

大腸菌とプラスミドを用いた実験の基本

1. 大腸菌とプラスミド

1-1 大腸菌とは

大腸菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)は、もともとヒトの大腸に存在する常在菌(共生細菌)であり、腸内環境の維持や他の病原菌の定着阻止に寄与している。世の中のほとんどの細菌が人工培地上での培養が困難であるのに対し、*E. coli*は容易に培養でき、増殖速度も速いため、分子生物学・遺伝学の研究においてモデル生物として広く利用されてきた。

1-2 プラスミドとは

プラスミドは、細胞の染色体DNAとは独立して存在する小型の環状2本鎖DNA分子であり、大腸菌などの宿主に組み込まれれば自動的に複製される性質をもつ。抗生物質耐性遺伝子や、基質を呈色させる酵素遺伝子などをプラスミドに組み込むことで、プラスミドが入った大腸菌のみを選別することができるため、人工的な配列を組み込んだプラスミドを大量に増やすことができる。分子生物学実験では、「大腸菌にプラスミドを増やさせる」ことを頻繁に行う。

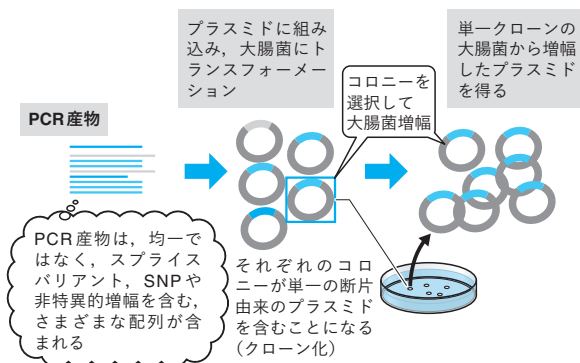


図2 TAクローニングによる単一断片の増幅(クローン化)

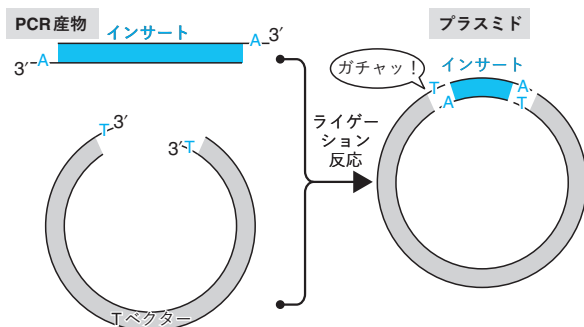


図3 TAクローニングにおけるライゲーション反応の模式図

PCR産物のインサートの3'末端に付加されたアデニン(A)塩基と、Tベクターの3'末端のチミン(T)塩基を、ライゲーション反応により結合させることで、プラスミドを形成する。

memo

● プログラム(3ステップPCR) ^{*27}

- ☐ Step1 95°C 150 秒
↓
- ☐ Step2 95°C 10 秒
↓
- ☐ Step3 60°C 10 秒
↓
- ☐ Step4 72°C 10 秒 ※ここで蛍光の測定
↓
- ☐ Step5 Step 2に戻る(44回)
↓
- ☐ Step6 メルティングカーブ^{*28}を描く

ダウンロード



リアルタイムPCRの
プログラム

memo

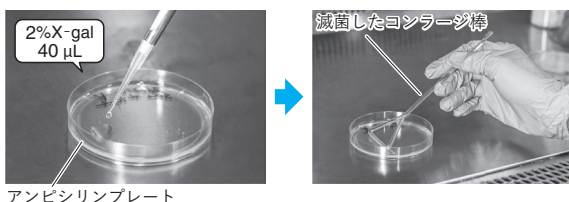
***27** 試薬によっては「2ステップPCR」が推奨されている (TB green[®] Fast qPCR Mix など)

2ステップPCRのプログラム

- Step1 95°C 30 秒
Step2 95°C 5 秒
Step3 60°C 10 秒
Step4 Step2に戻る(39回)
Step5 メルティングカーブを描く

***28** リアルタイムPCR装置により異なる。60～65°Cあたりから、+0.2～0.5°C /秒で90～98°Cあたりまで緩やかに上昇させることが多い

DH5 α , DH10 β , Mach1™ 等ではIPTG添加は不要. JM109等ではIPTG添加が青白スクリーニングに必要. 用いる場合には100mM IPTGも40 μ L加える.
詳細はp.42参照.



動画7

大腸菌を
プレートに撒く

ダウンロード

トランスフォーマー
ションからPCRまで

- Step6 Step5で用意したLB/Amp + X-gal プレートにSOC入りのコンピテントセルを全量撒く
通常100 μ L くらい^{*14}.



*14 p.64 に示した2種類作る撒き方を推奨