

# 生物実験：「遺伝子組換え実験」

実験日： 月 日 ( )  
実験開始時刻： 時 分

年 組 番 氏名： \_\_\_\_\_

共同実験者 ( \_\_\_\_\_ )

## 1 目的

遺伝子組換え・遺伝子発現の仕組みを，実験を通して理解・確認する。

## 2 重要確認項目

オペロン説，遺伝子発現， $\beta$ ガラクトシダーゼ，制限酵素，DNAリガーゼ，プラスミド，アンピシリン

## 3 実験の概要

遺伝子組換え生物は，遺伝子を導入して作りだした新しい形質をもつ生物である。したがって，実験室の外へ拡散させないように，その取り扱いには十分注意を払わなければならない。

本実験では病原性のない極めて安全性の高い大腸菌と，大腸菌にのみ入るプラスミドをベクターとして用いる。

遺伝子組換えが起こったことを確認するために，アンピシリン耐性の遺伝子 ( $amp^r$ ) をもつプラスミドを用いる。大腸菌は，アンピシリンという抗生物質を含む培地では生育できない。しかし， $amp^r$  をもつプラスミドを取り込むと，アンピシリンを含む培地で増殖できる大腸菌に形質転換する。

本実験では次の2種類のプラスミドを用いる。

- ・  $amp^r$  と GFP の遺伝子をもつプラスミド
- ・  $amp^r$  と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $lacZ$ ) の遺伝子をもつプラスミド

GFP と  $lacZ$  の各遺伝子は，ラクトースオペロンのプロモーターとオペレーターをもつ。

## 【MEMO】

#### 4 準備

大腸菌, プラスミド (2種類混ざったもの), 形質転換液, SOC 培地<sub>※1</sub>, LB 寒天培地 (amp<sup>-</sup>・+), X-gal<sub>※2</sub>, IPTG<sub>※3</sub>, マイクロチューブ, ループ (白金耳), ピペット, コンラージ棒  
(以上は, 市販の「遺伝子組換え実験キット」で準備する)

恒温槽, 恒温器, タイマー

※1 SOC 培地: グルコースなどを含んでおり, ヒートショックによるダメージを回復させ, 形質転換効率を上げる。

※2 X-gal :  $\beta$  ガラクトシダーゼによって分解されると青色に発色する物質

※3 IPTG : ラクトースオペロンで調節される遺伝子の発現を誘導する物質

#### 5 方法

**本実験では, すべての操作を素早く行う。**

<大腸菌を扱う際には, ガスバーナーの近くで操作をする。>

- (1) マイクロチューブ 2本 (白・ピンク, 形質転換溶液 250  $\mu$ L 入り) を氷上におく。
- (2) 大腸菌を培養した寒天培地から, ループを用いて大腸菌のコロニーを一つかきとり, マイクロチューブに加える。両方のマイクロチューブに加えたら, 大腸菌が細かく分散するよう, 溶液とよく混合する。
- (3) 2本のマイクロチューブをチューブラックにさして, 氷上に5分間静置する。
- (4) ピンクのマイクロチューブに, プラスミド溶液 (別の小チューブに入っている) 50  $\mu$ L を加え, よく混合する。
- (5) 氷上に10分間静置する。
- (6) 2本のマイクロチューブを 42°C の恒温槽に1分間浸した後, すばやく氷上に戻し, 2分間静置する (ヒートショック)。
- (7) 2本のマイクロチューブに SOC 培地を, 260  $\mu$ L ずつ入れて混合する。  
ピペットの先端が大腸菌溶液につかないよう, 注意する。
- (8) 37°C の恒温器 (インキュベーター) で10分間静置する。
- (9) アンピシリンを加えた LB 寒天培地 (LB/amp プレート) に X-gal 溶液 65  $\mu$ L と IPTG 溶液 65  $\mu$ L を加え, コンラージ棒を使用して培地全体に広げる。  
※この操作は(8)でチューブを10分間静置している間に行う。
- (10) マイクロチューブ内の大腸菌混合液を, 130  $\mu$ L ずつ下表のように寒天培地に植菌する。  
※植菌は別々のピペットを用いて行う。  
※大腸菌が沈んでいるので, 何回かピペットで出し入れして, よく混ぜてから使う。  
※あらかじめ培地の種類と大腸菌を容器に書いておく。

白チューブ: 組換えなし		ピンクチューブ: 組換えあり	
LB プレート	1 枚	LB/amp プレート	1 枚
LB/amp プレート	1 枚	LB/amp・X-gal・IPTG プレート	1 枚

- (11) それぞれ別々のコンラージ棒を使用して, 培地全体に大腸菌混合液を広げる。
- (12) 寒天培地にふたをして逆さまにし, 37°C の恒温器で 18~24 時間静置する。  
<翌日>
- (13) 4枚の寒天培地について, コロニーの数, コロニーの色, 紫外線を当てたときのコロニーを観察して, 結果をまとめる。

【次のことを、実験前に確認・理解しておく】

- 1 形質転換溶液にはどのような物質が含まれているか。その物質はどのようなはたらきをするか。

( )

- 2 方法(3)において氷上で5分間静置するのはなぜか。

( )

- 3 方法(5)の10分間で、何が起きているか。

( )

- 4 方法(6)ヒートショックでは何がおこるか。

( )

- 5 方法(8)の10分間では何がおこるか。

( )

- 6 方法(12)で培地を逆さまにして静置するのはなぜか。

( )

- 7 大腸菌を扱う際、ガスバーナーの近くで操作するのはなぜか。

( )





<自己評価シート>該当する番号を○で囲み、回答欄にも数字を記入する。

- 1 実験の手順を事前に把握することができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 2 実験の各操作の意味を理解することができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 3 実験の各操作の意味に注意して、実際に実験することができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 4 実験の操作は手早く行うことができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 5 遺伝子の組換えと発現の仕組みから、事前に結果を予想することができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 6 予想通りの結果を得ることができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 7 青色コロニーの形成の仕組みを理解することができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 8 蛍光を発するコロニーの形成の仕組みを理解することができたか。  
① できた      ② まあできた      ③ あまりできなかった      ④ できなかった
- 9 今回の実験を通して、遺伝子組換えの実験や技術に関心をもったか。  
① とてももった      ② 少しもった      ③ あまりもてなかった      ④ もてなかった
- 10 今回のような培養実験に、また取り組んでみたいと思うか。  
① とても取り組んでみたい      ② まあ取り組んでみたい      ③ あまり取り組みたくない  
④ 取り組みたくない

回答欄

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10