

実験1 DNAと形質発現

生物材料

大腸菌 (*Escherichia coli*)

実験手順 (1日目)

A 大腸菌形質転換体の生育

試験管には、番号以外に班名を記入

	試験管 1	試験管 2	試験管 3	試験管 4
LB培地	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
テトラサイクリン	0 μ L	20 μ L	0 μ L	20 μ L
大腸菌 1	30 μ L	30 μ L	0 μ L	0 μ L
大腸菌 2	0 μ L	0 μ L	30 μ L	30 μ L

↓
攪拌した後、37°C恒温槽で振とう培養

↓
約 2-3 時間後、培養液の濁度を測定する

B PCR法によるテトラサイクリン耐性遺伝子領域の増幅

◇ 1.5%アガロースゲルの作製（1班でゲルを1枚作製）

メスシリンダーでTAE緩衝液を 20 mL 計りとり、三角フラスコに入れる。

終濃度1.5%(w/v)になるようにアガロースを計り取り、三角フラスコに入れる。



ラップでフラスコの口を軽く覆い、電子レンジで加熱する（沸騰したらすぐ止めること）

目安(フラスコ2本分)

あたため or 700 W モード 30秒×2回



フラスコを取り出し、時々攪拌してアガロースを完全にとかす（熱いのでシリコンミトンを使用）



素手で触れられる程度(約 50 °C) に冷えたら、アガロース溶液をゲルトレイに流し込む。



30分以上待ち、ゲル状に固まったら、静かにコームを抜く。ゲルの入ったトレイを取り出し、ラップで包む。



ラップに班名を記載したのち、教卓上のタッパーの中へ入れる。（一週間保存、次回に使用）

◇大腸菌液の希釈（20倍希釈）

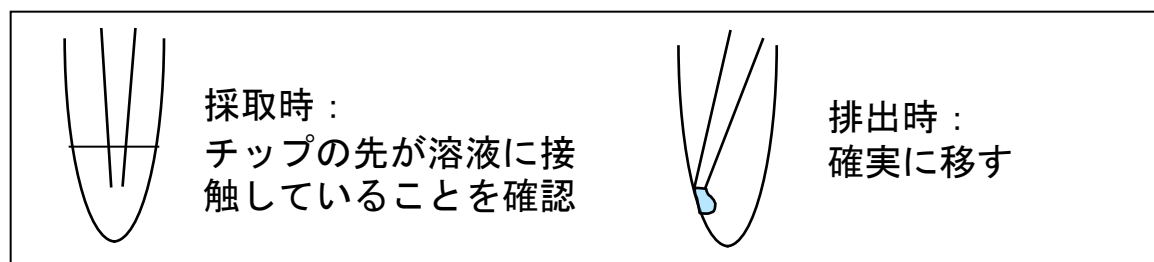
滅菌蒸留水 95 μL と培養液 5 μL を混合する

◇ PCR反応溶液の作製

ウルトラマイクロチューブに以下の液を入れる
(必ず一人につき一本の反応液を調製すること)

大腸菌 1 (or 2) の希釈液	8 μL
“反” のチューブ	8 μL
“コ” のチューブ	8 μL

計 24 μL



キャップを閉じ、指先で軽くはじいて溶液を混ぜた後、
チューブを軽く振り、溶液を底に集める



教卓の上のチューブラックに、
チューブ配置表に従ってチューブを置く

◇ PCR（反応は教員が開始する）

95°C 2分

95°C 50秒

65°C 90秒



この間を

30サイクル



教員が回収、2日目の電気泳動に使用

実験手順（2日目）

PCRチューブに、ゲル電気泳動用色素“**ゲ**”を
5 μ L 入れる

↓
混合後、チューブを軽く振り、溶液を底に集める

↓
電気泳動

◇ 電気泳動

ゲルをTAE緩衝液で満たした泳動槽にセット
(1台の泳動槽に1枚のゲルを置き泳動する)

↓
ゲルの左レーンから、教員またはTAが

- ・ DNA サイズマーカー (レーン1)
- ・ ポジティブコントロール1, 2 (レーン2, 3)

を8 μ Lロードした後、各人のサンプルを8 μ Lロード

↓
陽極、陰極に注意して電源につなぎ泳動開始

↓
濃青色素がゲルの2/3を越えたら、泳動を止める

↓
ゲルを取り出し、染色液 (DNA結合性の発癌物質。触らないこと！！)につけて、30分程度まつ

↓
FASで写真撮影

(写真は1人1枚プリントアウト。余白をはさみで切り取り、ゲル部分をレポートに貼る)

C リアルタイムPCR法によるDNA増幅の観察

プラスミドDNAの配列(一部)

```
10      20      30      40      50      60      70      80      90
*      *      *      *      *      *      *      *      *
5'-GTCCATTCCGACAGCATCGCCAGTCACTATGGCGTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCTGTGGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTG
3'-.....

100     110     120     130     140     150     160     170     180
*      *      *      *      *      *      *      *      *
GCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGTC
.....

190     200     210     220     230     240     250     260     270
*      *      *      *      *      *      *      *      *
ATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGCG
.....

280     290     300     310     320     330     340
*      *      *      *      *      *      *
GCGGCGGTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTGCATAAAGGGAGAGC-3'
.....-5'
```

プライマー1: 5' - **GCGCCTATATCGCCGACAT** - 3'

プライマー2: 5' - **ATGTCGGCGATATAGGCGC** - 3'

プライマー3: 5' - **TCATGAGCGCTTGTTCGG** - 3'

プライマー4: 5' - **CCGAAACAAGCGCTCATGA** - 3'

4つのプライマーから増幅可能と思われる2つを各班で選択
1班で反応液を1つ調製する。

反応液の調整(ウルトラマイクロチューブで調製)

- ・野生株のプラスミドDNAと酵素が入った反応液 10 μ L
(はじめから入っている)

- ・選んだプライマー 5 μ L

- ・選んだプライマー 5 μ L

- ・よく混ぜた後、教卓にあるウルトラマイクロチューブ
立ての班ごとに指定された位置に置く。

- ・DNAが増幅する様子を観察する。

レポート内容

目的

材料と方法

- 材料の生物名は和名、学名両方記載
- 方法は実際に当日おこなった操作に従って書くこと
(教科書からの変更点がある)

結果

A 大腸菌の生育

- テトラサイクリン耐性株と感受性株の特定
(特定の理由も必ず書くこと)

B PCR法によるテトラサイクリン耐性遺伝子領域の増幅

- 電気泳動写真 (のり付け、各レーンの説明、マーカーのバンドの大きさを入れる)
- PCR 増幅断片の長さ
- 欠失変異を持つ大腸菌の特定
(特定の理由も必ず書くこと)
- 欠失変異の大きさの見積もり

C リアルタイムPCR法によるDNA増幅の観察

- 選んだプライマーの種類と選択理由および増幅結果

考察

- 欠失変異に用いた制限酵素の推定
- 2つの大腸菌の表現型と遺伝型(欠失変異)との関係
- 教科書の課題3
(○リアルタイムPCR法で増幅が見られなかった理由)