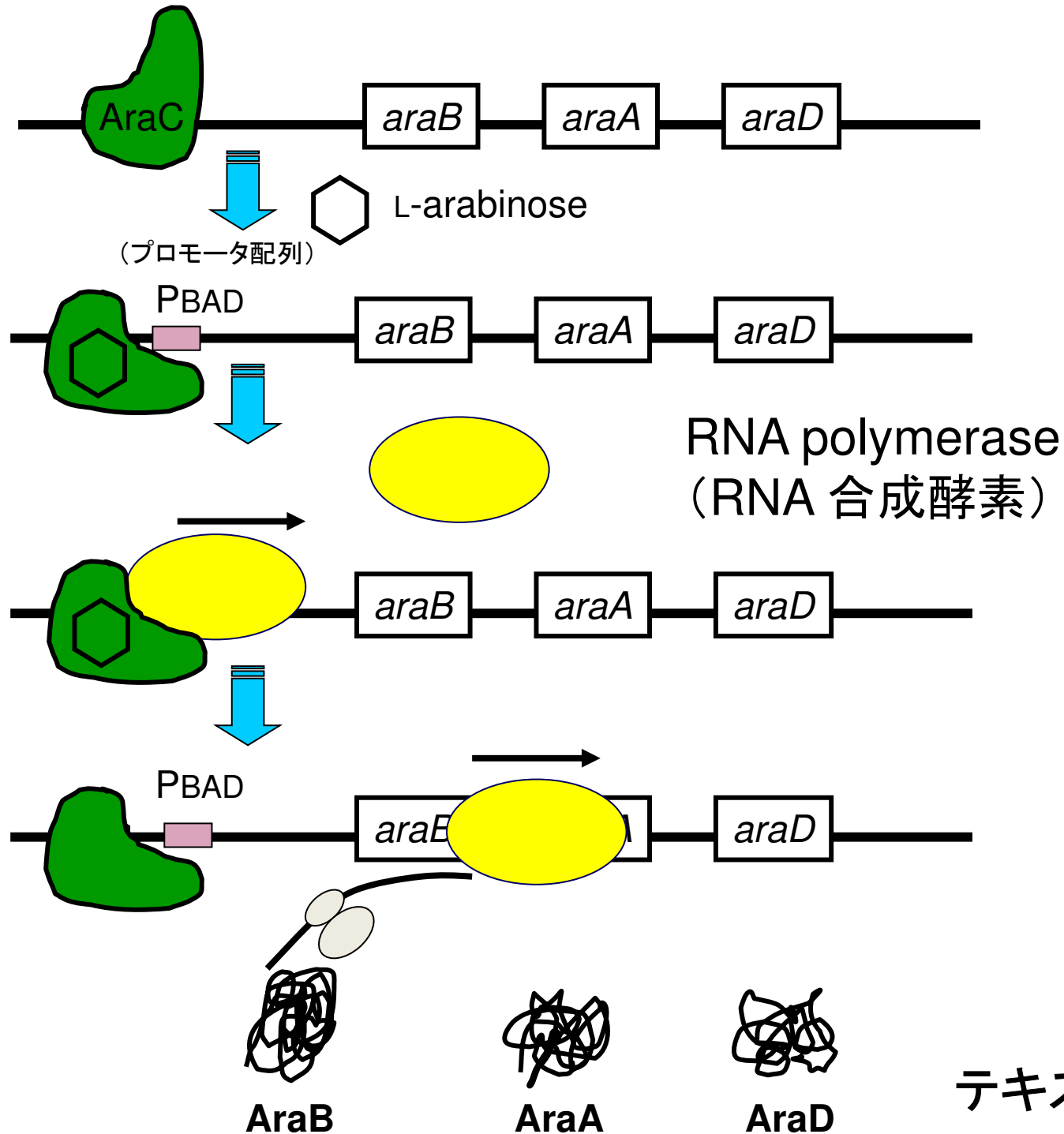
# アラビノースの代謝



テキスト26ページ



# アラビノースオペロンと遺伝子発現



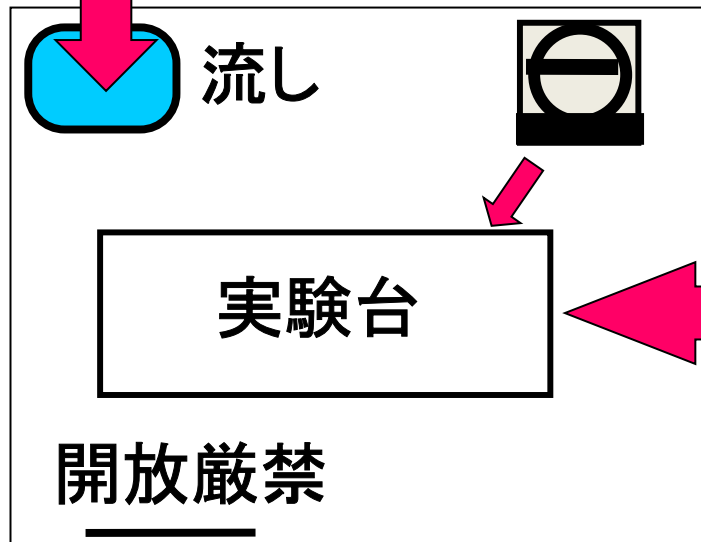
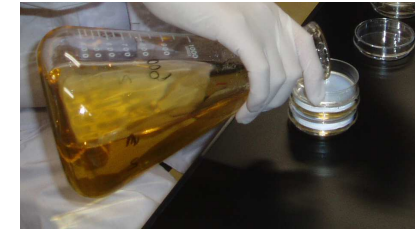
# 実験操作のポイント

# 実験前の確認



実験前必ず手を洗う  
オートクレーブ

器具・試薬・試薬→滅菌



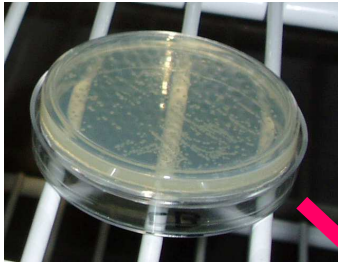
ドアを閉めて閉鎖系

70%エタノール等で殺菌

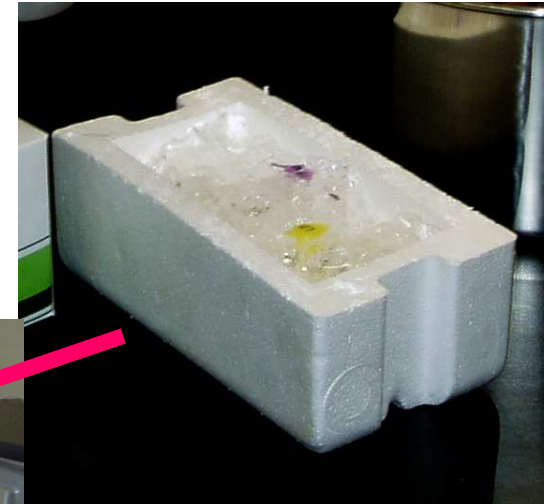


テキスト37ページ

# 実験台



大腸菌 (スタータープレート)



氷と試薬



プレート



水浴



ピペット・ループ他

テキスト36ページ

## 実験中

DNaseの混入を避ける  
→静かに実験する



## 実験後

必ず手を洗う



## 廃棄物処理

オートクレーブ滅菌



オートクレーブバッグ

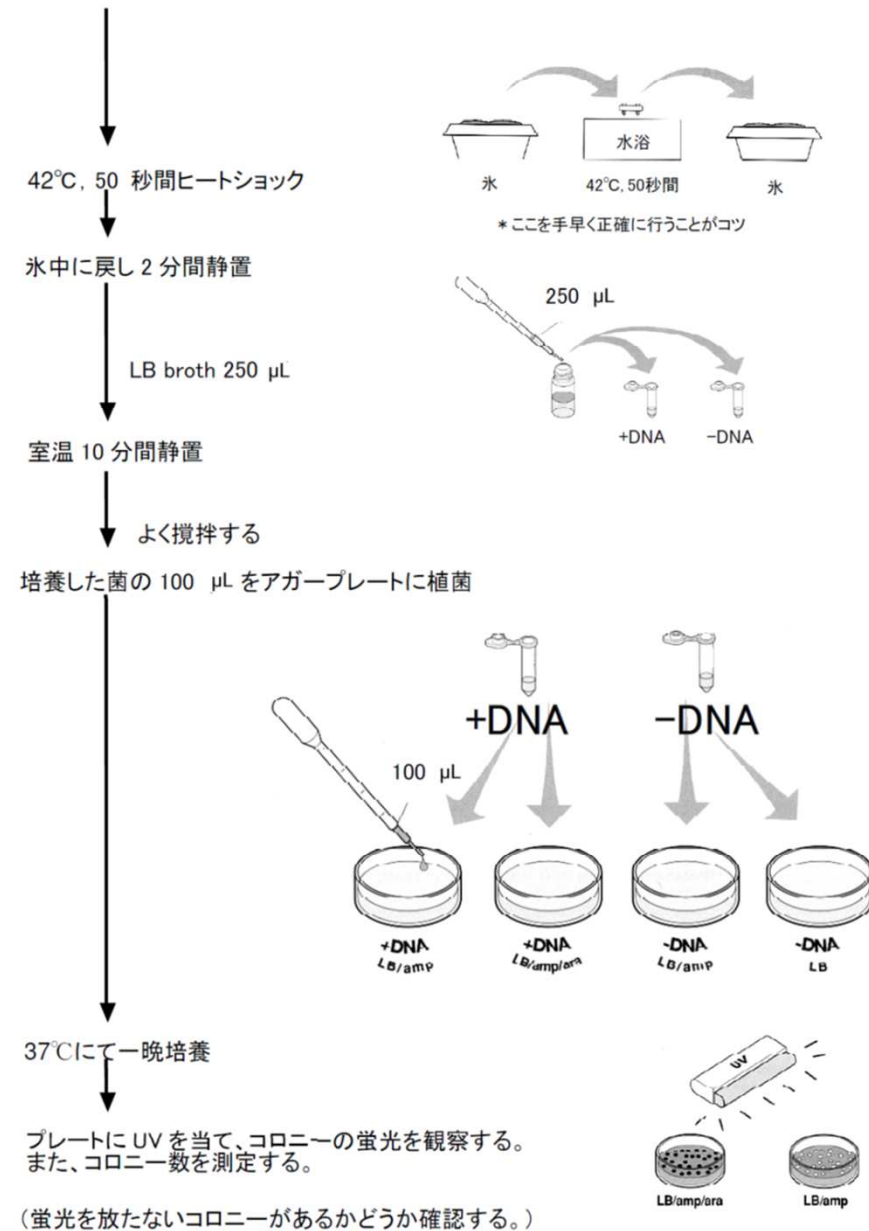
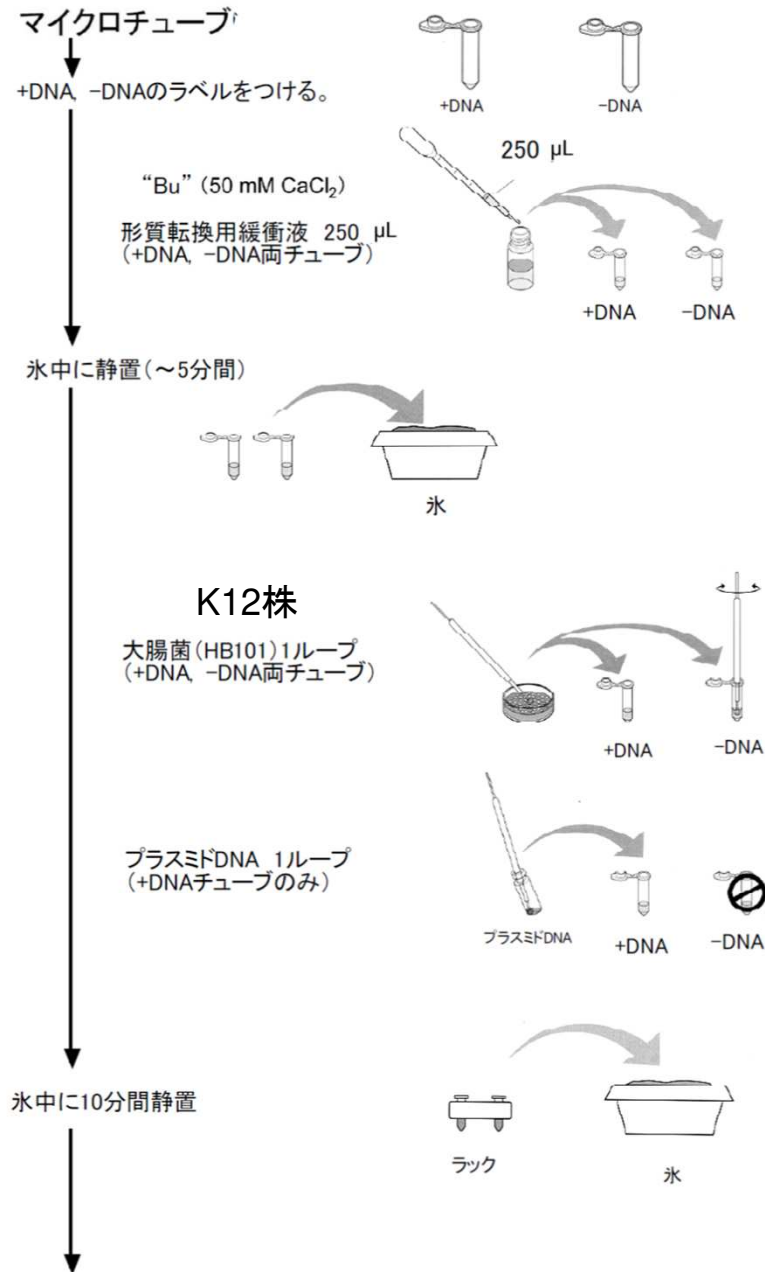


テキスト41ページ



# 形質転換実験操作

テキスト38-39ページ



# 形質転換実験操作

テキスト38-39ページ

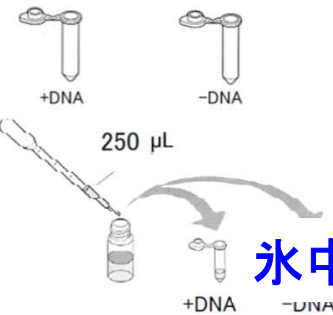
マイクロチューブ

+DNA -DNAのラベルをつける。

“Bu” (50 mM  $\text{CaCl}_2$ )

形質転換用緩衝液 250  $\mu\text{L}$   
(+DNA, -DNA両チューブ)

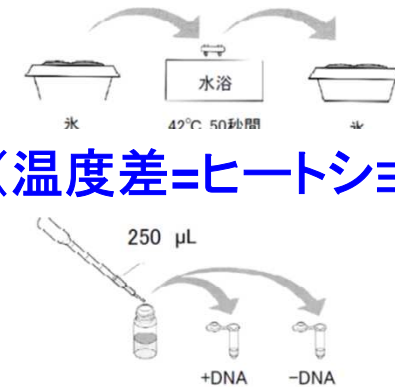
氷中に静置 (~5分間)



水中⇒42℃(50秒)⇒氷中(温度差=ヒートショック)

42℃. 50 秒間ヒートショック

LB broth 250  $\mu\text{L}$



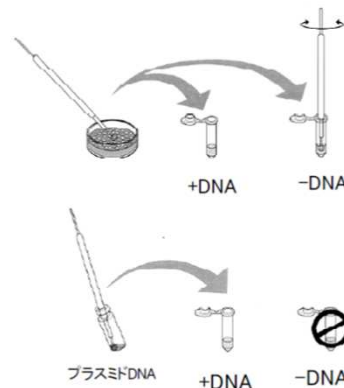
確り冷やす。

大腸菌、プラスミドDNA添加は、できるだけ氷の中で行う。

K12株

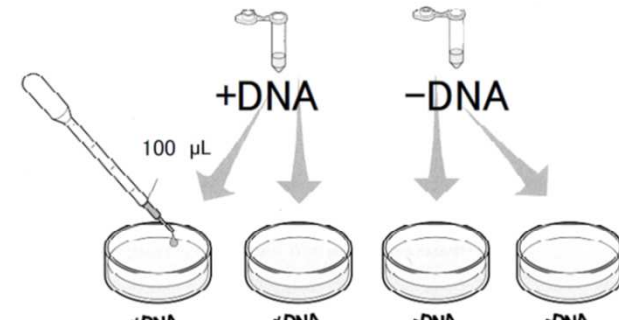
大腸菌(HB101) 1ループ  
(+DNA, -DNA両チューブ)

プラスミドDNA 1ループ  
(+DNAチューブのみ)



よく撹拌する

培養した菌の 100  $\mu\text{L}$  をアガープレートに植菌



植菌の前にチューブを撹拌して菌を分散させる。

氷中に10分間静置

本実験のコツは、  
大腸菌、プラスミドを確り採ること。  
操作中、コンピテント細胞を確りと氷の中で冷やすこと。



# 実験操作(1日目①) テキスト40ページ

チューブ

形質転換緩衝液添加

大腸菌添加

プラスミド添加

ヒートショック

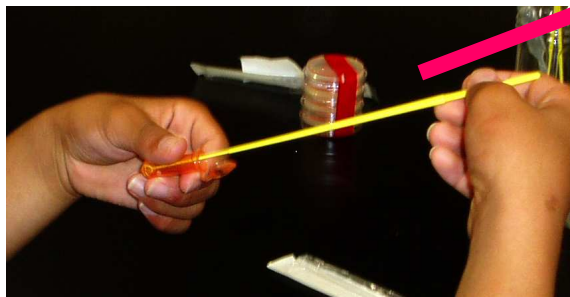
形質転換緩衝液  
添加

大腸菌(K12株:HB101)  
添加

プラスミドDNA(pGLO)添加

氷中

ヒートショック  
(42°C、50秒)



# 実験操作(1日目②)

テキスト41ページ





# 実験操作(1~2日目) テキスト41ページ

培養(37°C)  
↓  
紫外線照射  
↓  
結果観察

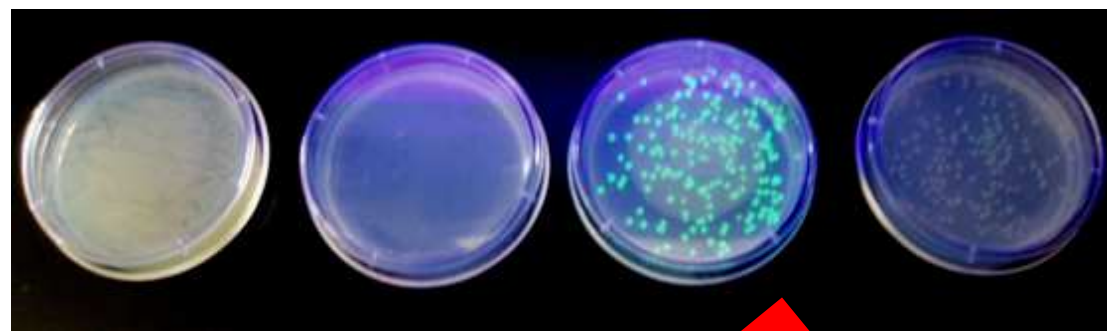


培養(裏返し)

結果観察



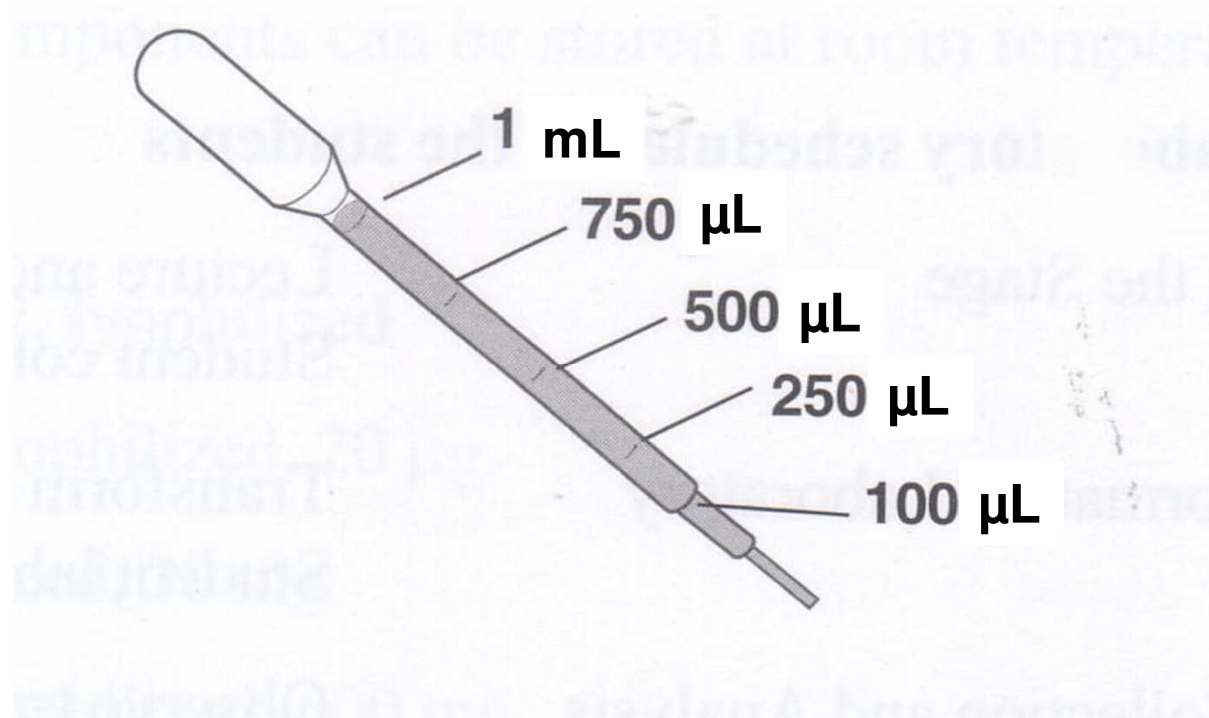
紫外線(366 nm)



コロニー数測定



## ① ピペットで液を採取

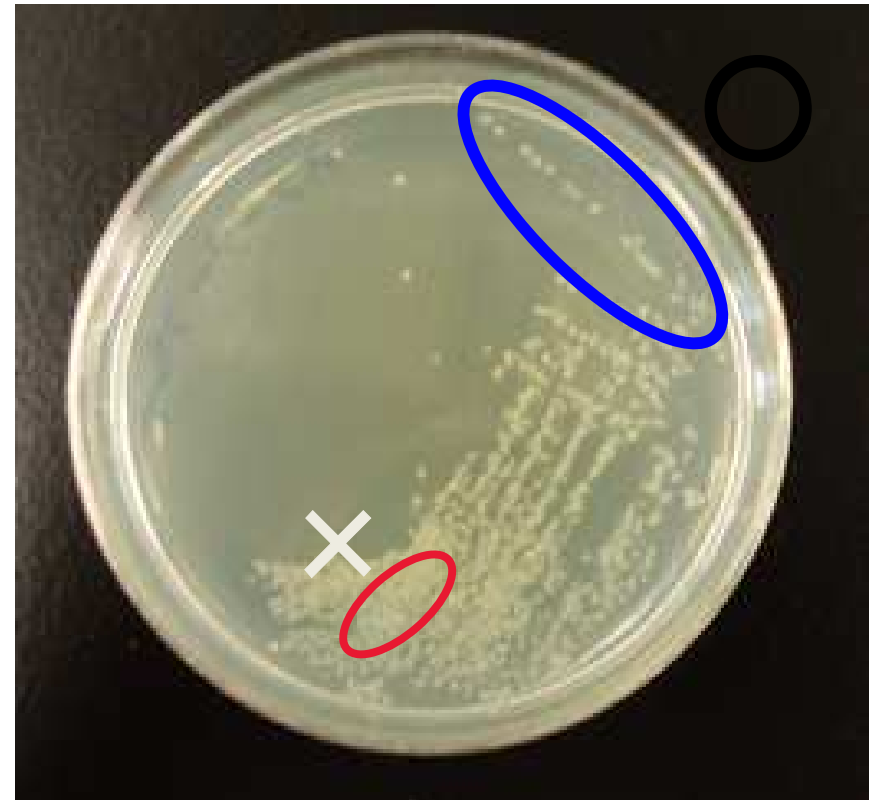
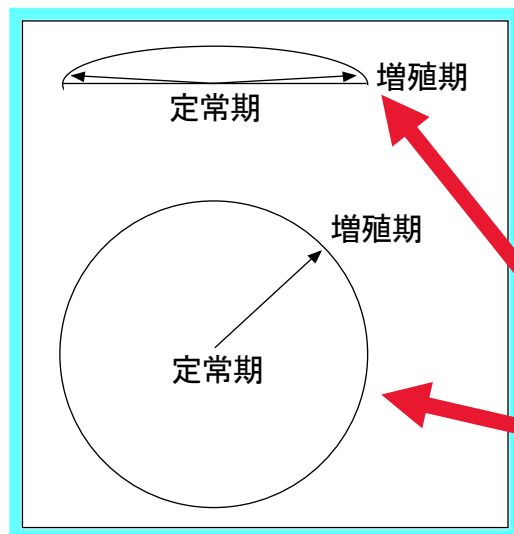
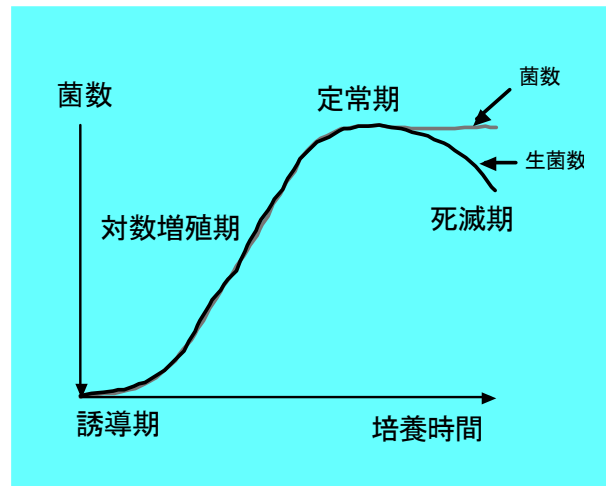


- 形質転換緩衝液添加
- LB-broth添加
- 形質転換した菌の採取

テキスト42ページ

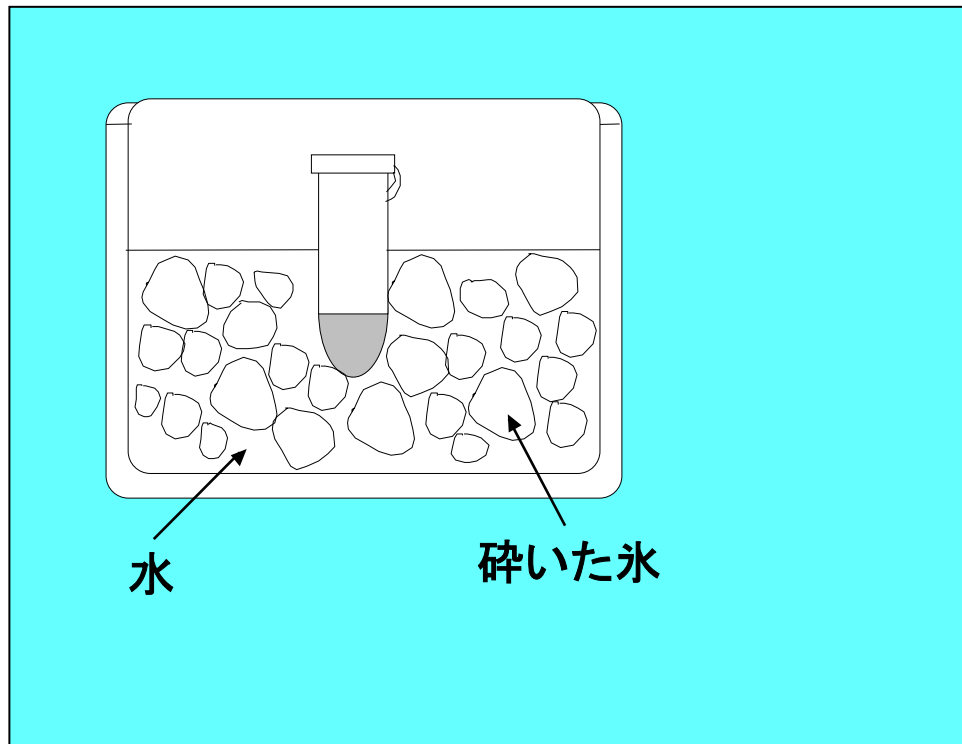
## ② スタータープレートから菌をしっかりと採る

使用する菌の増殖状態と数(～16時間培養)



1コロニー中の大腸菌増殖状態

③ 菌を形質転換緩衝液に添加した後、  
氷中で確りと冷やす



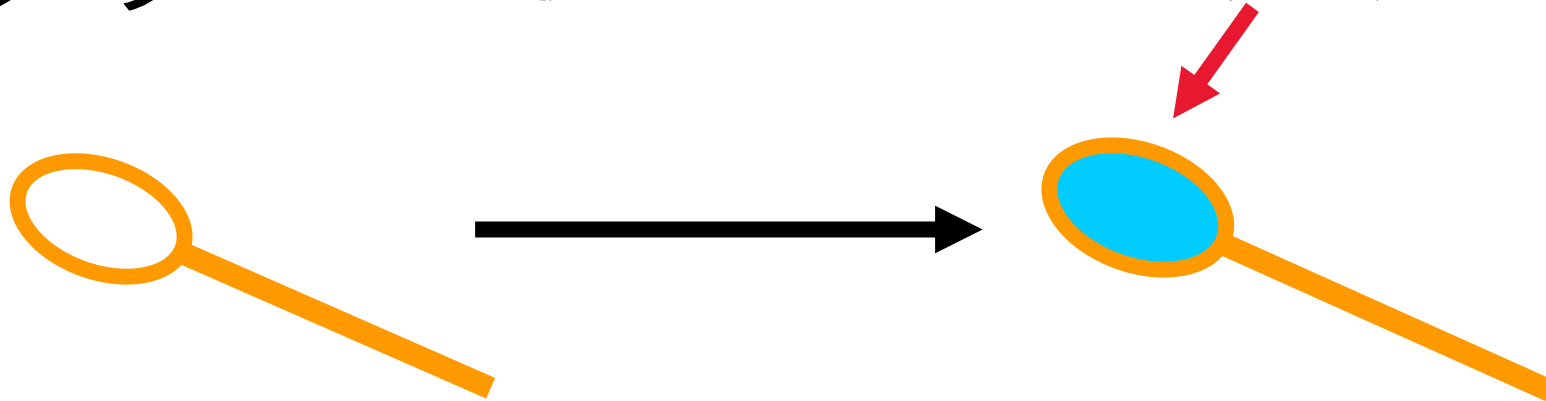
テキスト43ページ

#### ④ プラスミドDNAを確実に採取

→DNA + 表示チューブに添加

ループ

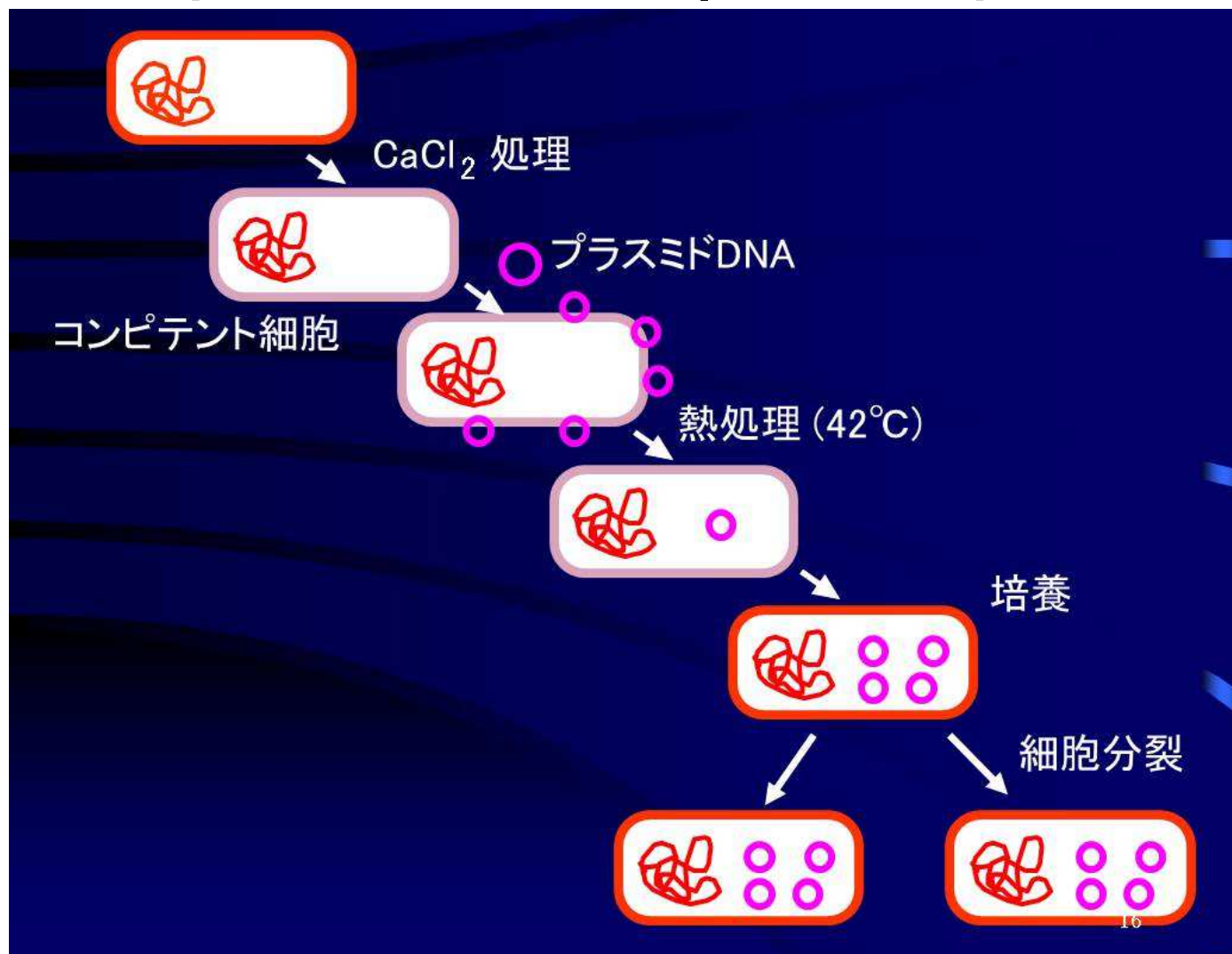
液をシャボン玉のようにすくい取る



テキスト44ページ

## ⑤ ヒートショック

氷中 > 42°C・50秒 > 氷中





## ⑥ LB broth添加後の放置

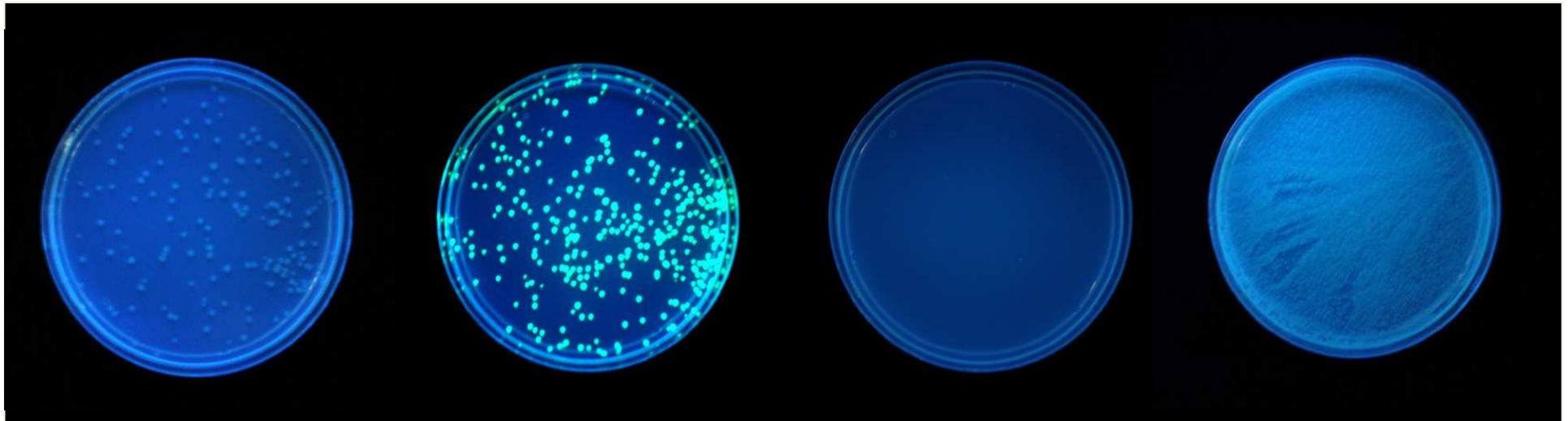
→アンピシリン分解酵素の生産  
＝アンピシリン耐性の獲得

## ⑦ 液の混合

→沈んだ大腸菌を懸濁する

# pGLOプラスミドと遺伝子発現調節

# 実験結果：遺伝子発現調節



+DNA

+DNA

-DNA

-DNA

LB/amp/

LB/amp/**ara**

LB/amp

LB

+DNA

pGLO導入実験

-DNA

pGLO未導入実験

遺伝子組換え実験  
(組換えDNA実験)

テキスト48ページ

# 高等学校「生物」での本実験の取り扱い(新課程事例)

料  
解

## 大腸菌の遺伝子組換え実験



目的

大腸菌に緑色蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子をもつプラスミドを導入し、「光る大腸菌」をつくることで遺伝子組換えのしくみを理解する。

事前準備

【大腸菌を培養する寒天培地のプレートの作製】(8人分)

① LB プレート 16 枚を作製する。

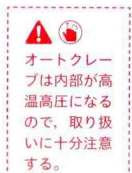
LB/寒天粉末 10.5 g を蒸留水 300 mL に溶解し、オートクレープ処理(121℃, 15 分)した後、16 枚のプレートに分注する。8 枚に LB と記入し、残り 8 枚には何も記入しない。



▲図a 溶解前のLB培地



▲図b 溶解後のLB培地



▲図c 培地をプレートに注ぐ

② LB/Amp プレート 16 枚と、LB/Amp/Ara プレート 8 枚を作製する。Amp とは、アンピシリンという抗生物質の添加を示す。Ara とは、アラビノースの添加を示す。

LB/寒天粉末 15.8 g を蒸留水 450 mL に溶解し、オートクレープ処理(121℃, 15 分)した後、50℃に冷えてからアンピシリン 45 mg を加えて混ぜ、300 mL を 16 枚のプレートに分注する。すべてのプレートに LB/Amp と記入する。

③ ②で作製した培地の残りの 150 mL にアラビノース 900 mg を加え、8 枚のプレートに分注する。LB/Amp/Ara と記入する。

【スタータープレートの作製】

①で作製した LB プレートのうち、何も記入していない 8 枚に大腸菌を含む溶液を添加して、プレート全体に薄く広げて 37℃の恒温器に入れて一晩培養し、スタータープレートとする。

### 実験器具・材料

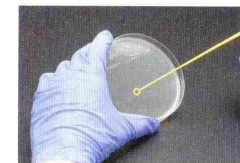
(市販のキットを用いてもよい)

- ☐ 大腸菌(K-12株など)
- ☐ LB/寒天培地の粉末
- ☐ LB液体培地
- ☐ 滅菌プレート
- ☐ アンピシリン
- ☐ アラビノース
- ☐ 遺伝子組換え用プラスミド
- (pGLO: アンピシリン分解酵素のβラクタマーゼの遺伝子とアラビノースで発現が調節されている GFP の遺伝子が存在)
- ☐ 形質転換溶液
- ☐ フラスコ
- ☐ マイクロチューブ
- ☐ チューブラック
- ☐ ブラックライト
- ☐ 恒温水槽
- ☐ 温度計
- ☐ タイマー
- ☐ マイクロピペット
- ☐ 氷(クラッシュアイス)
- ☐ 恒温器
- ☐ 蒸留水
- ☐ 保護眼鏡またはゴーグル
- ☐ ゴム手袋

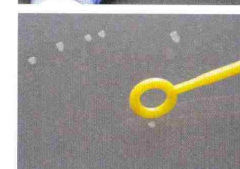
実験は、文部科学省ライフサイエンス課のリーフレット「高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ」に従って行う。

実験手順

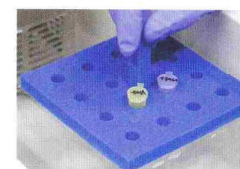
- ① 2本のマイクロチューブを用意し、「+DNA」、「-DNA」と記入し、チューブラックに差す。
- ② マイクロピペットを使用して形質転換溶液 250 μL を、それぞれのチューブに加え、チューブラックごと氷上に置く。
- ③ 大腸菌のスタータープレートのコロニーから、大腸菌を少量かき取り、それぞれのチューブに懸濁する。次に、プラスミド溶液をマイクロピペットで 10 μL を計り、「+DNA」チューブに加えて氷上で 10 分間放置する。
- ④ 冷やしている間に、4 枚のプレート(LB プレート 1 枚、LB/Amp プレート 2 枚、LB/Amp/Ara プレート 1 枚)を準備し、下のようになにに a~d の記号と +DNA、または -DNA を記入する。  
LB プレート: a. -DNA  
LB/Amp プレート: b. -DNA  
LB/Amp プレート: c. +DNA  
LB/Amp/Ara プレート: d. +DNA
- ⑤ チューブラックごと 42℃の恒温水槽に 50 秒浸けた後、すぐに氷上に戻す(42℃と 50 秒は正確に行う)。この操作はヒートショックと呼ばれ、大腸菌のプラスミドの取り込みを促進する。
- ⑥ 氷上に 2 分間置いた後、室温に戻した 2 本のマイクロチューブに LB 液体培地を 250 μL 加え、室温で 10 分間放置する。
- ⑦ 「+DNA」チューブの大腸菌液 100 μL を④の c、d のプレートに、「-DNA」チューブの大腸菌液 100 μL を④の a、b のプレートにそれぞれ滴下し、すばやくプレート全体に広げる。
- ⑧ プレートを裏返して 37℃の恒温器に入れて、24 時間以上培養し、観察する。



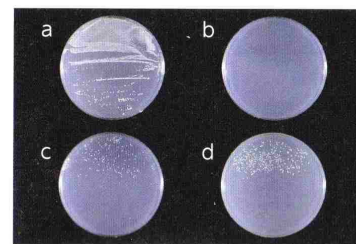
▲図d コロニーをかき取る



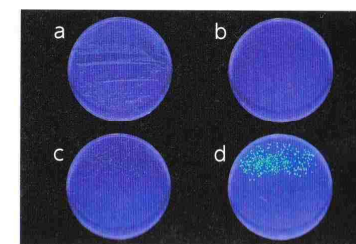
▲図e ヒートショック



ブラックライト使用時には、皮膚を保護するために長袖の服や手袋を着用し、眼を保護するためにゴーグルを着用する。



▲図f 培養1日後プレート



▲図g ブラックライトを照射したようす

高等学校「生物」(東京書籍)令和5年2月10日発行

# 形質転換実験 結果と考察



2025年7月25日  
おおとう みちえい

大藤 道衛



# 遺伝子組換え実験(講義と実習)

## 2日目

### 実習・演習

形質転換結果判定と考察

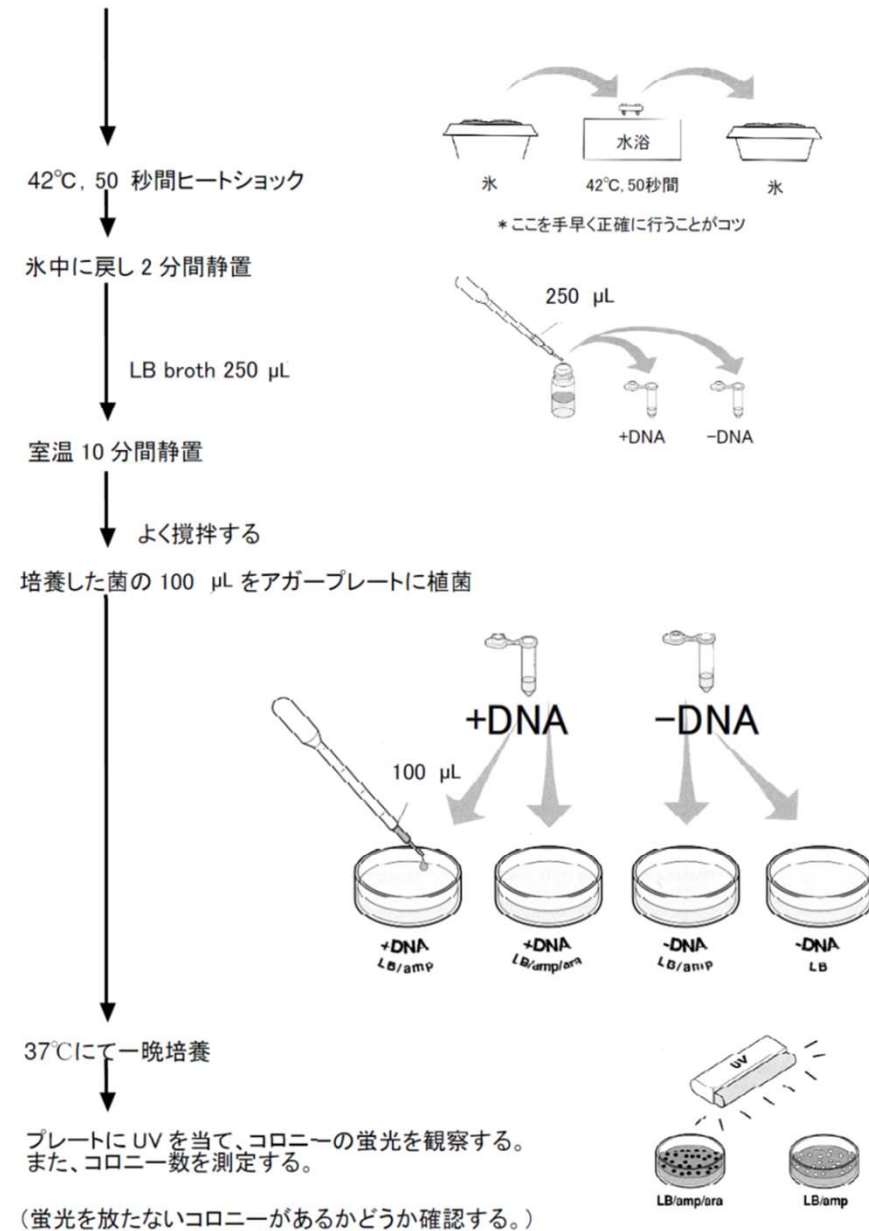
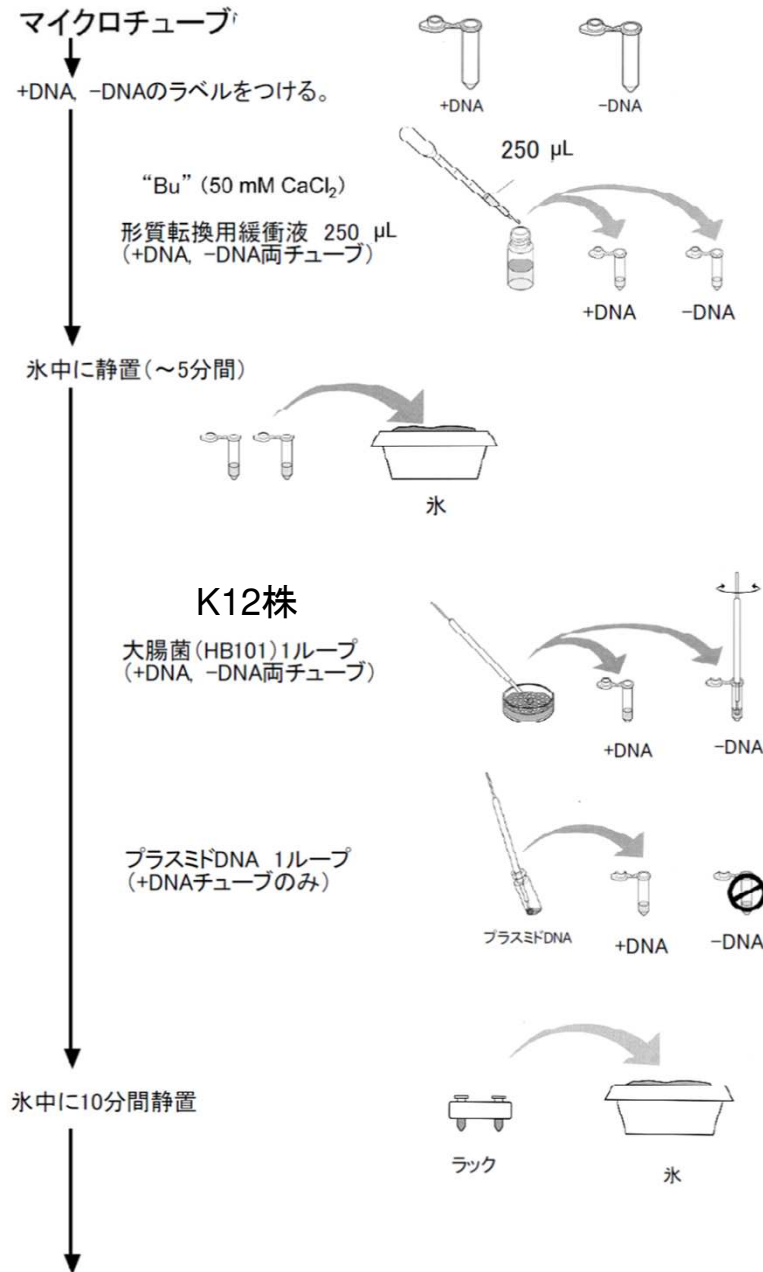
GFP遺伝子発現実験

実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

廃棄物処理方法

# 形質転換実験操作

テキスト38-39ページ



# 形質転換実験操作

テキスト38-39ページ

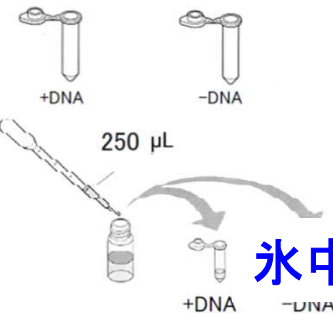
マイクロチューブ

+DNA -DNAのラベルをつける。

“Bu” (50 mM  $\text{CaCl}_2$ )

形質転換用緩衝液 250  $\mu\text{L}$   
(+DNA, -DNA両チューブ)

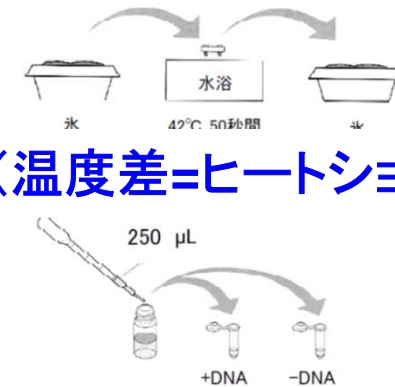
氷中に静置 (~5分間)



水中⇒42℃(50秒)⇒氷中(温度差=ヒートショック)

42℃. 50 秒間ヒートショック

LB broth 250  $\mu\text{L}$



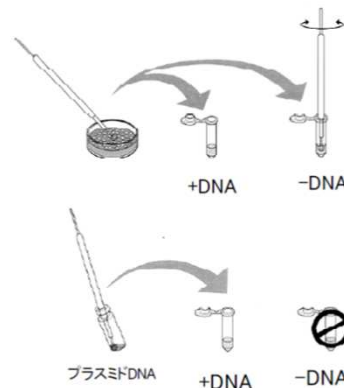
確り冷やす。

大腸菌、プラスミドDNA添加は、できるだけ氷の中で行う。

K12株

大腸菌(HB101) 1ループ  
(+DNA, -DNA両チューブ)

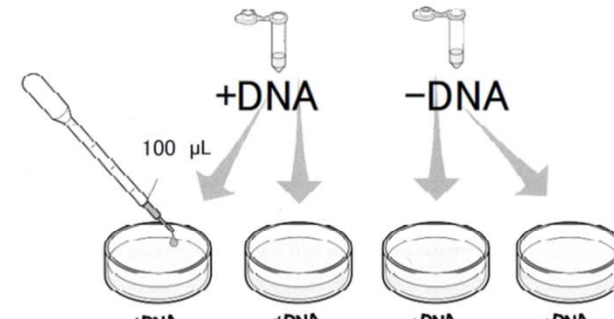
プラスミドDNA 1ループ  
(+DNAチューブのみ)



氷中に10分間静置

よく攪拌する

培養した菌の 100  $\mu\text{L}$  をアガープレートに植菌

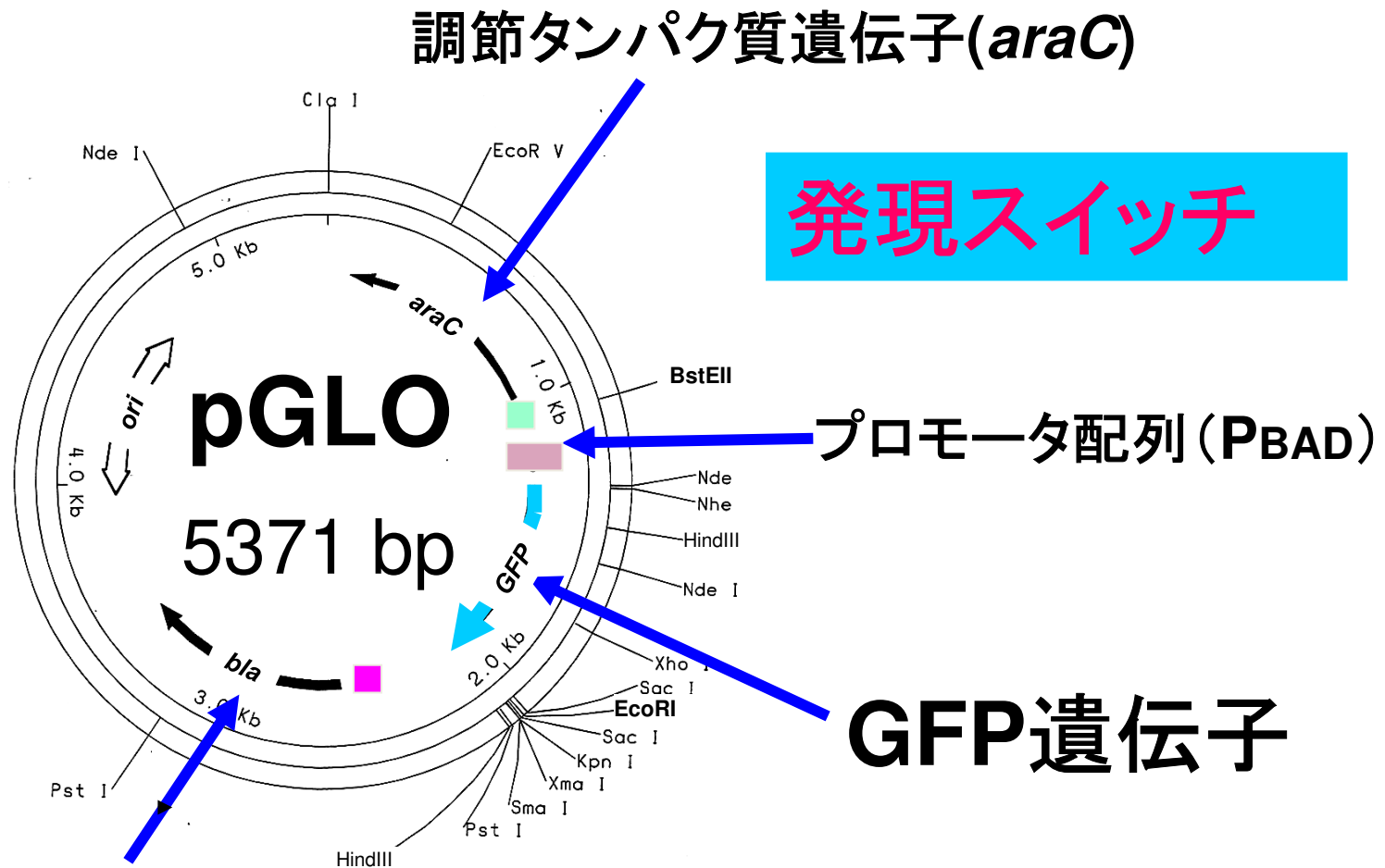


植菌の前にチューブを攪拌して菌を分散させる。

本実験のコツは、  
大腸菌、プラスミドを確り採ること。  
操作中、コンピテント細胞を確りと氷の中で冷やすこと。



# プラスミドDNA pGLOの構造

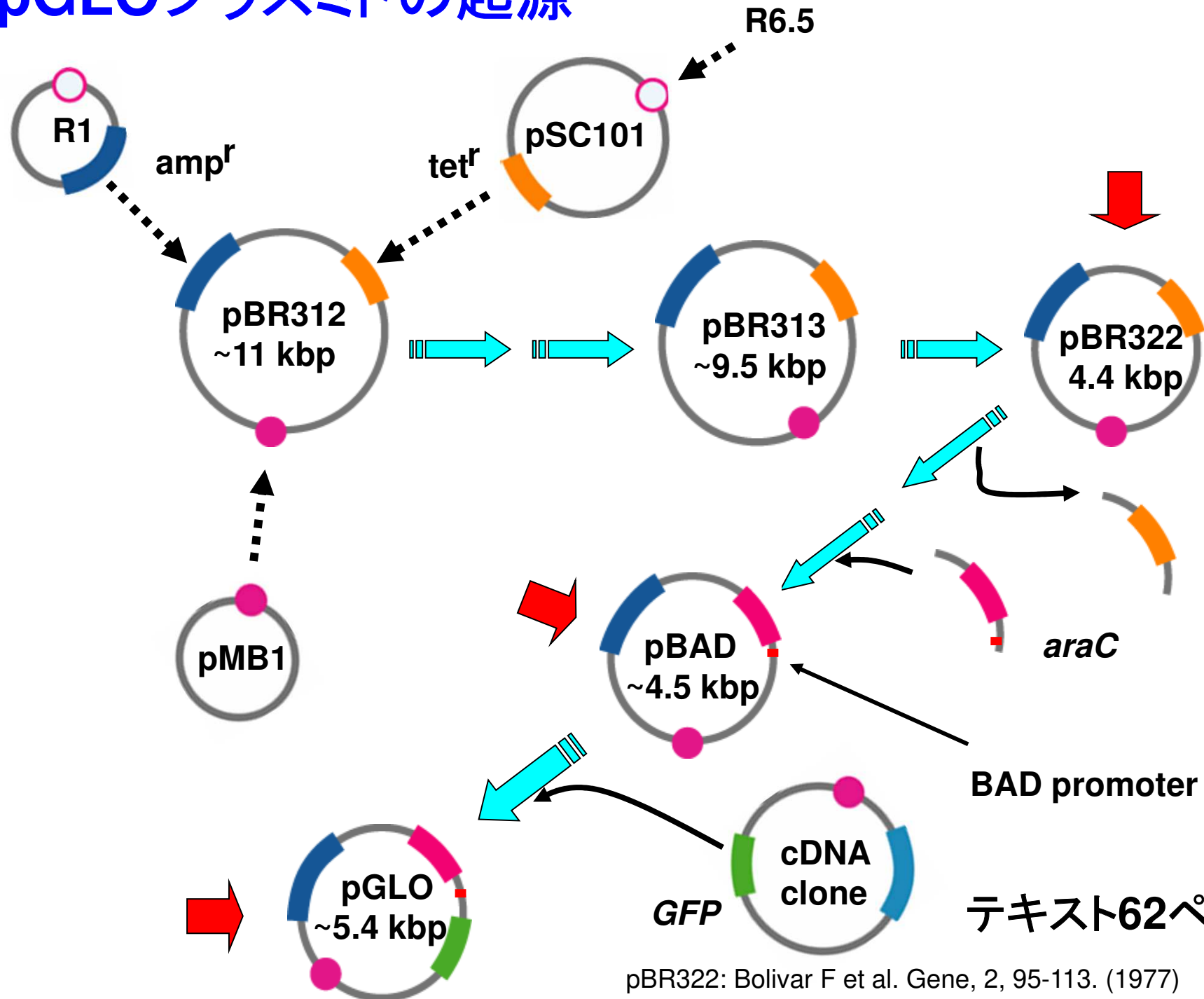


アンピシリン耐性遺伝子  
( $\beta$ ラクタマーゼ (beta lactamase) の遺伝子)

テキスト23ページ

pGLOプラスミドDNAの塩基配列: テキスト55-60ページ

# pGLOプラスミドの起源



テキスト62ページ

pBR322: Bolivar F et al. Gene, 2, 95-113. (1977)  
pBAD: Guzman LM et al. J. Bacteriol., 177, 4121-4130. (1995)



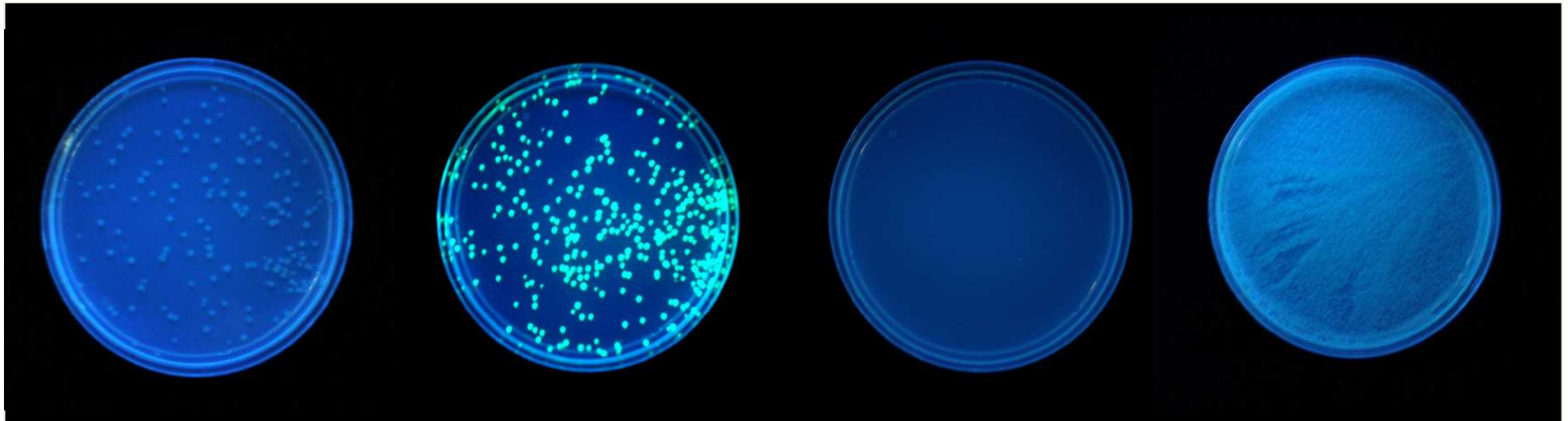
# 遺伝子の役割

1. 遺伝情報を伝える役割  
⇒ 遺伝 (世代から世代へ)  
複製 (細胞から細胞へ)
2. 遺伝情報を働かせる役割  
⇒ 遺伝子発現

遺伝  
Heredity

遺伝子  
Gene

# 実験結果：遺伝子発現調節



+DNA

LB/amp/

+DNA

LB/amp/**ara**

-DNA

LB/amp

-DNA

LB

+DNA

pGLO導入実験

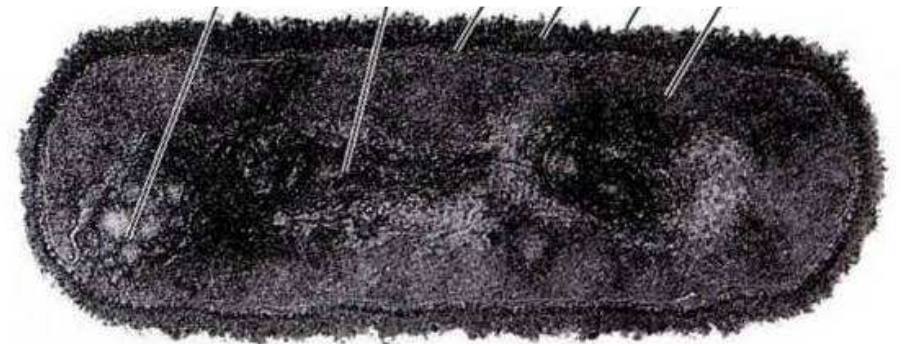
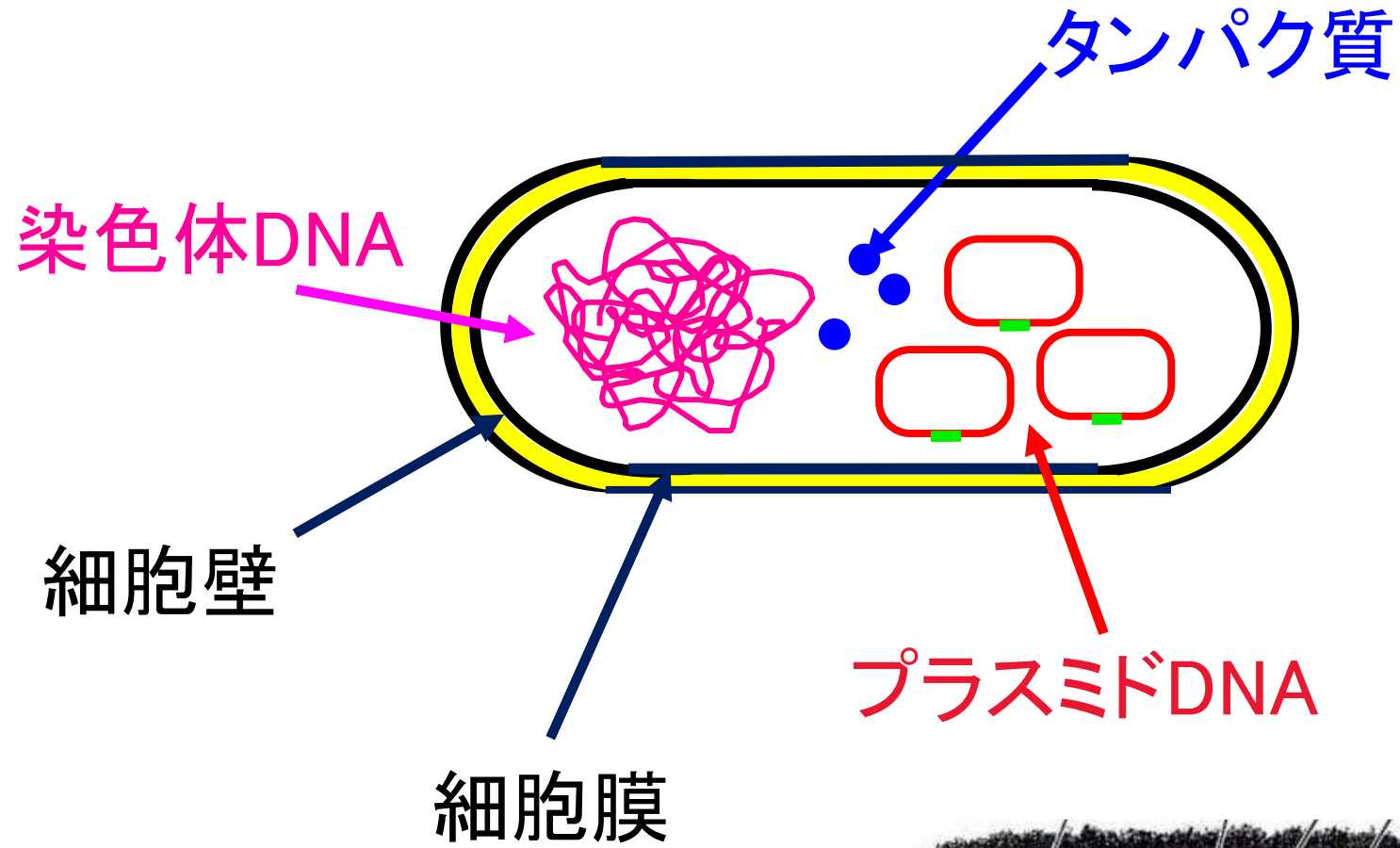
-DNA

pGLO未導入実験

遺伝子組換え実験  
(組換えDNA実験)

テキスト48ページ

# 大腸菌の構造

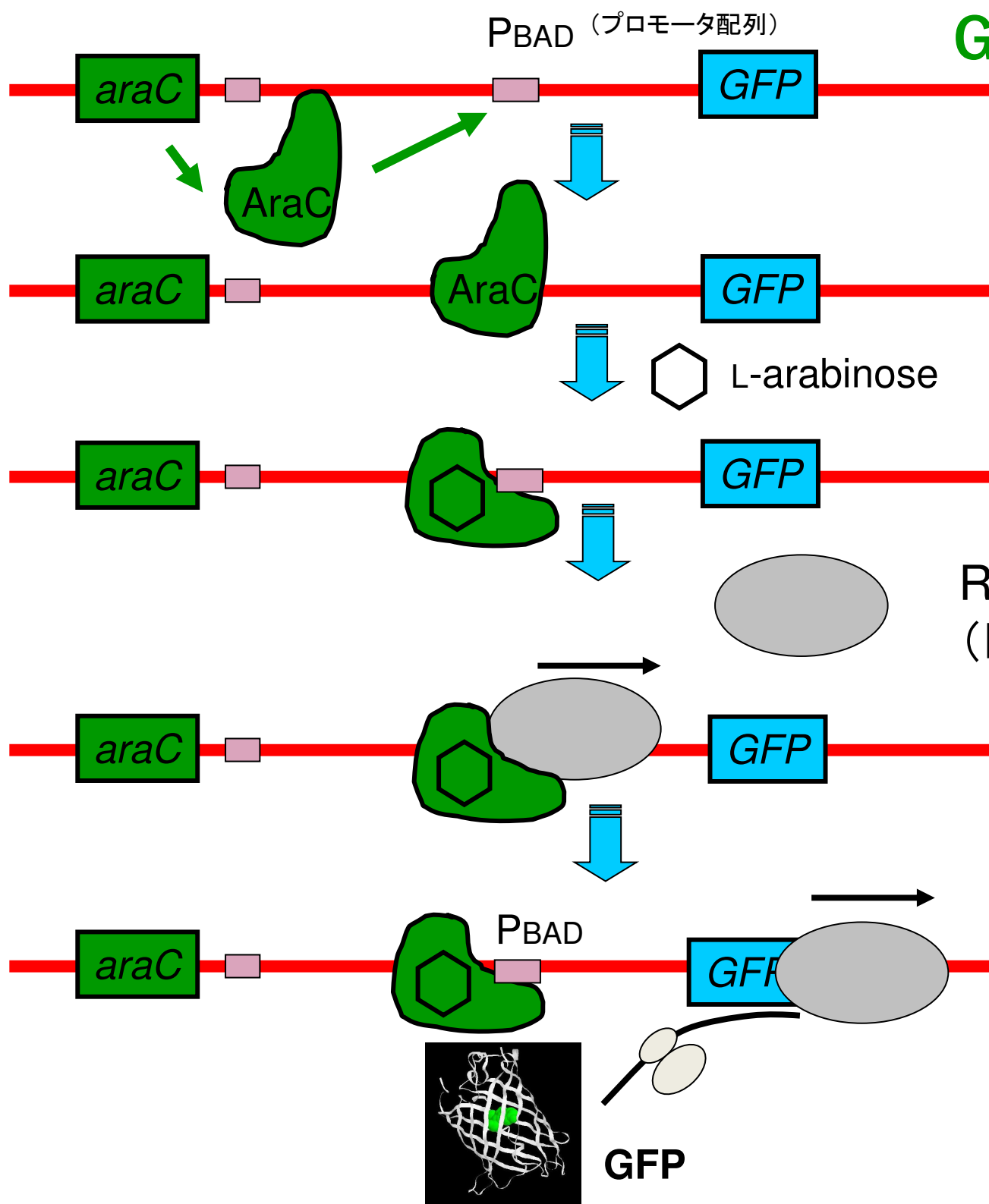


# GFPタンパク質の発現

発現スイッチ

**OFF**

(負の制御)



RNA polymerase  
(RNA 合成酵素)

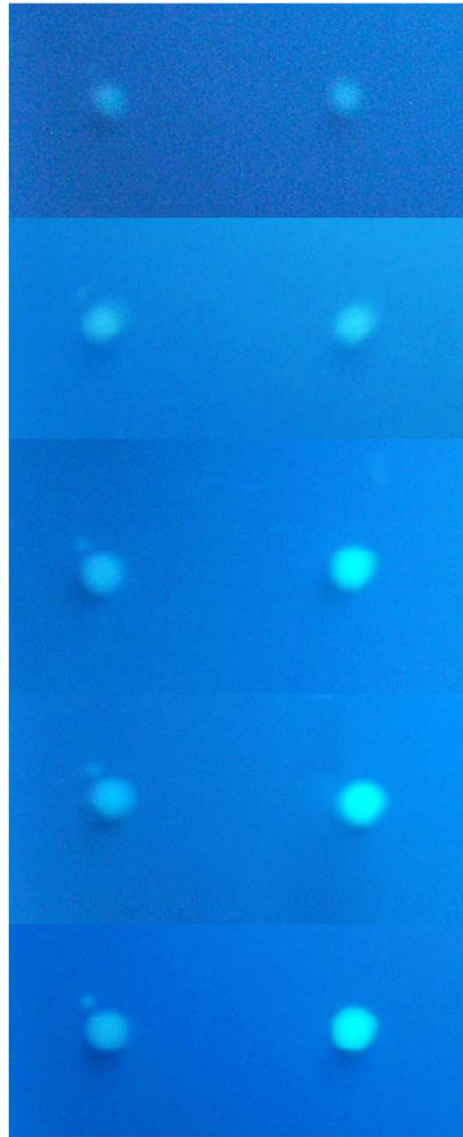
発現スイッチ

**ON**

(正の制御)

テキスト27ページ

# GFPの発現



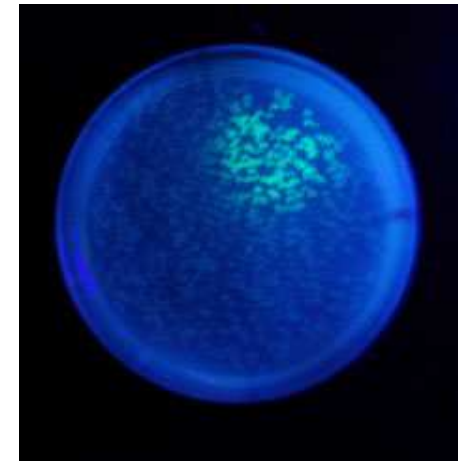
0時間

1時間

2時間

4時間

6時間

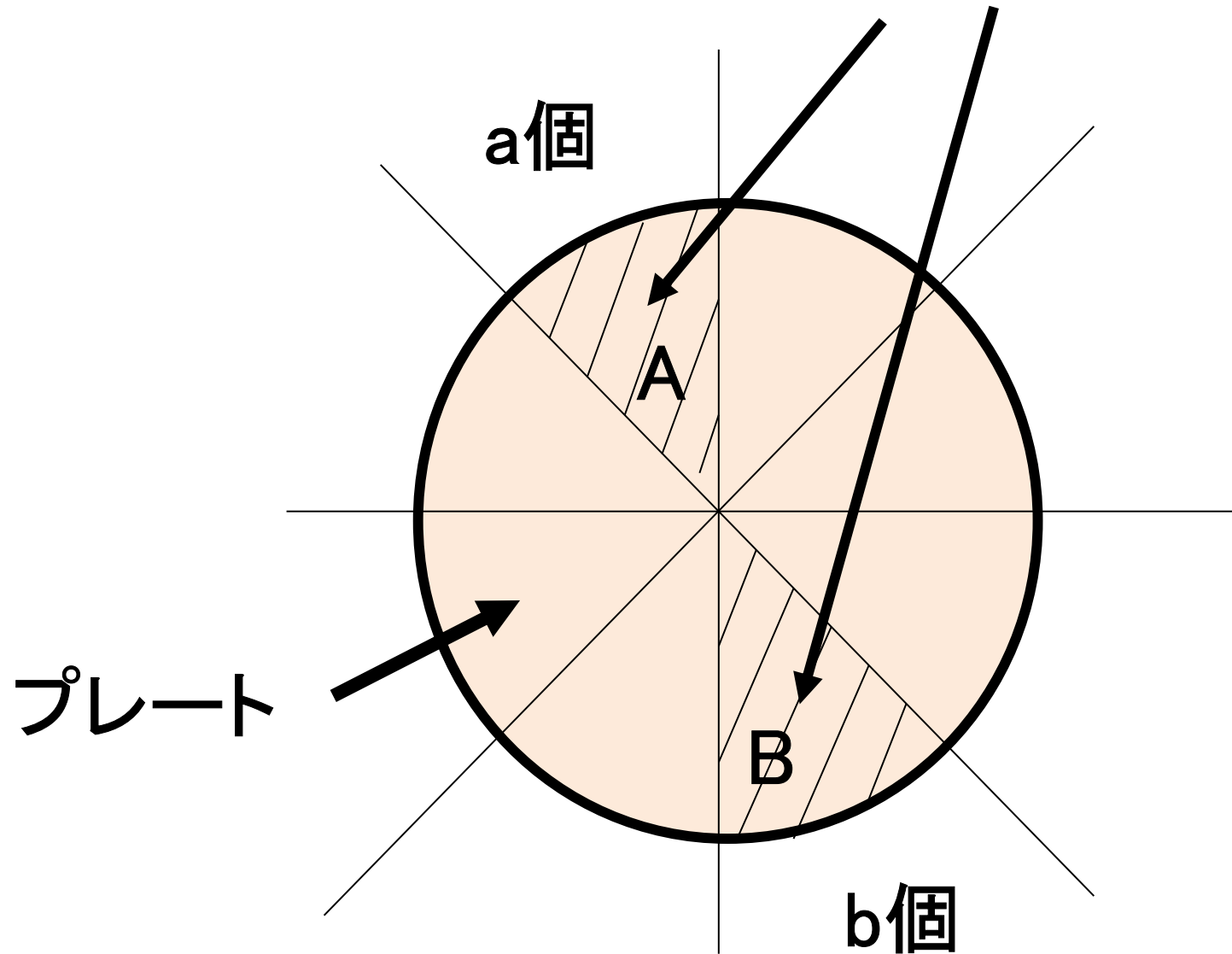


テキスト49ページ



# コロニー数の測定

プレートを8等分し、A,B 2箇所のコロニー数を測定



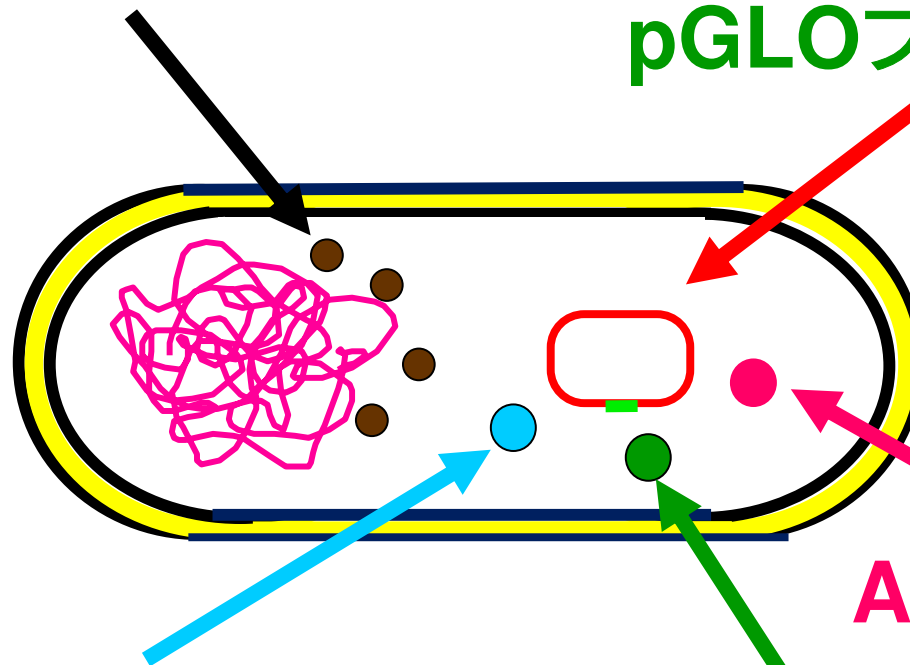
全コロニー数 =  $4 \times (a + b)$  個

テキスト46ページ

# 組換え大腸菌での遺伝子発現

大腸菌タンパク質

pGLOプラスミドDNA

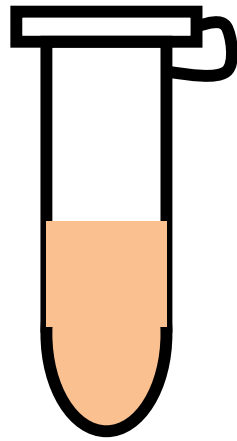


$\beta$ ラクタマーゼ  
(アンピシリン分解酵素)

AraCタンパク質

GFPタンパク質

# 形質転換効率(プラスミドDNA $\mu\text{g}$ 当たりのコロニー数)



250  $\mu\text{L}$  TF soln. (*E. coli*)  
250  $\mu\text{L}$  LB broth  
10  $\mu\text{L}$  pGLO soln. (0.8  $\mu\text{g}$ ) ] 510  $\mu\text{L}$

プレートに播いた菌の容量

プレート当たりのプラスミド量

$$\frac{100}{510} \times 0.8 \mu\text{g} = 0.16 \mu\text{g}$$

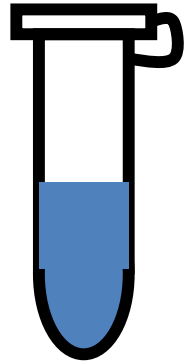
20  $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$  :1 バイアル

$$\frac{190 \text{ コ}}{0.16 \mu\text{g}} = 1,187 = 1.2 \times 10^3 \text{ コ}/\mu\text{g}$$

↑  
プラスミドDNA 1  $\mu\text{g}$  当たりのコロニー数

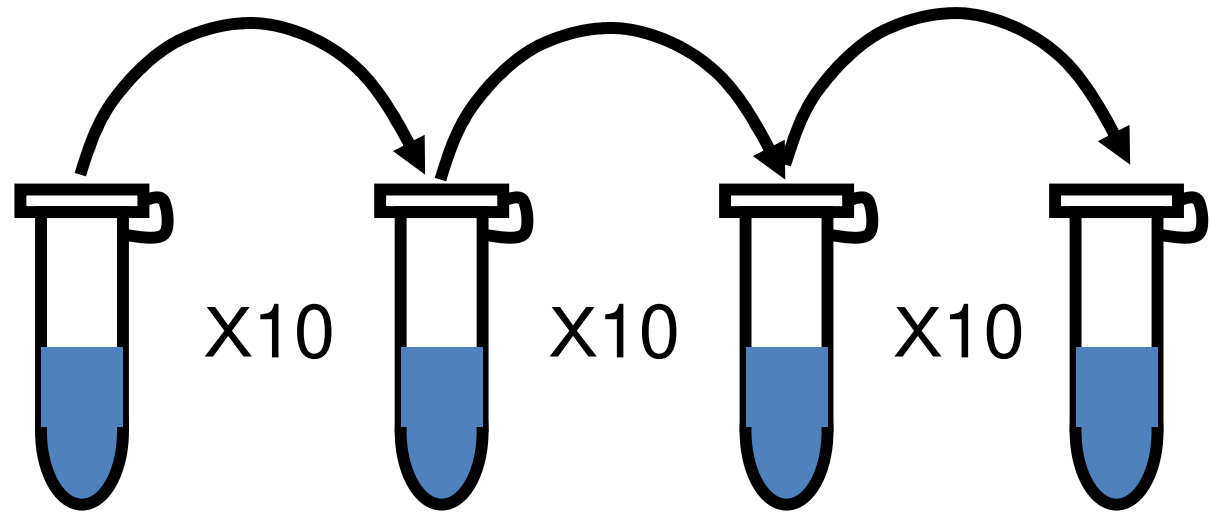
# 形質転換頻度の推定

(菌数測定による形質転換頻度の推定)



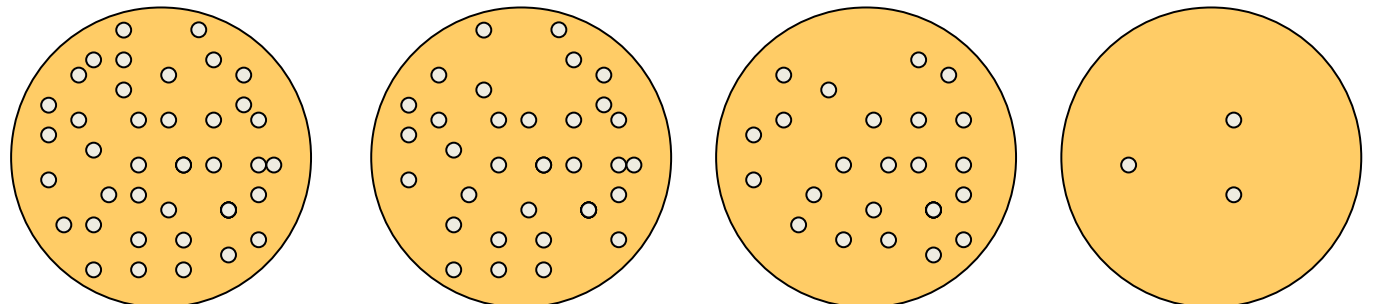
250 µL TF soln. (*E. coli*)  
250 µL LB broth  
10 µL pGLO soln. ] 510 µL

菌数測定:  
チューブ内菌数  
→プレート添加菌数



$$\frac{\text{形質転換コロニー数}}{\text{プレート添加菌数}} \times 100$$

= 形質転換頻度 (%)



$\times 10^3$

$\times 10^2$

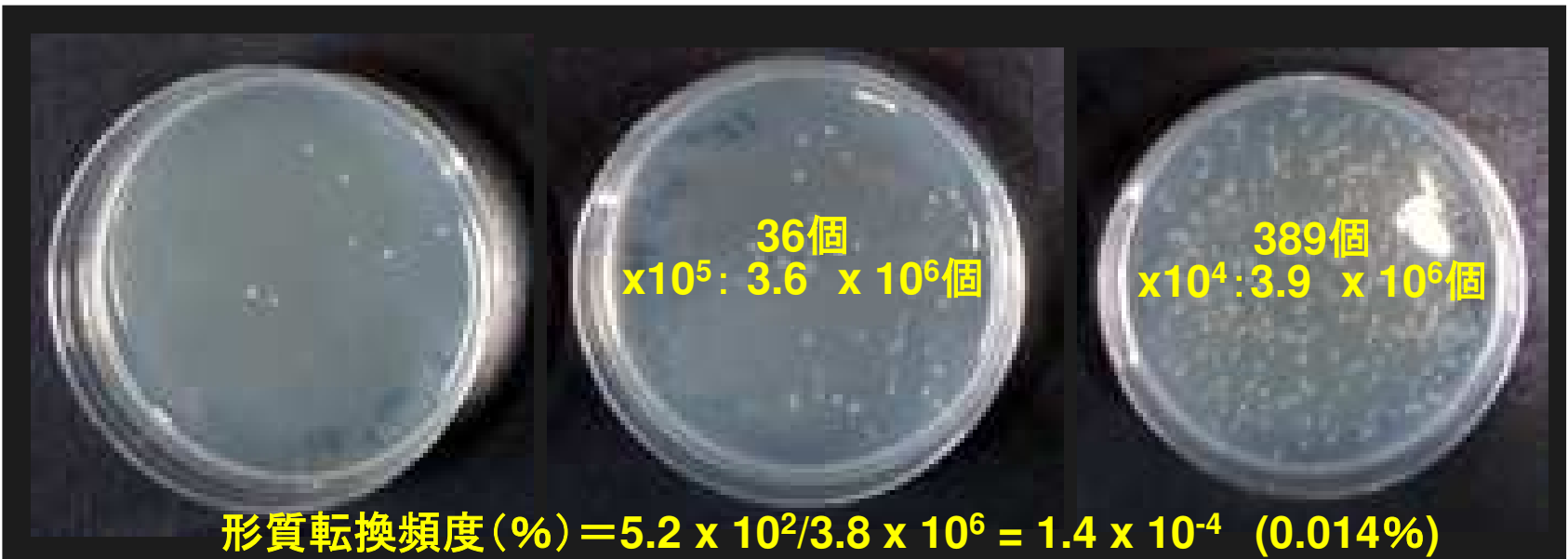
$\times 1$



$\times 10^6$

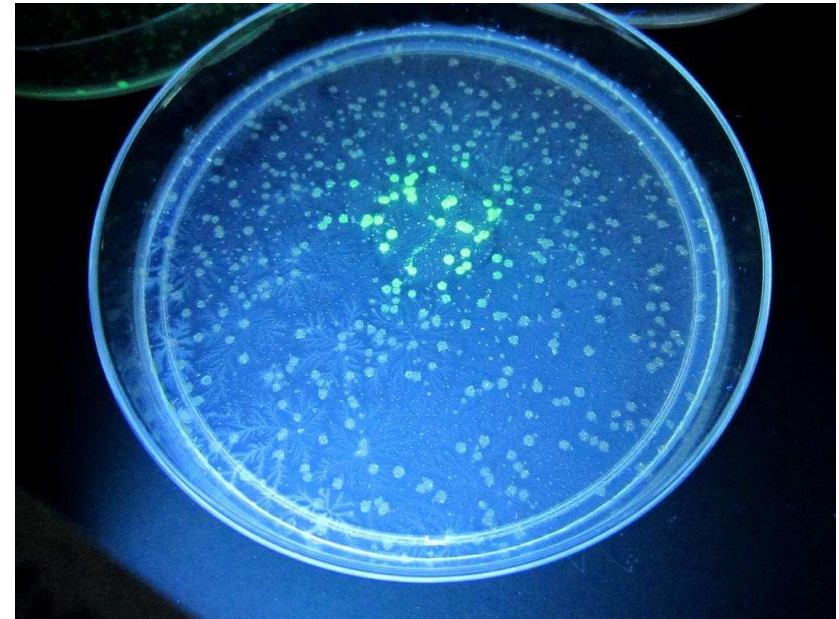
$\times 10^5$

$\times 10^4$





# 蛍光の持続力



**2-8°C(低温室)12週間放置  
培地乾燥状態**

# 本実験の準備

テキスト30～36ページ

関連事項:

テキスト37ページ、50ページ

テキスト66～68ページ

# 実習の準備1: 培地作製



寒天培地溶解



攪拌後分注

**注意:** アンピシリン・アラビノースは、  
ボトルを手で触れられる温度で添加。



ラベル表示



# Luria-Bertani (LB) medium

## Lysogeny Broth medium

トリプトン(Bacto-Tryptone) 1% (w/v)  
酵母エキス(Yeast Extraxt) 0.5% (w/v)  
塩化ナトリウム (NaCl) 1% (w/v)  
(NaOHにて、pH 7.0に調整)

\*LB培地の名称: Salvador Edward Luria (1969年ノーベル医学生理学賞受賞) 研究室の Giuseppe Bertani が溶原化ファージの培地として1951年に報告したため Luria-Bertani と呼ばれることもある。(テキスト66ページ)

**Bertani G.**: “Studies on **lysogenesis**. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Echerichia coli*.” J. Bacteriol. 62, 293-300 (1951)

# Lysogeny Broth medium

200 mL三角フラスコ

← 水	100 mL
← Bacto-tryptone (DIFCO)	1.0 g
← Yeast extract (DIFCO)	0.5 g
← NaCl	1.0 g

↓  
攪拌

← 10 M NaOH	10 $\mu$ L
← 寒天粉末	1.2 g

↓  
攪拌

オートクレーブ (121°C、20分)

↓  
攪拌

LB寒天培地



## 実習の準備2: 試薬分注

□大腸菌:

凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液("Bu") 250 $\mu$ L添加。  
溶解した際、必ず攪拌する。

□プラスミドDNA溶液: 60  $\mu$ L/1チューブ → 2グループで1本  
プラスミド溶液(凍結乾燥品): 20  $\mu$ g/250  $\mu$ L "Bu"

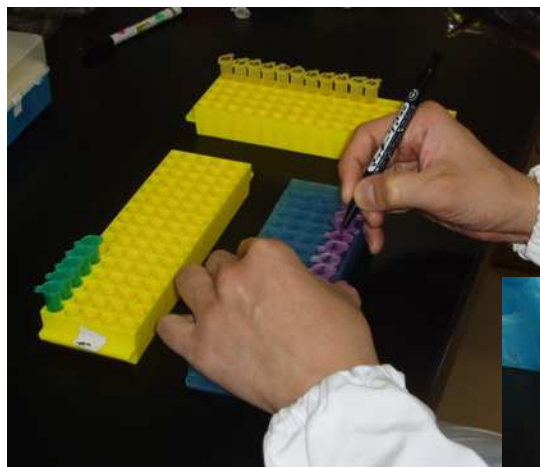
2-4倍希釈とし20  $\mu$ g/500-1,000  $\mu$ L "Bu"でも問題ない。

プラスミドDNA溶液は、確実にループで採取する必要があるため、多少希釈されても十分な容量がよい。

□形質転換用溶液(Transformation buffer: "Bu")

0.8 mL/1チューブ

# 実習の準備2: 試薬分注



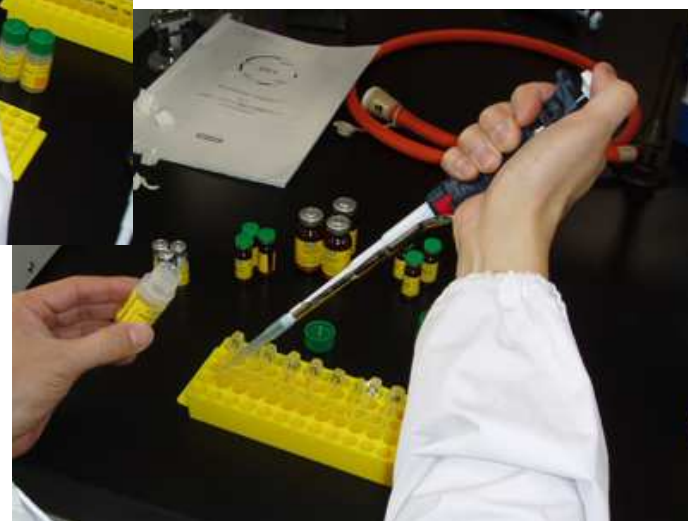
ラベル表示

凍結乾燥品の溶解

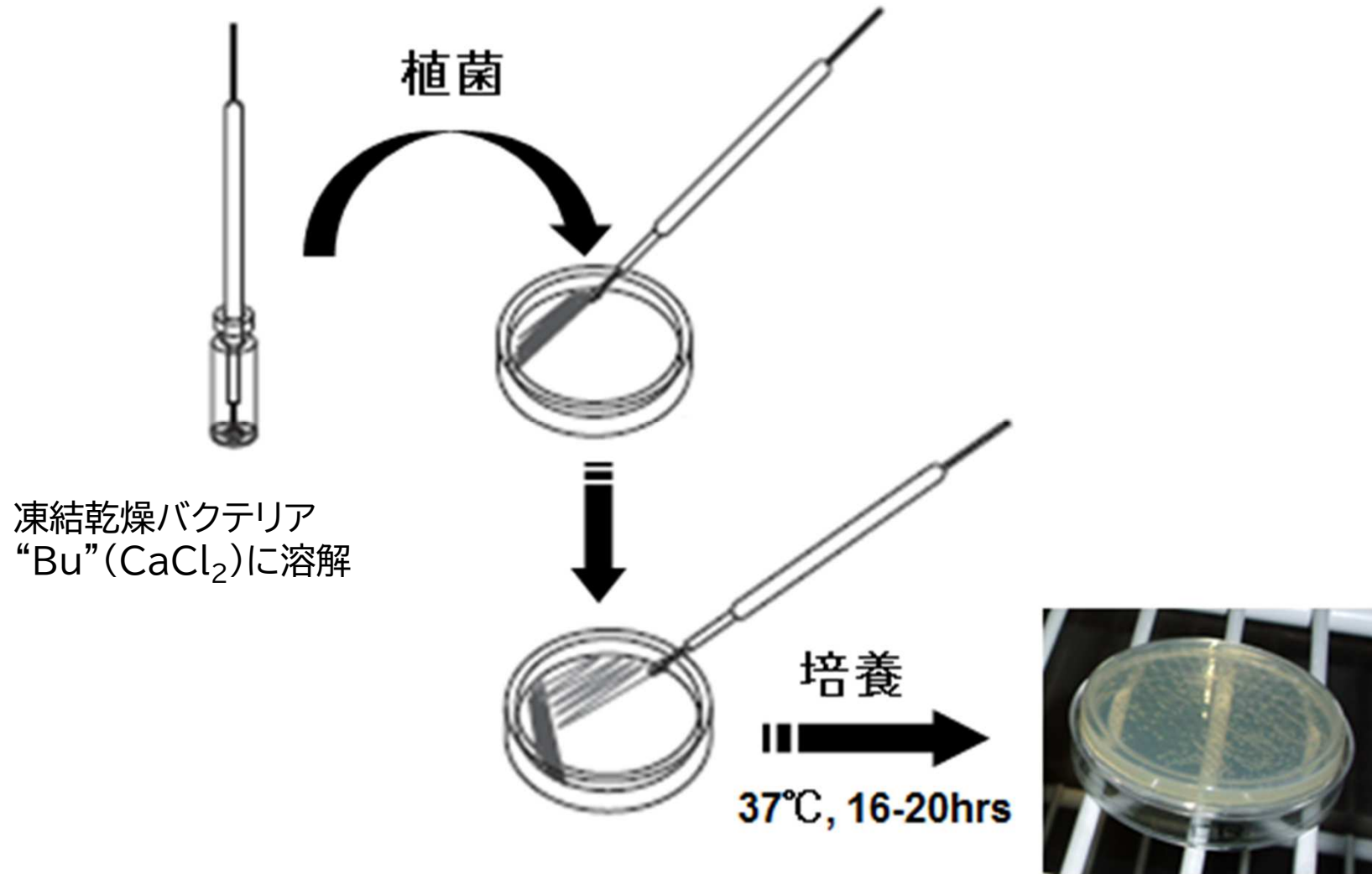


攪拌

分注

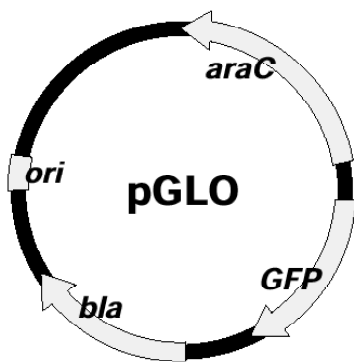


## スタータープレートの作製(従来法)



プレート全面に植菌して構わない。

# スタータープレートの作製(二段階法)



Biotechnology Explorer Kit 1 pGLO バクテリア遺伝子組換えキット  
マニュアル変更内容(M4119 1512H →2407I) 一覧

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット	
ページ	変更内容
	全体的に誤字・脱字等を訂正し、表現をより分かり易いよう改訂いたしました。
	テキストの上部にヘッダーを付けました。
p.5, 67	文部科学省のホームページの URL を変更しました。
p.13	アンピシリンの溶解量を英文マニュアルの変更に従い 3 ml と変更しました。
p.15	英文マニュアルの変更に従い 大腸菌の溶解液を、LB 培地にし、インキュベーション時間やプレートへの大腸菌のまき方などを変更しました。
p.17	スタータープレートの培養例の写真を掲載しました。
p.19	コロニーをすくう数を 2～5 個としました。

Biotechnology Explorer™

実習用テキスト

Kit 1

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット

(1660003JEDU)

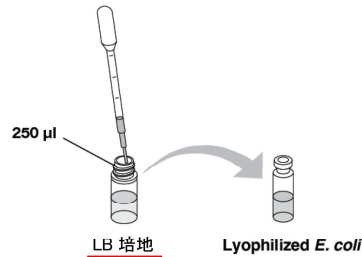
**BIO-RAD**

テキスト70-72ページ

Step2; 実験の 24-36 時間前に行います。

### 1. 大腸菌溶液の調製

- 1-a. 大腸菌 (*E.coli* HB101) のバイアルに 250  $\mu$ l の **LB 培地** を無菌のピペットで直接加えます。開封した LB 培地は冷蔵で保存します。



- 1-b. 蓋をしてバイアルを優しく揺らして混和します。  
バイアルを 37°C のインキュベーター に 8 時間程おきます (最大 24 時間まで)。

**注意;** 大腸菌の溶解液には **LB 培地** を使用してください。インキュベーションの時間は 8 時間より短くてもスタータープレートのコロニーはできますが、時間によってスタータープレートのコロニーの数や大きさが変わります。(p.17 参照)。2. スタータープレートへの大腸菌溶液のまくを参照し、プレート上に大腸菌溶液の濃淡をつけてシングルコロニーが得られるようにしてください。

プレートを事前に冷蔵保存している場合は、少なくとも半日前に冷蔵庫から必要数取り出し、寒天培地を室温に戻しておきます。

## 2段階

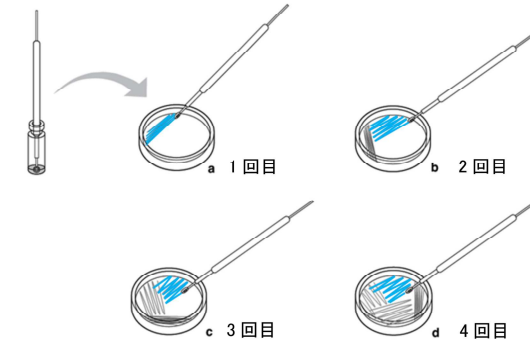
### 2. スタータープレートに大腸菌溶液をまく

1. で調製した大腸菌溶液を 8 枚の “LB” プレートにまき、37°C で 24 時間ほど培養します。適切な条件下で培養すると、おおよそ直径 1 mm のたくさんのコロニーが生えてきます。

- 2-a. 37°C に置いていた大腸菌溶液のバイアルを軽く懸濁し、植付け用ループを傾けずにまっすぐ入れて溶液を取ります。シャボン玉を作る時のようにループの輪に溶液の膜を張らせませす。ループの先を大腸菌溶液につけるのは 1 枚のプレートに対して 1 回のみで充分です。8 枚のスタータープレートを作成するのに、ループは同じものを使用します。  
注: バイアルのインキュベーション時間が長い場合は、ループの輪に膜を張ったものと張らないものなど、プレートごとに大腸菌溶液量に差をつけておくと、大腸菌が増えすぎてコロニーのできないプレートができて、大腸菌の液量が少ないプレートで適正なコロニーができ、適切なスタータープレートを準備することができます。

- 2-b. 初めに、次の図のようにループを数回ほど往復させて塗布します。  
次にプレートを 45° 回転させて 2 回目の塗布をします。ループを 1 回目に塗布された大腸菌溶液に接触させてから、塗布されていない培地のスペースに数回往復させて塗布します。

45° 回転させて 3~4 回と残りの部分に広げていくことにより、シングルコロニーを得られる濃度に塗布されるように調整します。4 回目の塗布終了後、プレートの蓋をかぶせます。



- 2-c. 同様にして、計 8 枚の “LB” プレートに大腸菌溶液を塗布します。1 本のループでプレート 8 枚の塗布を行ってください。また、コンタミネーションを防ぐため、1 枚のプレートに塗布が終わったら、その都度、きちんと蓋を開けてください。

- 2-d. 8 枚のプレートに塗布が終わったら、プレートを裏返しにして 37°C のインキュベーターに一晩おきます。24 時間前後に使用できるように授業計画を組みます。タイミングを逃しますと、その後の実験がうまくいかなることがありますのでご注意ください。  
36 時間以上経過したスタータープレートは、形質転換を失敗する可能性が高くなりますので使用しないでください。また、スタータープレートを使用する前に冷蔵保存しないでください。

### 3. pGLO プラスミド溶液の調製

- 3-a. 新しい殺菌済みピペットを使用して 250  $\mu$ l の形質転換用溶液 (精製水でも可) を pGLO バイアルに加えます。取り外したキャップに DNA が付着していないか確認します。

**注意;** DNA 量が少ないため、バイアルには何も入っていないように見えます。

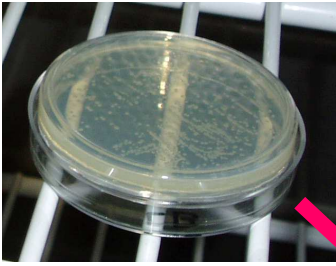
溶解したプラスミド溶液は使用するまで冷蔵保存します。

実験の際、いづつかに分注して配布したい場合は、溶解する容量を 500  $\mu$ l まで増やす事は可能です。ただし、プラスミドの終濃度が薄くなる為、形質転換効率が多少下がることがあります。





# 実験台



大腸菌(スタータープレート)



氷と試薬



プレート



水浴



ピペット・ループ他

テキスト36ページ



# 廃棄物処理

## オートクレーブ



テキスト50ページ

普通の鍋で煮沸：  
大腸菌が死滅すれば  
大丈夫！



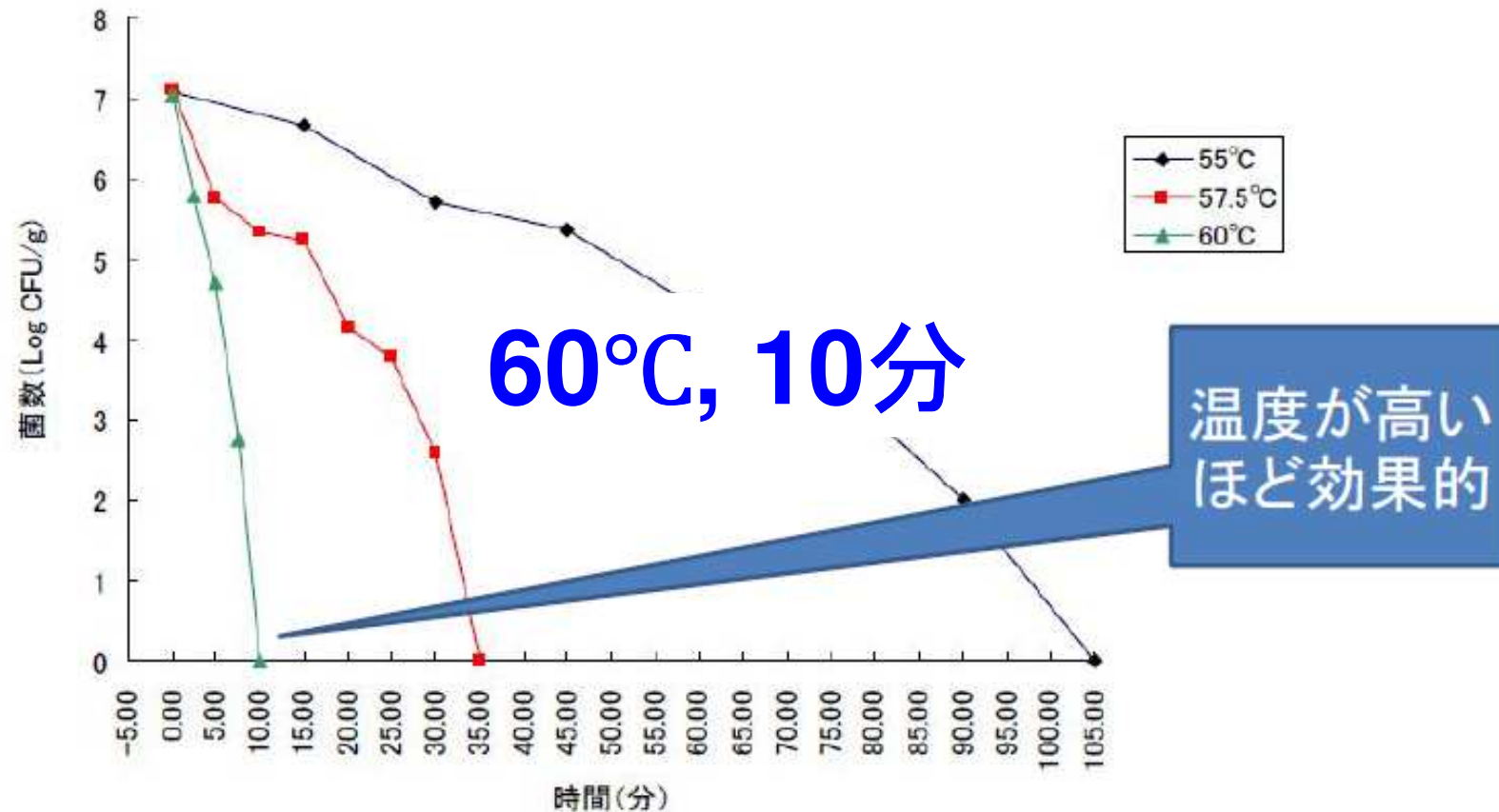
スーパーの袋（不透明）  
で代用可能



# スーパーの袋(不透明)を用いた滅菌処理



# 病原体の死滅する温度と時間



牛挽肉中の*E. coli* O157を55°C、57.5°Cおよび60°Cで加熱処理した時の菌数の消長

出典:「サルモネラならびに腸管出血性大腸菌O157:H7のD値に関する研究」分担研究者  
小沼博隆（東海大学海洋学部水産学科）

15

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課

食品規格専門官 吉原尚喜氏(平成27年6月26日)資料より

<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000090138.pdf>



# 高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ



文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課  
生命倫理・安全対策室

高等学校などで遺伝子組換え実験を実施することは、組換えDNA技術が持つ有用性とその社会的な影響を学び、ライフサイエンス研究に対する正しい理解を促すために有意義な手段であると考えられます。

しかしながら、その実施に当たっては、「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又は遺伝子組換え生物等規制法)」で定めるルールをしっかりと守る必要があります！



「組換えDNA実験指針」では、教育を目的とした遺伝子組換え実験のためのルールが規定されていましたが、平成16年2月のカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)の施行にともない、指針は廃止されました。これ以降、教育を目的とした遺伝子組換え実験は、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)で定めるルールにより実施することが必要となりました。

## 遺伝子組換え実験を行う際に注意すべきルール

教育目的で行われる遺伝子組換え実験は、通常、市販の実験キットなどを用いた簡単なものでしょう。このような実験の場合、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)に従って守らなければならないルールは非常にシンプルなものです。以下にこれらのルールを掲げますので、しっかりと守り、遺伝子組換え実験の安全の確保に努めて下さい。

### 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(遺伝子組換え生物等規制法)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。次ページの「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。



拡散防止措置の内容		✓
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っては、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を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拭)	
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:白金耳を蓋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後における手洗い等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)	

### 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、作成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、① 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、② 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、①と②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。

### ③ 体制を整備すること！

カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)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。

### ○ その他

上記のルールは、あくまでもカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)が定めるルールの一例です。他にも遺伝子組換え生物を運搬する際のルール、送付する際のルール、事故が発生した際のルールなど様々なルールがありますので、十分注意する必要があります。文部科学省のHPでは、遺伝子組換え実験に関する情報が満載です。是非ご覧下さい。



#### ●お問い合わせ先●

文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室  
http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae  
E-mail: kumikae@mext.go.jp  
TEL: 03-6734-4108 FAX: 03-6734-4114

Ver. 2.1