

## 大腸菌の培養

1 2 2 9 1 0 4 6 王 舒揚

### 要約

培養液の 1mL 中に居る大腸菌の個数を測定するため、実験を行う。培養液の 1mL 中に居る大腸菌の個数を仮定し、簡易無菌操作の準備し方と簡易滅菌操作を学んで、大腸菌培養の実験が始まる。計算結果によって  $50\mu\text{L}$   $\alpha$  希溶液を作り、寒天培地に入れ、培養する。三日後、実験結果を分析し、仮定を検定で再評価する。培養液の 1mL 中に居る大腸菌の個数は仮定の 5 倍ぐらいと評価する。

### 仮定

培養液の 1mL 中に居る大腸菌の個数は  $1 \times 10^7$  個。

### 検定

仮定が正しければ、 $50\mu\text{L}$  の希溶液を寒天培地で培養すると、100 個の大腸菌を培養する、つまり 100 個のコロニーを培養するはずである。

## 実験

### 計算

$$100\text{mL} = 1000\mu\text{L}$$

$$\text{Dim x As 体積量, 必要な培養液の体積量} = x$$

$$1000: 1 \times 10^7 = x: 1 \times 10^2$$

$$x = 0.01$$

$$50\mu\text{L} - 0.01\mu\text{L} = 49.99\mu\text{L}$$

∴

$$\text{必要な培養液の体積量} = 0.01\mu\text{L}$$

$$\text{必要な LB 培地の体積量} = 49.99\mu\text{L}$$

### 簡易無菌操作の準備をする

アルコールで机の上を拭き、ガスバーナーを配置する。

無菌状態を維持する上で、LB 培地を試薬瓶からピペットで  $49.99\mu\text{L}$  程度で、試験管に入れる

無菌状態を維持する上で、培養液をピペットで  $0.01\mu\text{L}$  程度、試験管に入れる

無菌状態を維持する上で、試験管から  $\alpha$  希溶液をピペットで  $50\mu\text{L}$  程度、寒天培地に入れる。

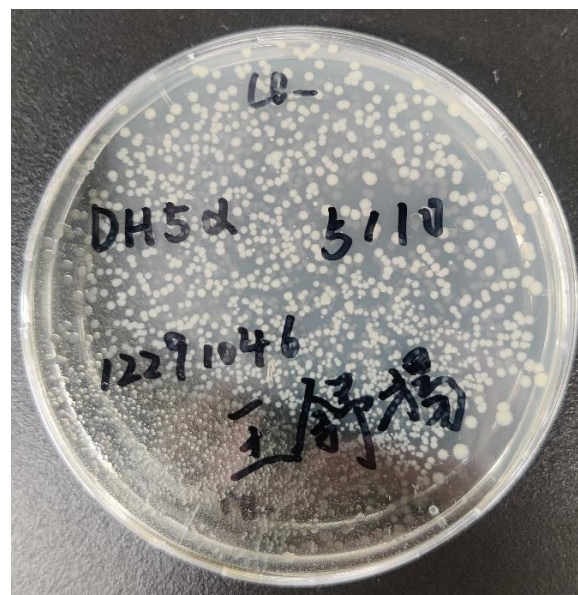
大腸菌の培養が始まる。

## 結果

三日後、実験結果を分析して、培養液の  $1\text{mL}$  中に居る大腸菌の個数は仮定の5倍ぐらいと評価する。

∴

培養液の  $1\text{mL}$  中に居る大腸菌の個数は約  $5 \times 10^7$  個と考える。



## 結論

培養液の 1mL 中に居る大腸菌の個数は約  $5 \times 10^7$  個

## 参考文献

教科書

## ヒートショック法による形質転換

1 2 2 9 1 0 4 6 王 舒揚

### 要約

大腸菌の形質転換効率を測定するため、ヒートショック法で大腸菌の形質転換の実験を行う。実験で大腸菌を培養する LB と LBamp の寒天培地を作る。三日後、実験結果によって、LB と LBamp の寒天培地にある大腸菌コロニー個数の違いが分かる、形質転換効率も測定する。

### 実験

#### 簡易無菌操作の準備をする

アルコールで机の上を拭き、ガスバーナーを配置する。

-80℃で凍結保存していたケミカルコンピテントセルが入ったチューブを 1 本

取り出した後で、on ice で細胞懸濁液を解凍する

片方の細胞懸濁液にコントロール用プラスミド溶液で調製した DNA 溶液を

1  $\mu$ L 加えて、マイクロチューブを軽く混合する。

チューブを 30 分間 on ice 。

42°C のヒートブロックにチューブを入れて、45 秒間静置し、ヒートショック

を加える。

すぐチューブを氷に入れ、5 分間冷却する。

室温の LB 培地を 100  $\mu$ L 加えて、37°C で 30～60 分間<sup>しんとうばいよう</sup>振盪培養する。

(無菌環境)

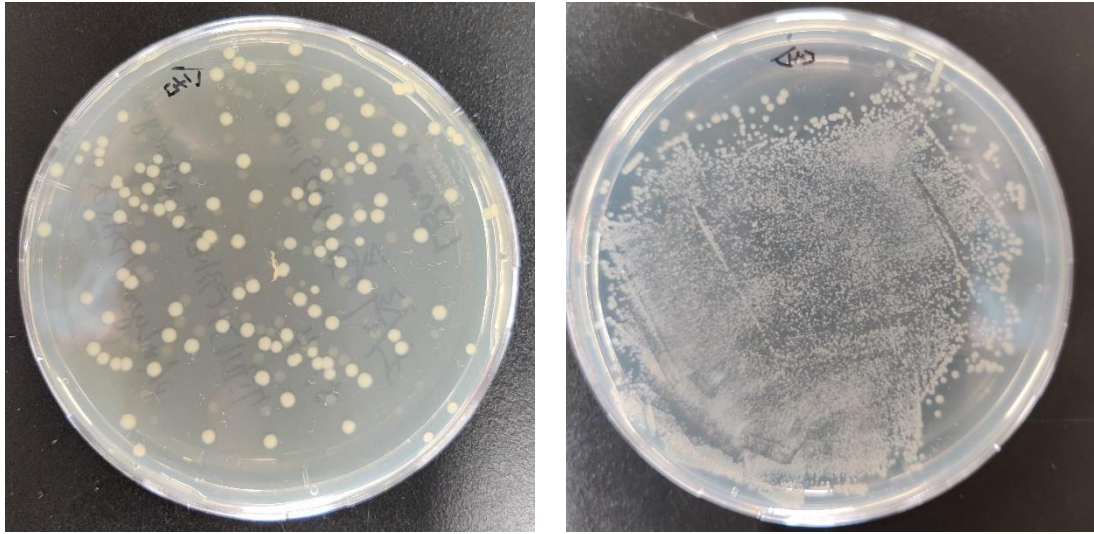
LB と LBamp の寒天培地を室温(20°C)で培養する。

## 結果

三日後、実験結果を分析して、LB と LBamp の寒天培地で、二つとも大腸菌

のコロニーがある。LB の寒天培地にある大腸菌コロニーの個数は LBamp の

方が多いと考えられる。



左：LBamp の寒天培地 右：LB の寒天培地

そして、LBamp の寒天培地にある大腸菌コロニーの個数で大腸菌の形質転換効率を計算する。

## 計算

LBamp の寒天培地にある大腸菌コロニーの個数は 100 ぐらいと思う。

培養液の体積量＝

$$1\mu\text{L} + 10\mu\text{L} + 100\mu\text{L} = 111\mu\text{L}$$

形質転換効率＝

$$100 \times 1/30 \times 111 \approx 370$$

## 結論

大腸菌の形質転換効率は 370 であると考える。

## 参考文献

教科書



## アガロースゲル電気泳動

1 2 2 9 1 0 4 6 王 舒揚

### 要約

アルカリミニブレップ法で大腸菌から作ったプラスミド DNA を使って、制限酵素処理をしたとしなかった試料の電気泳動を行う。

### 実験

#### 第一日

##### 簡易無菌操作の準備をする

アルコールで机の上を拭き、ガスバーナーを配置する。

プラスミドを含む大腸菌液 1.2mL を 1.5mL のチューブに入れる。

このチューブをチューブ甲にする。

油性ペンでチューブ甲の上にマックした後で、遠心機のローターにセットする。

15000rpm, 4°C, 1 分間 に遠心分離し、プレットにする。

チューブ甲にある上清をイエローチップに付けたマイクロピペッターで、前端イエローチップより、組換え体専用廃液チューブに流す。

チューブ甲の角度を変わらない状態で、チューブ壁面に付けた液滴をマイクロピペッターで吸い出す。

氷冷しておいた Solution I(100  $\mu$  L)を菌体のプレットに入れたチューブを懸濁した後で、ボルテックスでよく混合する。

(塊が残っている時、完全になくなるまでする)

200  $\mu$  L の Solution II をチューブ甲に入れた後で、チューブ甲のケースを閉めた状態で、ゆっくり振動する。

氷冷した Solution III を 150  $\mu$  L 程度でチューブに入れる。

**15000rpm, 4°C, 5 分間** に遠心分離する。

チューブ甲を静かに遠心機から取り出す。

マイクロピペッターで上清を吸い出した後で、**15000rpm, 4°C, 5 分間** に遠心分離し、プレットにする。

上清を除く。

(完全に除くこと)

7%エタノールを 200  $\mu$ L 程度でチューブに入れる、軽くボルテックスミキサーで攪拌する。

**15000rpm, 4°C, 5 分間** に遠心分離する。

上清を除く。

(完全に除くこと)

チューブ甲を開けたまま、キムワイプを被せて、手を握り、体温で加熱する。

このチューブをチューブ乙にする。

滅菌水をチューブ乙にマイクロピペッターで  $100\mu\text{L}$  程度に入れる

## 第二日

前に作ったプラスミドをチューブ乙に  $5\mu\text{L}$  程度で入れる。

$10^* \text{H}$  バッファーをチューブ乙に  $2\mu\text{L}$  程度で入れる。

既製溶液をチューブ乙に  $13\mu\text{L}$  程度で入れる。

BamHI( $15\text{U}/\mu\text{L}$ ), $1\mu\text{L}$	}	既製溶液
EcoRI( $15\text{U}/\mu\text{L}$ ), $1\mu\text{L}$		
$\text{H}_2\text{O}$ , $11\mu\text{L}$		

$37^\circ\text{C}$ で 30 分間反応させる。

滅菌水をチューブ乙に  $15\mu\text{L}$  程度で入れる。

10\*Loading buffer をチューブ乙に  $2.2\mu\text{L}$  程度で入れる。

もう一つのチューブに前に作ったプラスミドを  $2.5\mu\text{L}$  程度で入れる

このチューブをチューブ丙にする。

滅菌水をチューブ丙に  $7.5\mu\text{L}$  程度で入れる。

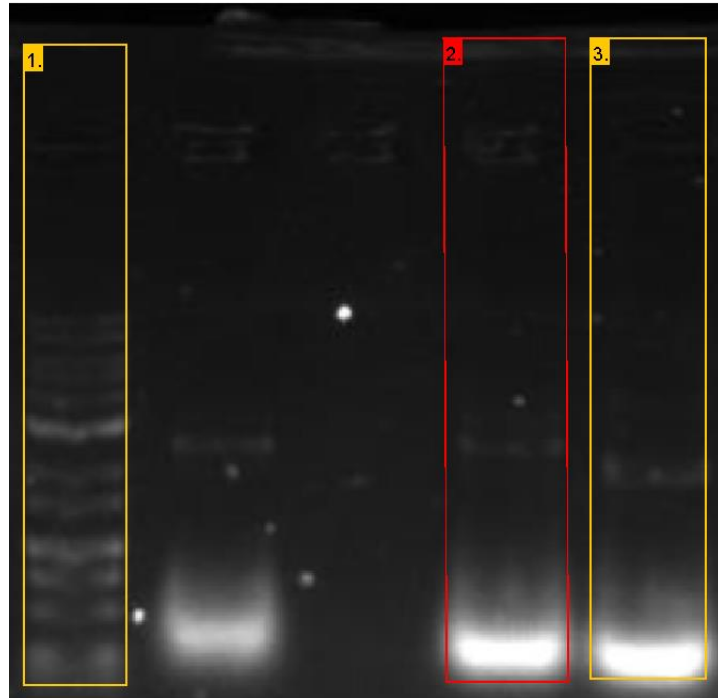
10\*Loading buffer をチューブ丙に  $1.1\mu\text{L}$  程度で入れる。

染色した試料をそれぞれ  $5.0\mu\text{L}$  程度で 1%アガロースゲルに移したあとで、

電気泳動を行う。

## 結果

結果は以下の通りである。

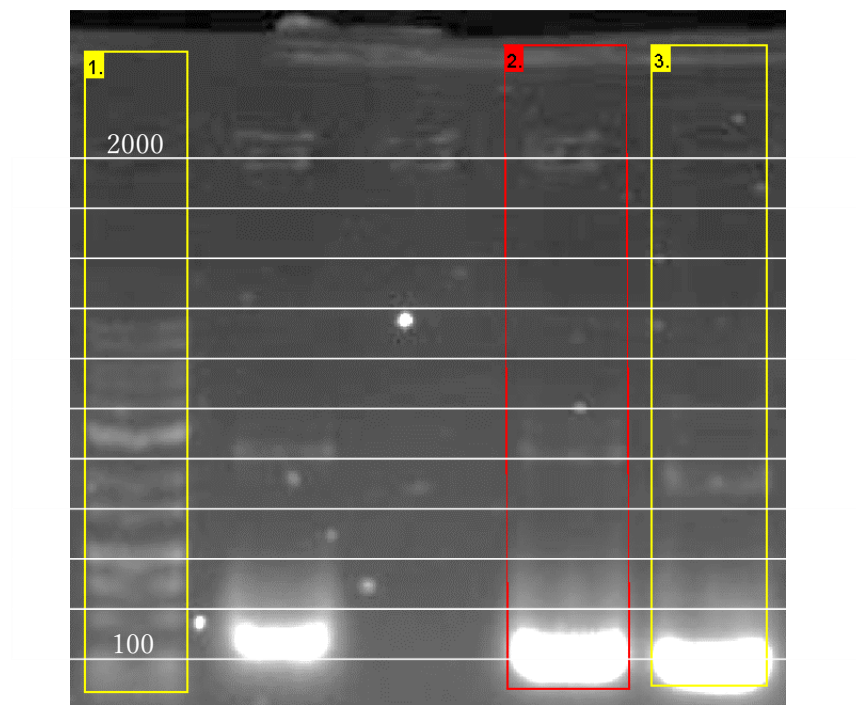


ゲル撮影装置で撮影した *DNA* サイズマーカーと試料

2 = 制限酵素処理なし

3 = 制限酵素処理あり

撮影した試料を分析する。



左 : 2      右 : 3

図によって、以下のシートを作った。

	鎖長
2	1140
3	1330

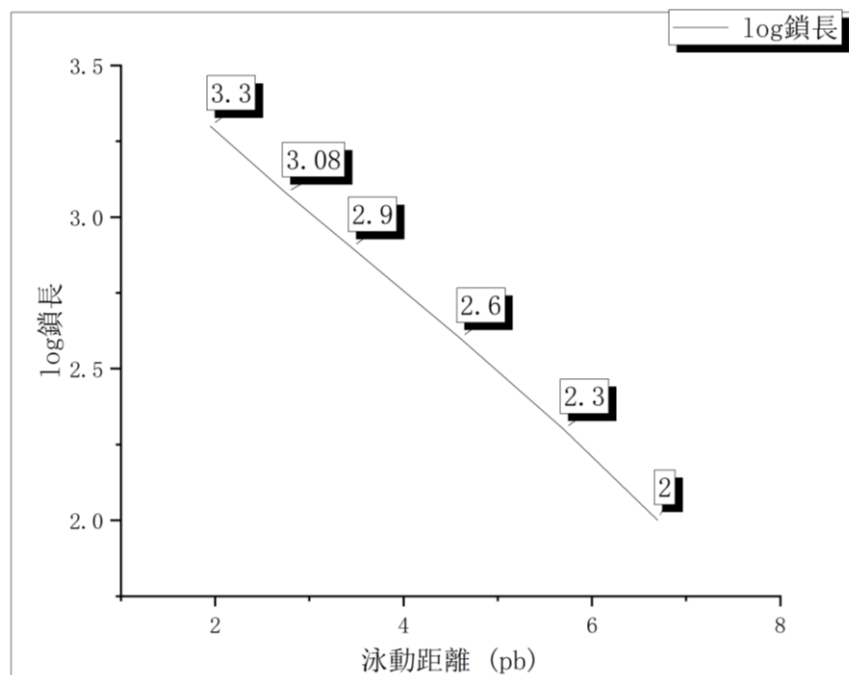
参考 : DNA サイズマーカーの鎖長と泳動距離の関係のシート \*

鎖長	log 鎖長	泳動距離
2000	3.30	1.95
1200	3.08	2.75
800	2.90	3.45

400	2.60	4.6
200	2.30	5.7
100	2.00	6.7

\*参考文献：教科書

泳動距離と log 鎖長関係のグラフ。



2 = 制限酵素処理なし

3 = 制限酵素処理あり

## 結論

以上の実験を通じて、アルカリミニプレップ法で大腸菌からプラスミド DNA を取り出し方と、アガロースゲル電気泳動で核酸を測定し方と原理を学ん



だ。

## 参考文献

教科書