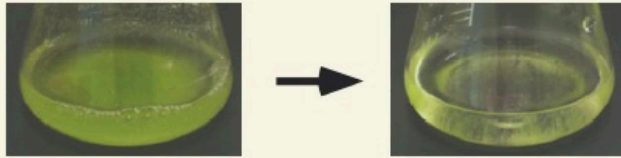


# シロイヌナズナT87培養細胞の形質転換方法

## T87の準備

- ▶ 継代1週間目のT87培養細胞を1.0 mmステンレス製試験篩（野中理化器）で漉し、フレッシュなJPL培地で10倍希釈する。



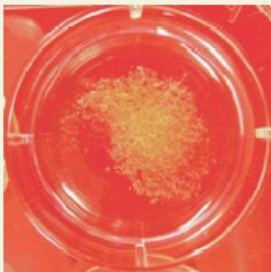
- ▶ 2~3日間、22℃、120 rpmで振とうする。

## アグロバクテリウムの準備

- ▶ プレートからアグロを液体培地に接種し、30℃にて二晩、振とうし前培養を行う。
- ▶ 前培養液を用いて、30℃にて一晩、振とうし本培養を行う。
- ▶ 500  $\mu$ lのアグロを集菌し、JPL培地で洗浄する（3回）。
- ▶ 500  $\mu$ lのJPL培地に再懸濁する。

## T87の形質転換

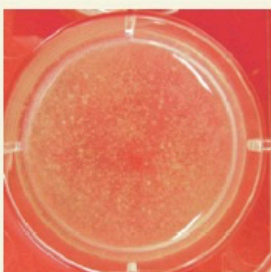
- ▶ 6穴プレートにT87を5 ml、アグロを50  $\mu$ l入れ120 rpm、22℃で2日間共培養する。



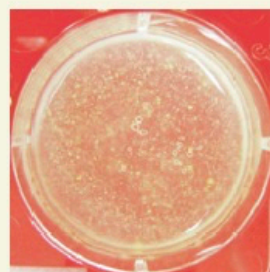
図よりも細胞が少なくないように注意する。



100 mlの三角フラスコでも良いが、共培養の際、図のように細胞が中心部に集まってしまい操作しづらい。



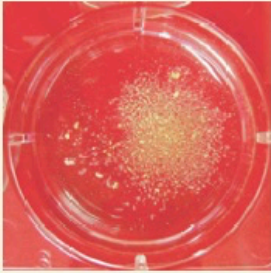
通常、図のようにアグロが増殖し培地が濁る



アグロの過度な増殖は細胞へのダメージが大きい。これ以上の増殖は避けること。

## T87の形質転換（続き）

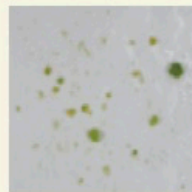
- ▶ 共培養液を15 mlチューブへ移し、600 rpmで30秒間遠心する。上清を除き3 mlのJPL培地を加え、再懸濁する。この操作を3回繰り返す。
- ▶ 5 mlのJPL液体培地（クラフォラン入り、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）に細胞を再懸濁し、6穴プレートで3~4日間、振とう培養する。



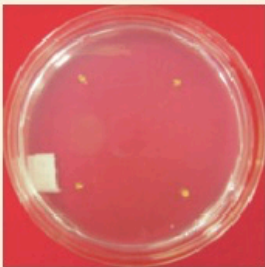
- ▶ 培養液を15 mlチューブへ移し、1回洗浄した後、上清を除き2 ml程度とし、予め滅菌しておいたナイロンメンブレン（Colony/Plaque Screen, PerkinElmer, NEF978Y）を敷いたCIM/15 cmプレート（クラフォラン入り、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）上に均一に広げる。
- ▶ 3日後、CIM/15 cmプレート（クラフォラン、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・カナマイシン、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）にメンブレンごとトランスファーする。  
（クラフォラン、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・カナマイシン、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）へ移植し、更に2週間培養する。



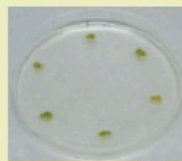
→  
更に培養



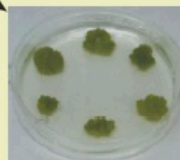
- ▶ 約2週間培養し、緑色のカルスになったものを、新しいCIM/9.0 cmプレートに移植する



### 通常の形質転換T87



→  
2週間の培養



- ▶ 緑色のカルスの一部をピンセットでピックアップしてJPL液体培地で継代する。  
（クラフォラン、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ・カナマイシン、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

\* 選抜マーカーにハイグロマイシンを用いる場合には10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で行う。

## CIM培地の調製

|                 |       |
|-----------------|-------|
| B5培地用混合塩類1リットル用 | 1 袋   |
| B5 vitamin      | 1 ml  |
| sucrose         | 30 g  |
| MES             | 0.5 g |
| NAA             | 1 ml  |
| Bact Agar       | 6 g   |

---

DWで1000mlにMessUp

KOHでpHを5.7に調整する。

B5培地用混合塩類1リットル用

ガンボークB5培地用混合塩類 (和光純薬 399-00621)

B5 vitamin      Gamborg`s Vitamin Solution 1000x (SIGMA G 1019)