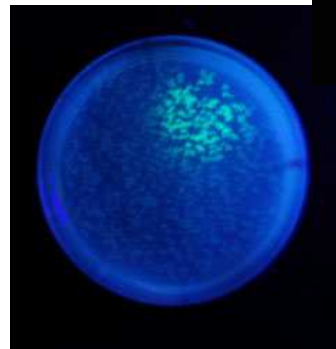
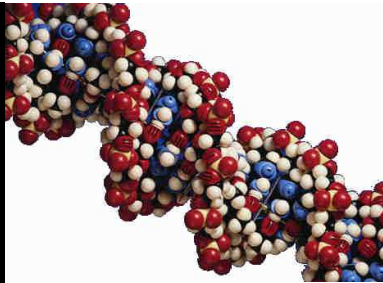
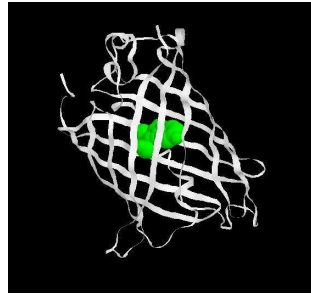
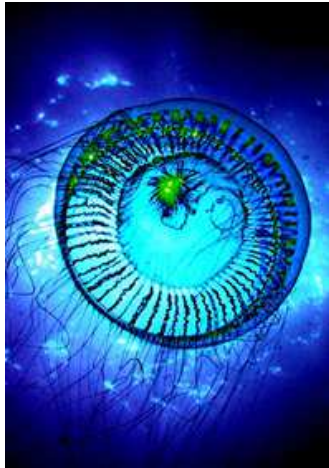


GFP遺伝子による大腸菌の形質転換



2021年8月19日～20日

おおとう みちえい

大藤 道衛

遺伝子組換え実験(講義と実習)

1日目

講義

実験の背景・原理

遺伝子組換え実験、pGLOプラスミドと遺伝子発現
形質転換実験(遺伝子組換え実験)操作

実習

形質転換実験: プラスミドDNAの大腸菌への導入と培養開始

GM検知実験: 食材からのDNA粗抽出とPCR反応開始

講義

遺伝子リテラシー教育と米国の教育教材

遺伝子組換え実験(講義と実習)

2日目

実習・演習

形質転換結果判定と考察

GFP遺伝子発現実験

講義と討論

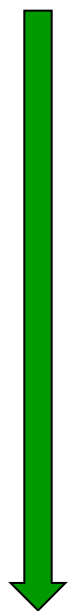
実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

廃棄物処理方法

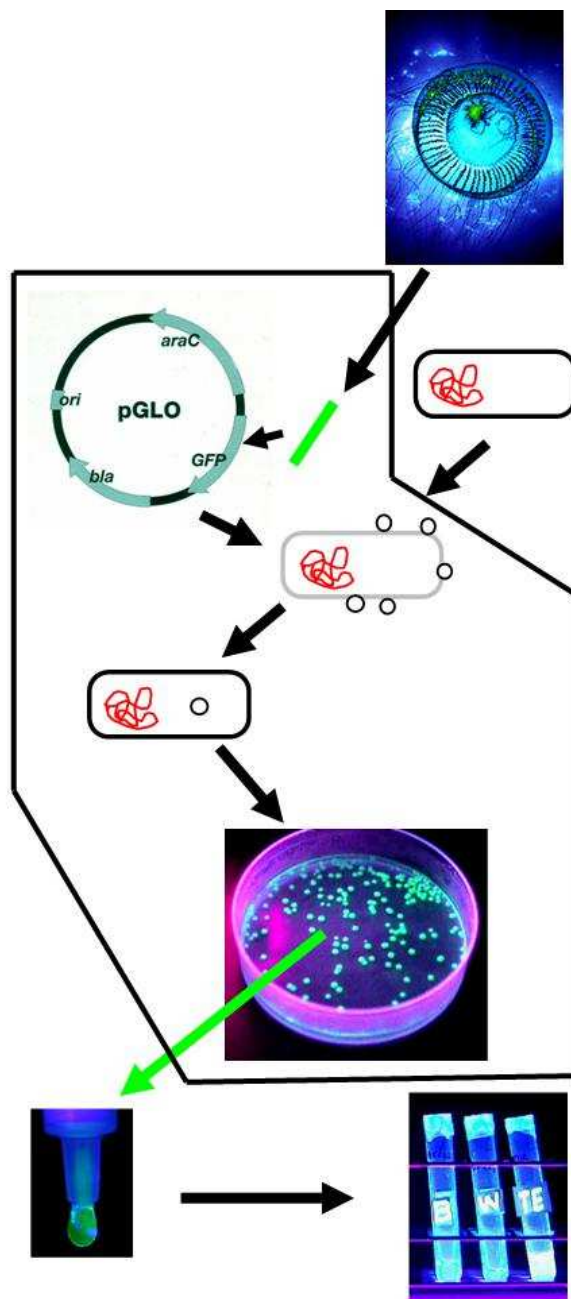
発展的実験授業展開

GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

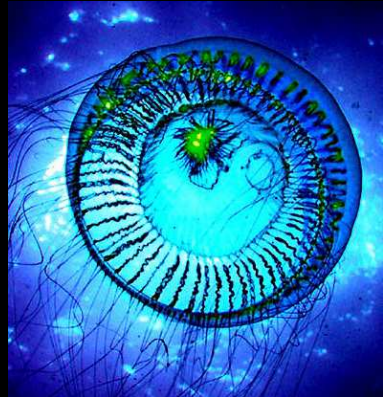
情報
(DNA)



機能分子
(タンパク質)



オワンクラゲとは



Bio-Rad Laboratories



<http://carnivoraforum.com/topic/10421768/1/>

テキスト21ページ



江ノ島水族館

ヒドロ虫綱クラゲ

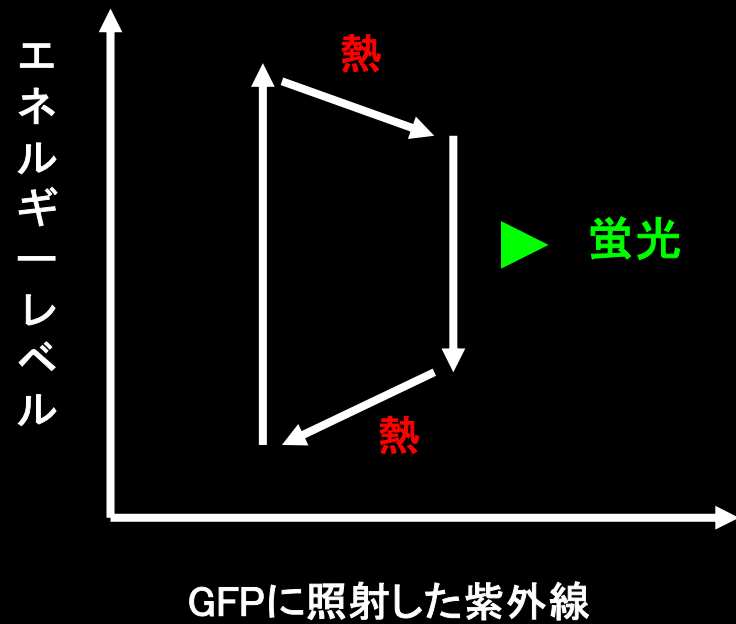
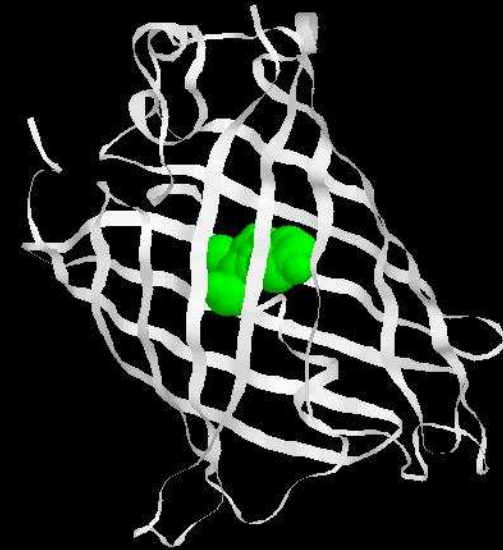
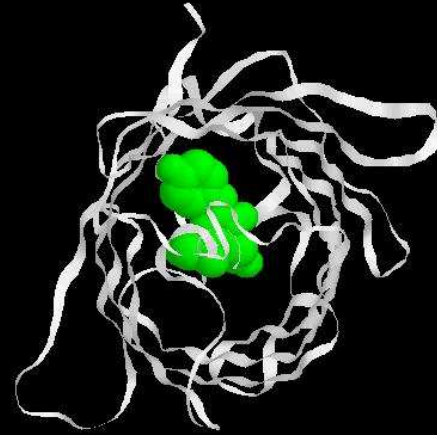
傘の直径20cmくらいになる、傘の中央が口
暗闇での刺激により発光する

シアトルに生息(最近はいなくなった。)

江ノ島でも春～夏生息といわれている

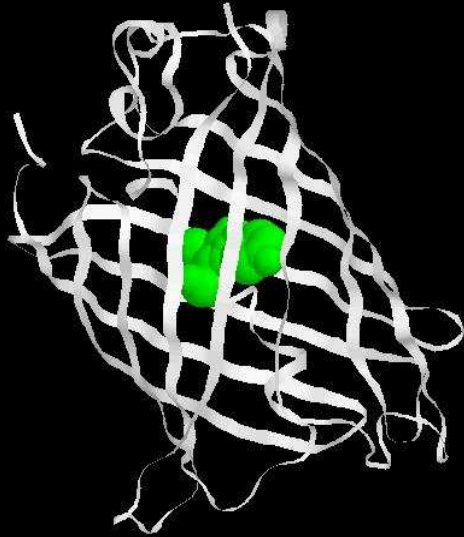
オワンクラゲの学名は、*Aequorea aequorea*, *Aequorea forskalea*,
Aequorea victoria (太平洋北東海域のバンクーバー島周辺に生息),
Aequorea coerulescens (日本近海に生息)。

GFPとは

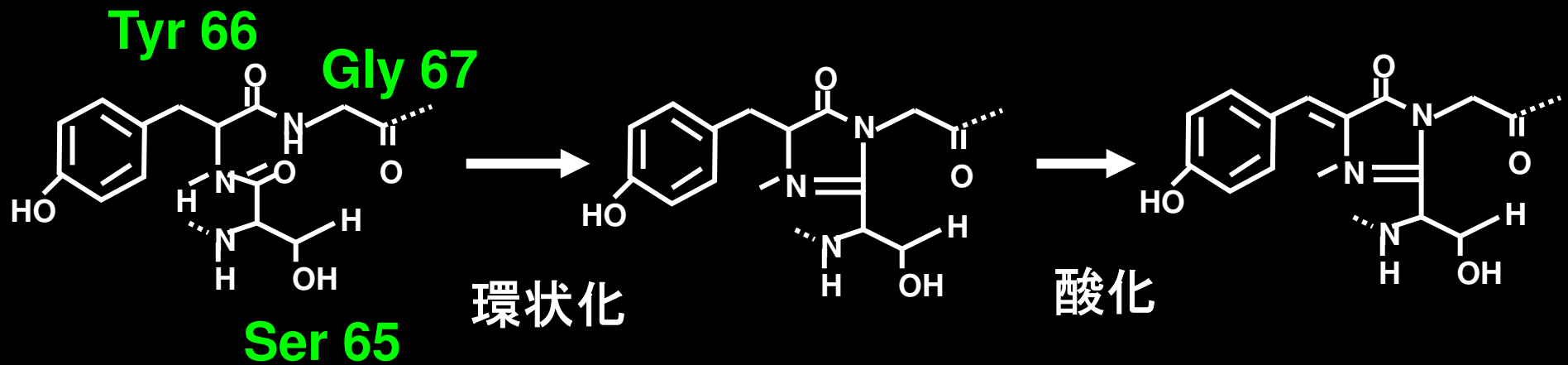


テキスト21 - 22ページ、60 - 61ページ

GFPの発色団



Ser-Tyr-Gly
65 – 66 - 67



テキスト60 - 61ページ

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"



The Nobel Prize in Chemistry 2008
Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien

Share this: 66

The Nobel Prize in Chemistry 2008



Photo: U. Montan
Osamu Shimomura
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Martin Chalfie
Prize share: 1/3



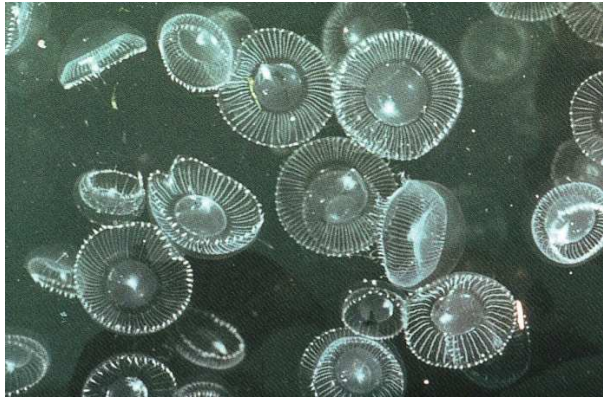
Photo: U. Montan
Roger Y. Tsien
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Chemistry 2008 was awarded jointly to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".

Photos: Copyright © The Nobel Foundation

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/index.html

くらげの採取とGFPの精製(下村先生 in 米国シアトル)



イクオリンからGFPへのエネルギー転移

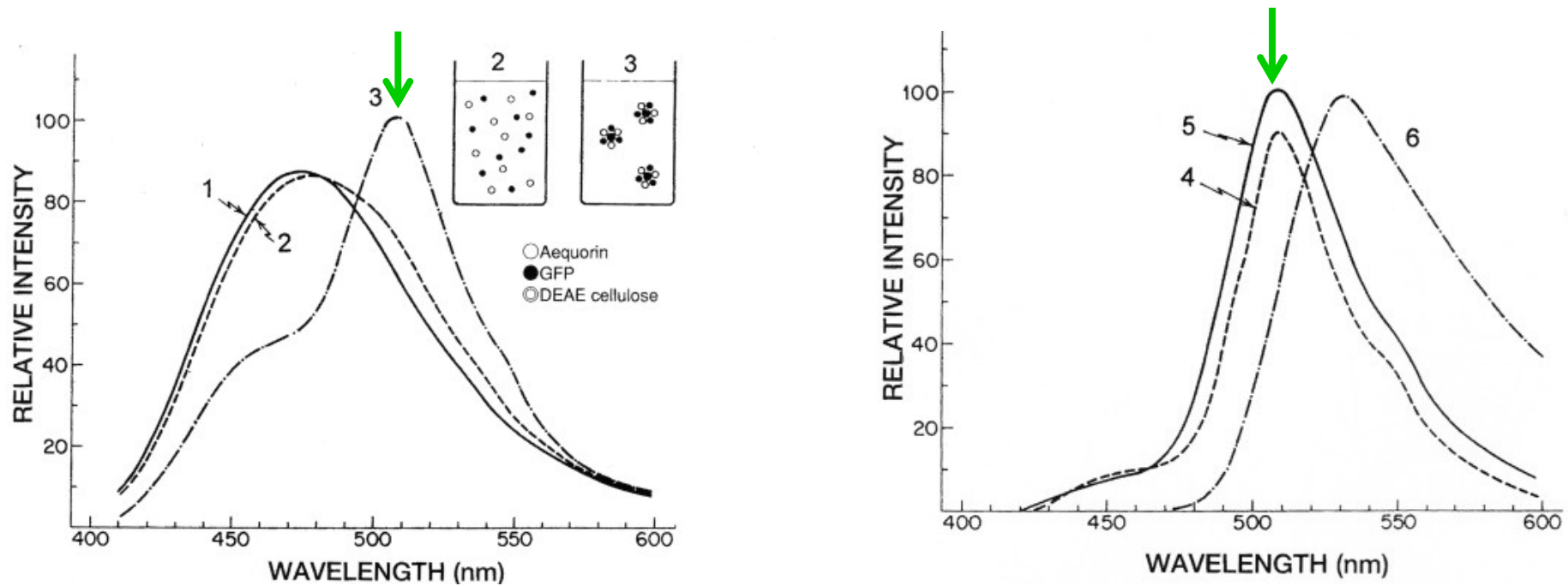


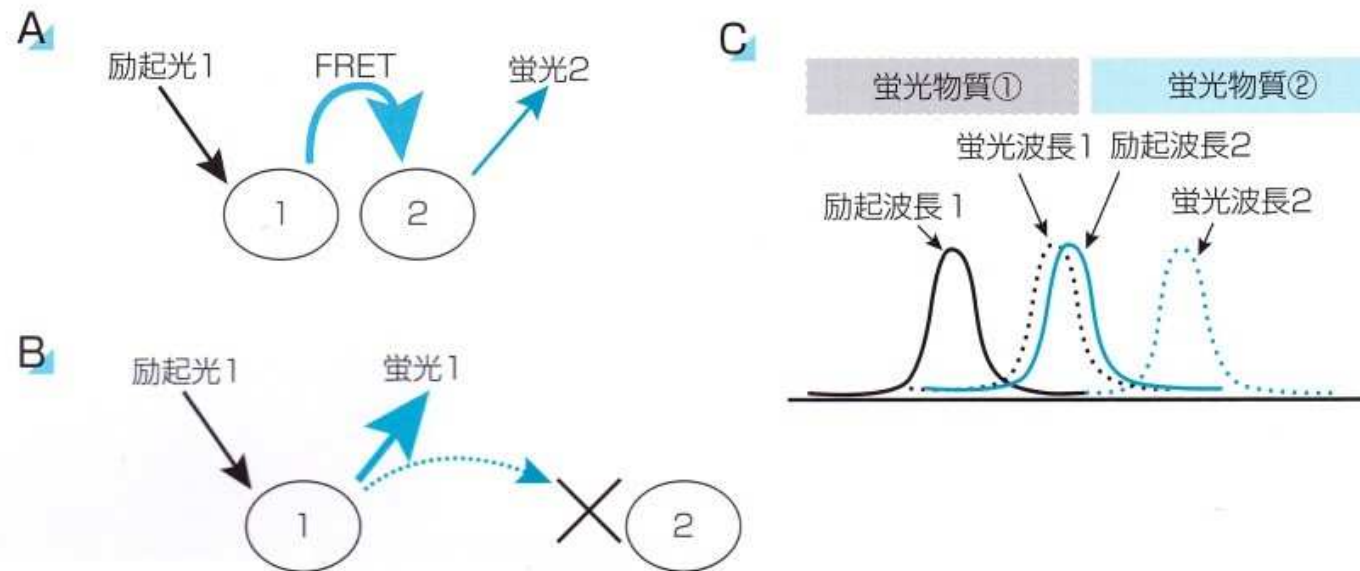
図5 イクオリンからGFPへのエネルギー転移を示す実験

イクオリンを種々の条件下で微量のカルシウムイオンで発光させてスペクトルを測定²⁴⁾。

(1) イクオリンの発光、(2) イクオリン+GFP、(3) イクオリン+GFP+DEAEセルローズ、(4) 3を遠心し沈澱をバッファーに再懸濁、(5) オワンクラゲの発光スペクトル、(6) イクオリン+FMN+DEAEセルローズを遠心し沈澱をバッファーに再懸濁。(2) と (3) では使用したイクオリン量もGFP量も全く同じである。

*DEAE cellulose
陰イオン交換樹脂

エネルギー転移 (FRETの原理)



A) fluorescent resonance energy transfer (FRET)

ある蛍光色素 (②) の蛍光エネルギーとして励起状態になった別の蛍光色素 (①) のエネルギーが利用される場合、1つの蛍光色素 (①) を励起させることにより他の蛍光色素 (②) にエネルギーが転移し結果として他の蛍光色素から蛍光が発せられる。この現象は、2つの蛍光物質が十分に近づいている場合に起こる

B) クエンチャーに FRET した場合

相手方の物質がクエンチャー [消光物質 (②)] の場合、蛍光物質 (①) を励起させても FRET によりそのエネルギーは消光物質に転移し蛍光は発せられない。しかし、消光物質 (②) が離れている場合 (離れてしまった場合) には、消光されず蛍光物質 (①) の蛍光が発せられる

C) FRET と蛍光波長

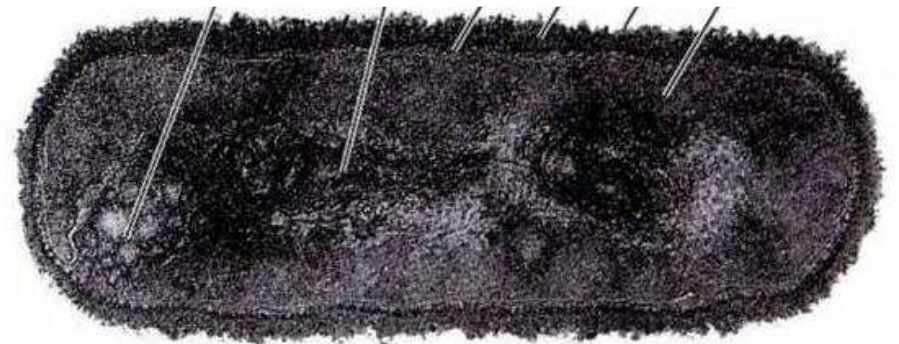
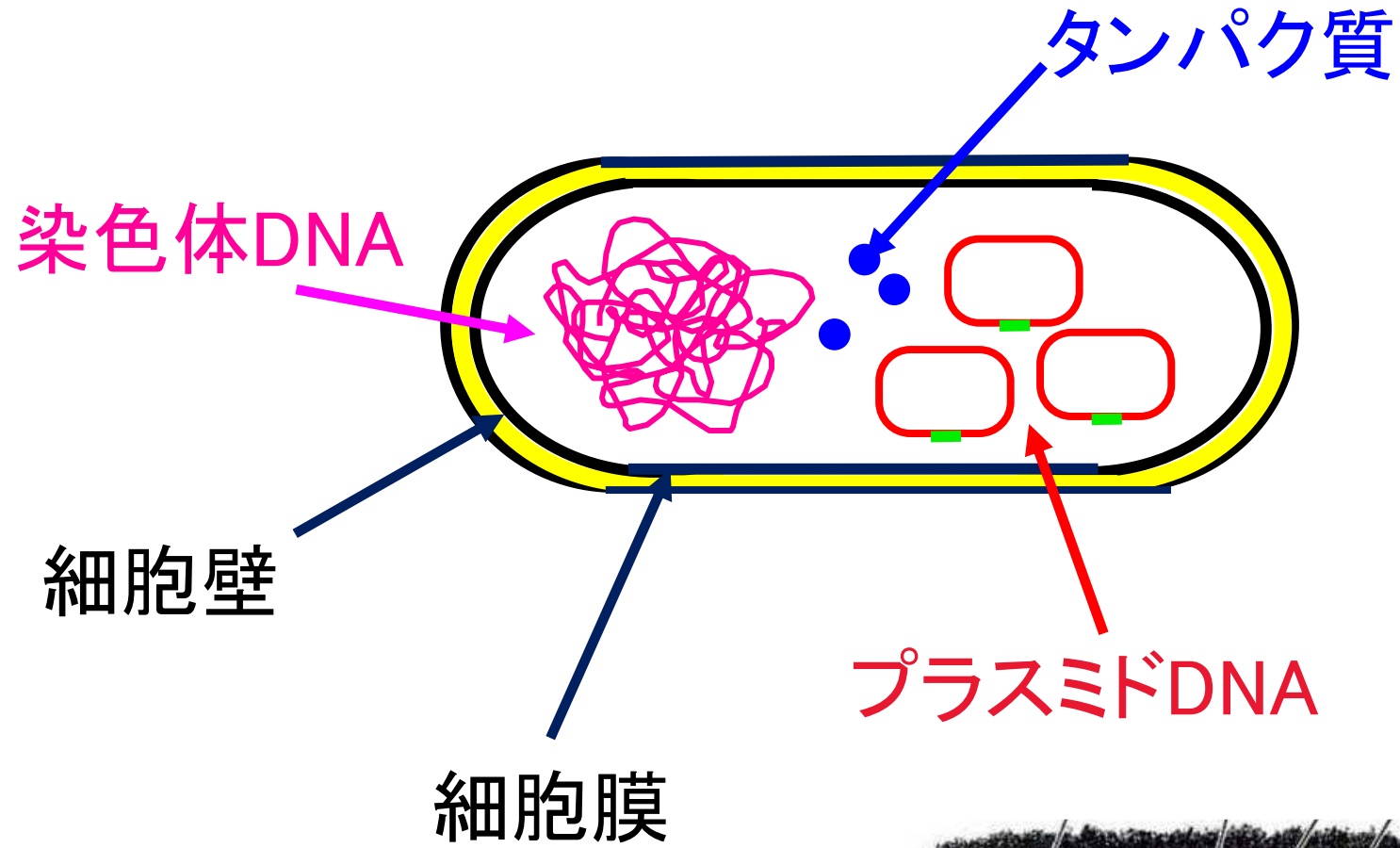
FRET が起こる場合、蛍光物質①の蛍光波長と蛍光物質②の励起波長が重複している。このため励起状態の蛍光物質①から、蛍光として利用されるエネルギーは蛍光物質②の励起に利用される

大藤道衛 「最適な実験を行うためのバイオ実験の原理」羊土社(2006) 198ページ

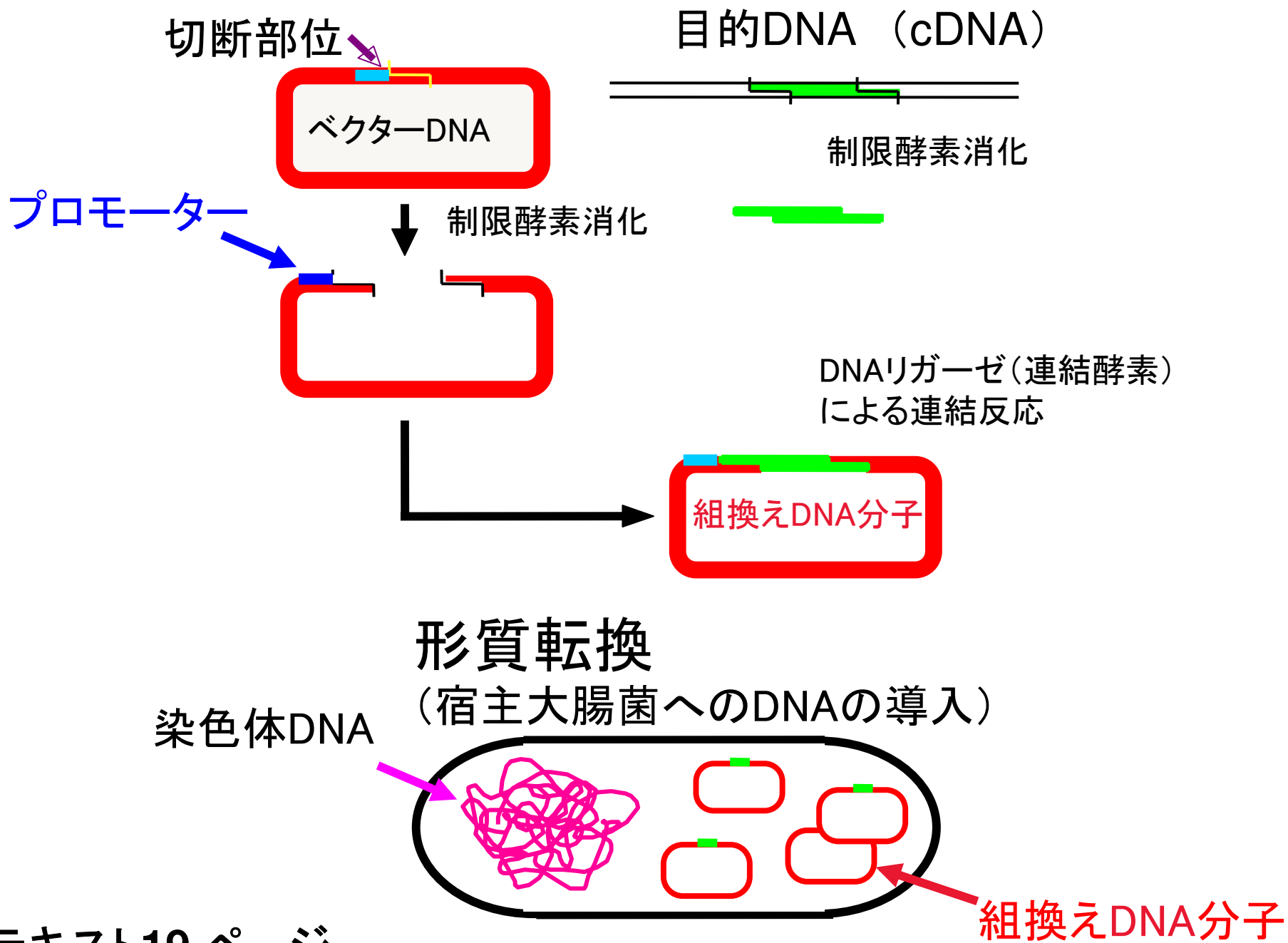
注:FRETの”F”は、発見者のTheodor Försterの”F”である。

IUPACは、Förster resonance energy transfer (FRET)の呼称を薦めている。

大腸菌の構造



遺伝子組換え実験(組換えDNA実験)



Paul Bergによる遺伝子組換え実験のはじまり

1975年2月 アシロマ会議

Asilomar Conference on Recombinant DNA



James Watson, Sydney Brenner

Paul Berg

1972年 組換えDNA技術

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 69, No. 10, pp. 2904-2909, October 1972

Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*

(molecular hybrids/DNA joining/viral transformation/genetic transfer)

DAVID A. JACKSON*, ROBERT H. SYMONS†, AND PAUL BERG

Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305

Contributed by Paul Berg, July 31, 1972

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 69, No. 11, pp. 3365-3369, November 1972

Cleavage of Simian Virus 40 DNA at a Unique Site by a Bacterial Restriction Enzyme

(DNA mapping/adenovirus-SV40 hybrid/T4 gene 32 protein/electron microscopy/double-strand cleavage)

JOHN F. MORROW AND PAUL BERG

Department of Biochemistry, Stanford University Medical Center, Stanford, California 94305

Contributed by Paul Berg, August 16, 1972

Herbert W Boyer (UCSF)

Stanley Norman Cohen

Venture capitalist: Robert A Swanson

1976年 **Genentech** 設立

バイオベンチャーの始まり

1978年 組換え Insulin

1979年 組換え 成長ホルモン

写真: Wikipedia

<https://www.sciencehistory.org/historical-profile/paul-berg>

<https://fnih.org/our-people/board-of-directors/paul-berg>

遺伝子研究における指針・法律

遺伝子組換え実験（組換えDNA実験）

1975年アシロマ会議

日本：1978-9年各省庁における「組換えDNA実験指針」

1999年バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書

- ①生物多様性の保全
- ②生物資源の持続可能な利用
- ③生物遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ公平な配分
地球上の生物は、進化の過程で多様に分化しバランスを持っている（生物多様性）。
組換え生物（新しい生物）の環境への導入を適切に管理し多様性を維持する。

日本：2004年「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」施行

遺伝子組換え実験 (組換えDNA実験)

発現ON



+



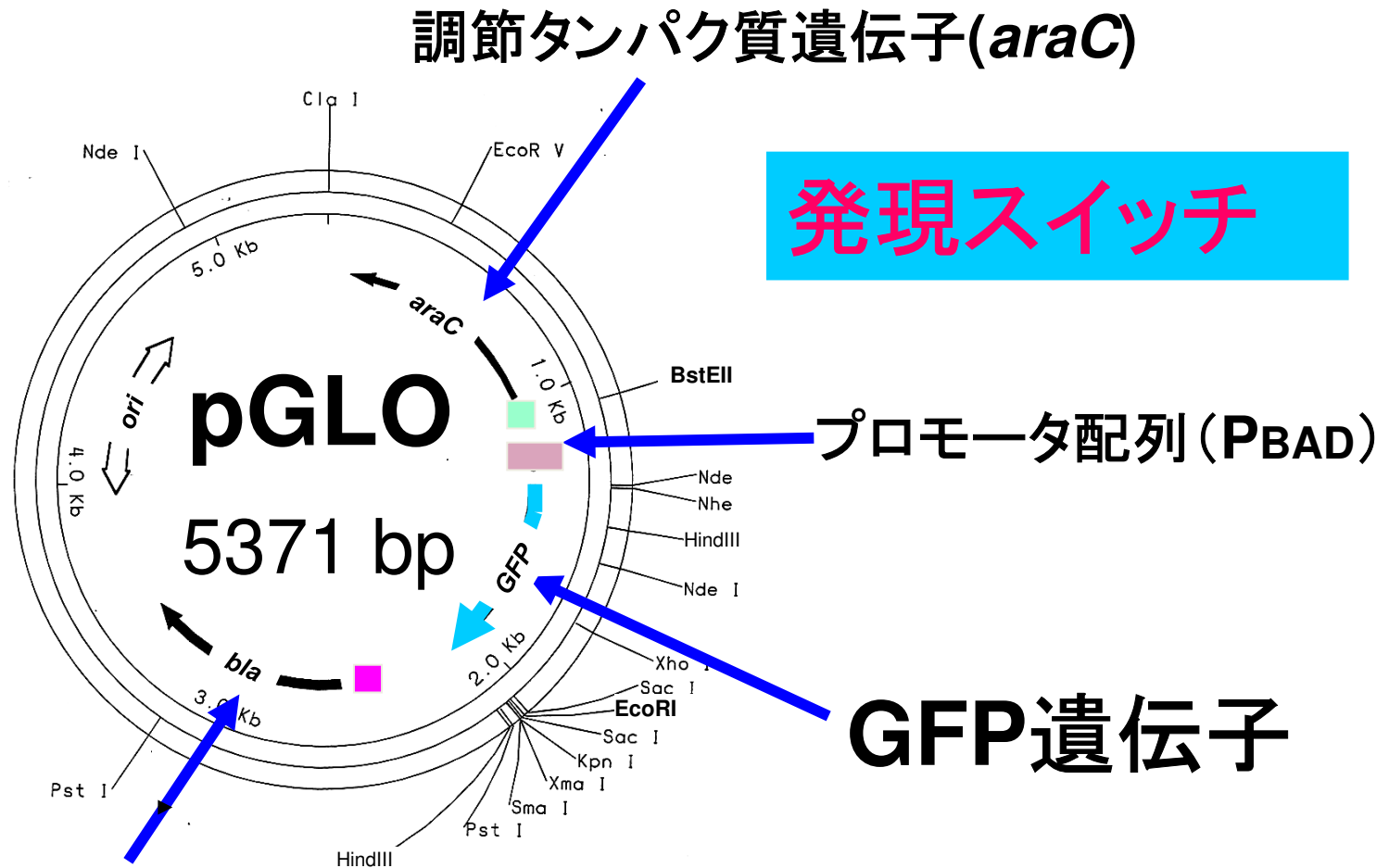
=



発現OFF



プラスミドDNA pGLOの構造

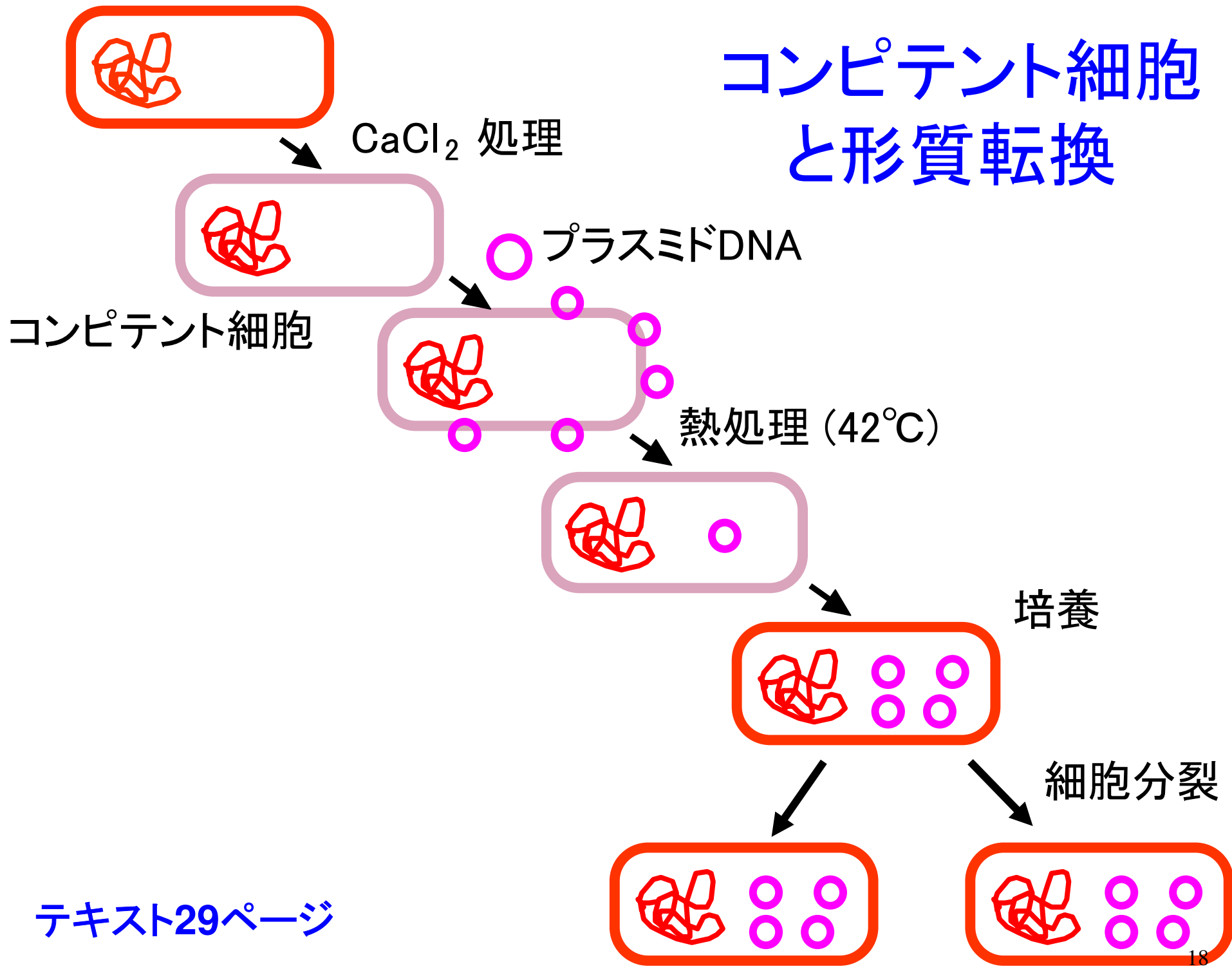


アンピシリン耐性遺伝子
(β ラクタマーゼ (beta lactamase) の遺伝子)

テキスト23ページ

pGLOプラスミドDNAの塩基配列: テキスト55-60ページ

コンピテント細胞 と形質転換

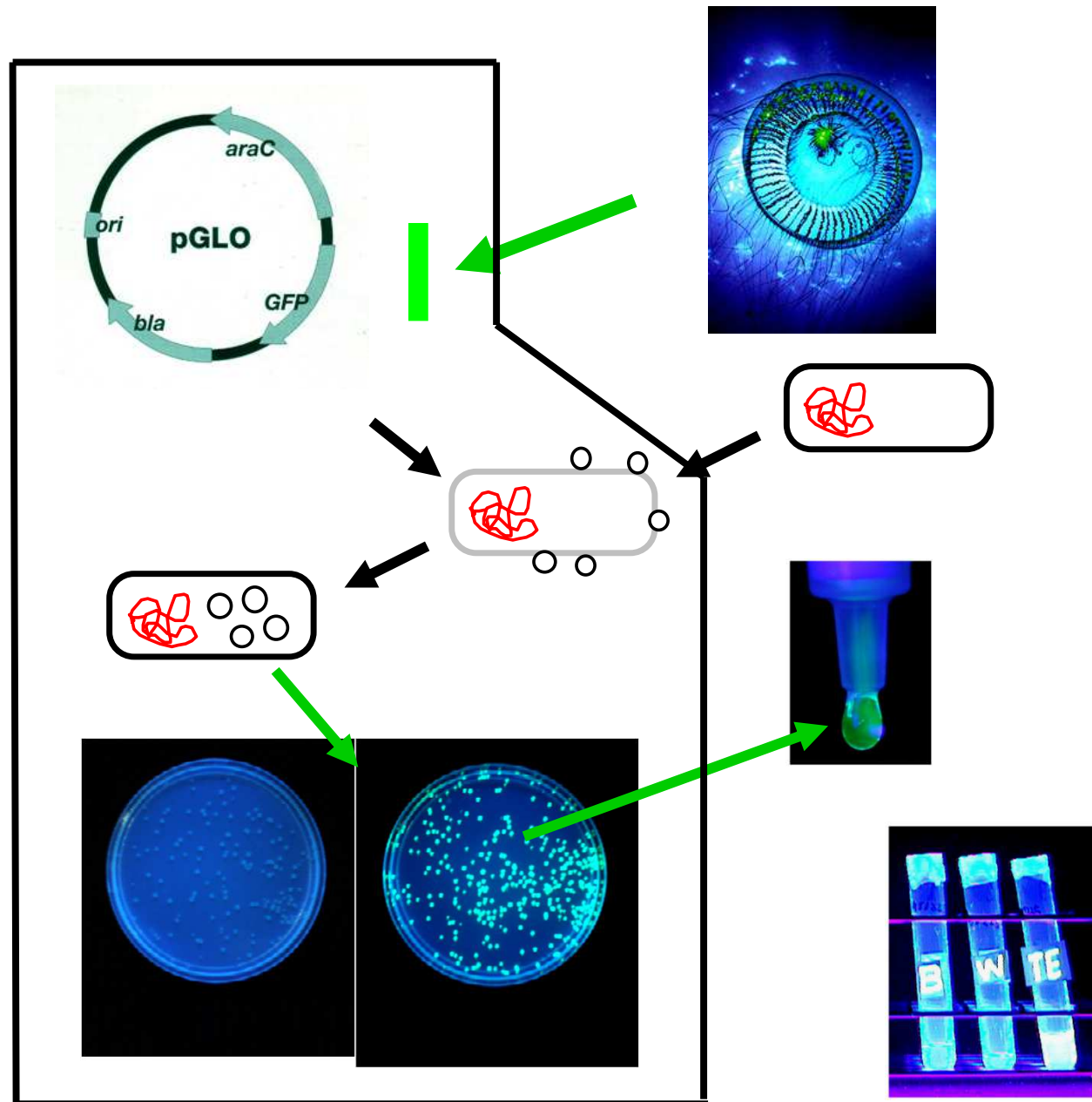


テキスト29ページ

GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

情報
(DNA)

機能分子
(タンパク質)



遺伝子の役割

1. 遺伝情報を伝える役割
⇒ 遺伝 (世代から世代へ)
複製 (細胞から細胞へ)
2. 遺伝情報を働かせる役割
⇒ 遺伝子発現

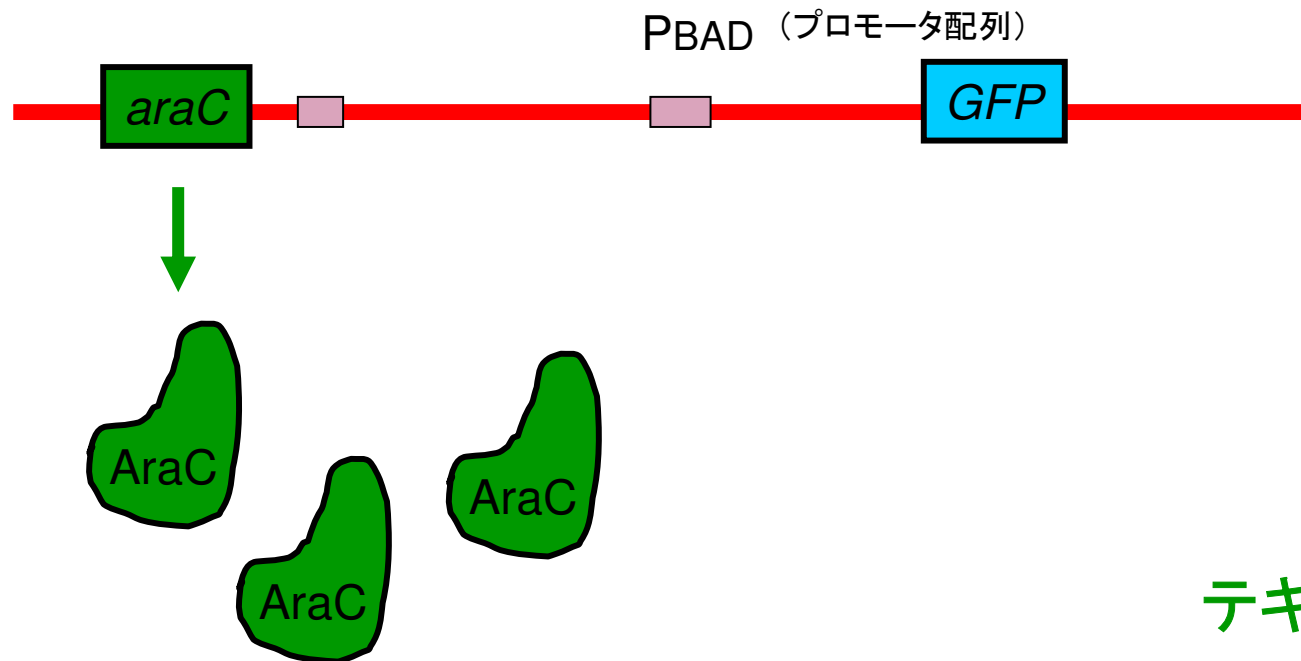
遺伝

Heredity

遺伝子

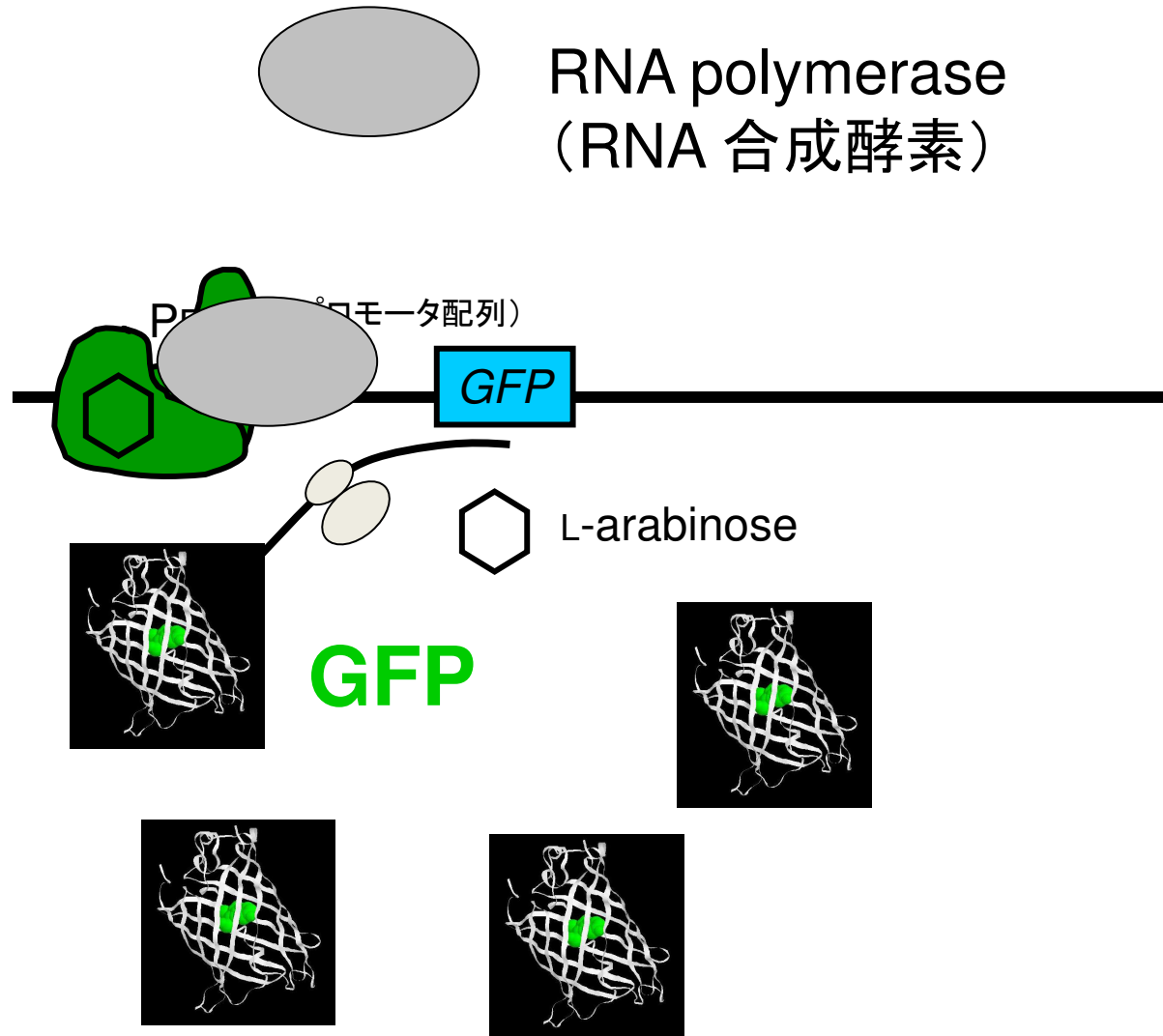
Gene

AraC遺伝子、GFP遺伝子とプロモータ配列



テキスト27ページ

GFPタンパク質の発現調節

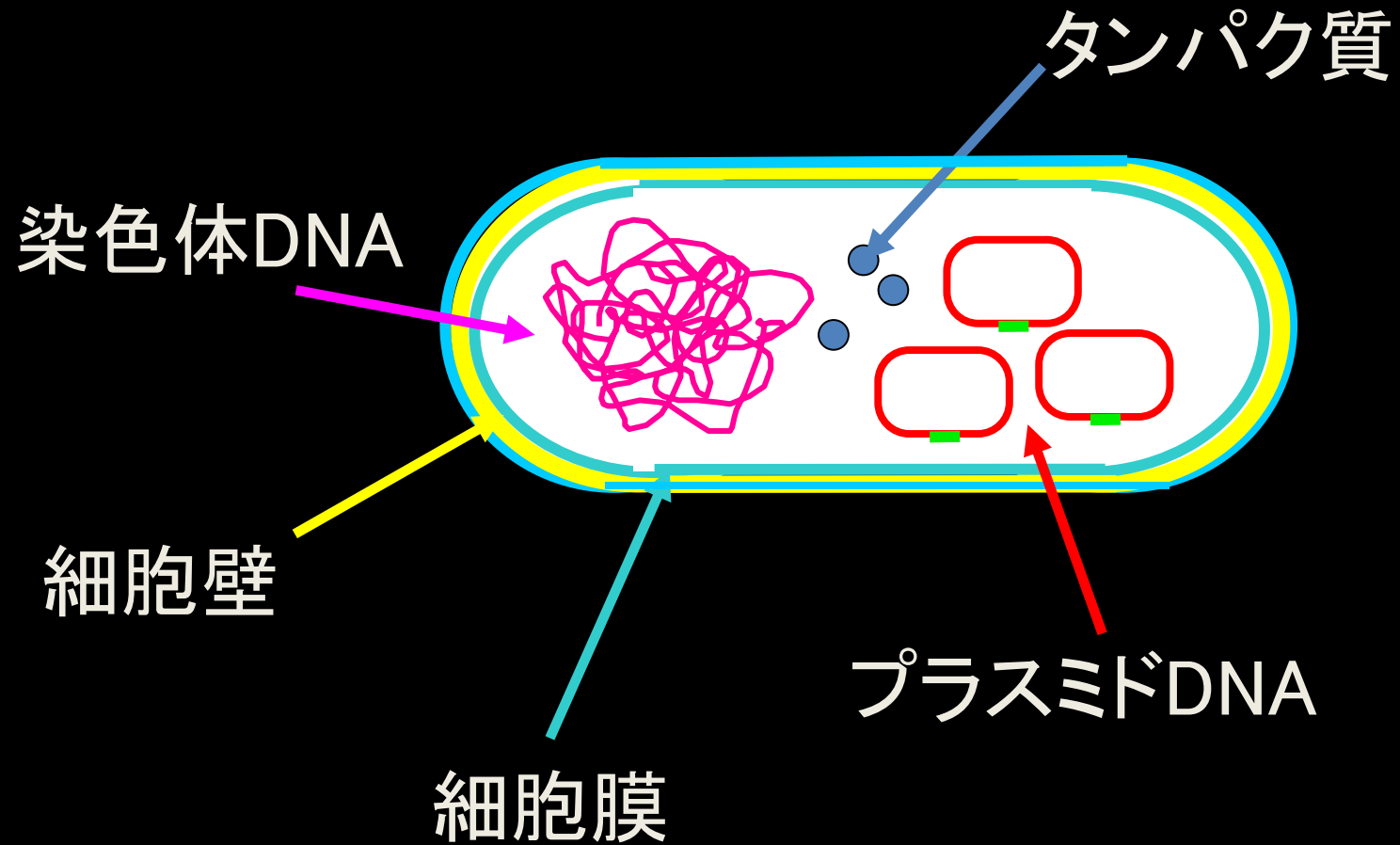


発現スイッチ

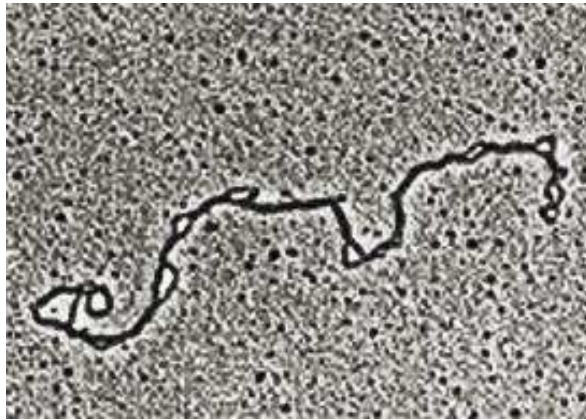
ON

テキスト27ページ

大腸菌の構造



プラスミドDNAの構造



covalently closed circular DNA:
cccDNA

閉環状DNA、超らせんDNAとも呼ばれ、
ニックが入っていない自然の環状DNA



Linear DNA

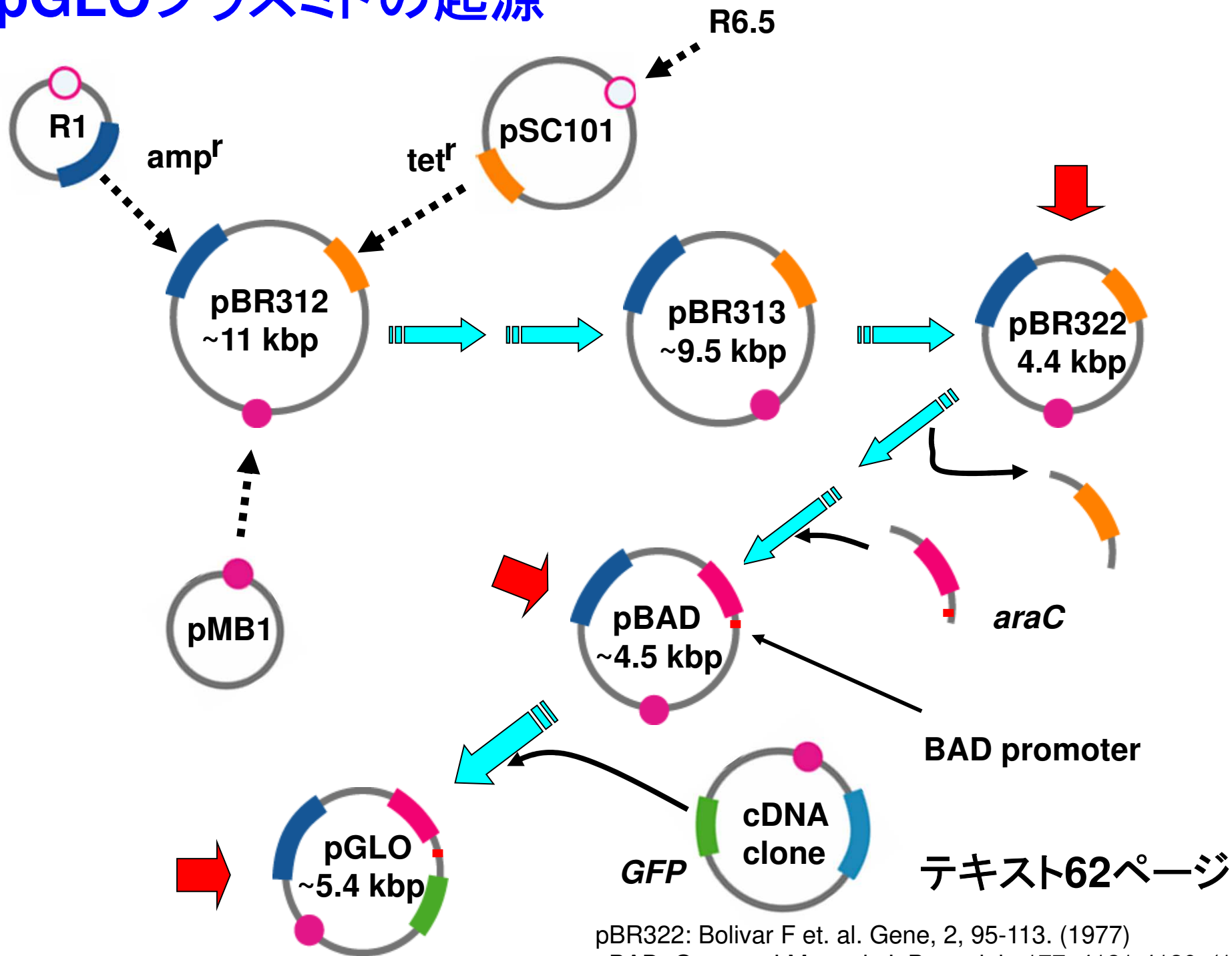
DNA分解酵素により切断され環状から
直線状となったDNA(直鎖状DNA)



Open circular DNA: ocDNA

片方の鎖にニックが入り環状を保ったまま
開環状となったDNA(開環状DNA)

pGLOプラスミドの起源

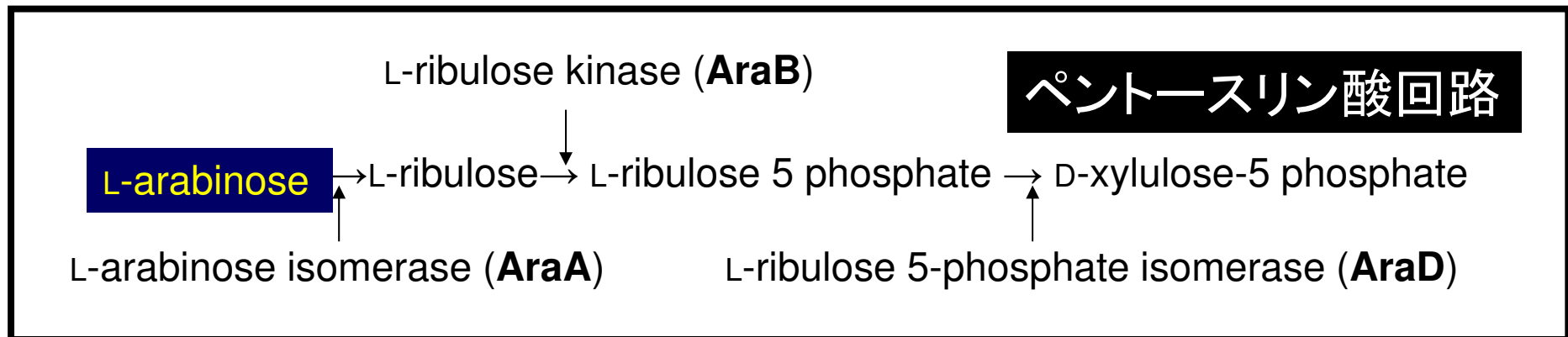


テキスト62ページ

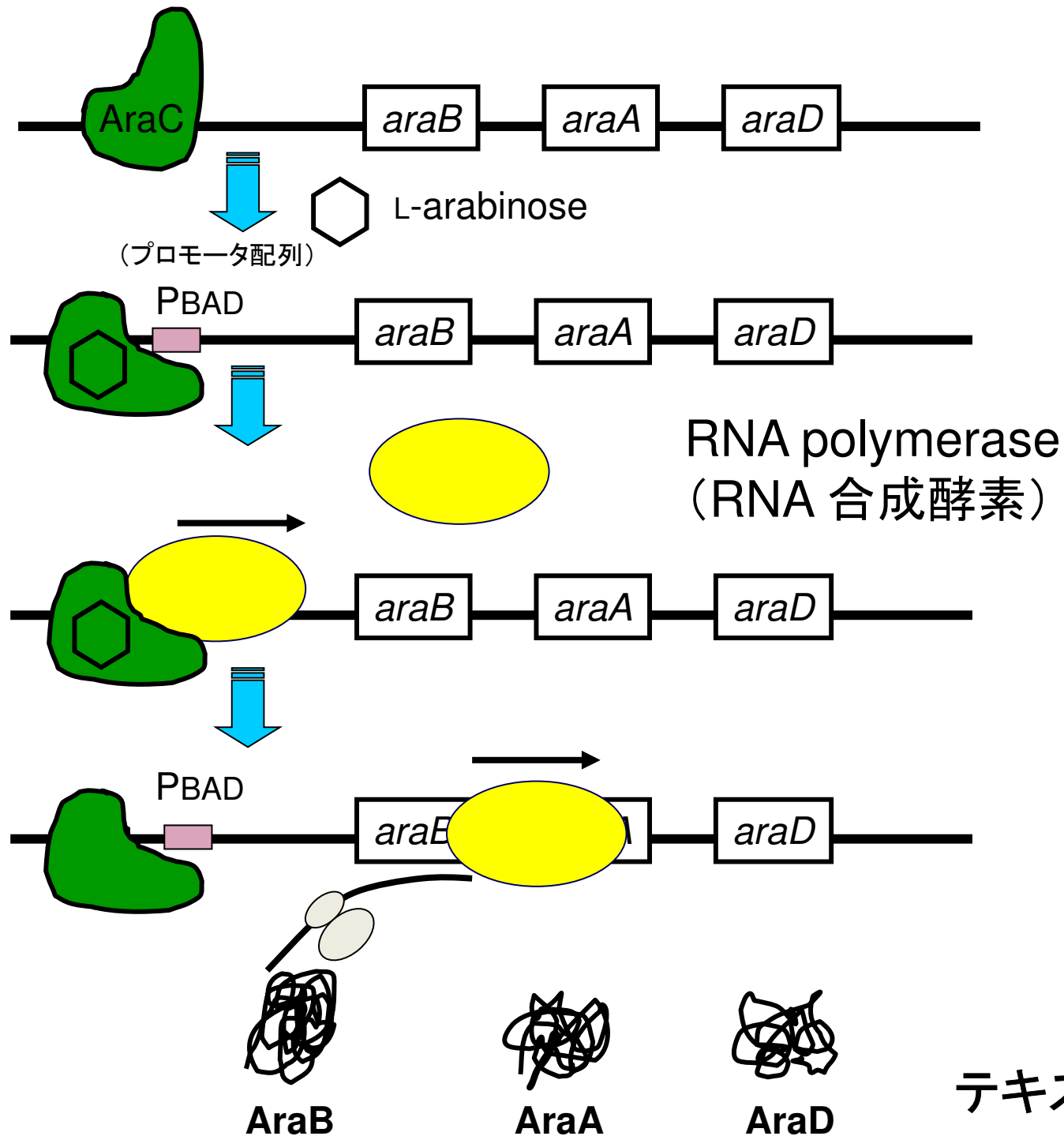
pBR322: Bolivar F et. al. Gene, 2, 95-113. (1977)

pBAD: Guzman LM et. al. J. Bacteriol., 177, 4121-4130. (1995)

アラビノースの代謝



アラビノースオペロンと遺伝子発現



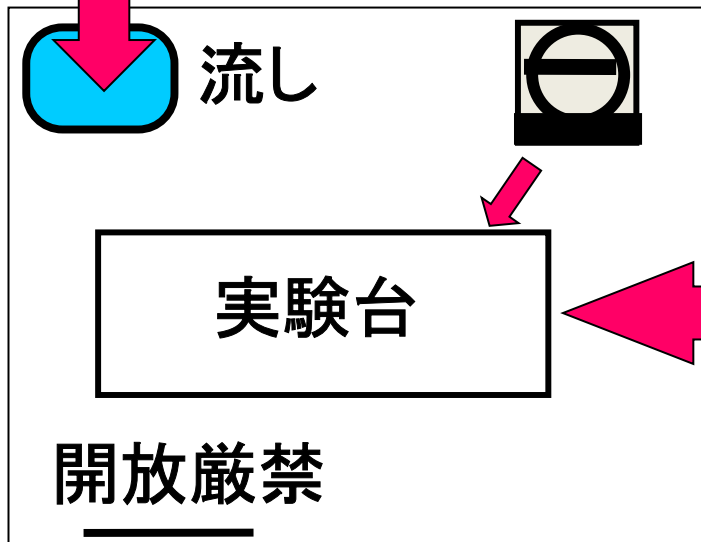
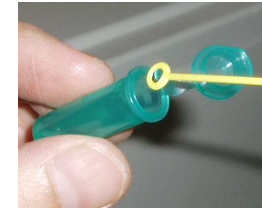
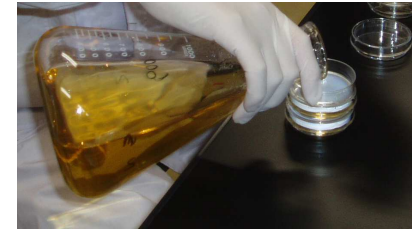
実験操作のポイント

実験前の確認



器具・試薬・試薬→滅菌

実験前必ず手を洗う
オートクレーブ



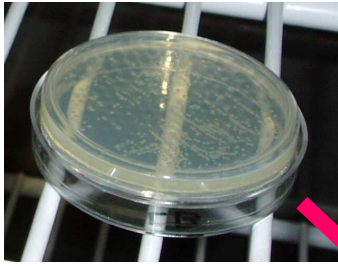
70%エタノール等で殺菌



ドアを閉めて閉鎖系

テキスト37ページ

実験台



大腸菌 (スタータープレート)



氷と試薬



プレート



水浴



ピペット・ループ他

テキスト36ページ

実験中

DNaseの混入を避ける
→静かに実験する



実験後

必ず手を洗う



廃棄物処理

オートクレーブ滅菌



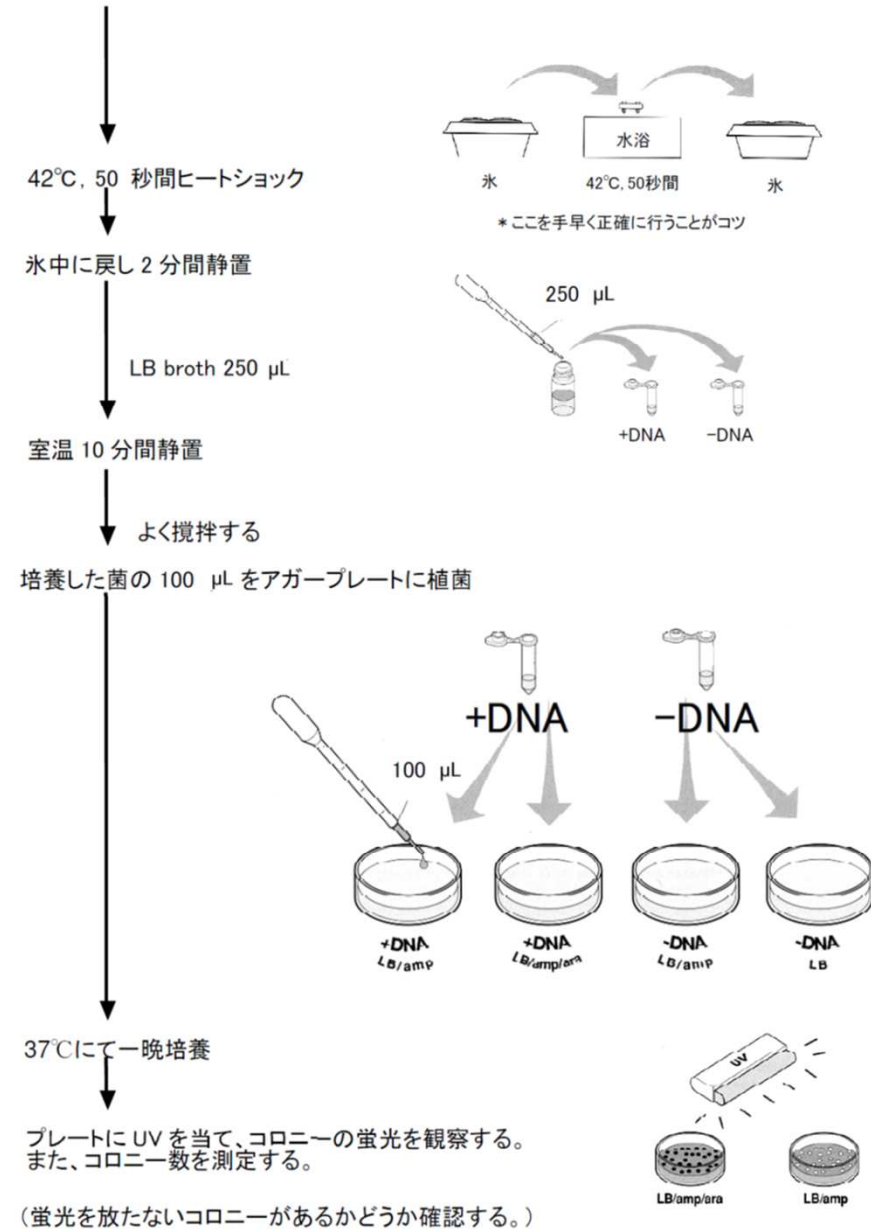
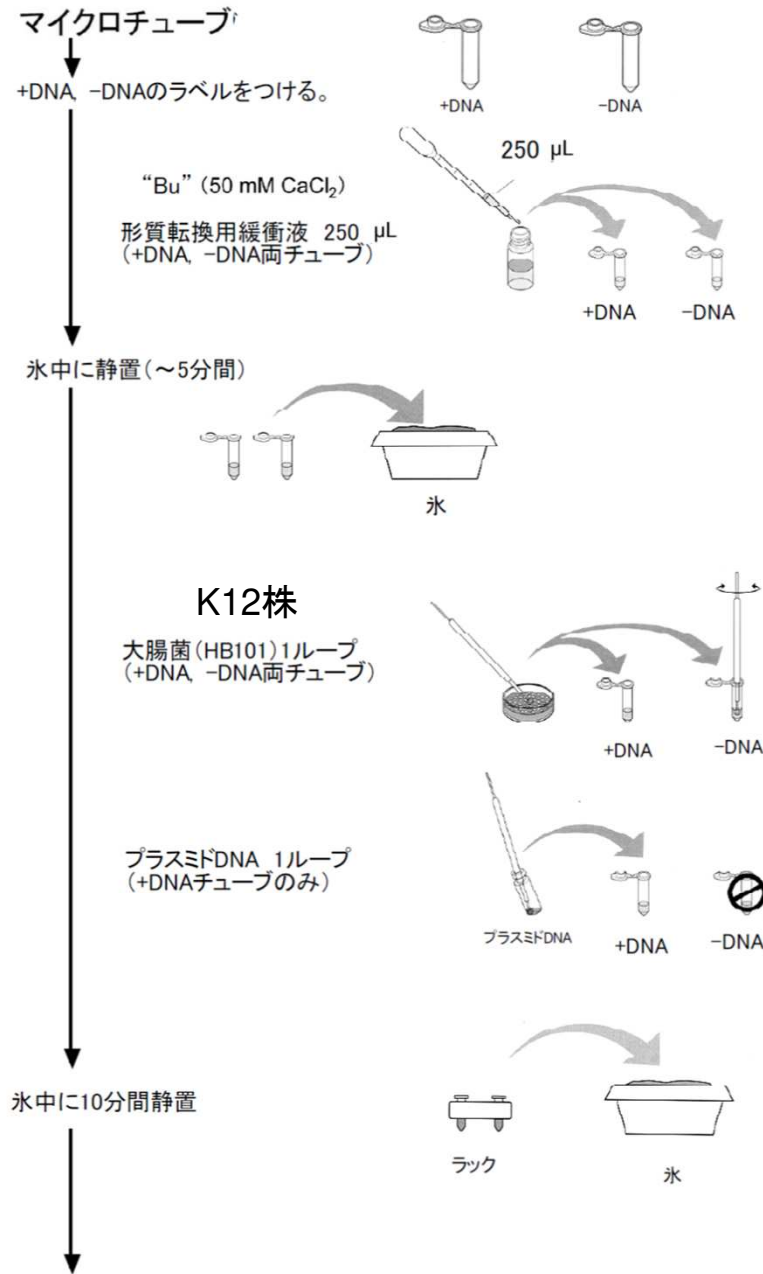
オートクレーブバッグ



テキスト41ページ

形質転換実験操作

テキスト38-39ページ



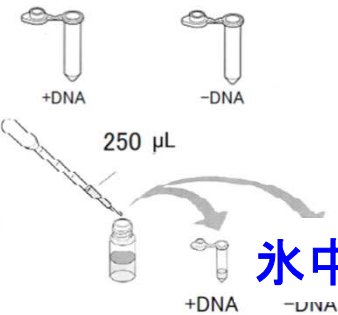
形質転換実験操作

テキスト38-39ページ

マイクロチューブ
+DNA -DNAのラベルをつける。

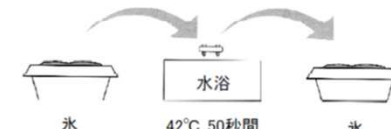
“Bu” (50 mM CaCl₂)
形質転換用緩衝液 250 μL
(+DNA, -DNA両チューブ)

氷中に静置 (~5分間)

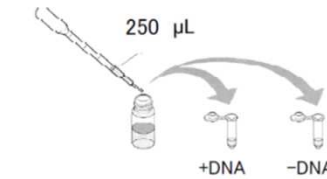


42°C. 50 秒間ヒートショック

水中⇒42°C (50秒) ⇒水中 (温度差=ヒートショック)



LB broth 250 μL



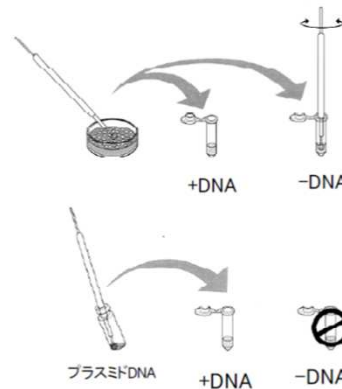
確り冷やす。

大腸菌、プラスミドDNA添加は、できるだけ氷の中で行う。

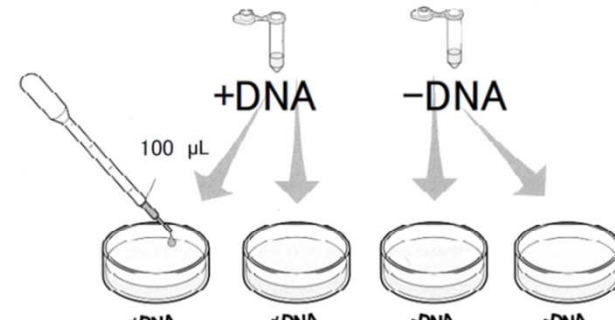
K12株

大腸菌 (HB101) 1ループ
(+DNA, -DNA両チューブ)

プラスミドDNA 1ループ
(+DNAチューブのみ)



よく攪拌する
培養した菌の 100 μL をアガープレートに植菌



植菌の前にチューブを攪拌して菌を分散させる。

氷中に10分間静置

本実験のコツは、
大腸菌、プラスミドを確り採ること。
操作中、コンピテント細胞を確りと氷の中で冷やすこと。



実験操作(1日目①) テキスト40ページ

チューブ

形質転換緩衝液添加

大腸菌添加

プラスミド添加

ヒートショック



形質転換緩衝液
添加



氷中

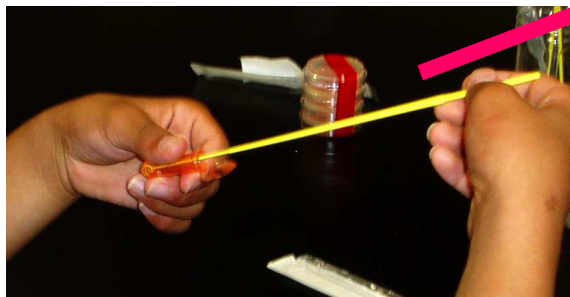


大腸菌(K12株:HB101)
添加



ヒートショック
(42°C、50秒)

プラスミドDNA(pGLO)添加



実験操作(1日目②)

テキスト41ページ



LB培地添加

室温10分放置

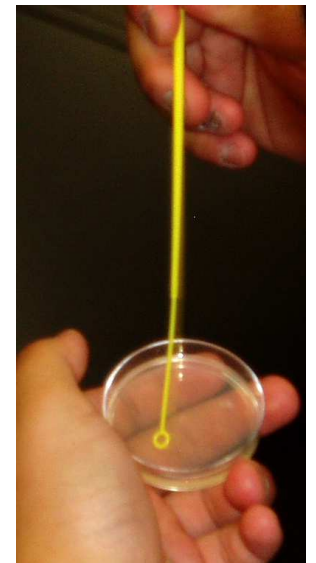
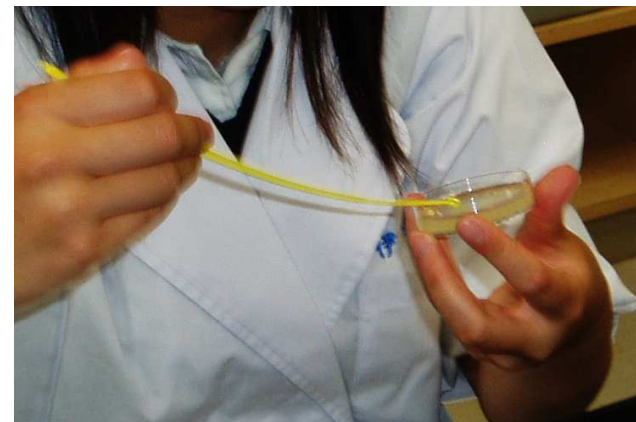
植菌



LB培地添加

室温放置

プレートにラベル



植菌

実験操作(1~2日目) テキスト41ページ

培養(37°C)
紫外線照射
結果観察

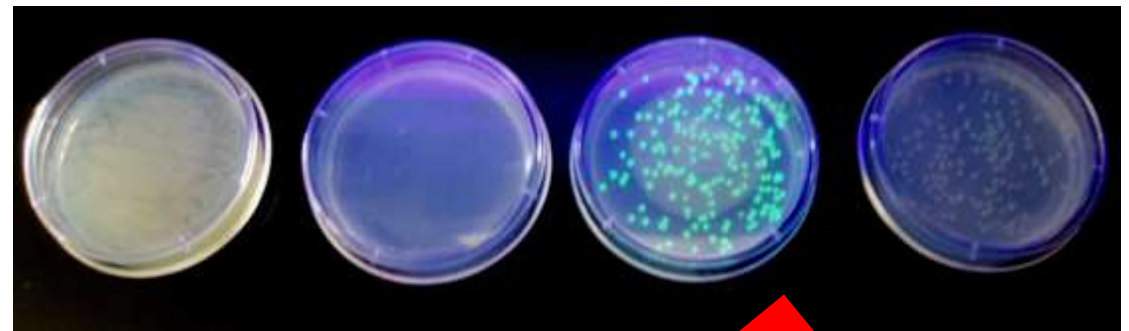


培養(裏返し)

結果観察

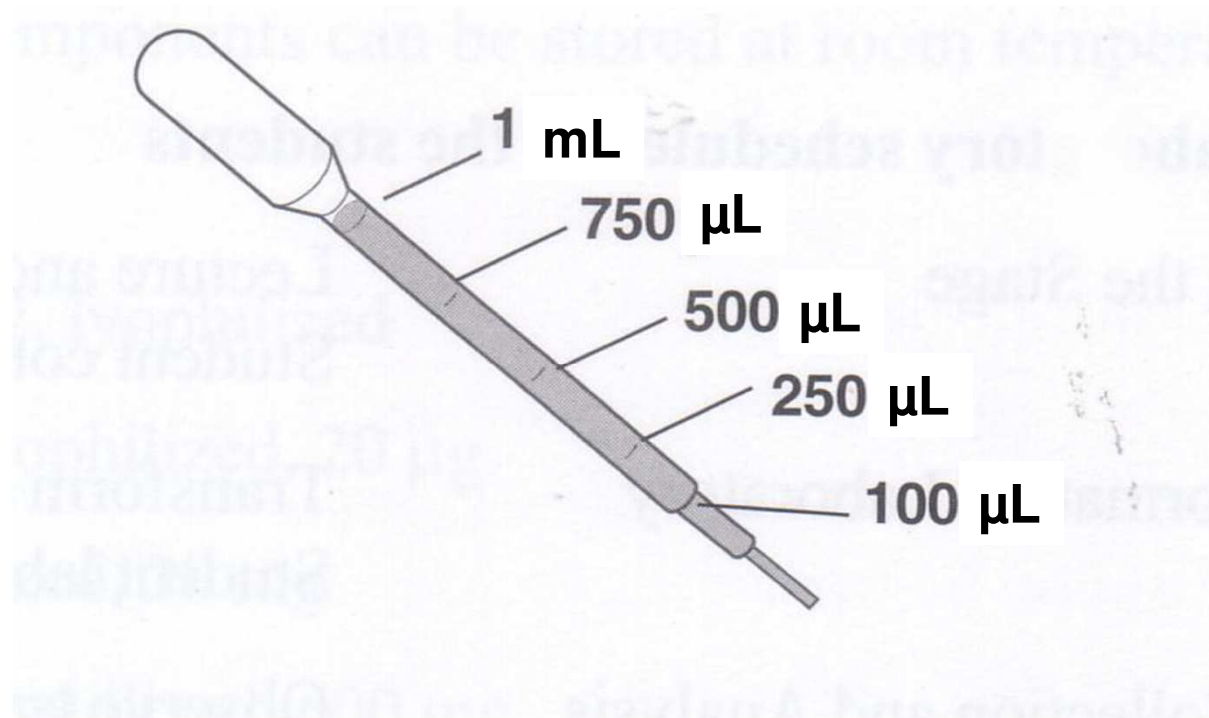


紫外線(366 nm)



コロニー数測定

① ピペットで液を採取

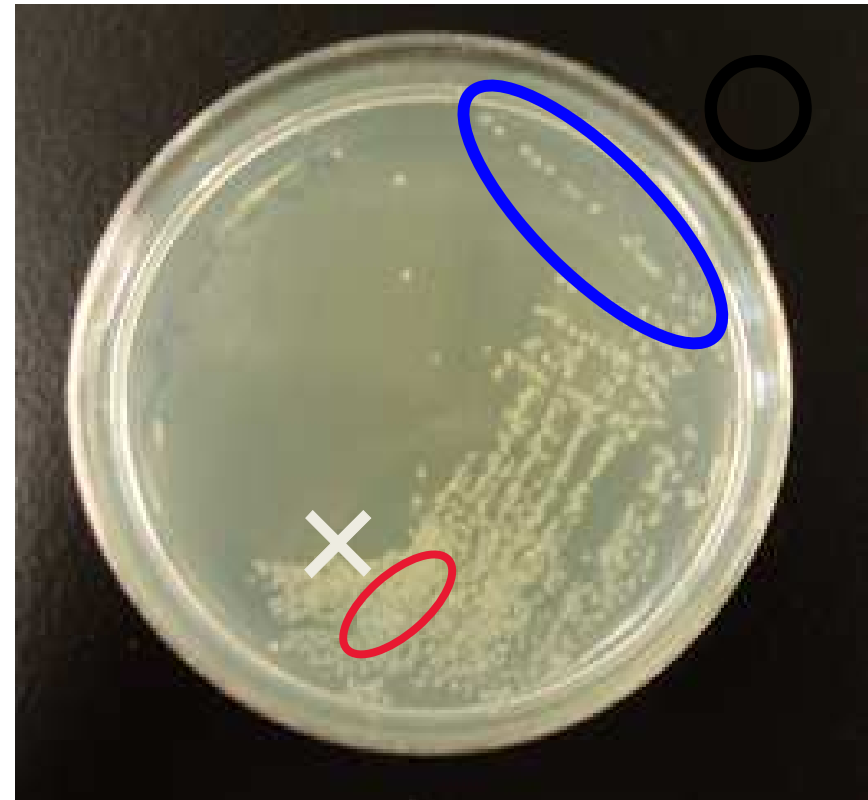
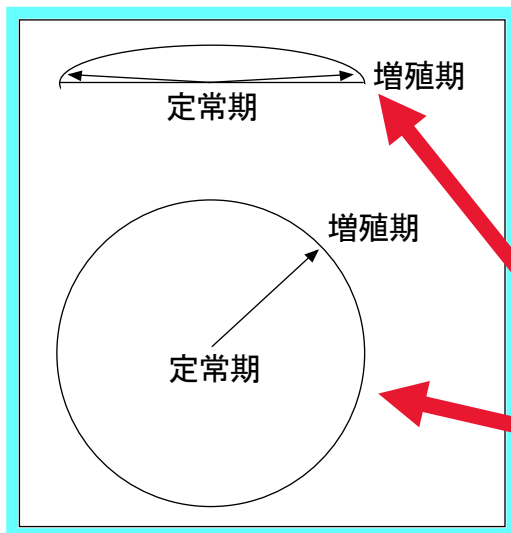
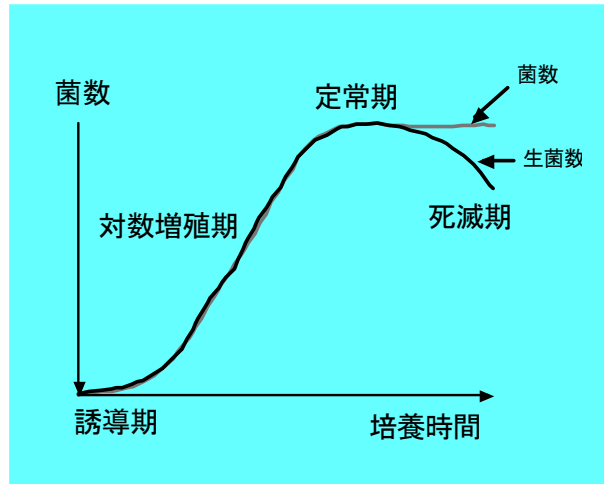


- 形質転換緩衝液添加
- LB-broth添加
- 形質転換した菌の採取

テキスト42ページ

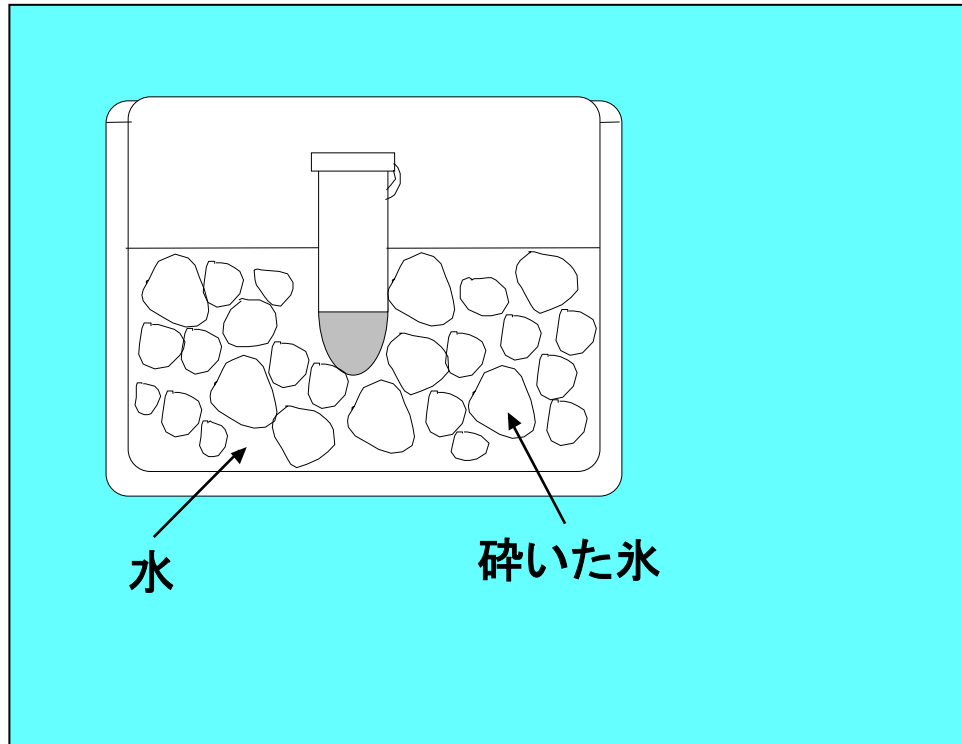
② スタータープレートから菌をしっかりと採る

使用する菌の増殖状態と数(～16時間培養)



1コロニー中の大腸菌増殖状態

③ 菌を形質転換緩衝液に添加した後、
氷中で確りと冷やす



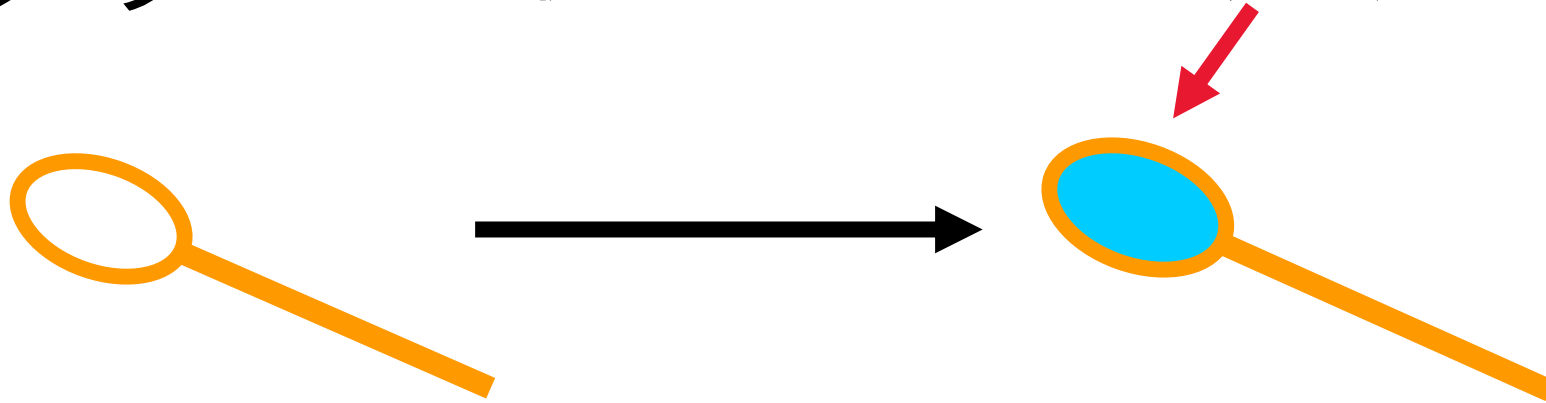
テキスト43ページ

④ プラスミドDNAを確実に採取

→DNA + 表示チューブに添加

ループ

液をシャボン玉のようにすくい取る



⑤ ヒートショック

氷中 > 42°C・50秒 > 氷中



⑥ LB broth添加後の放置

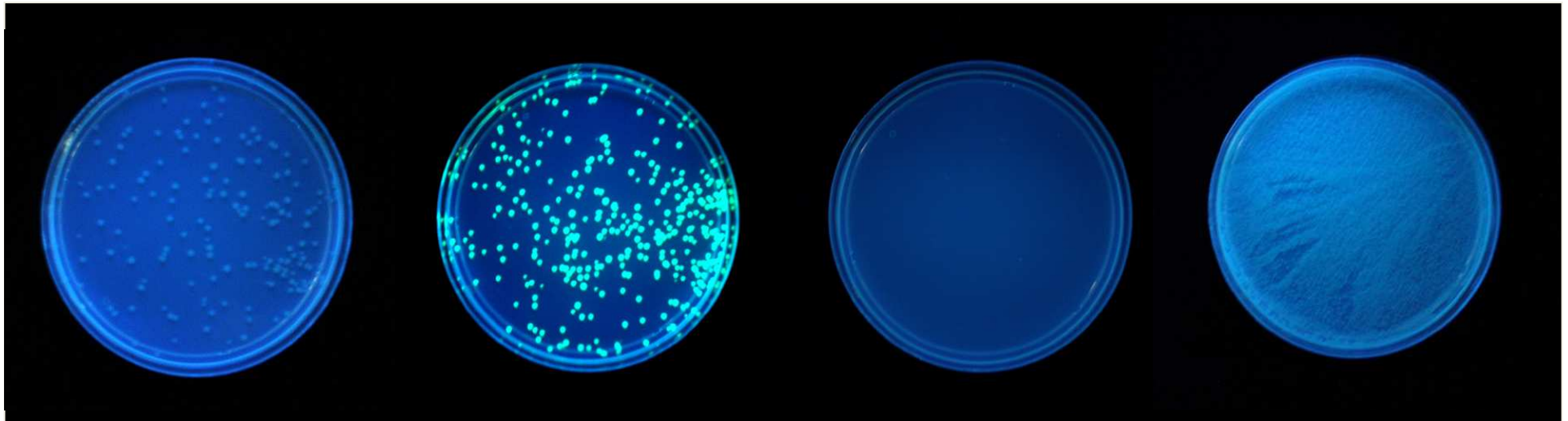
→アンピシリン分解酵素の生産
=アンピシリン耐性の獲得

⑦ 液の混合

→沈んだ大腸菌を懸濁する

pGLOプラスミドと遺伝子発現調節

実験結果：遺伝子発現調節



+DNA

+DNA

-DNA

-DNA

LB/amp/

LB/amp/**ara**

LB/amp

LB

+DNA

pGLO導入実験

-DNA

pGLO未導入実験

遺伝子組換え実験
(組換えDNA実験)

テキスト48ページ

高等学校「生物」での本実験の取り扱い事例

観察実験 9 大腸菌を使った遺伝子組換え実験

目的

大腸菌に蛍光タンパク質を合成するGFPの遺伝子をもつプラスミドを導入し、「光る大腸菌」をつくることでバイオテクノロジーにおける遺伝子組換えのしくみを理解する。

準備

大腸菌の遺伝子組換えに必要な用具(大腸菌、LB/寒天粉末、LB液体培地、滅菌プレート、アンピシリン、アラビノース、遺伝子組換え用プラスミド、形質転換溶液、緩衝液、マイクロピペット、マイクロチューブ、チューブラックなど。市販のキットを用いてもよい)、UVランプ、恒温水槽、温度計、タイマー、氷(クラッシュアイス)、定温器、蒸留水

事前準備 (8人分)

①大腸菌を培養する以下のプレートを調整し、ふたの上面に内容を記入する。
LBプレート16枚(8枚に「-DNA・LB」と記入、残り8枚には何も記入しない)：「-DNA」とは、プラスミドを感染させない大腸菌を植え付けることを示す。LB/寒天粉末7gを蒸留水200mLに溶解し、オートクレープ処理(120℃、20分)した後、16枚のプレートに分注する。
LB/Ampプレート16枚(「-DNA・LB/Amp」と記入)：「+DNA」とは、プラスミドを感染させた大腸菌を植え付けることを示す。Ampとは、アンピシリンという抗生物質の添加を示す。作成方法は、LB/Amp/Araプレートの項目を参照。

LB/Amp/Araプレート8枚(「+DNA・LB/Amp/Ara」と記入)：Araとは、アラビノースの添加を示す。LB/寒天粉末10.5gを蒸留水300mLに溶解し、オートクレープ処理(120℃、20分)した後、寒天が固まらない程度に冷ましてからアンピシリン30mgを加えて混ぜ、200mLを16枚のプレートに分注する(LB/Ampプレート)。残りの100mLにアラビノース600mgを加え、8枚のプレートに分注する(LB/Amp/Araプレート)。

②何も記入されていないLBプレート8枚に大腸菌を含む溶液を添加して、プレート全体に薄く広げて37℃の定温器に入れて一晩培養する。

方法

- ①2つのマイクロチューブを用意し、「+DNA」、「-DNA」と記入し、チューブラックに差しておく。
- ②マイクロピペットを使用して形質転換溶液250μLを、両チューブに加え、チューブラックごと氷上に置く。
- ③事前準備で培養した、大腸菌のプレートから、大腸菌を少量かき取り、両チューブに差し込んで懸濁する。次に、GFPの遺伝子を含むプラスミド溶液を、マイクロピペットで10μLを計り、「+DNA」チューブに加えて氷上で10分間放置する。



▲培養した大腸菌 ▲大腸菌のかき取り ▲チューブに懸濁 ▲形質転換溶液の添加

注意
●実験は、文部科学省ライフサイエンス課のリーフレット「高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ」に従って行う。

④冷やしている間に、次の4枚のプレートを準備する。

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| a. LB プレート/- DNA | b. LB/Amp プレート/+ DNA |
| c. LB/Amp プレート/- DNA | d. LB/Amp/Ara プレート/+ DNA |

⑤チューブラックごと、42℃の恒温水槽に50秒浸けた後に、氷上に戻す(42℃と50秒は正確に行う)。この操作はヒートショックと呼ばれ、プラスミドの大腸菌への侵入を促す。



▲ヒートショックのようす

⑥氷上に2分間置いた後、室温に戻した両チューブにLB液体培地を250μL加え、室温で10分間放置する。

⑦「+DNA」、「-DNA」チューブの大腸菌液100μLを①の、4種のプレートに滴下し、すばやく表面に広げた後にふたを閉める。



▲各プレートに大腸菌を滴下

⑧プレートは裏返して37℃の定温器に入れて、翌日観察する。

結果・考察

4枚のプレートの大腸菌の増殖状況を観察する。大腸菌のコロニーを確認後、暗所でUVランプを照射し、GFP合成の有無(緑色の蛍光)を確認する。



▲培養1日後のプレート

課題

- ①今回実験に使ったプラスミドは遺伝子組換えによって、GFPをつくる遺伝子とアンピシリンという抗生物質を分解する酵素を合成する遺伝子を含んでいる。アンピシリンを添加したプレートに生育した大腸菌について、どのようなことがいえるだろうか。
- ②今回実験に使ったプラスミドでは、GFPの発現にアラビノースが必要である。このことを示すためにはどのプレートの大腸菌のようすを比較したらよいだろうか。



▲UVランプの照射のようす

4章3節のポイント

- ! 遺伝子を導入する方法には、受精卵に遺伝子を入れる、アグロバクテリウムやウイルスなどに遺伝子を組み込んで感染させるといったものがある。
- ・外来の遺伝子を導入した生物をトランスジェニック生物という。
 - ・GFPと呼ばれる、蛍光を発するタンパク質は、生きた細胞内で遺伝子の発現を調べるのによく使われる。