



## ミナトカモジグサの形質転換法

### <培地組成>

カルス誘導培地 1	1 L	終濃度
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	1 袋 (4.6 g)	
Thiamin hydrochloride	0.1 mg	
Pyridoxine hydrochloride	0.5 mg	
Nicotinic acid	0.5 mg	
Glycine	2 mg	
Myo-inositol	100 mg	
Sucrose	30 g	3.0%
2,4-D (1 mg/ml)	2.5 ml	2.5 mg/l
Phytigel	3 g	0.3%

pH 5.8 に調整し、オートクレーブする。

カルス誘導培地 2	1 L	終濃度
カルス誘導培地 1		
CuSO <sub>4</sub> (20 mM)	120 μl	

pH 5.8 に調整し、オートクレーブする。

MGL 培地	1 L	終濃度
Tryptone	5 g	
Yeast extract	2.5 g	
NaCl	5.2 g	
Mannitol	10 g	
L-glutamic acid sodium salt	2.32 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g	
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g	
Agar	10 g	1.0%

pH 7.2 に調整し、オートクレーブ後にアセトシリンゴン (終濃度 30 mg/l) と抗生物質を添加する。

感染培地	1 L	終濃度
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	1 袋 (4.6 g)	
Mannitol	10 g	
Sucrose	10 g	1.0%

pH 5.5 に調整し、オートクレーブする。使用時にアセトシリンゴン (終濃度 45 mg/l) を添加する。

### 選抜培地 1

カルス誘導培地 2 を pH 5.8 に調整し、オートクレーブ後に抗生物質\*<sup>3</sup>とクラフォラン (終濃度 250 mg/l) を添加する。\*3 ハイグロマイシンの場合、終濃度 40 mg/l

### 選抜培地 2

カルス誘導培地 2 を pH 5.8 に調整し、オートクレーブ後に抗生物質\*<sup>4</sup>とクラフォラン (終濃度 250 mg/l) を添加する。\*4 ハイグロマイシンの場合、終濃度 30 mg/l

<u>再分化培地</u>	<u>1 L</u>	<u>終濃度</u>
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	1 袋 (4.6 g)	
Thiamin hydrochloride	0.1 mg	
Pyridoxine hydrochloride	0.5 mg	
Nicotinic acid	0.5 mg	
Glycine	2 mg	
Myo-inositol	100 mg	
Sucrose	30 g	3.0%
Kinetin (1mg/ml)	200 $\mu$ l	0.2 mg/l
GA <sub>3</sub> (1mg/ml)	200 $\mu$ l	0.2 mg/l
Phytigel	3 g	0.3%

pH 5.8 に調整し、オートクレーブ後に抗生物質\*<sup>5</sup>とクラフォラン (終濃度 250 mg/l) を添加する。\*5 ハイグロマイシンの場合、終濃度 20 mg/l

<u>発根培地</u>	<u>1 L</u>	<u>終濃度</u>
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture	0.4 袋 (1.84 g)	
Thiamin hydrochloride	0.1 mg	
Pyridoxine hydrochloride	0.5 mg	
Nicotinic acid	0.5 mg	
Glycine	2 mg	
Myo-inositol	100 mg	
Sucrose	10 g	1.0%
Agar	6 g	0.6%

pH 5.8 に調整し、オートクレーブする。

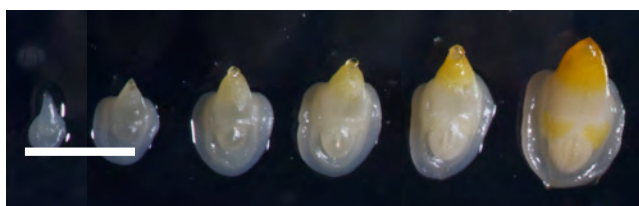
## <カルス誘導>

### 準備するもの

- ・ 土で育成してから 6-8 週間後の植物体
- ・ 種子滅菌用試薬（栽培法 p.1 参照）
- ・ 滅菌水
- ・ 50 mL チューブ
- ・ ピペット
- ・ 実体顕微鏡
- ・ ピンセット 2 本
- ・ 滅菌シャーレ
- ・ 培地（カルス誘導培地 1、2）
- ・ サージカルテープ

### 方法

- 1) 土で育成してから 6-8 週間後の植物から未熟種子<sup>\*6</sup>を採取し、滅菌する  
(栽培法 p.1参照)。\*6 胚乳が形成されているがまだ柔らかいものが良い
- 2) 実体顕微鏡下で滅菌した未熟種子から胚<sup>\*7</sup>を取り出し、カルス誘導培地 1 に置床する。蓋をしてサージカルテープを巻き、27°C・暗所で 14 日間培養する。  
(栽培条件によりカルス誘導に最適なステージは異なりますのでご注意ください。)



\*7 左から 2～3 番  
目がエンブリオジェ  
ニックカルス誘導に適  
した未熟胚 bar = 1  
mm

- 3) クリーム色のエンブリオジェニックカルスのみをカルス誘導培地 2 に移植し、同条件で 10 日間培養する。



未熟胚をカルス誘導培地に置  
床してから 14 日後に形成され  
たエンブリオジェニックカル  
ス bar = 1 mm

- 4) 増殖したカルスを新しいカルス誘導培地 2 に移植し、同条件でさらに 7 日間培養したものをアグロバクテリウム感染に用いる。

## <アグロバクテリウムの感染>

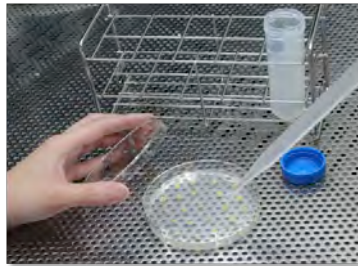
### 準備するもの

- ・ 未熟胚から誘導したカルス
- ・ 導入したいプラスミドを組み込んだアグロバクテリウム
- ・ 培地 (LB 液体培地、MGL 培地、感染培地)
- ・ アセトシリンゴン
- ・ 50 ml チューブ
- ・ 葉匙
- ・ 振とう機
- ・ 滅菌シャーレ (9 cm)
- ・ 滅菌濾紙 ( $\phi$ 90 mm)
- ・ ピンセット
- ・ ピペット
- ・ パラフィルム

### 方法

- 1) 形質転換に用いるアグロバクテリウムのグリセロールストックを掻き取り、LB 液体培地 (抗生物質入り) に懸濁し、 $28^{\circ}\text{C}$ ・120rpm で一晩培養する。
- 2) 1) のプレカルチャー50 $\mu$ l を MGL 培地にストリークし、 $28^{\circ}\text{C}$ で一晩培養する。
- 3) 50 ml チューブに感染培地 10 ml を分注し、アセトシリンゴン (終濃度 45 mg/l) を添加する。

- 4) 滅菌シャーレに滅菌濾紙を1枚敷き、3)の感染培地のうち750 $\mu$ lを染み込ませておく。
- 5) 2)のアグロバクテリウムを薬匙で掻き取り、残りの感染培地に懸濁し、28 $^{\circ}$ C・220rpmで45分間振とう培養する。
- 6) 懸濁液がOD<sub>600</sub>=1.0になるように感染培地で希釈し、終濃度45 mg/lになるようアセトシリンゴンも添加する。
- 7) カルスに懸濁液をかけてから5分間置く。  
※ 9cmプレート1枚あたり懸濁液13mlが適当。



- 8) カルスの余分な水分を滅菌濾紙で除去した後、4)のシャーレにカルスを移して蓋をしたらパラフィルムを播き、27 $^{\circ}$ C・暗所で2日間共存培養する。

## <形質転換カルスの選抜および植物体再分化>

### 準備するもの

- ・ アグロバクテリウムと共存培養させたカルス
- ・ 培地（選抜培地 1、2、再分化培地、発根培地）
- ・ ピンセット
- ・ サージカルテープ
- ・ グロースチャンバー
- ・ その他（土植えや植物育成に必要なもの）

### 方法

- 1) 共存培養したカルスは選抜培地 1 に移植し、蓋をしてサージカルテープを播き、27°C・暗所で 14 日間培養する。
- 2) さらに選抜培地 2 に移植し、同条件で 14 日間培養する。※同一カルス由来のものは同じ区画に置く。褐変化やアグロが増殖したカルスは継代しない。
- 3) 褐変化せずに抗生物質耐性を示すカルスのみを再分化培地へ移植し、25°C・16h 明期/8h 暗期<sup>\*1</sup>のグロースチャンバーで 14 日間培養する。  
※同一カルス由来のものは同じ区画に置く。
- 4) 再生したシュートは発根培地へ移植し、同条件で 14 日間培養する。シュートを形成していないカルスは新しい再分化培地に継代してさらに 14 日間培養する。※同一カルス由来のシュートは同じ区画に置く。
- 5) 発根した個体は土へ移植した後、22°C<sup>\*2</sup>・20h 明期/4h 暗期の条件下で育成し、T<sub>1</sub> 種子を収穫する。  
※同一カルス由来の再分化個体は同じ形質転換体ラインとみなす。

※1 現在当室では20h 明期/4h 暗期を使用

※2 室温設定は22°C設定だが棚面の実測値は25°C程度

## 参考文献

Alves SC. et al. (2009) A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. Nature Protocols 4:638-649.

Vain P. et al. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of the temperate grass *Brachypodium distachyon* (genotype Bd21) for T-DNA insertional mutagenesis. Plant Biotechnology Journal 6:236-245.

Brachypodium Community JAPAN 日本語プロトコール  
<http://brachy.bmep.riken.jp/wp/>