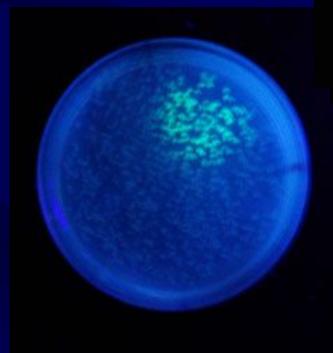
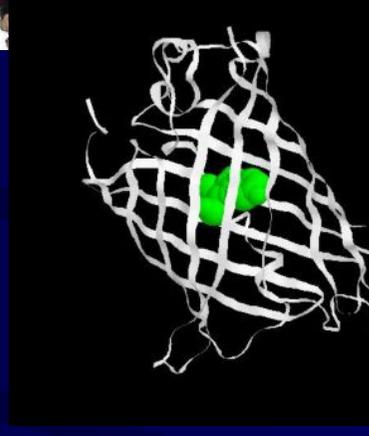


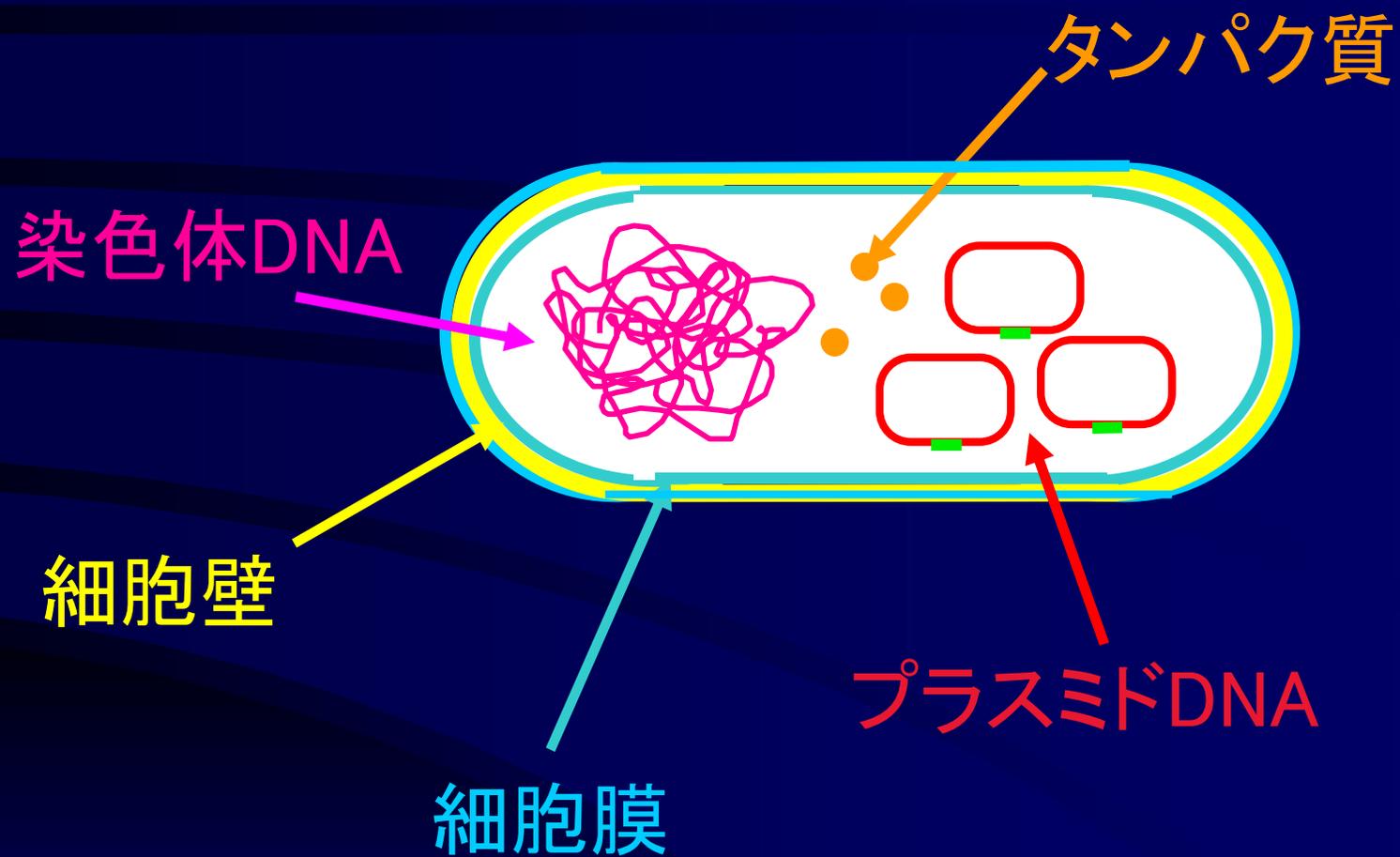
GFP遺伝子による大腸菌の形質転換



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

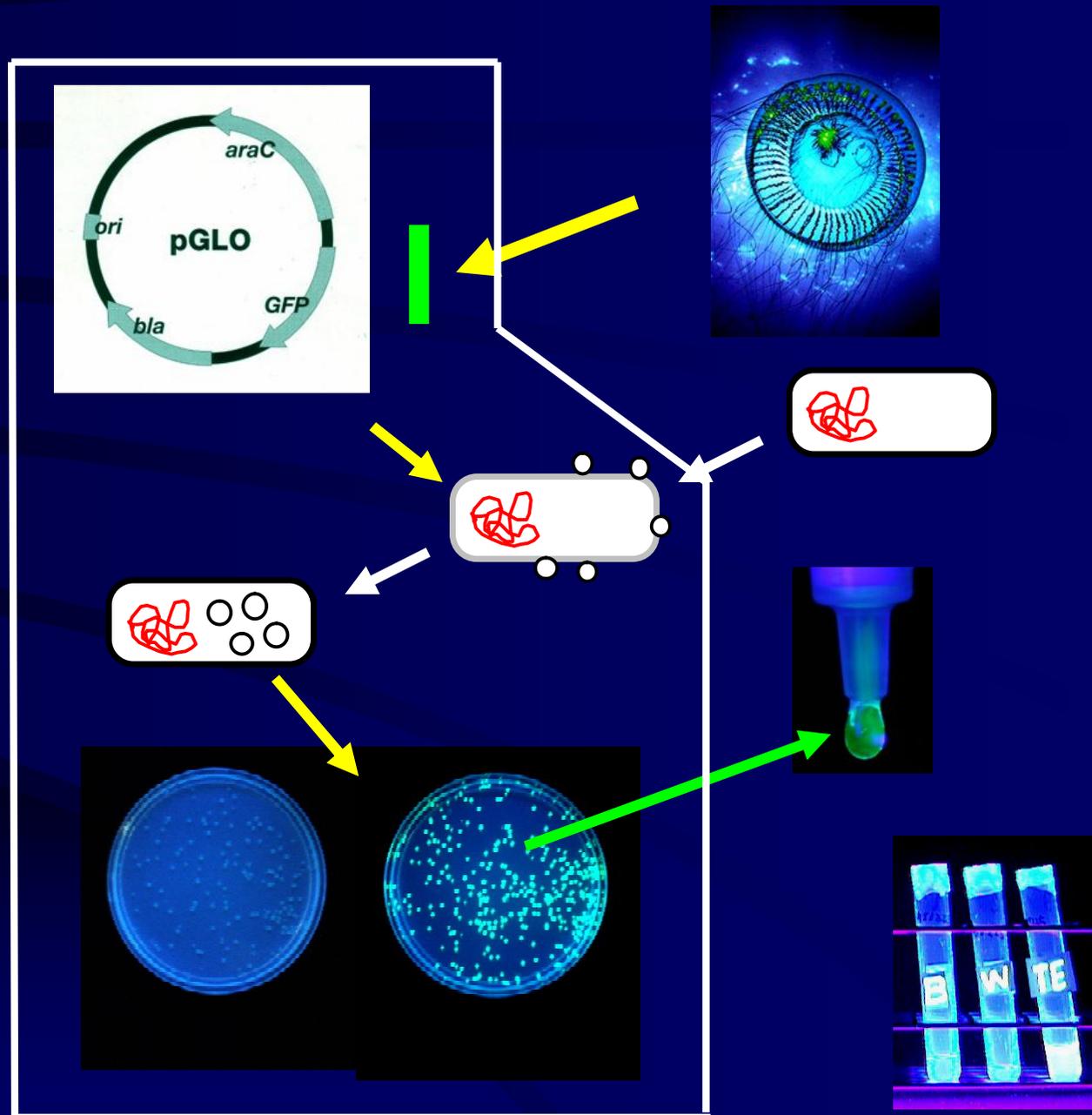


GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

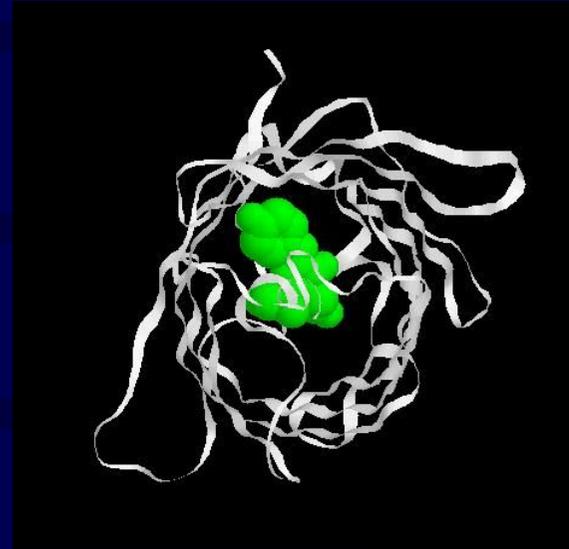
情報
(DNA)



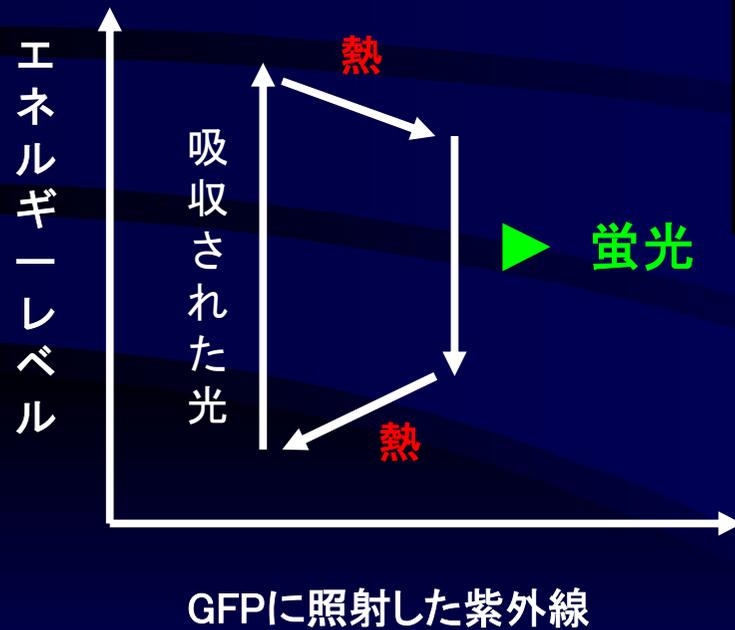
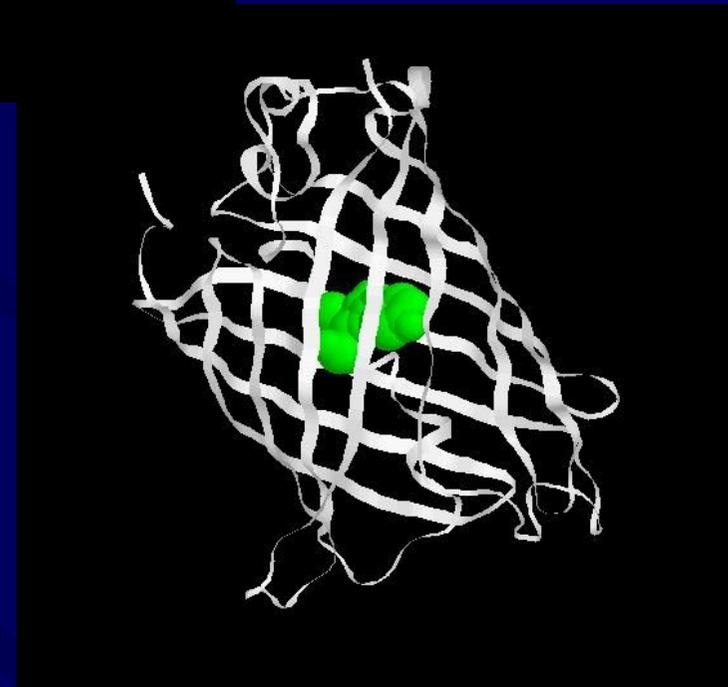
機能分子
(タンパク質)

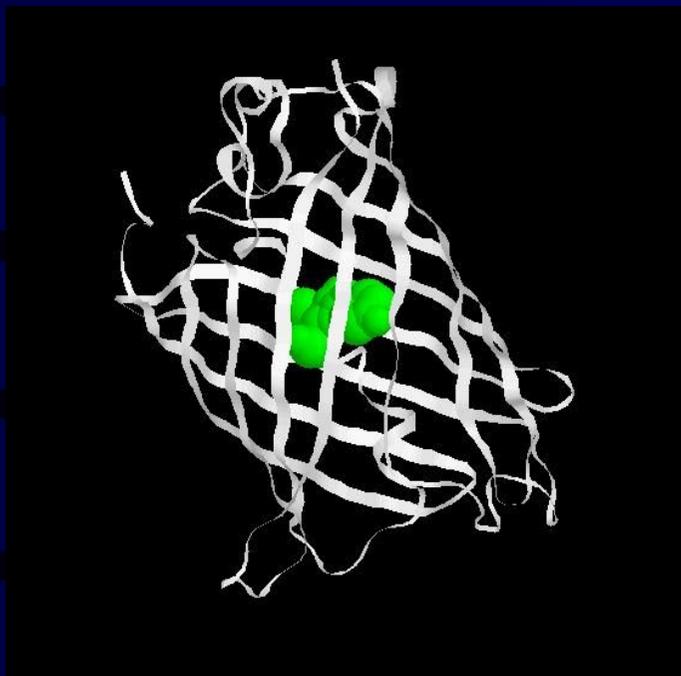


GFPとは



Ser-Tyr-Gly
65-66-67

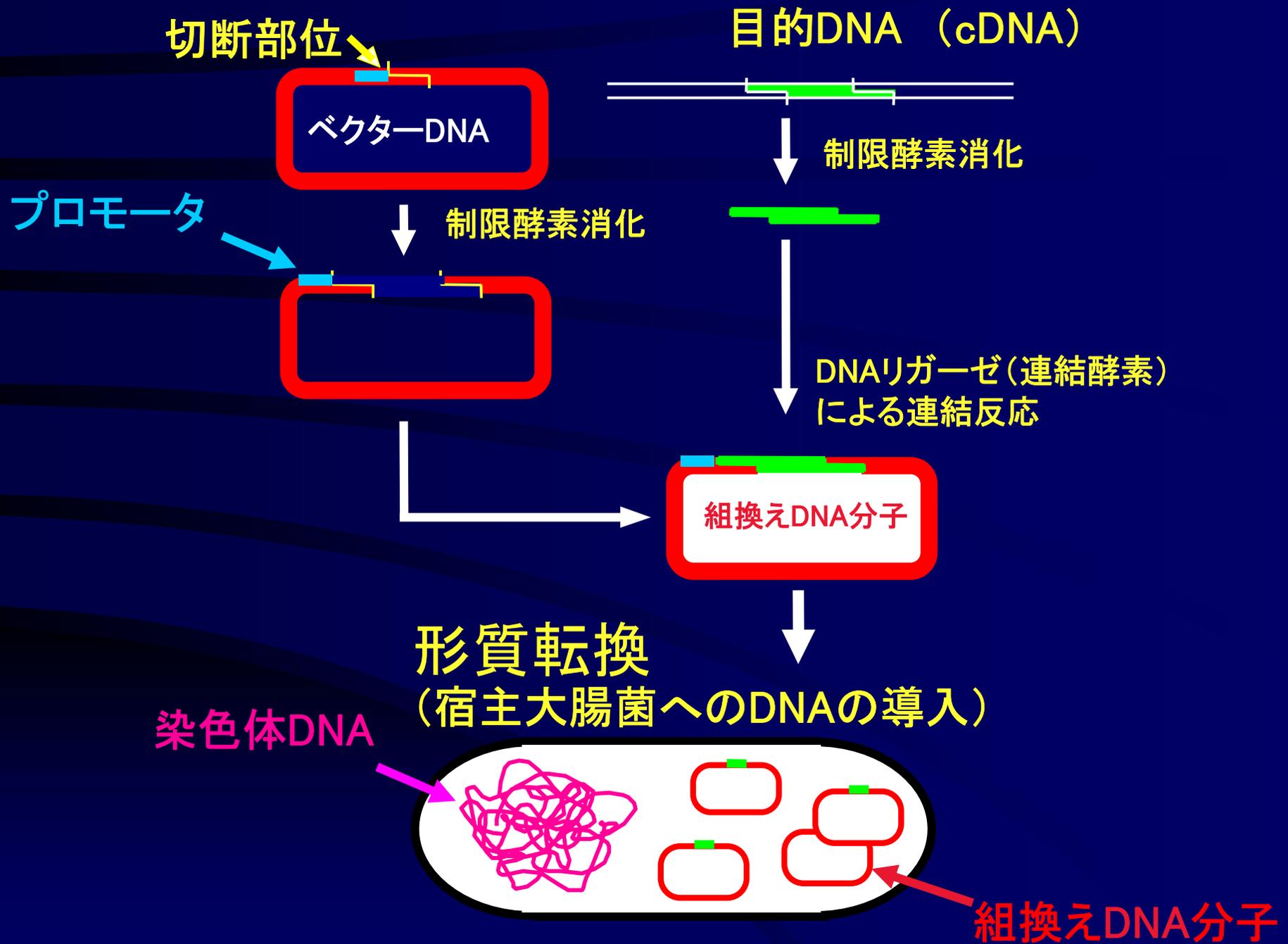




発色団
Ser-Tyr-Gly
65 - 66 - 67



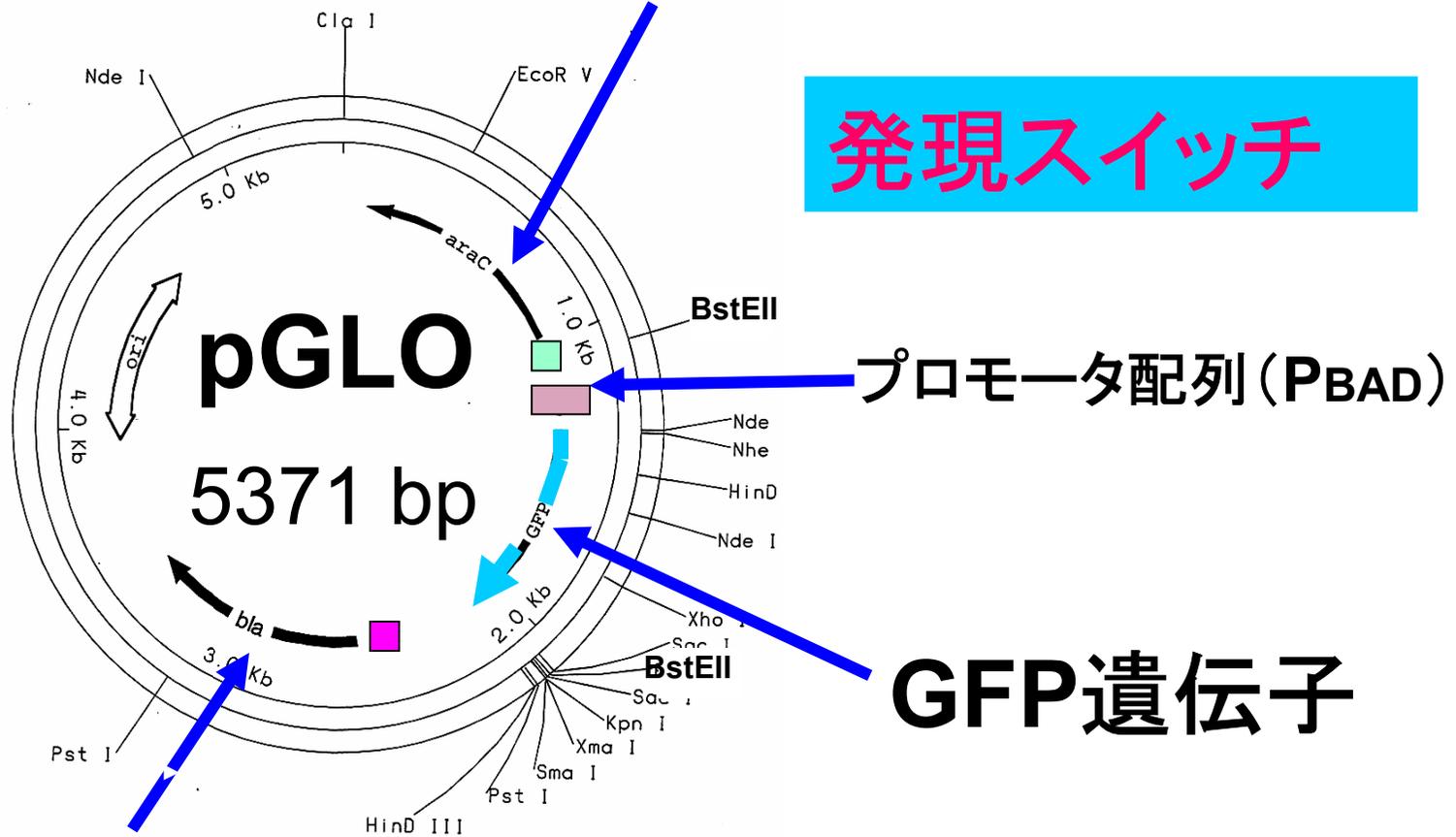
組換えDNA実験



プラスミドDNA pGLOの構造

調節タンパク質遺伝子(araC)

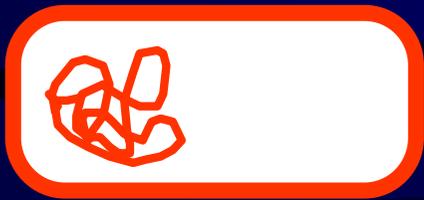
発現スイッチ



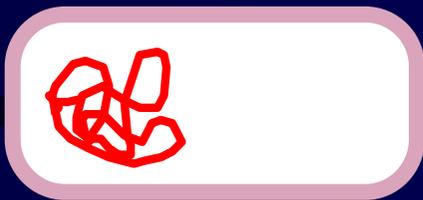
プロモータ配列 (PBAD)

GFP遺伝子

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

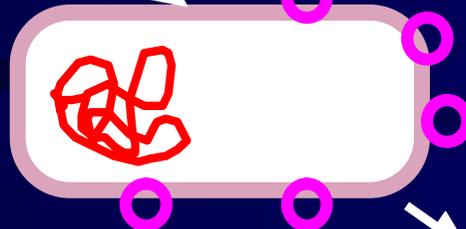


CaCl₂ 処理



コンピテント細胞

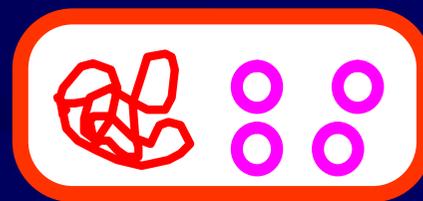
プラスミドDNA



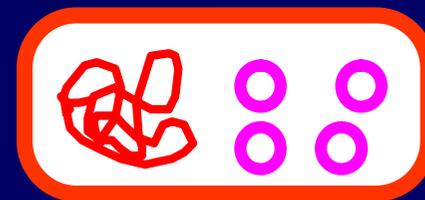
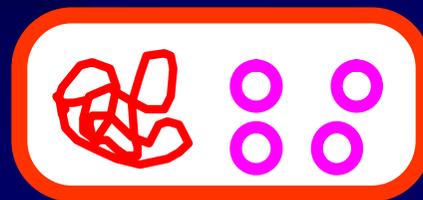
熱処理 (42°C)



培養

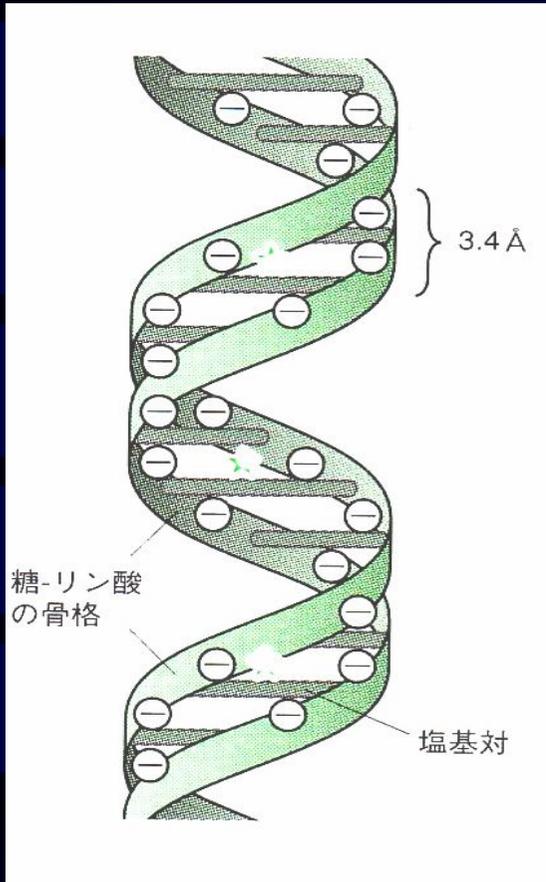


細胞分裂



コンピテント細胞 と形質転換

DNAの構造

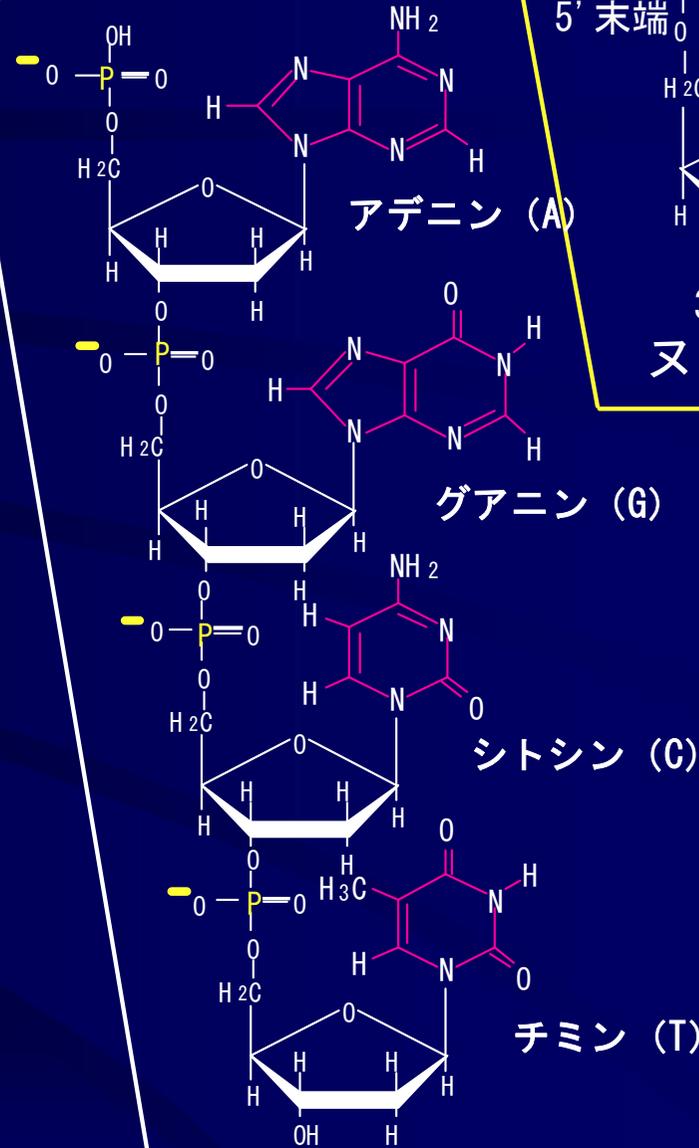


G≡C

A=T

5' 末端

3' 末端



マイナスチャージ

リン酸

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'



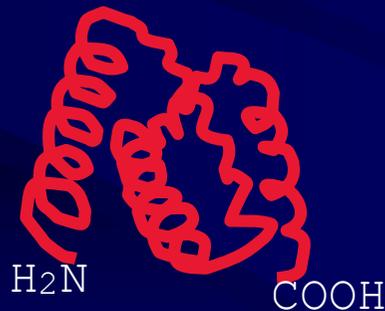
翻訳 (translation)

H₂N Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly COOH

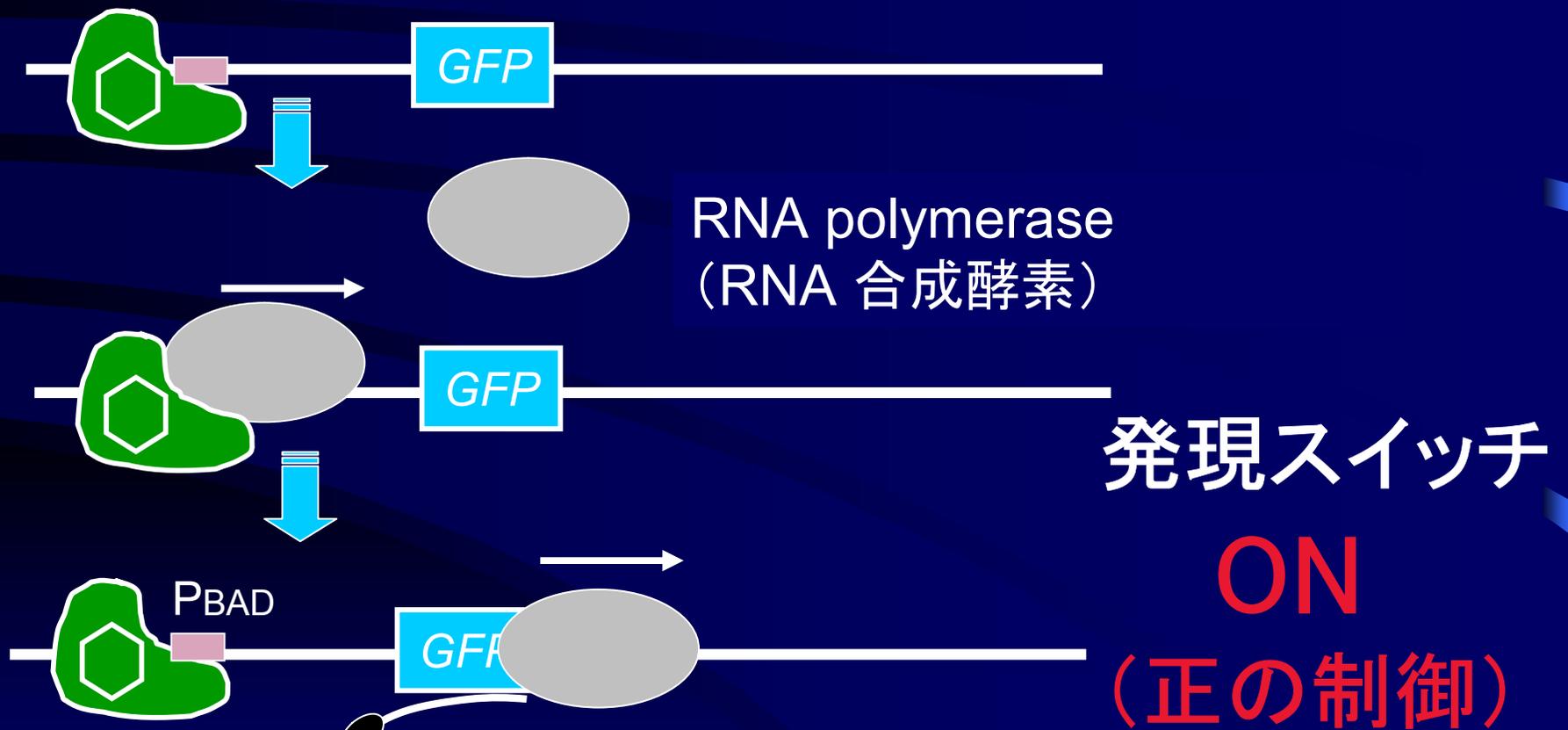


機能

タンパク質

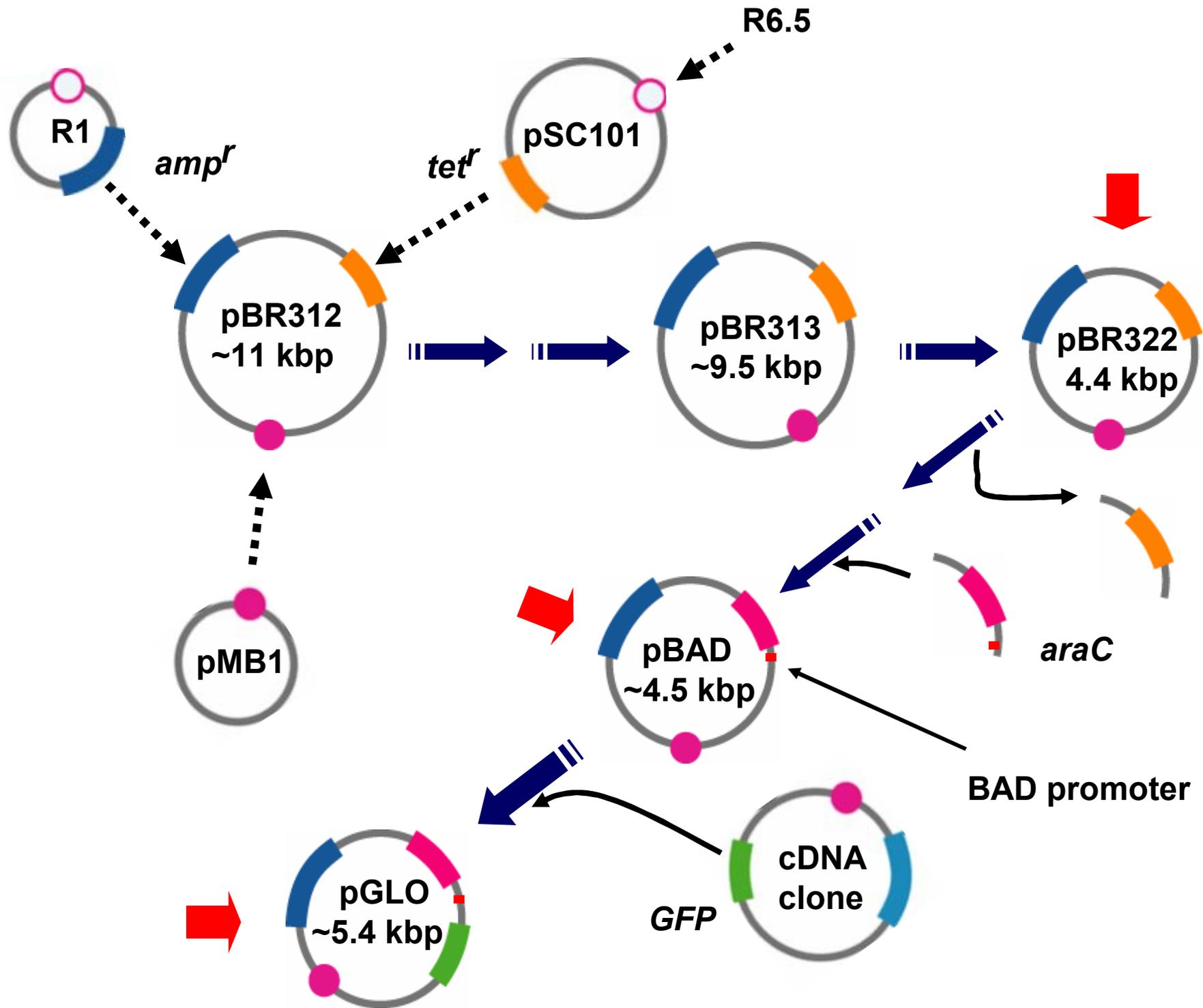


第一塩基	第二塩基				第三塩基
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	stop	stop	A
	Leu	Ser	stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C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



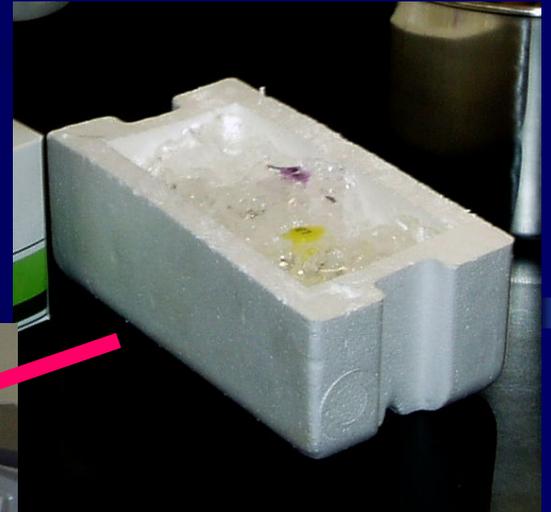
実験前の確認

ドアを閉めて閉鎖系

実験台



大腸菌 (スタータープレート)



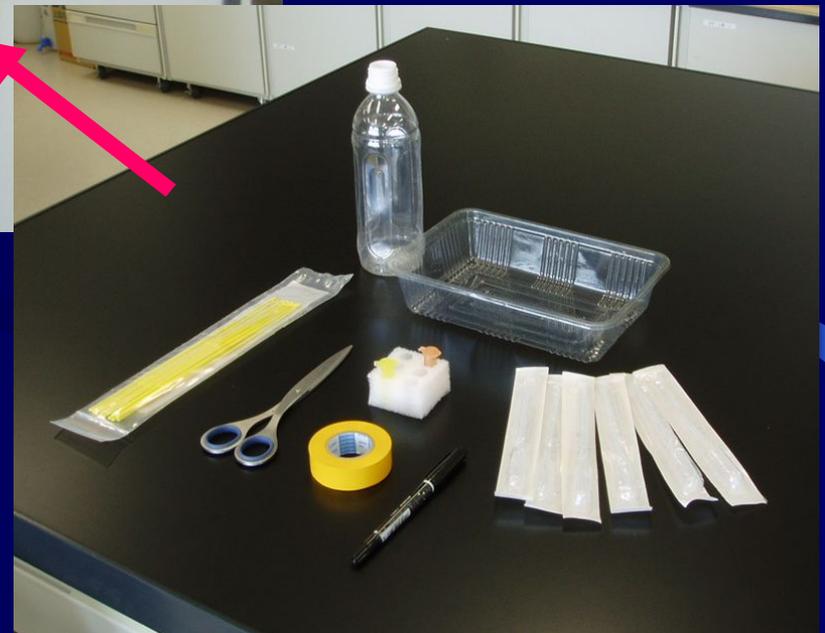
氷と試薬



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

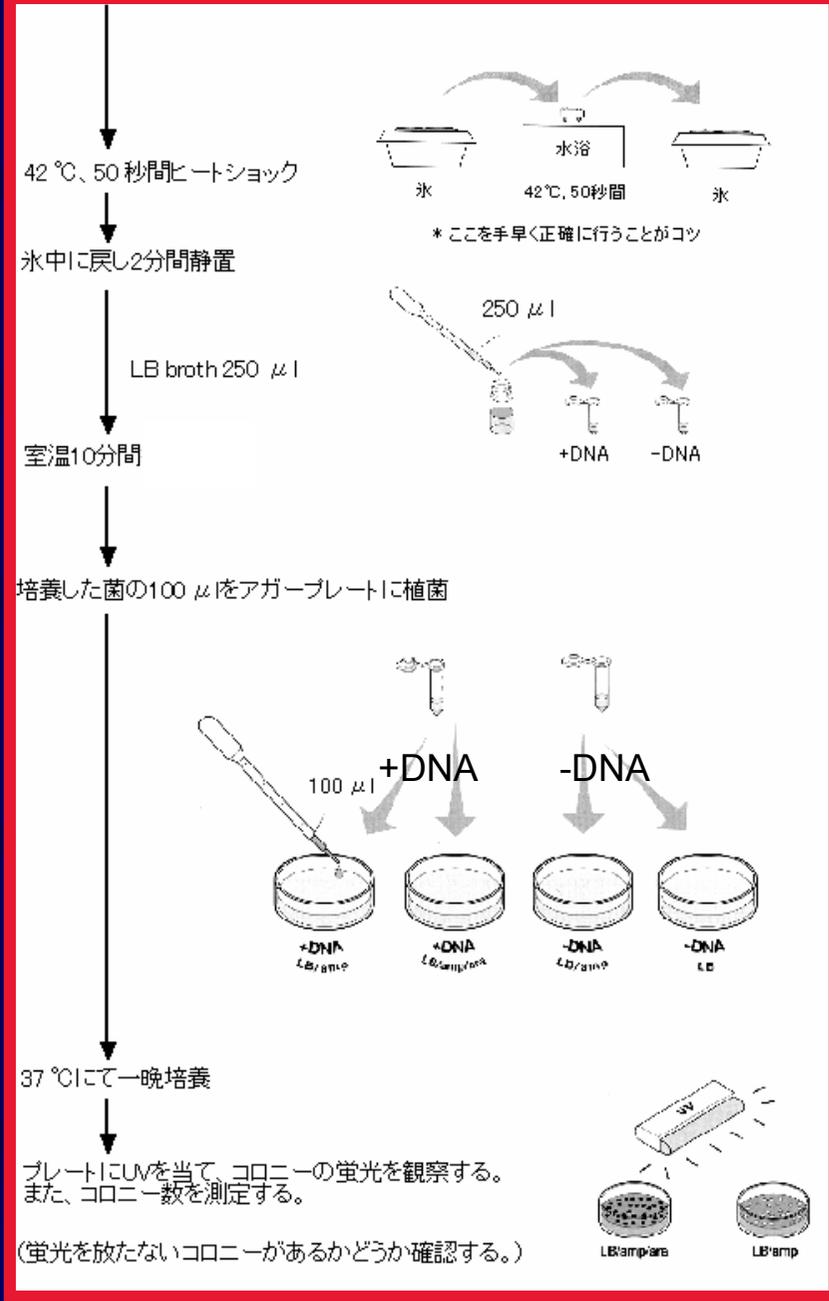
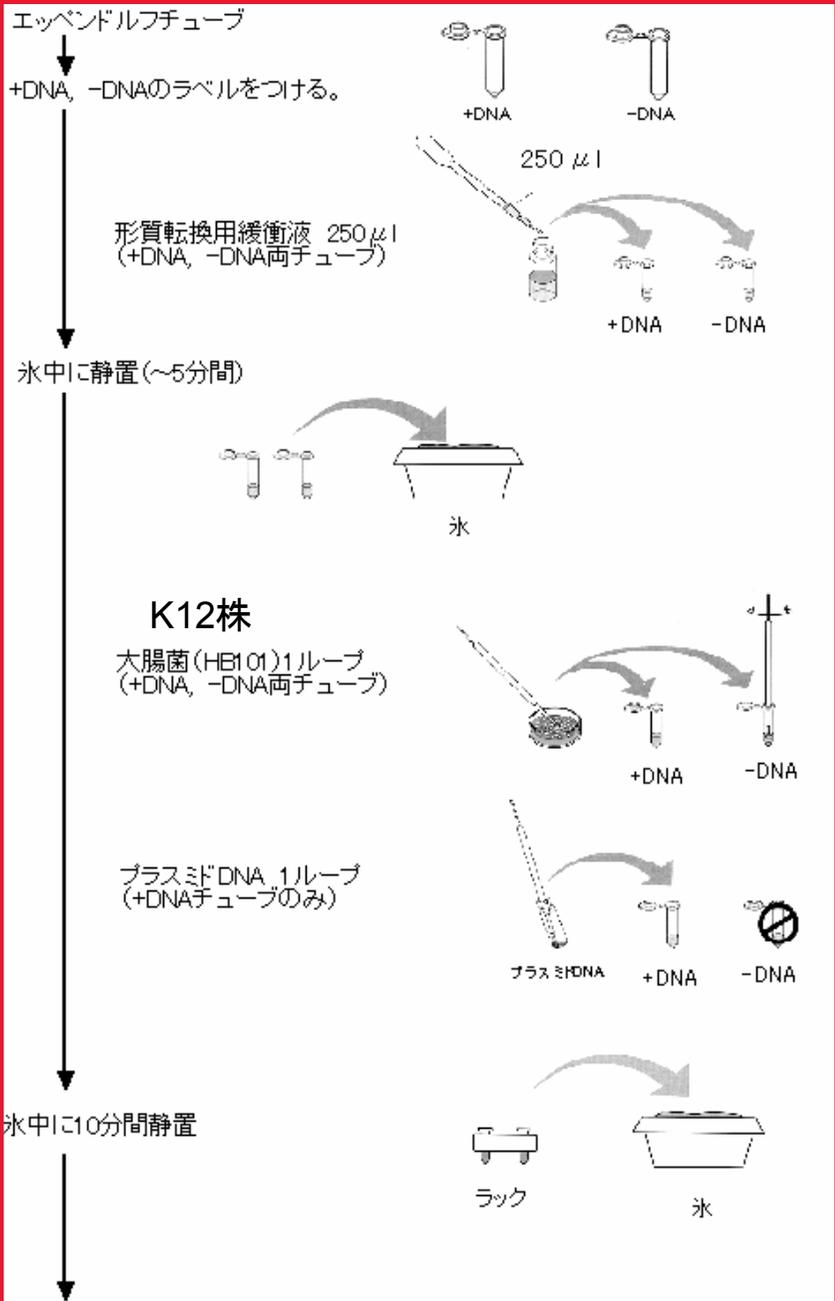
オートクレーブ滅菌



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

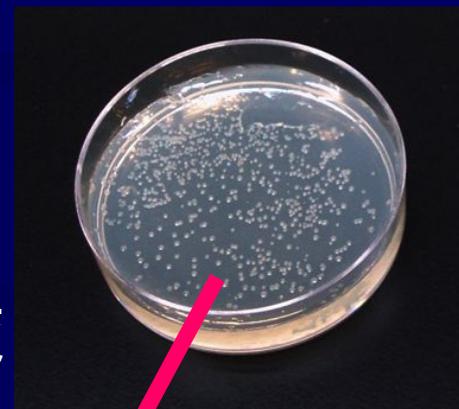
大腸菌添加

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

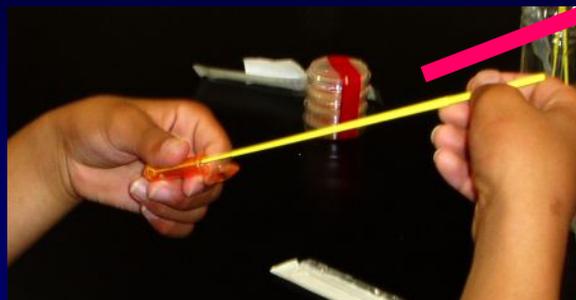


氷中

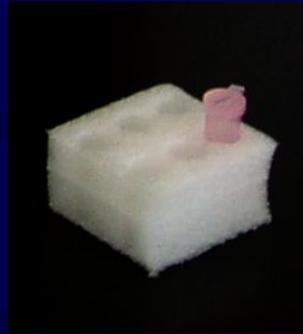


ヒートショック
(42°C、50秒)

プラスミドDNA (pGLO) 添加

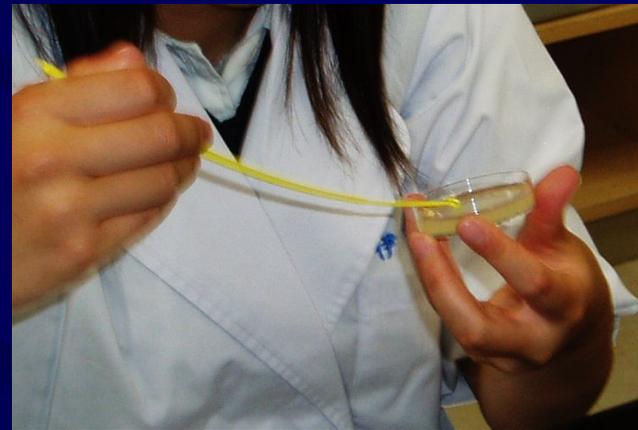


LB培地添加
室温10分放置
植菌



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

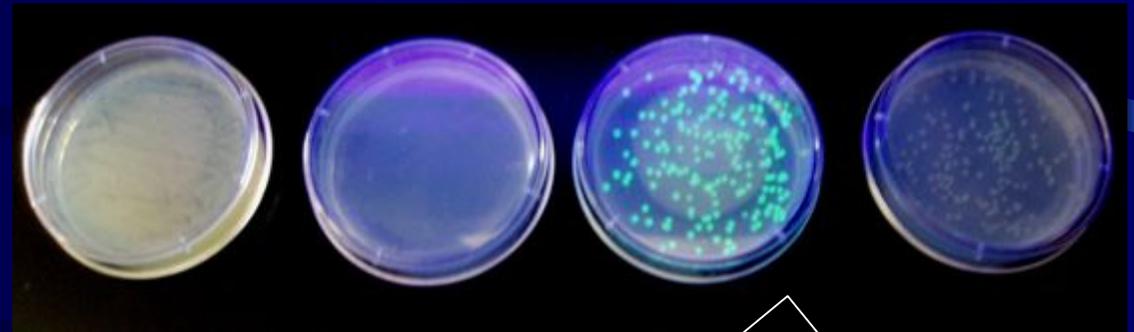


培養(裏返し)

結果観察

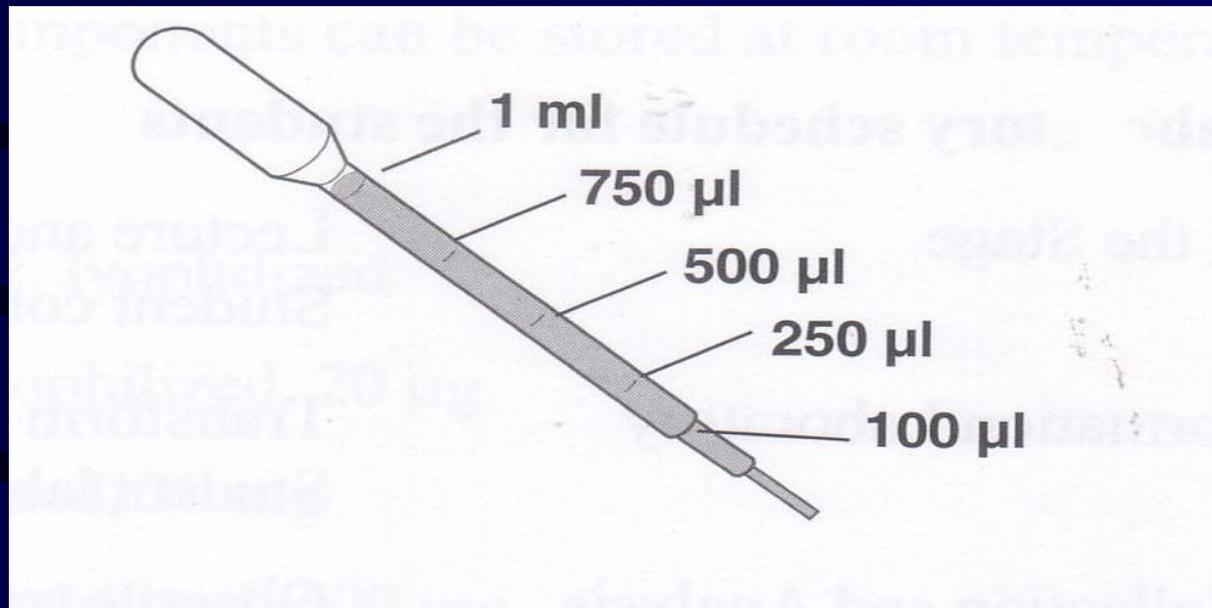


紫外線(366 nm)



コロニ一数測定

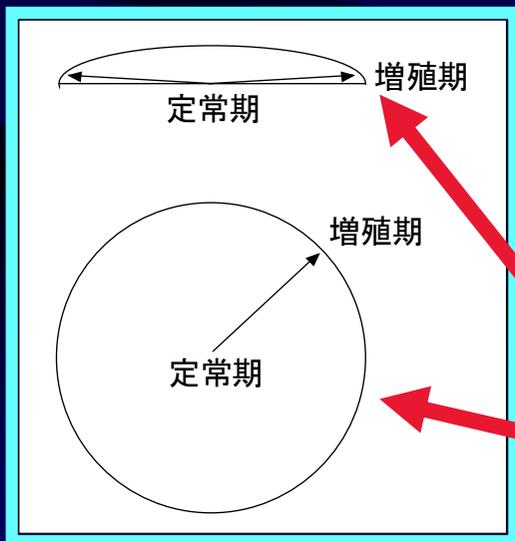
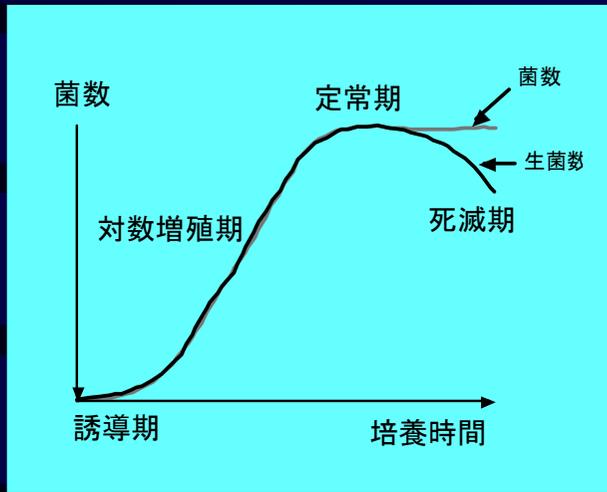
① ピペットで液を採取



- 形質転換緩衝液添加
- LB-broth添加
- 形質転換した菌の採取

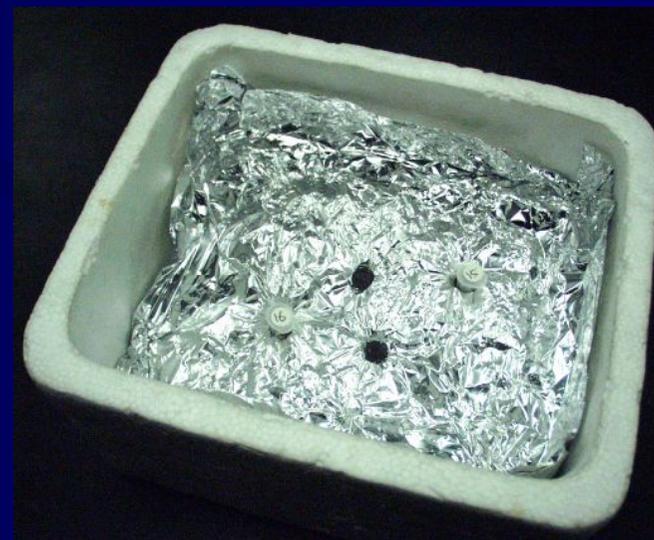
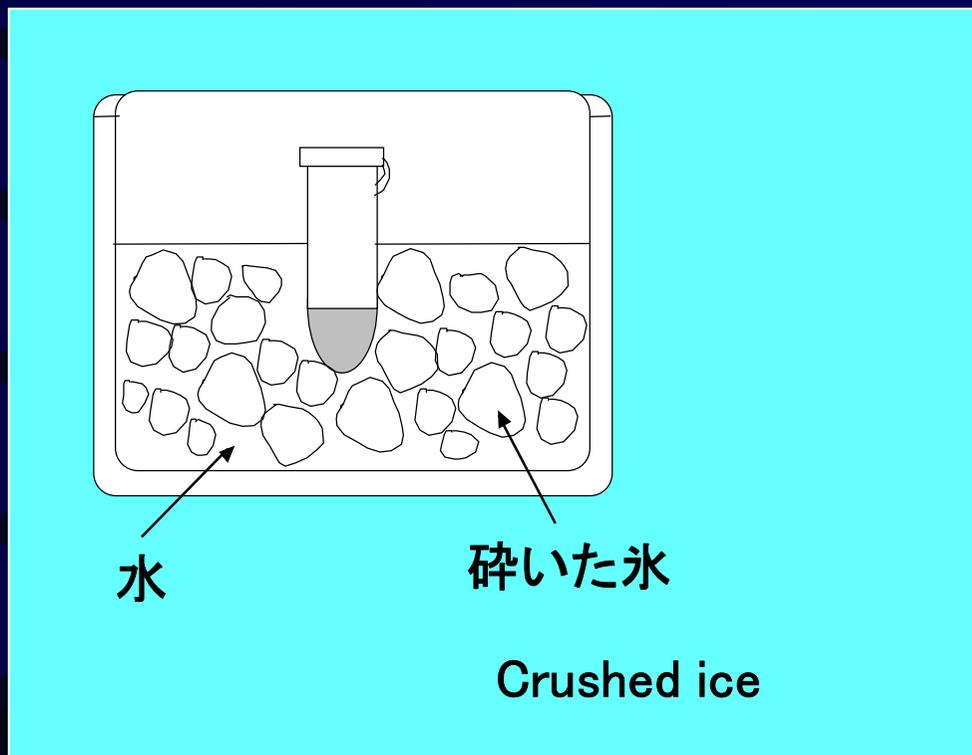
② スタータープレートから菌をしっかりと採る

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

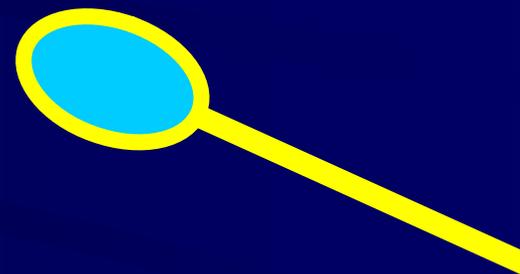
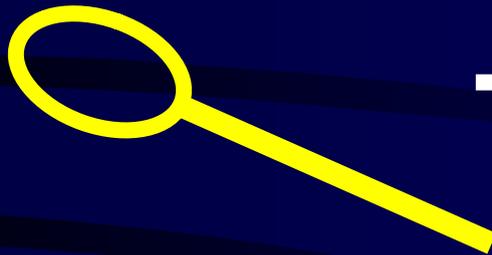
③ 菌を形質転換緩衝液に添加した後、水中で保温



④ プラスミドDNAを確実に採取
→DNA+チューブに添加

ループ

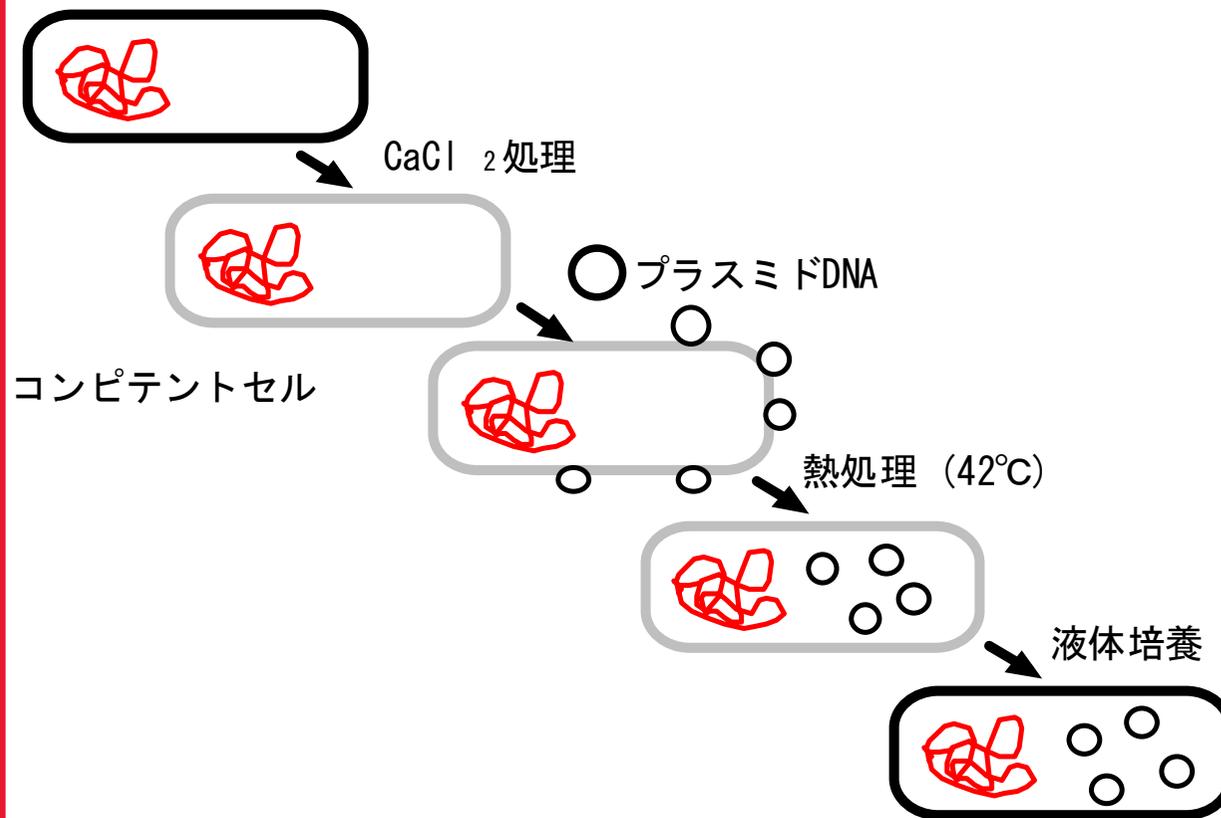
液をシャボン玉のようにすくい取る



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



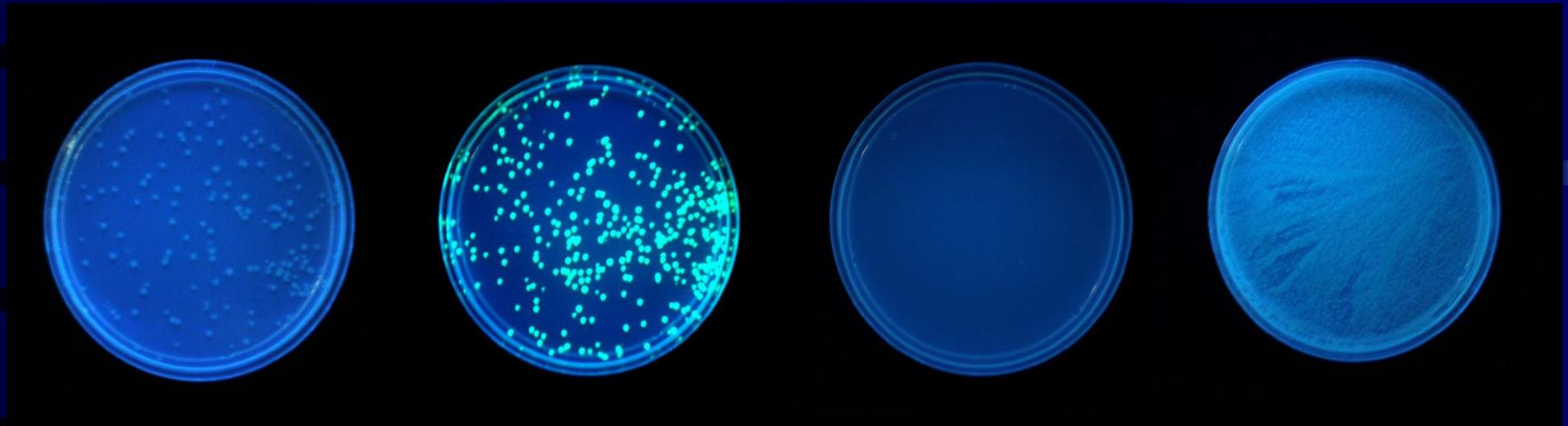
⑥ LB broth添加後の放置

→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

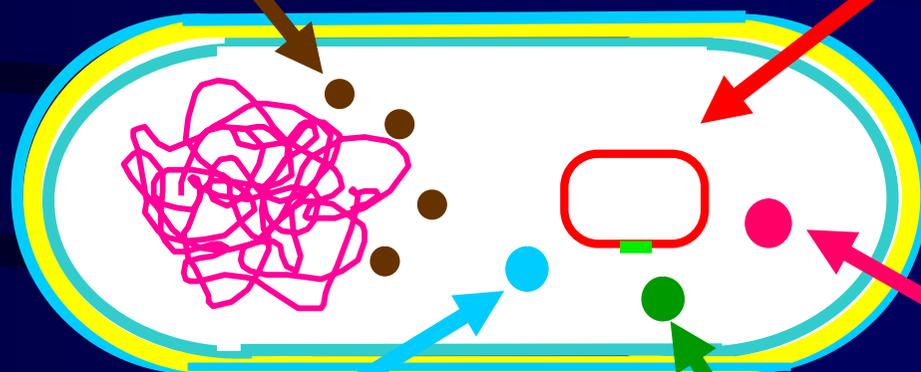
-DNA
pGLO未導入実験

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

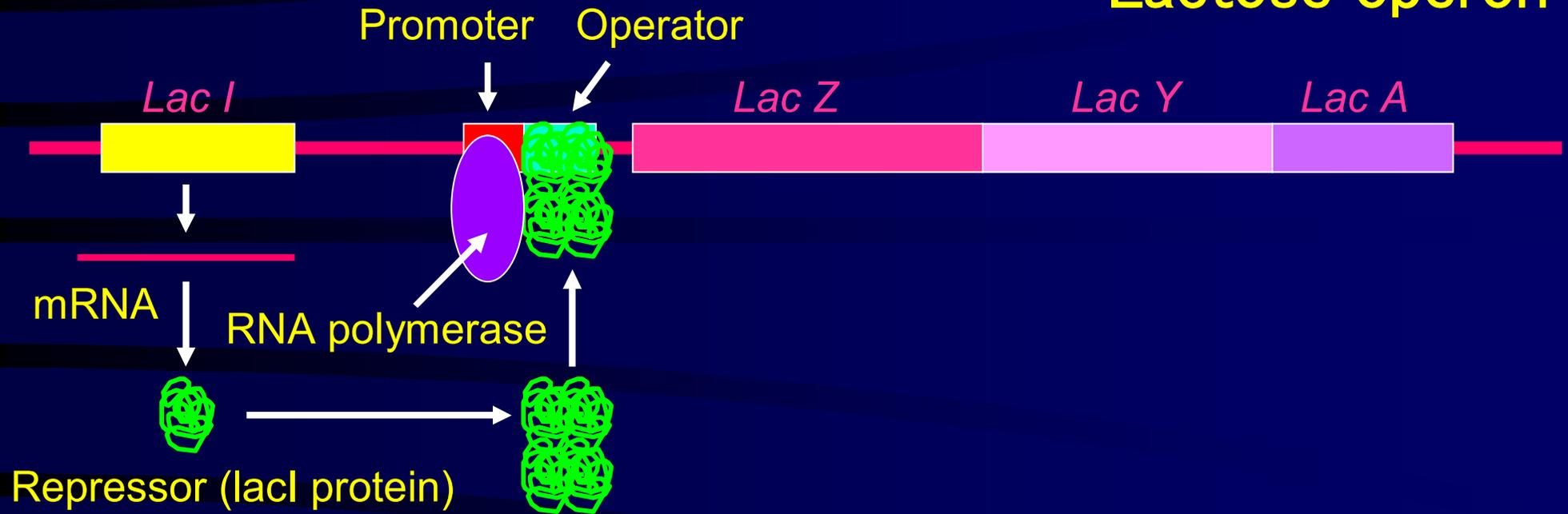


araCタンパク質

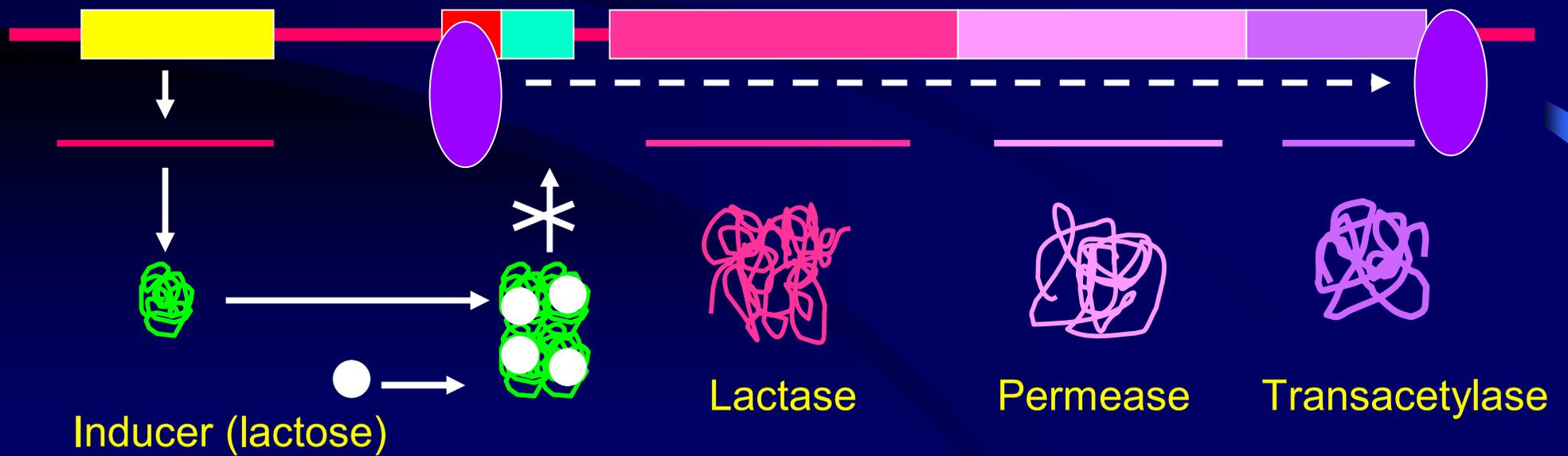
βラクタマーゼ
(アンピシリン分解酵素)

GFPタンパク質

Lactose operon



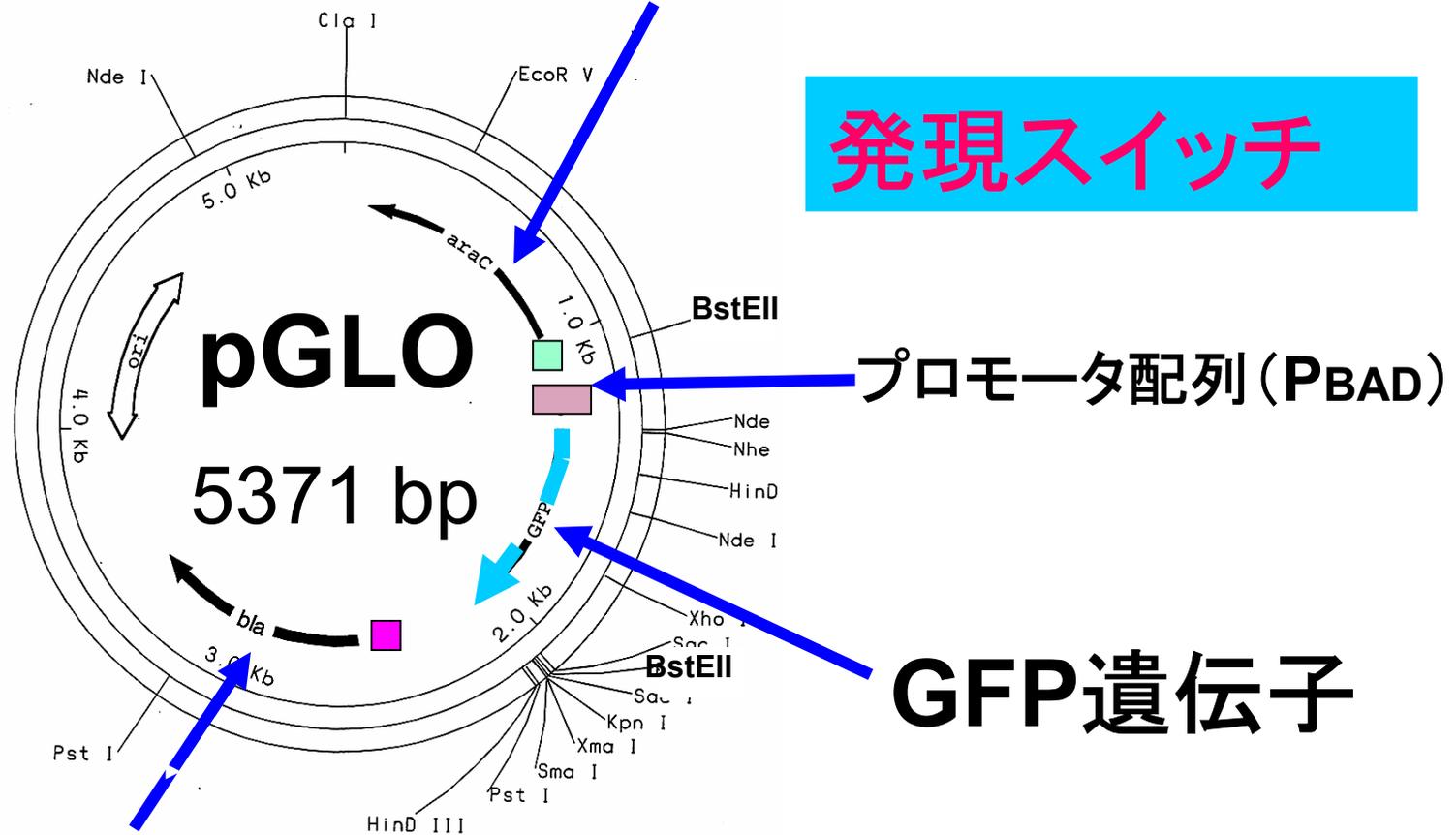
Polycistron



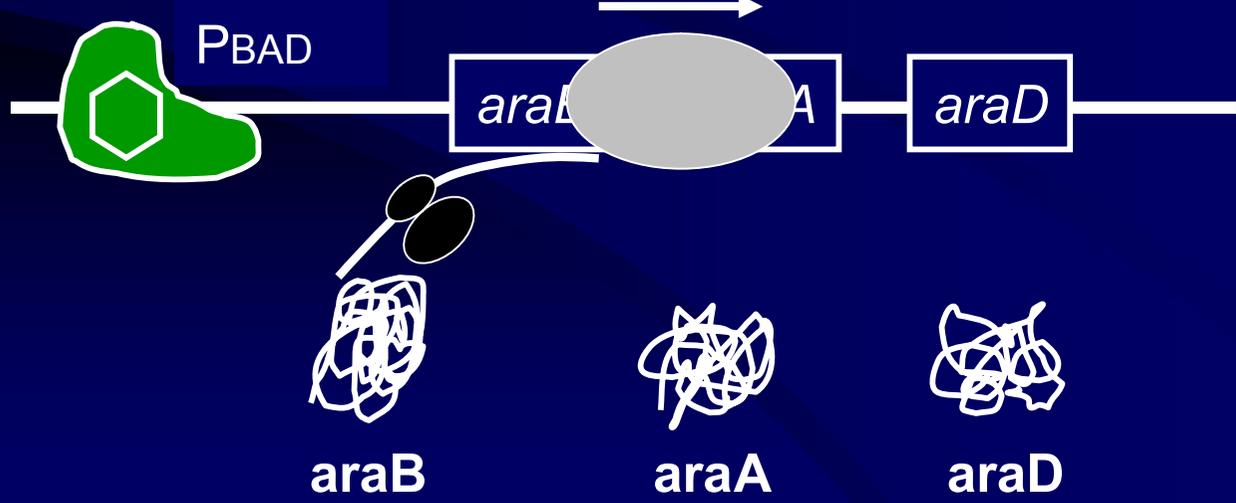
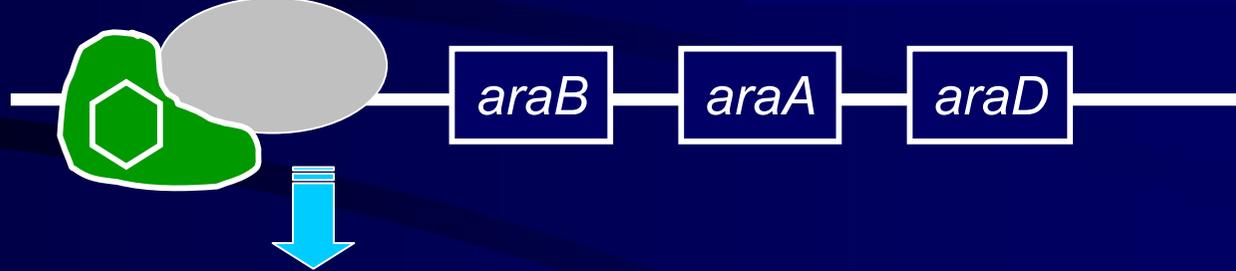
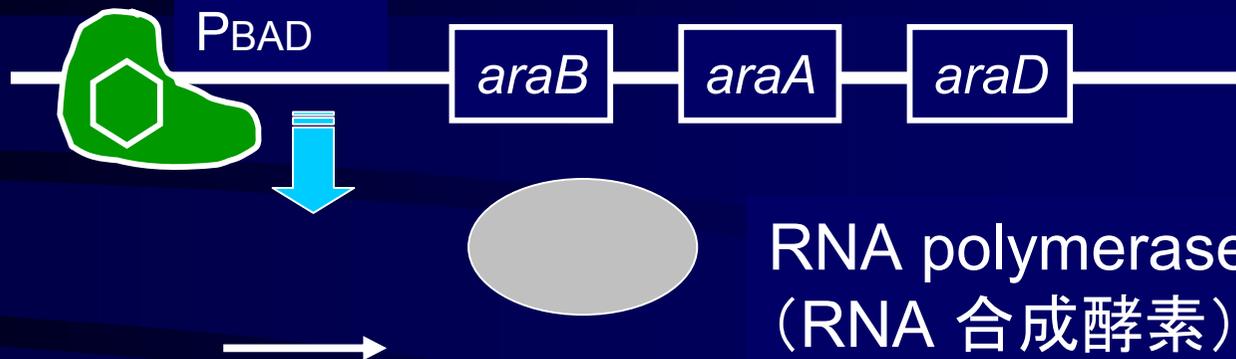
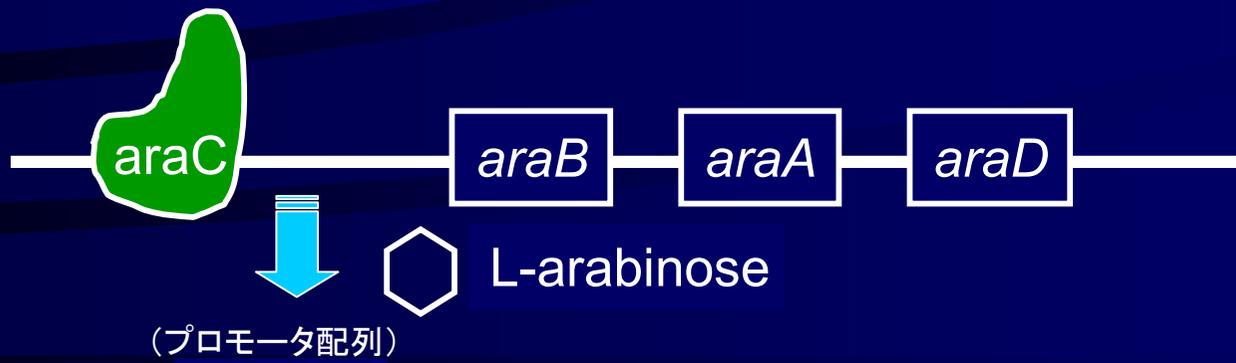
プラスミドDNA pGLOの構造

調節タンパク質遺伝子(araC)

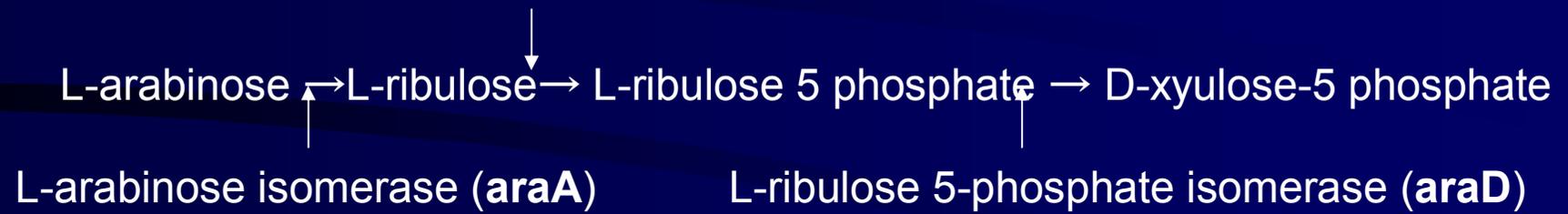
発現スイッチ

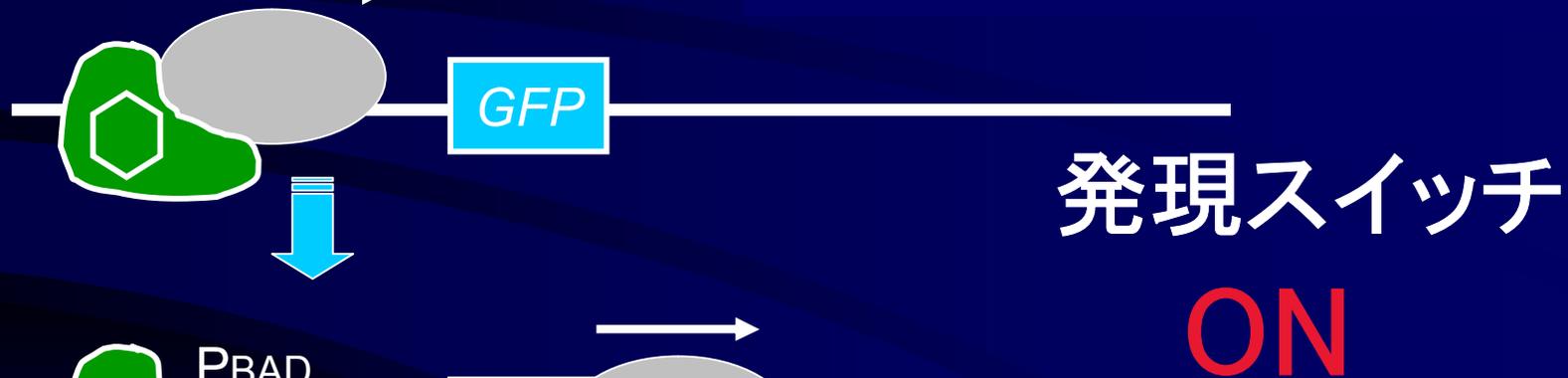
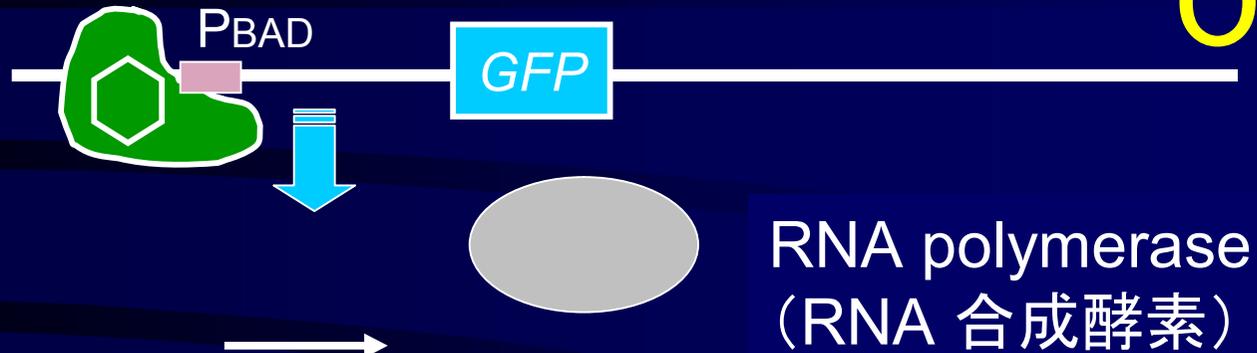
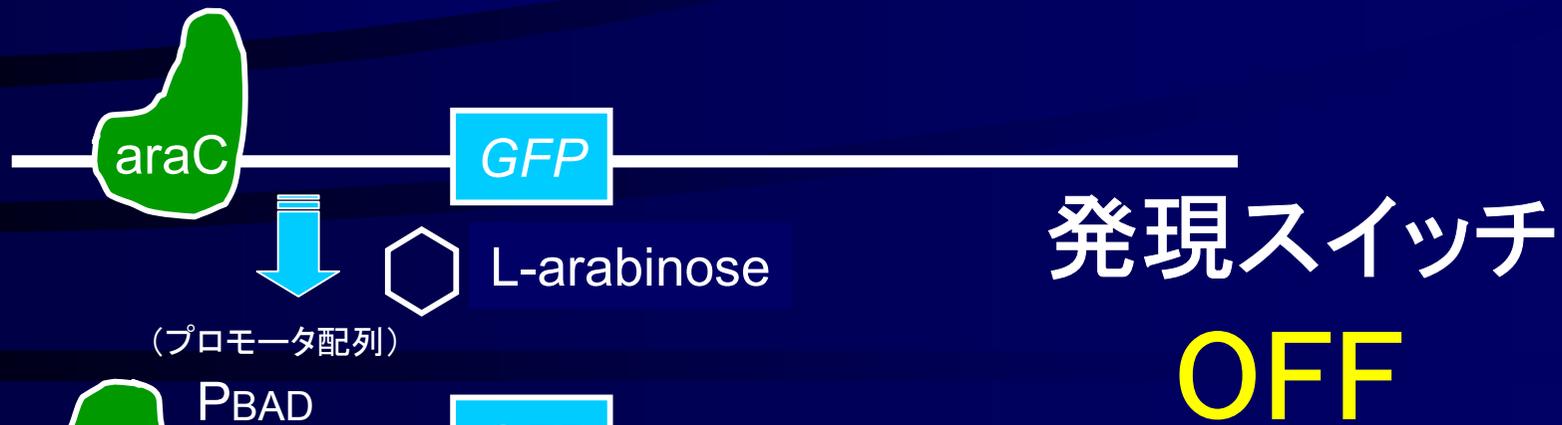


アンピシリン耐性遺伝子
(β ラクタマーゼ (beta lactamase) の遺伝子)



L-ribulose kinase (**araB**)





GFP

GFPタンパク質の発現