

大腸菌の形質転換 コンピテント細胞をつかって

外から与えられたDNAを取り込む能力が上昇した大腸菌を「コンピテント細胞」という。コンピテント細胞の効率は、用いた大腸菌の菌の種類によって大きく異なる。コンピテントセルを調整する方法はいくつかあるが、もっとも初歩的な方法として今回は塩化ルビジウム法で調整したコンピテントセルを用いて大腸菌の形質転換を行う。

形質転換

ホストの大腸菌は、通常コンピテント細胞の状態で大量に調整し、100 μ l ずつに分注、 -80°C で保存する。どの大腸菌を選ぶかはその目的（遺伝子クローニング・タンパク質発現解析等）に応じて使い分ける。

形質転換するDNA量は、コンピテントセルの1/10 量までにとどめる。

- () コンピテントセル (DH5 α) を準備する (各班で1つ)
- () ライゲーションしたDNAをコンピテントセルに加え、ピペティングで混ぜる
(セルを暖めないように、バーナーを焚いて無菌的にすばやく)
- () 冷蔵庫で30分間放置 (DNA取り込み)
- () 37°C 、120秒間加温し、DNAの取り込みを停止する
- () SOC培地 (900 μ l) に無菌的に、コンピテントセル溶液を全量加える
- () 37°C 、30分間振とう培養 (200 rpm)
- () 遠心分離 4,000 rpm, 2 min 行い細胞を回収する
- () 上清をすて、残った培地を取り除き、X-gal・IPTG溶液 (100 μ l) で懸濁し、
L-amp plate にコンラージ棒で広げる ← (無菌的に行う)

実験のポイントとして、

ライゲーションがうまくいっているか？

アンピシリン耐性プラスミドが取り込まれたはずであるので L-amp 培地にコロニーが形成されるはずである。

形質転換された大腸菌のコロニーは青くなる？

X-gal、IPTG を添加したことで、修復されたプラスミドDNAによりコロニーは、青色を呈するはずである。なぜ青くなるのかその原理についてレポートする。

コロニーが形成されない班は何処に問題があったのか？考えてみる。

- 1) DNAが回収されたか？
- 2) ライゲーションがうまくいかなかった？
- 3) 形質転換が上手くいかなかった？
- 4) 青いコロニーが形成されなかった？