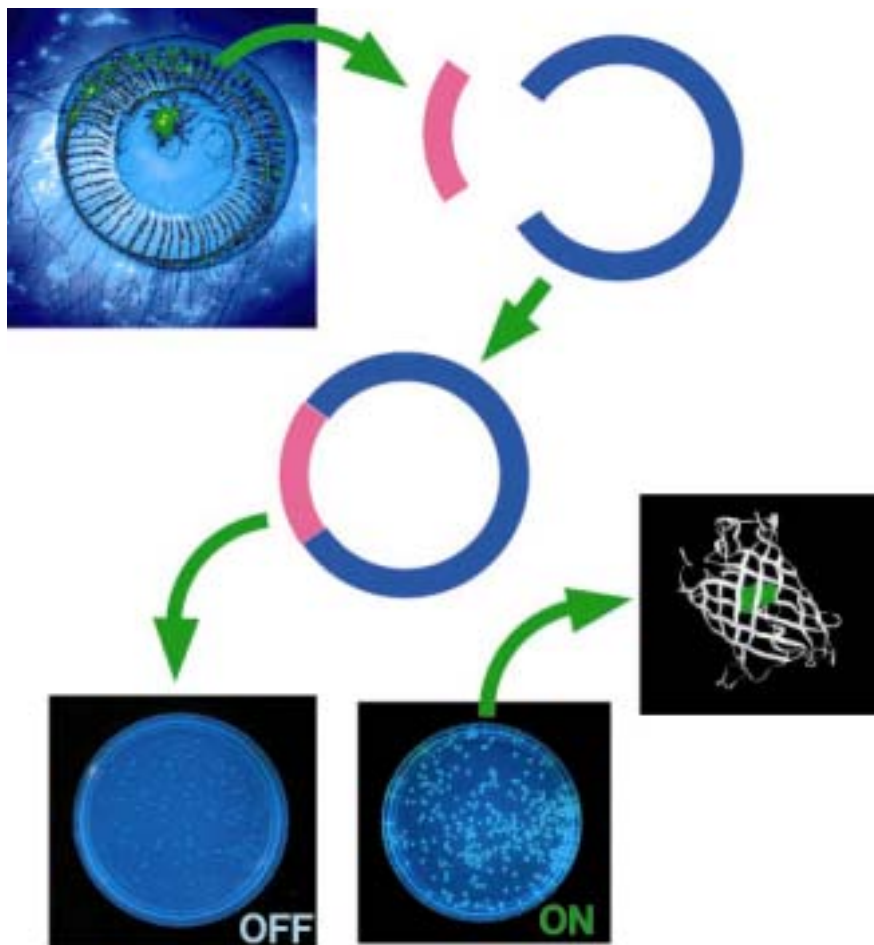


教育目的組換え DNA 実験 (講義と実習) 2003 年版

大藤道衛 (東京テクニカルカレッジ・バイオ科)



目次

1. はじめに p. 4
2. 講義・実習予定 p. 5
3. 遺伝子教育と教育教材 p. 6-11
 - 3-1. 遺伝子教育について
 - 3-2. 米国におけるバイオ技術と産業の発展と遺伝子教育
 - 3-3. 遺伝子教育教材キット
4. Biotechnology Explorer テキストを用いた実習授業の流れ p. 11-12
 - 4-1. 形質転換授業準備(約3時間)
 - 4-2. 遺伝子組換えについての講義と実習・演習(50分 x 4コマ)
5. 実験の背景と予備知識 p. 13-28
 - 5-1. 遺伝子工学と実習の位置付け
 - 5-2. DNA とは
 - 5-3. セントラルドグマとコドン表
 - 5-4. 組換え DNA 実験
 - 5-5. 制限酵素と連結酵素
 - 5-6. Green Fluorescent Protein (GFP) とは
 - 5-7. プラスミド pGLO の構造
 - 5-8. アンピシリン(Ampicillin)と ラクタマ-ゼ(lactamase)
 - 5-9. pGLO プラスミド導入大腸菌におけるタンパク質の発現
 - 5-10. アラビノースオペロンと遺伝子発現調節
 - 5-11. プロモータ配列と遺伝子発現
 - 5-12. 大腸菌への遺伝子導入
 - 5-13. 教育目的組換え DNA 実験に際しての注意点

- 6. 組換え DNA 実験(形質転換) p. 29-37
 - 6-1. 実験のポイント
 - 6-2. 実験結果のまとめ

- 7. どのような授業をおこなうか p. 37-40

- 8. 実験結果例 p. 41

- 9. 参考図書 p. 42-44
 - 9-1. 実験に役立つ本
 - 9-2. 米国高等学校生物学教科書
 - 9-3. 関連 URL

- 10. 参考資料 p. 45-61
 - 10-1. ゲノム / 遺伝子 / DNA
 - 10-2. 遺伝子とタンパク質の関係のたとえ話
 - 10-3. 組換え体の封じこめについて
 - 10-4. 組換え DNA 実験管理規則と安全委員会
 - 10-5. タンパク質の立体構造表示
 - 10-6. プラスミド pGLO の全塩基配列と遺伝子のタンパク質配列

1. はじめに

「組換え DNA 実験を含む授業」は、実験操作を行うことが目的ではない。生徒は、実験を通じ実物に触れ、セントラルドグマ(DNA > RNA > タンパク質 > 形質)と遺伝子発現調節の仕組みという生物学的に重要な概念を学ぶことが大切である。また組換え DNA 実験の原理、組換え実験を行う際の組換え DNA 実験の規則(安全を保つきまり)や廃棄物処理、更には、生物系実験結果の評価方法を学ぶこともできる。この授業を受けた生徒は、組換え DNA 実験を体験し、生命科学の面白さに興味を持つキッカケや更に勉強する動機付けになる。

本研修では、遺伝子教育ならびにアメリカ合衆国での遺伝子教育の歴史と組換え DNA 実験の原理と流れを概説した後、米国の高校で広く使われている市販教材”Biotechnology Explorer”(Bio-Rad laboratories)を用いた実験を体験する。更に実験結果を判定するとともに授業方法について考察する。

”Biotechnology Explorer”には、実習用試薬、器具ばかりでなく 50 分単位で授業ができるように教員用テキスト・生徒用テキスト・確認テストなど授業実施に必要な教材が全て含まれている。このキットでは、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)が持つ緑色蛍光タンパク質である Green Fluorescent Protein (GFP)の遺伝子を大腸菌へ導入し大腸菌を形質転換することで光る大腸菌を作製する系を使用している。具体的には GFP の遺伝子を大腸菌プラスミドのプロモータ下流に組み込んだ組換えプラスミド DNA (pGLO)を大腸菌 K12(HB101)株に導入し形質転換する。形質転換した大腸菌内で、GFP 遺伝子を発現させ、GFP タンパク質を作らせる。この大腸菌に紫外線を当てると蛍光を発する。プロモータはアラビノースオペロンのプロモータ配列を用いているため培地にアラビノースを添加するか否かで遺伝子発現調節ができる。

このキットは、実験に必要な試薬・器具・テキストが含まれ良くできたものであるが、実際に授業を組む際に教員は、キットをそのまま使用するのではなく、生徒に何を教えたいかの目的を明確にし、自分が行う授業の流れの中で組換え DNA 実験を有効に取り入れることが大切でしょう。このため本テキストは、実験のプロトコール、実験実施のポイントばかりでなく、参考図書ならびに参考資料も多く盛り込んである。講習終了後も本テキストが教材作成の参考になれば幸いであろう。

2003 年 7 月 31 日

大藤道衛

2. 講義・実習予定

7月31日(木)13:30 - 16:30

講義:

米国における遺伝子教育と”Biotechnology Explorer kits”(Bio-Rad laboratories)

DNAの構造と組換え DNA 実験

教育目的組換えDNA実験の主眼

実験原理と操作・廃棄物処理

“Biotechnology Explorer Kits”テキスト使用方法

実習:

培地調製と無菌操作

大腸菌への GFP 遺伝子の導入と形質転換

8月1日(金)9:00 - 12:00

演習と講義:

形質転換結果の観察と実験データのまとめ考察

遺伝子教育授業の実施方法

実習:

実験廃棄物の処理方法

質疑応答:

本研修での講義・実習は、本テキストならびに Biotechnology Explorer キットの説明書を使用する。

3. 遺伝子教育と教育教材

3-1. 遺伝子教育について

遺伝子教育とは、実験を含めた授業により生命科学に対する興味や理解を促す教育である。生命科学を支えるバイオテクノロジーは、21世紀の基盤技術といわれている。組換え DNA 実験を含む生命科学やバイオテクノロジー授業は、これからの科学を支える若者に生命科学への興味を促すばかりでなく、市民の一般教養(例えば新聞の生命科学に関する記事を読みこなし、自分の意見がもてるレベル)としても必要であろう。このような背景で遺伝子教育の重要性は益々高まっている。

注:用語の説明

遺伝子教育、DNA 教育、バイオテクノロジー教育、生命科学教育は、同じような意味で使われることが多い。本稿では、触れないが生命倫理さらには、遺伝教育を含めて考えることも重要である。

遺伝子教育の主な目的には、下記の4種類のカテゴリーがある。

生命科学への動機付け教育

書物の上ばかりでなく、実習を通じ物に触れ興味を促す。 高度な生命科学教育
中学・高校レベルを超えた先取り教育(米国の Advanced placement (AP)、スーパーサイエンスハイスクール)

実験技能・技術教育

実験の組み方、操作方法、データの見方などの実験技能
(専門高等学校等での Technique/Technology)

市民教養教育

バイオテクノロジーや遺伝子工学技術に対する理解と認識をもち、自分の意見がもてるレベルの教養 (Scientific literacy, Genetic literacy Public acceptance (PA))

3-2. 米国におけるバイオ技術と産業の発展と遺伝子教育

遺伝子教育を考える場合、生命科学・バイオテクノロジー先進国であるアメリカ合衆国の状況を知る必要がある。米国では、生命科学・バイオテクノロジーの発展に伴い遺伝子教育に対する努力がなされてきた。その結果、生命科学に興味を持ちその分野も大学・大学院に進学し、バイオテクノロジー分野の研究者・技術者を見ずきっかけが中学・高校生に提供されるばかりでなく、市民リテラシーとしての Genetic literacy が進み、今後の遺伝子医療・バイオ産業の受け入れ態勢としての Public acceptance が得られる素地が出来てきた。以下にバイオテクノロジーの発展と遺伝子教育の歴史を概説する。

1970年代以降、クローニング、シーケンシングなどの遺伝子工学基盤技術が発明され、遺伝子クローニング(分子クローニング)の時代となった。それ以降の技術の進歩と産業の発展を下記に示す。

遺伝子工学技術の進歩と産業の発展

1970-1980年代前半(クローニング・シーケンシングの時代)

遺伝子工学技術が確立し、バイオ産業への導入開始

1980年代後半(クローン化遺伝子の利用とPCR法によるDNA解析の時代)

生物製剤製造、DNA鑑定、遺伝子診断・遺伝子治療、
組換え植物等へ遺伝子工学技術応用

1990年代(多検体同時処理(High throughput: HT)化による網羅的解析の時代)ゲノムプロジェクト・組換え食品等

2000～(バイオインフォマティクス・プロテオーム解析の時代)

ポストゲノムシーケンス・オーダーメイド医療等

このように、従来の中学・高校の生物学の考え方とは、異なる生物学が一つの流れを作り始めた。このような社会の動きに呼応し、米国高等学校における遺伝子教育の取り組みが始まった。生物学の新しい取り組みを学校の中に取り込もうという機運が盛り上がった。このような機運の裏づけには、大学・企業・高校の連携が深い米国ならではの歴史があった。

高校での遺伝子教育の取り組み

1980年～

学校で習う生物学と実社会での遺伝子工学技術・バイオ産業の進歩に温度差すなわち、高校カリキュラムの生物学と実社会でのバイオテクノロジーとの間でギャップの存在を高校教員の中で感じ取る人々が生まれだした。「大学に進学する人、一般社会人となる人」

全ての人に対する一般教養としての

バイオテクノロジー教育 / 遺伝子教育の必要性 ギャップを埋めるための新カリキュラムの必要性

高校教員の中から草の根的に発生 1985年ごろ

大学研究者と高校教員による共同カリキュラムの創造

大学での高校教員の遺伝子教育トレーニング

(Stanford Univ.などで、生命科学のAPプログラム)

高校・大学教員と地域企業との交流(産学共同の機運)

1980年代後半

カリキュラム開発に対する国の研究助成

バイオ技術の発展と遺伝子教育は車の両輪 1990年

初の“DNA SCIENCE”教科書

教育目的実験は、NIH ガイドラインと無関係 1995年 DNA SCIENCE が
NATIONAL science EDUCATION STANDARDS に掲載

充実した生物学教科書、多数出版

Bio-Rad laboratoreis 社による 遺伝子教育教材キット”Biotechnology Explorer
system“(Stanford Univ.共同開発)完成3-3. 遺伝子教育教材キット

遺伝子教育を実施する際、教材開発は大きな課題です。アメリカ合衆国では、多くの
遺伝子教育教材が市販されている。その中で、特徴をもち高いシェア-をもっている
教材が、”Biotechnology Explorer Kits & Curriculum”(米国 Bio-Rad laboratories 社
製品)である。このキットは、多くの種類をもち構成もよく工夫されている。これは、
Stanford 大学の高校教員教育プログラムを参考にし、元高校教員である Bio-Rad
laboratories 担当者が作製したプログラムである。

キットの種類(図1)

Kit 1: 形質転換(組換え DNA 実験)

pGLO Bacterial Transformation kit

Kit 2: 発現タンパク質の精製(組換え DNA 実験)

Green Fluorescent Protein Chromatography kit

Kit 3: 電気泳動による DNA 解析

Analysis of Precut Lamda DNA kit_

Kit 4: 電気泳動による DNA 解析

Restriction Digestion & Analysis of Precut Lamda DNA kit

Kit 5: DNA 鑑定

DNA Fingerprinting kit

Kit 6: クローニング(組換え DNA 実験)

Secrets of the Rain Forest kit

Kit 7: ゲルろ過原理

Size Exclusion Chromatography

Kit 8:PCR と DNA 鑑定

Chromosome 8 PCR kit

Kit 9:タンパク質解析

Protein Fingerprinting kit

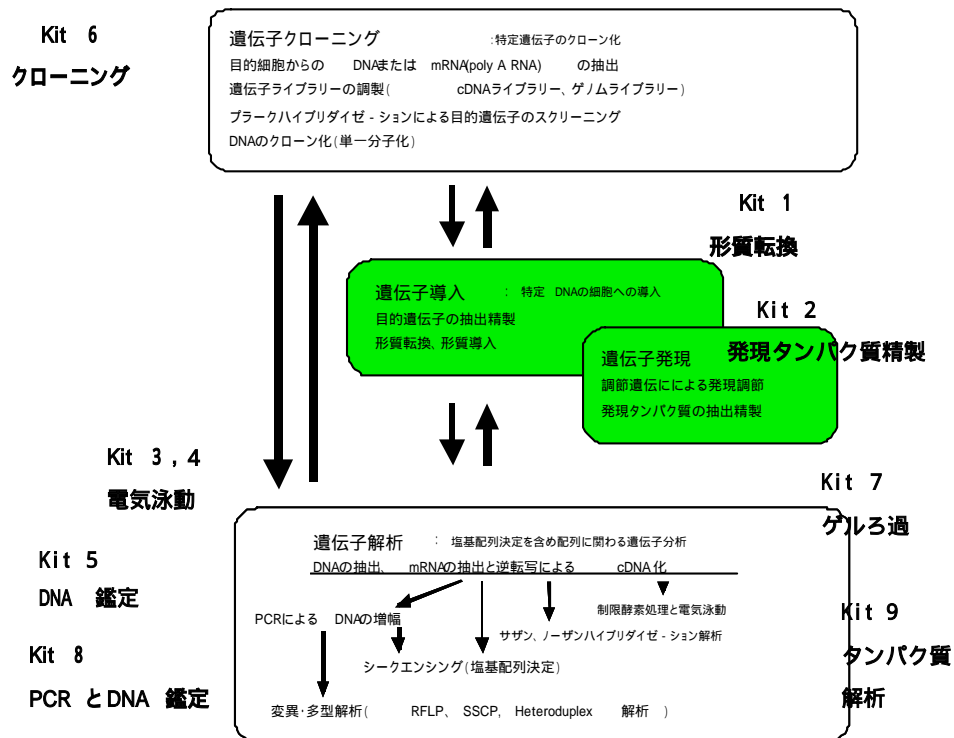


図1 遺伝子工学技術における各キットの位置付け

各キットは、遺伝子工学技術を用いた分子生物学実験を体験できるように構成されている。

キットの構成

このキットは、使用する試薬・器具を含むばかりでなく、実習実施に際してのカリキュラムと実施マニュアルが含まれている。マニュアルには、下記の6項目が含まれている。

- 実験上の注意事項
- 基本的な実験手技の説明
- 事前準備

先生用マニュアル・生徒用テキスト
生徒への質問例とその回答(理解度チェック)
実社会との関連性についての問題提起方法

先生用1コマ50分の授業に対応できるように構成されている。先生用マニュアル・生徒用テキストには、下記の内容が盛り込まれている。先生用テキスト(1コマ50分の授業設定)

1. 本キットの説明
2. 使用器具類とチェックリスト
3. 実験手技の解説と注意事項
4. 事前準備の内容と具体的手技の解説
5. 実験のクイックガイド
6. 質問と解答(50分ごとに理解度チェック)

生徒用テキスト(例:Kit 1 形質転換)

レッスン1:トランスフォメーションの説明

レッスン2:形質転換実験

レッスン3:データの記録と解析

レッスン4:形質転換効率の計算

(各レッスンは50分、レッスンごとに目標を示し、レッスン開始、最後に理解度チェック実施)マニュアルとは別に関連資料も含まれ、生徒が自分で勉強する糸口を供給している。

資料1. 今までの研究業績まとめ資料2. 本実験で使用する用語の解説集資料3. 本実験に出てくる手技や手法の解説集資料4. その他

遺伝子と発現タンパク質との関連性についての資料等(Kit 1の例)

このような遺伝子教育キット教材をそのまま使用することで、ある授業目標は達成できる。教員自身が教えたい内容にこれらのキットを盛り込むことで、新しいカリキュラムも構築できる。いずれにしる遺伝子教育用キットを用いるメリットには、下記のような事項がある。

1. 必要な試薬・器具が含まれている。
2. 容易な操作で実習できる。
3. 比較的安価である。
4. 学習目標は、自由に設定できる。

すなわち「いつでもどこでも」実習授業の目的にかなう方法である。

4 . Biotechnology Explorer テキストを用いた実習授業の流れ
ページ数は、キットに含まれるテキストのページを示している。
(50 分 x4 コマ)

4-1 . 形質転換授業準備 (約 3 時間)

講義内容の準備

形質転換と遺伝子組換え : p. 1-2

遺伝子組換えについて : p. 28-31

付録 (用語解説等) : p. 47-59

実習の準備 p. 3-15

使用器具の準備 : p. 3-9

寒天プレートの準備 : p. 11-13

スタータープレートの準備・試薬調製 : p. 13-15

試薬分注 : p. 15

使用した器具・試薬の殺菌廃棄方法を確認すること : p. 5

実習講義内容の準備

使用器具・試薬・用語説明 : p. 3-5

実験操作説明 : p. 16-20 (先生用)、 p. 34-39 (生徒用)

実験結果解説説明 : p. 20-28 (先生用)、 p. 28-46 (生徒用)

4-2 . 遺伝子組換えについての講義と実習・演習 (50 分 x4 コマ)

各コマにおける実施内容の要点を示す。

1コマ目 (Lesson 1) : 遺伝子組換えについて (講義) p. 28-31

下記の 5 項目を盛り込み講義します。

組換え DNA 実験と原理 (宿主・ベクター)

組換え DNA 実験の規則 (実験室・滅菌方法)

実験の結果評価方法

遺伝子発現とセントラルドグマ (DNA>RNA>タンパク質>形質)

発現調節の仕組み (プロモーター : 種固有)

2コマ目(Lesson 2): 遺伝子導入実験(実習) p. 32-38

実際に形質転換を行います。

3コマ目(Lesson 3): データの収集と分析(演習) p. 39-42

蛍光の観察とコロニーの有無を定性的に確認し、発現調節の仕組みを考えます。

4コマ目(Lesson 4): 考察(演習) p. 43-46

形質転換効率を測定し、他のクラスメートの結果と比較して定量的に評価します。

注: 上記における「講義」・「実習」・「演習」の定義

講義: 先生からの一方通行が中心の授業

実習: 先生の指示により生徒が手を動かし実際に実験してみる授業

演習: 先生と生徒がディスカッションし双方向性のある授業

Biotechnology Explorer: 米国 Bio-Rad Laboratories 社が開発販売している遺伝子教育用教材 (<http://explorer.bio-rad.com>)

5. 実験の背景と予備知識

5-1. 遺伝子工学と実習の位置付け

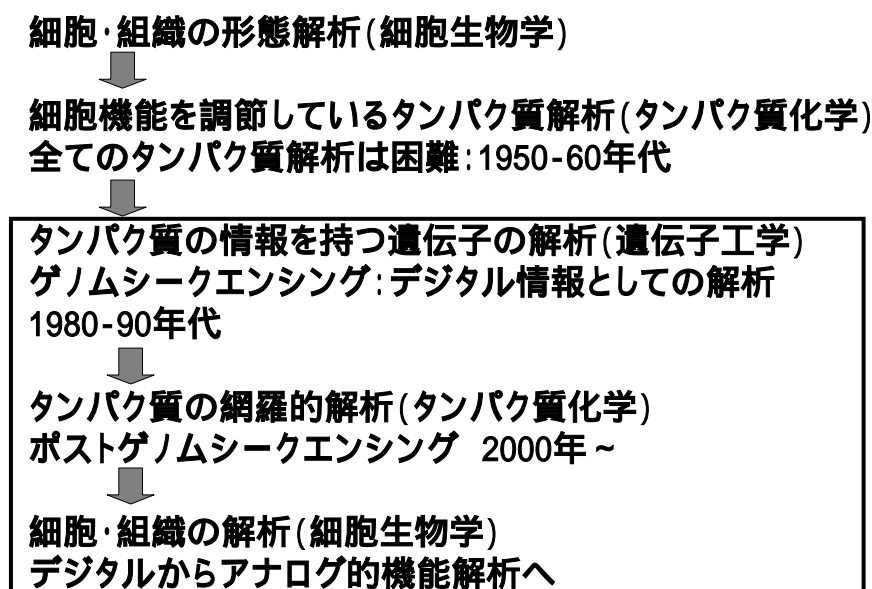
そもそも遺伝子工学は、なぜ発展したのであるか？

生命の分子レベルでの解明は、当初細胞・組織レベルで行なわれた。細胞染色や免疫染色などの手法も取り入れられた。その後、細胞内で機能を果たしているタンパク質(酵素、ホルモン、調節物質)を抽出精製する試みがなされたが、細胞内で一時に存在するタンパク質の種類は、数千から数万と多く、20種類のアミノ酸の配列から立体構造を形成するタンパク質を解析することは、困難を極めた。また、タンパク質の種類によっては、存在量が低く抽出精製も困難なものがあつた。このため、タンパク質自体を取り出すのではなく、その情報を持つ遺伝子である DNA を取り出し解析する方が、容易と考えられた。このため組換え DNA 技術が開発された1970年代から、タンパク質に対応する遺伝子の分子クローニングが盛んに行なわれるようになった。その後、DNA 解析技術や機器の進歩にも助けられ、その生物がもつ遺伝子全部を含むゲノム DNA 塩基配列を決定する仕事(ゲノムプロジェクト)が進み、情報である遺伝子を網羅的に見ることができるようになってきた。

今世紀に入り、ゲノム DNA 塩基配列に基づき、遺伝子の発現を網羅的に検索するトランスクリプトーム解析、さらにはタンパク質を網羅的に見るプロテオーム研究がなさ

れている。トランスクリプトーム解析は、マイクロアレイやDNAチップを用い、プロテオーム研究では、2次元電気泳動、NMR(核磁気共鳴)、そしてMALDI-TOF-MS(質量分析)などの手法により多数のタンパク質を同定している。遺伝子工学は、このような流れの中で、機能を持つタンパク質解析の近道、突破口としての意味を持っていた。一方、DNA解析技術は、DNA上の繰り返し配列の繰り返し数を測定することを利用した個人鑑定や病気に関係した遺伝子の変異解析による遺伝子診断などその方法自体が意味を持ってきている。

生命現象の解明



生命科学の発展と遺伝子工学の位置付け

遺伝子工学実験には、特定の遺伝子クローンを得る遺伝子クローニング、得られたクローン化遺伝子を他の細胞に入れる遺伝子導入、更に遺伝子の多型、変異、塩基配列を決める遺伝子解析がある(図2)。これらの実験のうち、いわゆる組換えDNA実験と呼ばれるものは、遺伝子クローニングならびに遺伝子導入実験である。

Biotechnology Explorerでは、オワンクラゲが持つ蛍光タンパク質(GFP)の遺伝子を大腸菌へ導入し大腸菌を形質転換する。この大腸菌内でGFPを発現させ光る大腸菌を作製する。この授業では、組換え実験の原理、遺伝子組換え実験の規則、実験の結果評価のやり方、遺伝子発現とセントラルドグマ、発現調節の仕組みを学ぶことができる。

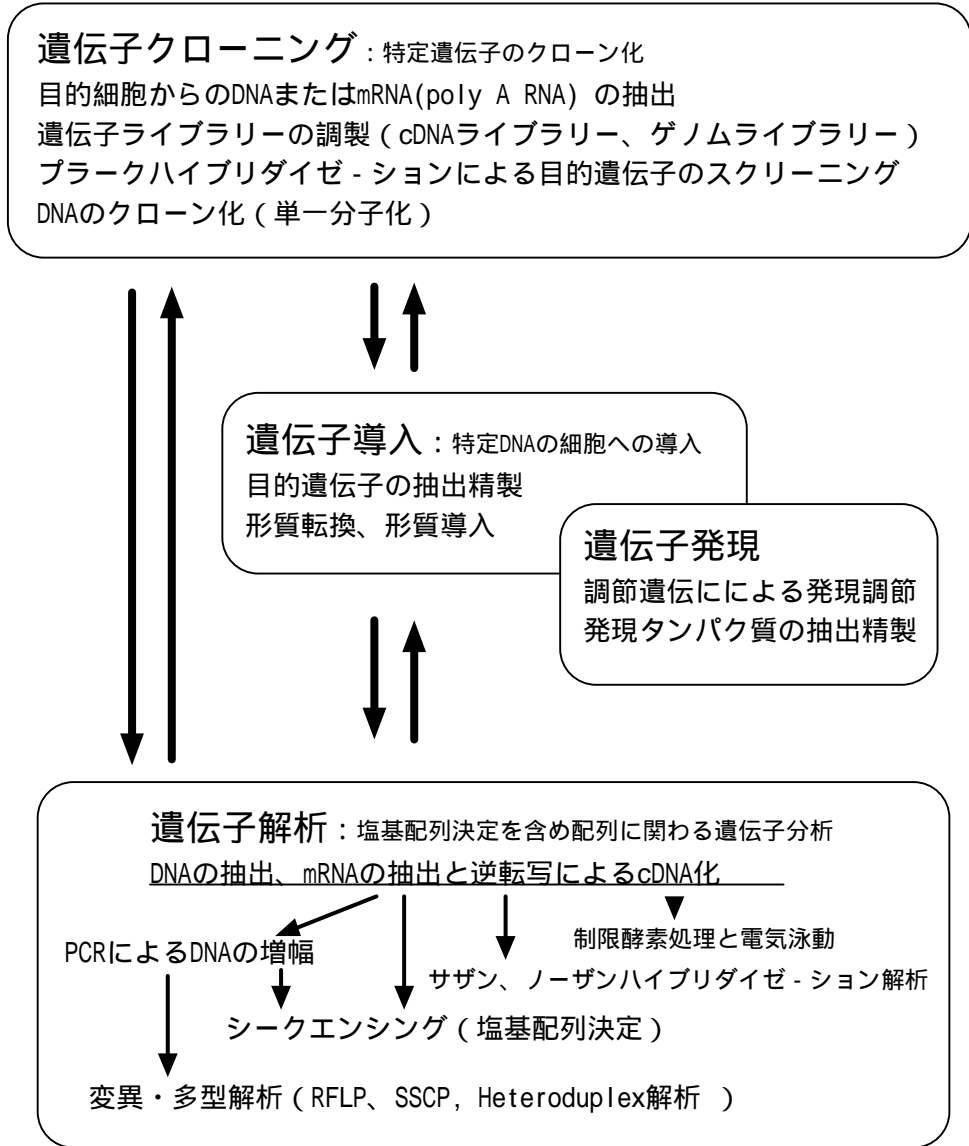


図2 遺伝子工学実験の全体像
 遺伝子クローニング、細胞内への遺伝子導入と遺伝子発現、遺伝子解析

5-2. DNA とは

DNA は、デオキシリボースという糖に 4 種類の有機塩基並びにリン酸が結合したヌクレオチドがリン酸エステル結合した高分子である。この 4 種類の塩基の配列が遺伝情報をになっている。分子構造は繰り返し構造(図3)であり、解析しやすい。重らせんを形成に当たっては、GとC (水素結合3つ)、AとT (水素結合2つ)が、対となって結合する。 GCの含量はDNAの安定化に寄与している。また、リン酸のマイナスチャージは電気泳動で解析する場合に有効に作用する。

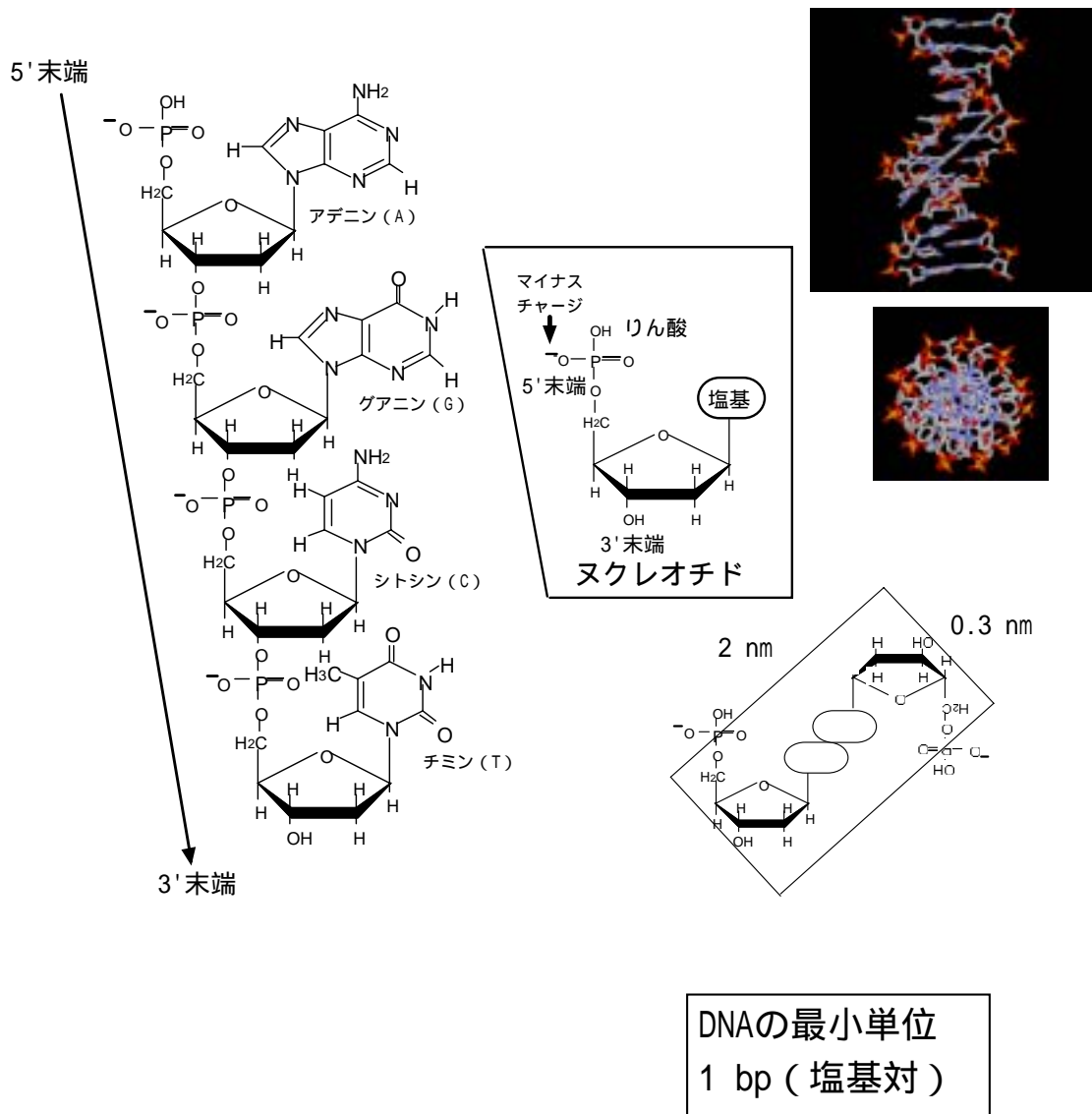
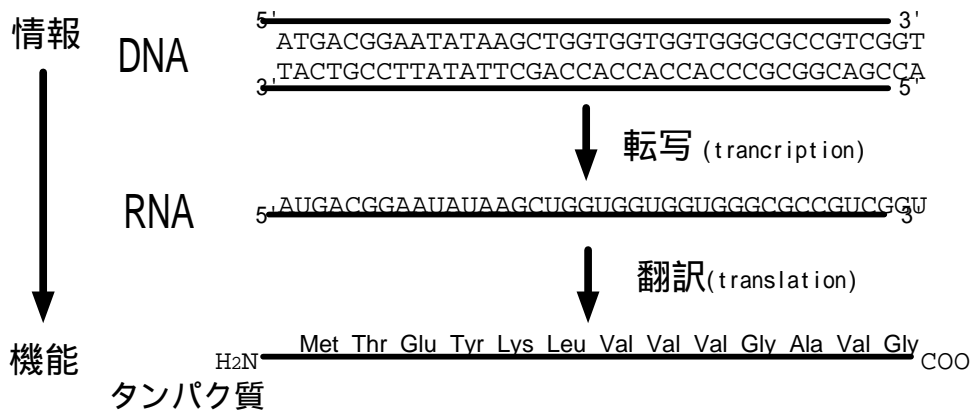


図3 DNA の構造

5-3. セントラルドグマとコドン表

DNA から RNA に転写され、更にタンパク質に翻訳される。この流れはレトロウイルスを除く生物に共通である。遺伝情報は、この流れに沿って機能をもつタンパク質へと翻訳されていく。



コドン表

DNA の塩基配列 (A, G, C, T) は 3 塩基を 1 単位 (コドン) としてアミノ酸に翻訳される。コドン表は、この暗号解読表である。(コドン表では、RNA の AGCU で表わしてある。) このコドン表は、基本的に全ての生物に対し共通である。

第一塩基	第二塩基				第三塩基
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	-	-	A
	Leu	Ser	-	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

5-4. 組換え DNA 実験

ゲノムまたは cDNA ライブラリー、PCR 産物などから目的 DNA を制限酵素にて切り出す。一方プラスミドなどのベクター DNA も同じ制限酵素で切断した後、目的 DNA とベクター DNA を連結酵素 (DNA リガーゼ) にて連結する。この分子を組換え DNA 分子という。この組換え DNA 分子を宿主細胞 (図4では大腸菌) に導入することで、組換え DNA をもつ細胞ができる。ベクターのプロモーター領域の下流にコドンに合わせて目的遺伝子を組み込んだ場合、遺伝情報に従い組換えタンパク質が宿主細胞のタンパク質合成系を用いて合成される。種を超えて組換え実験ができる前提は、全ての生物において遺伝子は4種類の塩基を持つ DNA で構成されており、塩基配列とアミノ酸の種類の関係 (コドン表) も生物種を超えて共通であることによる。

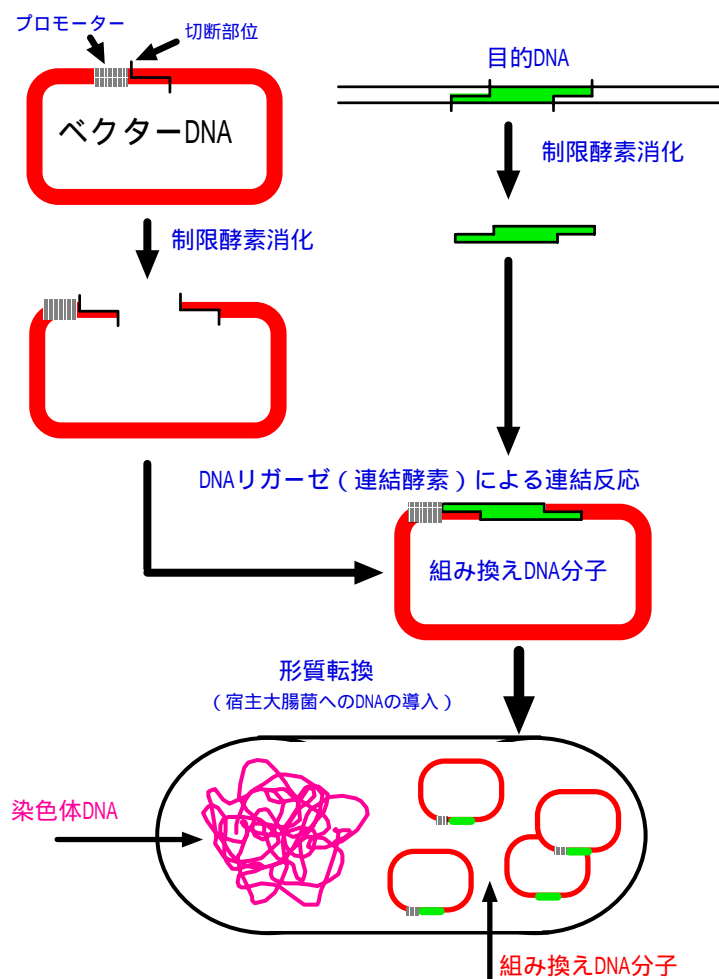


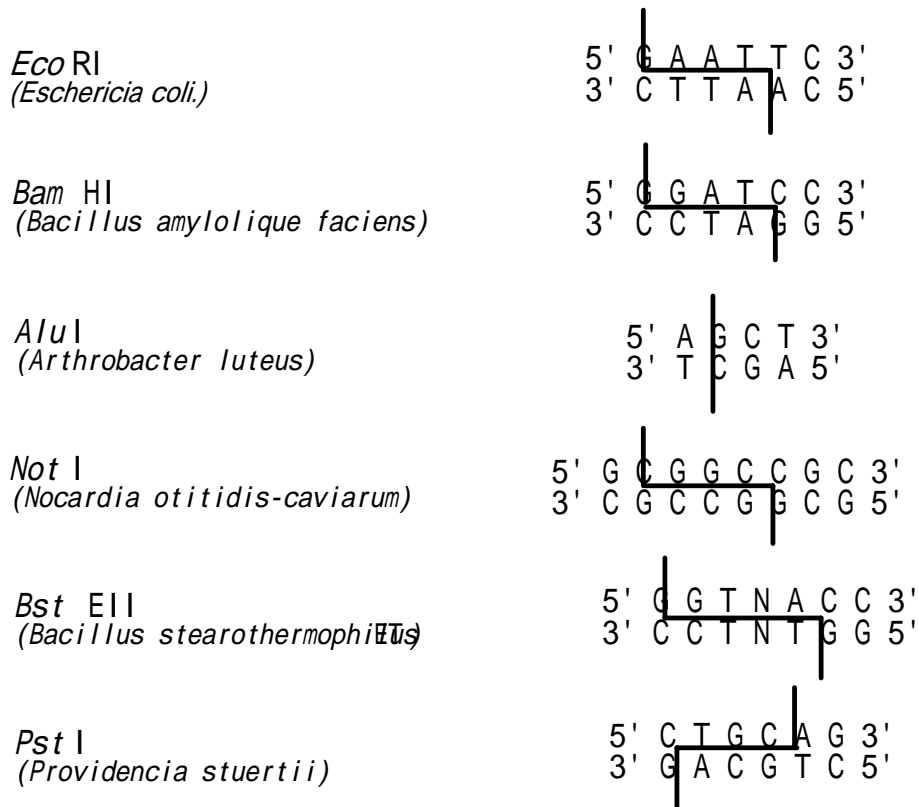
図4 組換え DNA 実験

5-5. 制限酵素と連結酵素

制限酵素

DNA を切断する酵素 (DNA 分解酵素 : DNase) には、DNA 鎖の途中を切断するエンドヌクレアーゼ (endonuclease) と DNA 鎖の末端から切断するエキソヌクレアーゼ (exonuclease) がある。エンドヌクレアーゼのうち、特定の塩基配列を認識し、この部位を特異的に切断する酵素を制限酵素 (restriction endonuclease) という。制限酵素は、現在までに 100 種類以上が精製され市販されている。

制限酵素には、4 塩基認識、6 塩基認識、8 塩基認識など色々な種類がある。何れも



認識配列は回文構造 (palindorome) を持っている。命名は、その酵素が存在する微生物の名前に由来している。属名と種名の最初の 2 文字のイタリック体で示し、1 種類の菌で 2 種類以上の制限酵素が存在するときは、ローマ数字を付け区別する。

また切り口は、5'または3'側に突出している付着末端 (cohesive end) や平滑に切断される平滑末端 (blant end) がある。

連結酵素

2本の異なるDNA鎖の3'-OHと5'-りん酸基を、ホスホジエステル結合で連結させる、いわば糊の役割をする酵素をDNAリガーゼ (DNA ligase: 連結酵素)という。よく用いられるDNAリガーゼには、大腸菌DNAリガーゼ、T4DNAリガーゼがある。前者は、付着末端同志の連結に適し、後者は平滑末端同志の連結もできる。これらの酵素も各メーカーから市販されている。

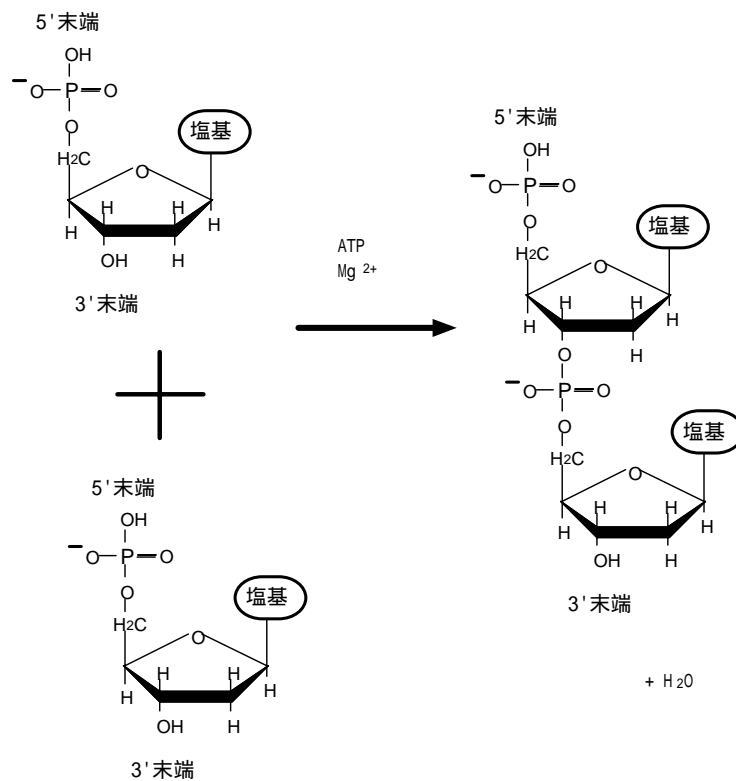
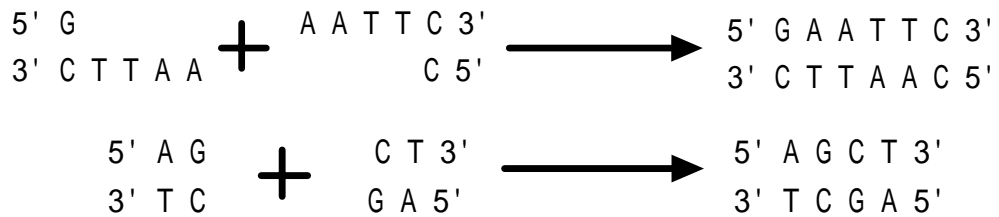
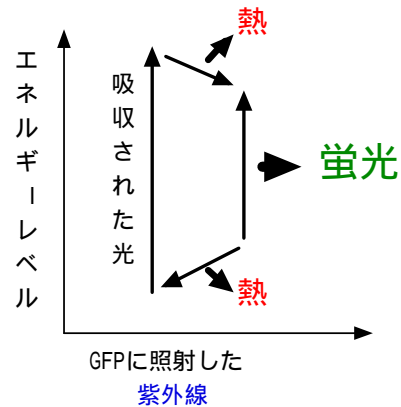


図5 GFPと蛍光



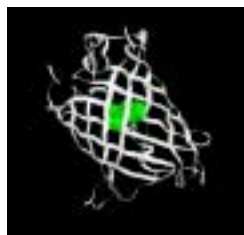
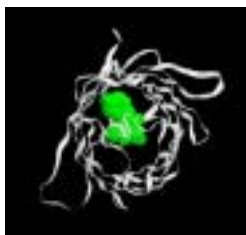
5-6 . Green Fluorescent Protein (GFP) とは

GFP は発光オワンクラゲ *Aequorea victoria* に含まれる緑色蛍光タンパク質である。オワンクラゲにはフォトサイト と呼ばれる発光組織があり、この組織中にイクオリンと GFP の 2 つの発光分子が結合して存在している。外部から刺激を受けた場合、イクオリンにカルシウムが結合し、エネルギーが生産される。そのエネルギーが GFP に受け渡されて緑色の蛍光を発する。一方、単離された GFP にエネルギーの高い紫外線を照射した場合でも GFP は、蛍光を発する(図5)。

GFP は、27kDa(分子量:27000)の籠状のタンパク質で分子内部に発色団をもっている。このため紫外線を当てると照射された光のエネルギーの一部を蛍光として放出し GFP タンパク質自身が蛍光を発する。蛍光は、始めに照射した光よりもエネルギーの低い光(長波長)となる。

注: $E = Nhc / \lambda$; エネルギーは光の波長に反比例する。つまり紫外線のような波長の短い(青色系の)光のエネルギーは高く、赤外線のような波長の長い(赤色系の)光のエネルギーは低い。

E: エネルギー、 λ : 波長 (nm)、N: アボガドロ数 (6.02x10²³)、h: プランク定数 (1.58x10⁻³⁷ kcal/mol)、c: 光速 (3x10⁸ m/s)



GFP の分子構造

5-7. プラスミド pGLO の構造

プラスミド pGLO は、オワンクラゲ由来の GFP 遺伝子の他に GFP 遺伝子を発現させるため、アラビノースオペロンのプロモータ (PBAD) 配列および発現調節に関わるタンパク質 (Ara C) の遺伝子 *Ara C*、さらに抗生物質アンピシリンを分解する酵素 (ラクタマ・ゼ) の遺伝子 (*Bla*) をもつ 5371 bp の組換えプラスミドである (図6)。このプラスミドが導入された大腸菌は、アンピシリンを含む培地に植えることにより選択的に生育させることができる。

注:

プロモータとは、RNA ポリメラ・ゼが結合する配列のことである。

ラクタマ・ゼ (lactamase, Beta lactamase) は、アンピシリナ・ゼ (ampicillinase) ということもある。

ラクタマ・ゼの遺伝子 (*Bla*) をアンピシリン耐性遺伝子ということもある。

ori とは、複製開始点である。

プラスミド pGLO の全塩基配列は、参考資料参照

なお、遺伝子を英文字で現す場合、斜体字で表示する。

GFP: GFP タンパク質 *GFP*: GFP 遺伝子

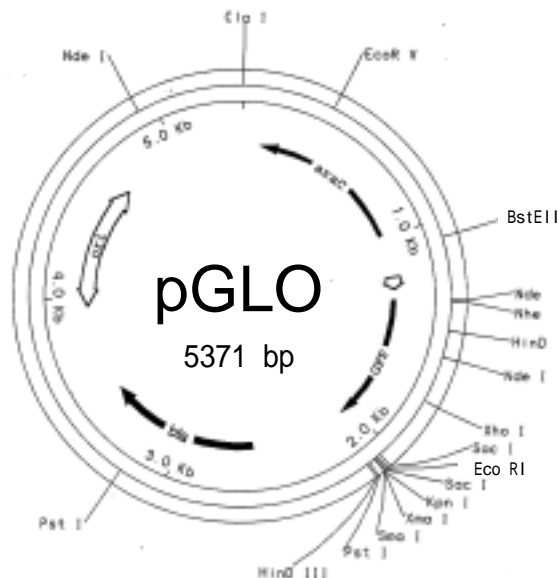


図6 pGLO プラスミド DNA の構造

5-8. アンピシリン(Ampicillin)とラクタマゼ(lactamase)

アンピシリンはペニシリン系の抗生物質で、ラクタム構造と呼ばれる4員環をもち、ラクタム系抗生物質とも言われる。アンピシリンは、バクテリア細胞壁のペプチドグリカン架橋の合成を阻害することでバクテリアの生育を阻害する。

アンピシリン分子の立体構造は、ペプチドグリカン生合成で生じるD-アラニル-D-アラニンの立体構造によく似ている(図7)。そこでD-アラニル-D-アラニンに作用しペプチドグリカン合成に参与するトランスペプチターゼが類似分子であるアンピシリンを誤認することで細胞壁の架橋が阻害される。このため菌の細胞壁は細胞分裂ごと弱くなり、数回の細胞分裂の末、浸透圧に耐えられなくなった菌は溶菌し死滅する。

D-alanyl-D-alanine

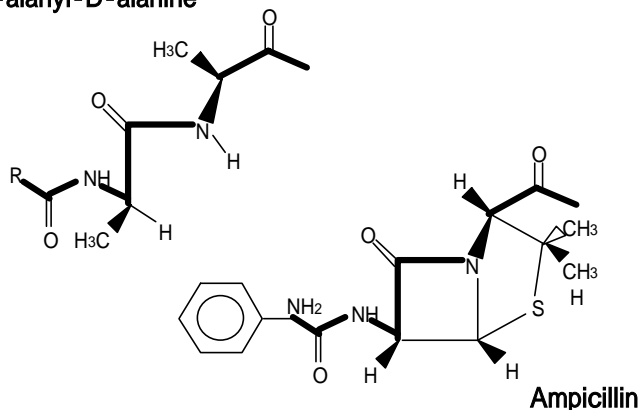


図7 D-アラニル-D-アラニンとアンピシリンの分子構造

一方、アンピシリン分解酵素であるβ-ラクタマーゼは、アンピシリンのβ-ラクタム構造を加水分解する(図8)。

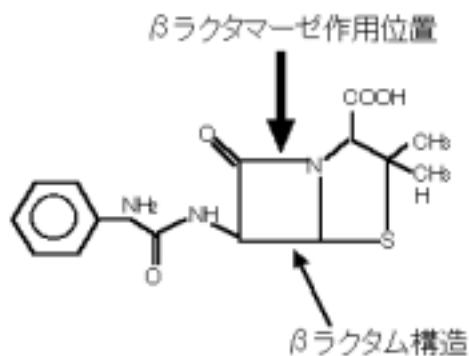


図8 アンピシリンの分子構造と ラクタム構造

ラクタマ-ゼの遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子 (*Bla* または *amp^r*) といい、実験で用いる pGLO プラスミドにも含まれている。形質転換の際、ベクターとしてアンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミド DNA を用いて目的遺伝子を組み込むとプラスミド DNA が導入されなかった細菌はアンピシリンによって増殖できないため、プラスミド DNA ずなわち目的の遺伝子を含む細菌を選択できる。

アンピシリンは、アンピシリンナトリウムの粉末で市販されており、冷蔵庫中で遮光保存する。アンピシリンは熱に弱いのでオートクレーブした培地は、温度が下がってから加える。

5-9 .pGLO プラスミド導入大腸菌におけるタンパク質の発現

GFP 遺伝子を含むプラスミド pGLO を大腸菌に導入し形質転換 (Transformation) した場合、GFP ばかりでなく Beta-lactamase やアラビノースプロモータ結合タンパク質も発現される (図9)。形質転換した大腸菌では、Beta-lactamase が発現されるためにアンピシリンを含む培地でも生育できる。また、GFP の発現は、培地にアラビノースが存在するか否かによって調節される。アラビノースが存在しない場合は、GFP 遺伝子が菌体内に存在するにも関わらず、発現はしない。言い換えれば、情報があるにもかかわらず、機能はしないということである。

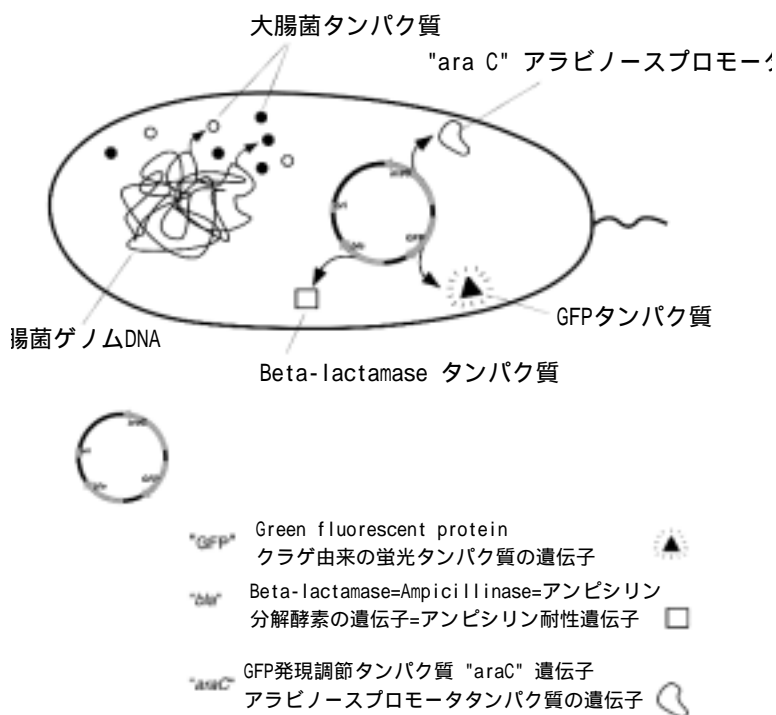


図9 pGLO プラスミド DNA 導入大腸菌のタンパク質発現

5-10. アラビノースオペロンと遺伝子発現調節

アラビノース分解酵素遺伝子を含むアラビノースオペロンには、分解酵素の遺伝子である *araB*, *araA*, *araD* およびプロモータ配列である PBAD が存在する(図10)。発現調節は、タンパク質 AraC で行われている。培地にアラビノースが存在しないとき、AraC は PBAD の付近に結合している。しかしアラビノース存在下で、AraC の立体構造が変化することにより PBAD が露出し、PBAD に RNA ポリメラーゼが結合することで構造遺伝子が発現する。このように AraC タンパク質は、*araB*, *araA*, *araD* という構造遺伝子の発現調節を行っている。

一方プラスミド pGLO では、*araB*, *araA*, *araD* の代わりに、オワンクラゲの GFP 遺伝子が組み込まれている。そこで GFP の発現は、AraC タンパク質により調節されている。培地にアラビノースを加えるか否かにより GFP の発現調節を行うことができる。

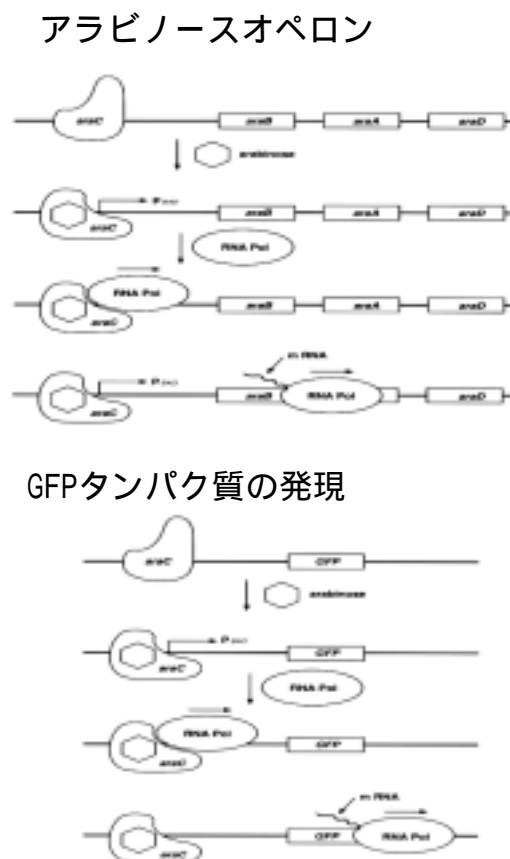
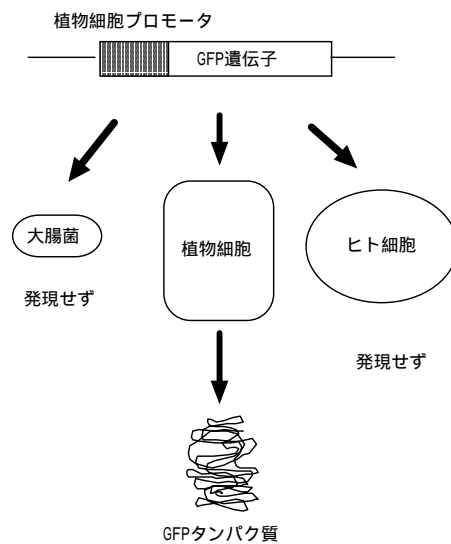


図10 アラビノースオペロンと遺伝子発現調節

5-11. プロモータ配列と遺伝子発現

生物種によりプロモータ配列や調節遺伝子は異なる。実験では、大腸菌のプロモータ配列 PBAD を含むプラスミドベクターに組み込んだ GFP 遺伝子を用いている。しかし、このプラスミドを植物細胞やヒト細胞に導入して培地にアラビノースを加えても GFP は発現しない。これは、生物種ごとに RNA ポリメラーゼも異なりプロモータ配列も異なるためである。図11において、大腸菌プロモータ配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、大腸菌のみで発現している。一方、植物細胞プロモータ配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、植物細胞のみで発現する。ヒト細胞でも同様である。



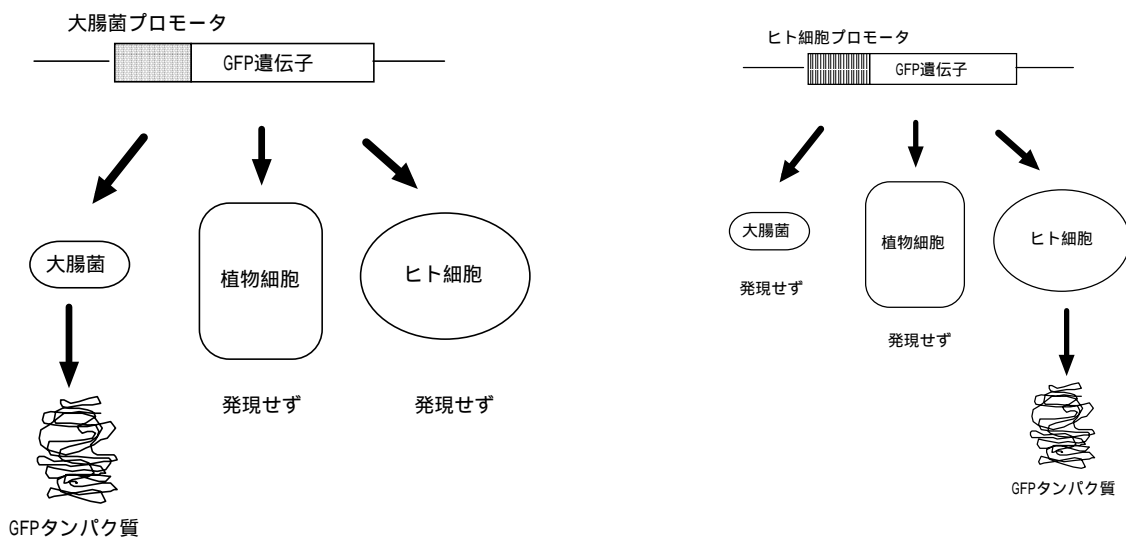


図11 生物種とプロモータ

5-12. 大腸菌への遺伝子導入

大腸菌は細胞膜および細胞壁をもち、通常、プラスミドのような大きな分子は内部に取り込めない。大腸菌を 50 mM の CaCl_2 処理することによりプラスミドを取り込めるコンピテント細胞 (competent cell) を調製することができる。更に Ca^{2+} イオンにより DNA のマイナス電荷が中和されると同時にマイナス電荷をもつ細胞表面からの反発が除かれプラスミド大腸菌表面に吸着した後に効率良く大腸菌の中に取り込まれる。実験に際しては、42 °C での熱処理を短時間おこなうことで膜の流動性が変わり導入効率をあげることができる。実験で用いる形質転換用緩衝液が、50 mM CaCl_2 を含む溶液である。(図12)

コンピテントセルを用いた化学的遺伝子導入法

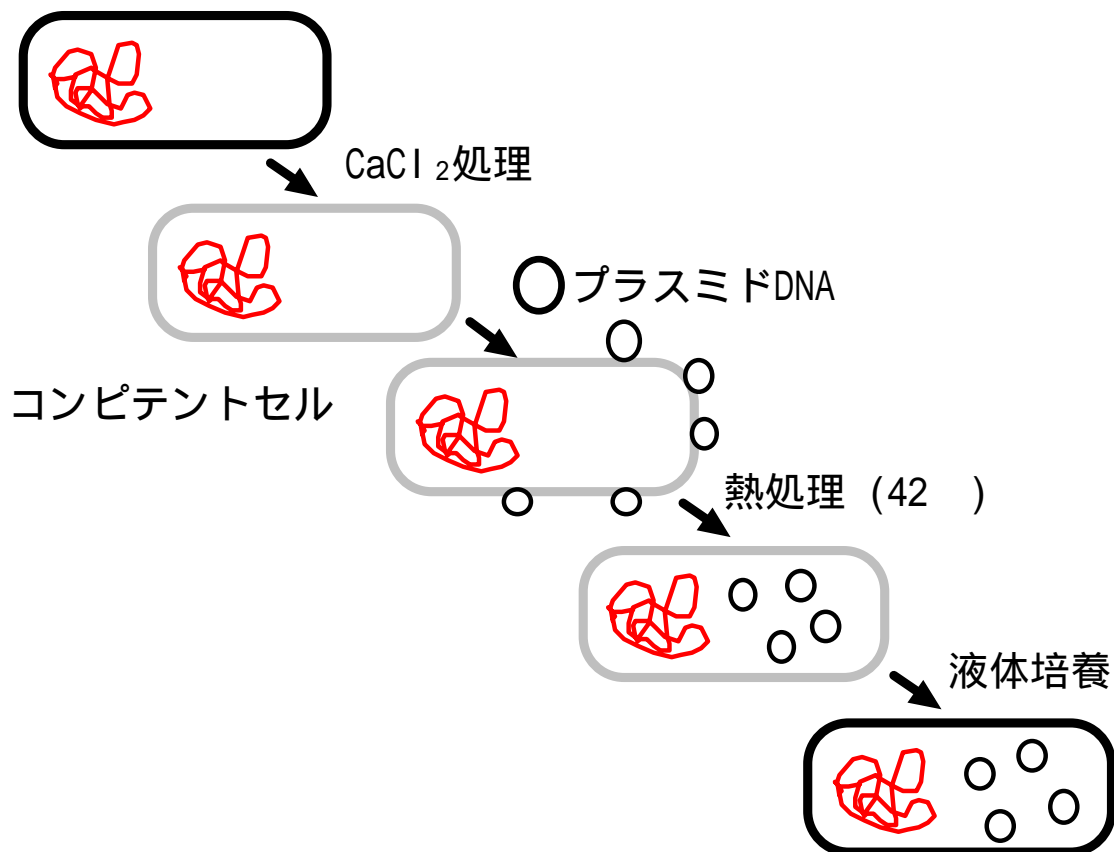


図12 コンピテント細胞の作製と形質転換

5-13. 教育目的組換え DNA 実験に際しての注意点

教育目的組換え DNA 実験を行う大前提は、実験申請手続きが済んでいることである。手続きを確認した後、実際の実験に際しては、実験系、実験者、実験室環境を守るために幾つかの注意が必要である。

実験中は、ドアを閉めて閉鎖系にする。

実験前および実験後には、必ず手を洗う。

実験台は、70%エタノール溶液を噴霧し殺菌してから使用する。

実験に使用する水は、蒸留水、イオン交換水もしくはこれらよりも高純度な水を用いる(6-1 実験のポイント 参照)。

使用する器具、試薬は、予め全て滅菌する⁽¹⁾。

プラスミド DNA を扱う場合は、会話しないなどの注意を払い唾液からの DNase の混入を避ける⁽²⁾。

使用した菌、プレート、器具、試薬は、全てオートクレーブ滅菌⁽¹⁾もしくはそれに準じた方法にて滅菌し、廃棄⁽³⁾する。

紫外線を使用する際には、ゴーグルもしくはフェイスシールドを使用して目を保護する。

(1)滅菌

キットを用いる場合、キット中の器具、試薬は予め滅菌してある。しかし、ピペットやチューブなどをキット以外に購入し使用する場合は必ず滅菌してから用いる。この滅菌は、菌のコンタミを防ぐばかりでなく混入した DNase を失活させる目的がある。また、実験後にも同様に滅菌する。滅菌方法には以下の方法があるが、主に用いる方法は、オートクレーブ滅菌である。

高圧蒸気滅菌；オートクレーブ滅菌(121℃、15-20分)

実験前では、タンパク質成分など熱に弱い物質を含まない溶液の滅菌に用いる。また、ポリプロピレン製のチューブ、チップ、更にはマイクロピペットを滅菌する時にも用いる。チューブ・チップなどの場合、オートクレーブ滅菌後 60℃程度で乾燥させてから使用する。実験後には、使用したチューブ、ピペット、プレート、菌を含む培地など全て滅菌する。(ポリスチレンやポリエチレンの器具は、熱に弱いのでオートクレーブでは、滅菌できない。

オートクレーブが設置されていない施設では、圧力釜で代用することも可能である。

乾熱滅菌(160℃、1-2時間)

乾熱滅菌器を用い、主にガラス器具の滅菌に用いる。

火炎滅菌

火で直接あぶる。白金耳の滅菌など植菌の際に用いる。

ろ過滅菌

0.22 μmのニトロセルロースフィルターなどで溶液をろ過する。オートクレーブにかけられない血清タンパク質や抗生物質を含む溶液の滅菌(除菌)に用いる。

ガス滅菌

エチレンオキシドガスで置換し滅菌する。熱に弱いプラスチックプレート(ポリスチレンやポリエチレン製)の滅菌に用いる。通常の使い捨てプラスチック製品等は、すでに

ガス滅菌してある場合がある。

オートクレーブ滅菌の際の注意：タンパク質や抗生物質などの熱に弱い成分を含む溶液を滅菌する場合、抗生物質などは溶液をオートクレーブした後に添加する。

(2) DNA 分解酵素

DNA は安定な物質であるが、 Mg^{2+} イオン依存性の DNA 分解酵素 (DNase) により簡単に分解されてしまう。DNA 分解酵素は、細胞内ばかりでなく唾液・血液・その他の体液中にも存在し、実験中に実験者から混入する場合がある。これを防ぐためには、実験系にキレート剤である EDTA を添加し、実験中会話をしないようにする (6-1 実験のポイント 参照)。

(3) 実験終了後の器具・試薬・大腸菌の処理方法

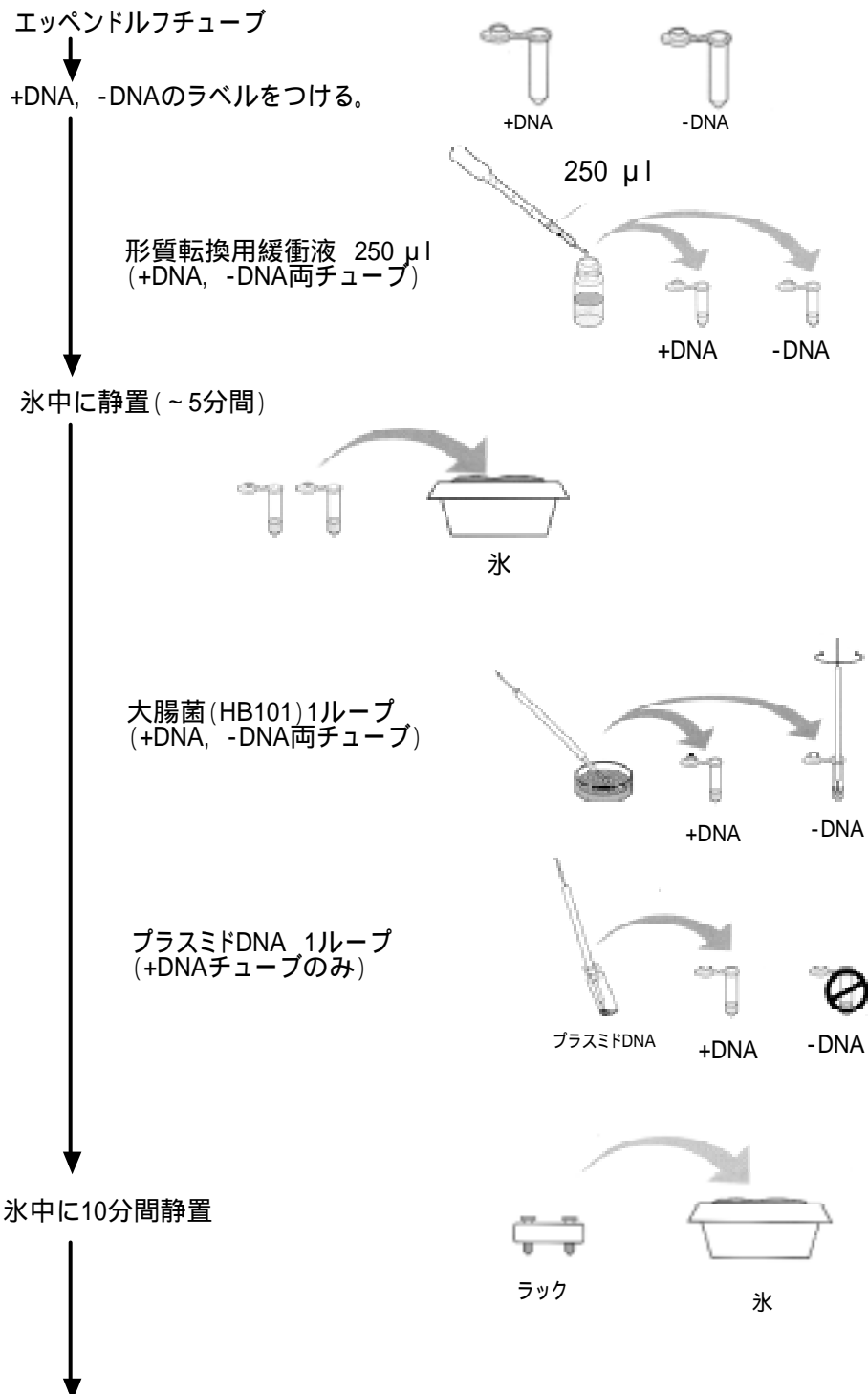
組換え実験に使用した器具 / 試薬 / 組換え大腸菌などは、全て滅菌してから廃棄する。滅菌方法は、オートクレーブ滅菌が原則である。

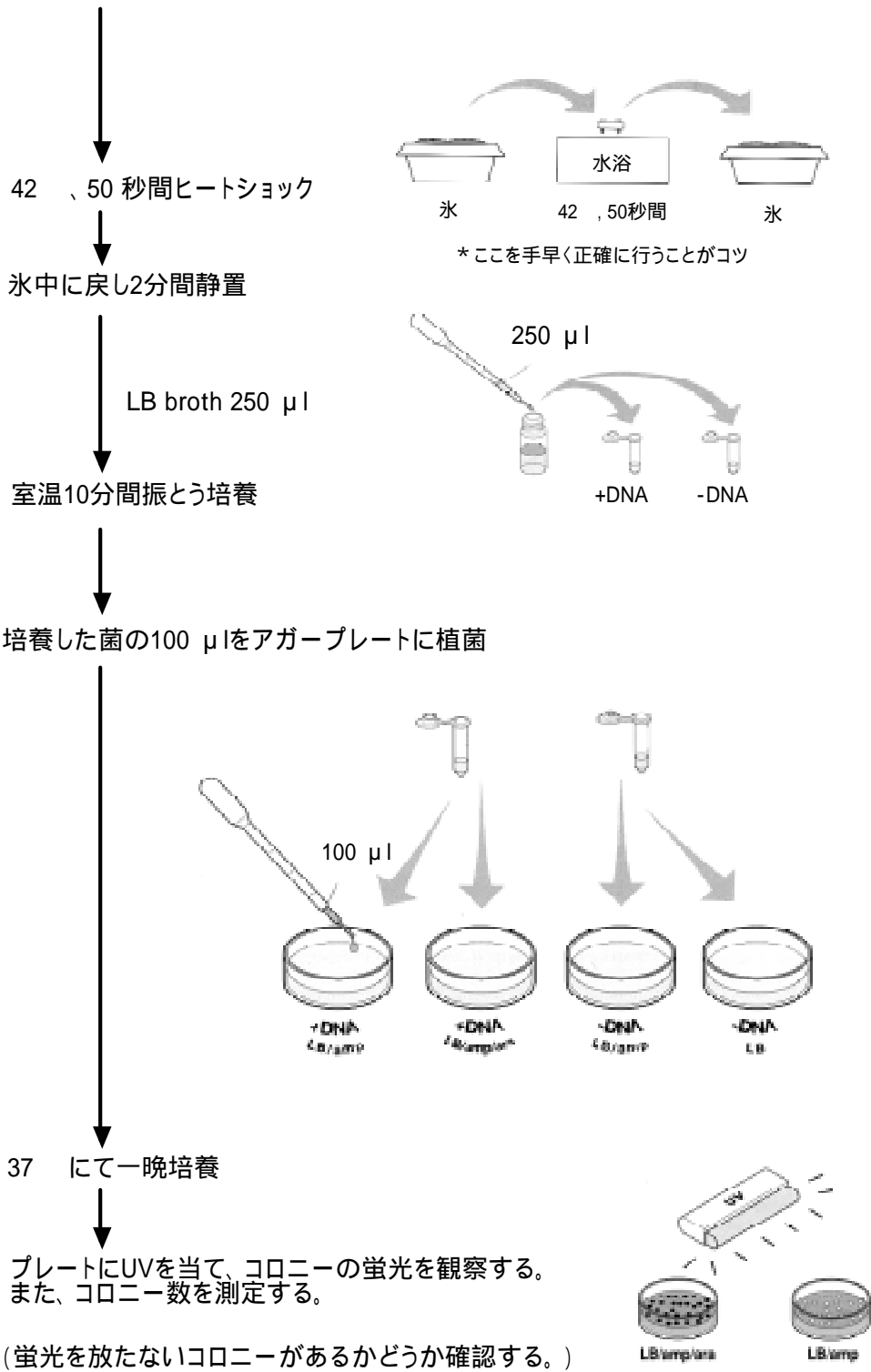
オートクレーブが設置されていない施設では、圧力釜で代用することも可能である。

菌をまいたプレートは、オートクレーブ滅菌後、最終的には産業廃棄物業者に処置してもらおう。ゴミの処理方法は、各都道府県により方法が異なるため、各地区の方法に沿って行う。

実験を実施する施設で、廃棄物処理のプロトコールを事前に作製しておくといよい。

6. 組換え DNA 実験(形質転換)





6-1. 実験のポイント

実験の各ステップでのポイントを示す。実験の各ステップでどのような反応が起こっているかも同時に示す。

使用する菌の増殖状態と数

スタープレートにおける大腸菌の増殖状態と数は、形質転換効率に影響する。実験には前日から培養した増殖中の菌を用いる。コロニーの大きいものを選び、充分量の1ループを採取する必要がある。コロニーの周縁部の菌は、増殖が盛んな状態(増殖曲線の対数増殖期(図 13.1))である。このため大きいコロニーを選べば増殖の盛んな菌を多く採取できる(図 13.2)。

長期間培養した菌は死滅期の細胞を含むため用いない方が良い。

なお本実験では、GFP 遺伝子を含む pGLO プラスミド DNA を用いているため、通常のサブクロニングと異なり、インサートが入っていないプラスミド DNA などが入り込むことは考え難いため、全てのコロニーは同一のクローンと考えても問題ない。このため、コロニーが小さい場合は、単一コロニーにこだわらず複数のコロニーを採取しても問題はない。十分な菌数を確保することが大切。

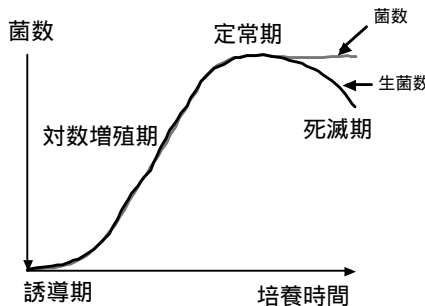


図 13.1 菌の増殖曲線

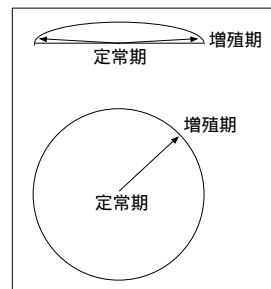


図 13.2 一つのコロニーにおける菌の増殖

菌を形質転換緩衝液に添加した後、氷中で保温

形質転換緩衝液は、塩化カルシウム (CaCl₂) 溶液であるため、懸濁した菌は不安定な状態にある。特にプラスミドを混ぜる時やヒートショックを行う際には、氷中に静置し室温に放置しないように注意する。製氷機で作製した氷を使用できない場合は、氷を木槌などで十分に破碎 (crushed ice) し、更に水を加え、チューブが十分に氷に接する状況を作ることが大切である。また、いずれの場合でも、氷の表面をアルミホイルで覆い、アルミを貫いてチューブを立てると氷の温度が一定しチューブも安定する

(図14)。

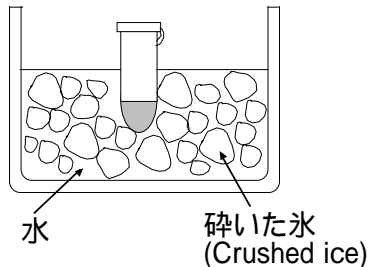


図 14.1 砕いた氷を用いた場合



図 14.2 アルミホイルで氷を覆った場合

プラスミド DNA を確実に採取

プラスミド DNA を、1ループ確実に採取する。この際、ループにプラスミド DNA 溶液は“シャボン玉”のように表面張力で付着しているの自分で見て付着していることを確認してから菌に添加する。採取後に“シャボン玉”が割れてプラスミド DNA 溶液が採れない場合がある。

ヒートショック

ヒートショックは、氷中 > 42℃・50秒 > 氷中、と連続的に温度差をつけなければならない。この温度差により大腸菌の膜の流動性が変化しプラスミド DNA が菌の中に入り込める。42℃ 処理前に室温に出してしまうと菌は弱まり、ヒートショックにもならないために形質転換の効率が低下するので注意する。

LB broth 添加後の放置

放置中に lactamase が発現する。この放置を行わなければ、(抗生物質耐性が得られず)抗生物質は分解できず、抗生物質存在下で生育できない。

液の混合

バイオ系実験では、混合が重要である。この実験においても菌と DNA の混合(懸濁)を充分に行う。ただし、混合の際、室温に戻ってしまうと菌の状態が悪くなり形質転換の効率が落ちるために注意する。

実験に用いる水について

実験に用いる水は、水道水を原料としてイオン交換・蒸留、膜を通すなどの処理によりイオンや有機物を除いたものである。イオン交換水、蒸留水、純水、超純水などがあり、

実験目的に応じて使い分ける。一方、組換えDNA実験で用いる DNase や RNase Free(含まない)滅菌水は、9000 円/500 ml 程度でメーカーから市販されている。

水道(用途:水洗剤による器具の洗浄)

飲料規格基準値に基づいた品質管理を通り水道管によって家庭に供給されている水で水道局が管理している。器具の洗浄に用いるが、洗浄後のすすぎは、その後の実験で用いるレベルの水を用いる。

イオン交換水・脱イオン水(用途:微生物の培養、生化学実験)

水道水を基にイオン交換樹脂によりイオンが除去されたことです。MgやCaイオンが多く含まれる硬水を用いる場合は、蒸留後にイオン交換樹脂を通したほうが、樹脂の劣化はすくなくなる。培養では、オートクレーブ滅菌して用いる。

蒸留水(微生物の培養、生化学実験)

イオン交換水又は水道水を沸騰・気化した蒸気を冷却することで得られた水。蒸留水の比抵抗値:1~3M \cdot cm 程度である。培養では、オートクレーブ滅菌して用いる。

純水(タンパク質解析実験、動物細胞培養、生化学実験)

Reverse osmosis(RO)膜処理、MilliQ 装置処理、蒸留処理、イオン交換処理等の方法を用いてイオンを除去し、比抵抗値 1~10M \cdot cm 程度の水のことをいう。

超純水(DNAクローニング実験、動物細胞の培養)

品質管理されたイオン交換樹脂処理、活性炭処理、Reverse osmosis(RO)膜処理等を組み合わせて処理され、比抵抗値 17M \cdot cm 以上の純水を特に超純粋という。

組換え DNA 実験で使用する大腸菌など微生物の培養では、水道水に含まれる Cl や Fe などのイオンを取り除き、オートクレーブ滅菌した脱イオン水や蒸留水が充分に使用できる。動物細胞や植物細胞など増殖速度が遅く、微量に含まれる有機物などの影響を受ける可能性がある培養では純水または超純水を滅菌して使用する。

無菌操作とヌクレア-ゼ

微生物を扱うときの基本は、特定微生物の純粋培養である。このため無菌操作は、実験系へ他の微生物が混入しないことならびに実験にもちいている微生物を外部に出さないことを目的とする。すなわち実験操作中の空中落下菌や試薬に混入している菌、更には他のプレートに生えている菌のコンタミを防ぐために無菌操作を実施する。病原微生物を扱う場合は、実験系外に出ない操作をすることもある。

一方、DNA・RNAを取り扱うときの無菌操作は、DNA・RNA の安定性に関わる DNA分解酵素(DNase)やRNA分解酵素(RNase)などのヌクレア-ゼ(Nuclease)が実験系に混入することを防ぐとことが目的である。このため同じ無菌操作でも微生物の取り

扱いの場合と DNA・RNA 取り扱いの場合では目的や意味が異なる。

ヌクレア-ゼは、細胞中ばかりでなく、試薬、水、更には実験者の唾液や汗からも混入する。そこで、使用する試薬は全てオートクレーブ(高圧蒸気)滅菌し、さらに EDTA (DNase の場合)などの阻害剤を加える。また、唾液や汗の混入を防ぐために状況に応じ実験中にマスクや手袋を着用する。

このように DNA や RNA を取り扱う実験を行う際にも、オートクレーブ滅菌や器具の乾熱滅菌を行なうため、操作自体は微生物の無菌操作に似ているが、目的はまったく異なる。(もちろん、微生物がコンタミすれば、その微生物からヌクレア-ゼがコンタミすることもありえるので、滅菌操作で微生物を死滅させることも含む。)

ろ過滅菌という滅菌方法がある。タンパク質を含む溶液の滅菌には、オートクレーブ滅菌するとタンパク質が非可逆的に変性するために 0.22 ~ 0.45 μm 程度のポアサイズをもつフィルターに溶液を通し、滅菌(正確には除菌)する方法である。この方法では、タンパク質である DNA 分解酵素や RNA 分解酵素は、フィルターを通過してしまうため、DNA・RNA を扱う場合には意味が無い。

DNA・RNA 抽出で用いる酵素は、高純度なものをを用いるとともにオートクレーブ滅菌した緩衝液に溶解し、できるだけヌクレア-ゼのコンタミを防いで使用する。

6-2. 実験結果のまとめ

Biotechnology Explorer キットのテキストでは、実験授業を 50 分ずつに分けて各々目標を設定し、授業後に確認試験を行う形式である(キットテキスト3ページ参照)。本研修では、Lesson 3、4 の一部についてテキストに従い実施してみる(Explorer キットのテキスト: 22-28 ページ、40-46 ページ)。

まとめのポイント

情報と機能、セントラルドグマ

GFP 遺伝子(情報)を含むプラスミド DNA は、紫外線を照射しても蛍光を発しない(Explorer キットのテキスト17ページ)が、アラビノース添加培地のコロニーは紫外線で蛍光を発する。DNA は情報であり「蛍光を発する」という機能を持たないが、大腸菌に導入し GFP タンパク質を発現させると GFP タンパク質が蛍光を発する。

発現調節

プラスミド DNA を導入した大腸菌は、アラビノースを含む培地中で培養すると、アラビノースが araC タンパク質と結合することで araC タンパク質の構造変化が起こりプロモータ配列 PBAD が露出する。このため GFP が発現する(本テキスト13ページ参照)。こ

ここでアラビノースは発現スイッチの ON/OFF の役割を担っている。また、GFP 遺伝子 (情報) が大腸菌内に存在しても発現しなければ、蛍光を発するという機能は起こらない。この際プロモータ配列が大腸菌のものであることが前提となる (本テキスト14 ページ)。

対照実験の置き方

抗生物質 (アンピシリン) の効果、アラビノースによるタンパク質発現スイッチの ON/OFF、そもそも実験系が成立しているか否か (菌が入っているかどうか、実験の再現性はどうかなど) などは、どのプレート同志を比較したらよいか確認する。

実験の再現性と形質転換効率

実験者全員のコロニー数のデータを比較し、形質転換効率の実験者間再現性を調べ、バラツキの原因を考察する。

本実験の場合、スタータープレートから採取した大腸菌を CaCl₂ 溶液 (Transformation 溶液) に漬すものの完全なコンピテント細胞となっていない大腸菌を用いている。この大腸菌に充分量のプラスミド DNA を加えて形質転換を行っているため、実験者間の形質転換効率は、形成されたコロニーの数をみて比較することで充分である。

< 参考: 形質転換効率測定の実験の必要性について >

ライブラリーと形質転換効率

遺伝子ライブラリーを作製し、特定の遺伝子をクローニングする際、少量ライブラリーから、より多くのコロニーを作らせてスクリーニングする必要がある (図 15)。

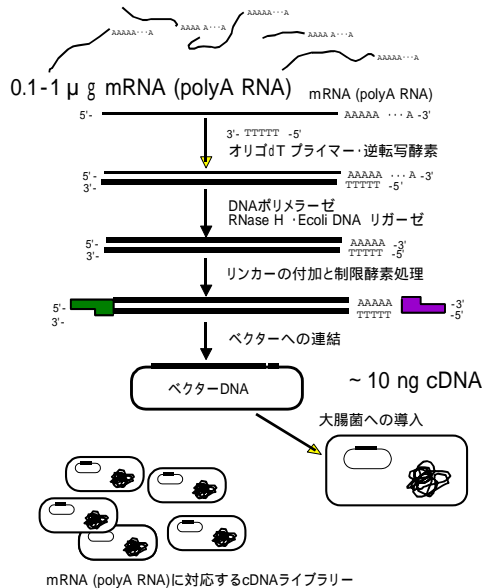


図15 cDNA ライブラリーの作製

細胞から抽出精製したマイクログラム単位の polyA RNA を材料として逆転写酵素を用いてライブラリーを作製する。ライブラリー作製には、幾つかの工程を経るため最終的な DNA 量は、ナノグラム単位である。このような少量の DNA で大腸菌を形質転換させ、できるだけ多くのコロニーを形成させることにより目的のクローンがスクリーニングしやすくなる。そこで、形質転換効率が重要になってくる。

通常、宿主(大腸菌)とベクター(プラスミド)との組み合わせ並びにコンピテント細胞調製方法の違いや形質転換方法により形質転換効率が高い系を用いて実験する。評価は、実験に用いたプラスミド DNA 量と形成されたコロニー数から計算し、プラスミド DNA の 1 μ g 相当で形成されるコロニー数(colony forming unit:CFU)を比較する。

なお、ライブラリー作製にはファージベクターを用いる場合も多い。

例えば、pGLO プラスミド DNA1 ループ(約 10 μ l、約 0.3 μ l)を用いて、形質転換実験を行なったところプレートあたり 190 個のコロニーが形成されたとする。この場合は、形質転換効率は、 3.2×10^3 コ/ μ g プラスミド DNA である(図16)。

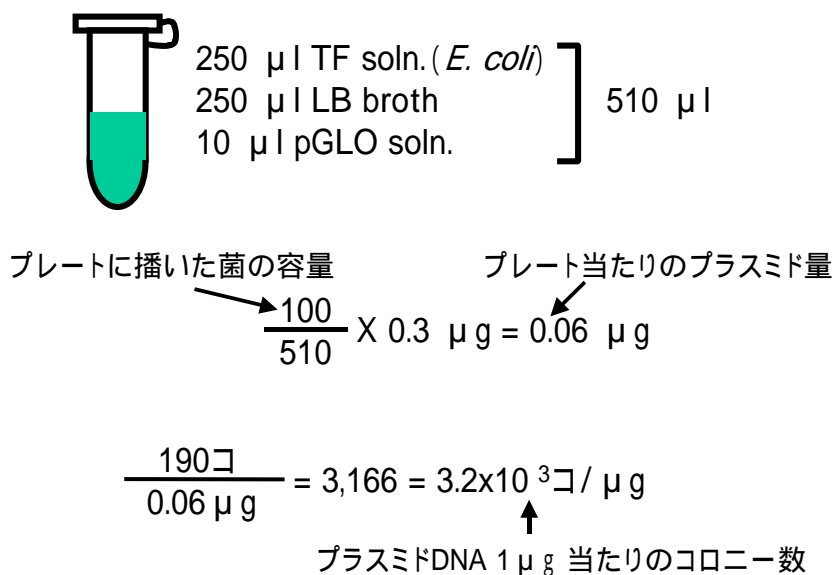


図16 形質転換効率の測定

プレートあたりに仕込んだプラスミド DNA 量とコロニー数の関係から形質転換効率を求めることができる。

ライブラリーのスクリーニングでは、多数のプレートを用いて万単位のコロニーを作らせる必要がある。そこで通常、形質転換効率が、 $10^7 \sim 10^8$ コ/ μ g プラスミド DNA のコンピテント細胞(大腸菌)を用いる。本実験をこのようなコンピテント細胞を用いて実験した場合、同数のコロニーを作らせるために必要なプラスミド DNA 量は $10^4 \sim 10^5$ 分の1で済む。図16の例の場合では、形質転換効率が 3.2×10^3 コ/1 μ g プラスミド DNA ならば 30,000 コ/10 μ g プラスミド DNA であるのに対し、形質転換効率が 3.2×10^8 コ/1 μ g プラスミド DNA ならば 30,000 コ/0.1ng プラスミド DNA となる。このように形質転換効率の高いコンピテント細胞を用いれば、ng 単位の DNA が用意できればスクリーニングが可能である。

形質転換頻度

実験に用いた大腸菌のうちプラスミド DNA を取り込んだ大腸菌がどれくらいの頻度で存在するか推測することも可能である。

大腸菌とプラスミド DNA を仕込んだ溶液の希釈系列を調製しコロニーを形成させることで仕込んだ溶液中の大腸菌数を推定できる。ここから形質転換プレートあたりに存在する菌数(形質転換体 + 非形質転換体の総数になる)を計算し、仕込んだ大腸菌

のうちどの程度の頻度でプラスミド DNA を取り込んだ(形質転換された)大腸菌が存在するか推定できる(図17)。

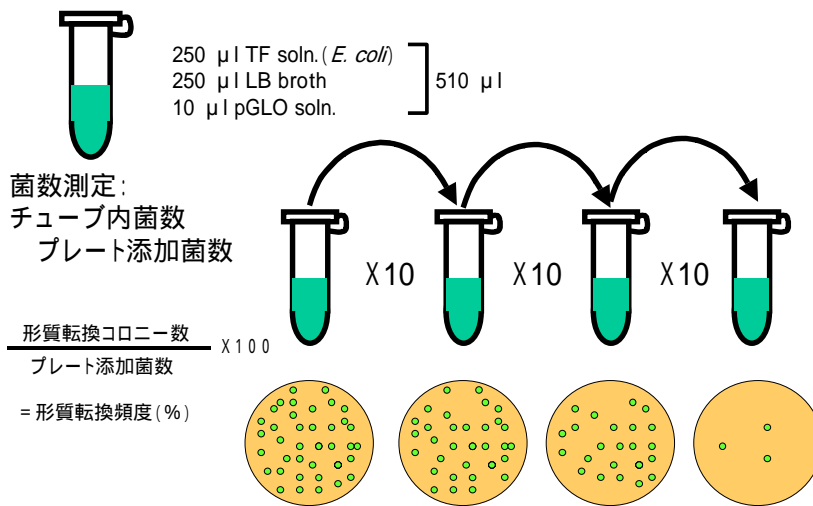


図17 仕込んだ大腸菌のうち形質転換された頻度の推定

仕込んだチューブから大腸菌溶液を一定量採取し希釈系列を調製した後、抗生物質を含まない培地に植菌・培養することでコロニー数チューブ内の菌数を計算する。この菌数からプレートに添加した菌数を計算し、形質転換コロニー数との比較により形質転換の頻度を測定する。

形質転換頻度の測定により形質転換の頻度は高くないことがわかる。

菌の増殖

形質転換後、翌朝すぐに観察する。更に昼食時、研修終了時に観察しコロニーの大きさや蛍光の具合を観察する。菌の増殖に従いコロニーは大きくなり蛍光強度も強くなるはずである。

7. どのような授業をおこなうか

教育用キットを授業に取り入れる場合、まず授業で何を教えたいかを明確にし、実行できるシラバスやコマシラバスを作製し授業計画する必要がある。同じキットであっても使い方しだいで様々な目的に使用できる。下記にいくつかの事例を示す。指導者は、授業の目的に沿った指導計画が必要であろう。

分子生物学の基本であるセントラルドグマを学ぶ

DNA は、情報であり mRNA を通じ、機能をもったタンパク質が作られる。(このキットの場合は、GFP が産生され蛍光を発する。) これを体験的に学ぶ。

< 実験中の指導ポイント >

プラスミド DNA に UV を当て、DNA は情報であり、蛍光を発する機能はもたないことを確かめる。

アラビノースマイナスのプレートの大腸菌にも GFP 遺伝子は、導入されている。つまり遺伝子は存在する。アラビノースを加えなければ、GFP は作られないことを確かめる。言い換えれば、遺伝子という情報が存在しても、タンパク質が発現されなければ蛍光を発するという機能は持たないことを実験で確かめる。

アラビノースを加える遺伝子発現調節により、初めて GFP タンパク質が作られて蛍光を発するという機能が生まれることを体験する。

アラビノースを加えていない培地で培養し、後からアラビノース溶液をコロニーに降りかける実験を行うことで、発現調節が更に明確になる。また、大腸菌から GFP を粗抽出し、熱処理で蛍光が消失する実験を行うと GFP がタンパク質であることが解る。

更に発展させて、ゲノムは、情報であり細胞で一意的に決まるが、各細胞での発現状態を反映したトランスクリプトーム(遺伝子発現プロファイル)さらにプロテオーム(発現タンパク質のプロファイル)は発現調節によりきまる話題にも迫りゲノム科学の話題に入っていくことも可能でしょう。

< 参考: 遺伝子と発現調節 >

ヒトの DNA 配列は、99.9%一致するといわれている。個人による DNA 配列の違いは、多型といい、特に1塩基の多型(Single nucleotide polymorphisms: SNPs)は、ヒト DNA 上に 0.1%存在すると言われ個人個人の性質の違い関係する。例えば、お酒に強いかわい(ALDH2: アセトアルデヒド脱水素酵素 の多型)、特定の薬剤に対する感受性などは SNPs と関係している。また、プロモータ配列など調節領域 DNA の多型は、発現のレベルに影響する。一方、個人を見た場合、脳でも肝臓でも存在している遺伝子は同じであるが発現している(使われている)遺伝子の種類が違うために組織や臓器の違いが出てくる。このように遺伝子発現は、遺伝子の情報を機能への結びつけ、細胞・組織・臓器・個体の性質(形質)を決める重要なカギとなる。ここでもちいた Biotechnology Explorer の pGLO プラスミドには、アラビノースオペロンの遺伝子発現調節機構が含まれているため GFP 発現の「ON」、「OFF」ができる。このためセントラルドグマと遺伝子発現の教育に適している。

実験を体験し生命科学への興味を促し、更に学ぶための動機付けとする。

< 実験中の指導ポイント >

GFP の遺伝子 (UV を当てても光らない) を、大腸菌に導入することで大腸菌は GFP を産生し UV を当てると光るようになる。遺伝子には、GFP の情報が含まれていることを知る。

キットに含まれている簡単な試薬で細胞内へ遺伝子を導入し形質転換が自分の手で行えることを体験する。

たとえ簡単な実験であっても、組換え体を取り扱うことを意識できるように安全な廃棄物の処理も体験する。

細胞内への遺伝子の導入は、組換え植物の作成や遺伝子治療など多くの応用技術がある。新聞や啓蒙書に記載されている身近な内容を含め、この体験実験の先に講義を含めて実施する。

組換え DNA 実験の基本技術を学ぶ

< 実験中の指導ポイント >

試薬の滅菌を行い、パストゥールピペットの代わりにマイクロピペットを用いるなど、この教育用キットの試薬や器具は用いるものの実施方法は、研究レベルの組換え DNA に即して行う。

滅菌・廃棄物処理含め自分で準備し、実験し、廃棄するところまで実施する。

マイクロピペット検定など実験操作自体の評価も含めて実施する。

コントロール実験の設定など、実験系の組み方を学ぶ。

コントロール実験を踏まえ実験結果の評価を議論する。

更に発展した実習授業

形質転換体からのプラスミド DNA 抽出と電気泳動での評価

遺伝子が DNA であることを確かめるため、形質転換した大腸菌と形質転換する前の大腸菌から DNA を抽出し電気泳動することで、形質転換した大腸菌からプラスミド DNA (pGLO) の存在を示す。更に、制限酵素処理により pGLO の制限酵素地図と比較することも可能である。

発現 GFP タンパク質の抽出・精製

大腸菌が光ることから GFP タンパク質が形質転換した大腸菌に存在することを確認するため、Biotechnology Explorer Kit 2 を用いて GFP タンパク質を精製する。

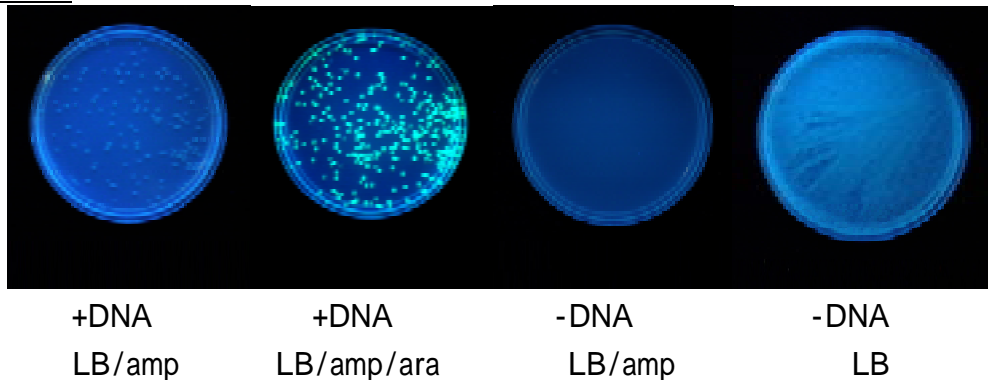
あるいは、形質転換大腸菌を凍結融解にて GFP を粗抽出し、熱処理でタンパク質を変性させることで蛍光がなくなることを確かめる。(蛍光がタンパク質であることの傍証)

実際の授業では、上記 、 、 の要素、更には指導者がオリジナルで考えた要素を付け加えて実験授業を組み立てることになるでしょう。

何れにしろ、実習ありきで授業があるのではなく、何を教える授業かを明確にし、授業を助ける意味での体験実習として位置付けることが大切でしょう。

8. 実験結果例

形質転換



amp:ampicilline ara:arabinose DNA:plasmid
E. coli:大腸菌 K12 株 HB101 LB:LB 培地
図17 形質転換結果例

アラビノースによる GFP 発現誘導

+DNA, LB/amp の系で培養した形質転換大腸菌のコロニーの内、孤立して隣接しているコロニーを選び、一方にアラビノース溶液をパスツールピペットで1滴垂らし、他のコロニーをコントロールとして、時間による蛍光強度を観察する。

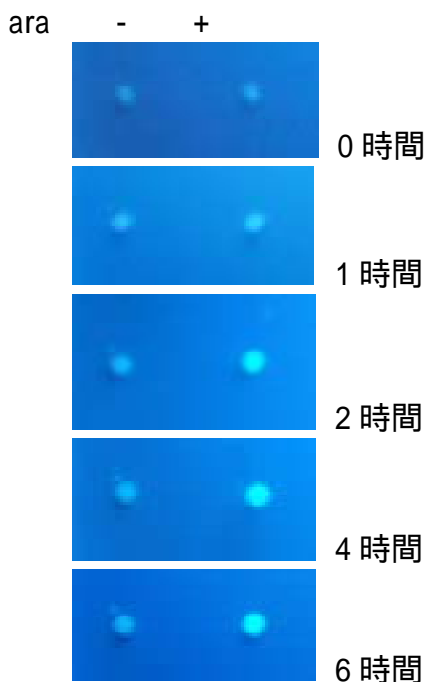


図16 GFP 発現誘導実施例

9. 参考図書

9-1. 実験に役立つ本

緒方宣邦 / 野島博著:「遺伝子工学キーワードブック」

羊土社 2000 ISBN 4-89706-637-9 絵や図をふんだんに取り込まれ、遺伝子工学技術やゲノム科学を勉強するには便利な辞書

安藤昭一編著:

「初めて学ぶ人のための微生物実験マニュアル 培養から遺伝子操作まで」

技報堂出版 2003 ISBN 4-7655-02384

バクテリア、カビ、酵母などの微生物に関する基礎的内容から、無菌操作や培養方法など微生物取り扱いの基本が実験操作の豊富な写真を用いて判りやすく解説。更に組換えDNA実験ガイドライン、教育目的組換えDNA実験のプロトコル事例も紹介されている。

大藤道衛著:「バイオ実験超基本 Q&A」

羊土社 2001 ISBN4-89706-659-X

なぜ白衣は着るの？ DNA を扱う基本は何？ データベースは実験でどのように使うの？ 遺伝子実験に必要な知識は何？ バイオ支援企業ってどんな会社？ など実験初心者に必要な超基本を Q&A 形式で解説

高木利久 / 監、大藤道衛、高井貴子 / 編:「これからのバイオインフォマティクスのためのバイオ実験入門」 羊土社 2002 ISBN 4-89706-285-3

「バイオインフォマティクスのための」とあるが、実験初心者向けのゲノム解析入門書。ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームの概念と具体的な実験方法が示されており、更に DNA 解析・タンパク質化学・組換え DNA 実験の体験実習プロトコルが含まれている。微生物、動物、植物を問わず必要となるゲノム解析入門書。

組換え DNA 実験は、Biotechnology Explorer を元に、プラスミド DNA 抽出、電気泳動でのタンパク質解析も含めたプロトコルが盛り込まれている。

広川貴次、美宅成樹:「できるバイオインフォマティクス」:中山書店、2002

ゲノム配列、タンパク質立体構造、代謝経路などの公共の生物情報データベースには、どのようなものがあり、どのように利用することができるかを解説。更に演習問題を通じ、BLAST 検索やアライメント、タンパク質の立体構造表示などデータベース活用方法の基本を体得できる入門書。データベースに基づくこれからの生物学に必須の一冊。

Sambrook and Russell : “Molecular cloning A laboratory manual” 3rd ed.

この本の第 1 版 (Maniatis et al) は、遺伝子工学実験の原点であった。遺伝子工学実験プロトコールのバイブルとして、1980 年代初頭多くの遺伝子工学研究者が活用。第 3 版も試薬の調製方法から、ベクターの構造などあらゆる実験プロトコールが含まれている。更に、マイクロアレイや GFP テクノロジーについても触れている。

Cold Spring Harbor Laboratory press 2001 ISBN0-87969-577-3

URL: <http://www.MolecularCloning.com>

9 2 . 米国高等学校生物学教科書

Leonard W. H. and Penick J. E.: “Biology A community context”

South-Western Educational Publishing Cincinnati, OH 1998 ISBN 0-538-65208

Greenberg J ed “BSCS Biology A molecular approach” 8th edition Everyday Learning Corporation Chicago, IL 2001 ISBN 0-538-69039-9

Campbell N. A. :”Biology” 4th edition The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park CA 1996 ISBN 0-8053-1957-3

Laboratory Manual “Biology:The Dynamic of Life” The McGraw-Hill company
ISBN 0-02-828251-5

9 - 3 . 関連 URL

NCBI GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>



Cn3D <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>



RasMol <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>



Biotechnology Explorer <http://explorer.bio-rad.com>



10. 参考資料

10-1. ゲノム / 遺伝子 / DNA

ゲノムとは、その生物の遺伝情報の1セットのことである。すなわち「その生物の設計図」である。生殖細胞(Haploid)では1セットの、体細胞(Diploid)では、2セットのゲノムがある。ゲノムの物質としての実体はDNAであり、情報を刻んでいる文字は、DNAの4種類の塩基、すなわちアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の配列である。ヒトの場合ゲノムは常染色体22対、性染色体1対の合わせて23対の染色体上にある。ヒトのゲノム1セットは、30億塩基対である。長さは約1メートルである。すなわちヒトの体細胞では、父親由来のゲノム1セットと母親由来のゲノム1セット、合計2セットの60億塩基対からなっている。ゲノムには、遺伝子ばかりでなく遺伝子以外のまだ機能が明らかになっていない配列も含まれる。すなわちゲノム=遺伝子ではない。なお、ゲノムという用語の由来は、gene+chromosome=genomeである。

実験においてゲノムDNA(genomic DNA)は、ヒトでいえば、体細胞から抽出したDNAのことという。また、大腸菌ではから取り出した染色体DNAである。これに対して実際に発現したすなわちmRNAとなったDNA配列は、mRNAから逆転写したcDNAとして得られる。

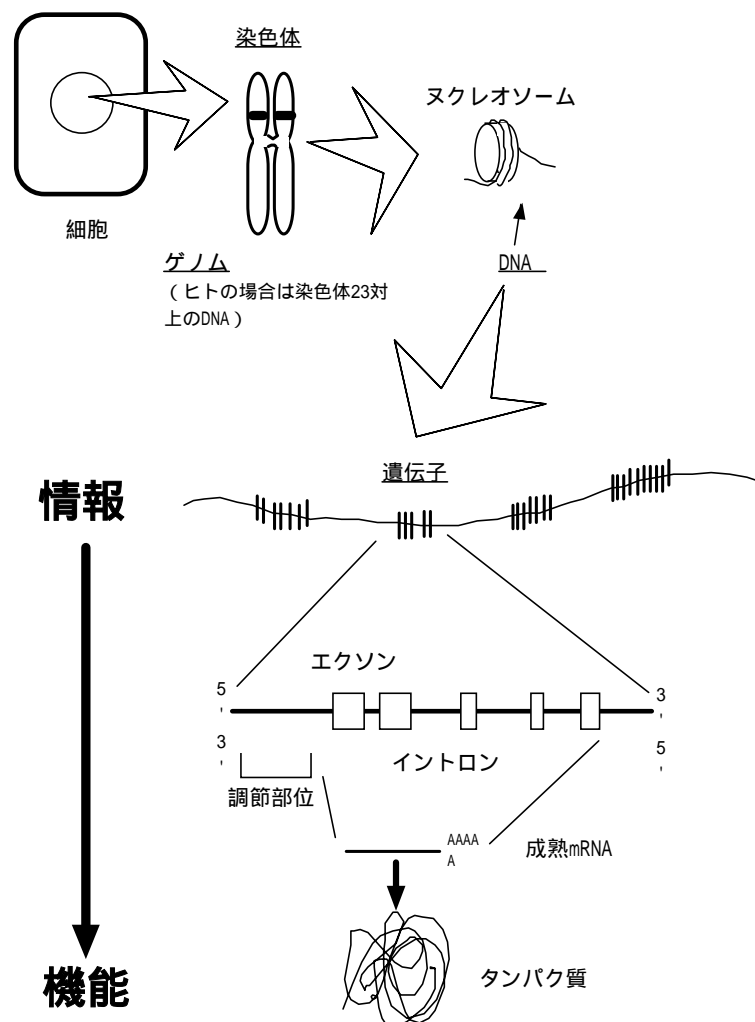
遺伝子とは、DNAのうちタンパク質の情報をもっている配列である。一昔前に「1遺伝子1酵素」、「1遺伝子1ペプチド」という考え方があったが、基本的には一つの遺伝子は、一つのタンパク質の情報をもっている。しかし現在では、一つの遺伝子が複数のタンパク質の情報を持っていることもあると分かった。これはAlternative splicingにより一つの遺伝子の情報から複数のタンパク質ができることもあるためである。また、高等生物ではPost translational modification(翻訳後修飾)により多くのタンパク質が作られる。ヒトの場合、DNAには、タンパク質の構成成分であるアミノ酸配列の情報を持っているエクソン(exon)とその間を繋ぐイントロン(intron)という配列からなっている。遺伝子は、mRNAを介してあるタンパク質を作る(発現させる)ために必要な情報、すなわちプロモータ、エクソン、イントロン含めた配列である。ただし大腸菌のような原核細胞では、イントロンはない。ヒトの場合、30億塩基対のうちアミノ酸の情報をもっている配列は、2%程度といわれている。国際ゲノムプロジェクトにより、次々に各染色体の配列が決められ遺伝子も同定された。2000年6月26日には、ドラフトシーケンスは完成したとの発表がなされたことも記憶にあたらしい。1999年に発表された慶應義塾大学清水信義のグループの22番染色体(全体の約1%)の結果では、545個の遺伝子(1)が、また2000年に発表された理化学研究所ゲノム科学総合研究センターの榎佳之・服部正平のグループの21番染色体(22番よりもやや大きい)が全体の約1%)の結果では、225個の遺伝子が発見されている(2)。2001年2月の「Nature」には、ヒトの遺伝子数は当初の予想していた10万個よりもかなり少なく3万個程度と云われている(3)。

DNA とは、核酸の一種で有機塩基、糖でできたヌクレオシド(nucleoside)が、リン酸を介してリン酸エステル結合した二重らせん構造の高分子ヌクレオチド(nucleotide)で遺伝情報を有機塩基であるアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の配列として持っている。DNA は、リン酸基があるため中性付近でマイナス電荷をもつ似た構造の繰り返し配列であるため、ゲル電気泳動で分析が可能となる。また、AとT、GとC の塩基同士は水素結合で特異的に結びついており熱や変性剤により変性し、変性剤を除くと再生する。更に G-C では、3 本の水素結合が、A-T では、2 本の水素結合をもつため塩基配列により結合の強さが違う。この性質を利用して PCR による特定 DNA 配列の増幅やハイブリダイゼーションによる特異的な配列検出が可能となった。

- (1) Dunham, I. et al.: "The DNA sequence of human chromosome 22": Nature, 402: 489-495, 1999
- (2) Hattori M. et al.: "The DNA sequence of human chromosome 21": Nature, 403: 311-319, 2000
- (3) International Human Genome Sequencing Consortium: "Initial sequencing and analysis of the human genome": Nature, 409: 860-921, 2001

遺伝子と発現

ヒトを含む高等生物では相同染色体がある。また遺伝子は、イントロンにより分断されたエクソンとして存在し、原核細胞である大腸菌とは、異なる構造を呈している(下図)。しかしどの生物においても遺伝子は、プロモータを含む調節配列で発現調節され、遺伝情報は機能をもつタンパク質と移行する。このプロモータの配列や調節配列は、生物固有の配列であるために、大腸菌で発現させた遺伝子を他の生物で発現させるためには、異なる調節配列を用いなければならない。

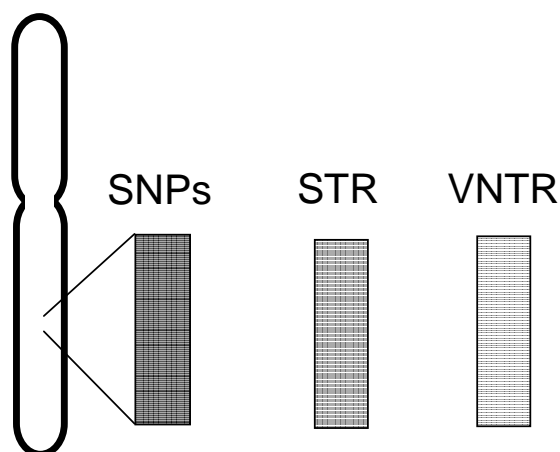


SNPsとは

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) は、「スニップス」とよみ 1 塩基多型をこ

ある。ゲノム全領域にわたり 500-1000 塩基に 1 つ程度の割合でこの多型は存在する。ヒトゲノム全体での総数は約 300 万個(ヒトゲノム DNA は約 30 億 bp であることから前塩基数の 0.1%)になる。通常、DNA 上の繰り返し配列を多型マーカーとする。STR(Short tandem repeats:3-5 塩基対の繰り返し配列)や VNTR(Variable number of tandem repeats:塩基対の繰り返し配列)がその例である。SNPsは、これらの繰り返し配列に比べ高密度な多型マーカーとして利用できる。

ちなみに 1 塩基多型と点突然変異は、同じように例えば A から G への変化となる。多型とは、集団中に 1%以上その変化がある場合と定義されている。SNPsは、様々な形質と関連し、個人個人の性格に結びつく変化となる。SNPs には、cSNPs (codingSNPs:タンパク質の情報を持っている遺伝子における SNPs), rSNPs (regulatorySNPs:調節領域にある SNPs), gSNPs (genomeSNPs:遺伝子でない DNA 配列に対する SNPs) などがある。この内 cSNPs と rSNPs は、表現型に影響がある多型であるため重要である。例えば、酒に強いか弱いかは、ALDH (Acetaldehyde dehydrogenase) の多型により決まる。また、薬剤の副作用があるか否かなども特定の遺伝子の多型によって決まるものもある。今後多くのスニップスが見つけれられ病気との関連や薬剤の作用機序との関連が解ってくると期待される。



SNPs STR VNTR

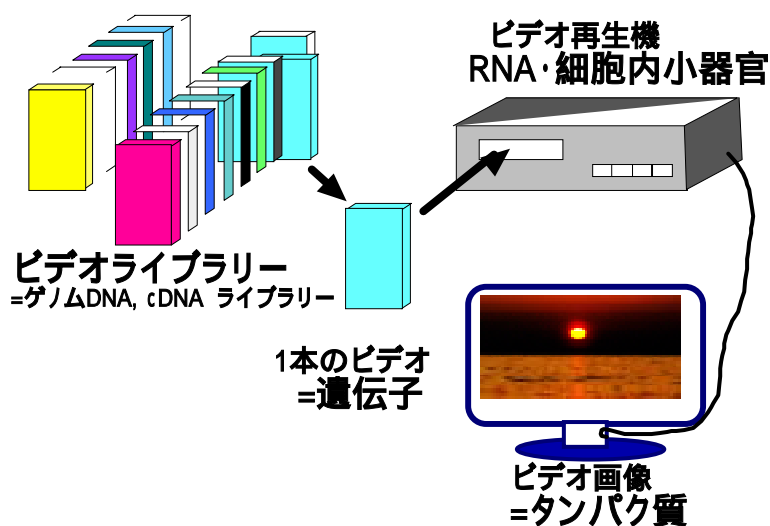
SNPs は、他の繰り返し配列マーカーに比べ遥かに高密度多型であることから、個々人の体質を示す多型マーカーである。

10-2. 遺伝子とタンパク質の関係のたとえ話

DNA は、情報でありその中に遺伝子が含まれている。遺伝子が発現すると機能をもつ

タンパク質ができる。タンパク質同志の相互作用で生命現象が成り立ってくる。
 下図のように、フロッピーディスクのデジタル情報(下記の例では写真情報)がパソコン
 やプリンターで実体である写真になることや、多くのビデオテープ(ゲノム DNA: 情報)
 の中から特定のビデオテープ(遺伝子)を選び再生して映像という機能を発揮させる
 様子と似ている。

情報から機能へ = DNAからタンパク質へ



10-3. 組換え体の封じこめについて

遺伝子組換え体は、自然界に存在しないものである。このため組換えDNA実験を行

う場合、その宿主 ベクターのレベルに応じ異なる区域で実験する必要がある(物理的封じ込め)。また、宿主自体も特定の培養条件でなければ生育できないよう外界と区別されている(生物学的封じ込め)。

物理的封じこめ (Physical containment)

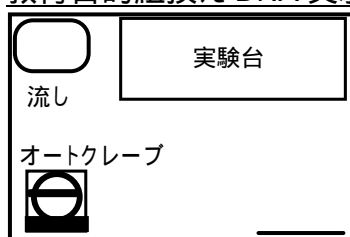
物理的封じこめには、P1-4 のレベルがある。(P は、Physical の頭文字)組換え体が実験室外に漏出するのを防ぐための実験施設レベルである。

各レベルの概略を下記に記します。実験指針では、具体的なウイルスや細菌を取り扱う際の危険度、安全性等をふまえ、どの材料を使用する場合にはどの封じ込めレベルの施設で行えば良いかの基準が定められている。管轄省庁の組換え DNA 実験指針に詳細が記されている。

< P1 レベル >

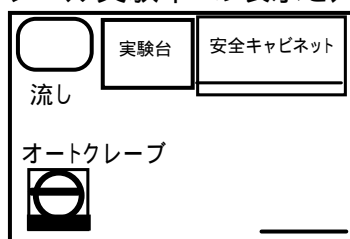
オートクレーブ等の滅菌装置が設置された通常の微生物実験室で、実験中は窓や扉が閉められる区域。

教育目的組換え DNA 実験は P1 レベルの施設であれば問題なく実施できる。



< P2 レベル >

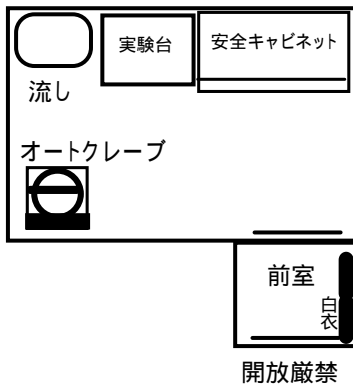
P1 レベルの条件に加え、安全キャビネットが設置、稼動できる区域。実験中は、“P2 レベル実験中”の表示を入りに掲げる必要がある。



< P3 レベル >

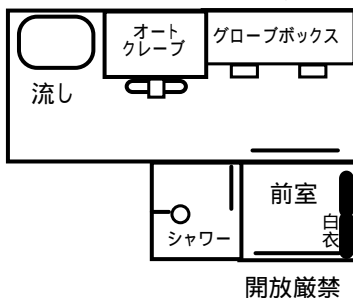
P2 レベルの条件に加え、実験室内を陰圧(空気が出入口から室内の方向に流れる状

態)となる区域で、専用の無塵衣に着替えるための前室(他の区域と隔離できるように、前後の扉は同時に開かない構造であること)とエアシャワーなどが備えられている。また、実験区域の床や天井は容易に洗浄できるようになっている必要がある。



< P4 レベル >

P3 レベルの条件に加え、クラス III 安全キャビネット(グローブボックス)を使用する。実験室専用の給排気装置が備えられ、シャワー室も備えられている。



普通の研究所では、P2 か P3 レベルまでの施設を保有しており、P4 は日本国内で限られた施設だけである。

生物学的封じ込め (Biological containmant)

特定の培養条件でなければ生育できない生物もしくは、組換え体が、万一実験室外に洩れでたとしても死滅してしまうような宿主、ベクターを用い、組換え体の拡散を防ぐ事。B1、2がある。(Bは、Biological containmantの頭文字)大腸菌 K12 株とプラスミドの組み合わせは、B1 である。

B1 レベル

自然条件下での生存率が低い宿主系と宿主依存性が高いベクターを用いた実験系です。宿主としては、大腸菌 K12 株とその誘導株、枯草菌 *B. subtilis* Marburug168 株とその誘導株、酵母 *S. cerevisiae*、動植物細胞、アグロバクテリウム、*Thermus* 属細菌を用います。

B2 レベル

大腸菌 K12 株-ベクター系のうちの安全性がさらに高い宿主ベクター系で、1776 などがあります。

このような「物理的封じ込め」ならびに「生物学的封じ込め」を組み合わせることで個々の実験を行ないます。例えば、動物細胞由来DNAを組み込んだプラスミドDNAをB1レベルである大腸菌K12株に導入する実験は、P2施設で行います。一方、微生物や植物由来のDNAを用いてB1レベルの大腸菌K12株を用いた実験は、P1レベルの施設で実施します。

教育目的組換え DNA 実験では、B1 レベルの系を用いる。

10-4. 組換え DNA 実験管理規則と安全委員会

研究目的で組換え DNA 実験を行う研究所などの施設では、管轄省庁の指針に基づいた組換え DNA 実験管理規則を作製し、安全委員会を設置して初めて実験ができる。

安全委員会は、組換え DNA 研究者、他の分野の研究者、人文社会研究者、医学研究者、医師などで事業所ごとに構成される。

しかし、PCR 実験や制限酵素処理と電気泳動、シーケンシングなど組換えを伴わない遺伝子実験は、この規則には関わらず実験ができる。

教育目的組換え DNA 実験では、文部科学省の組換え DNA 実験指針の教育目的組換え DNA 実験指針に従って実施することにより安全委員会の設置は必要ない。

10-5. タンパク質の立体構造表示

タンパク質の立体構造は、タンパク質立体構造データベースのデータをWeb上に存在する立体構造表示ソフトを用いて表示できる。以下には、立体構造表示ソフト RasMol または Cn3D を用いた GFP 立体構造の表示について示す。本テキスト中の GFP 立体構造グラフィックも RasMol で描いたものである。

RasMol (Windows) を用いた場合

ソフトウェアの入手

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm> (Windows 95, 98)

<http://www.bernstein-plus-sons.com> (Windows XP)



にアクセスし画面の指示に従って RasMol ソフトウェアをダウンロードする。

立体構造座標データの入手

<http://www.genome.ad.jp/>

ゲノムネットにアクセスし、PDB を選択して調べたいタンパク質をキーワードとして検索する。

例: GFP の場合は、green fluorescent protein をキーワードとしてクリック



[1EMA](#) (GFP 立体構造座標データ)のファイルを選択

Entire PDB file としてテキストファイルで保存する。

立体構造(3次元分子グラフィック)の表示と操作

- ・PDB ファイル(座標データ)のアイコンを、RasMol のアイコンに重ねるとソフトが起動してグラフィックが表示される。
- ・option キーを押しながら立体構造の絵自体を左クリックした状態でマウスを動かし上下左右、斜めへのグラフィックの移動ができる。
- ・shift キーを押しながら立体構造の絵自体を左クリックした状態でマウスを左右に動か

し拡大縮小できる。

・shift キーと option キーを同時に押しながらグラフィック自体を左クリックした状態でマウスを動かすとグラフィック自体を回転させることができる。

・メニューの"Display"を、左クリックすると下記のような分子表示を選ぶことができる。例えば、分子の全体像を見たいときには、"Ribbons"で表示する。また、分子を構成している原子同士の結合を見たい場合には、"Ball & Stick"で表示する。

"Wireframe" (針金モデル)、"Backbone" (骨格モデル)、"Sticks" (棒モデル)、"Spacefill" (空間充填モデル)、"Ball & Stick" (球・棒モデル)、"Ribbons" (リボン状モデル)などがある。

その他、特定の元素を色分けすることもできる。

例: GFP タンパク質の発色団(アミノ酸番号 65-67 番; cro)を表示する。

RasMol Command line を用いて下記のようにコマンドを打ち込み表示する。

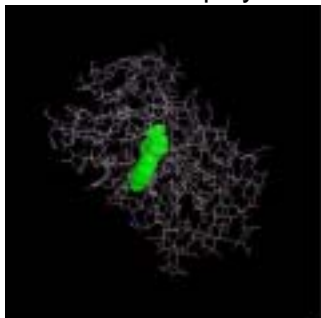
RasMol> select cro と打ち込む

22 atoms selected! と表示される。

RasMol> colour green と打ち込む

グラフィック上で発色団が緑色に表示される。

メニューの"Display"から"Spacefill"を選択すると、下図のように発色団が表示できる。



2 . Cn3D の場合

Cn3D は、NCBI が供給するソフトウェアで NCBI のタンパク質立体構造データベースのデータ (ASN.1 フォーマット) からグラフィック表示ができるソフトウェアである。

Cn3D ホームページとソフトウェアの入手

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>

画面の指示に従い、Cn3D をダウンロードする。

立体構造座標データの入手

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI ホームページにアクセスして search: Structure を選択する。目的タンパク質をキーワードとし座標データを入手する。

例: GFP の場合は、キーワード green fluorescent protein

「Go」をクリック



色々な GFP ミュータントが表示されるなか、

[1EMA](#)を選択

View 3D structure をクリックし、ファイルのダウンロードを行なう。

PC に Cn3D ソフトウェアがダウンロードされていれば、ファイルをダブルクリックするとそのままグラフィックが表示される。注: ダウンロードされたソフトウェアは、予めインストールしておく。



10-6. プラスミド pGLO の全塩基配列と遺伝子のタンパク質配列

NCBIデータベースの一つである GenBank data から本実験で使用したpGLOの塩基配列を取り出すこともできる。

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>

1: U62637 Cloning vector PubMed, Protein, Related Sequences, Taxonomy
pBAD-GFPuv,
complete sequence

LOCUS CVU62637 5371 bp DNA SYN 14-AUG-1996

DEFINITION Cloning vector pBAD-GFPuv, complete sequence.

ACCESSION U62637

VERSION U62637.1 GI:1490531

KEYWORDS .

SOURCE Cloning vector pBAD-GFPuv.

ORGANISM Cloning vector pBAD-GFPuv
artificial sequence; vectors.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5371)

AUTHORS Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P.

TITLE Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling

JOURNAL Nat. Biotechnol. 14 (3), 315-319 (1996)

MEDLINE 98294348

REFERENCE 2 (bases 1 to 5371)

AUTHORS Cramer, A. and Kitts, P.A.

TITLE pBAD-GFPuv complete sequence

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 5371)

AUTHORS Kitts, P.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-JUN-1996) CLONTECH Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..5371

/organism="Cloning vector pBAD-GFPuv"

/db_xref="taxon:50707"
 gene complement (96..974)
 /gene="araC"
 CDS complement (96..974)
 /gene="araC"
 /note="PID: g455167"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="araC protein"
 /protein_id="AAC53662.1"
 /db_xref="GI:1490532"
 /translation="MAEAQNDPLLPGYSFNAHLVAGLTP IEANGYLDFFI DRPLGMKG
 YILNLTIRQQGVVKNQGREFVCRPGD ILLFPPGEIHHYGRHPEAREWYHQWVYFRPRA
 YWHEWLNWPSIFANTGFFRPDEAHQPHFSDLFGQI INAGQGEGRYSELLAINLLEQLL
 LRRMEAINESLHPPMDNRVREACQYISDHLADSNFDIASVAQHVCLSPSRSLSHLFRQQ
 LGISVLSWREDQRISQAKLLLSTTRMPIATVGRNVGFDDQLYFSRVFKKCTGASPSEF
 RAGCEEKVNDVAVKLS"
 gene 1342..2061
 /gene="gfpuv"
 CDS 1342..2061
 /gene="gfpuv"
 /note="GFPuv is the GFP variant called 'cycle 3'; Allele:
 AC2; green fluorescent protein variant"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="GFPuv"
 /protein_id="AAC53663.1"
 /db_xref="GI:1490533"
 /translation="MASKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
 LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFK
 DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI ELKGI DFKEDGNI LGHKLEYNYNSHNVIYITADKQKN
 GIKANFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTP IGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH
 MVLLEFVTAAGITHGMDELYK"
 gene 2636..3496

```

CDS          /gene="bla"
            2636..3496
            /gene="bla"
            /function="confers resistance to ampicillin"
            /codon_start=1
            /transl_table=11
            /product="beta-lactamase"
            /protein_id="AAC53664.1"
            /db_xref="GI:1490534"
            /translation="MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGY
            IELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVE
            YSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAFLHNMGDHVTRL
            DRWEPELNEAIPNDRDITMPAAMATTLRKLITGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPL
            LRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIIVITYTGSQATMDERNRQIA
            EIGASLIKHW"

```

BASE COUNT 1369 a 1368 c 1300 g 1334 t

ORIGIN

```

    1 atcgatgcat aatgtgcctg tcaaatggac gaagcagggg tcttgcaaac cctatgctac
   61 tccgtcaagc cgtaattgt ctgattcggt accaattatg acaacttgac ggctacatca
  121 ttcacttttt cttcacaacc ggcacggaac tcgctcgggc tggccccggt gcatttttta
  181 aataccgcg agaaatagag ttgatcgtca aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata
  241 ggcatccggg tggtgctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctcgcgccag
  301 cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag
  361 caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgctgatg
  421 tactgacaag cctcgcttac ccgattatcc atcggtggtat ggagcgactc gttaatcgct
  481 tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc
  541 ccttcccctt gcccgcgctt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggtggtgc
  601 gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgtattg gcaaatttg acggccagtt aagccattca
  661 tgccagtagg cgcgaggacg aaagtaaacc cactggtgat accattcgcg agcctccgga
  721 tgaccaccgt agtgatgaat ctctctggc gggaacagca aaatatcacc cggtcggcaa
  781 acaaattctc gtccctgatt tttcaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata

```

841 taacctttca ttcccagcgg tcggtcgata aaaaaatcga gataaccgtt ggcctcaatc
901 ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt
961 tgcgcttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaccaa ttgtccatat
1021 tgcacagac attgccgtca ctgctctttt tactggctct tctcgtaac caaacggta
1081 accccgctta ttaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgct
1141 aacaaaagtg tctataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttga cggcgtcaca
1201 ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg atcctacctg acgcttttta
1261 tcgcaactct ctactgtttc tccatacccg ttttttggg ctagaataa tttgtttaa
1321 ctttaagaag gagatataca tatggctagc aaaggagaag aacttttcac tggagtgtc
1381 ccaattcttg ttgaattaga tggatgatt aatgggcaca aattttctgt cagtggagag
1441 ggtgaagggtg atgctacata cggaaagctt acccttaaat ttatttgac tactgaaaa
1501 ctacctgttc catggccaac actgtcact actttctctt atggtgttca atgcttttcc
1561 cgttatccgg atcatatgaa acggcatgac ttttcaaga gtgcatgcc cgaaggttat
1621 gtacaggaac gactatatac tttcaagat gacgggaact acaagacgag tgcgaagtc
1681 aagtttgaag gtgataacct tgftaatcgt atcgagttaa aaggattga tttaaagaa
1741 gatgaaaca ttctcggaca caaactcgag tacaactata actcacaca tgtatacatc
1801 acggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gctaacttca aaattcgcca caacattgaa
1861 gatggatccg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggcct
1921 gtcttttac cagacaacca ttacctgtcg acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac
1981 gaaaagcgtg accacatggt ccttcttgag tttgtaactg ctgctgggat tacacatggc
2041 atggatgagc tctacaaata atgaattcga gctcgttacc cgggatcct ctagagtga
2101 cctgcaggca tgcaagcttg gctgttttgg cggatgagag aagattttca gcctgataca
2161 gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc
2221 ggtggtcca cctgacccca tgccgaactc agaagtgaag cgccgtagcg ccgatggtag
2281 tgtgggtcc cccatgagag agtagggaac tgccaggcat caaataaac gaaaggctca
2341 gtgcaaagac tggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tctgagtag
2401 gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgcaagcaa cggcccggag ggtggcggc
2461 aggacgcccg ccataaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg
2521 cctttttgag tttctacaaa ctctttgttt atttttctaa atacattcaa atagtatcc
2581 gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag
2641 tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttggc gcattttgcc ttctgtttt
2701 tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt
2761 ggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga
2821 acgttttcca atgatgagca cttttaagat tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtgt

2881 tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg acttggttga
2941 gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag
3001 tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg
3061 accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg
3121 ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc
3181 agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccc
3241 gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagtgca ggaccacttc tgcgctcggc
3301 ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg
3361 tatcattgca gactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac
3421 ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact
3481 gattaagcat tgtaactgt cagaccaagt ttactcatat aactttaga ttgatttacg
3541 cgccctgtag cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta
3601 cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctgcccagct
3661 tcgcccggctt tccccgtaa gctctaatac gggggctccc tttagggttc cgatttagtg
3721 ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggcat
3781 cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac
3841 tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggg ctattctttt gattataag
3901 ggattttgcc gatttcggcc tatttggttaa aaaatgagct gatttaaca aaattaacg
3961 cgaatttta caaaatatta acgtttacaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt
4021 gataatctca tgacaaaat ccctaacgt gagtttctgt tccactgagc gtcagacccc
4081 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg
4141 caaacaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact
4201 ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgagatac caaatactgt ccttctagtg
4261 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgctacata cctcgctctg
4321 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac
4381 tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca
4441 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga
4501 gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggaag cggcagggtc
4561 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggatctt ttatagtcct
4621 gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc aggggggagg
4681 agcctatgga aaaacgccag caaccgggc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct
4741 tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc
4801 tttgagtgag ctgataccgc tcgccgagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc
4861 gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat tttctcctta cgcactctgt cggattttca

4921 caccgatat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat
4981 aactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg
5041 ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc ttacagaca gctgtgaccg
5101 tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtatc accgaaacgc gcgaggcagc
5161 aaggagatgg cgccaacag tccccggcc acggggcctg ccaccaacc cacgccgaaa
5221 caagcgctca tgagcccga gtggcgagcc cgatcttccc catcggatgat gtcggcgata
5281 taggcgccag caaccgacc tgtggcgccg gtgatgccgg ccacgatgcg tccggcgtag
5341 aggatctaattctcatgtttgacagcttatc