

7. 根粒からの根粒菌の分離法

内海俊樹

鹿児島大学理学部生命化学科
uttan@sci.kagoshima-u.ac.jp

根粒を表面殺菌して破碎した後、破碎液を YM 培地にプレーティングする。屋外にて生育している植物の根粒から根粒菌を分離する場合には、根粒菌によく似たコロニーで生育の早い菌が出現することがある。必ずプラスミドプロファイルの確認や宿主植物への接種試験を行い、根粒菌であることを確認する必要がある。

〔準備するもの〕

試薬・溶液

0.5% SDS-10mM NaCl

50-5 TE (pH7.5) -12% sucrose-10mM NaCl

YM 培地

70% エタノール 滅菌水

器具

ピンセット 白金耳

〔方法〕

1. 根粒を火炎滅菌したピンセットなどでつまみ取る。
2. 5 ml チューブに 0.5% SDS-100mM NaCl を適量入れたものに、根粒を入れる。
3. チューブを振り根粒表面を洗浄する。
4. DS 溶液を取り除き、70% エタノールを加えチューブをよく振り 5 分間殺菌する。
5. エタノールを取り除き、滅菌水を加えチューブをよく振り洗浄する。
6. もう一度滅菌水による洗浄を行う。
7. 根粒をシャーレに移し、50-5 TE (pH7.5) -12% sucrose-10mM NaCl (滅菌水でも可) を滴下し、ピンセットやガラス棒などで根粒を破碎する。
8. 根粒破碎液を YM 培地に塗布する。
9. 28 °C で数日インキュベートする。

(Reference)

Long, S. R., Buikema, W. J., and Ausubel, F. M. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod- mutants. *Nature*, **298**, 485-488 (1982).

8. 根粒菌遺伝子解析法

〔1〕根粒菌 DNA 調整法

(1)根粒菌ゲノム DNA 調製法

板倉 学

東北大学生命科学研究科

manav@ige.tohoku.ac.jp

当研究室でダイズ根粒菌からゲノム DNA を抽出するために使っている方法であるが、ミヤコグサ根粒菌からも同じ方法で DNA の抽出が可能である。

〔準備するもの〕

試薬・溶液等

STE buffer

リゾチーム溶液 (リゾチーム 0.5mg / mL TE buffer)

プロナーゼ・SDS 溶液 (プロナーゼ 0.2mg、SDS 2.3% / mL TE buffer)

TE 飽和フェノール

クロロホルム / イソアミルアルコール (24:1)

3M 酢酸ナトリウム (pH7.0)

99.5% 冷エタノール (-20)

70%冷エタノール (-20)

TE buffer

RNA 溶液 (リボヌクレアーゼ A 10mg / ml RNase 用 buffer : 5min 沸騰水につけた後に使用する.)

器具

遠沈管もしくはディスポーザブルチューブ

〔方法〕

1. 根粒菌培養液 30mL をオートクレーブした遠沈管もしくはディスポーザブルチューブに入れ、8000rpm、10min 遠心して集菌する。上澄みを捨て、STE buffer を 20mL 加え、懸濁する。
2. 8000rpm、10min 遠心して集菌し、上澄みを捨てる (この状態で -20 保存可能である)。
3. 菌体ペレットにリゾチーム溶液を 8mL 加えて懸濁し、室温で 10min 放置する。
4. プロナーゼ・SDS 溶液を 10mL 加えて 37 のウォーターバスで 1~2h インキュベートする。(液は透明になり、粘度が増す。)
5. TE 飽和フェノールを 18mL 加えて 15sec 激しく混合する。
6. 室温で 10000rpm、10min 遠心する。水層を新しいチューブにとる。この工程を 2 回以上繰り返す。
7. クロロホルム / イソアミルアルコールを 18mL 加えて 15sec 激しく混合後、室温で 10000rpm、10min 遠心する。
8. 水層を新しいチューブにとる。この工程を 1 回以上繰り返す。
9. 3M 酢酸ナトリウム (pH7.0) を水層の 1/10 量、99.5%冷エタノール (-20) を水層の 2 倍量加えて穏やかに混和する。(DNA が白濁する。)
10. 4 で 10000rpm、15min 遠心する。(DNA が白いペレットになる。)

11. エタノールを捨て、70%冷エタノール(-20)を加えてペレットを洗浄する。
12. エタノールを捨てて、2~5min 真空乾燥する。(完全に乾かさない。DNA が溶解しにくくなる。)
13. TE buffer 500 μ L を加えてDNA を溶解する。1h 以上冷蔵庫で放置し、完全に溶解する。
14. Rnase 溶液 25 μ L を加えて穏やかに混合後、37 のウォーターバスで2h インキュベートする。
15. TE 飽和フェノール 500 μ L を加えて15sec 激しく混合後、室温で15000rpm、5min 遠心する。
16. 水層を新しいチューブにとる。この工程を2回以上繰り返す。
17. クロロホルム/イソアミルアルコールを500 μ L 加えて15sec 激しく混合後、室温で15000rpm、5min 遠心する。
18. 水層を新しいチューブにとる。3M 酢酸ナトリウム(pH7.0)を水層の1/10量、99.5%冷エタノール(-20)を水層の2倍量加えて穏やかに混和後、4 で15000rpm、10min 遠心する。
19. エタノールを捨て、70%冷エタノール(-20)を加えてペレットを洗浄する。
20. エタノールを捨てて、2~5min 真空乾燥する。(完全に乾かさない。DNA が溶解しにくくなる。)
21. TE buffer 30~50 μ L を加えてDNA を溶解する。1h 以上冷蔵庫で放置し、完全に溶解する。

(2)根粒菌のゲノム DNA 及びプラスミドの単離方法 (アルカリ溶菌法)

内海俊樹

鹿児島大学理学部生命化学科

uttan@sci.kagoshima-u.ac.jp

根粒菌からの全 DNA の調製法は様々な方法があるが、ここでは、Casse のアルカリ溶菌法を紹介する。菌体量あたりの収量は低いものの、アガロースゲル電気泳動により巨大プラスミドの存在も容易に検出できる。Early stationary phase 位の菌体が良いので、培養時間は菌株によって調節する。

〔準備するもの〕

培地・試薬

TY 培地 50 ml のフラスコに 10ml (プレカルチャー用)

100 ml のフラスコに 20ml (本カルチャー用)

50-20 TE buffer (pH 8.0)

2M Tris-HCl buffer (pH 7.0)

Lysing buffer (50-20 TE, 4% SDS pH12.45 adjusted with 5M NaOH)

使用するとき調製する。

3% NaCl 水溶液にて飽和させたフェノール

器具

攪拌用プラスチック製ヘラ (葉さじでも可)

先を切って広口にしたパスツールピペット等

チップ チューブ

〔方法〕

1. プレカルチャーをする。1 白金耳接種して 1 晩培養。
2. 本カルチャーをする。プレカルチャー 200 μ l を 20ml の培地に接種して 15~16 時間培養する (培養時間は菌株によって調節する)。
3. NaCl を 1 M になるように培養液に加えて 30 分振とうする。(根粒菌のポリサッカライドをできるだけ除去するため。)
4. 遠心管に培養液を移して、7000 rpm, 10 min, 4℃ で遠心し、集菌する。
5. TE buffer (pH 8.0) を 20ml 加え、菌を懸濁し洗浄する。7000 rpm, 10 min, 4℃ で遠心し、集菌する。この操作を 2 回行う。
6. 50-20 TE buffer (pH 8.0) 1 ml に菌を懸濁する。
7. 1 ml の菌懸濁液を 100 ml 容ビーカーに移し、Lysing buffer 19 ml をすばやく加える。ヘラで泡立てない程度に良くかき混ぜる。34℃、25 min インキュベートする。
8. 2M Tris-HCl (pH 7.0) を 1.8ml 加え、よく混合する。(液の粘性が下がる)
9. 3% になるように NaCl を加え攪拌し、30 min 静置する。タンパク質-SDS 複合体などが白い凝集物となる。夏季は、白い凝集物は再び溶解してしまうことがある。冬季は、白い凝集物が多残ることが多い。どちらも DNA の質・収量にはほとんど影響ない。
10. 3% NaCl 水溶液飽和フェノールを等量加える。良く混和して、5000 rpm, 10 min, 4℃ で遠心する。

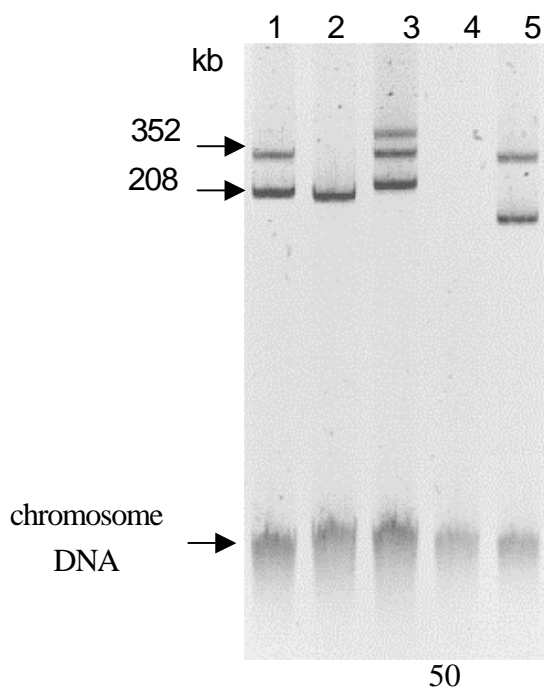
11. 先太のピペット（先端を切ったメカニカルピペットのチップでもよい）で上澄みを、ビーカーに移す。中間層の白い凝集物を吸い取らないようにする。
12. 2 倍量(40 ml)の冷エタノールを加える。
13. -80 で 25 min インキュベートする。
14. 12000rpm, 15min, 4 で遠心する。
15. 沈殿を 70%エタノールに懸濁し、1.5 ml チューブに移す。微量遠心機で 12000rpm, 3min 遠心する。
16. 乾燥デシケーターで乾燥させる。乾燥しすぎると次のステップで DNA が溶解しにくくなるので注意する。
17. 10-1 TE buffer、又は、滅菌水に溶解（50~200 μ l）する。DNA の沈殿物を液表に浮かしてやれば、容易に溶解する。
18. 5~10 μ l 程度を電気泳動する。サンプルの粘性が高い場合には、適当に希釈系列をつくり、泳動に供する（巨大プラスミドの分離を目的とする場合、同仁のアガロース II を用いると良い）。Mupid で泳動する場合は、0.7% アガロースゲル、TBE-buffer で 100V・90min を目安に泳動する。大型の泳動装置を使う場合は、ゲル幅 1 cm あたり 5V の定電圧を目安として 15 時間程度、冷蔵庫の中で泳動する。泳動時間が長すぎたり、電圧が高くなったりすると、巨大なプラスミドは泳動中に破壊され検出できないことがある。ゲル厚、泳動用緩衝液の量など常に一定になるように工夫し、それぞれの装置に合った泳動条件を見つけだすこと。プラスミドを保持している菌株（例えば、*M. loti* 303099 株）から調製したサンプルを同時に泳動するとよい。

(注意)

- *全ゲノム DNA 抽出を目的とする場合、DNA 溶液は凍結保存する。
- *巨大プラスミドは壊れやすいので、物理的衝撃を最小限にする。この方法で、500 kb 程度のプラスミドまで検出可能である。保存は、冷蔵にて 2~3 日程度。1 週間経つとプラスミドを検出できないことがある。

(Reference)

Casse, F., Boucher, C., Julliot, J. S., Michel, M., and Denarie, J. Identification and characterization of large plasmid in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, **113**, 229-242 (1979).



〔2〕根粒菌 RNA 抽出法

(1)根粒菌培養菌体からの RNA の調製

内海俊樹

鹿児島大学理学部生命化学科

uttan@sci.kagoshima-u.ac.jp

Ditta らの方法 (Ditta *et al.*, J. Bacteriol., **169**, 3217-3223, 1987) を基本に、次のような Hot phenol 法でミヤコグサ根粒菌体より RNA を抽出する。この手順で、200 μ g 程度の RNA の調製が可能である。

〔準備するもの〕

培地・溶液・酵素

TY 培地 (プレカルチャー 5 ml、本カルチャー100 ml)

extraction buffer (80 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM β -mercaptoethanol)

1% SDS, 500 μ g/ml アクチナーゼ E in 50 -20 TE buffer (pH 8.0)

phenol-chloroform (10-1 TE buffer 飽和)

50 mM Tris-HCl-5 mM MgCl₂ (pH 7.8)

DNase

〔方法〕

1. 根粒菌を 2-5 ml の TY 培地で充分増殖させ、これをプレカルチャーとする。
2. プレカルチャー300 μ l を、100 ml の TY 培地の入った坂口フラスコ (500 ml 容) に接種し、一晚振盪培養する。
培養終了後、培養液を氷中にて冷却する。
3. 予め冷却しておいた 100 ml extraction buffer を培養液に注ぎ込む。
4. 軽く振盪した後、7000 rpm、4 で3分間遠心し、上澄を捨てる。
5. 菌体を 1% SDS、及び、37 で30分 predigest したアクチナーゼ E (500 μ g/ml)を含む 50 -20 TE buffer (pH 8.0) 5ml に懸濁し、50 で10分間インキュベートする。
6. これに等量 (5 ml) の 65 に熱した phenol-chloroform を加えよく振盪する。
7. 3000 rpm , 10分間室温で遠心し、水層を別の遠心管に移す。
8. 6~7.の操作をきれいな水層がとれるまで、2~3回繰返す。
9. 水層に二倍量の 100%EtOH を加え DNA と RNA を沈殿させる。
10. 14000 rpm、4 で10分間遠心し上澄みを捨て、沈殿を 100%EtOH で洗浄した後、乾燥させる。
11. 沈殿を 5 ml の 50 mM Tris-HCl-5 mM MgCl₂ (pH 7.8) に溶かし、50 μ g/ml になるように DNase (RNase-free) を加え、37 で20分間インキュベートする。
12. DNase を失活させるために再度フェノール抽出、エタノール沈殿を行う。
13. 沈殿物を 200 μ l の 10-1 TE buffer に溶解する。
11. で添加する DNase I の量は、もっと少ない量でもよいかもしれない (未検討)。

(2)根粒菌バクテロイドからの RNA の調製

内海俊樹

鹿児島大学理学部生命化学科

uttan@sci.kagoshima-u.ac.jp

根粒細胞よりバクテロイドを純粋分離すると、分離操作中に RNA が分解される可能性があるため、以下のようなバクテロイド粗画分からの全 RNA の調製を試みた。ミヤコグサの根粒 1 g から 40 μ g 程度の RNA が得られる。アガロースゲル電気泳動では、宿主植物由来の rRNA の混入はごく僅かであった。

〔準備するもの〕

試薬・溶液

根粒 1 g

Grinding buffer; 0.3 M sucrose, 5 mM Mg-acetate, 0.2 M L-ascorbate, 2% PVP,

1.45 M 2-mercaptoethanol in 50 mM KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer pH7.4

3M Sucrose in extraction buffer (80 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 10 mM β -mercaptoethanol)

1% SDS, 500 μ g/ml アクチナーゼ E in 50 -20 TE buffer (pH 8.0)

phenol-chloroform (10-1 TE buffer 飽和)

50 mM Tris-HCl-5 mM MgCl_2 (pH 7.8)

DNase

器具

Miracloth (CALBIOCHEM)

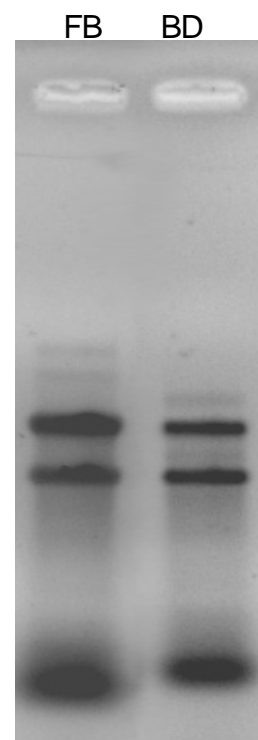
〔方法〕

1. 1.0 g の根粒を冷却した乳鉢に入れ 3 ml grinding buffer (0.3 M sucrose, 5 mM Mg-acetate, 0.2 M L-ascorbate, 2% PVP, 1.45 M 2-mercaptoethanol in 50 mM KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer pH7.4) を加えて穏やかに磨砕し、3層のミラクロスを通しろ過する。
2. これに等量の 0.3 M スクロースを含む extraction buffer を加え 7000 rpm、4 , 3 min 遠心し、粗バクテロイド画分とする。
3. 以後の操作は、「培養菌体からの RNA 調製」の「ステップ 5 .」以降と同じ操作を行う。

図 *M. loti* MAFF303099 株より抽出した RNA のアガロースゲル電気泳動像 .

FB , TY 培地にて培養した培養菌体より調製した RNA

BD , ミヤコグサ根粒の粗バクテロイド画分より調製した RNA .



〔3〕 RT-PCR によるミヤコグサ根粒菌の遺伝子発現解析法

—ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* JRL501 (pMP2112) の根粒形成遺伝子の発現解析例

南澤 究

東北大学大学院生命科学研究科

kiwamu@ige.tohoku.ac.jp

アルファルファ根粒菌・ダイズ根粒菌では、遺伝子発現解析の系がある程度確立し、研究の蓄積があるが、ミヤコグサ根粒菌では、ほとんど報告されていない。一般に、根粒菌の遺伝子発現解析法として *lacZ* 遺伝子をレポーター遺伝子とした Translational fusion 法が繁用されてきている。ミヤコグサ根粒菌では、一般の広宿主域のプラスミド (pLAFR1, pMP系) が安定的に保持されるので、*lacZ*-fusion 系による遺伝子発現解析が可能であると考えられるが、確立された系は今のところない。また、正確な理由は不明であるが、m-RNA の不安定性や高い RNAase 活性等のため根粒菌の Northern 解析の成功例は報告されていない。しかし、RT-PCR 法による発現解析は可能である。ここでは、根粒形成遺伝子 *nodA* の発現解析例を説明するが、他の遺伝子にも適当なプライマーを設計すれば当然適応可能である。その際、設計したプライマーで目的の遺伝子を増幅できるか否か、予め Total DNA を用いて確認しておく方が良いであろう。

(1) 根粒形成遺伝子の誘導

〔準備するもの〕

菌株

Mesorhizobium loti JRL501 pMP2112 (Spectinomycin^r)

培地、誘導物質

TY 寒天培地 (Spectinomycin 100 μ g/ml)

B 培地 (Spectinomycin 100 μ g/ml) 表 1

Naringenin 原液 (5 mM, *N,N*-Dimethylformamide に溶解)

〔方法〕

1. 菌株を TY プレート (Spectinomycin 100 μ g/ml) に接種し 3 日程度培養する。
2. プレートから菌体をかき取り B 培地 600 μ l に懸濁し、20ml の B 培地 (Spectinomycin 100 μ g/ml) に 300 μ l、200 μ l、100 μ l ずつ接種し、30 $^{\circ}$ C で 1 晩振とう培養する。
3. OD₆₆₀=0.5 程度のカルチャーを OD₆₆₀=0.1 程度に B 培地で希釈し、Naringenin を終濃度 1 μ M になるように加える。
4. 30 $^{\circ}$ C で 6 時間~24 時間振とう培養する。

(2) RNA の抽出

〔準備するもの〕

使用キット等

TRIZOL Reagent (GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES 11596-018)

DNase I (TAKARA 2215A)

RNeasy Mini kit (QIAGEN 74104)

〔方法〕

1. カルチャーを8,000 rpm 5 min 4 で遠心し集菌する (TOMY MRX-150, TMA-S26)。
2. TRIZOLを加える。OD₆₀₀=0.5のカルチャー 7 mlに対してTRIZOL 1 mlを目安とする。
3. ボルテックスにより懸濁する。
4. 60 で1分間インキュベートし、その後室温で5分間静置する。
5. はじめに入れたTRIZOL 1 mlに対してクロロホルムを0.2 ml 加える。
6. ボルテックスで混合したのち、室温で3分間静置する。
7. 10,000 rpm, 10 min 4 で遠心し、水層を新しいチューブに移す(TOMY MRX-150, TMA-S26)。
8. はじめに入れたTRIZOL 1 mlに対してイソプロパノールを0.5 ml 加え混合し、室温で10分間静置する。
9. 10,000 rpm, 10 min 4 で遠心しRNAを沈澱させる(TOMY MRX-150, TMA-S26)。
10. RNAペレットを70%エタノールで洗浄する。
11. RNAペレットを滅菌水に溶解する。
12. RNA 20-50 ugに対し、10x DNase I Buffer 5 μ l、DNase I 2 μ l (10U)を加え、RNase free waterで50 μ lまでメスアップした後、37 30 min DNase I 処理する。
13. RNeasy mini kit を用いてRNAをクリーンアップする (詳しくは付属のプロトコール参照)。

- 1) RNA サンプルをRNase free water で100 μ lにする。
- 2) Buffer RLT(あらかじめ β -メルカプトエタノールを加えておく。RLT 1mlに対し β -メルカプトエタノール10 μ l)を350 μ l 加え、穏やかに混合する。
- 3) エタノールを250 μ l 加えピペティングで混合する。
- 4) RNeasy column に移し >8,000 x g, 15 sec 遠心する。
- 5) コレクションチューブを新しいものと取り替え、Buffer PRE を500 μ l 加え、>8,000 x g, 15 sec 遠心する。
- 6) Buffer PRE を捨て、新たにBuffer PRE を500 μ l 加え、>8,000 x g, 2 min 遠心する。
- 7) RNeasy column を1.5 ml チューブに移し、RNase free water を30 μ l 加え >8,000 x g, 1min 遠心する。

14. 電気泳動でRNAが取れているか確認する。
15. RNA溶液の濃度を測定し、10 ng/ μ lに調製する。

(3) RT-PCR (解析例)

[準備するもの]

使用キット

OneStep RT-PCR kit (QIAGEN 210212)

Primer

MLsym1: GGAGGTTATGCTGGGAAAATGAGTTGCAGC Tm=63 GC=50

MLsym5: TGGGAGGCAGATCGAGGTACACGTC Tm=64 GC=60

(*nodA* gene 470bp を増幅)

[方法]

1. 付属のプロトコールに従い以下のような反応組成で各試薬を混合する。

反応組成

RNase free water	25	μl
5x OneStep RT-PCR buffer	10	μl
dNTP Mix	2	μl
Primer MLsym1 (10 pmol/μl)	3	μl
Primer MLsym5 (10 pmol/μl)	3	μl
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2	μl
Template (10 ng/μl)	5	μl
<hr/>		
Total	50	μl

2. 反応サイクルは付属のプロトコールに従い以下のように行う。

Reverse transcription: 50 / 30 min

Initial PCR activation step: 95 / 15min



3-step cycling (30 cycles)

Denaturation: 94 / 30 sec

Annealing: 58 / 30 sec

Extension: 72 / 1 min

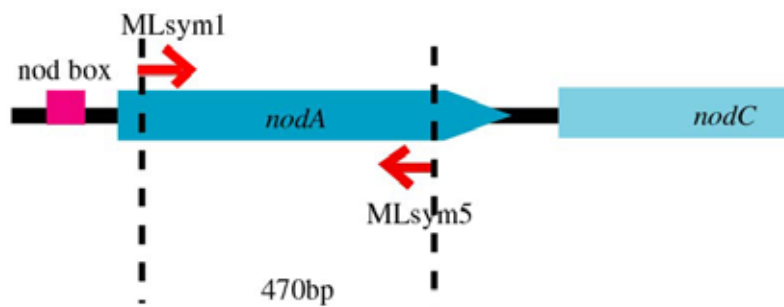
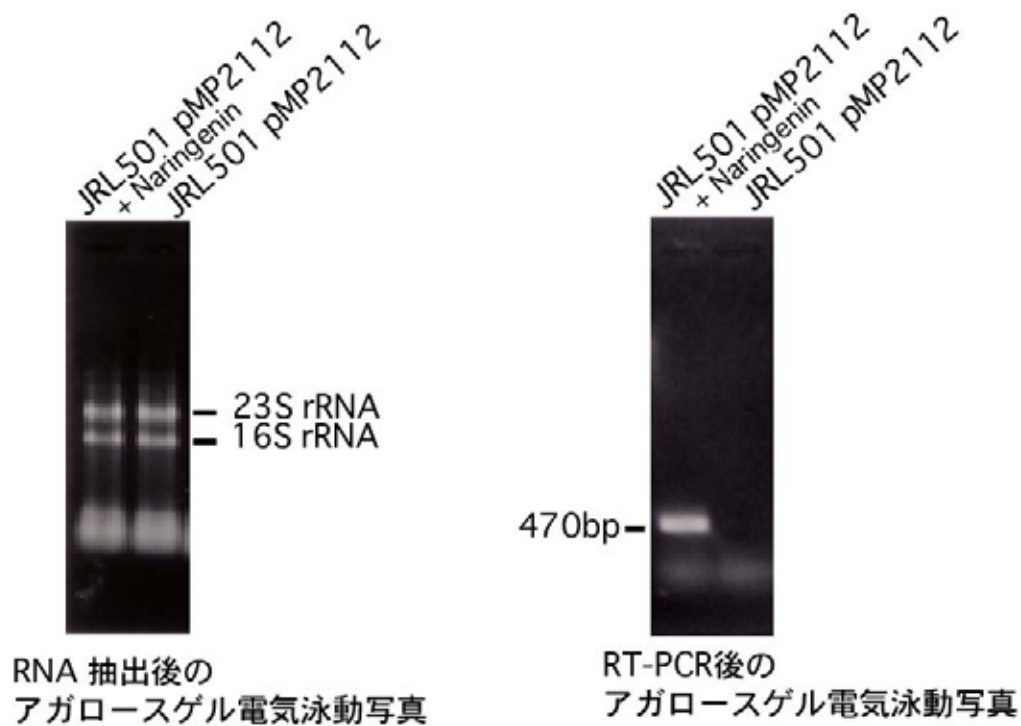


Final extension: 72 / 10 min

このプロトコールは *Mesorhizobium loti* JRL501 (pMP2112) の *nodA* gene の発現解析に最適化してあるので、他の遺伝子の発現を見る場合はテンプレート RNA の濃度や RT-PCR の条件を検討する必要がある。

[結果例]

図1に示すように、*R. leguminosarum* 由来の *nodD* 遺伝子を導入したミヤコグサ根粒菌 JRL501 (pMP2112) の *nodA* 遺伝子の発現に対応する 470 bp のバンドが、Naringenin 添加処理で観察された。



MLsym1: GGAGGTTATGCTGGGAAAATGAGTTGCAGC T_m=63 GC=50
 MLsym5: TGGGAGGCAGATCGAGGTACACGTC T_m=64 GC=60

図1 RT-PCRに用いたプライマーの位置と配列

〔4〕 Conjugation による根粒菌への遺伝子導入法

(1) Conjugation (鹿児島大 version)

内海俊樹

鹿児島大学理学部生命化学科

uttan@sci.kagoshima-u.ac.jp

pKT230 等の広宿主域クローニングベクターにクローン化した遺伝子や pKS800 等のコスミドクローン、あるいは、pSUP202 等の suicide plasmid を、大腸菌から根粒菌へ導入する方法である。エレクトロポレーション等による形質転換と比べ、予備検討すべき項目が少なく、信頼性、効率ともに高い方法である。遺伝子破壊株の作製や変異株の相補性試験には必要不可欠な手法である。

〔準備するもの〕

菌株

根粒菌 [受容菌, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 株など]

E. coli [供与菌, 移行させたいプラスミドを保持する菌株]

通常の実験に使われている JM109, HB101, DH1 などでもよい。ただし、プラスミドは、*Mob* 遺伝子を保持していること。S17-1 株のように染色体上に *Tra* 遺伝子を保持している菌株を供与菌として証する場合は、ヘルパーである *E. coli* MM294(pRK2013) は必要ない。

@*E. coli* MM294(pRK2013) [ヘルパー]

pRK2013 に *Tra* 遺伝子を保持しており、*Mob* 遺伝子を保持するプラスミドを供与菌から受容菌へと移行させる働きがある

培地・器具

TY 培地...10 ml を 50 ml のフラスコに 1 本

LB 培地...10 ml を 50 ml のフラスコに 2 本

TY プレート 1 枚

最少培地など選択用培地 (使用したい数だけのプレート)

ミリポアフィルター(φ13mm, pore size 0.45 μ)

滅菌水、チップ、チューブ、等

〔方法〕

1. LB 培地で供与菌 (大腸菌) とヘルパー (大腸菌) を一晩培養する。受容菌 (根粒菌) は TY 培地で培養する。生育の遅い根粒菌は、培養時間を調整する。いずれも培地には適当な抗生物質を入れておく。
2. 2 種の大腸菌をそれぞれ 50 μl (ただし、S17-1 株を donor とする場合は 100 μl) と受容菌 100 μl の総量 200 μl を 1 本のチューブに入れ、10000 rpm, 1 min 遠心集菌する。
3. 上澄みを除去し、1 ml の滅菌水に懸濁し、10000 rpm, 1 min 遠心洗浄する。もう一度繰り返す。
4. 上澄みを除去し、菌体を 100 μl の滅菌水に懸濁する。
5. TY プレートにミリポアフィルターをのせて、菌体懸濁液 50 μl をフィルター上にのせる。
6. 28 °C で一晩インキュベートする。
7. フィルターを 1.5 ml チューブに入れ、滅菌水 1 ml を加えよく懸濁する。フィルター上の菌体がよく懸濁されたら、フィルターを取り除く。

8. 10000 rpm, 1 min で菌体を遠心洗浄する。これをもう一度繰り返す。
9. 滅菌水 1ml を加え再懸濁し、適当な濃度に希釈する。たいていの場合、懸濁液そのままと 100 倍希釈液を準備すればよい。
10. 最少培地など、目的の根粒菌が成育する選択培地にプレーティングする。
11. 28 ℃ で 4~5 日インキュベートする。

(注意)

M. loti MAFF303099 株を受容菌として用いる場合、フォスホマイシンをカウンターセレクションに使うことができる。Phosphomycin disodium salt (Sigma, 100 mg/ml の水溶液を調製し、濾過滅菌後、-20 ℃ にて保存) を 100-200 µg/ml で含む TY 培地を使用する。インキュベートの日数は、一週間位まで延ばしてもよいが、あまり長くすると大腸菌のコロニーやサテライトが出現することがある。また、プレーティングの際の菌密度が濃すぎると、本来は生育するはずのない菌のコロニーが出現したりすることがある。必ず、希釈した菌体懸濁液を準備し、プレーティングしておく。

(Reference)

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784-789 (1982).

Uchiumi, T., Higashi, S., and Abe, M. A chromosome integrative vector system utilizing DNA fragments of a lysogenic phage of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2371-2377 (1993).

(2)ミヤコグサ根粒菌へのプラスミド導入 (大阪大version)

佐伯和彦

大阪大学大学院理学研究科

ksaeki@bio.sci.osaka-u.ac.jp

プラスミドを大腸菌からミヤコグサに導入する方法に関して、用途、簡便さ、コストなどの異なる4法について手順を取り上げて説明する。なお、使用するプラスミドとしては、RK2由来の*oriT*および複製起点を持つベクター(例えばpRK290、pLAFR1やpKS800)に由来するものを想定している。(特に触れない限り、根粒菌は28、大腸菌は35 または37 で培養。液体培養の場合、14ml Falcon35205 tube (17mm x 100mm) (白キャップ) 中に培養液2mlを入れ、150rpmで振盪。)

- 【1】ライブラリー等により相補実験を行うための標準接合法
- 【2】標準法を低コスト化した簡便接合法
- 【3】低コストな超簡便接合法(一種類のプラスミドのみの導入を行う場合)
- 【4】電気穿孔法(Electroporation)

[準備するもの--4法に共通]

培地

TY培地、TY寒天培地；寒天培地は、クリーンベンチ内で開放・放置して表面を乾燥させたもの(15分程度、季節・湿度により適宜変える)を用いる。また、Ca由来の沈殿物を避けるため、stock溶液として10g/100ml 濃度の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を別途滅菌し、これを除く培地成分をautoclave後 55 程度まで冷却してから、1/100量添加している。

M. loti用抗生物質および調製濃度

(ストック溶液は溶解後、0.22 μm フィルター滅菌後1ml程度に分注し-20 保存)

Phosphomycin 2Na塩 (Sigma P-5396) ; 既知 *Mesorhizobium loti* 株は全て、Phosphomycin耐性である(鹿児島大理学部グループより)。滅菌水で100mg/mlに溶解、ストック溶液とする。1000倍希釈して終濃度100 $\mu\text{g/ml}$ にて使用。
(500倍希釈(終濃度200 $\mu\text{g/ml}$)でも *M. loti* の生育にほとんど影響はない)

Kanamycin : 滅菌水で50mg/mlに溶解、ストック溶液とする。333倍希釈して終濃度150 $\mu\text{g/ml}$ にて使用。

Tetracyclin : エタノールで5 mg/mlに溶解(フィルター滅菌の必要なし)、ストック溶液とする。1000倍希釈して終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ にて使用。

Gentamycin : 滅菌水で20mg/mlに溶解、ストック溶液とする。2000倍希釈して終濃度10 $\mu\text{g/ml}$ にて使用。

大腸菌用抗生物質濃度 (low copyベクターの場合)

20 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin、5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin、5 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin

器具・試薬等

Millipore Filter HATF 0.45 μm 直径 13mm : 保護紙に挟んだまま適量を濾紙に挟み、滅菌バッグないしはアルミフォイルで包んでautoclaveし、恒温乾燥器(80 程度)で乾燥したものをを用いる。

10 mM MgSO_4 : Autoclave滅菌したものを希釈用に使用

【1】ライブラリー等により相補実験を行うための標準接合法

(1)前日までの準備

- (R) Recipient ミヤコグサ根粒菌：接合実施10日程度前にTY寒天培地にストリーク。接合実施3日前に、Fresh colony を2 ml TY培地に植菌して前培養を開始する。接合実施前日に、前培養液を2ml TY培地に希釈率を変え(200倍、100倍、50倍、25倍など)で植菌、14~16時間培養して接合に用いる。(接合実験に用いる培養液には抗生物質を添加しない)
- (D) Donor 大腸菌：接合実施2日前に、DH5 (またはDH10BÅj等を宿主として、常法により一次ライブラリーを構築する。適当な抗生物質を含むLB寒天培地上に適度(1プレート当たり、 $1\sim 3 \times 10^3$)のコロニーが出るものが含まれるように調節しておく。接合実施前日に、コロニーが出たプレートに、1mlのLB培地を滴下、滅菌spreaderを用いてコロニー全体を懸濁し、1.5ml Sampling tubeに回収する。回収懸濁液20 µlをLB培地2mlに植菌して、14~16時間培養して接合に用いる。(接合実験に用いる培養液には抗生物質を添加しない) Negative Controlとしてプラスミドを含まない Donor大腸菌を同様に準備する。)
- (H) Helper大腸菌：プラスミドpRK2013を保持するHB101株を、frozen stockから、20 µg/ml Kanamycin含有LB寒天培地に展開。得られたコロニーを、LB培地2mlに植菌して、14~16時間培養して接合に用いる。(接合実験に用いる培養液には抗生物質を添加しない)

(2)接合実施

- 菌体混合：(R) Recipient (希釈の範囲内で増殖途上のもの)、(D) Donor、(H) Helperを200 µlずつ、1.5 ml Sampling tubeに入れ、12,000 × gで3分間遠心(常温)、上清を除き、200 µlの10mM MgSO₄で懸濁
- Filter上への滴下：クリーンベンチ内で、表面を乾燥させたTY寒天プレートに、滅菌したMillipore Filterを載せる。Filterに の懸濁液を50 µl載せる。培地表面が十分に乾燥されていれば、10分程度でfilter表面に菌体がひからびて固着する。
- 接合*：Filterを載せたTY寒天プレートを上下逆向きにし、28 °Cで4時間(野生型*M. loti*の世代時間程度)静置する。
- 再懸濁：800 µlの10mM MgSO₄を入れた1.5ml tubeに、Filterを入れ、vortex mixerでよく攪拌する。500rpm・5秒以下程度の軽い遠心で蓋の裏側についた懸濁液を落とした後、100 µlを取り出し525 µlの10mM MgSO₄を入れた1.5ml tubeに移し攪拌(100 × 希釈懸濁液)。懸濁液100 µlを900 µlの10mM MgSO₄を入れた1.5ml tubeに移し、攪拌することで、さらに10 × 希釈した懸濁液を得る。これを繰り返すことにより、1000 ×、10,000 ×、100,000 × 希釈懸濁液を得る。
- 選択培地への展開：希釈懸濁液100 µlを、選択TYプレート(大腸菌counter-selection用に100~200 µg/mlのphosphomycin、およびプラスミド選択用抗生剤を含むもの)に展開する。接合効率の計算を行う場合は、少なくとも2枚ずつの選択培地に展開する、非選択培地(Recipient TY-Pm100, Donor LB-Tetなど)を用いて、DonorおよびRecipientの含量を決定する。

(補注)

Recipient当たりの接合効率 = 選択培地上*M. loti*のCFU/ml ÷ 非選択培地上*M. loti*のCFU/ml

Donor当たりの接合効率 = 選択培地上*M. loti*のCFU/ml ÷ 非選択培地上Donor大腸菌のCFU/ml

100 × 希釈懸濁液100 µlをspreadした場合の、原培養液 CFU/ml = [得られたコロニー数] × 10³

1000 × 希釈懸濁液100 μl をspreadした場合、CFU/ml = [得られたコロニー数] × 10⁴
10,000 × 希釈懸濁液 100 μl をspreadした場合、CFU/ml = [得られたコロニー数] × 10⁵
100,000 × 希釈懸濁液100 μl をspreadした場合、CFU/ml = [得られたコロニー数] × 10⁶

6. 培養：28 ℃ で培養、5～6日程度でコロニーが出現する。

*ライブラリー構築の際、sibling (同じクローンに由来する複数のコロニー) の出現を避けるためには接合時間を制御する。ただし、単一のプラスミドを用いる際は、長時間となって構わない。

【2】標準法を低コスト化した簡便接合法

基本的に、【1】と同じ過程に従う。10mM MgSO₄の代わりに滅菌水またはTY培地を用いてもよい。変更ステップは以下の通り。

2. 寒天培地上での接合開始：クリーンベンチ内で、表面を乾燥させたTY寒天プレート上に、 の懸濁液を20 μl ずつ、相互に連続しないように滴下する。培地表面が十分に乾燥されていれば、滴下した懸濁液は約10～20分で菌体がスポット状に乾涸らびて固着する。(懸濁液200 μl を全てで10スポットとなる)
3. 接合：TY寒天プレートを上下逆向きにし、28 ℃ で4～16時間、静置する。
4. 再懸濁：800 μl 程度の10mM MgSO₄をスポット上に滴下し、滅菌したspreaderで固着した菌混合物を懸濁する。懸濁物を1.5ml tubeに回収し、vortex mixerでよく攪拌する。懸濁液、これを100～10,000 × 希釈した希釈懸濁液を作る。
5. 選択培地への展開：希釈懸濁液それぞれのうち100 μl を選択TYプレートに展開する。通常、100 × と10,000 × の希釈懸濁液を用いて大丈夫である。

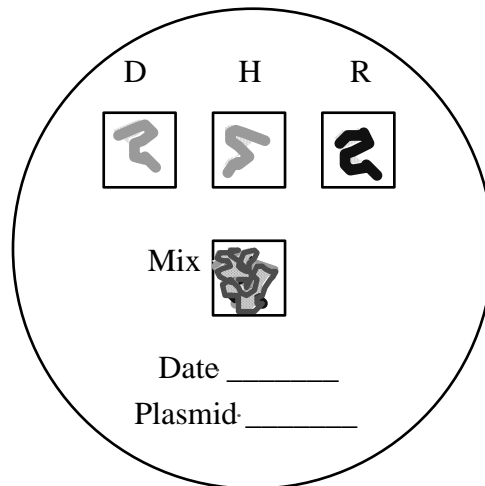
*一種類のプラスミドのみの導入を行う場合は長時間静置して構わない。

【3】低コストな超簡便接合法 (一種類のプラスミドのみの導入を行う場合)

前日までの準備

TY-プレート、選択用TY-プレート

- (R) Recipientミヤコグサ根粒菌：接合実施5～7日程度前にTY寒天培地にストリークし、十分量の菌体を得ておく。
- (D) Donor大腸菌：接合実施前日に、適当な抗生物質を含むLB寒天培地に選択培地にストリークし、十分量の菌体を得ておく。Negative Control用のプラスミドを含有しない大腸菌も適当な培地にストリークしておく。
- (H) Helper大腸菌：プラスミドpRK2013を保持するHB101株を、20 μg/ml Kanamycin含有LB寒天培地にストリークし、十分量の菌体を得ておく。



接合開始

1. 菌体混合：上図に示すように、TYプレート上に4つの区画を作り、準備した（R）Recipient（D）Donor、（H）Helperのプレートから、3種の菌を個別に白金ループで（ループに山盛り程度）、（Mix）混合区画に植え、用いた白金ループでよく混合する。同時に、3種それぞれを個別の区画に植え、成長能の確認に用いる。
2. 接合開始：菌体混合物を、28℃で一夜、静置する。
3. 選択培地への展開：混合区画から白金ループで菌を取り出し、選択TYプレート（大腸菌counter-selection用に100～200 μg/mlのphosphomycin、およびプラスミド選択用抗生物質を含むもの）にストリークする。
4. 培養：28℃で培養、5～6日程度でコロニーが出現する。（28℃で菌体混合に用いたTYプレートも同様に培養し、根粒菌および大腸菌に異常がないことを確認する）

【4】電気穿孔法（Electroporation）

〔準備するもの〕

TY培地 200 mlを 1 baffled flaskに入れたもの（2本）

滅菌遠心チューブ（250 mlで4,000 × gの遠心が可能なもの）2本

10% (v/v) glycerol 700 ml（200 mlを2本、100mlを3本にして滅菌しておく）

electroporation用セル（幅1mmか2mm）

〔方法〕

1. 前培養：MAFF303099のコロニーをTY液体培地1.5mlに植えたものを2本作製、28℃、150rpmで2overnight 振盪培養。
2. 培養：前培養液 1mlをTY液体培地200ml（1 baffled flask）に添加し、28℃、150rpmで14時間、培養する。

<Electro-competent Cellsの作製>

3. 14時間培養液（OD600=0.1～0.15程度）を滅菌遠心チューブに移し、4℃、4,000 × gで20分間遠心。（以下の記述は培養1本当たりのものである）
4. 上清を除き、氷上で冷やした10%Glycerol 200ml に懸濁（ピペッティング）後、遠心。
5. 上清を除き、氷上で冷やした10%Glycerol 100ml に懸濁後、遠心。