

# トマト遺伝子導入実験プロトコール



2005.6/27改正版

## 形質転換スケジュール

月	火	水	木	金
		<u>トマト播種</u>		
<u>シングルコロニーの培養</u>		<u>トマト前培養</u> <u>感染用アグロの培養</u>		<u>感染</u>
<u>除菌・選抜</u> <u>(1回目)</u>				



以降2週間おきに選抜

700mg/300粒

滅菌



70% EtOH 2分振とう



1% 次亜塩+200  $\mu$  l/L tween  
10分振とう



# 洗浄

## クリーンベンチ作業



SDWで1分間×5回洗浄



Point

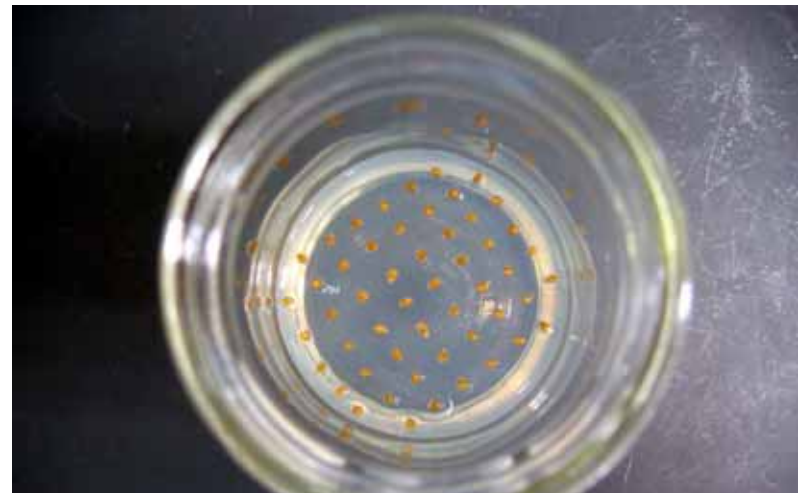
種子の沈殿が洗浄の目安  
洗浄が甘いと発芽が悪くなる



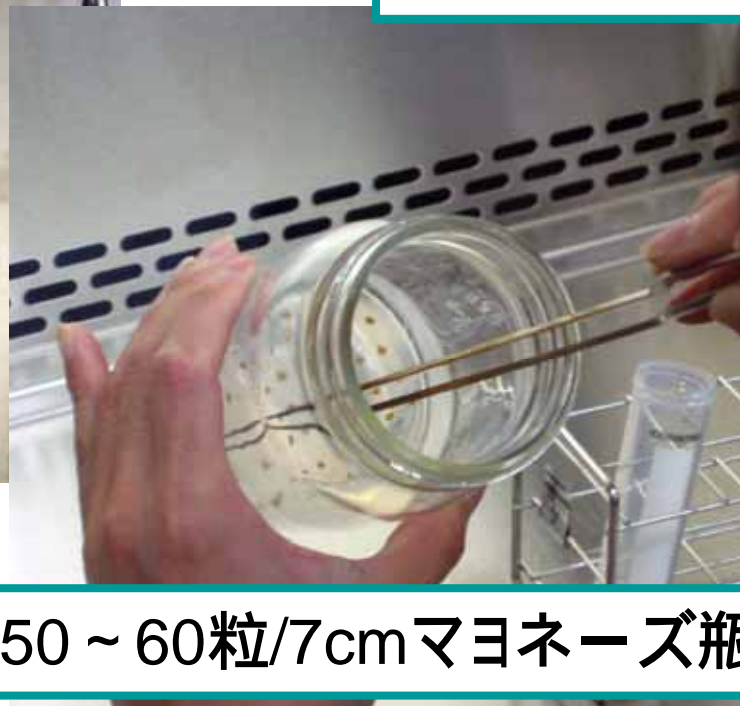
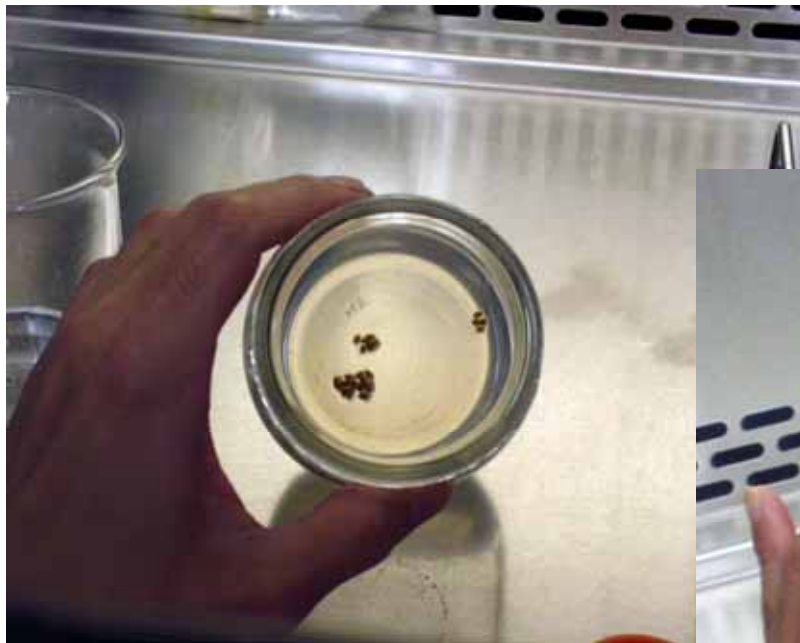
# 播種

## クリーンベンチ作業

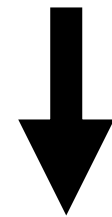
1/2MS+3%Suc+0.8%Agar pH5.8  
25℃, 16時間の日長



50粒播種するとこんな感じ



50 ~ 60粒/7cmマヨネーズ瓶



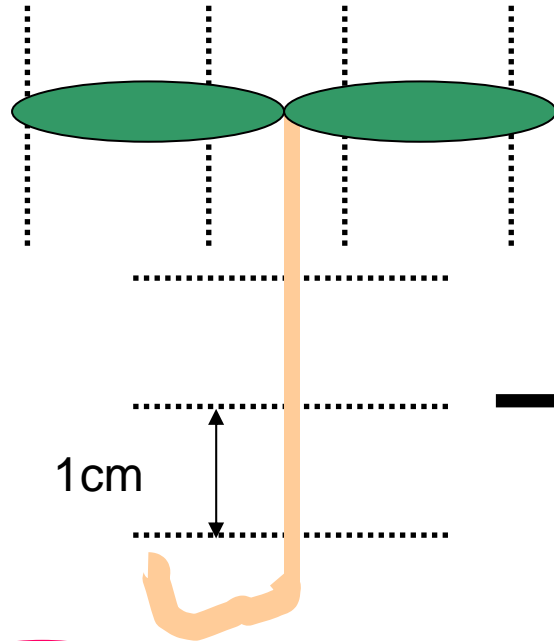
約1週間培養

## 前培養

クリーンベンチ作業

Point

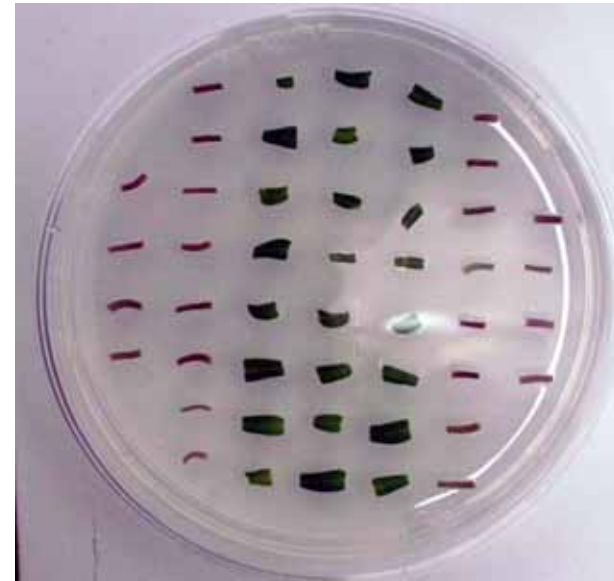
本葉が出たものはNG  
作業中乾かないように注意!!



湿らした  
紙へ  
一時置き

Point

子葉は必ず背軸面が  
培地に触れるように置床



Point

作業は湿らせた紙の上で  
子葉を傷つけないように  
胚軸は下の方を使う  
子葉の両端を切る

MS+2mg/l Zeatin+3% Suc+0.8% Agar  
48切片/1シャーレ(9cm深底シャーレ)  
パラフィルムでシール  
2日間 25℃, 16h日長で培養

# アグロバクテリウムの調整

前培養; LB プレート(+抗生物質)にグリセロール  
ストックのアグロバクテリウムをストリーク

↓ 2日間 28 暗所

感染用培養; シングルコロニーをLB プレート  
(+抗生物質)にストリーク

↓ 2日間 28 暗所

## Point

- ・必ず増殖中(盛り上がる前)の菌プレートを用意する  
(導入した遺伝子によって増殖速度が微妙に異なるため、  
培養時間をずらしたプレートを何枚か準備と良い)

# 感染

注) 改善の余地あり

## 菌液の準備

MS液体培地 50ml  
+ アセトシリゴン (10mg/L)

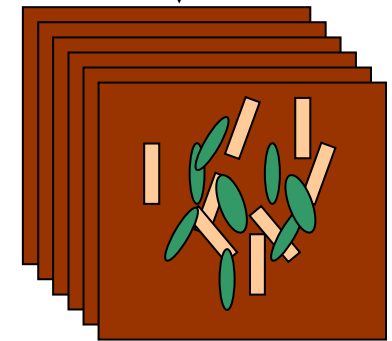
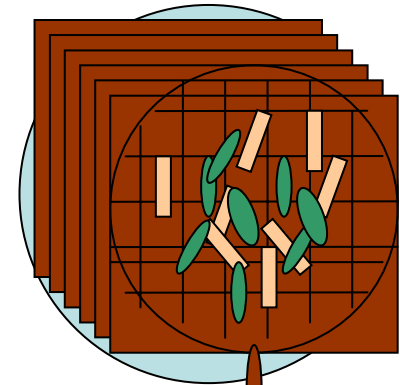
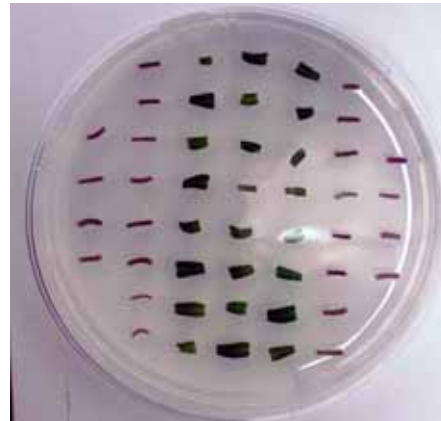
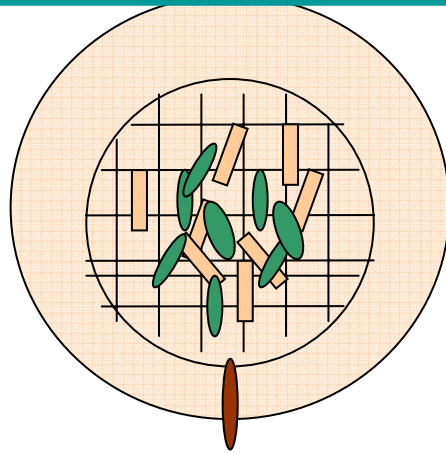
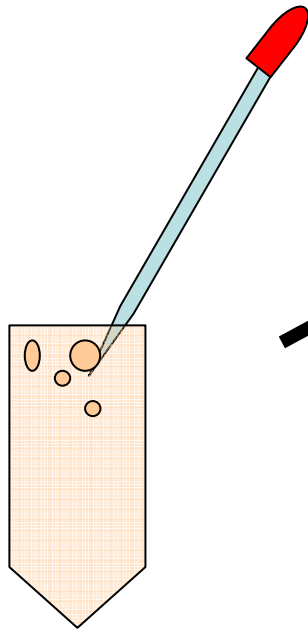
スパーテルで集菌し、  
ピペッティング

切片を滅菌した茶漉しに入れ  
菌液内で1分間攪拌

滅菌したキムタオルで  
水分除去

元の培地に ( 3日間, 21℃, 遮光 )

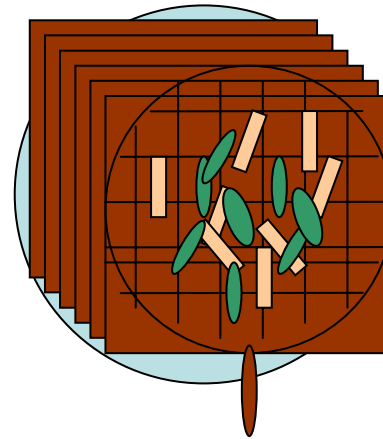
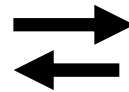
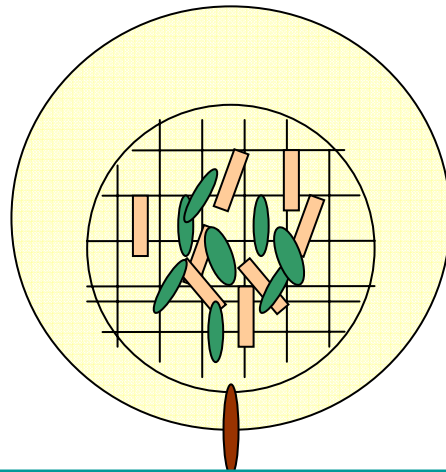
さらに水分除去



# 除菌

注) 改善の余地あり

洗浄 MS液体培地  
除菌 MS液体培地+Cb 500mg/l



選抜へ

2週間, 25 16h日長

2,3分ゆすりながら洗う  
洗浄1回 / 除菌1回

水分除去

Point

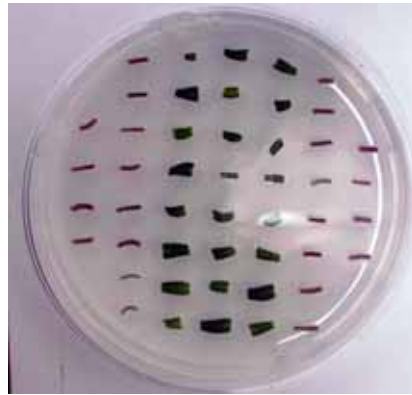
傷をつけないように気をつける

# 選抜

## 選抜1、2回目(カルス誘導)

カルス誘導培地

MS+2mg/l Zeatin+抗生物質+250mg/l Cb+3% Suc+0.8% Agar



Point

サージカルテープでシール(選抜1)

パラフィルムでシール(選抜2)

24切片/1シャーレ

子葉は表面を上・少し培地に埋め込む

## 選抜3回目(再分化誘導)

再分化誘導培地

MS+1mg/l Zeatin+抗生物質+250mg/l Cb+3% Suc+0.8% Agar

パラフィルムでシール

1シャーレあたり20切片以下

3回目の選抜ではカルスの反対側の切片を切り落とす

Point

# 選抜



## 選抜4回目(シュート伸長・発根)

シュート伸長、発根誘導培地

MS+1mg/l IBA+抗生物質+125mg/l Cb+3% Suc+0.8% Agar

カルス化した切片をマヨネーズ瓶に移す

## 選抜5回目(発根)

発根誘導培地

MS+0.5mg/l IBA+抗生物質+125mg/l Cb+3% Suc+0.8% Agar

### Point

シュートの条件: 発根したカルスから取る・大きさ(2cm程度)

発根を阻害されるのでカルスはきれいに取り除く

アグロとエスケープを防ぐため、少なくとも3回は頂芽を植継ぐ

花芽は切り落とす!!



# 馴化



## Point

- ・根を傷つけない
- ・ロックウールに馴化した苗を容器に入れサランラップで覆い、1週間程度かけてサランラップをあけて湿度を下げていく。
- ・土でも馴化できるが、湿度には十分注意する。
- ・水やりは最初の2週間は水のみ、その後1000倍ハイポネックス/週1

# 効率

## 植物形質転換用バイナリーベクター

Liu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 6535–6540, (1999)



(平均インサート長: 80Kb)

1ベクターあたり 感染: 240切片  
馴化できた系統数: 0 ~ 21系統作出

カルベニシリンよりMeropenemの方が

アグロバクテリウムの増殖を抑えるとの報告もあります!!

**Yoichi Ogawa · Masahiro Mii** (2004) *Arch Microbiol* 181 : 331.336

Screening for highly active  $\beta$ -lactam antibiotics against *Agrobacterium tumefaciens*

Point