

The *gpt* Assay of *gpt* delta Transgenic Mouse

(Ver. 4.01ja / 2000.01.21)

大腸菌 *gpt* 遺伝子は guanine phosphoribosyltransferase をコードしている。この酵素は、プリンサルベージ経路においてグアニンのフォスホリボシル化を触媒している。しかし 6-thioguanine (6TG) もまたこの酵素の基質となり、こちらは DNA 中に取り込まれて細胞に毒性を示すことが知られている。従って野生型の *gpt* 遺伝子を持った大腸菌は 6TG を含む寒天培地上で生育することができない。一方 *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌は 6-thioguanine を含む培地上でコロニーを作ることができる。すなわち *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌のみをポジティブに選択することが可能である。*gpt* 遺伝子のコード領域は 456 塩基対であり、DNA シーケンスによる迅速な変異部位の同定に適している。

トランスジェニックマウス *gpt* delta には、 λ EG10 シャトルベクター DNA が組み込まれている。このベクター中には直鎖状にしたプラスミド DNA が挿入されている。直鎖状プラスミド DNA 上には大腸菌 *gpt* 遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (CAT)、pBR322 の複製開始部位が存在し、両端には一対の *lox P* 反復配列が存在する。マウスのゲノム DNA から *in vitro* パッケージングにより λ EG10 をファージ粒子として回収し、回収したファージを Cre 部位特異的組み換え酵素を発現する大腸菌 YG6020 に感染させると、組み換えによってプラスミド領域がファージ DNA から効率よく切り出され、*gpt* 遺伝子と CAT を持つマルチコピープラスミドとして保持される。プラスミド上の *gpt* 遺伝子に変異をもつ大腸菌は 6TG とクロラムフェニコール (Cm) を含む寒天培地上でポジティブに選択できる。回収ファージ数は、Cm を含む寒天培地上のコロニーとして測定する。*gpt* 遺伝子突然変異体頻度は、6TG と Cm に耐性なコロニー数を Cm 耐性コロニー数で除して算出する。

以下に *gpt* アッセイのプロトコルを示す。

入ファージの *in vitro* パッケージングは、 λ シャトルベクターシステムを採用している既存のトランスジェニックマウスと同様の方法を用いる。

The <i>gpt</i> Assay of <i>gpt</i> delta Transgenic Mouse	... 1
1) 6 thioguanine selection による変異体の選択	... 3
2) 6TG ^r 表現型の確認と菌体の保存	... 5
3) 試薬・培地の調整法	... 6
4) その他の試薬・器具	... 8

[The ***gpt*** Assay of *gpt* delta Transgenic Mouse]

gpt delta マウスの臓器からゲノム DNA を抽出する。

↓

in vitro packaging によりトランスジーンをファージとして回収する。

Packaging Kit としては、STRATAGENE 社の Transpack Packaging Extract や自家製 Packaging Extract を使用する。

各プロトコルに従いパッケージング操作を行う。

↓

SM buffer を加え、final volume = 300 μ l に合わせる。使用時まで 4°C で保存する。

↓

6-thioguanine selection(6TG selection)により *gpt* 遺伝子に変異を持つ大腸菌を選択する。

(6TG Selection)

第 x 日	<i>gpt</i> delta mouse DNA の <i>in vitro</i> packaging
第 1 日	plate の作製 前培養の開始(YG6020)
第 2 日	本培養の開始(YG6020) 菌液の調製(YG6020) infection plating→ incubation at 37°C
第 3 日	
第 4 日	
第 5 日	M9+Cm plate のコロニーをカウント (after 3 days) M9+Cm+6TG plate のコロニーをカウント (after 72 hrs)
第 6 日	4 日目のカウント (→Confirmation へ)

↓

6TG 耐性コロニーの確認を行い、突然変異体頻度を算出する。

↓

変異体の菌体を保存する。

↓

塩基配列の解析により *gpt* 遺伝子上の突然変異部位を同定する。

1) 6 thioguanine selection による変異体の選択

6TG Selection では、Titer(Survival)の測定と 6TG Selection を同時に行う。

(Time table)

第 x 日	<i>gpt</i> delta mouse DNA の <i>in vitro</i> packaging
第 1 日	plate の作製(M9+Cm plate, M9+Cm+6TG plate, soft agar, 6TG soft agar) 前培養の開始(YG6020)
第 2 日	本培養の開始(YG6020) 菌液の調製(YG6020) infection plating→ incubation at 37°C
第 3 日	
第 4 日	
第 5 日	M9+Cm plate のコロニーをカウント (after 3 days) M9+Cm+6TG plate のコロニーをカウント (after 72 hrs)
第 6 日	4 日目のカウント (→Confirmation へ)

(1) 菌液の調製

6TG Selection (YG6020 使用) に用いる菌液を調製する。

{前培養} 小試験管に分注した 2 ml LB+maltose broth に YG6020 を植菌する。 (培地には 25 µg/ml kanamycin を添加する。) ↓ 37°Cで一晩振とう培養する。 {本培養} 必要量の LB+maltose broth に前培養液を 1/40 vol.植菌し、OD600=1.0 になるまで 37°C振とう培養する。 (培地には 25 µg/ml kanamycin を添加する。) (OD600=1.0 に達するのに 3 時間前後かかる。) ↓ OD600=1.0 に達した培養液は、遠心(4000×g, 10 min at 4°C)した後上清を除き、菌を 1/2 vol.の LB+10 mM MgSO₄ broth に懸濁する。(計算上は OD600=2 となる。) ↓ 氷中に保存し、その日のうちに実験に使用する。	LB+maltose broth は、滅菌済みの LB broth に滅菌済みの 20%(w/v)maltose 溶液を 1/100 vol. (final conc. 0.2%)加えて調製。 6TG selection には packaged sample 1本あたり 4 mlの本培養液を使用する。濁度測定用に多少の余裕をみておく。 本培養中に 6TG soft agar用の 6TG 溶液を調製する。 soft agar (50°Cに保温)、試験管、plate、遠心機、吸光光度計、インキュベーター等の準備をする。 LB+10 mM MgSO₄ broth は、LB broth に 1 M MgSO₄溶液を 1/100 vol. 加えて調製。
---	---

(2) Titer(Survival)の測定

小試験管 2 本に YG6020 菌液を 200 μ l 分注する。 100 倍希釈した packaged sample を 10 μ l 加え、vortex で混合する。 ↓ incubation at 37°C, 20 min (静置) ↓ incubation at 37°C, 30 min (<u>振とう</u>、約 300 rpm) ↓ (50°C の water bath で保温中の) soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、M9+Cm plate にまく (2 枚)。 ↓ soft agar が固まったら plate を倒置し、37°C で培養する。(2 and 3 days) ↓ Cm^r コロニーをカウントする。 (M9+Cm plate は 3 日後にカウントする。) (コロニーはスプレーで吹いたような形状をしている。)	分注の直前に軽く vortex をかけて菌液を均一にする。 1 ml エッペンチューブに LB+10 mM MgSO₄ broth 495 μ l を取り、packaged sample 5 μ l を加え vortex で混合する。 滅菌済駒込ピペット (5 ml 容) を使用する。 一枚の plate に sample 0.1 μ l が入っている計算で、一回の packaging (300 μ l) での回収 phage 数を計算する。 (plate 一枚あたりのコロニー数の平均値×3000)
---	---

(3) 6TG Selection

小試験管 5 本に YG6020 菌液を 200 μ l 分注する。 packaged sample を 60 μ l ずつ加え vortex で混合する。 ↓ incubation at 37°C, 20 min (静置) ↓ incubation at 37°C, 30 min (<u>振とう</u>、約 300 rpm) ↓ (50°C の water bath で保温中の) 6TG soft agar を 2.5 ml 加えて混合し、M9+Cm+6TG plate にまく (5 枚)。 ↓ soft agar が固まったら plate を倒置し、37°C で培養する。(3 days) ↓ 72 時間後に 6TG^r, Cm^r コロニーをカウントする。 M9+Cm+6TG plate には 6TG の結晶が析出する上、72 時間後のコロニーはまだ小さくて見にくいので、注意してカウントする。(コロニーはスプレーで吹いたような形状をしている。) コロニーと思われるものを 72 時間の段階でサインペン等でマーキングしておき、4 日目まで培養してコロニーであることを確認する。→Confirmation へ	分注の直前に軽く vortex をかけて菌液を均一にする。 sample(約 500 μ l)を全量使用する。直前にチューブを flash 遠心しておくロスが少ない。 <u>soft agar に 6TG を加えておくのを忘れないこと!</u> 滅菌済駒込ピペット (5 ml 容) を使用する。 培養開始時刻を記録しておく。 5 枚の plate のコロニー数を合計し、一回の packaging (300 μ l) での 6TG^r mutant 数とする。
---	---

4 日目になってはじめて現れる微小コロニーはほとんどが *gpt* 遺伝子に変異を持たないコロニーなのでカウントしない。

2) 6TG^r 表現型の確認と菌体の保存

(1) 表現型の確認 (Confirmation)

M9+Cm+6TG plate (72 時間後のカウント済み plate) から、滅菌した楊枝で 6TG^r コロニーをとり、少量 (50 µl) の 1/15 M Na-K bufer で楊枝の先をよく洗った後、未使用の M9+Cm+6TG plate と M9+Cm plate にストリークする。※

- ・ 6TG Selection 用に作った plate の余りを 4°C で保管しておいて使ってもよい。
- ・ 一本の楊枝で M9+Cm+6TG plate → M9+Cm plate の順にストリークする。

↓

37°C で 3 日間培養する。 M9+Cm+6TG plate に 6TG^r コロニーの生育を確認する。

※

4 日目にあらわれる微小コロニーはカウントしないが、形状などから *gpt* mutant と思われるものはカウントして Confirmation を行う。突然変異体頻度の算出には Confirmation 後の数値を用いる。

<突然変異体頻度 (mutant frequency) の算出>

突然変異体頻度は、6TG^r and Cm^r コロニーの総数 (Confirmation 後の値) を Titer で割って算出する。

[Mutant Frequency = Total number of mutant colonies / Titer]

Total number of mutant colonies : M9+Cm+6TG plate 上の変異コロニー合計数 (Confirmation 後の値)。

Titer : M9+Cm plate 上のコロニー数(プレート一枚あたり) × Dilution Factor

Dilution Factor = 3000

(2) 菌体 stock の調製

試験管に 2 ml LB broth (25 µg/ml Cm 含む) を分注し、M9+Cm+6TG plate にストリークした 6TG^r コロニーを植菌して、37°C で一晩振とう培養する。

↓

overnight culture をエッペンチューブに移し、遠心して上清を除き、菌体ペレットを -80°C で保存する。

(Sequence 解析に使用する。)

3) 試薬・培地の調製法

Stock solution (reagents, media)

LB broth	
20%(w/v)Maltose	
10×M9 salt	
50%(w/v)Glycerol	
1M MgSO ₄	
1M CaCl ₂	
1%(w/v)Thiamine	
10 mg/ml Amino acids (Pro, Leu, Ile)	(ここまでの試薬は、オートクレーブまたはろ過滅菌後、室温保存)
25 mg/ml Kanamycin	-20℃保存
25 mg/ml Chloramphenicol	EtOH 溶液、-20℃保存
25 mg/ml 6-thioguanine*	DMSO 溶液、当日調製

※6-thioguanine[TCI (東京化成) , 1 g, T0212]

Plates (原則として前日に作製する。)

[BOTTOM](1.5% agar*) 30 ml/plate	[TOP](0.6% agar*) 2.5 ml/plate
M9+Cm plate	soft agar
M9+Cm+6TG plate	6TG soft agar

※ BACTO-AGAR[DIFCO, 1lb, 0140-01]

Preparation of Plates

○M9+Cm±6TG plate (Cm=25 µg/ml, 6TG=25 µg/ml)

	for 1 liter	
Agar	15 g	
H ₂ O	900 ml	Autoclave with stirrer bar
10×M9 salt	100 ml	
50%(w/v)Glycerol	20 ml	
1M MgSO ₄	2 ml	
1M CaCl ₂	100 µl	
1%(w/v)Thiamine	500 µl	
Amino acids	4 ml	
(10 mg/ml Pro, Leu, Ile for YG6020)		
25mg/ml Chloramphenicol(in EtOH)	1 ml	
25mg/ml 6-thioguanine(in DMSO)	1 ml	※6TG 溶液は当日調製する。

pour 30 ml/ plate(9 cm diameter).

M9 plate は後から加える試薬が多いので、各 stock solution のコンタミに注意すること。

*[10×M9 salt]

H ₂ O	
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	128 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	5 g
NH ₄ Cl	10 g

fill up to 1 liter.

→autoclave

○soft agar (0.6%(w/v)NaCl, 0.6%(w/v)agar)

	for 100 ml
Agar	0.6 g
NaCl	0.6 g
H ₂ O	100 ml

autoclave→keep at 50°C

前もってオートクレーブをかけ、室温で固まった状態で保存しておき、翌日使用前に再び短いオートクレーブ(120°C, 5 min)で融かして 50°C water bath に移す。

(オートクレーブから出したときよく振って混ぜておく。)

○6TG soft agar(25 µg/ml 6TG, 0.6%(w/v)NaCl, 0.6%(w/v)agar)

融かして 50°C water bath に置いた soft agar に、当日調製した 6TG 溶液(25 mg/ml in DMSO)を 0.1% vol.加えてよく混ぜる。

4) その他の試薬、器具

○LB+Maltose broth

LB broth に 20%(w/v) Maltose 溶液を 1/100 vol.加えて調製。(final 0.2%)

○LB+10 mM MgSO₄ broth

LB broth に 1 M MgSO₄溶液を 1/100 vol.加えて調製。(final 10 mM)

○1/15 M Na-K buffer(pH 7.4)

H ₂ O	
Na ₂ HPO ₄	7.57 g
KH ₂ PO ₄	1.82 g
fill up to 1 liter.	
→autoclave	

- ・試験管（滅菌しておく）
小試験管(12.3×75 mm)
- ・滅菌済シャーレ(9 cm diameter)
EIKEN KIZAI CO., LTD., code No. AK2000
- ・5 ml 容 駒込ピペット（滅菌しておく）
- ・インキュベーター（37°Cに設定しておく）
- ・小試験管シェーカー（37°Cに設定しておく）
Environmental Incubator Shaker
New Brunswick Scientific Co., Inc.
EDISON, N. J., U.S.A.
- ・吸光光度計
- ・遠心分離機
- ・-80°C冷凍庫