

バイオ実験キット

Dr.ジーン 4 大腸菌形質転換キット ピッカジーン®

取扱説明書

I. 本キットについて	2
II. 「遺伝子組換え生物等規制法」について	3
III. 遺伝子組換え実験を行なうにあたって	5
IV. キット内容の確認	5
V. 実験準備	6
VI. プロトコル(実験操作)	7
VII. トラブルシューティング	13
VIII. 参考文献	14
IX. 使用上の注意	14



ホタルの酵素(ルシフェラーゼ)による発光

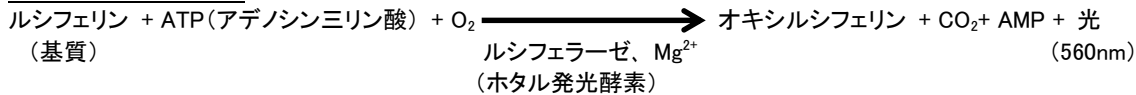
I. 本キットについて

【生命を作るタンパク質・遺伝子を理解するために】

誰もがあらゆる情報媒体から“遺伝子”や“細胞”という言葉を目にするようになり、タンパク質・遺伝子・細胞を中心とするライフサイエンスの基礎は、文系、理系を問わず、避けては通れない学問分野になっています。

人間・動物・昆虫・植物等の全ての生物は、遺伝情報を DNA という形で保存しています。生体における代謝活動では、これらの情報が読み取られてタンパク質が合成され、活用されます。Dr.ジーン 3～5 は、身近な生物発光(ホタルの発光(※1))を利用して、このような生命情報の流れの基本であるセントラルドグマ(※2)を理解するための教材として、高等学校、大学一般教養向けに製作されました。

※1 ホタルの発光反応



※2 セントラルドグマ

1958年にフランス・クリックが提唱した分子生物学の一般原理。DNA塩基配列による情報をRNAに転写し、そのRNAからタンパク質が合成される流れのことで、生体内では、その逆は起こらないとされている。ただし、RNAウイルス(レトロウイルス等)のように、RNAを遺伝情報とし、そのRNAからDNAを作り出す例外も存在する。

【Dr.ジーン4について】

Dr.ジーン4は、大腸菌の形質転換を利用して、DNAはどのような生体においても機能することを理解するための実験キットです。測定機器を使用せずに、ホタルルシフェラーゼを利用して酵素反応を視覚で確認します。ホタルの発光反応は、前述の通り、基質であるルシフェリンがATP、O₂、Mg²⁺の存在下で、ルシフェラーゼの関与によって、オキシルシフェリンへと酸化される際に放出されるエネルギーが光として現れる現象です。

DNAは、様々な細胞においてその機能が発揮されるため、動物のDNAであっても、微生物・昆虫・植物の細胞で機能します。本キットでは、大腸菌にホタル発光酵素「ルシフェラーゼ」のDNAを導入して形質転換させ、ルシフェラーゼの発光を大腸菌で確認することにより、異種生物のDNAであっても機能することを確認します。

II. 「遺伝子組換え生物等規制法」について

【遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律】

以下、「遺伝子組換え生物等規制法」について。

組換え DNA 実験では本来自然界に存在しない組み合わせの DNA を容易に作り出すことが可能です。したがって、その有用性と共に自然界に対する予測できない危険性を含んでいることを十分理解しておく必要があります。組換え DNA 実験を行う際に、安全にそして有効に実験を行うために、平成 16 年 2 月 19 日から「遺伝子組換え生物等規制法」が施行されています。日本国内で DNA 組換え実験を行うすべての研究者は、この法律に従って実験を計画し行わなくてはなりません。本キットを使って実験を行う前にも、この法律に目を通して内容を理解し、学生にもその趣旨と内容を理解させてください。特に「遺伝子組換え生物等規制法」についての解説資料には、高校などでの実習のため「教育目的組換え DNA 実験の取り扱い」が記載されていますのでよく目を通しておいてください。

<文部科学省ホームページ>

http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/index.htm

<物理的封じ込めと生物的封じ込め>

組換え DNA 実験においては、組換え体を施設、設備内に封じ込めることにより、外界への拡散を防止する目的の物理的封じ込めと、特殊な培養環境以外では生存できない宿主と他の生物への伝播性のないベクターDNA の組み合わせによって組換え体の拡散防止と実験の安全性を図る生物学的封じ込めというものがあります。扱う材料によって生物学的封じ込めには B1、B2 などがあり、その安全性を総合的に判断して物理的封じ込めのレベルが P1 から P4 まで定められています。教育目的に使われる宿主及びベクター、供与 DNA には特に安全性の高いと認定されているものだけが認められています。Dr.ジーンシリーズで使われている材料はすべてこの教育目的組換え実験で示されている条件に適合しています。

「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」の解説資料(平成 16 年3月8日版)中の「教育目的組換えDNA実験の取扱い」について記載します。

9 教育目的組換えDNA実験の取扱い

(1) 法及び法に基づく省令等における教育目的実験の取扱い

①法及び法に基づく省令等における教育目的実験の位置付け

教育目的実験は、遺伝子組換え技術に関する基礎的な理解、関心向上等を目的とするものであり、その重要性にかんがみ、指針第8章において、実験に用いる生物や細胞を限定し、その安全な実施の確保を図ってきたところである。指針の枠組みで行われてきた教育目的実験は、法においては第二種使用等に該当し、その実施について特別の規定が設けられていないが、指針別表7に定められた組合せである遺伝子組換え生物等又はこれと同等に安全管理の容易なものをを用いる等安全上の観点から十分に配慮された実験として行うことが望ましいことから、各機関においてこの点についての検討をお願いする。

<指針別表第7>

・教育目的組換えDNA実験に用いることができる宿主-ベクター系及び供与DNA

1 宿主ベクター系B1、B2レベルの認定宿主ベクター系

2 供与DNA

(1) 以下の蛋白質をコードする遺伝子

amylase, cellulase, galactosidase, glucosidase, green fluorescent protein, luciferase, phosphatase

(2) 以下の抗生物質の耐性をコードする遺伝子

ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, tetracycline

②執るべき拡散防止措置の内容

指針別表7に定められた組合せである遺伝子組換え生物等を用いる場合には、二種省令第4条第1号及び第5条第1号の規定により、同省令別表第2第1号に掲げるP1レベルの拡散防止措置を執ることが義務付けられる。同措置の内容と指針別表資料4に定められた実験実施規定の内容には異なる部分があるので、十分な留意が必要。

(2) 基本的事項における教育目的実験の取扱い

基本的事項第2に、遺伝子組換え生物等の使用等をする者がその行為を適正に行うために配慮しなければならない基本的事項が規定されており、教育目的実験を実施する機関においても、配慮することが重要と考えられ、以下に掲げる事項について十分に留意の上、実験を実施されるようお願いする。

①体制の整備

基本的事項第2の2において、第二種使用等をしようとする者は、遺伝子組換え生物等の特性及び使用等の態様に応じ、その安全な取扱いについて検討する安全委員会等を設置し、第二種使用等を行うに当たり、あらかじめ遺伝子組換え生物等の安全な取扱いについての検討を行うとともに、遺伝子組換え生物等の取扱いについて経験を有する者の配置、遺伝子組換え生物等の取扱いに関する教育訓練、事故時における連絡体制の整備を行うよう努める旨が規定されている。教育目的の実験は、安全管理が容易なものであることにかんがみ、安全委員会等の設置及び事故時における連絡体制の整備は求められるものではない。

②記録保管

基本的事項第2の4に関し、教育目的の実験の実施機関においては、安全委員会等における検討結果等についての記録、保管は求められるものではない。

(3) その他の留意事項

教育目的の実験を実施する機関においては、法に基づく拡散防止措置を執る義務的確な実施等を確保しつつ、教育目的の実験の円滑な実施に向けて、各機関の長を中心に関係者の連携が図られるよう十分な留意をお願いする。

=参考資料=

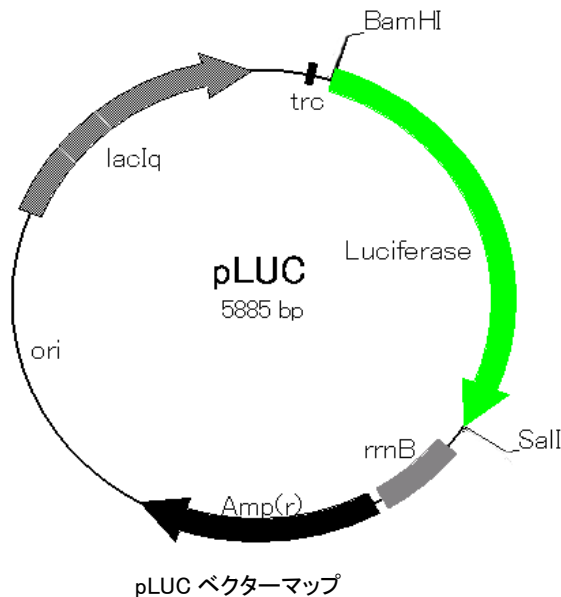
研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第1号)別表第二(第四条第一号関係)

拡散防止措置の区分	拡散防止措置の内容
<p>ー P1レベル</p>	<p>イ 施設等について、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。</p> <p>ロ 遺伝子組換え実験の実施に当たり、次に掲げる事項を遵守すること。</p> <p>(1) 遺伝子組換え生物等を含む廃棄物(廃液を含む。以下同じ。)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。</p> <p>(2) 遺伝子組換え生物等が付着した機器及び器具については、廃棄又は設備、再使用(あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。以下「廃棄等」という。)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。</p> <p>(3) 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。</p> <p>(4) 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を除く。)</p> <p>(5) 実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等必要な措置を講ずること。</p> <p>(6) 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。</p> <p>(7) 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その他の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が漏出その他拡散しない構造の容器に入れること。</p> <p>(8) 遺伝子組換え生物等を取り扱う者に当該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い後における手洗い等必要な措置を講ずること。</p> <p>(9) 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。</p>

Ⅲ. 遺伝子組換え実験を行うにあたって

教育目的で使われる宿主及びベクター、供与 DNA は、特に安全性が高いと認定されているものだけが使用を認められています。Dr.ジーンシリーズで使用する材料は、全て、この教育目的組換え実験で示されている条件に適合しています。また、遺伝子組換え生物等を用いる場合には、P1レベルの拡散防止措置を執ることが義務付けられています。実験環境が適合しているかどうか、十分に確認した上で実験を行って下さい。

- 宿主：大腸菌 (JM109)
- ベクター：pLUC
 - 由来：pTrc99A
 - 遺伝子：ルシフェラーゼ
[北米産ホタル (*Photinus pyralis*) 由来]
 - 耐性遺伝子：アンピシリン耐性遺伝子
(β -ラクタマーゼ)



Ⅳ. キット内容の確認

- ☞必ず「使用上の注意(22 ページ)」を読んでから作業を開始して下さい。
- ☞常温品に含まれている LB プレートは、到着後、4℃にて冷蔵保管して下さい。

保存温度	NO	品名	容量	数量
冷凍	1	ホタル遺伝子 (青色チューブ)	5 μ l	12 本
	2	カルシウム溶液 (半透明チューブ)	100 μ l	24 本
	3	SOC 培地 (黄色チューブ)	400 μ l	24 本
	4	ルシフェリン溶液 (緑色チューブ)	500 μ l	24 本
	5	大腸菌 (オレンジ蓋)		1 本
	6	アンピシリン溶液(紫色チューブ)	300 μ l	2 本
	7	IPTG 溶液 (赤色チューブ)	300 μ l	2 本
常温	8	LB 粉末培地	100 ml 分	6 袋
	9	6cm プレート		60 枚
	10	掻き取り棒		30 本
	11	コンラージ棒 (5 本入り)		50 本(10 袋)
	12	メンブレン		24 枚
	13	ピンセット		12 個
	14	LB プレート(※到着後、4℃保管)		2 枚

<キット構成品以外に必要なもの>

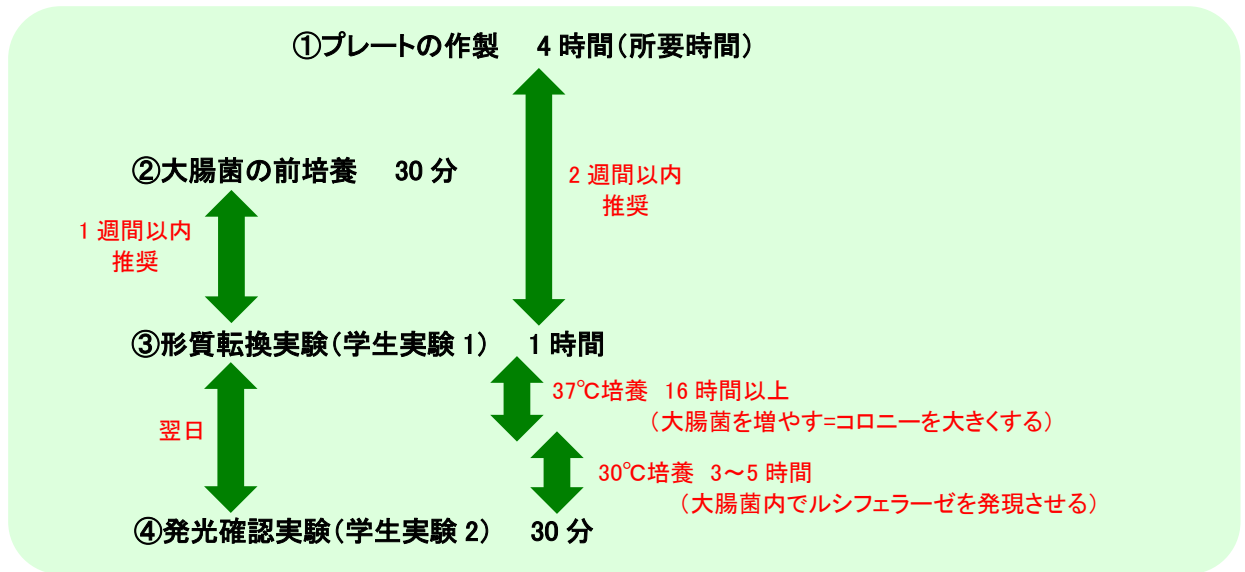
- ・ピペッター&チップ(またはスポイト)
 - 本キットで使用する溶液は、全て使い切りサイズで分注されています。
 - 定量性の高いピペッターが無い場合は、スポイトでも実験が可能です。
- ・三角フラスコ(500ml)
- ・インキュベーター(37℃及び 30℃の温度設定が可能な恒温装置)
- ・恒温槽(42℃および 37℃)…湯煎で代用可
- ・発泡スチロールの箱に入れた氷
- ・廃棄物入れ(プラスチック用、可燃物用)
- ・滅菌ゴミ入れ(大腸菌に触れたものはこの中に廃棄し、最後にオートクレーブ滅菌を行って下さい。)
- ・滅菌用 70%エタノール
- ・オートクレーブ
- ・ティッシュまたはガーゼ
- ・タイマー、油性ペン、アルミホイル、温度計

V. 実験準備

<実験計画>

本キットは、4ステップ(実験準備:2ステップ、学生実験:2ステップ)で構成されています。実験を成功させるためには、各ステップを推奨する期間内に行う必要があります。事前に実験計画を立ててから作業を開始して下さい。

実験計画フローチャート









- ① プレートの作製
形質転換実験で使用する培地プレートを作製します。この作業を一度で行なう場合、60枚のプレートを同時に作成することになります。スペースがない場合や、作業そのものに不慣れな場合は、30枚ずつ2回に分けて作成することをお勧めします。
- ② 大腸菌の前培養
大腸菌をLBプレートに伸ばし、実験で使える状態にします。この作業は、形質転換実験の1週間前以内に行うことをお勧めします。前培養から1週間以上過ぎて形質転換実験を行った場合、大腸菌の活性が低下し、形質転換効率が下がるなど、学生実験に影響を及ぼす可能性があります。
- ③ 形質転換実験(学生実験1)
1)大腸菌の調整、2)大腸菌に遺伝子を取り込ませる(形質転換)、3)大腸菌をLB培地プレートにまく、の3段階で実験を行います。
- ④ 発光確認実験(学生実験2)
大腸菌が生えたプレートの観察と、大腸菌に作らせたルシフェラーゼによる発光反応を確認します。

VI. プロトコル(実験操作)

①プレートの作製 (作業時間=約 4 時間)

保存温度	NO	品名	容量	数量
冷凍	6	アンピシリン溶液(紫色チューブ)	300 μ l	2 本
	7	IPTG 溶液 (赤色チューブ)	300 μ l	2 本
常温	8	LB 粉末培地	100 ml 分	6 袋
	9	6cm プレート		60 枚

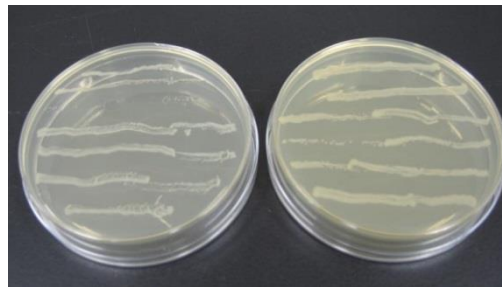
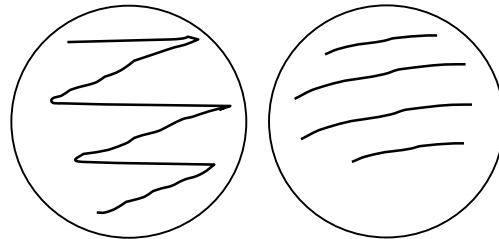
i	培地の調製と滅菌	<ol style="list-style-type: none"> 500ml の三角フラスコに蒸留水 300ml を入れ、「LB 粉末培地」3 袋分を加えます。 ☞ 蒸留水または超純水を推奨しますが、水道水でも可能です。 アルミ箔で三角フラスコに蓋をして、円を描くように振り、粉末を溶かします。 1~2 の作業を繰り返してもう 1 本作製し、培地を 2 本用意します。 オートクレーブで滅菌します (121℃、20 分間) 加熱終了後、温度・圧力が十分に下がっていることを確認し、フラスコを取り出します。 フラスコを軽く回して沈殿物を溶かし、培地成分を均一にします。 	  
ii	アンピシリン、IPTG の添加	<ol style="list-style-type: none"> フラスコ越しに、培地の温度が手で触れる程度 (60℃くらい) まで冷めていることを確認します。 「アンピシリン溶液」300 μl (1 本分全量) を加え、軽く回して攪拌します。 ☞ 培地が高温のままアンピシリン溶液を入れると失活してしまうため、必ず冷ましてから加えて下さい。 「IPTG 溶液」300 μl (1 本分全量) を加え、軽く回して攪拌します。 7~9 の作業を繰り返し、2 つ分作製します。 	
iii	プレート作製	<ol style="list-style-type: none"> 「6cm プレート」に培地を注ぎ込み、プレート全体に広げます。 ☞ プレート 1 枚あたり、約 10ml 必要です。フラスコ 1 本分から 25~30 枚のプレートを作製できます。 ☞ 本実験での最低必要枚数は 48 枚です。足りなくならないよう、注意して下さい。 ☞ フラスコ内で培地が固まらないよう、素早く分注作業を行って下さい。 水平な台の上で、培地が固まるまで静置します。 培地が固まったら蓋をし、逆さの状態 (蓋が下) にして袋に入れ、4℃で冷蔵保存します。 ☞ 培地が固まったプレートは、大腸菌をまく時を除き、常に逆さの状態ですべて置いて下さい。 	  

②大腸菌の前培養（作業時間＝約 30 分）

☞実験日の朝に、キット内に含まれている LB プレート(2 枚)を 37℃インキュベーターに移し、プレートに温めておいて下さい。冷蔵保存したプレートをそのまま使用すると、培地上に水分が残り、大腸菌をまきにくくなります。

保存温度	NO	品名	容量	数量
冷凍	5	大腸菌（オレンジ蓋）		1 本
冷蔵	14	LB プレート		2 枚

i	プレートの準備	<p>1. 冷蔵保存していた LB プレート(キット内に含まれているもの)2 枚を 37℃インキュベーターで温めます。</p> <p>☞プレート内側の水分が無くなったことを確認してから、次の手順に進んで下さい。</p>
ii	大腸菌をまく	<p>2. 大腸菌を氷上に移し、ゆっくりと溶かします。</p> <p>☞チューブを指でつかむなど、急激に熱を加えることは避けて下さい。</p> <p>3. 掻き取り棒の先端を大腸菌溶液に付けます。</p> <p>☞大腸菌が垂れないよう注意して下さい。</p> <p>4. 大腸菌が付着した掻き取り棒で、培地の表面に『Z』または『-』を繰り返し書きます。これをプレート 2 枚分、行います。</p> <p>☞プレート 2 枚分とも同じ掻き取り棒を使用して大腸菌を延ばしても構いません。</p> <p>☞使い終わった掻き取り棒には大腸菌が付着しているため、滅菌処理を行ってから廃棄して下さい。</p>
iii	培養・保存	<p>5. 大腸菌を延ばしたプレートを 37℃インキュベーターに移し、24 時間培養します。</p> <p>6. 翌日、大腸菌が増殖していることを確認してから、プレートを 4℃で冷蔵保存します。</p>



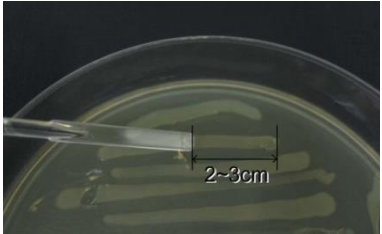




③形質転換実験（作業時間＝約1時間）

- ☞実験日の朝に、作製済みの培地プレート（作製したもの）を37℃インキュベーターに移し、プレートを温めておいて下さい。冷蔵保存したプレートそのまま使用すると、培地上に水分が残り、大腸菌をまきにくくなります。
- ☞試薬が全て揃っていることを確認して下さい。試薬は微量のため、チューブの蓋裏等に付着している場合がありますので、使用前に試薬全量がチューブの底に集まっていることを確認して下さい。
- ☞実験者は、全員、石鹸で手を洗って下さい。また、ティッシュやガーゼ等に滅菌用70%エタノールを含ませ、実験台を拭いてから作業を開始して下さい。

保存温度	NO	品名	容量	数量	1班あたり
冷凍	1	ホタル遺伝子（青色チューブ）	5 μl	12本	1本
	2	カルシウム溶液（半透明チューブ）	100 μl	24本	2本
	3	SOC 培地（黄色チューブ）	400 μl	24本	2本
常温	10	掻き取り棒		30本	2本
	11	コンラージ棒（5本入り）		50本（10袋）	4本
		作製済みの培地プレート		60枚	4枚

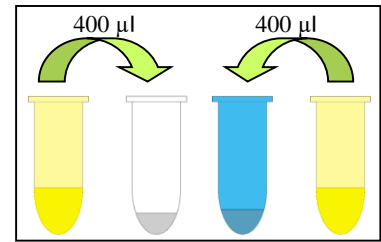
i	準備	<ol style="list-style-type: none"> 1. 冷蔵保存していた培地プレート（作製したもの）を37℃インキュベーターで温めます。 ☞プレート内側の水分が無くなったことを確認してから、次の手順に進んで下さい。 2. 42℃、37℃の恒温槽を準備します。 ☞恒温槽が無い場合は、箱にお湯を入れて42℃に調整します。37℃の恒温槽が無い場合は、インキュベーターで代用して下さい。 3. 発砲スチロールの箱に、細かく砕いたクラッシュアイスを入れます。 ☞氷は製氷機などで作成した粒の細かいものを使用して下さい。氷の粒が大きい場合、チューブとの接触面積が小さくなり、冷却効率が悪くなります。 4. 「ホタル遺伝子」と「カルシウム溶液」のチューブを3.で準備した氷の中に差し込みます。 ☞「SOC 培地」は冷凍で保存されていますが、実験当日に室温で融解し、そのまま使用して下さい。氷上で冷却する必要はありません。
---	----	--




ii	大腸菌-カルシウム溶液の作製	<p>5. 事前に大腸菌を培養した LB プレートから、「掻き取り棒」の平らな部分を用いて、大腸菌を掻き取ります。 ☞幅2～3cm分を掻き取って下さい。</p> <p>6. 「掻き取り棒」に付着した大腸菌をカルシウム溶液に溶かし込みます。 ☞液面よりもやや上の部分に大腸菌を付着させて、徐々に溶解させます。大腸菌を溶液内で一度に溶解させようとする、大腸菌が球状になって浮遊し、溶かしにくくなります。</p> <p>7. ある程度大腸菌が溶解したら、「掻き取り棒」を回転させてチューブ内の溶液を混ぜ、大腸菌が均一になるよう溶かし込みます。</p> <p>8. チューブを氷中に深く差し込み、5 分間静置します。 (これにより、大腸菌をカルシウム溶液になじませます)</p> <p>9. 5～8 の作業を繰り返し、「大腸菌-カルシウム溶液」をもう 1 本作製します(計 2 本)。</p>	  
iii	形質転換	<p>10. 作製した「大腸菌-カルシウム溶液」2 本のうちの 1 本分をホタル遺伝子が入った青色チューブに移します。 ☞移す前に、ホタル遺伝子溶液がチューブの底に集まっていることを確認して下さい。 ☞遺伝子の有無がわかるように、チューブに (+)(-) と記載しておくことをお勧めします。</p> <p>11. チューブを氷中に深く差し込み、5 分間静置します。 (これにより、大腸菌と遺伝子が均等に混ざります。)</p> <p>12. 準備した恒温槽(または湯煎)が 42℃になっていることを確認します。</p> <p>13. 42℃の恒温槽に、大腸菌が入ったチューブを 30 秒間つけ、温めます。 ☞短時間の熱ショックにより、DNA の菌体内への取り込みが促進されることが知られています。ただし、大腸菌が死滅してしまわないよう、時間は厳守して下さい。</p> <p>14. チューブを氷中に深く差し込み、5 分間静置します。</p>	  

15. 準備した恒温槽(またはインキュベーター)が 37°Cになっていることを確認します。
 ☞13.で使用した 42°Cの恒温槽を 37°Cに変更して使用することも可能です。その場合は、14.の水中での冷却時間を長くして下さい。

16. チューブに「SOC 培地」400 μ lを加え、ピペット又はスポイトで溶液を出し入れして、軽く攪拌します。

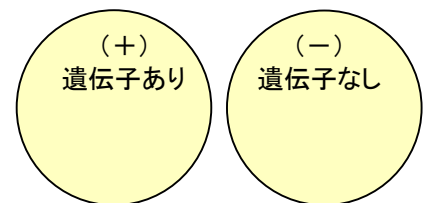


17. 37°Cの恒温槽で 15 分間、温めます(プレ培養)。



18. 大腸菌を温めている間にプレートを用意します。4 枚のプレートに、遺伝子の有無が区別できるように油性ペンで記入しておきます(2 枚ずつ)。また、班が区別できるように班番号等も記入します。

- ☞「遺伝子あり」を(+),「遺伝子なし」を(-)と表記します。
 ☞プレートの蓋側ではなく、底側に記載して下さい。



19. プレ培養が終わった大腸菌を半量(225 μ l)ずつプレートの中央にたらし、「コンラージ棒」を使用してプレート全体に塗り広げます。

- ☞培地を壊さないよう、力を入れずに表面をなでるように塗って下さい。
 ☞コンラージ棒は、プレート 1 枚ごとに新しいものを使用して下さい。



20. プレートを 37°Cのインキュベーターに入れ、一晩培養します。

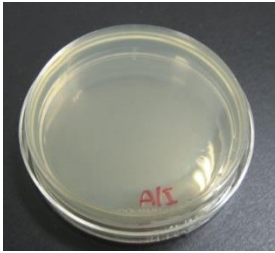
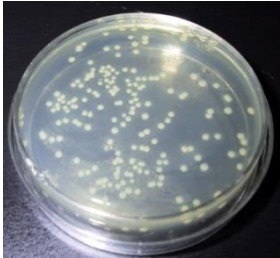
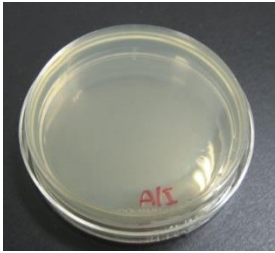
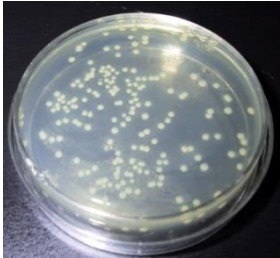
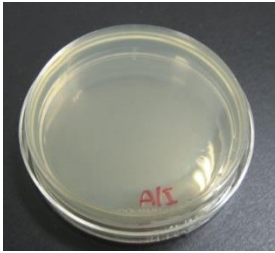
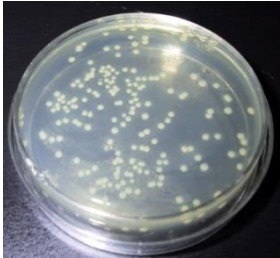
実験後、、、

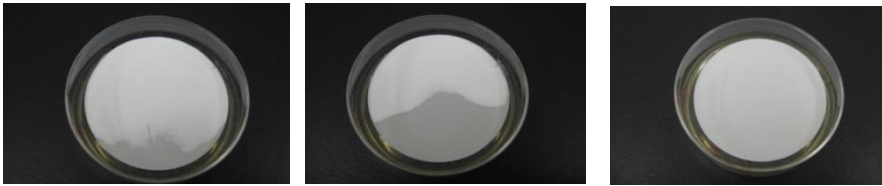
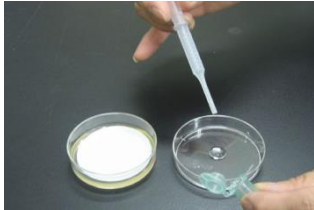


- ☞チューブ、掻き取り棒、コンラージ棒は大腸菌に触れているため、滅菌バックへ入れてオートクレーブで滅菌処理してから廃棄して下さい。
 ☞ティッシュやガーゼなどに滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭いて下さい。
 ☞実験者は、手を洗って下さい。

④発光確認実験（作業時間＝30分）

- ☞形質転換した日の翌朝に、大腸菌の生え具合を確認して下さい。
- ☞試薬が全て揃っていることを確認して下さい。試薬は微量のため、チューブの蓋裏等に付着している場合がありますので、使用前に試薬全量がチューブの底に集まっていることを確認して下さい。
- ☞実験者は、全員、石鹸で手を洗って下さい。また、ティッシュやガーゼ等に滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭いてから作業を開始して下さい。

保存温度	NO	品名	容量	数量	1 班あたり
冷凍	4	ルシフェリン溶液（緑色チューブ）	500 μl	24 本	2 本
常温	12	メンブレン		24 枚	2 枚
	13	ピンセット		12 個	1 個

i	プレートの確認と培養	<p>1. コロニーの大きさが 1mm 以上あることを確認し、インキュベーターの温度を 30℃に下げて、培養を続けます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞コロニーの大きさが 1mm 未満の場合は、しばらく 37℃で培養を続け、1mm 以上になった時点で温度を下げて下さい。 ☞コロニーの大きさが 1mm 未満でも、発光確認実験を行なう 3 時間前までには温度を 30℃に下げて下さい。 									
ii	プレートの観察	<p>2. 培養したプレートを観察します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞アンピシリンを含まないプレートを用意した場合、プレート全体に大腸菌が生えた様子を確認できます。 <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th></th> <th>アンピシリン(抗生物質)を含むプレート</th> <th>アンピシリン(抗生物質)を含まないプレート</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>遺伝子なし (-)</td> <td></td> <td>一面に大腸菌が生える</td> </tr> <tr> <td>遺伝子あり (+)</td> <td></td> <td>一面に大腸菌が生える</td> </tr> </tbody> </table> <p>* 遺伝子なし(-) 抗生物質アンピシリンにより細胞壁合成が阻害されるため、大腸菌は死滅する。</p> <p>* 遺伝子あり(+) プラスミド DNA 内に「βラクタマーゼ」をコードする遺伝子(アンピシリン耐性遺伝子)が含まれている。この遺伝子から作られたβラクタマーゼは、アンピシリンを不活性化させるため、細胞壁合成が阻害されることなく生き残ることができる。</p>		アンピシリン(抗生物質)を含むプレート	アンピシリン(抗生物質)を含まないプレート	遺伝子なし (-)		一面に大腸菌が生える	遺伝子あり (+)		一面に大腸菌が生える
	アンピシリン(抗生物質)を含むプレート	アンピシリン(抗生物質)を含まないプレート									
遺伝子なし (-)		一面に大腸菌が生える									
遺伝子あり (+)		一面に大腸菌が生える									

iii	発光確認	<p>3. ピンセットで「メンブレン」をつかみ、大腸菌が生えている面にメンブレンをのせます。</p> <p>4. プレートの裏側(底の方)から見て、メンブレン全体が湿っているか確認します。浮いているようならば、ピンセットで軽く抑え、メンブレン全体を培地に密着させます。</p> <p><メンブレンが湿っていく様子></p>  <p>5. 開いたプレートの蓋の内側中央に、「ルシフェリン溶液」500 μl を滴下します。</p>  <p>6. メンブレンを剥がし、大腸菌が付着した面を上にして、ルシフェリン溶液にのせます。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞メンブレンを剥がす際、メンブレンに大腸菌が付着していることを確認して下さい。 ☞メンブレンをルシフェリン溶液にのせた後、軽くまわしてルシフェリン溶液がメンブレン全体にしみ込むようにして下さい。  <p>7. 部屋を暗くして、発光反応を確認します。</p> <ul style="list-style-type: none"> ☞ルシフェリンが大腸菌内に染み込むまで1~2分かかる場合があります。 	
-----	------	--	--

実験後、..

- ☞プレート、メンブレン、ピンセットは大腸菌に触れているため、滅菌バックへ入れてオートクレーブで滅菌処理してから廃棄して下さい。
- ☞ティッシュやガーゼなどに滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭いて下さい。
- ☞実験者は、手を洗して下さい。

VII. トラブルシューティング

コロニーが形成されなかった場合、次のような原因が考えられます。

- ・実験開始までの大腸菌の保存状態が良好でなかった場合、溶解後の大腸菌の冷却が不十分だった場合、ピペettingが強すぎた場合、42°Cの加熱において温度が高すぎた場合などは、大腸菌が死滅したり、遺伝子導入効率が低下することがあります。
- ・大腸菌の加熱後に氷上で冷却が不十分だった場合、導入効率が低下することがあります。
- ・大腸菌を播いた際に、十分に塗り広げられていなかった場合、大腸菌が培地に接着しないことがあります。

コロニーの発光が確認できなかった場合、次のような原因が考えられます。

- ・十分に温度が低下していない培地にアンピシリンを加えた場合、アンピシリンの活性が低下し、遺伝子が組み込まれていない、光らない大腸菌もコロニーを形成することがあります。
- ・培養温度が高すぎた場合、大腸菌内で作られた酵素が分解することがあります。
- ・ルシフェリン溶液を長時間室温に放置した場合、または温度をかけた場合、基質の酸化や分解が起こることがあります。
- ・ルシフェリン溶液が室温に戻っていない場合、低温により酵素活性がでないことがあります。
- ・酵素を阻害する物質が混入した場合、酵素活性を確認できないことがあります。
- ・実験までの試薬の保存状態が良好でなかった場合、基質の酸化や分解が起こることがあります。
- ・メンブレンが培地に接していない場合、大腸菌コロニーを十分に採取できないことがあります。
- ・コロニーにルシフェリン溶液が十分に染み込んでいない場合、発光反応が起こりにくくなる場合があります。
- ・実験室内が十分に暗くない、もしくは観察者の目が慣れていない場合、発光を確認しにくい場合があります。
- ・コロニーの大きさが小さかった場合、発光を確認しにくい場合があります。

VIII. 参考文献

1. Alam, J. and Cook, J. L. (1990) "Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription", *Anal. Biochem.* 188, 245-254.
2. S. J. Gould and S. Subramani (1998) "Firefly Luciferase as a Tool in Molecular and Cell Biology". *Anal. Biochem.* 175, 5-13.
3. de Wet, J. R., et al. (1985) "Cloning of Firefly Luciferase cDNA and the Expression of Active Luciferase in *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7870-7873.
4. de Wet, J. R., et al. (1987) "Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells", *Mol. Cell. Biology*, 7, 725-737.
5. Ow, D., et al. (1986) "Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants", *Science* 234, 856-859.
6. Wood, K. V., et al. (1984) "Synthesis of Active Firefly Luciferase by *in vitro* Translation of RNA Obtained from Adult Lanterns", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 124, 592-596.
7. Williams, T. M., et al. (1989) "Advantages of Firefly Luciferase as a Reporter Gene" *Anal. Biochem.* 176, 28-32.
8. Wood, K. V. and Deluca, M. (1987) "Photographic Detection of Luminescence in *Escherichia coli* Containing the Gene for Firefly Luciferase", *Anal. Biochem.* 161, 501-507.
9. Wood, K. V. et al. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 124, 592
10. deWet, J. R. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7870.
11. Wood, K. V. (1991) *In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, eds. P. Stanley and L. Kricka, John Wiley and Sons, Chichester, 11.
12. Matthews, J. C. et al. (1977) *Biochemistry* 16, 85.
13. Lorenz, W. W. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4438.
14. Bothwell, A. L. M. et al. (1981) *Cell* 24, 625.
15. Senapathy, P. et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 183, 252.
16. Caswell, S. et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 4248.
17. Gluzman, Y. (1981) *Cell* 23, 175.
18. Schmidt, E. V. et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 4406.
19. Wagner, E. F. et al. (1985) *EMBO J.* 4, 663.
20. Stewart, C. L. et al. (1987) *EMBO J.* 6, 383.
21. Fart, A. and Roman, A. (1991) *Nucl. Acids Res.* 20, 920.

IX. 使用上の注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読み下さい。
- 本製品を研究用途以外には使用しないで下さい。
- 日本国内のみで使用して下さい。
- 使用期限と保存条件を必ず守って下さい。
- 本製品を火気に近づけないで下さい。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分して下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って準備を行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌して下さい。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合があります。試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄して下さい。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- 手袋、保護メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けて下さい。試薬類が目に入った場合や皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- その他、不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

問い合わせ先

東洋ビーネット株式会社
〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目2番1号
E-mail: b-net.bio@artiencegroup.com
HP: <https://artiencegroup.com>