



Title	シロイヌナズナの形質転換
Author(s)	鹿内, 利治
Description	5章 形質転換 5
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 615-616
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39202
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-086.pdf



5. シロイヌナズナの形質転換

鹿内 利治¹⁾

シロイヌナズナの形質転換は、技術的にほぼ完成されており、容易に簡便に行うことができる。以前は vacuum infiltration 法がよく使われたが、最近では floral dip 法¹⁾が主流である。

Transformation of *Arabidopsis thaliana*

Toshiharu Shikanai

Transformation technique of *Arabidopsis thaliana* has already been established almost completely. Although vacuum infiltration was routinely used previously, the transformation became even more efficient and simple by the establishment of floral dip method.

5.1 植物の準備

1. プラスチックポットに培養土を入れ、表面をネットで覆う。これはアグロバクテリウム懸濁液に逆さまに浸ける際、土がこぼれ落ちたいようにするためである。流し台の水切りネットなどを適当な大きさに切って、輪ゴムでポットに固定する。ネットと培養土に隙間が入らないように、培養土は山盛りにする。
2. 直径 75 mm の丸形ポットの場合、10~20 粒の種子を蒔く。約 1 か月後、伸びた花茎を切除（摘心）し、さらに花茎の誘導を促す。さらに 2 週間ほどしたら形質転換に用いる。

5.2 形質転換の操作

1. 形質転換に用いるアグロバクテリウムを準備する。我々は *Agrobacterium tumefaciens* MP90 (C58C1), ASE などを用いている。形質転換の 1 週間ほど前、菌を新しくプレートに広げておく（新鮮な菌を準備する）、その後の培養時間をコントロールしやすい。
2. 50 ml の無菌プラスチックチューブに 5 ml の抗生物質入りの LB を加え、プレートからアグロバクテリウムのコロニーを少し多めに取り加える。一晚 23°C で震盪培養する。培養温度は 25°C でもかまわない。
3. 翌日、抗生物質入りの LB 200 ml を含む 1 l フラスコに 200 μ l の前培養液を加え、一晚（約 16 時間）震盪培養する。翌日 OD₆₀₀ が 0.8~1.2 になったら培養をやめ、氷上に移す。

4. 培養液を遠心チューブに移し、集菌する。JLA100. 500 ローターの場合は、4000 rpm, 5 分, 4°C の遠心を行う。
5. 上清を捨て、菌を 200 ml の懸濁用培地^{#1}に懸濁し、500 ml ビーカーに移す。
6. 実験台にラップを敷き、その上で形質転換用の植物を逆さまにし、ロゼッタ葉までアグロバクテリウム懸濁液に浸す。しばらく置いて引き上げ、5 分後、もう一度懸濁液に浸す。
7. 広げたラップの上に植物を寝かせて置き、地上部をラップでくるむ。上部を折りたたんで閉じる。作業の間、70%エタノールのスプレーを用意し、アグロバクテリウムで実験台を汚染させないようにする。
8. ラップでくるんだ植物をそのまま 1 日通常条件で育て、ラップを外す。さらに植物を同じように育て、種を集める。この種が T₁ 世代になる。

5.3 形質転換植物の選抜

1. 耳かき一杯程度の種子を 1.5 ml チューブに取り、3%次亜塩素酸 1 ml を加えて 10 分間滅菌する。

^{#1} 懸濁用培地

1/2×MS 塩

10% ショ糖

0.5 g/L MES

KOH で pH を 5.7 に合わせる。

使用直前に、ベンジルアミノプリン (1 mg/mL ストック, DMSO 中) を 2 μ l と Silwet-L77 を 40 μ l 加える。Silwet-L77 は Lehle seeds (<http://www.arabidopsis.com/main/cat/VacInStuff/%21vis.html>) から購入できるようなが、少量ならシロイヌナズナを扱っている研究室から分与してもらうと良い。

1) 京都大学理学研究科

2. 1 ml の滅菌水で2回種子を洗う。
3. チューブを良くふった後、選択培地上^{註2}に流す。すぐに2 ml の0.15%アガー(無菌)を加え、まんべんなく種子が行き渡るように培地を回す。
4. サージカルテープで封をし、アルミホイルに包んで冷蔵庫で数日置く。
5. アルミホイルから出し、23°Cで培養する。場合によって非形質転換体も枯死せず緑を保つが、生育の差で形質転換体との見分けは容易である。
6. 本葉が5～6枚出たら、鉢あげする。最初は鉢をラップで包み、高湿を保ち、徐々に大気の湿度に馴らす。
7. 個々の植物をライン化し、T₂種子を採種する。必要があればT-DNAが一カ所挿入されたラインを選び(薬剤耐性か可能であれば表現型がT₂で3:1に分

離)，そこからホモ個体(T₃ですべて形質転換体)を得て保存する。この際、薬剤耐性を指標にすると、しばしば導入した目的遺伝子と連鎖していない問題が起きる。PCRで目的導入遺伝子の存在を確認する必要がある。

注意

すべての作業はクリーンベンチ内で行う。一連の作業は遺伝子組換え実験であり、機関による承認を受けていなければ行うことはできない。

参考文献

- 1) S. J. Clough & A. F. Bent, Plant J. **16** (1998) P.735.

^{註2} 選択培地

MS 塩

1% ショ糖

0.5 g/L MES

KOH で pH を 5.7 にあわせ、寒天を 0.8% になるよう加える。