

研修4 資料

東京農工大学遺伝子実験施設
第20回「教員のための遺伝子組換え実験教育研修会」

形質転換実験 結果と考察



2021年8月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)

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

川合先生imageJ講義

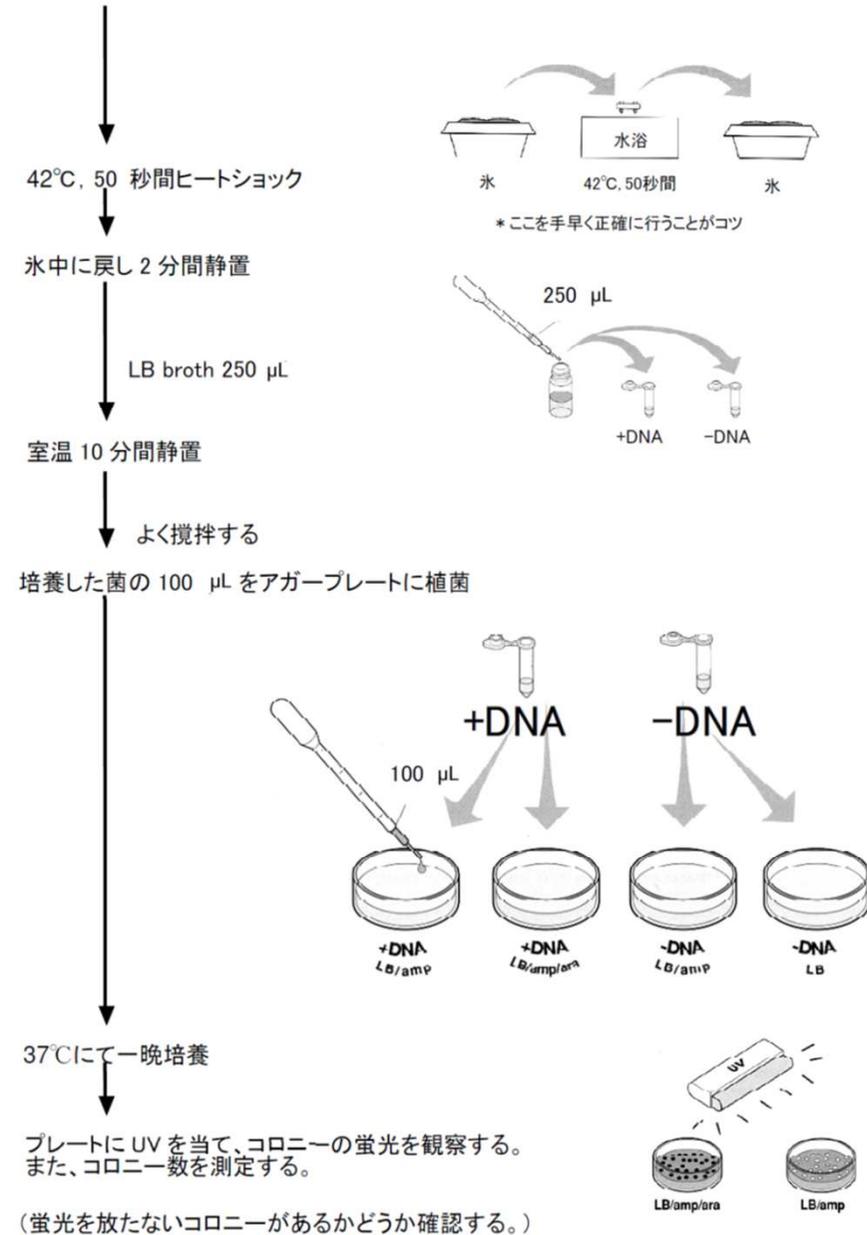
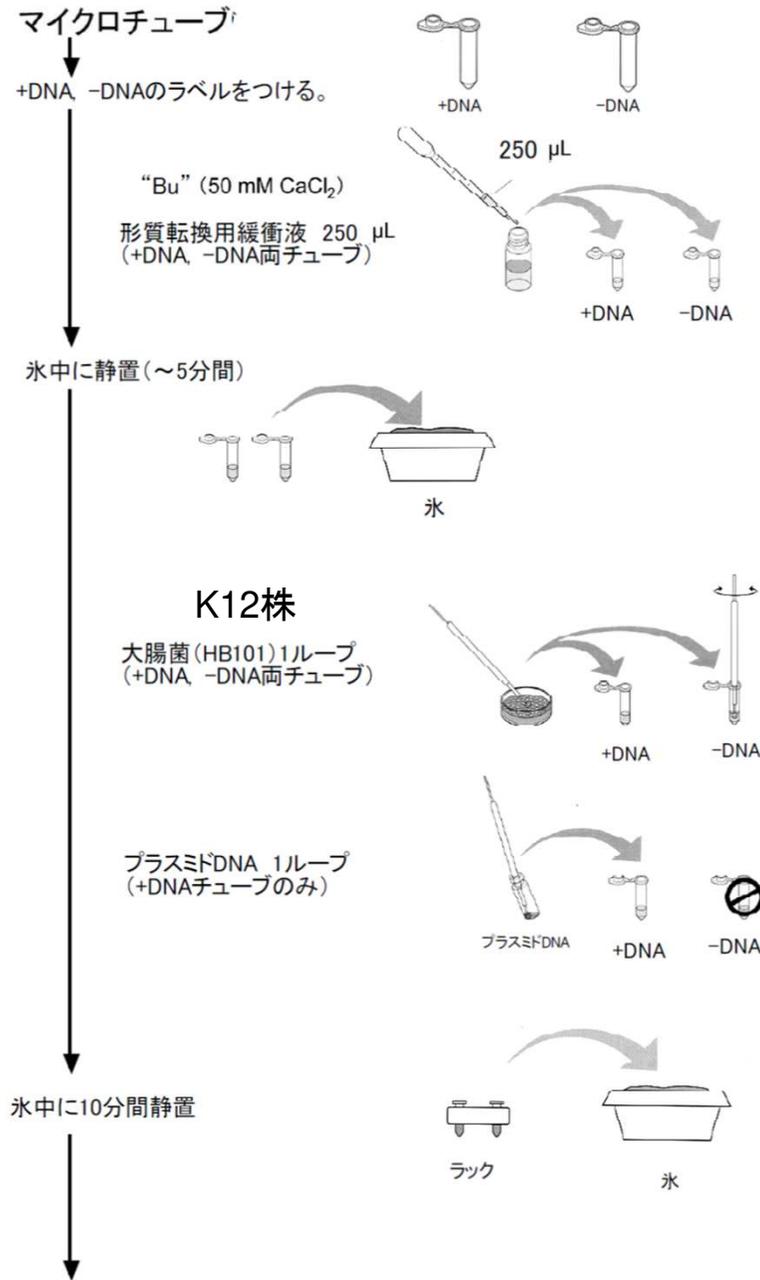
実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

廃棄物処理方法

発展的実験授業展開

形質転換実験操作

テキスト38-39ページ



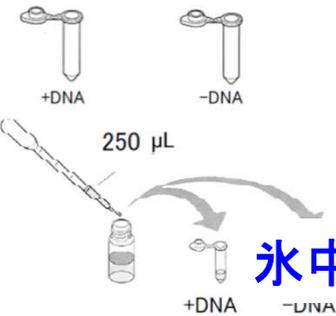
形質転換実験操作

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。

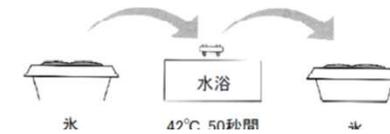
“Bu” (50 mM CaCl₂)
形質転換用緩衝液 250 μL
(+DNA, -DNA両チューブ)

氷中に静置 (~5分間)

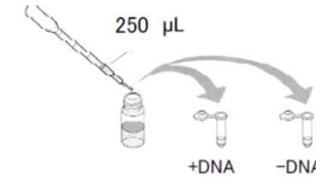


42°C. 50 秒間ヒートショック

水中⇒42°C (50秒) ⇒水中 (温度差=ヒートショック)



LB broth 250 μL

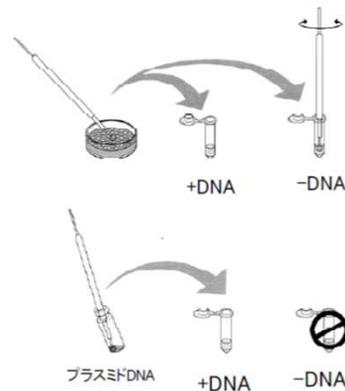


確り冷やす。
大腸菌、プラスミドDNA添加は、できるだけ氷の中で行う。

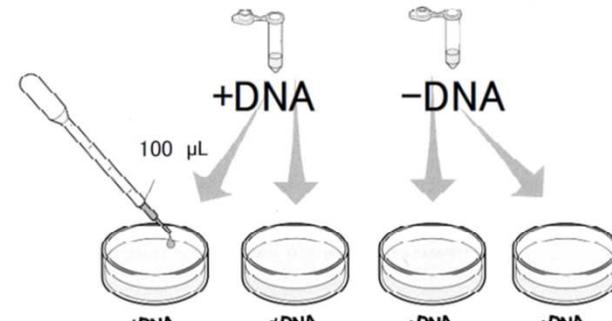
K12株

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。

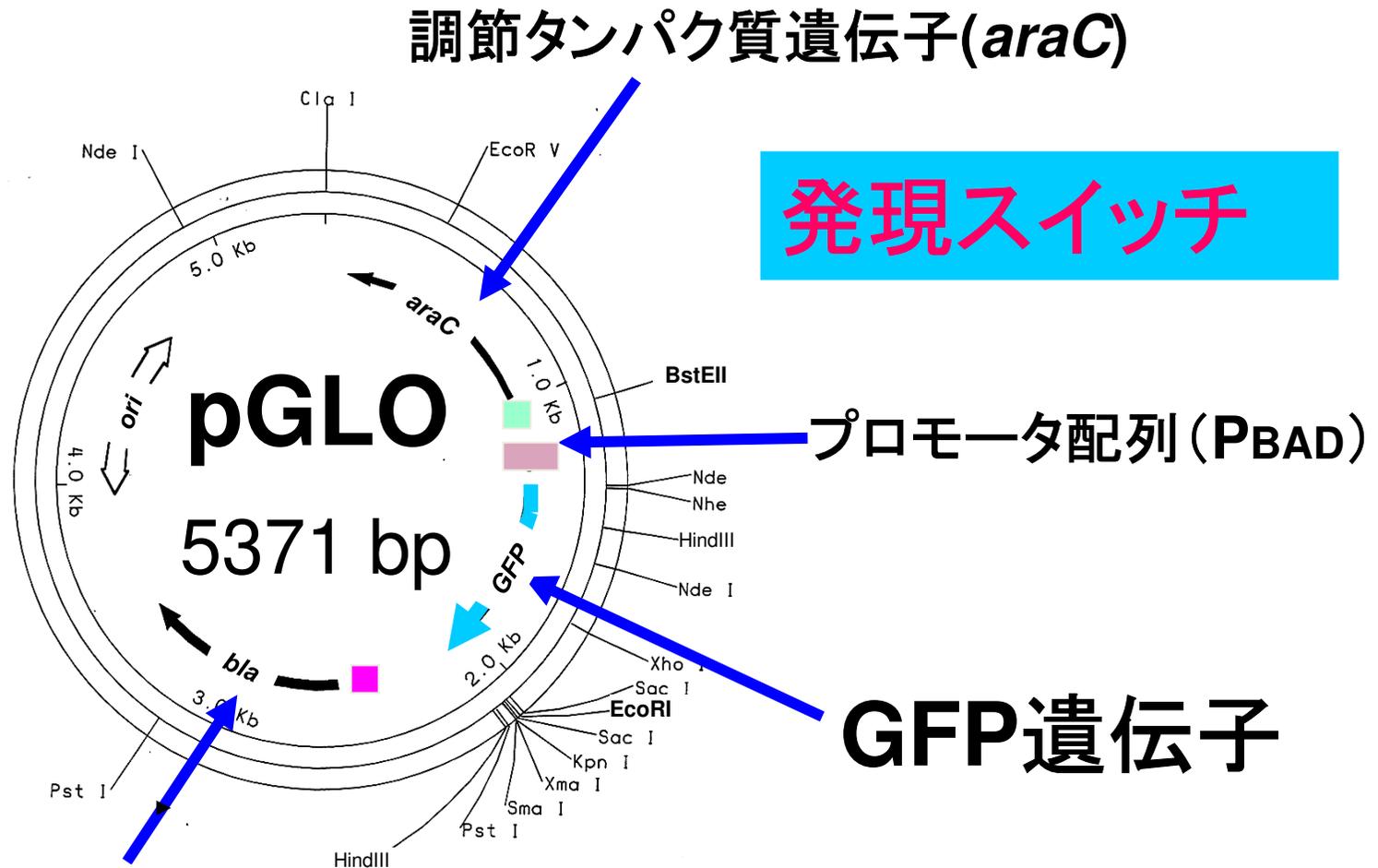
氷中に10分間静置

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。

37°Cにて一晩培養



プラスミドDNA pGLOの構造

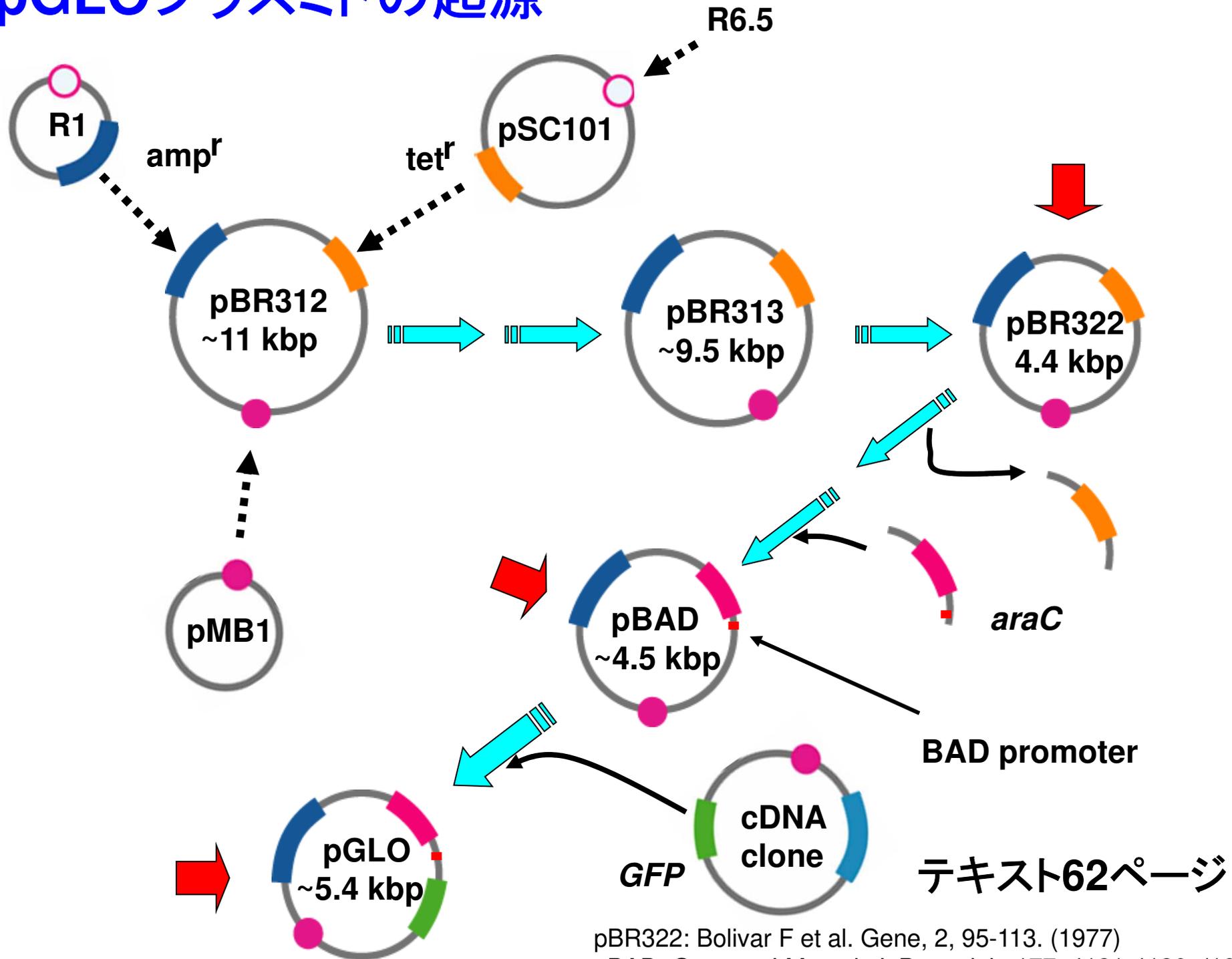


アンピシリン耐性遺伝子
(β ラクタマーゼ (beta lactamase) の遺伝子)

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

pGLOプラスミドの起源



pBR322: Bolivar F et al. Gene, 2, 95-113. (1977)
pBAD: Guzman LM et al. J. Bacteriol., 177, 4121-4130. (1995)

テキスト62ページ

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

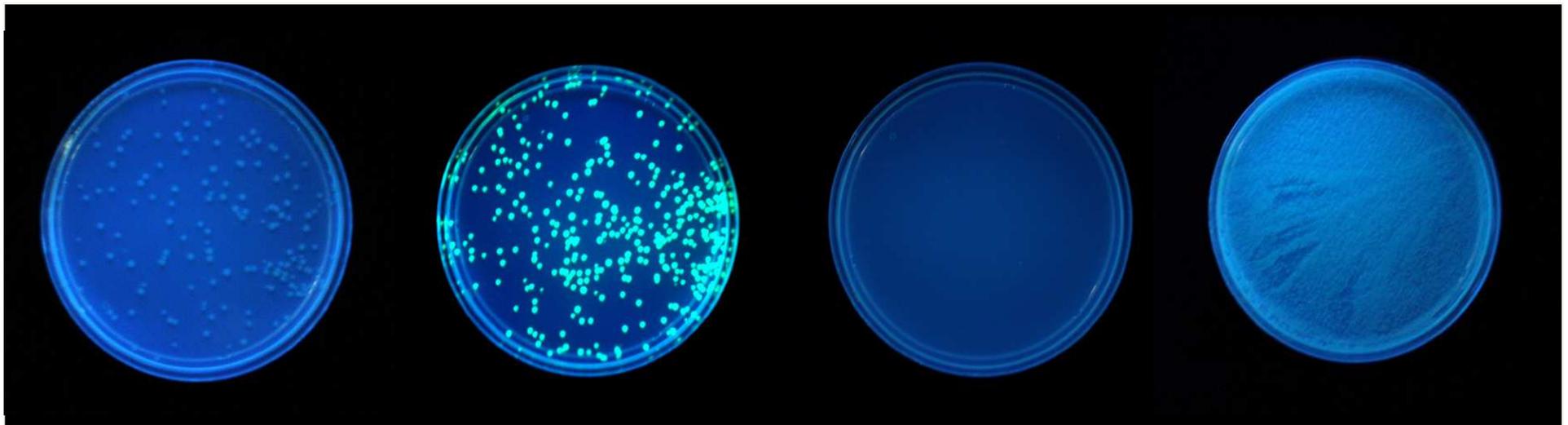
遺伝

Heredity

遺伝子

Gene

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

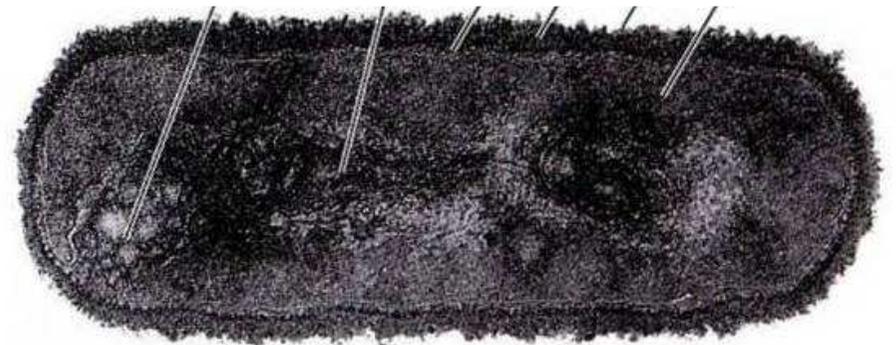
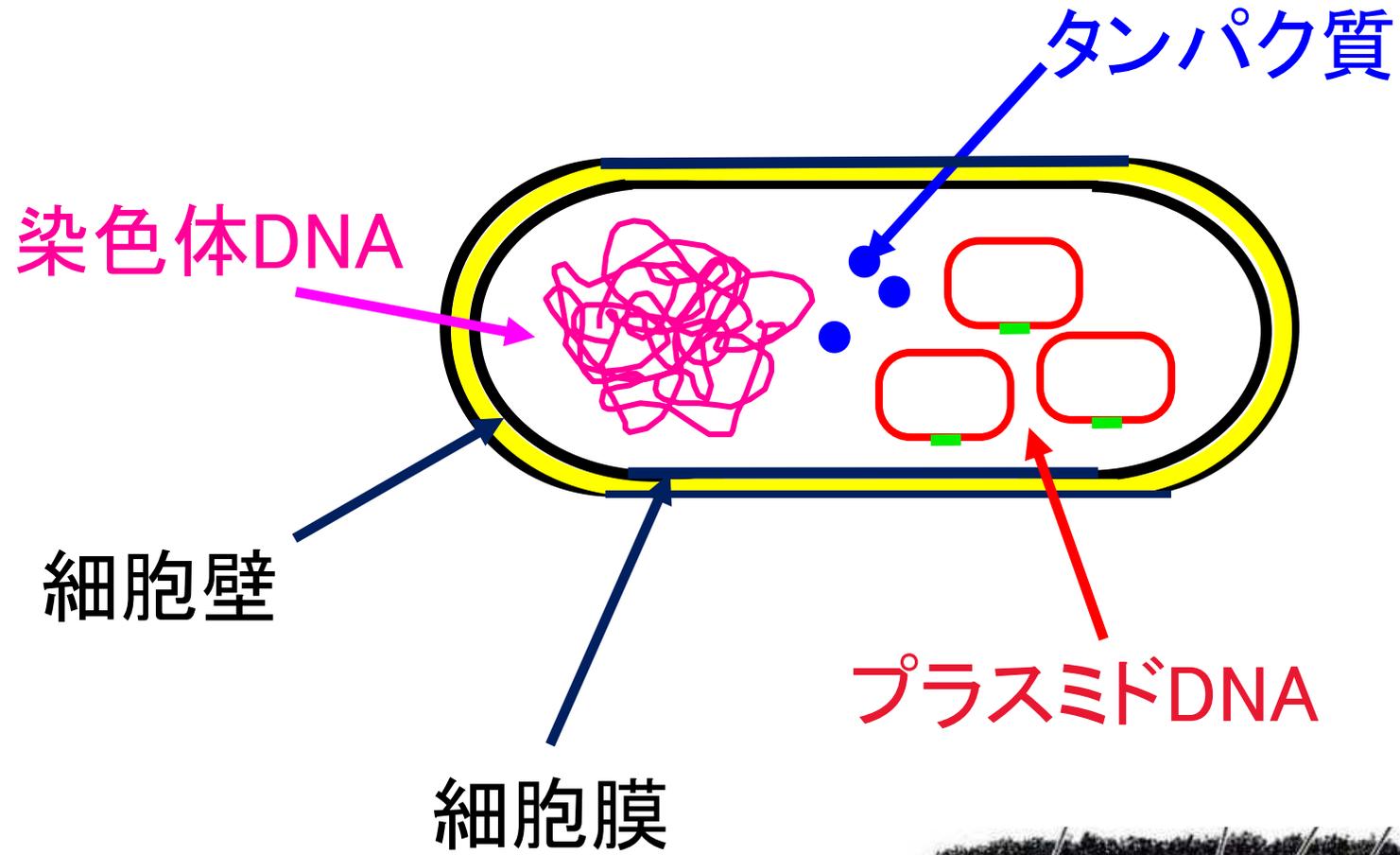
-DNA

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

大腸菌の構造

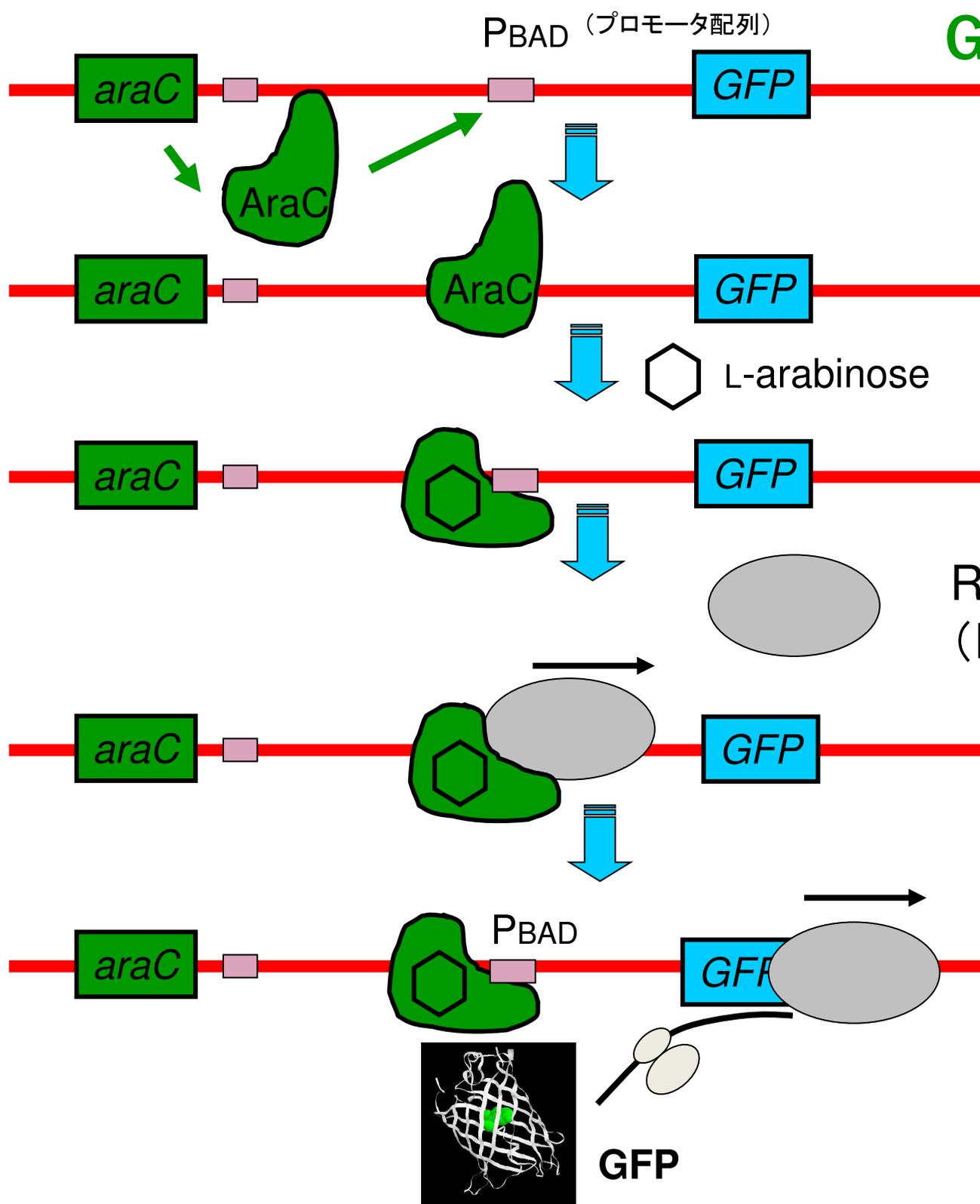


GFPタンパク質の発現

発現スイッチ

OFF

(負の制御)



RNA polymerase
(RNA 合成酵素)

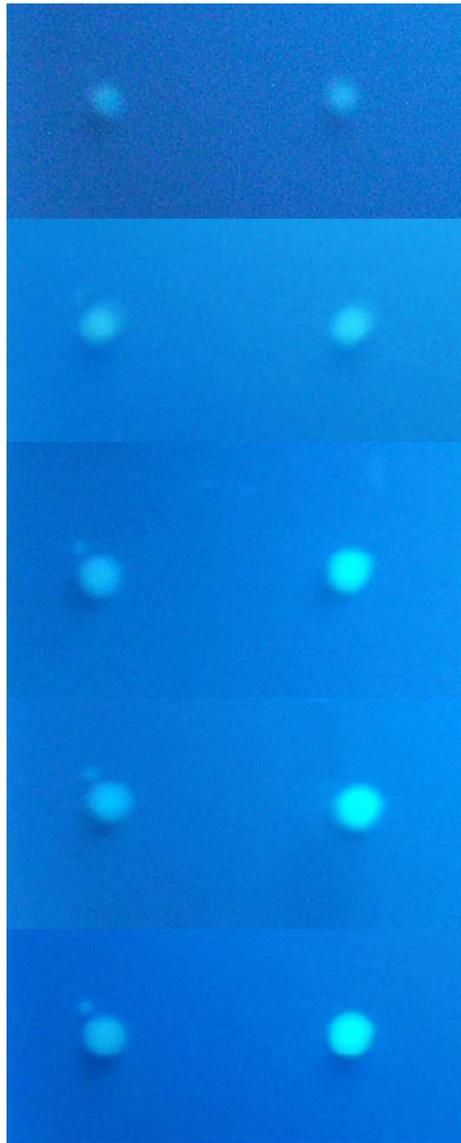
発現スイッチ

ON

(正の制御)

テキスト27ページ

GFPの発現



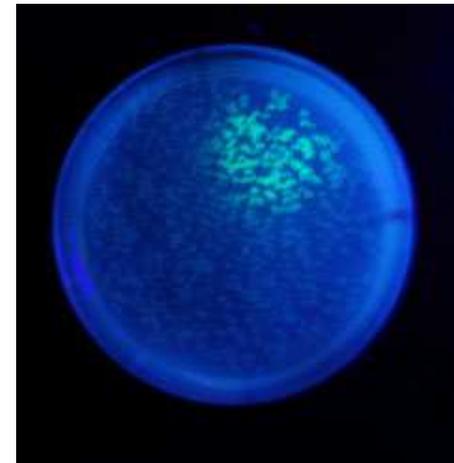
0時間

1時間

2時間

4時間

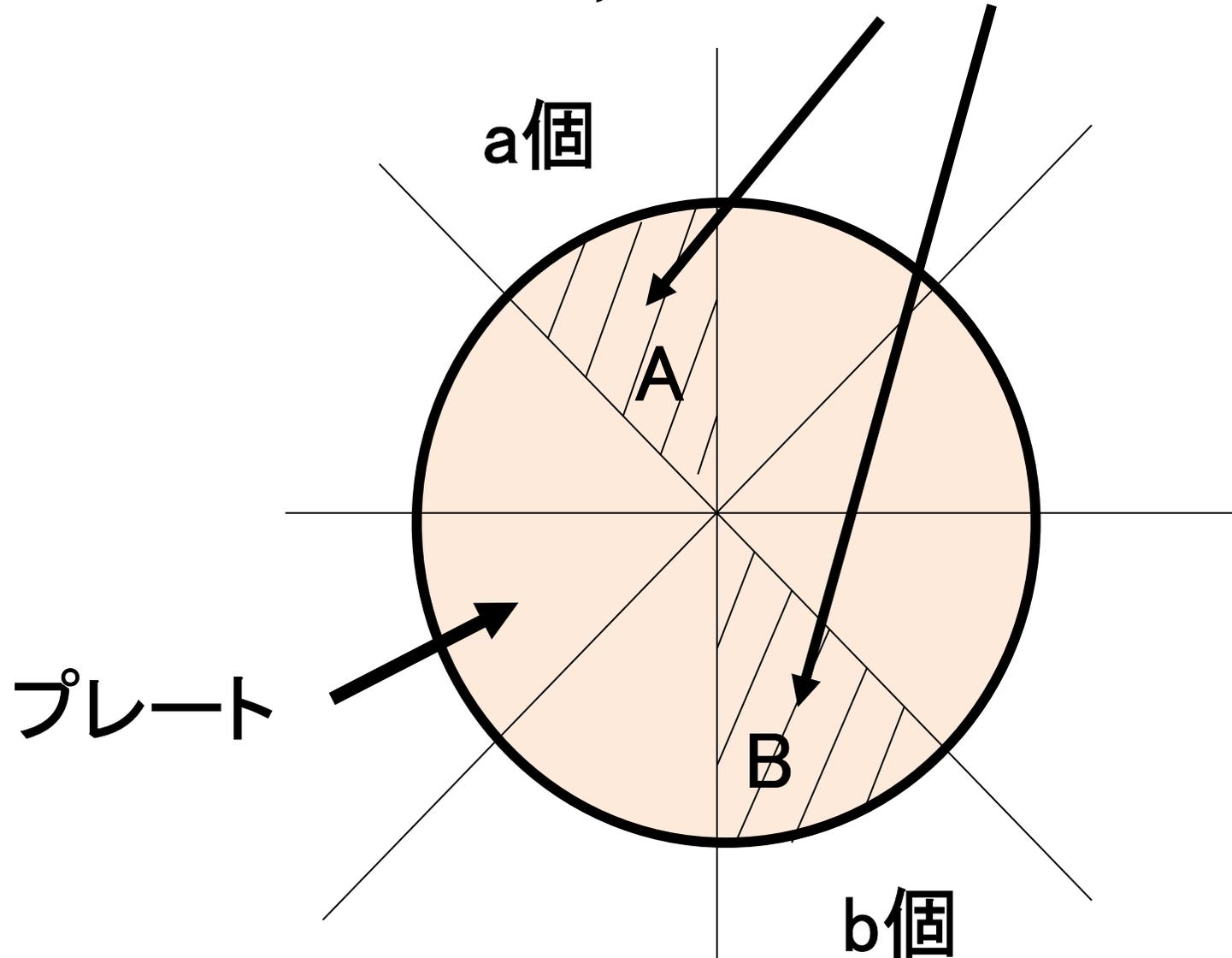
6時間



テキスト49ページ

コロニー数測定

プレートを8等分し、A,B 2箇所のコロニー数測定



全コロニー数 = $4 \times (a + b)$ 個

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

川合先生ImageJ講義

実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

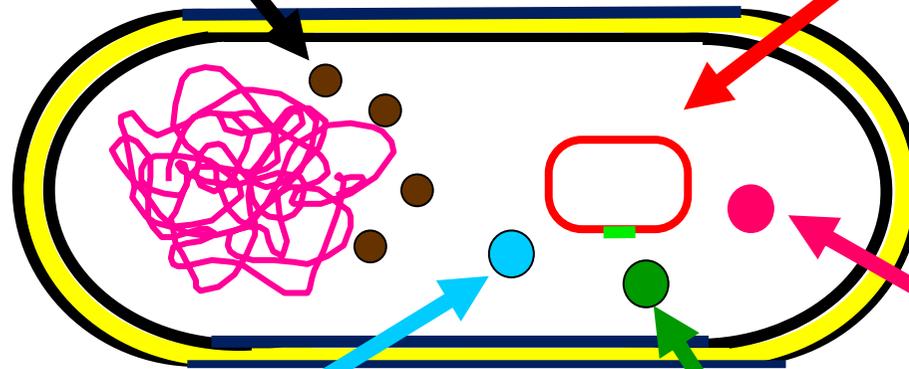
廃棄物処理方法

発展的実験授業展開

組換え大腸菌での遺伝子発現

大腸菌タンパク質

pGLOプラスミドDNA

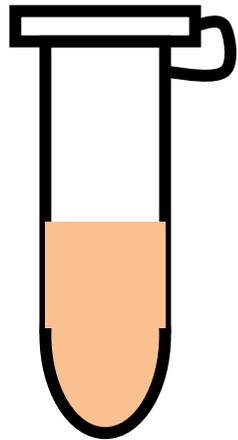


AraCタンパク質

βラクタマーゼ
(アンピシリン分解酵素)

GFPタンパク質

形質転換効率(プラスミドDNA μg 当たりのコロニー数)



250 μL TF soln. (*E. coli*)
250 μL LB broth
10 μL pGLO soln. (0.8 μg)] 510 μL

プレートに播いた菌の容量

プレート当たりのプラスミド量

$$\frac{100}{510} \times 0.8 \mu\text{g} = 0.16 \mu\text{g}$$

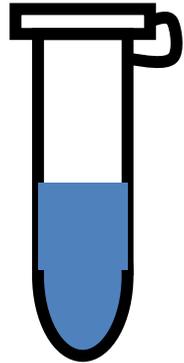
20 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$:1 バイアル

$$\frac{190 \text{ コ}}{0.16 \mu\text{g}} = 1,187 = 1.2 \times 10^3 \text{ コ}/\mu\text{g}$$

↑
プラスミドDNA 1 μg 当たりのコロニー数

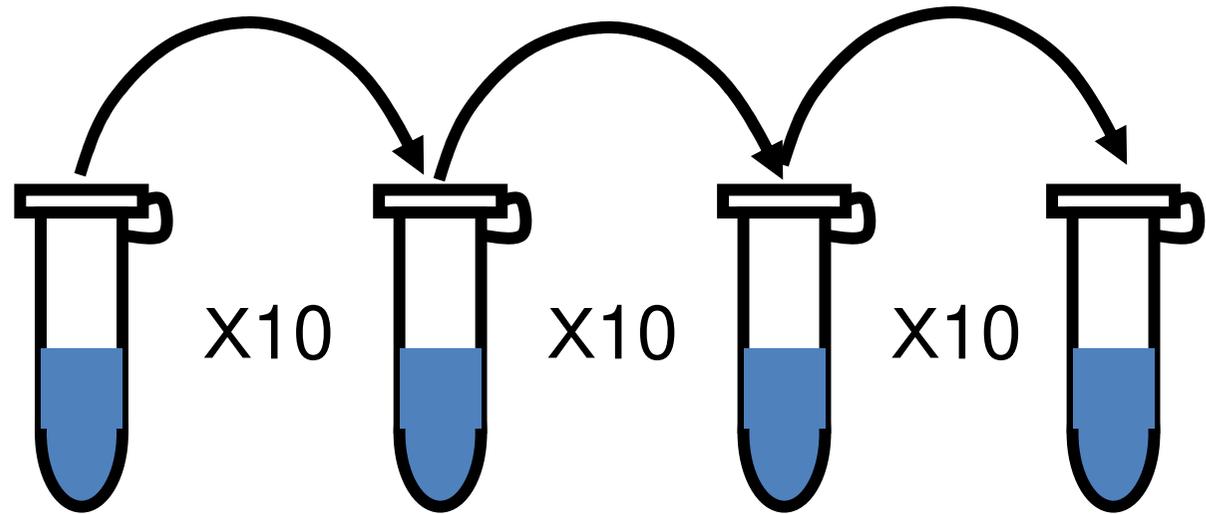
形質転換頻度の推定

(菌数測定による形質転換頻度の推定)



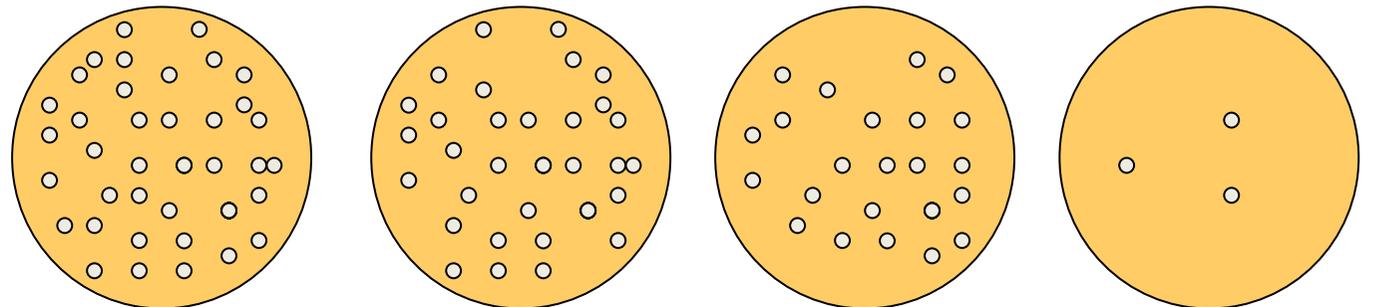
250 μ L TF soln. (*E. coli*)
250 μ L LB broth
10 μ L pGLO soln.] 510 μ L

菌数測定:
チューブ内菌数
→プレート添加菌数



$\frac{\text{形質転換コロニー数}}{\text{プレート添加菌数}} \times 100$

= 形質転換頻度 (%)



x10³

x10²

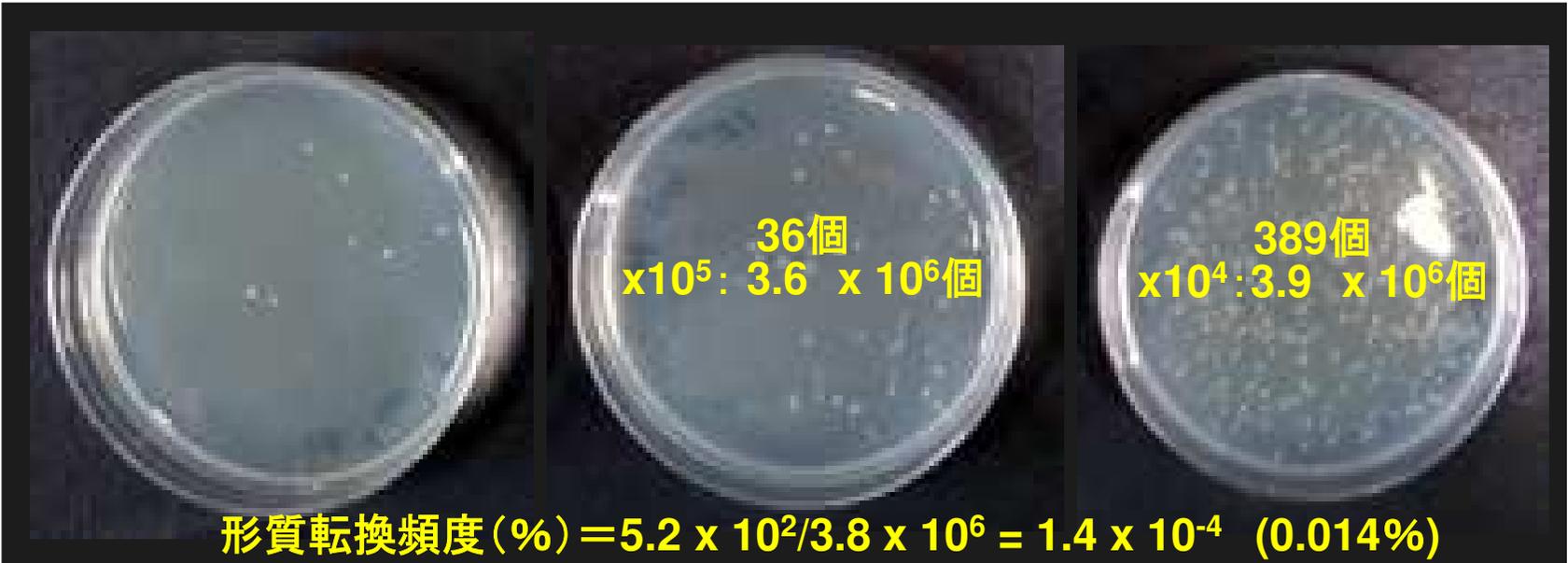
x 1



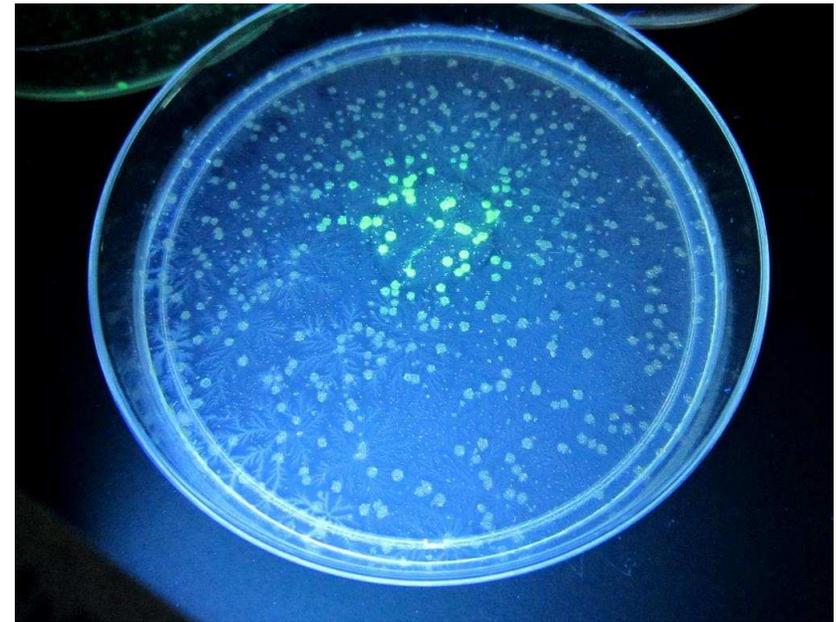
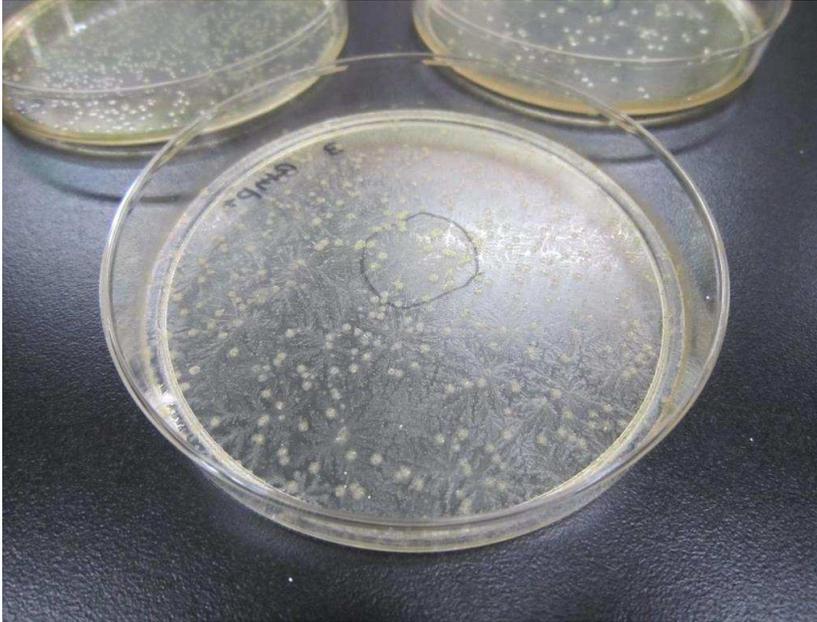
x10⁶

x10⁵

x10⁴



蛍光の持続力



2-8°C (低温室) 12週間放置
培地乾燥状態

本実験の準備

テキスト30～36ページ

関連事項:

テキスト37ページ、50ページ

テキスト66～68ページ

実習の準備1: 培地作製



寒天培地溶解



攪拌後分注



ラベル表示



注意: アンピシリン・アラビノースは、
ボトルを手で触れられる温度で添加。

Luria-Bertani (LB) medium

Lysogeny Broth medium

トリプトン(Bacto-Tryptone) 1% (w/v)
酵母エキス(Yeast Extraxt) 0.5% (w/v)
塩化ナトリウム (NaCl) 1% (w/v)
(NaOHにて、pH 7.0に調整)

*LB培地の名称: Salvador Edward Luria (1969年ノーベル医学生理学賞受賞) 研究室の Giuseppe Bertani が溶原化ファージの培地として1951年に報告したため Luria-Bertani と呼ばれることもある。 ([テキスト66ページ](#))

Bertani G.: “Studies on **lysogenesis**. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Echerichia coli*.” J. Bacteriol. 62, 293-300 (1951)

Lysogeny Broth medium

200 mL三角フラスコ

← 水	100 mL
← Bacto-tryptone (DIFCO)	1.0 g
← Yeast extract (DIFCO)	0.5 g
← NaCl	1.0 g

↓ 攪拌

← 10 M NaOH	10 μ L
← 寒天粉末	1.2 g

↓ 攪拌

オートクレーブ (121°C、20分)

↓ 攪拌

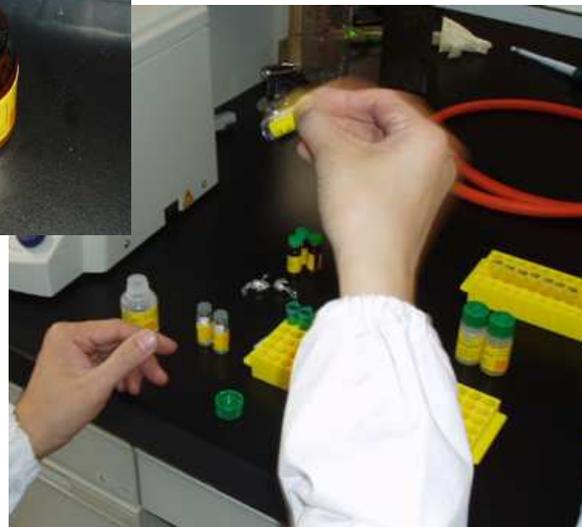
LB寒天培地

実習の準備2: 試薬分注



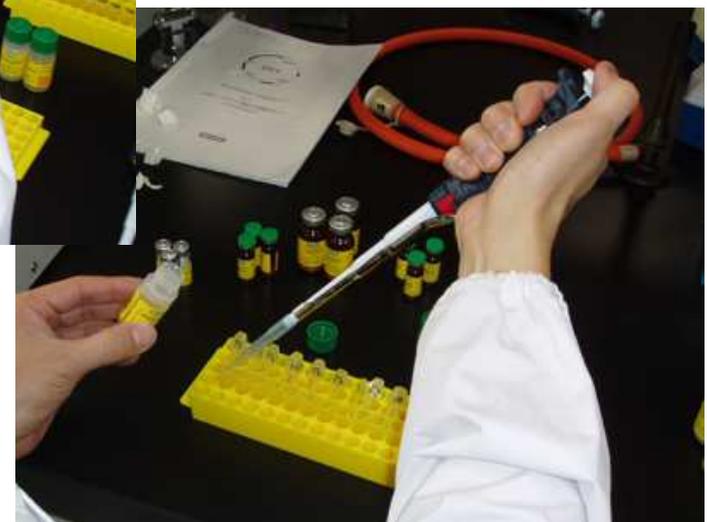
ラベル表示

凍結乾燥品の溶解



攪拌

分注



実習の準備2: 試薬分注

□大腸菌:

凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液("Bu") 250 μ L添加。
溶解した際、必ず攪拌する。

□プラスミドDNA溶液: 60 μ L/1チューブ →2グループで1本
プラスミド溶液(凍結乾燥品): 20 μ g/250 μ L "Bu"

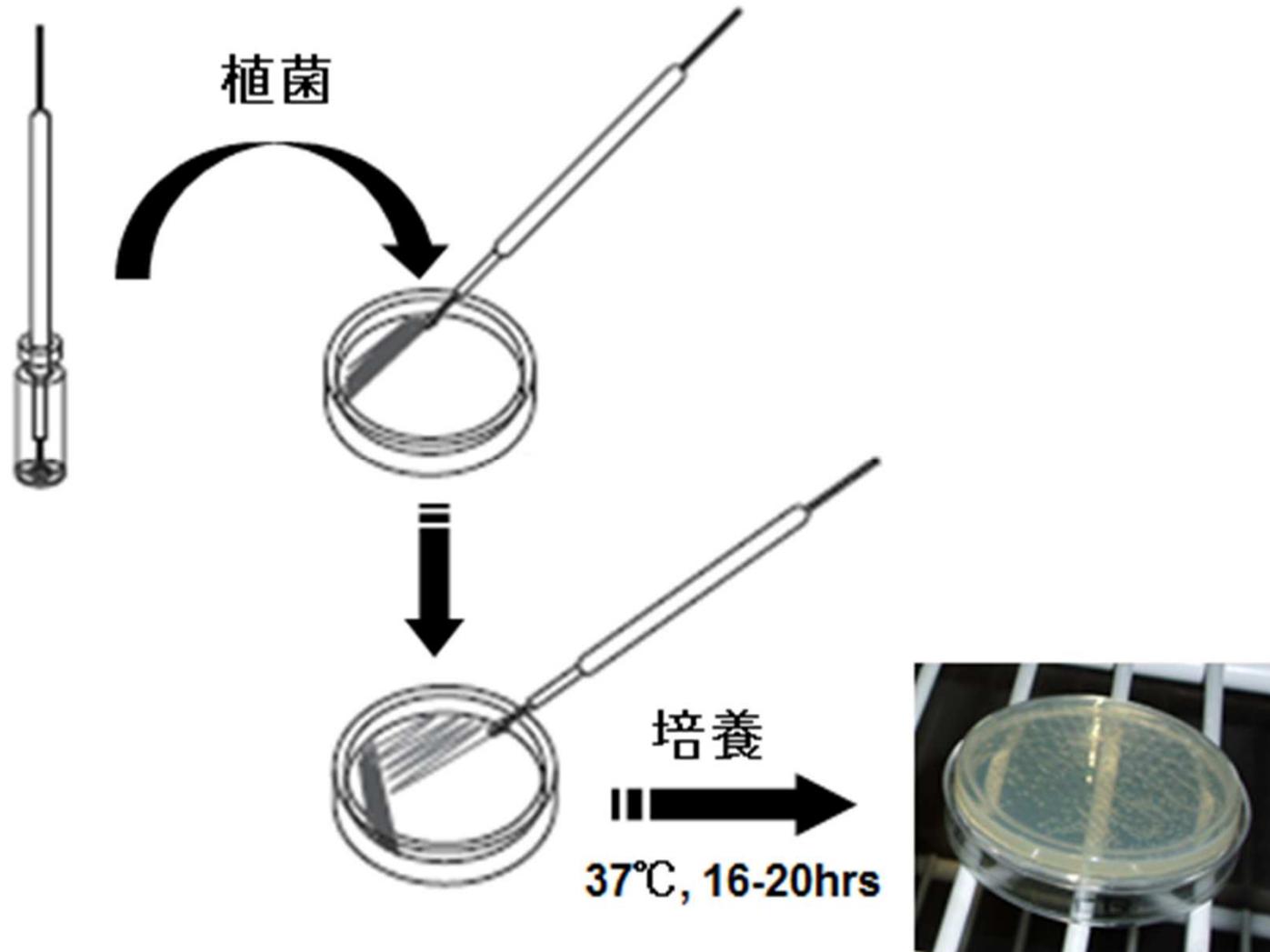
2-4倍希釈とし20 μ g/500-1,000 μ L "Bu"でも問題ない。

プラスミドDNA溶液は、確実にループで採取する必要があるため、多少希釈されても十分な容量がよい。

□形質転換用溶液(Transformation buffer: "Bu")

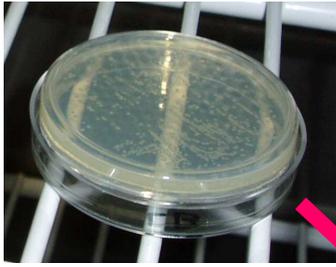
0.8 mL/1チューブ

スタータープレートの作製



プレート前面に植菌して構わない。

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

廃棄物処理

オートクレーブ



テキスト50ページ

普通の鍋で煮沸：
大腸菌が死滅すれば
大丈夫！



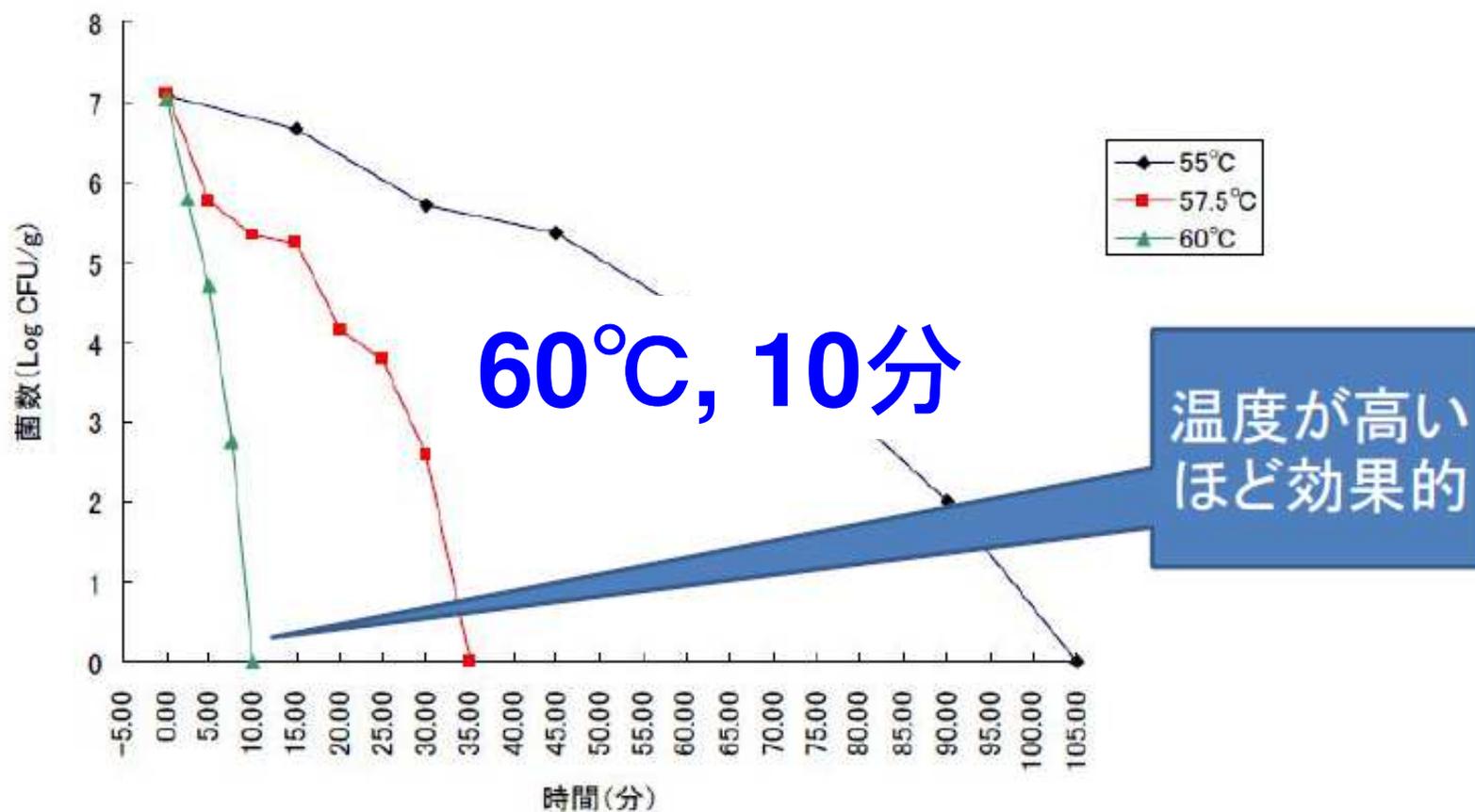
スーパーの袋（不透明）
で代用可能



スーパーの袋(不透明)を用いた滅菌処理



病原体の死滅する温度と時間



牛挽肉中の*E. coli* O157を55°C、57.5°Cおよび60°Cで加熱処理した時の菌数の消長

出典:「サルモネラならびに腸管出血性大腸菌O157:H7のD値に関する研究」分担研究者
小沼博隆 (東海大学海洋学部水産学科)

15

厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課

食品規格専門官 吉原尚喜氏(平成27年6月26日)資料より

<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/0000090138.pdf>

高等学校などで遺伝子組換え実験を行う皆様へ



文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課
生命倫理・安全対策室

高等学校などで遺伝子組換え実験を実施することは、組換えDNA技術が持つ有用性とその社会的な影響を学び、ライフサイエンス研究に対する正しい理解を促すために有意義な手段であると考えられます。

しかしながら、その実施に当たっては、「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(いわゆるカルタヘナ法又は遺伝子組換え生物等規制法)」で定めるルールをしっかりと守る必要があります！

拡散防止措置の内容		✓
①	実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。	
②	遺伝子組換え生物等を含む廃棄物(大腸菌などの菌液、廃液を含む。)については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。 (具体例:オートクレーブ装置を用いた滅菌、70%アルコールによる殺菌)	
③	遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器及び器具については、廃棄又は再使用(あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。)の前に②と同様に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。	
④	実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。(具体例:70%アルコールによる拭拭)	
⑤	実験室の扉については閉じておくこと(実験室に出入りするときは除く。)	
⑥	実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずること。	
⑦	すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。 (具体例:白金耳を蓋のついた状態で焼かないこと(焼く前に70%アルコールに浸すと良い。))	
⑧	実験室以外の場所で遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときなど、実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等の漏出や、拡散が起こらない構造の容器に入れること。	
⑨	遺伝子組換え生物等が付着し、又は感染することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等必要な措置を講ずること。(具体例:実験の前後の手洗い、実験中に髪をさわらない)	
⑩	実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。 (具体例:「遺伝子組換え実験につき関係者以外立入禁止」などの表示)	

② 保管中の拡散防止措置をしっかりとること！

数週間にわたって実験を行う場合、作成した遺伝子組換え生物を保管する必要がありますが、この場合には、① 遺伝子組換え生物が漏出しない容器に入れ、容器に遺伝子組換え生物である旨の表示をすること、② 冷蔵庫など決められた場所に保管し、見やすい箇所に遺伝子組換え生物である旨の表示をすること(つまり、①と②の2カ所の表示をしなければなりません)、を守る必要があります。

③ 体制を整備すること！

カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)では、遺伝子組換え実験を行う際に、その安全な取扱いについて検討する委員会を設置し、検討を行うよう求めているところですが、通常の教育目的の実験であれば、安全管理が容易なことから、こうした委員会の設置は必須ではありません。しかしながら、遺伝子組換え実験の内容や安全管理の方法などを組織として十分に把握した上で、実験を行うことが必要であると考えられます。また、実験を指導する方々は、遺伝子組換え生物等の取扱いについて十分な経験を有していることが望まれます。

○ その他

上記のルールは、あくまでもカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)が定めるルールの一例です。他にも遺伝子組換え生物を運搬する際のルール、送付する際のルール、事故が発生した際のルールなど様々なルールがありますので、十分注意する必要があります。文部科学省のHPでは、遺伝子組換え実験に関する情報が満載です。是非ご覧下さい。

●お問い合わせ先●

文部科学省 研究振興局 ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室
http://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae
E-mail: kumikae@mext.go.jp
TEL: 03-6734-4108 FAX: 03-6734-4114



～平成16年2月～

組換えDNA
実験指針

カルタヘナ法

「組換えDNA実験指針」では、教育を目的とした遺伝子組換え実験のためのルールが規定されていましたが、平成16年2月のカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)の施行にもない、指針は廃止されました。これ以降、教育を目的とした遺伝子組換え実験は、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)で定めるルールにより実施することが必要となりました。

遺伝子組換え実験を行う際に注意すべきルール

教育目的で行われる遺伝子組換え実験は、通常、市販の実験キットなどを用いた簡単なものでしょう。このような実験の場合、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)に従って守らなければいけないルールは非常にシンプルなものです。以下にこれらのルールを掲げますので、しっかりと守り、遺伝子組換え実験の安全の確保に努めて下さい。

① 遺伝子組換え実験中の拡散防止措置をしっかりとること！

遺伝子組換え実験を行う上で最も大事なことは、実験に用いる遺伝子組換え生物を実験室の外へ拡散させないことです。この拡散を防ぐため、カルタヘナ法(遺伝子組換え生物等規制法)では、実験の種類に応じた「拡散防止措置」をとるよう定めています。しかしながら、通常の教育目的の遺伝子組換え実験であれば、この拡散防止措置は「P1」と呼ばれるものとなります。次ページの「P1」チェックリストを参考に、遺伝子組換え実験を始める前に、これらの内容を全て満たすかどうかについてチェックしましょう。

