

# 本書の構成と使い方

## 本書の構成

### 1章 戦略を立てる

タンパク質を手に入れるためには、タンパク質のことを知らなければならない。実験でタンパク質を扱うなら必ず知っておきたいタンパク質の性質や、戦略の立て方を解説。

### 2章 発現系を選択する

原理を理解することが実験成功の秘訣。タンパク質発現系の種類とそれぞれの特徴を紹介し、各発現系のメカニズムを背景から解説。目的にあった発現系を選択するための知識を伝授。

### 3章 実験をする

実験操作の根拠がわかればトラブルに強くなる。まず各発現系における選択肢(細胞株やベクターなど)を紹介。続くプロトコルでは、具体的な操作や注意点、コツはもちろん、実験の「なぜ?」に応える解説が充実。トラブルシューティングも根拠から解説。

### 4章 ルールを知る

DNA組換え実験をするには、守らなければいけないルールがある。関係する法律や省令から、申請の仕方まで、具体例を挙げて解説。

## プロトコルの使い方

プロトコルの左段に実際の操作を記述。注意点や補足などがある場合「※○」が付いているので、対応する右段の解説を参照。

トラブルの「原因」と「原因の究明と対処法」の数字は対応しています。

**プロトコル**

- ※1 -80℃に保存してあるコンビテントセルを溶かす※1
- ※2 1.5 mL チューブに 100  $\mu$ L のコンビテントセル溶液を分注し、そこにあらかじめ作製しておいたベクター系列を 1  $\mu$ L ずつ加えて穏やかに混合する※2,3,4

※1 **原因** コンビテントセルを溶かすために激しくタッピングすると、大腸菌がダメージを負いコンビテンション率が低下する可能性がある。

※2 **原因** 加える DNA 量はすべて同量とし、コンビテントセルの 1/10 以下にする(今回の場合 10  $\mu$ L 以下)、それ以上加えるとコンビテンション率が低下する。

※3 **原因** ベクターを加えて混合するとき、激しくピペッティングまたはタッピングすると※1と同様にコンビテンション率が低下するので、穏やかに行う。

※4 コンビテンションがすでにわかっている場合は、希

プロトコルの右段には、**実験操作の注意点や根拠、コツ**などを解説。

**コンビテントセルの調製とベクターの導入** **トラブルシューティング**

**原因** コンビテントセルを LB 寒天培地に播いてもコロニーが生えない

**原因** ①グリセロールストックの大腸菌が死滅している  
②抗生物質の入った寒天培地を使用している

**原因の究明と対処法**

- ①ストック大腸菌の凍結融解を繰り返すと、大腸菌にダメージを与えることがあるので凍結融解は避ける。グリセロール溶液で保存している大腸菌は、凍ったままのものを白金耳の先で削り、寒天培地に塗り広げることでもコロニーが得られる。
- ②コンビテントセルは薬剤耐性がないので、抗生物質が入っていない寒天培地を用いる。

**原因** コンビテンション率が低い

### ▶▶ 遠心操作について

本書では、回転数(rpm)と重力加速度(G)を併記しています。回転数はプロトコルにて記したローターを用いた場合の数値を示しており、異なる半径のローターを用いる場合は重力加速度の数値に従って遠心操作を行ってください。

### ▶▶ “水”について

本書では、特に断わらない限り下のいずれかの水を使用しています。

**脱イオン水**: 逆浸透膜やイオン交換膜により塩、イオンを除去した一次純水

**超純水**: 一次純水を超純水用イオン交換樹脂に通し、殺菌、濾過後、比抵抗が18 M $\Omega$ ・cmを超える水