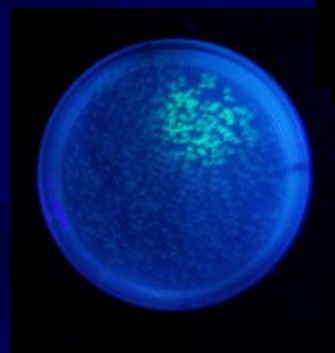
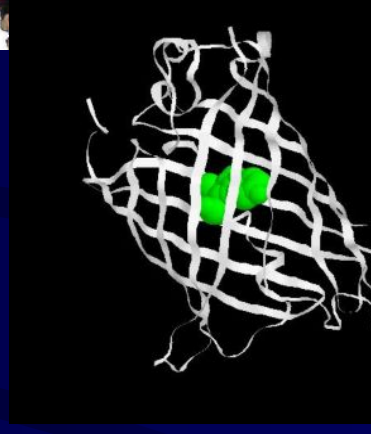
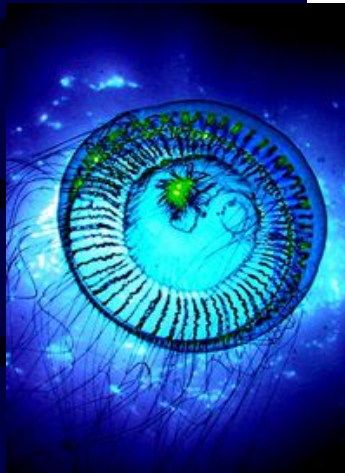
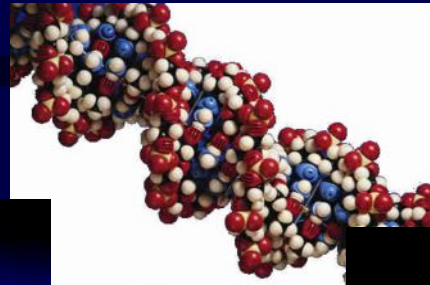


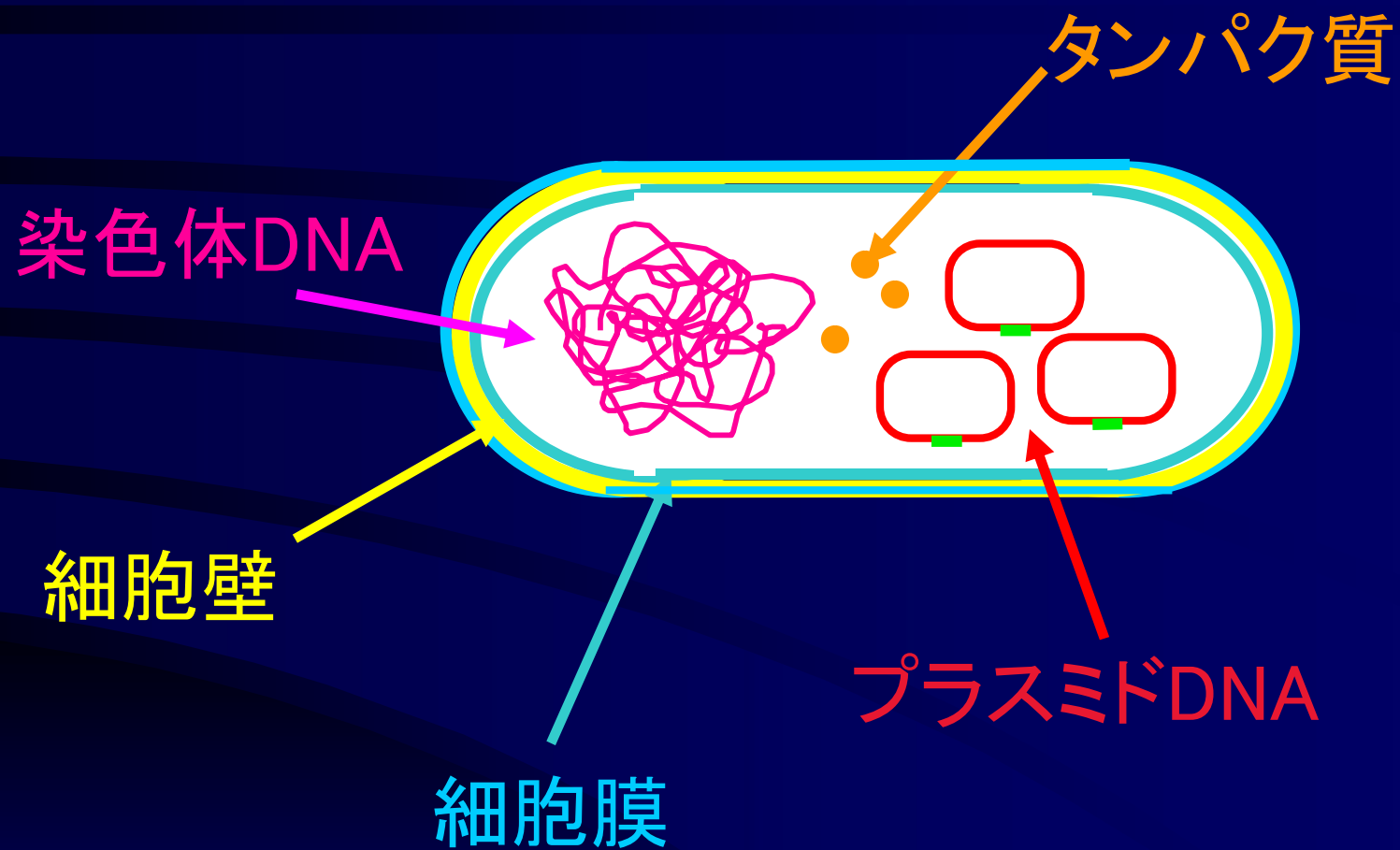
# GFP遺伝子による大腸菌の形質転換



大藤道衛

東京テクニカルカレッジ  
バイオテクノロジー科

# 大腸菌の構造

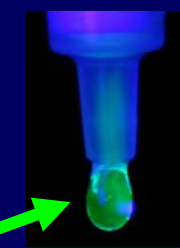
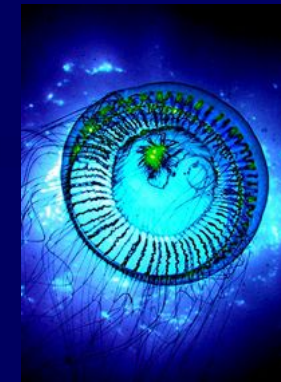
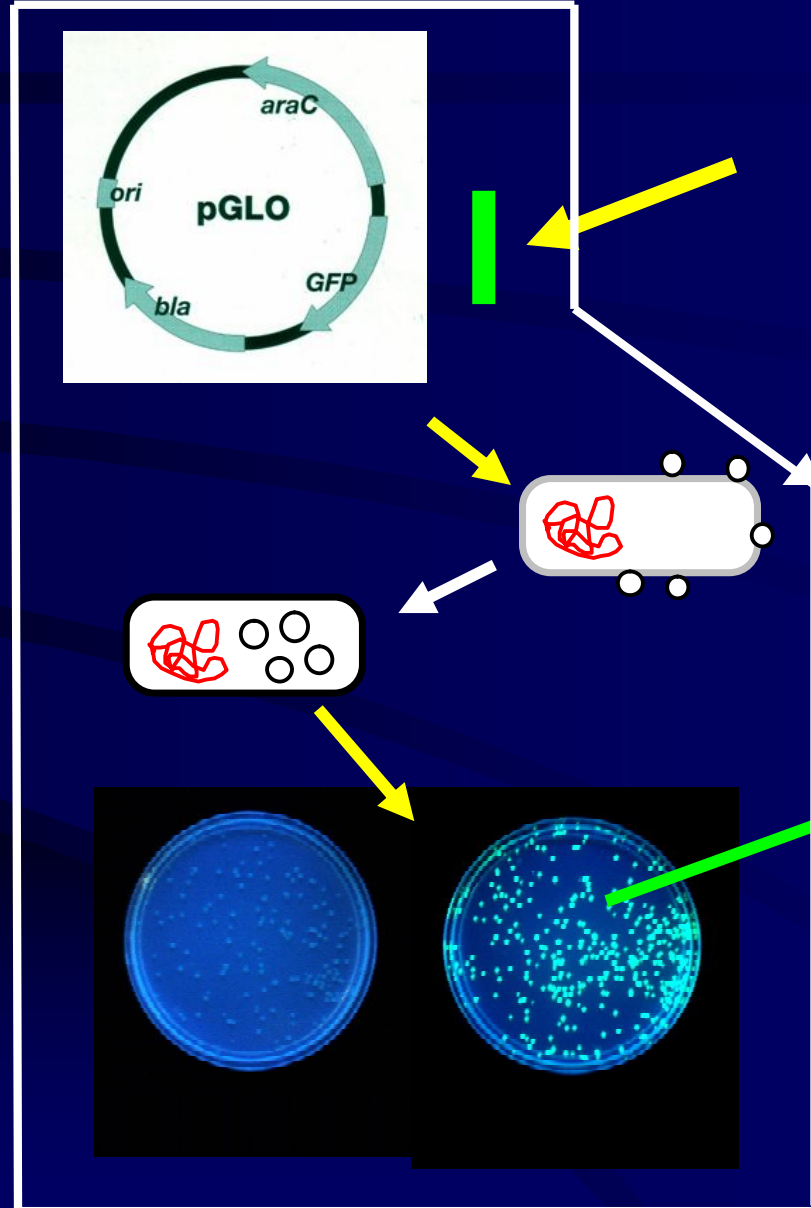


# GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

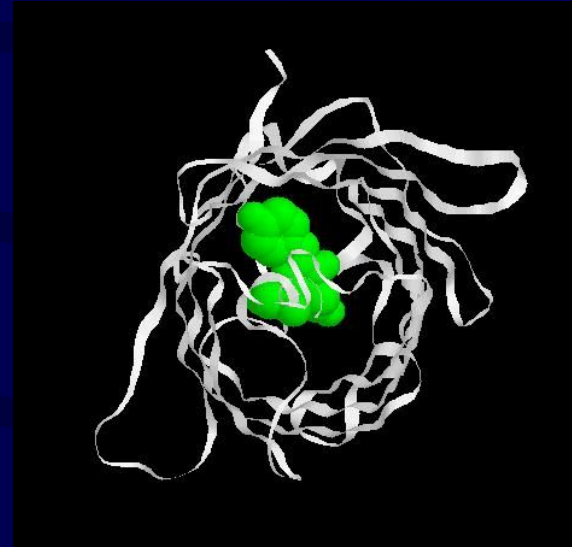
情報  
(DNA)



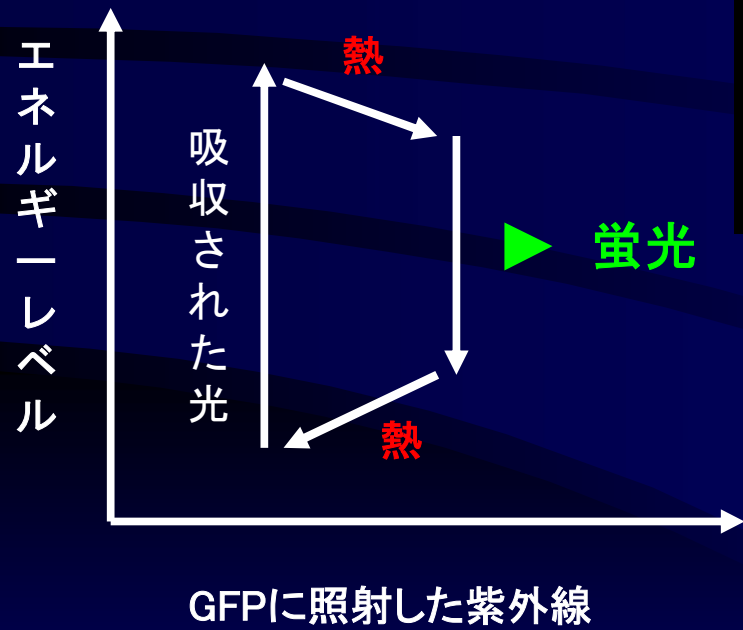
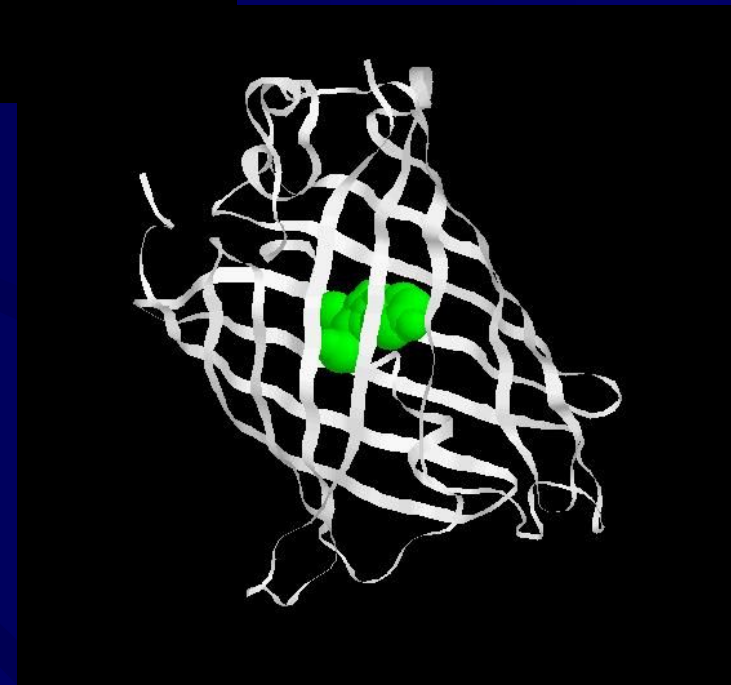
機能分子  
(タンパク質)

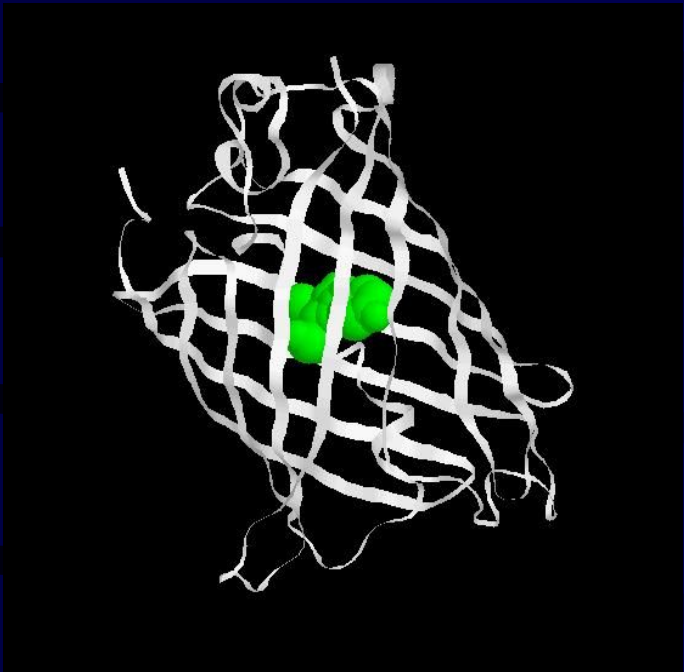


# GFPとは

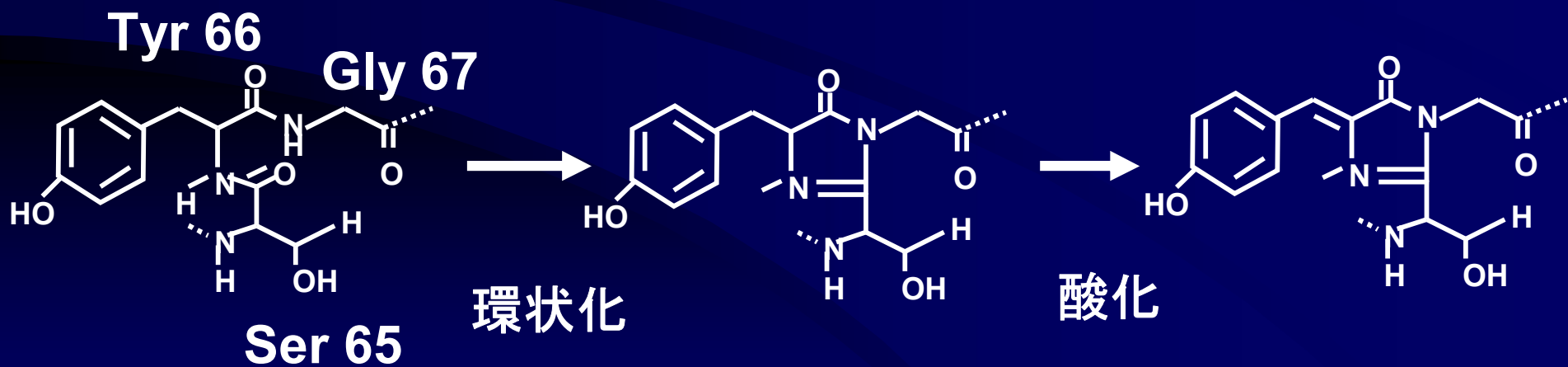


Ser-Tyr-Gly  
65-66-67

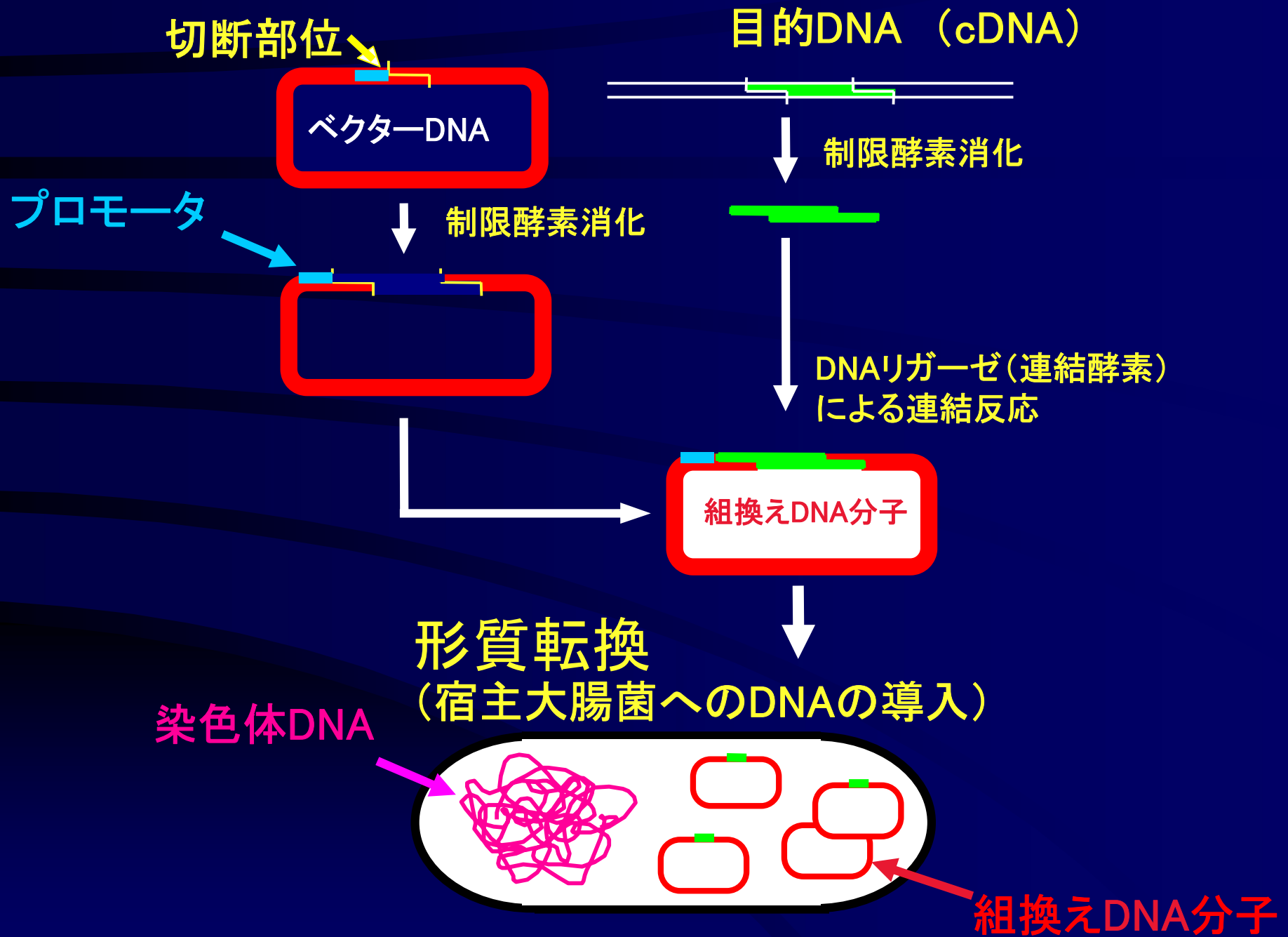




発色団  
Ser-Tyr-Gly  
65 - 66 - 67



# 組換えDNA実験

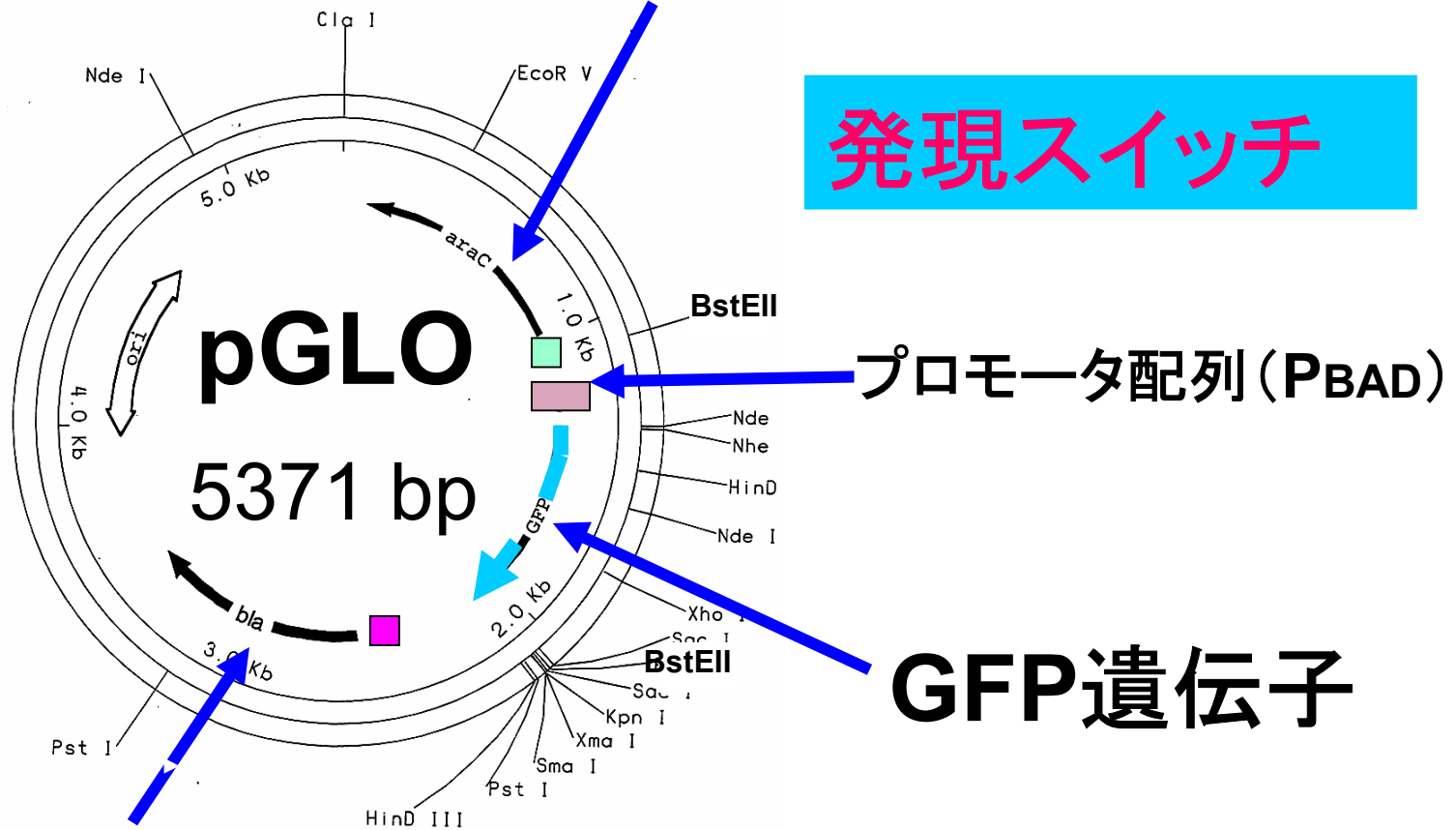




# プラスミドDNA pGLOの構造

調節タンパク質遺伝子(araC)

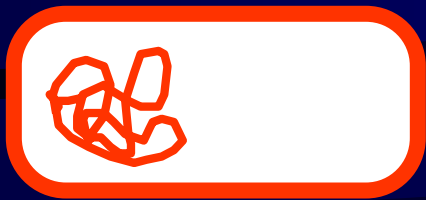
発現スイッチ



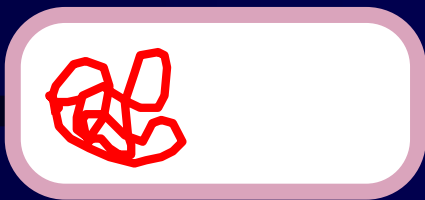
プロモータ配列 (PBAD)

GFP遺伝子

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

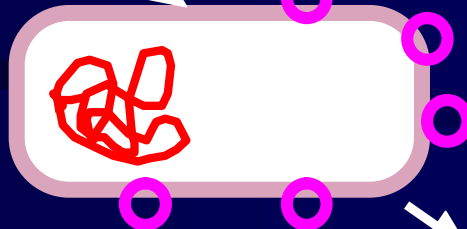


CaCl<sub>2</sub> 処理

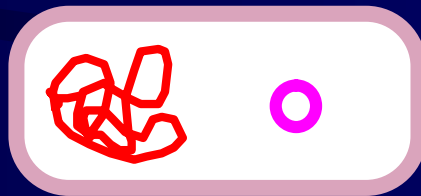


コンピテント細胞

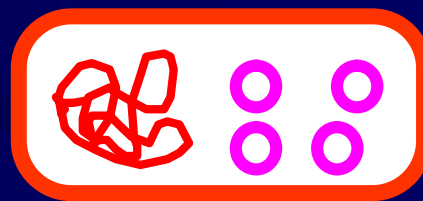
プラスミドDNA



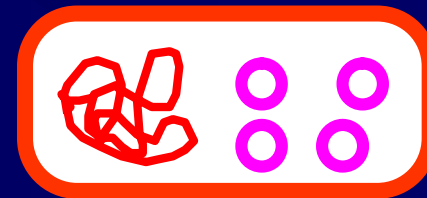
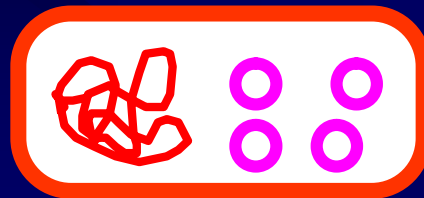
熱処理 (42°C)



培養



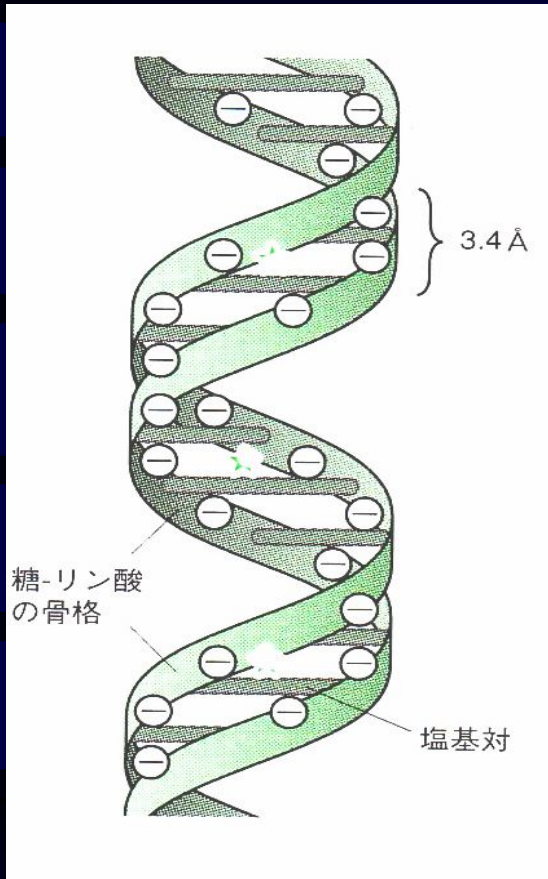
細胞分裂



# コンピテント細胞 と形質転換



# DNAの構造

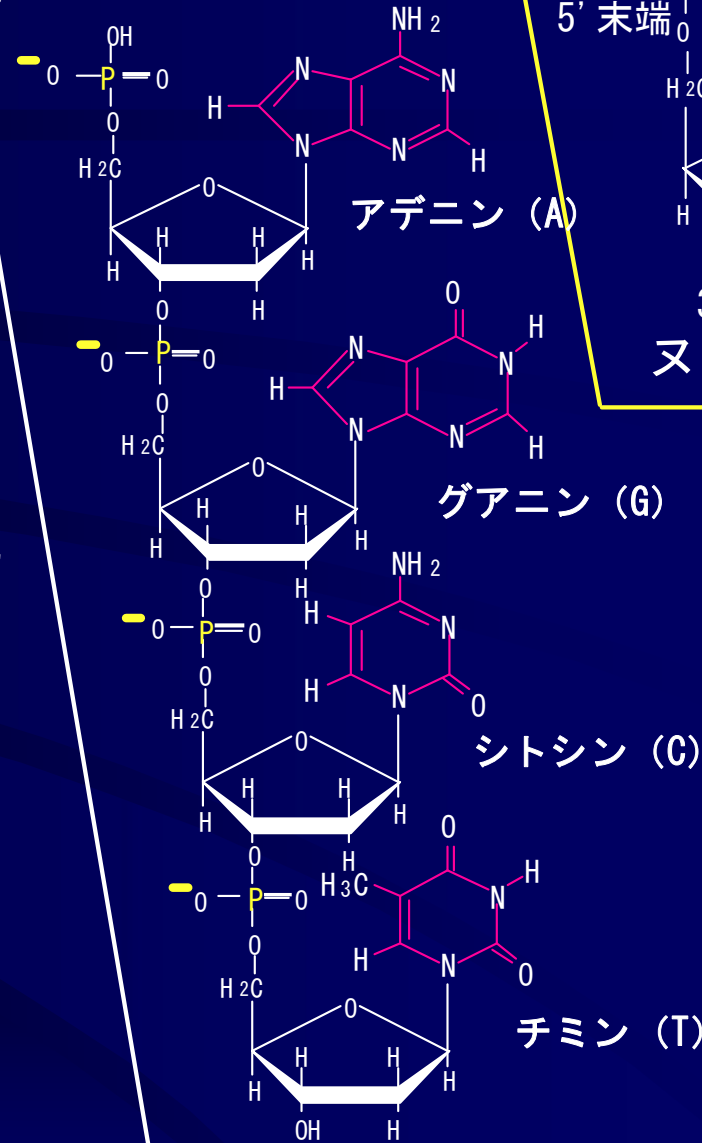


G≡C

A=T

5' 末端

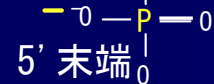
3' 末端



マイナスチャージ

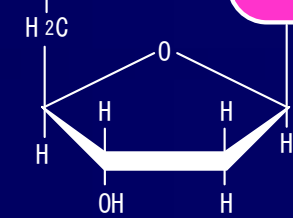


りん酸



5' 末端

塩基



3' 末端

ヌクレオチド

情報

DNA

5' ATGACGGAATATAAGCTGGTGGTGGTGGGCGCCGTCGGT 3'  
3' TACTGCCTTATATTCGACCACCACCACCCGCGGCAGCCA 5'



転写 (transcription)

RNA

5' AUGACGGAAUAUAAGCUGGUGGUGGUGGGGCGCCGUCGGU 3'



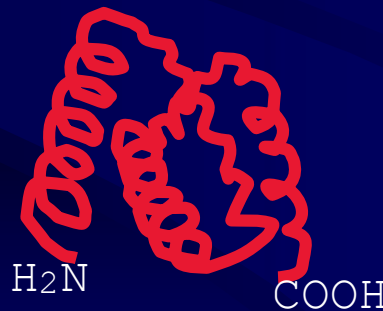
翻訳 (translation)

H<sub>2</sub>N Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly COOH

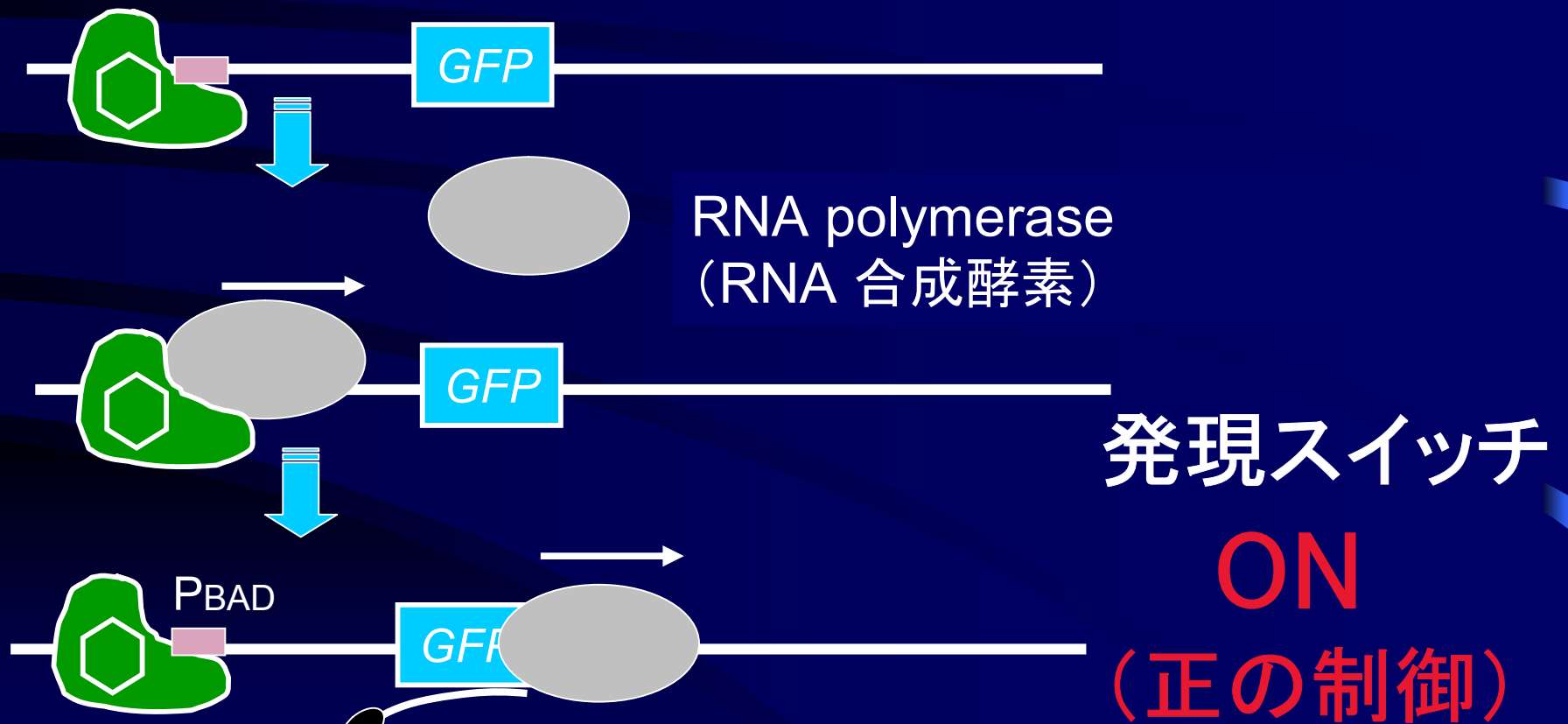
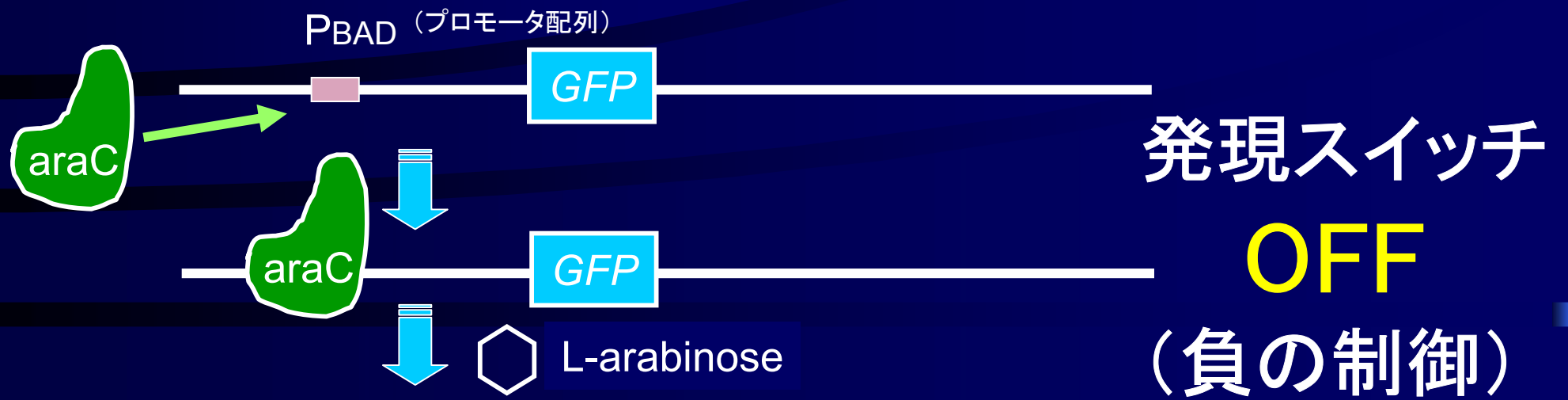


機能

タンパク質

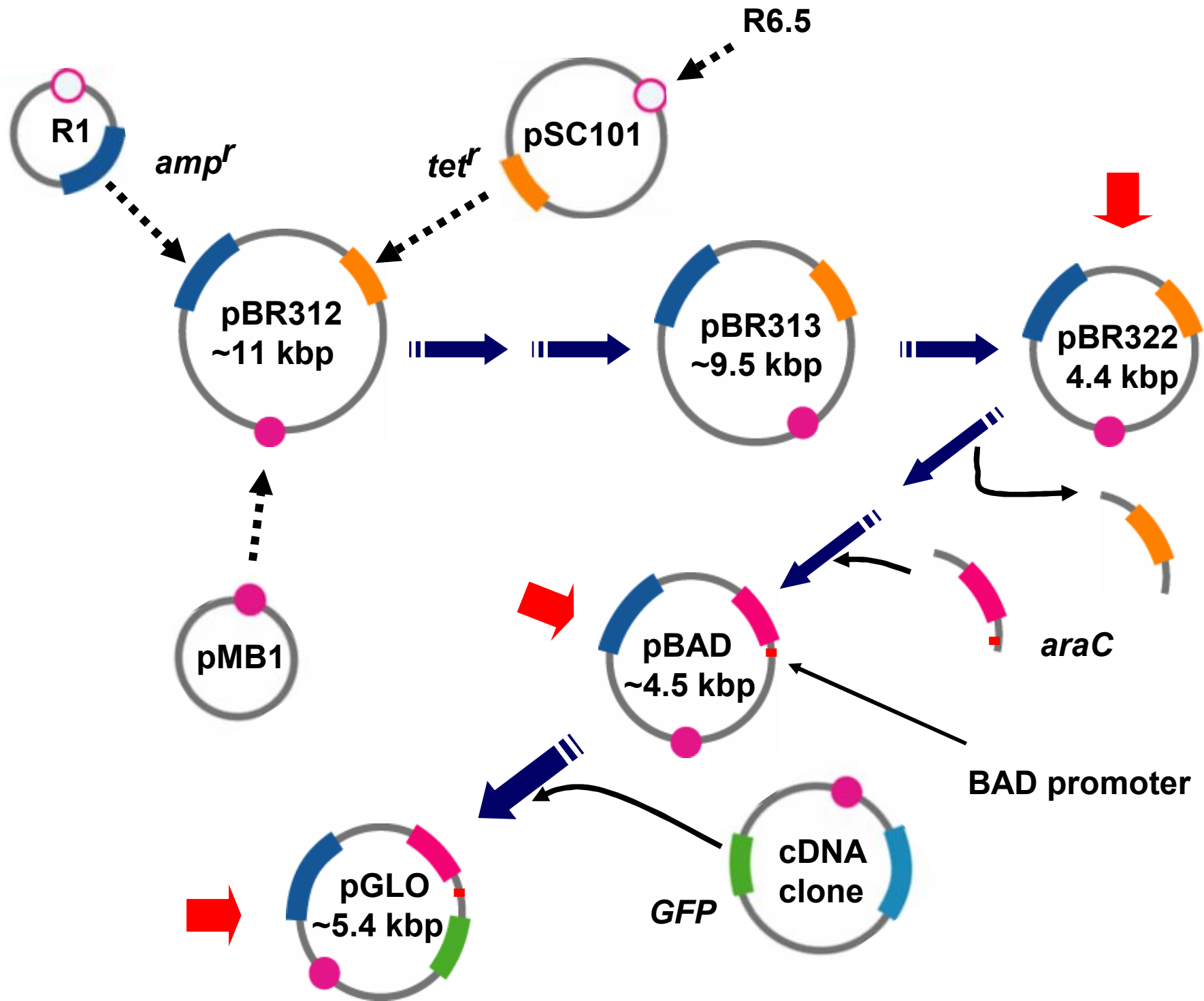


第一塩基	第二塩基				第三塩基
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	stop	stop	A
	Leu	Ser	stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G



GFP

GFPタンパク質の発現

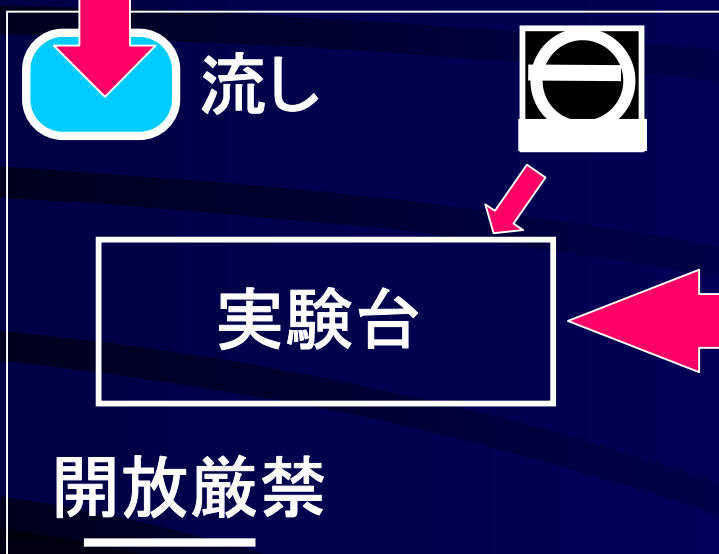


# 実験操作のポイント



実験前必ず手を洗う  
オートクレーブ

器具・試薬・試薬→滅菌



70%エタノール等で殺菌

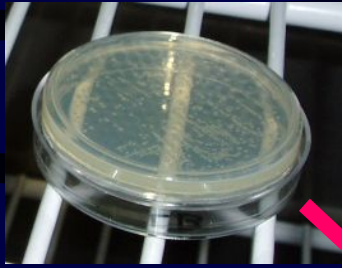


実験前の確認

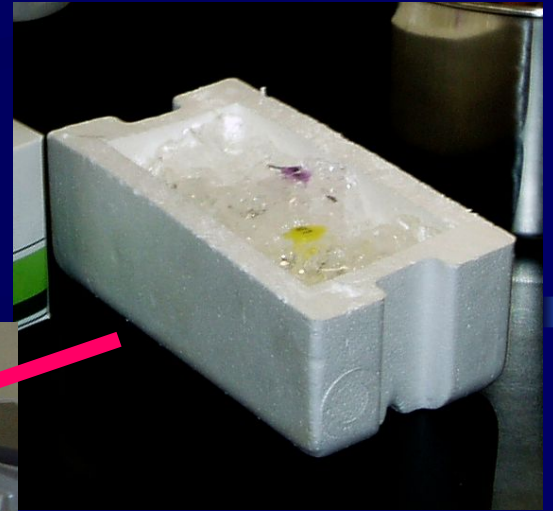
ドアを閉めて閉鎖系



# 実験台



大腸菌 (スタータープレート)



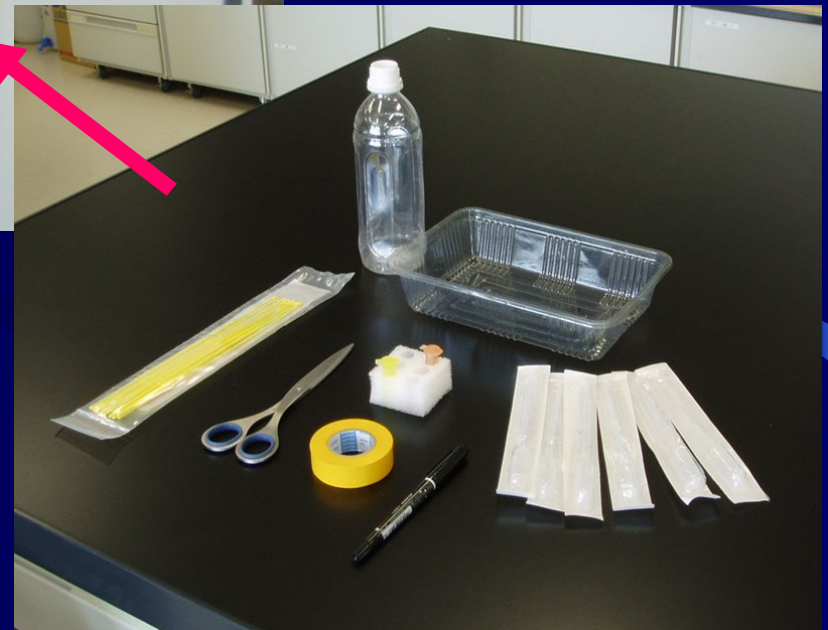
氷と試薬



プレート



水浴



ピペット・ループ他

# 実験中

DNaseの混入を避ける  
→ 静粛に実験する



# 実験後

必ず手を洗う



# 廃棄物処理

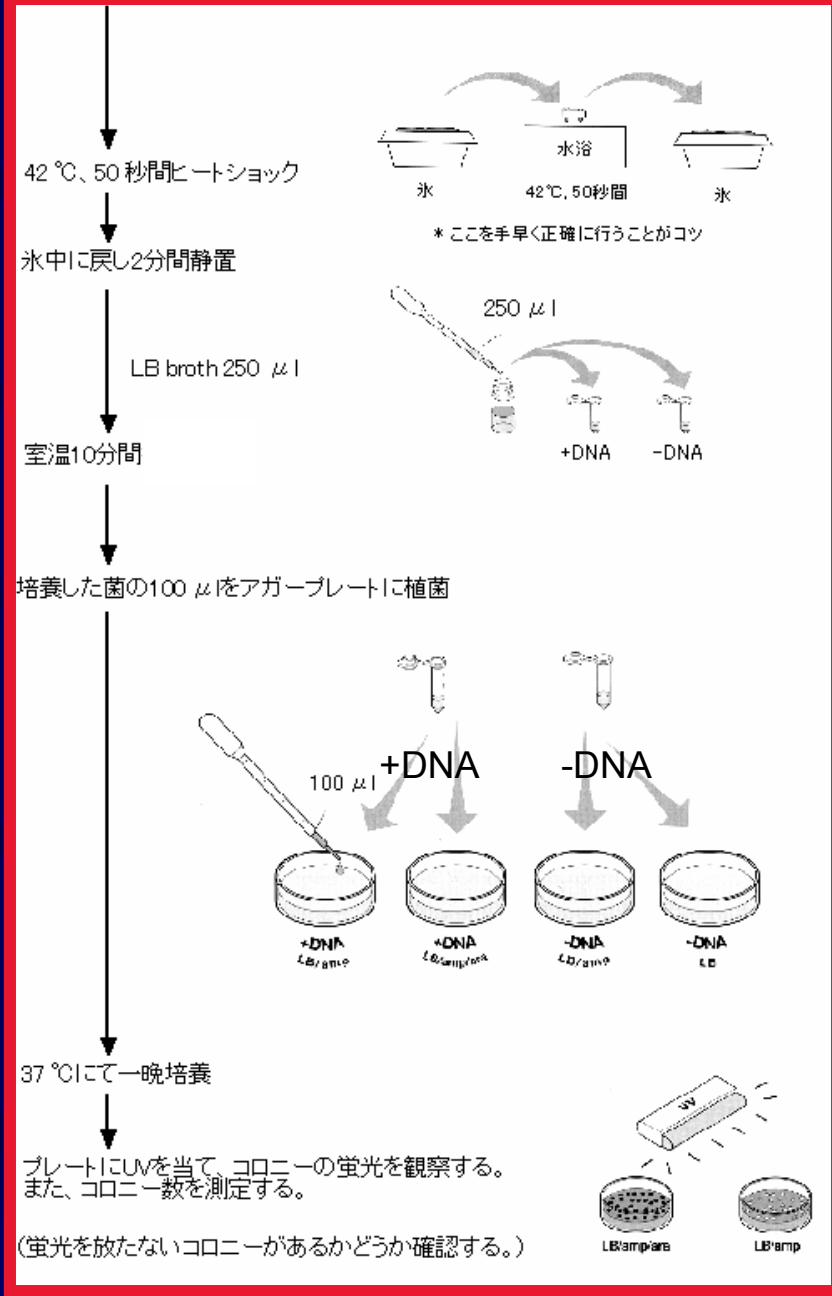
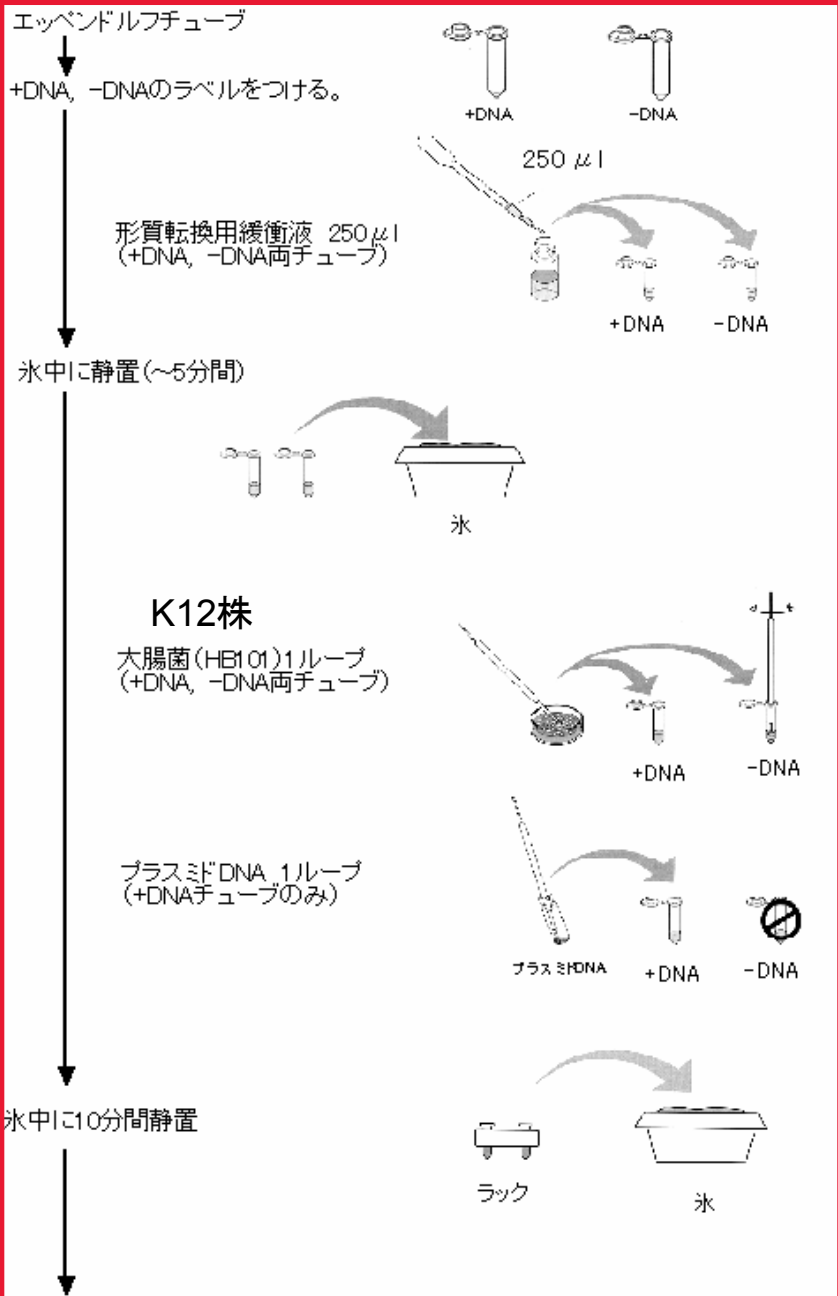
オートクレーブ滅菌



オートクレーブバッグ



# 形質転換実験操作





# 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

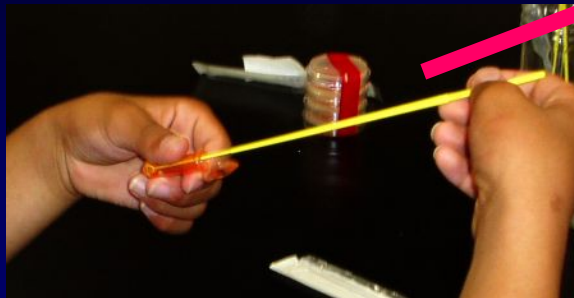


氷中

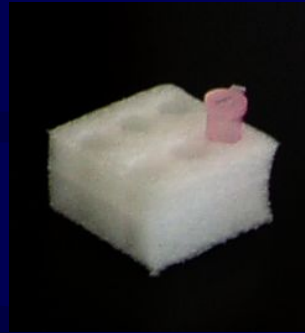


ヒートショック  
(42°C、50秒)

プラスミドDNA (pGLO) 添加

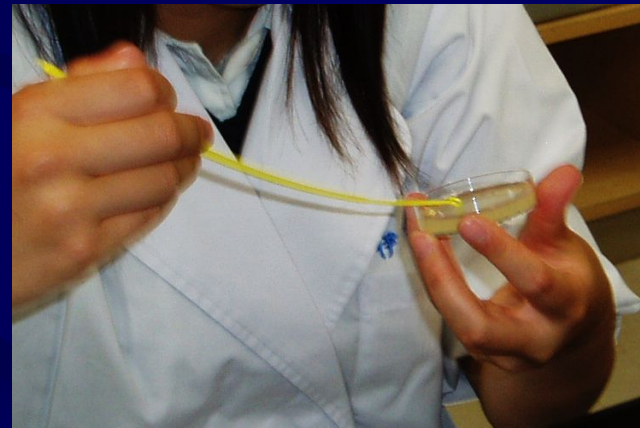
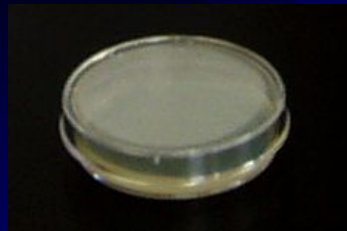


LB培地添加  
室温10分放置  
植菌



LB培地添加 室温放置

プレートにラベル



植菌

培養(37°C)  
紫外線照射  
結果観察

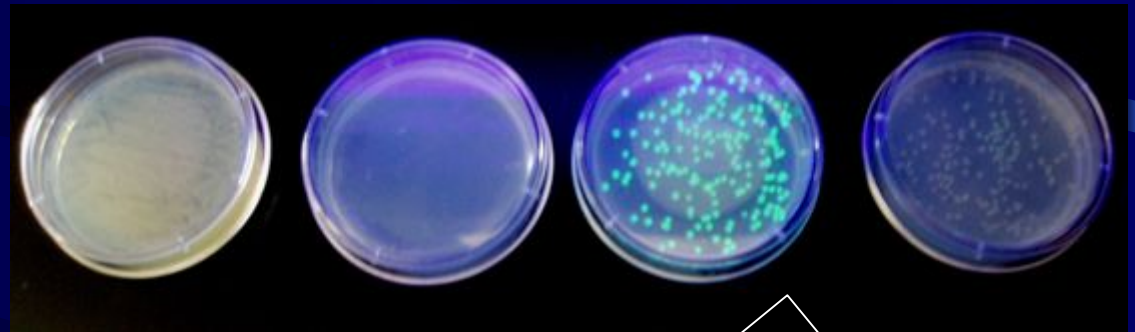


培養(裏返し)

結果観察



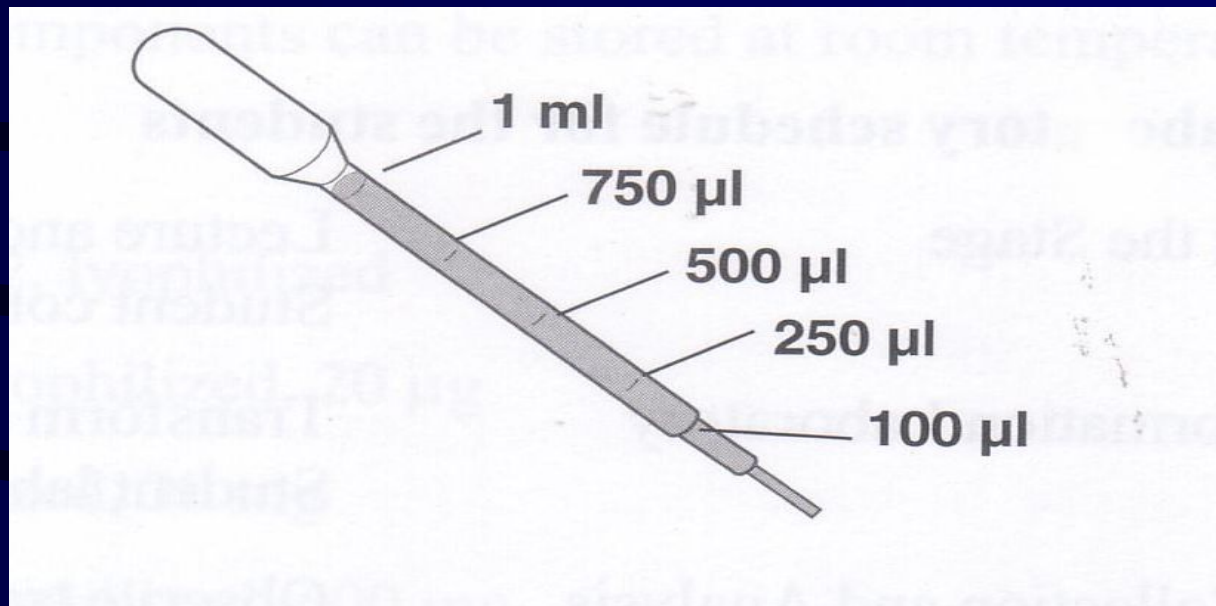
紫外線(366 nm)



コロニ一数測定



## ① ピペットで液を採取

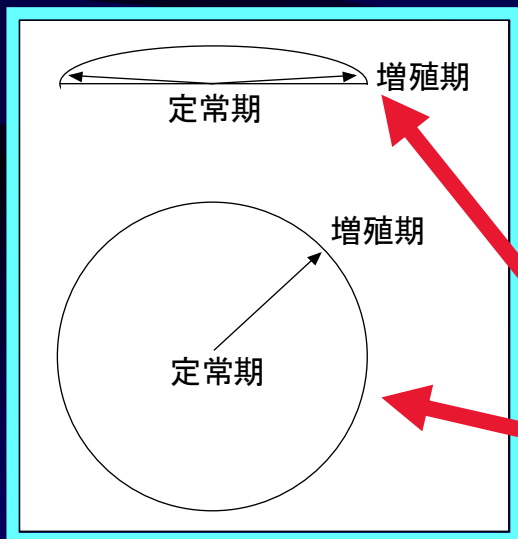
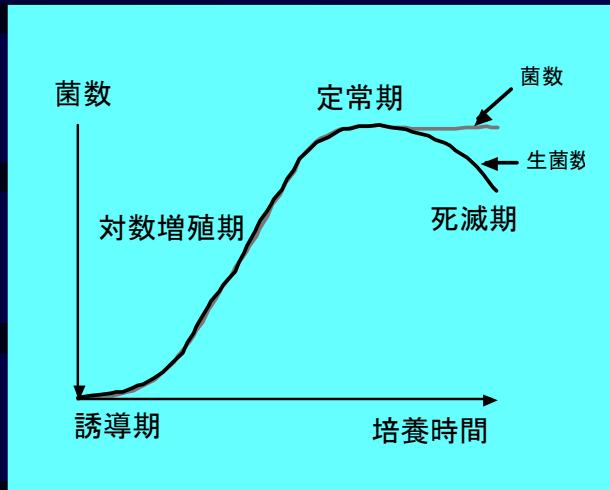


- 形質転換緩衝液添加
- LB-broth添加
- 形質転換した菌の採取



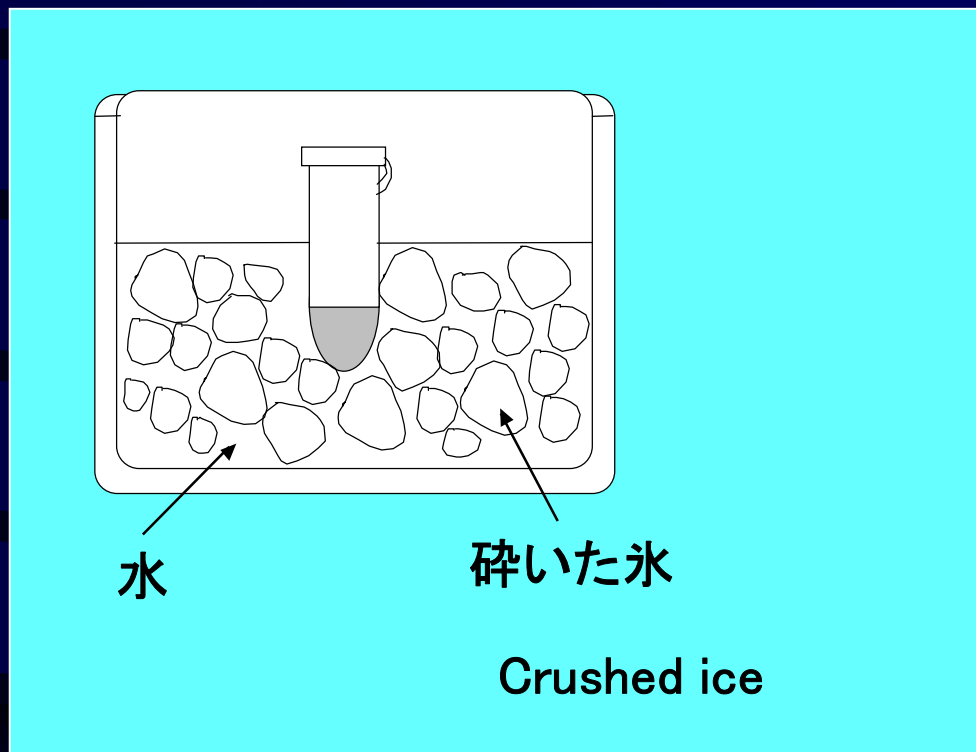
## ② スタータープレートから菌をしっかりと採る

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

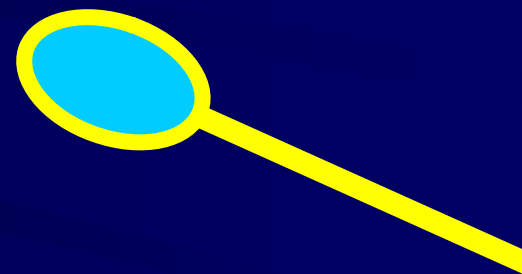
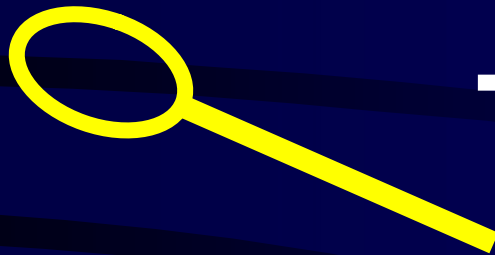
### ③ 菌を形質転換緩衝液に添加した後、水中で保温



④ プラスミドDNAを確実に採取  
→DNA+チューブに添加

ループ

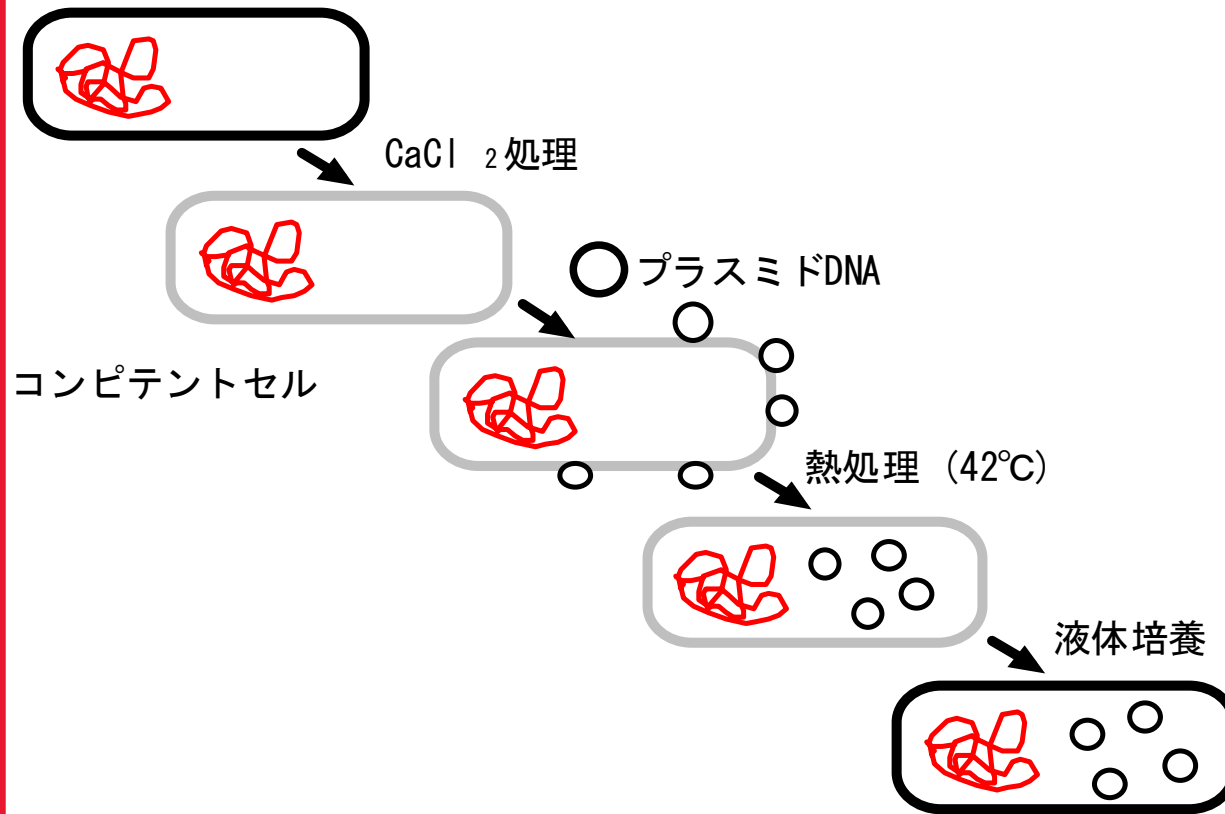
液をシャボン玉のようにすくい取る



## ⑤ ヒートショック

氷中 > 42°C・50秒 > 氷中

コンピテントセルを用いた化学的遺伝子導入法



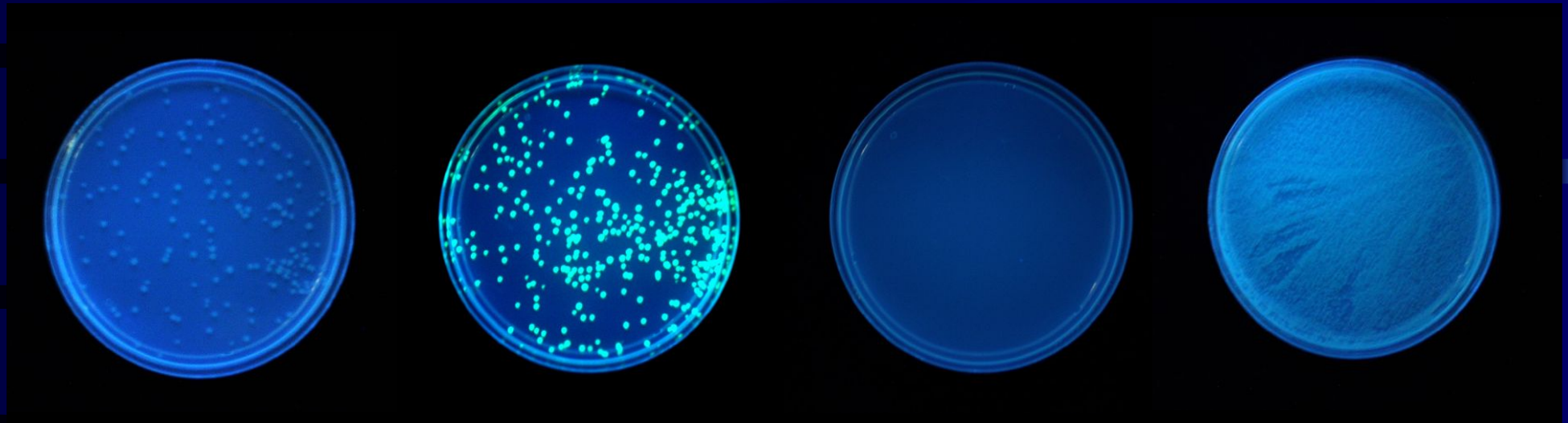
⑥ LB broth添加後の放置

→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



+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

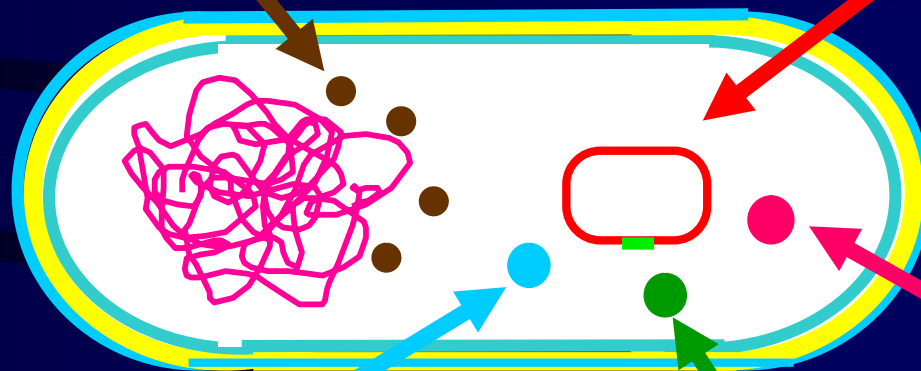
組換えDNA実験



# 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

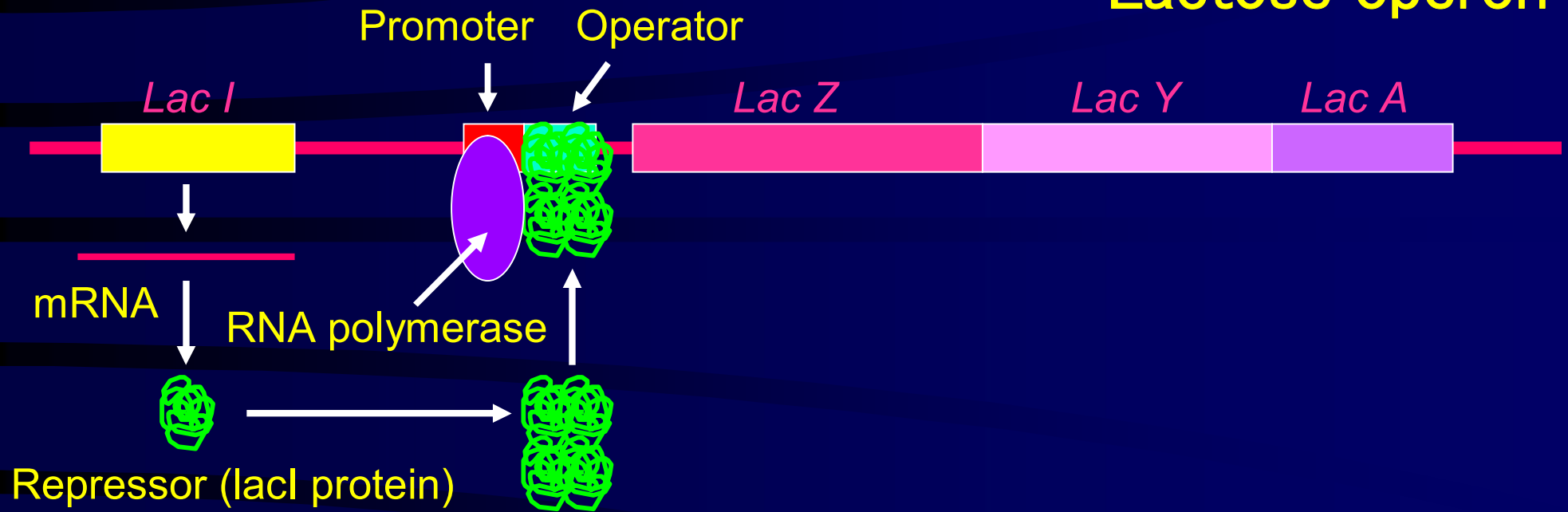


araCタンパク質

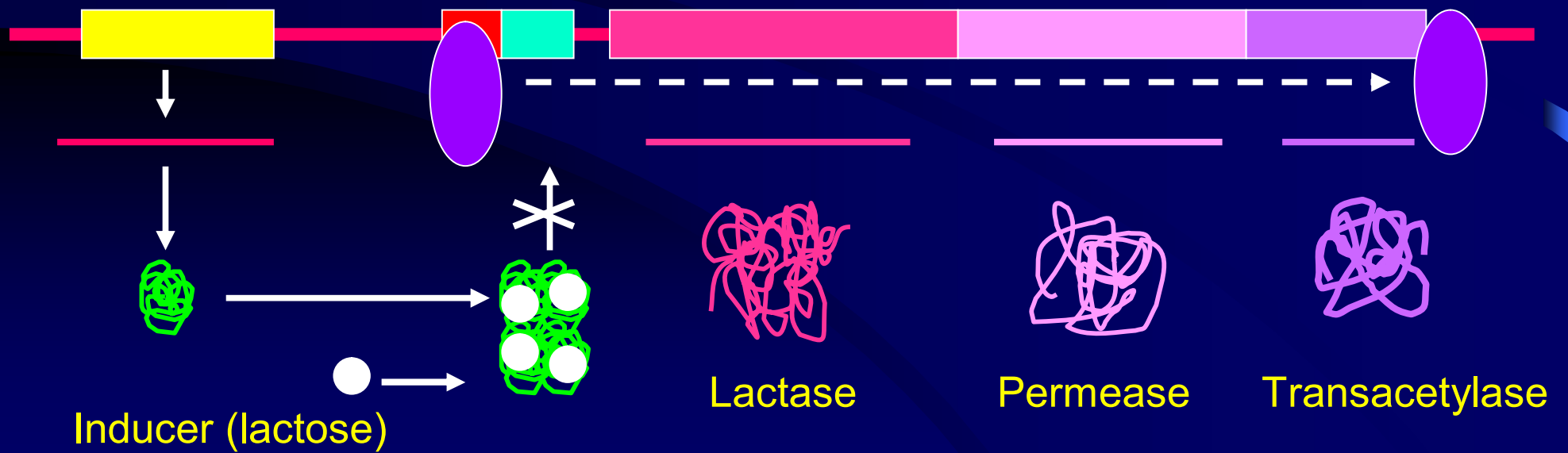
βラクタマーゼ  
(アンピシリン分解酵素)

GFPタンパク質

# Lactose operon



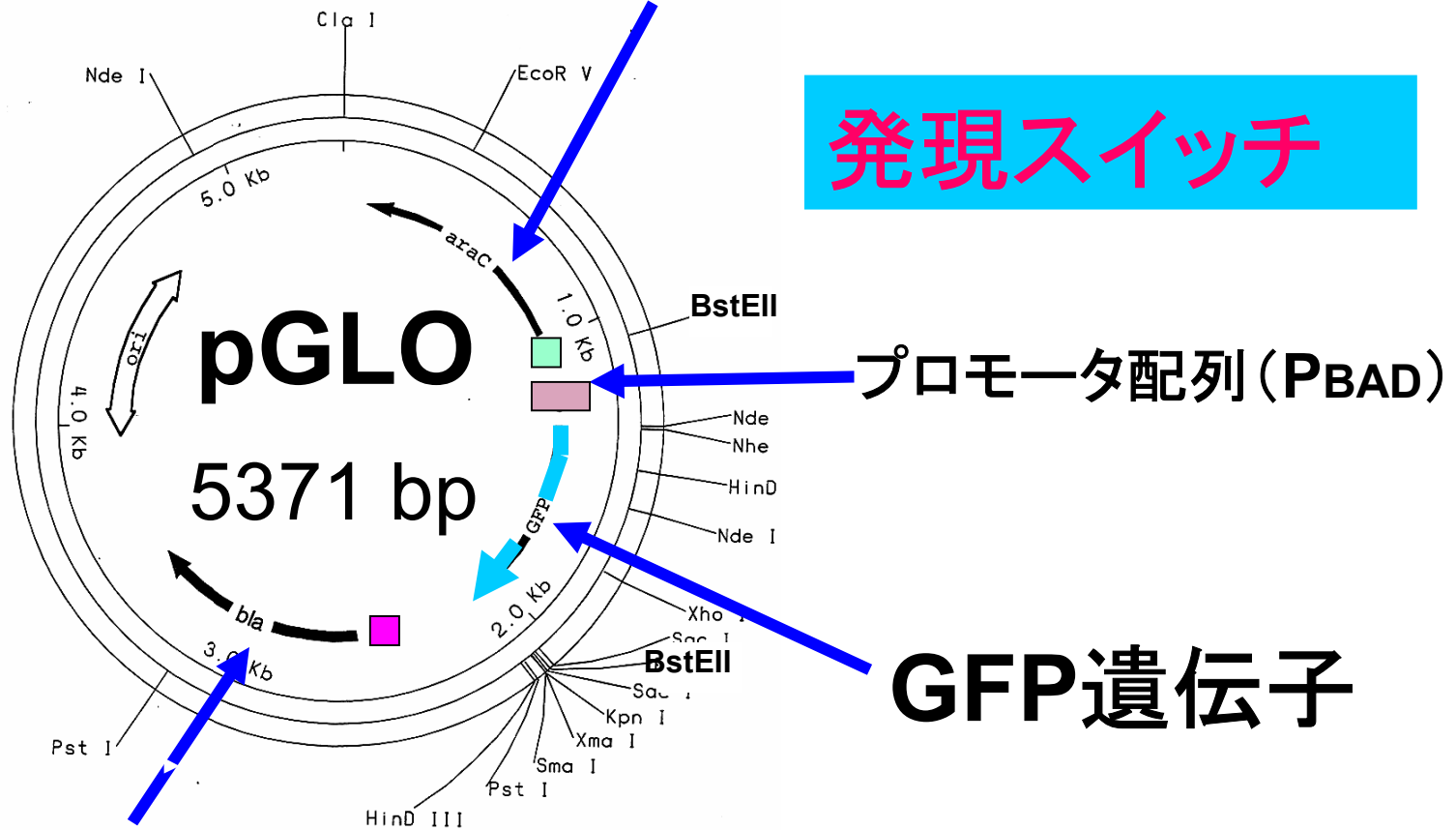
# Polycistron



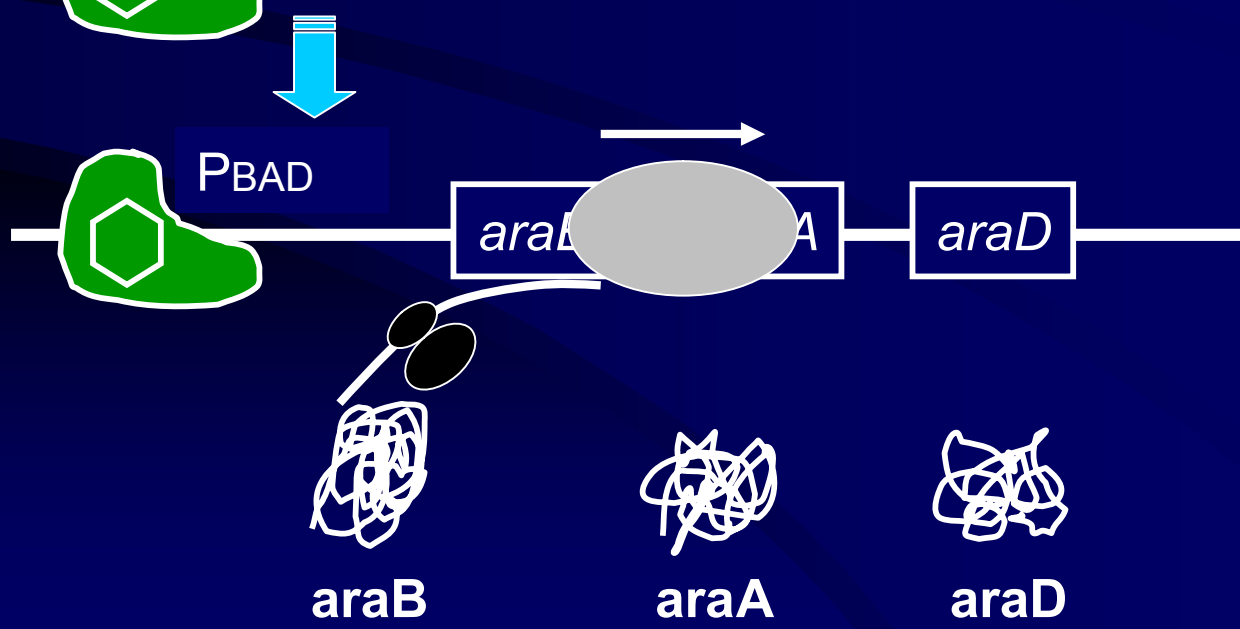
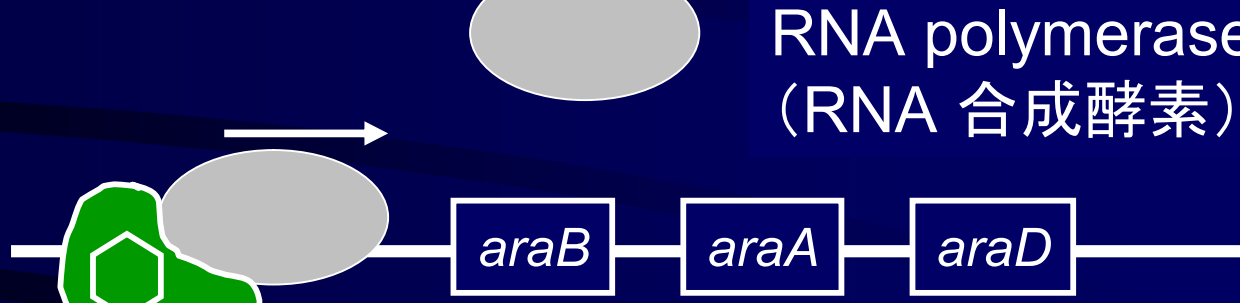
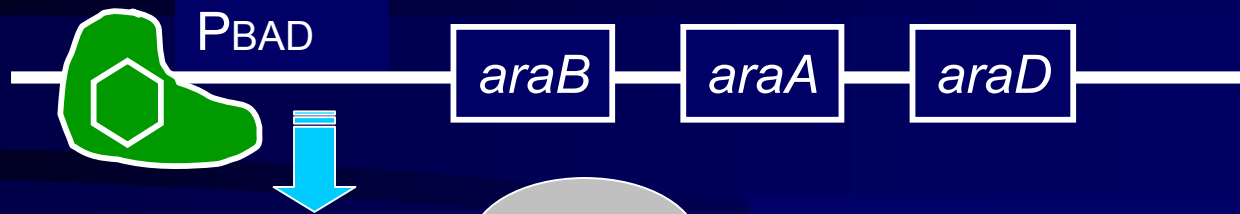
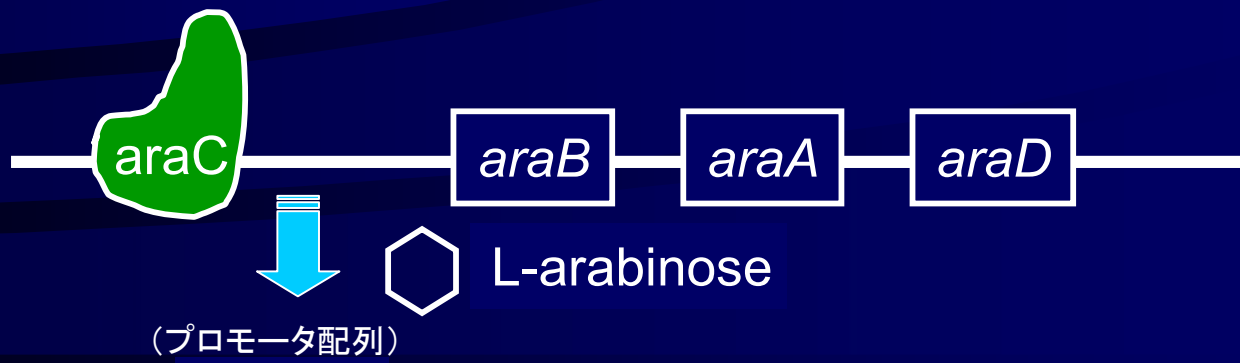
# プラスミドDNA pGLOの構造

調節タンパク質遺伝子(araC)

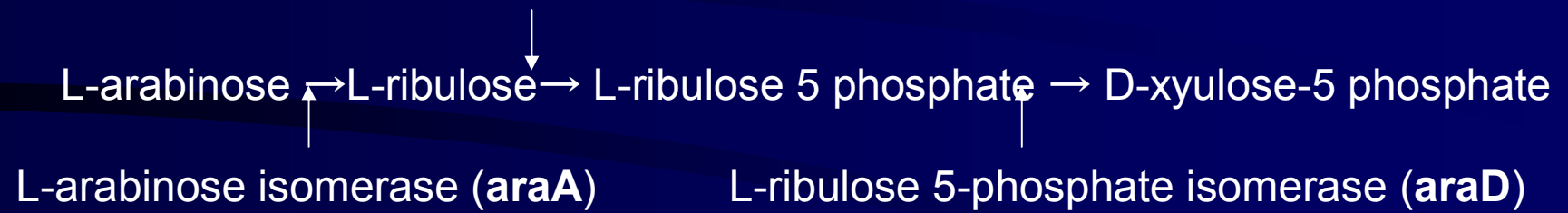
発現スイッチ

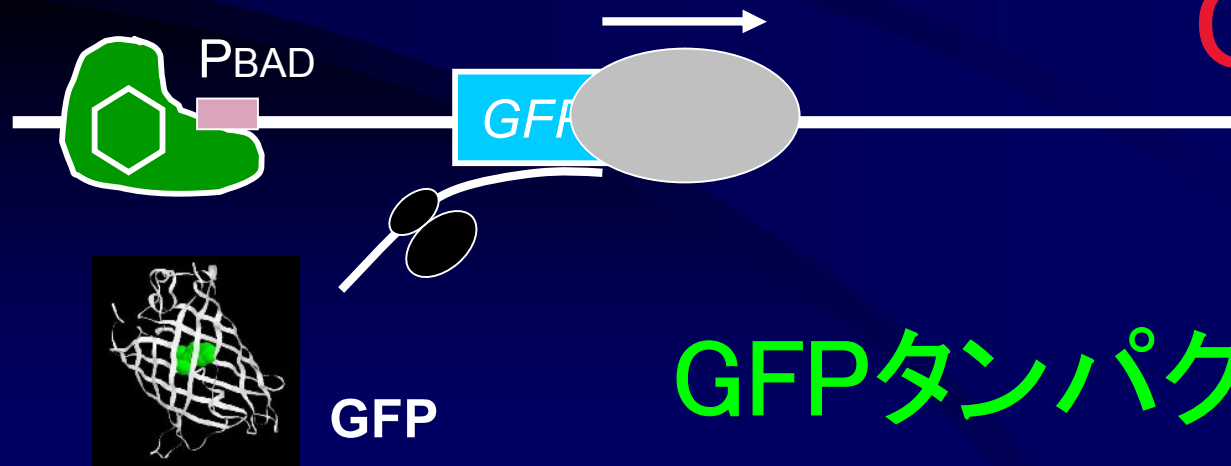
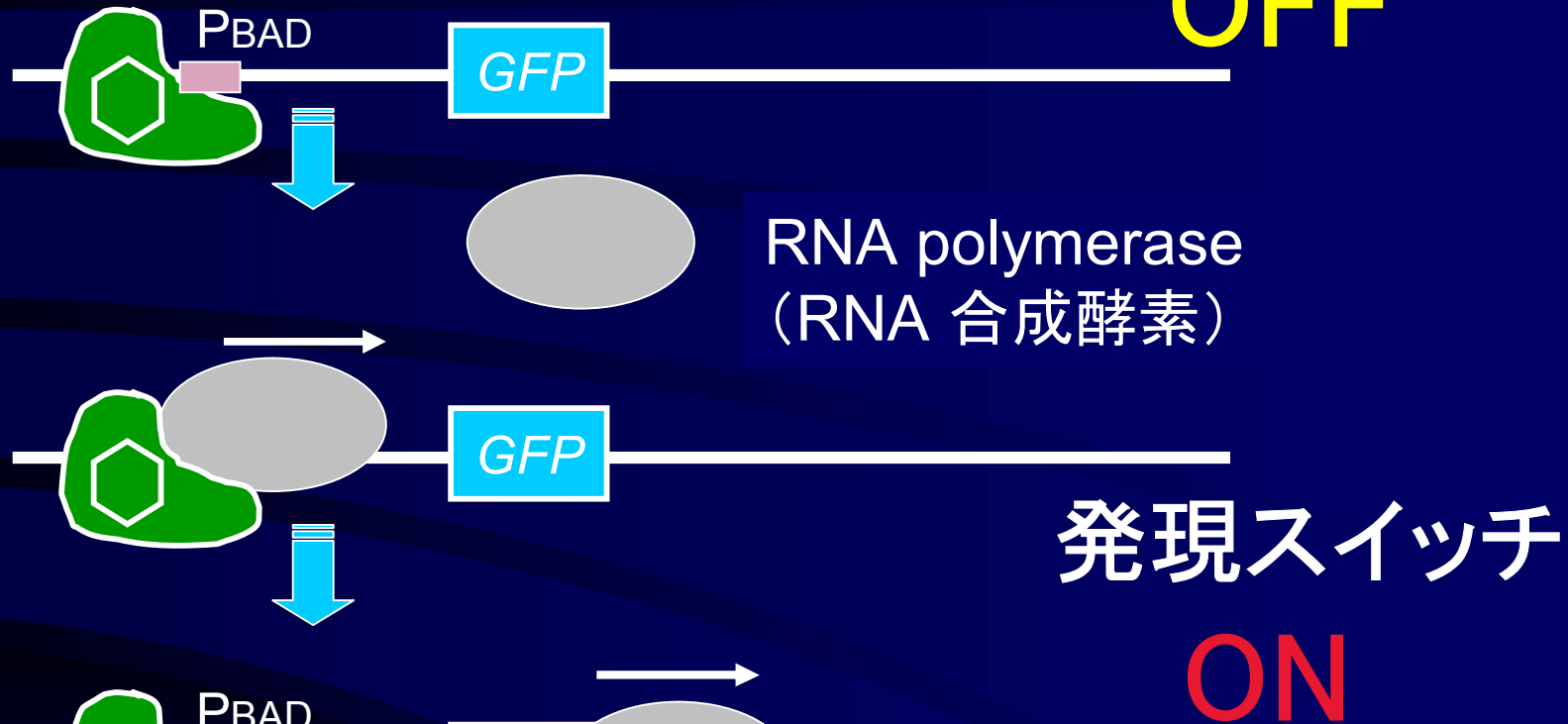
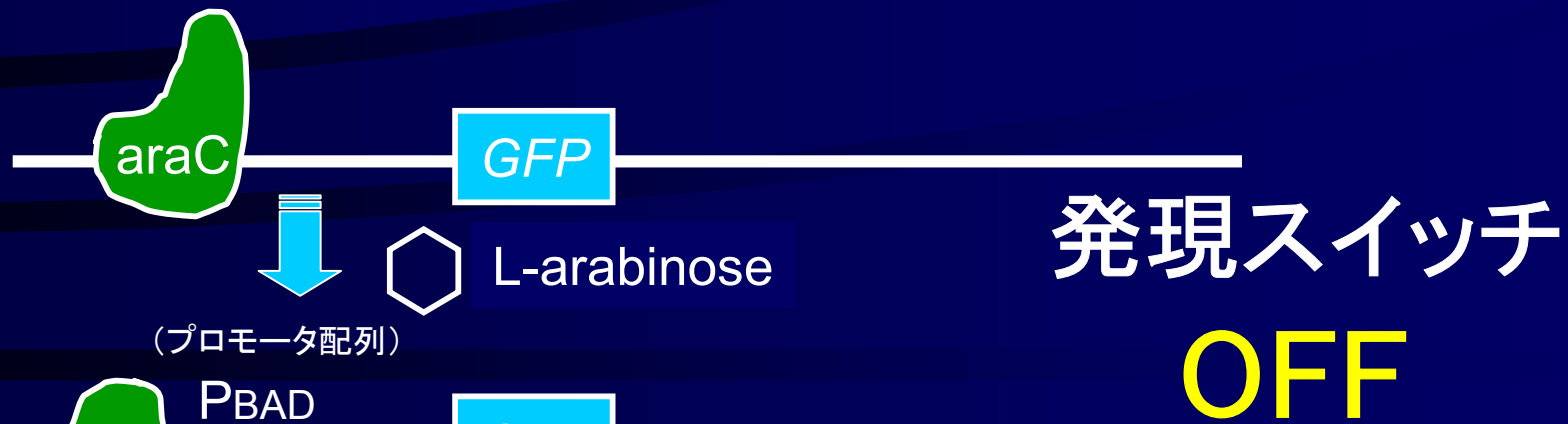


アンピシリン耐性遺伝子  
( $\beta$ ラクタマーゼ (beta lactamase) の遺伝子)



L-ribulose kinase (**araB**)





GFPタンパク質の発現