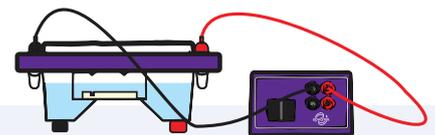

Blue&Green Fluorescent Protein을 이용한 E.coli의 형질전환

Transformation of E. coli with Green & Blue Fluorescent Proteins

ED222

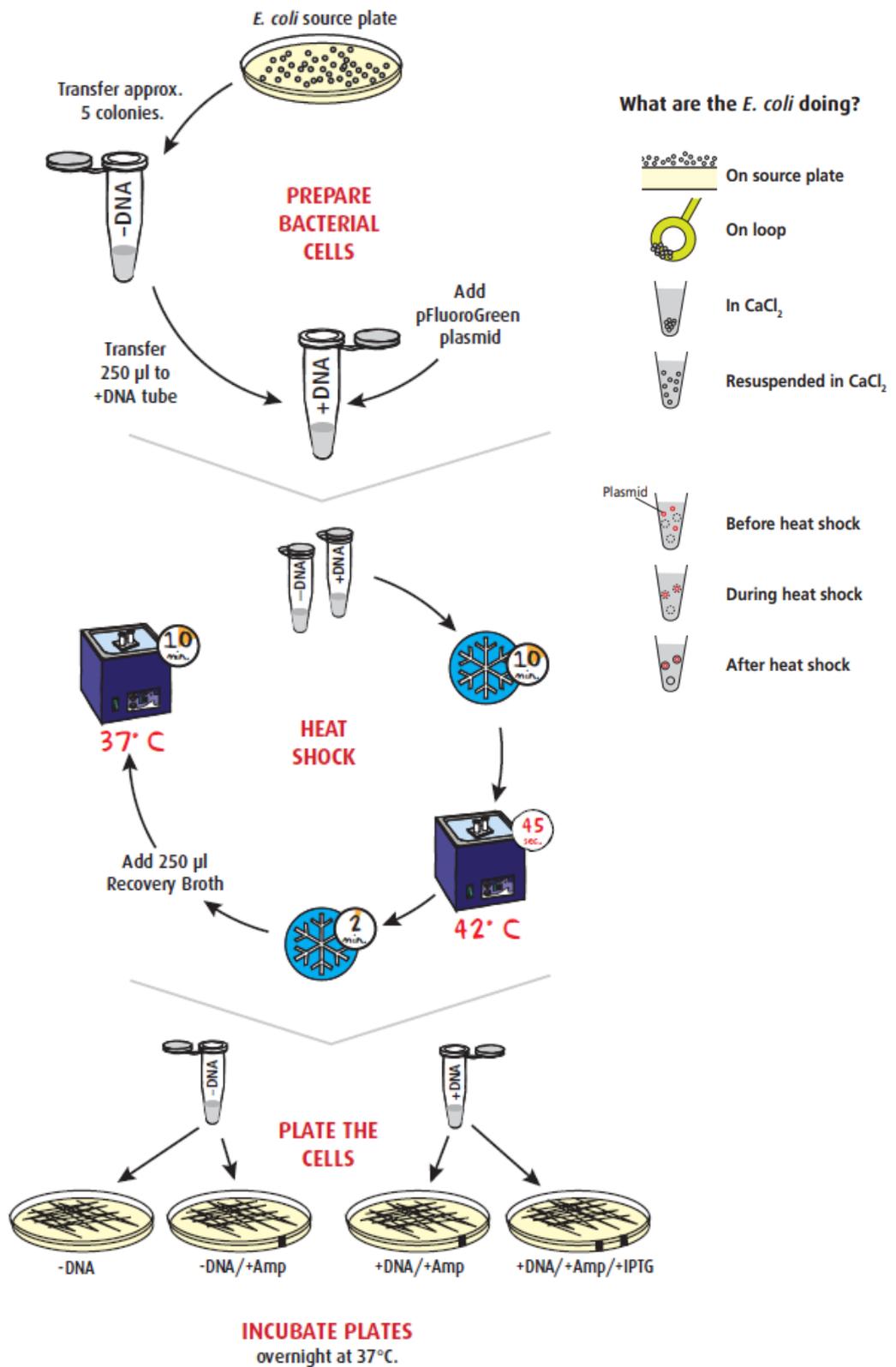


☎ 02-929-1110 ✉ info@koreasci.com

🛒 www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

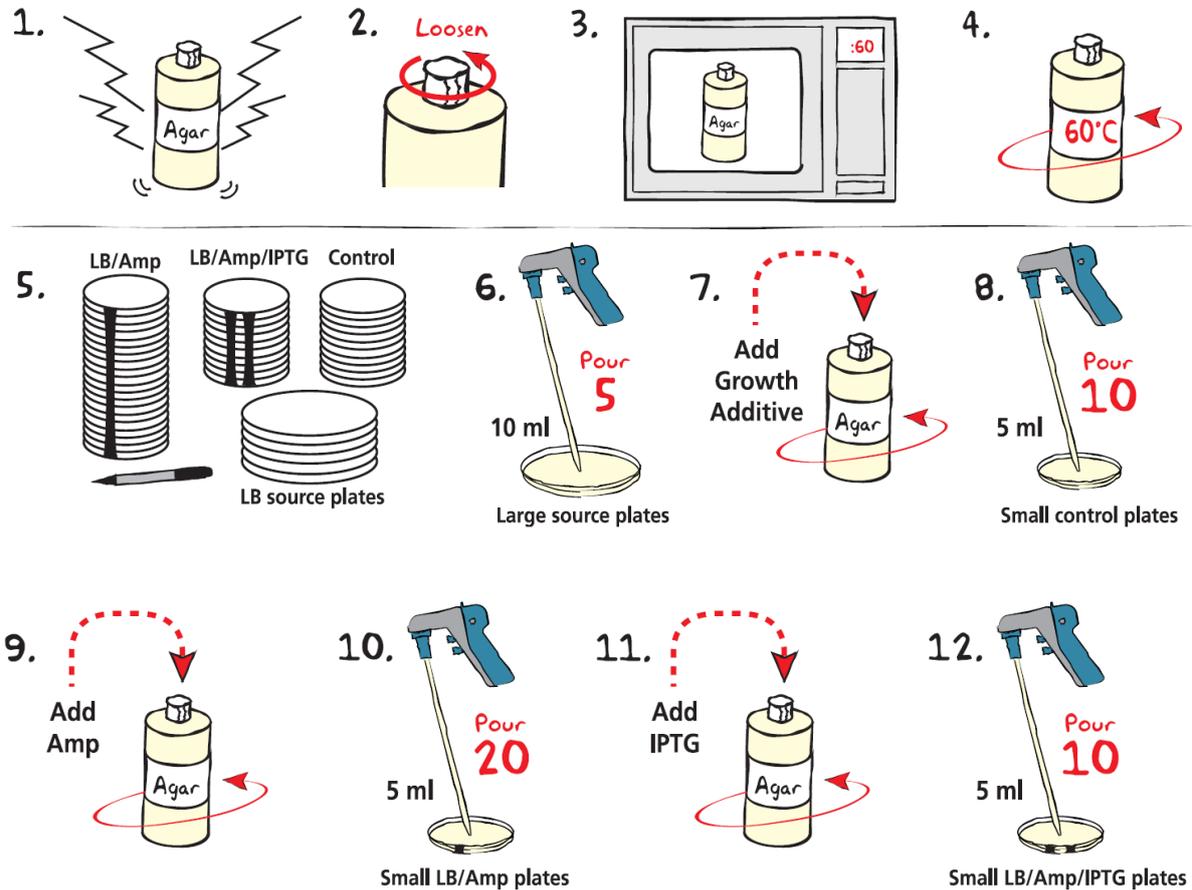
실험 전반적인 개요



Blue&Green Fluorescent Protein을 이용한 E.coli의 형질전환) #ED222

실험 전 준비 과정 #1

ReadyPour Luria Broth 1 개로 LB source plate 5 개, X-Gal plate 10 개, X-Gal/Amp plate 20 개를 만들 수 있습니다.



- 고체 상태의 ReadyPour LB Agar 를 손으로 쥐어짜고 흔들어 조각조각 냅니다.
- 뚜껑을 돌려 느슨하게 하여 공기가 통하게 만들되, 뚜껑을 열어버리진 않도록 합니다. 이렇게 해야 열을 가하는 동안 증기가 날라가지 않게 됩니다.

주의: 뚜껑을 공기가 통하게 느슨하게 하지 않으면 가열 중에 폭발할 위험이 있습니다.

- 전자레인지에 60 초 정도를 돌려 Agar 를 녹입니다. 전자레인지에서 병을 빼내 돌려가며 섞이게 하고 30 초 간격으로 다시 가열하여 완전히 녹을 때까지 과정을 반복합니다. (완전히 용해되면 투명해지고 작은 입자들은 없어지게 됩니다.)
- 조심스럽게 돌려가며 60°C 까지 식힙니다.
- Agar 용액이 식는 동안 작은 페트리 디쉬(60x15mm) 20 개에 마커펜으로 선을 그어 표시를 합니다. 이렇게 마킹된 플레이트는 LB/Amp plate 로 사용될 것입니다. 10 개의 페트리 디쉬를 쌓아 두 줄을 긋습니다. 이것은 LB/Amp/IPTG plate 로 사용될 것입니다. 나머지

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

Blue&Green Fluorescent Protein을 이용한 E.coli의 형질전환) #ED222

10 개의 페트리디쉬는 표시하지 않습니다. (5 개의 큰 페트리디쉬는 LB source plate 로 써야하기에 따로 챙겨놓습니다.)

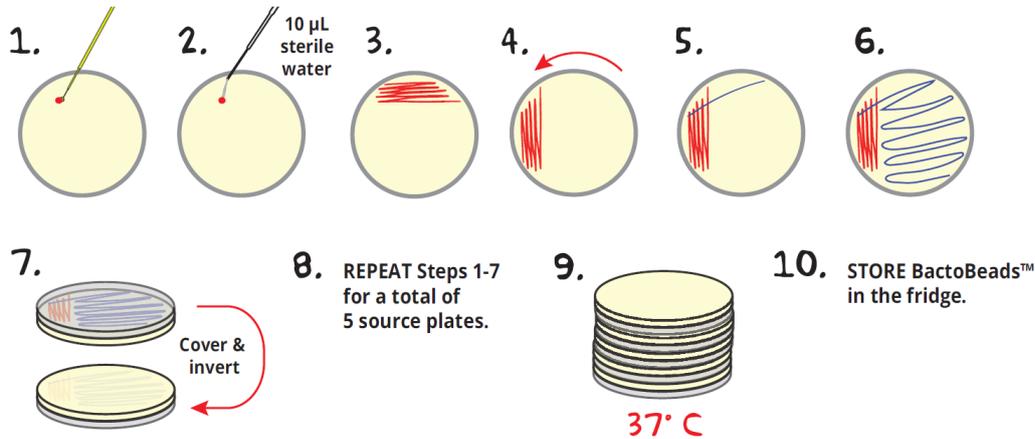
6. 어느 정도 식힌 ReadyPour Agar 를 5 개의 큰 페트리디쉬(source plate) 각각에 10mL 씩 넣습니다.
7. Growth Additive 튜브에 들어있는 모두를 식힌 ReadyPour Agar 에 넣습니다. 뚜껑을 닫고 병을 돌려가며 섞습니다. 주의: Agar 가 식었을 때만 첨가합니다. 앰피실린과 IPTG 같은 시약은 높은 온도에서 분해되기에 주의하십시오.
8. **표기하지 않은** 10 개의 페트리디쉬에 Agar 5mL 를 붓습니다.
9. Ampicillin 모두를 남아있는 ReadyPour Agar 병에 넣고 뚜껑을 닫아 흔들어 섞습니다.
10. 한 줄로 그은 20 개의 작은 페트리디쉬에 섞은 LB/Amp medium 을 5mL 씩 넣습니다.
11. IPTG 용액 모두를 ReadyPour Agar 병에 넣고 뚜껑을 닫아 잘 섞습니다.
12. LB/Amp/IPTG 배지액 5mL 를 두 줄을 그은 10 개의 작은 페트리디쉬에 넣습니다.
13. 뚜껑을 닫고 LB-agar 플레이트가 굳을 때까지 기다립니다. 최상의 결과를 위해 하룻밤 실온에 놔두는 것을 추천드립니다.
14. 실온에서는 2 일이상 보관하면 안되며 보관 시에 플레이트를 뒤집고 밀봉되는 비닐에 넣어 마르지 않게 합니다.

주의: 준비한 후 사용예정일이 2 일이 넘어가는 경우 비닐에 넣어 4°C 냉장고에 보관합니다. 사용 전 30 분 전에 냉장고에서 꺼내 37°C 인큐베이터에 30 분간 따뜻하게 합니다.

Blue&Green Fluorescent Protein을 이용한 E.coli의 형질전환) #ED222

실험 전 준비 과정 #2 (E.coli source plate 준비)

좋은 소스 플레이트를 만드는 것은 성공적인 형질전환 실험의 토대가 됩니다. 도말(streaking)은 박테리아 세포를 연속적으로 희석시켜 박테리아 콜로니를 분리합니다.



1. BactoBead 한 개를 일회용 멸균 루프를 사용해 병에서 빼냅니다. 큰 페트리 디쉬(LB source plate)의 가장자리에 비드를 옮깁니다. 병의 뚜껑을 재빨리 닫아 공기의 수분노출을 최소화 합니다.
 2. 10ul 의 증류수를 알갱이에 떨어뜨립니다.
 3. 루프를 사용해 용해된 BactoBead 를 앞뒤로 움직여 촘촘히 지그재그 선을 그어가며 약 1.5cm 너비가 되도록 도말합니다. 이 단계가 끝나면 플레이트 상단부에 박테리아의 밀집된 용액이 퍼져 있어야 합니다.
 4. 플레이트를 왼쪽으로 90 도 회전시킵니다. 사용하지 않은 면이 아가 쪽을 향하게 루프를 돌립니다.
 5. 루프의 깨끗한 면을 첫 도말한 부위의 전체 너비에 통과시킵니다. 이 교차지점은 상단부분이어야 합니다.
 6. 루프를 유지하고 1 차 도말부분을 건드리지 않고 루프를 플레이트의 앞뒤로 움직입니다. 3 단계 때와는 다르게 지그재그 선은 널널해야 합니다. 7-10 번의 지그재그 이동을 추천합니다. 주의: 이 단계에서 루프이동 시 가장자리 부분에서 연결이 끊어지지 않도록 루프를 유지합니다. 첫 번째 도말에서 박테리아가 루프에 끌려나오지 않도록 합니다.
 7. 뚜껑을 닫고 뒤집기 전에 5 분간 기다립니다.
 8. 4 개의 플레이트에 위 과정을 반복해 총 5 개의 소스 플레이트를 만듭니다.
 9. 16-20 시간 동안 37°C에서 뒤집어 배양합니다.
 10. 남은 BactoBeads 는 고무마개를 잘 닫아 냉장고에 보관합니다.
- ★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 당일 준비 과정

1. 37°C와 42°C에서 항온수조를 유지합니다; 인큐베이터는 37°C
2. 얼음 또는 얼음 물 수조를 각 그룹당 준비합니다. 작은 얼음 조각은 열충격(heat shock) 이후에 박테리아를 빠르게 식혀줍니다.
3. CaCl₂ 500μL 씩 10개의 원심분리기 튜브에 넣고 각조별로 나눈 후 얼음에 꽂아둡니다.
4. Recovery Broth를 1.5mL 씩 10개 그룹의 각 튜브에 분주하고 실온에 놔둡니다.

주의: Recovery Broth를 분주하는동안 멸균상태를 유지합니다.

pGFP와 pBFP Plasmid DNA의 준비

플라스미드 DNA는 실험 전날에 제조하여 4°C에서 보관하셔도 됩니다.

5. pGFP와 pBFP plasmid DNA의 튜브를 얼음에 꽂아놓습니다.
6. 10개의 원심분리기 튜브에 "pGFP"라 표기하고 다른 10개의 원심분리기 튜브에는 "pBFP"로 표기합니다.
7. 분주하기 전에 각 튜브 안 샘플이 모두 바닥으로 모일 때까지 손가락으로 툭툭 칩니다.
8. 마이크로 피펫을 사용해 원심분리기 튜브에 plasmid DNA 12ul를 분주합니다.

주의: 학생들은 10μL를 형질전환 실험에서 사용하게 됩니다.

9. 튜브의 뚜껑을 덮고 얼음에 꽂아 둡니다.

- 각 조별 나눠줄 품목

E.coli source plate : 공유

CaCl₂ 튜브(1ml) 1개, pGFP, pGFP plasmid DNA 1개, Recovery broth 튜브 1개(1.5mL)

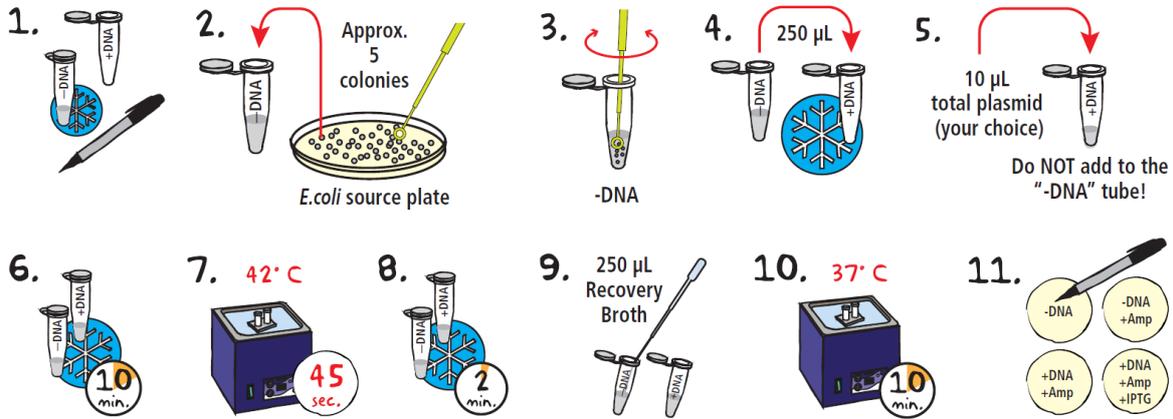
한 줄로 그어진 페트리디쉬 2개, 두 줄로 그어진 페트리디쉬 1개,

줄이 그어지지않은 페트리디쉬 1개

1ml 피펫 4개, 일회용 멸균 루프(Inoculating loop) 2개

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

GFP와 BFP를 이용한 E.coli 형질전환



1. 차가운 CaCl₂ 원심분리기 튜브를 "-DNA"로 빈 원심분리기 튜브를 "+DNA"로 표기합니다.
2. E.coli source plate에서 대략 5개의 콜로니(1-1.5mm 크기)를 멸균 루프를 이용해 "-DNA" 튜브에 넣습니다.
3. 루프를 돌려가며 세포가 떨어지게 합니다. 빨아 당겼다 놔다하는 피펫팅으로 CaCl₂용액에 잘 섞여 뭉침이 없도록 합니다.
4. 잘 섞인 용액 250µL를 "+DNA"로 표기한 튜브에 옮겨 넣고 얼음에 꽂아둡니다.
5. 10µL GFP 또는 10µL pBFP 또는 두 가지 모두 5µL씩을 "+DNA" 튜브에 넣고 잘 섞습니다.
*주의: "-DNA" 튜브에는 넣지 않도록 합니다.
6. 10분간 얼음에서 배양합니다.
7. 42°C의 항온수조에서 정확히 45초동안 담귀놓습니다.
8. 빠르게 얼음으로 튜브를 넣고 2분간 놔둡니다.
9. Recovery Broth 250µL를 각 튜브에 넣고 잘 섞습니다.
10. 37°C 항온수조에서 10분간 배양합니다.
11. 기다리는동안 4개의 아가배지 페트리디쉬 바닥에 다음과 같이 표기합니다. 글씨는 작게 구석부위에하여 콜로니관찰에 영향을 끼치지 않도록 합니다.

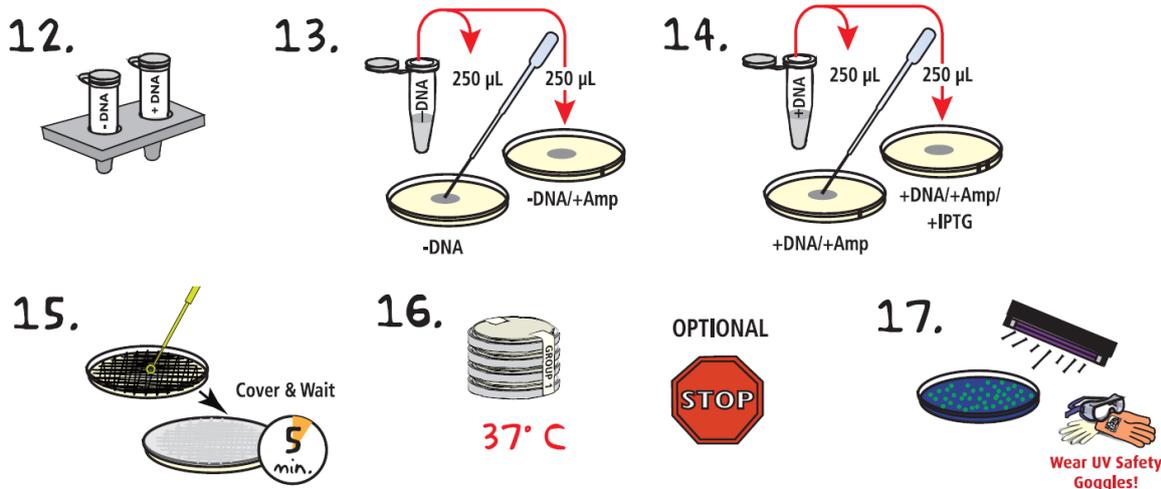
-DNA (줄을 긋지 않은 페트리디쉬)

-DNA/+Amp (줄을 한 개 그은 페트리디쉬)

+DNA/+Amp (줄을 한 개 그은 페트리디쉬)

+DNA/+Amp/+IPTG (줄을 두 개 그은 페트리디쉬)

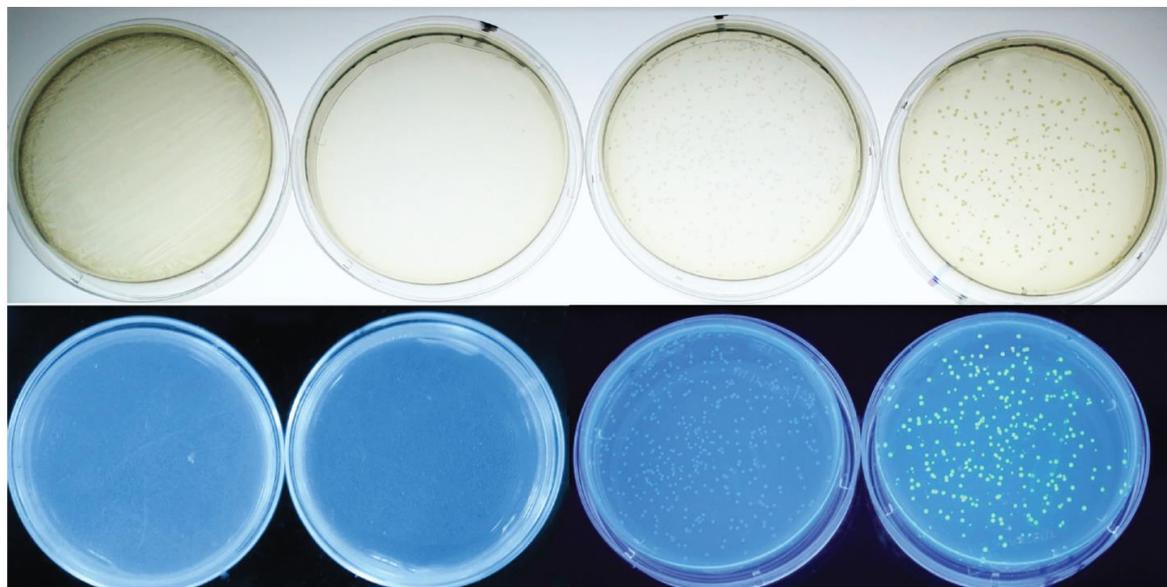
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.



12. 항온수조에서 튜브를 빼내 실험테이블 위에 올립니다.
13. "-DNA" 튜브에서 250uL recovered cell을 -DNA 플레이트와 -DNA/+Amp 플레이트 중앙에 넣습니다.
14. "+DNA" 튜브에서 250ul recovered cell을 +DNA/+Amp 플레이트와 +DNA/+Amp/+IPTG 플레이트의 중앙에 넣습니다.
15. 일회용 멸균 루프를 이용해 플레이트 전체에 퍼지도록 도말합니다. -DNA 샘플과 +DNA 샘플의 도말 시에 새 루프로 바꿔서 사용하여 서로 오염되어 섞이지 않도록 합니다. 플레이트 표면 전체에 고르게 퍼졌는지 확인하고 아가배지에 cell suspension이 잘 흡수되도록 뚜껑을 덮고 5분간 놔둡니다.
16. 플레이트를 서로 쌓아서 테이핑으로 함께 묶습니다. 묶인 플레이트에 실험자의 그룹을 적습니다. 세포가 흡수된 플레이트를 뒤집어 37°C 인큐베이터에 하룻밤정도(16-20시간) 놔둡니다. 인큐베이터가 없다면 실온에서 대략 24-48시간 놔두면 콜로니가 형성됩니다.
17. 형질전환과 control 플레이트를 관찰하고 결과(콜로니 수, 색깔)를 기록합니다.

Experiment Results and Analysis

TRANSFORMATION



-DNA
plated with
non-transformed cells
(no DNA)

Result: No fluorescent cells visible. White colonies. Will likely look like a smeared layer of cells (lawn).

Demonstrates: Host bacterial cells are viable in the absence of ampicillin.

-DNA/+AMP
plated with
non-transformed cells
(no DNA)

Result: No growth
Demonstrates: Cells are sensitive to ampicillin. Without pGFP, they are not ampicillin-resistant.

+DNA/+AMP
plated with
transformed cells
(pGFP or pBFP)

Result: white colonies. May look like a smeared layer of cells.

Demonstrates: Cells become resistant to Ampicillin when transformed with the pGFP.

GFP protein is not produced in the absence of IPTG.

+DNA/+AMP/+IPTG
plated with
transformed cells
(pGFP or pBFP)

Result: Individual colonies that will fluoresce when exposed to long wave UV light.

Demonstrates: Cells become resistant to Ampicillin when transformed with the pGFP. Production of GFP protein is turned on in the presence of IPTG.