

# 令和 5 年度 化学生命工学実験 3

実験名

学籍番号 : 082110424

氏名 : 中村優作

実施日 :

## 1 目的

## 2 操作

### 2.1 PCR

PCR 酶素  $15\mu\text{L}$  が入ったマイクロチューブに超純水  $3\mu\text{L}$  と template  $6\mu\text{L}$  と primer  $6\mu\text{L}$  を加えて調整した。調整した溶液を装置にセットし、以下の図 1 プログラムで PCR を行った。

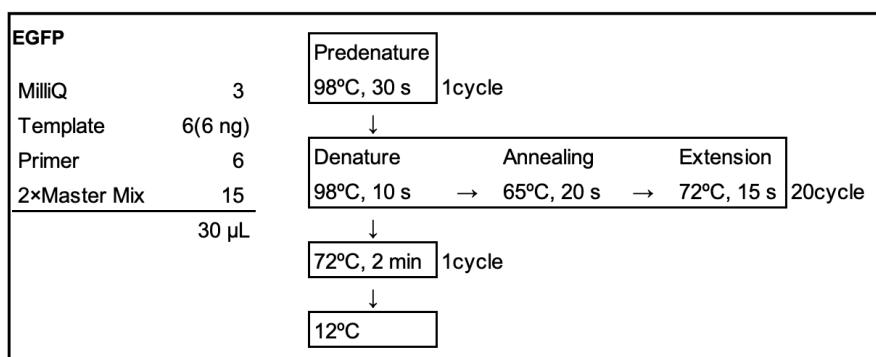


図 1: PCR プログラム

### 2.2 電気泳動

6x loading buffer 入りのエッペンチューブに PCR 後の溶液を  $10\mu\text{L}$  加えた。その後  $100\text{V}$  で 20 分間電気泳動をした。その後、電気泳動で確認できたバンドを切り出してカラムで DNA を観察した。ゲル精製した EGFP と  $GABA_{B1}$  をコードする DNA 断片とベクターとなる pBlueScript を制限酵素で切断した。

### 2.3 ligation

エッペンチューブ 2 本に制限酵素処理をした pBluescript(vector) を  $2.5\mu\text{L}$  ずつ加え、続いて片方に EGFP をコードする DNA 断片(insert)、もう片方に  $GABA_{B1}$  をコードする DNA 断片(insert) を  $2.5\mu\text{L}$  加えた。酵素と緩衝液である ligation mix を  $5\mu\text{L}$  加えて、 $16^\circ\text{C}$  で 30 分反応させた。 $2\mu\text{L}$  の 6x loading buffer が入ったエッペンチューブに ligation 前のペリレン、EGFP, GABA を各  $3\mu\text{L}$  ずつ加えた。また、 $1\mu\text{L}$  の 6x loading buffer が入ったエッペンチューブ 2 本にそれぞれペリレンと EGFP  $4\mu\text{L}$  ずつ、ペリレンと GABA  $4\mu\text{L}$  ずつ加えた。これらの溶液を  $16^\circ\text{C}$  で 30 分反応させた。その後、30 分間  $100\text{V}$  で電気泳動をした。

## **2.4 transformation**

2.3で調整したペリレンとEGFPの溶液、ペリレンとGABAの溶液を5μLとり、新しいチューブ内でコンピテントセル30μLとそれぞれの溶液を混合した。タッピング後、氷上で5分間静置して、コンピテントセルを42°Cで45分間加熱した。その後5分間静置してLBプレートへ菌を撒いた。

## **3 結果**

## **4 考察**

## **5 設問/課題**

## **6 参考文献**

## **参考文献**