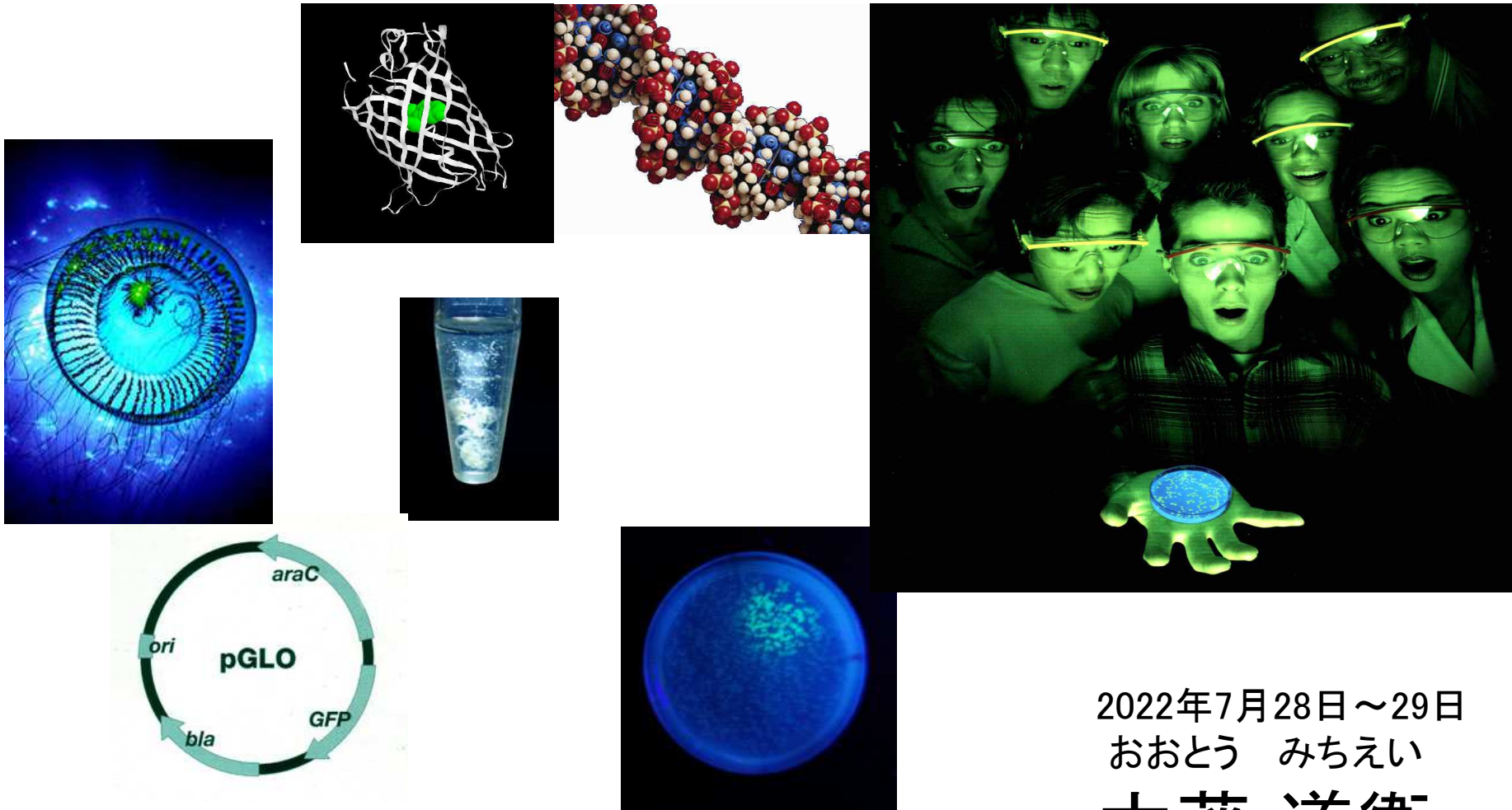


GFP遺伝子による大腸菌の形質転換



2022年7月28日～29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

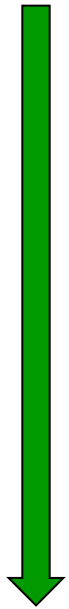
実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

廃棄物処理方法

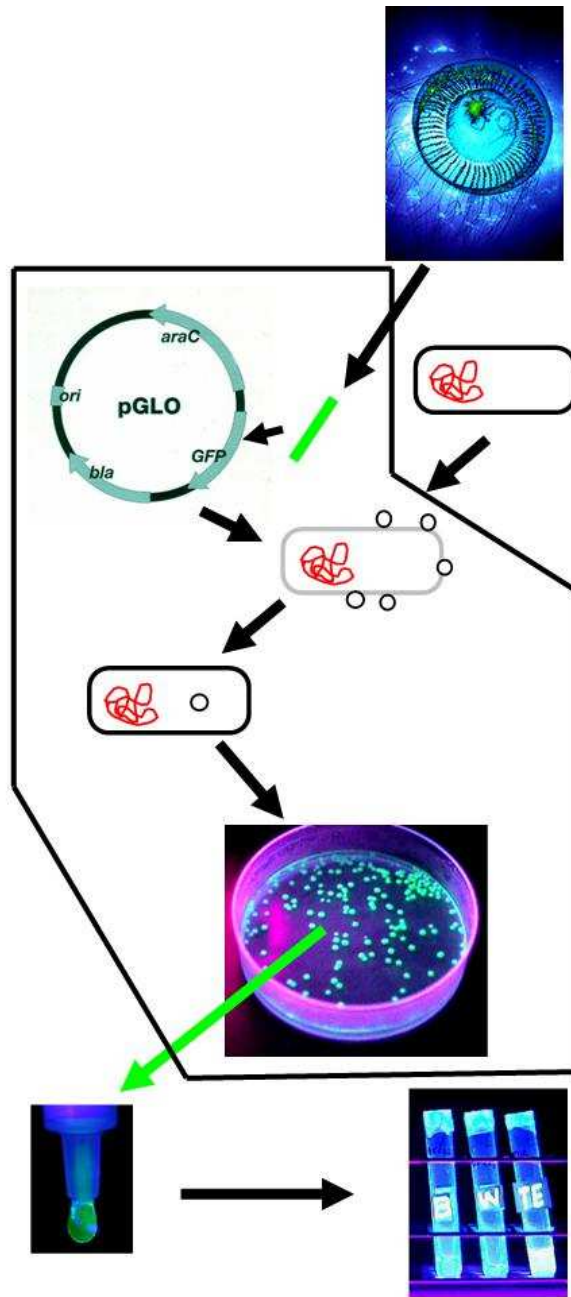
発展的実験授業展開

GFP遺伝子導入と発現GFPの精製

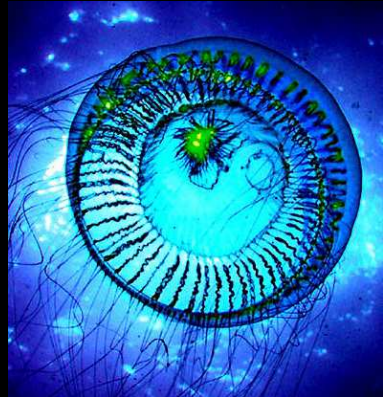
情報
(DNA)



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/>

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

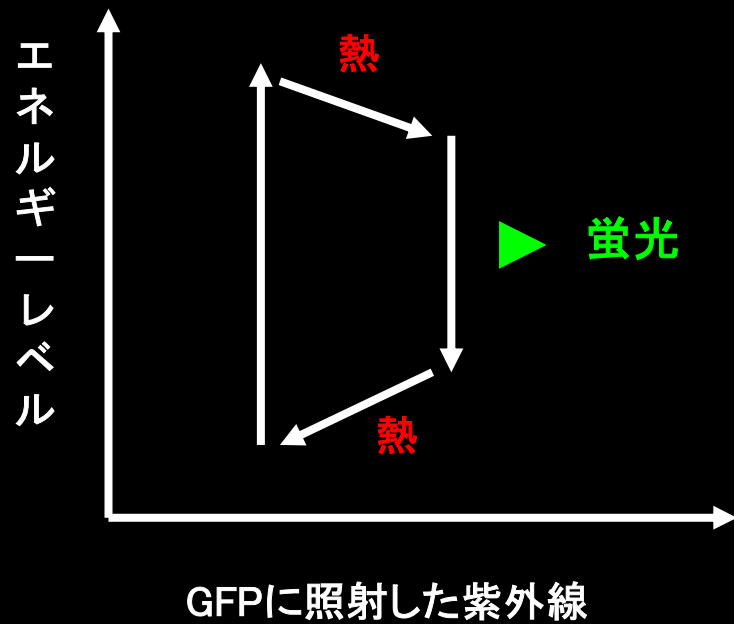
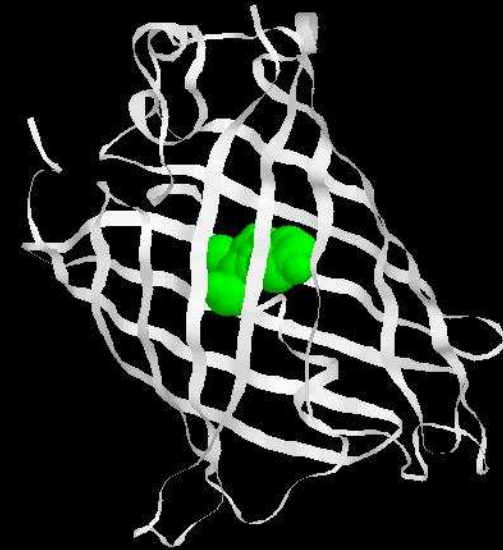
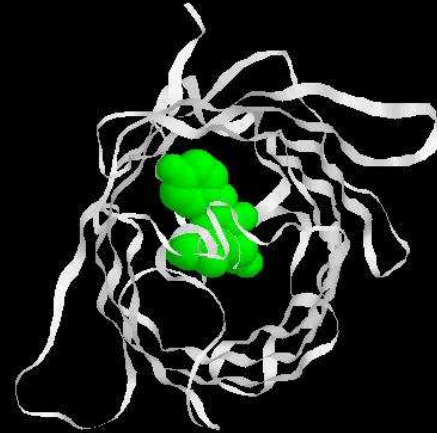
オワンクラゲの学名は、*Aequorea aequorea*, *Aequorea forskalea*,
Aequorea victoria (太平洋北東海域のバンクーバー島周辺に生息),
Aequorea coerulescens (日本近海に生息)。

テキスト21ページ



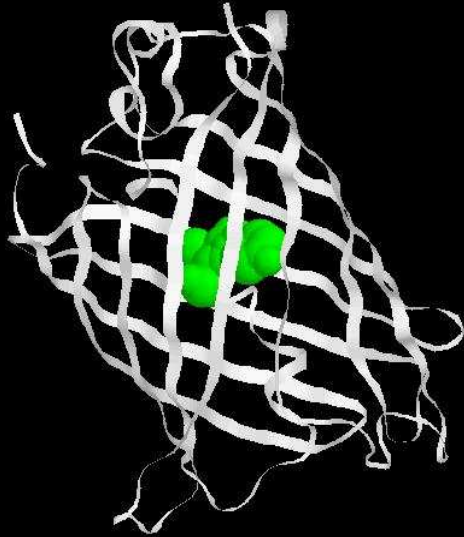
江ノ島水族館

GFPとは

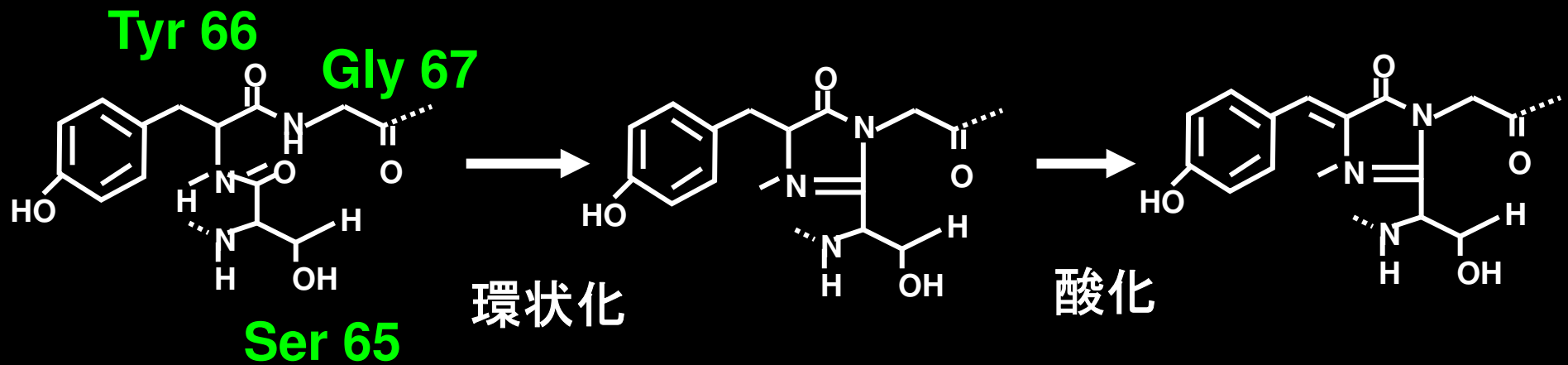


テキスト21 - 22ページ、60 - 61ページ

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



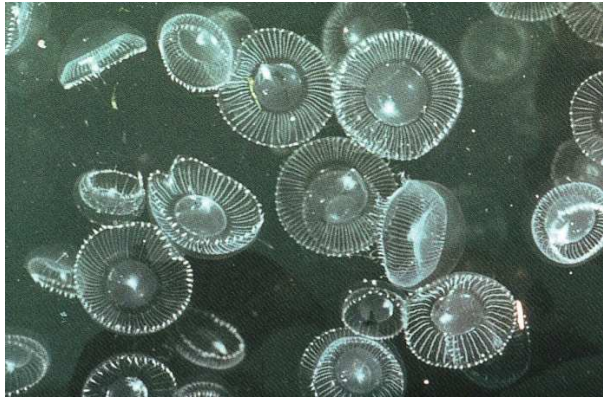
Photo: U. Montan
Roger Y. Tsien
Prize share: 1/3

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

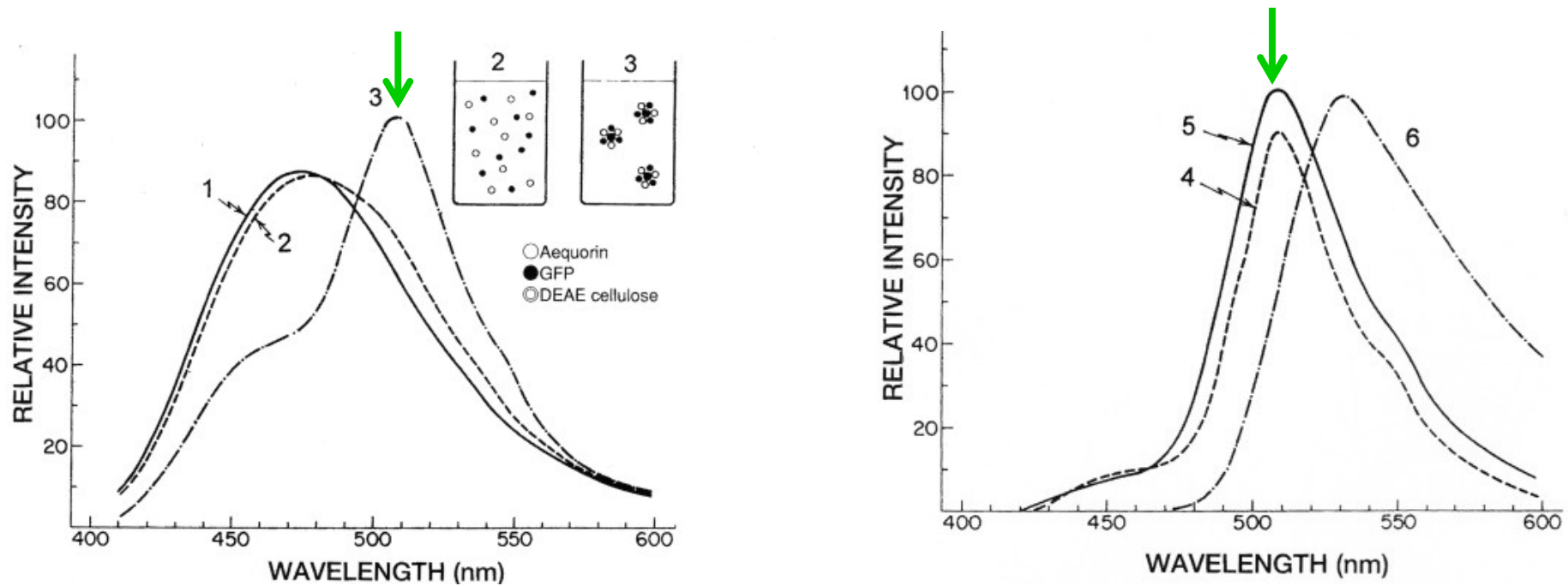


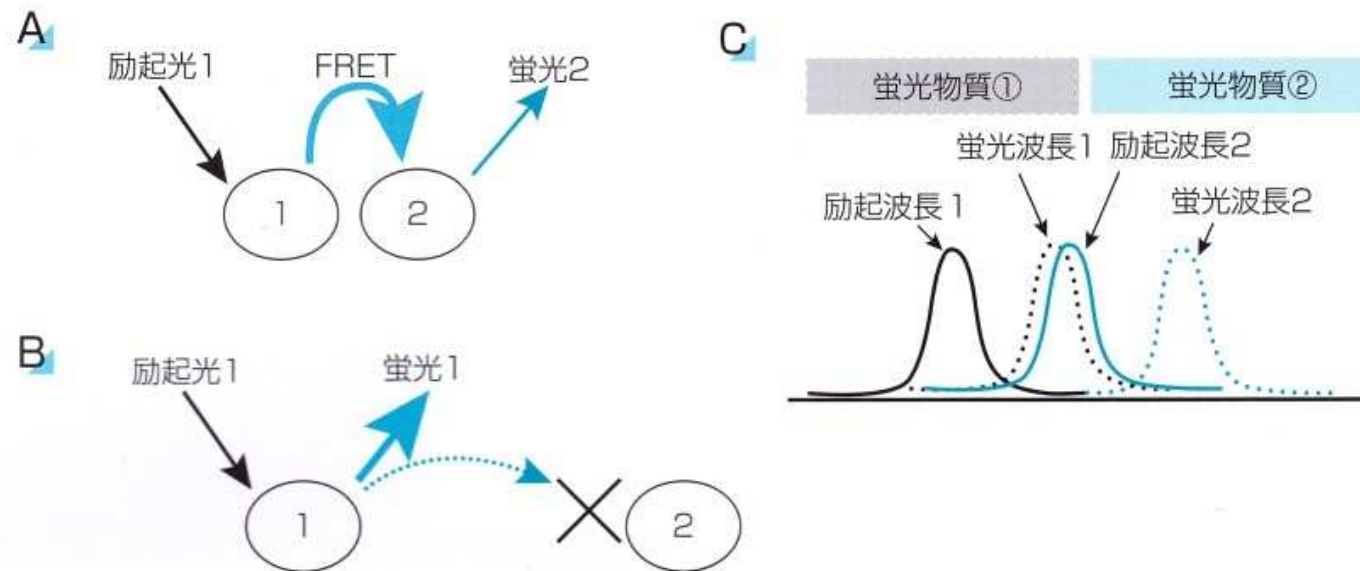
図5 イクオリンからGFPへのエネルギー転移を示す実験

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

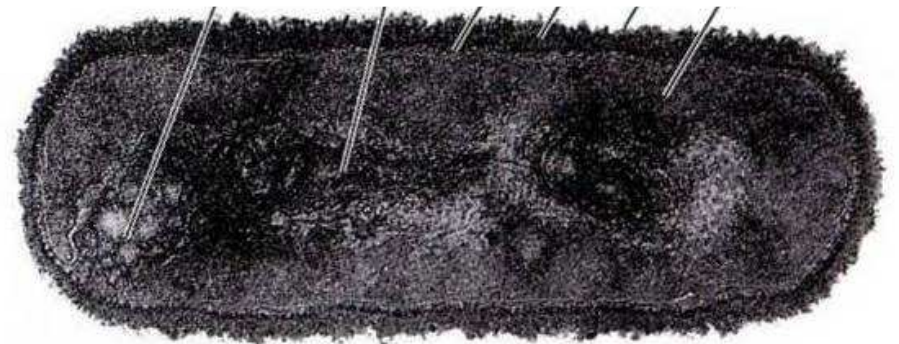
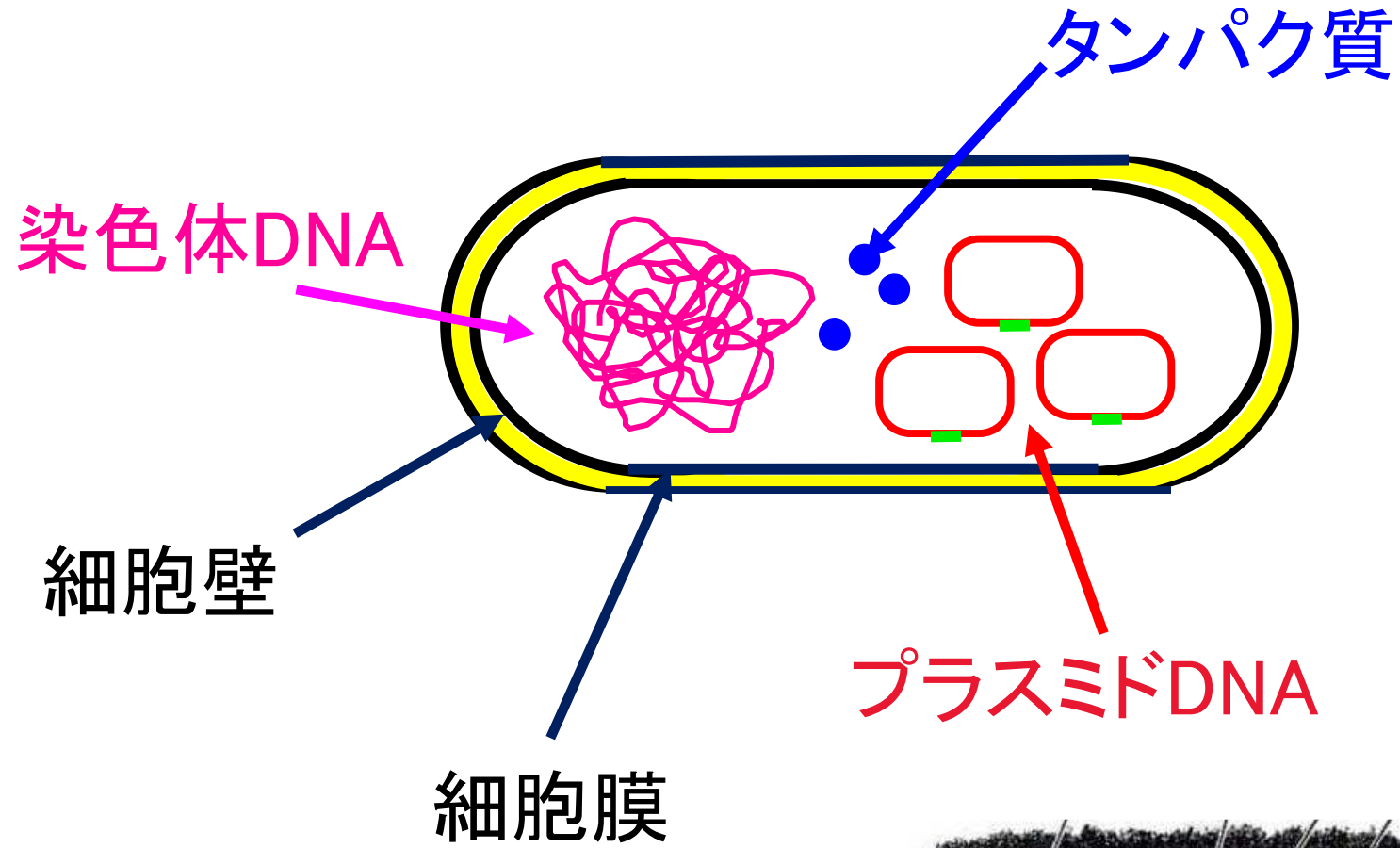
FRET が起こる場合、蛍光物質①の蛍光波長と蛍光物質②の励起波長が重複している。このため励起状態の蛍光物質①から、蛍光として利用されるエネルギーは蛍光物質②の励起に利用される

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

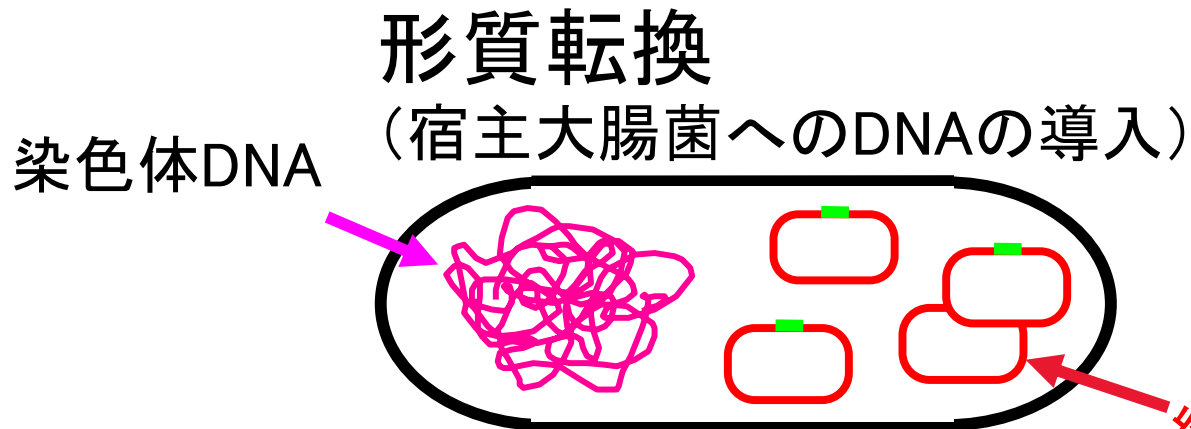
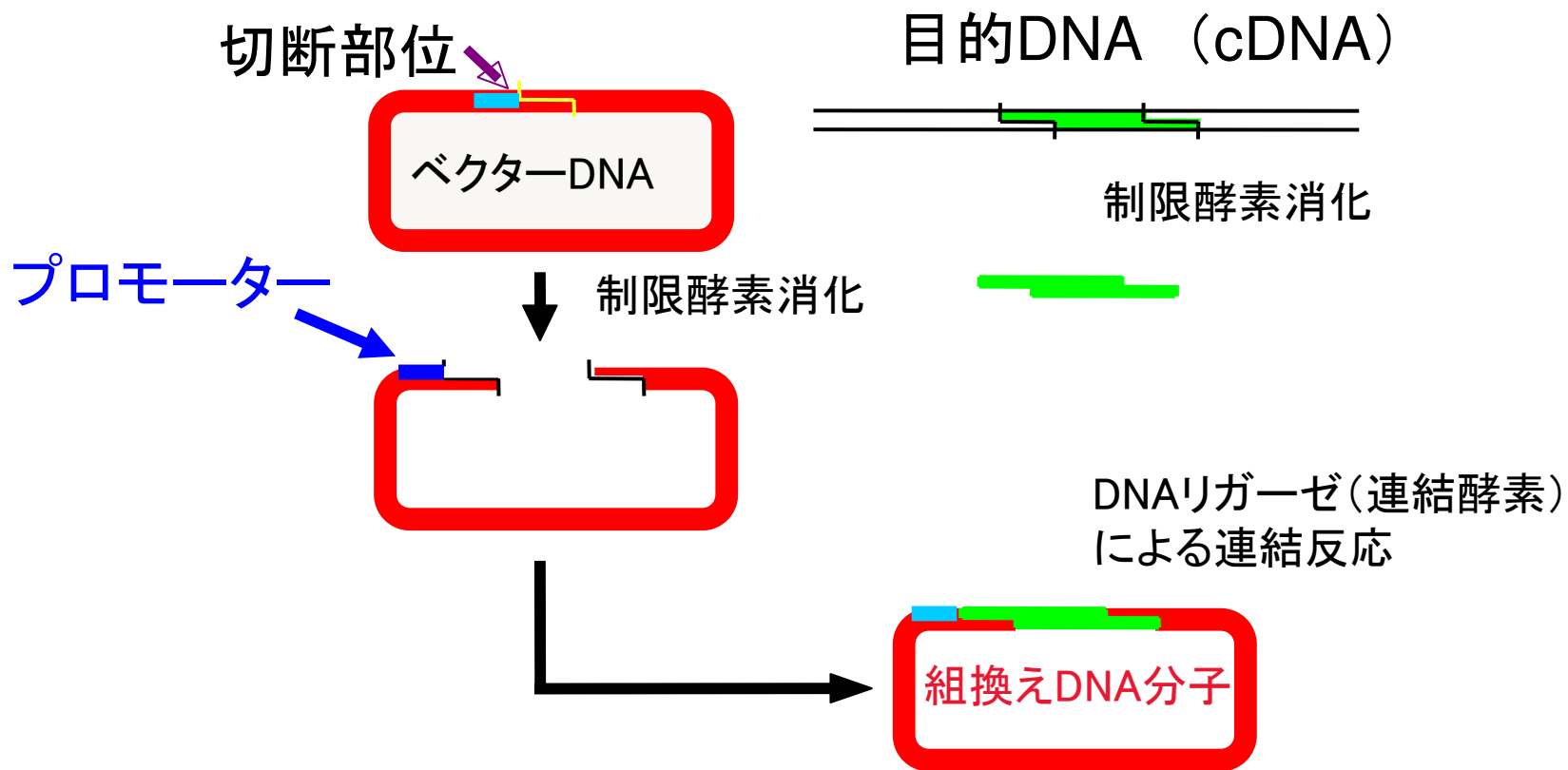
注:FRETの”F”は、発見者のTheodor Försterの”F”である。

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

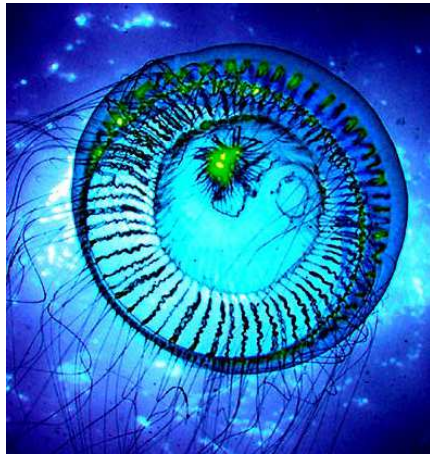
日本：1978-9年各省庁における「組換えDNA実験指針」

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)



+



=

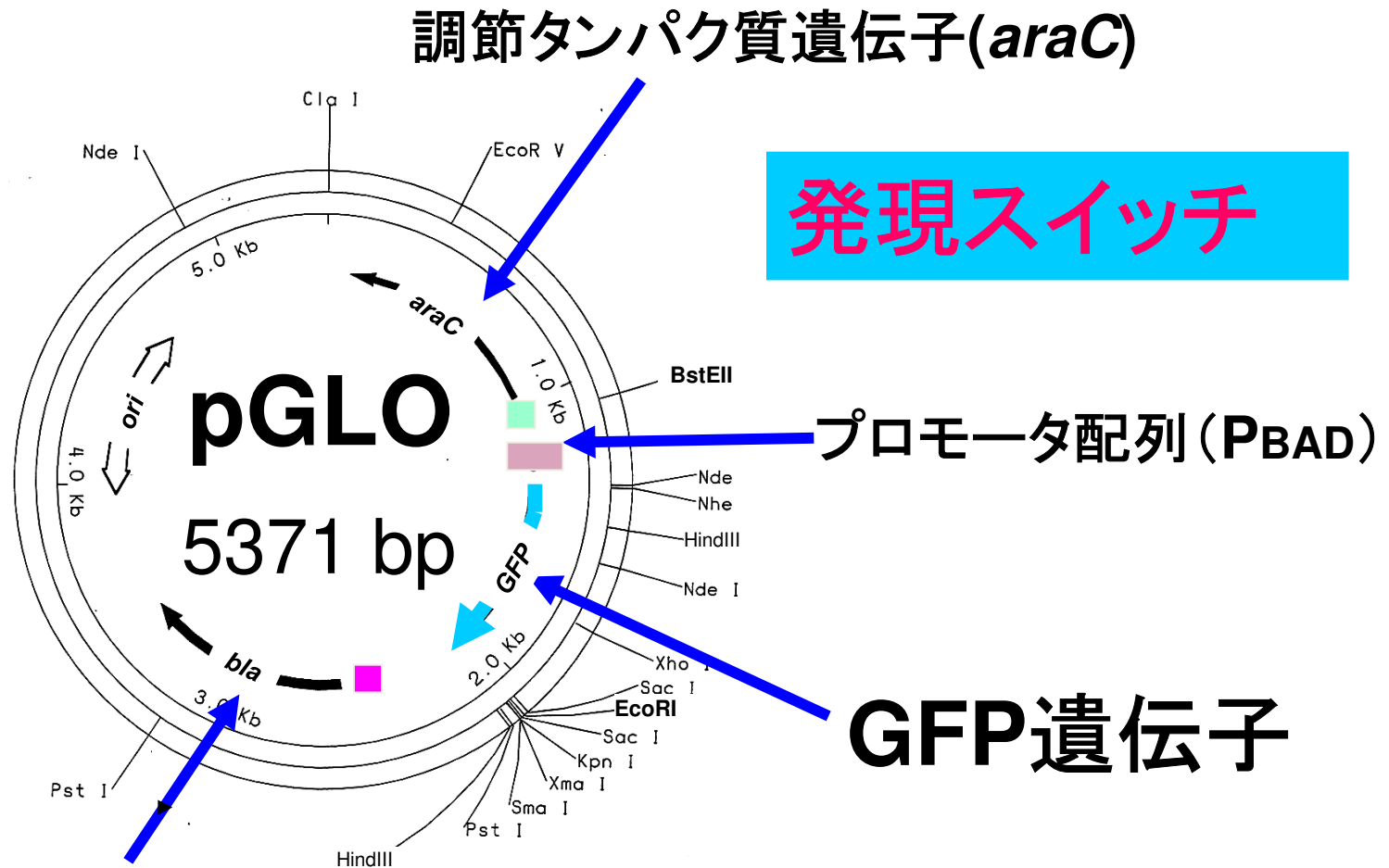
発現ON



発現OFF



プラスミドDNA pGLOの構造



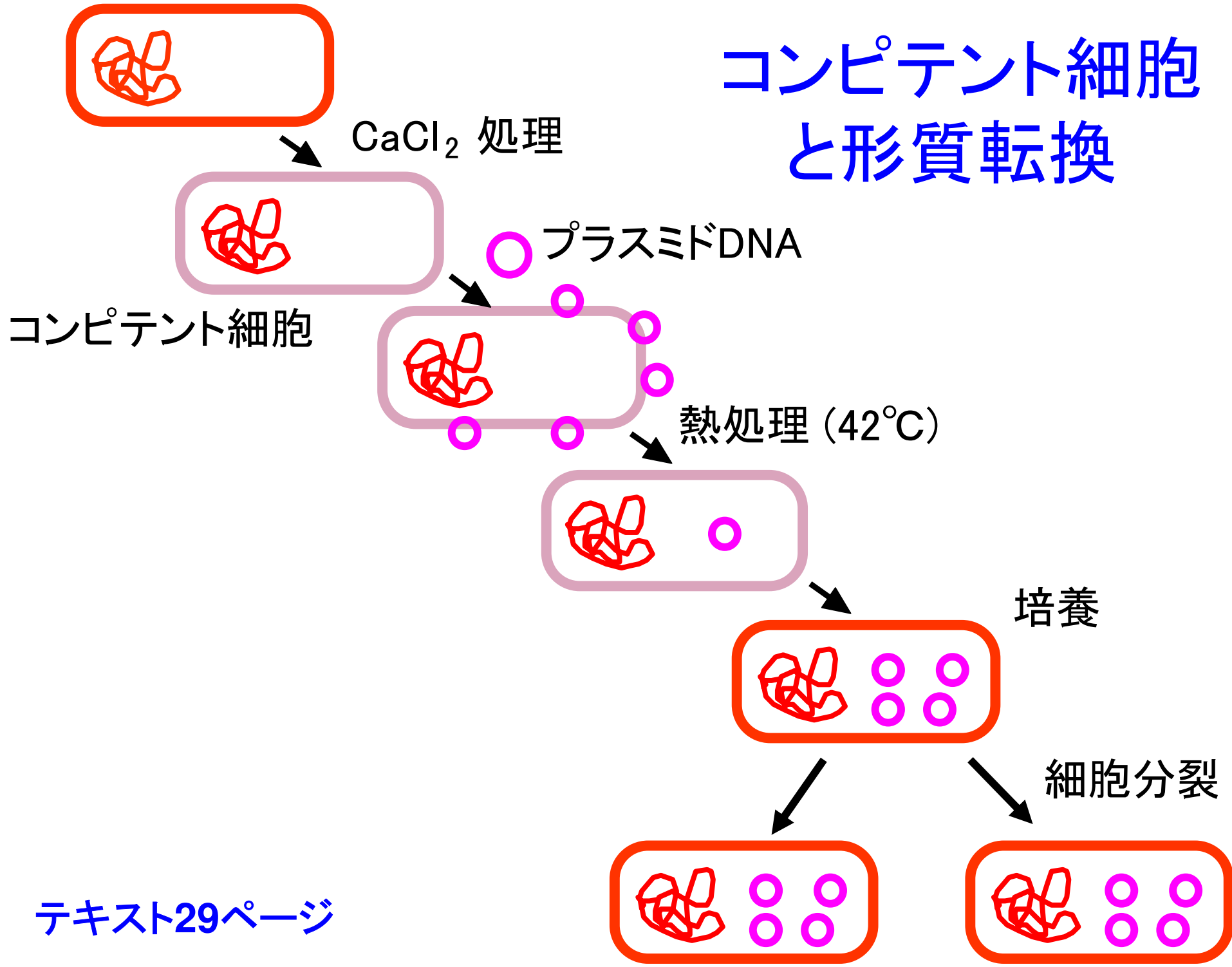
アンピシリン耐性遺伝子

(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

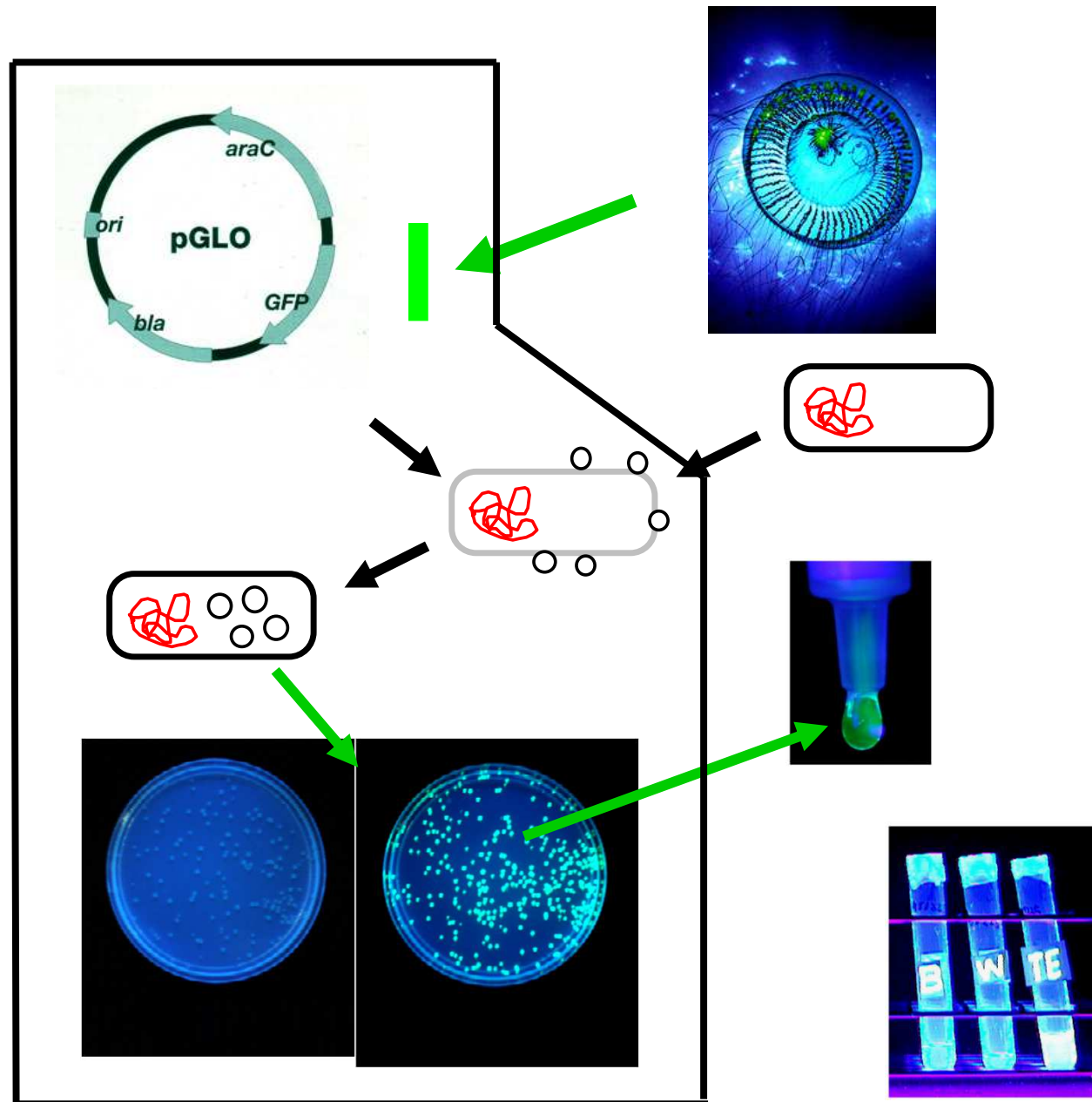
コンピテント細胞 と形質転換



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

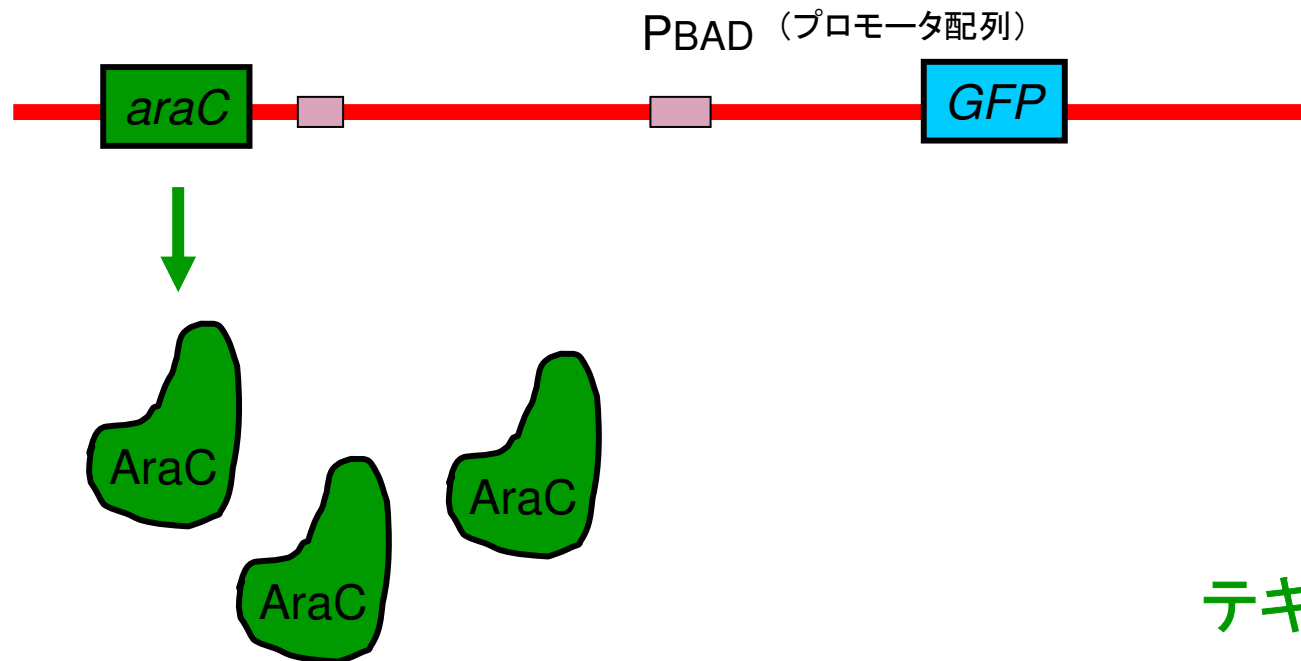
遺伝

Heredity

遺伝子

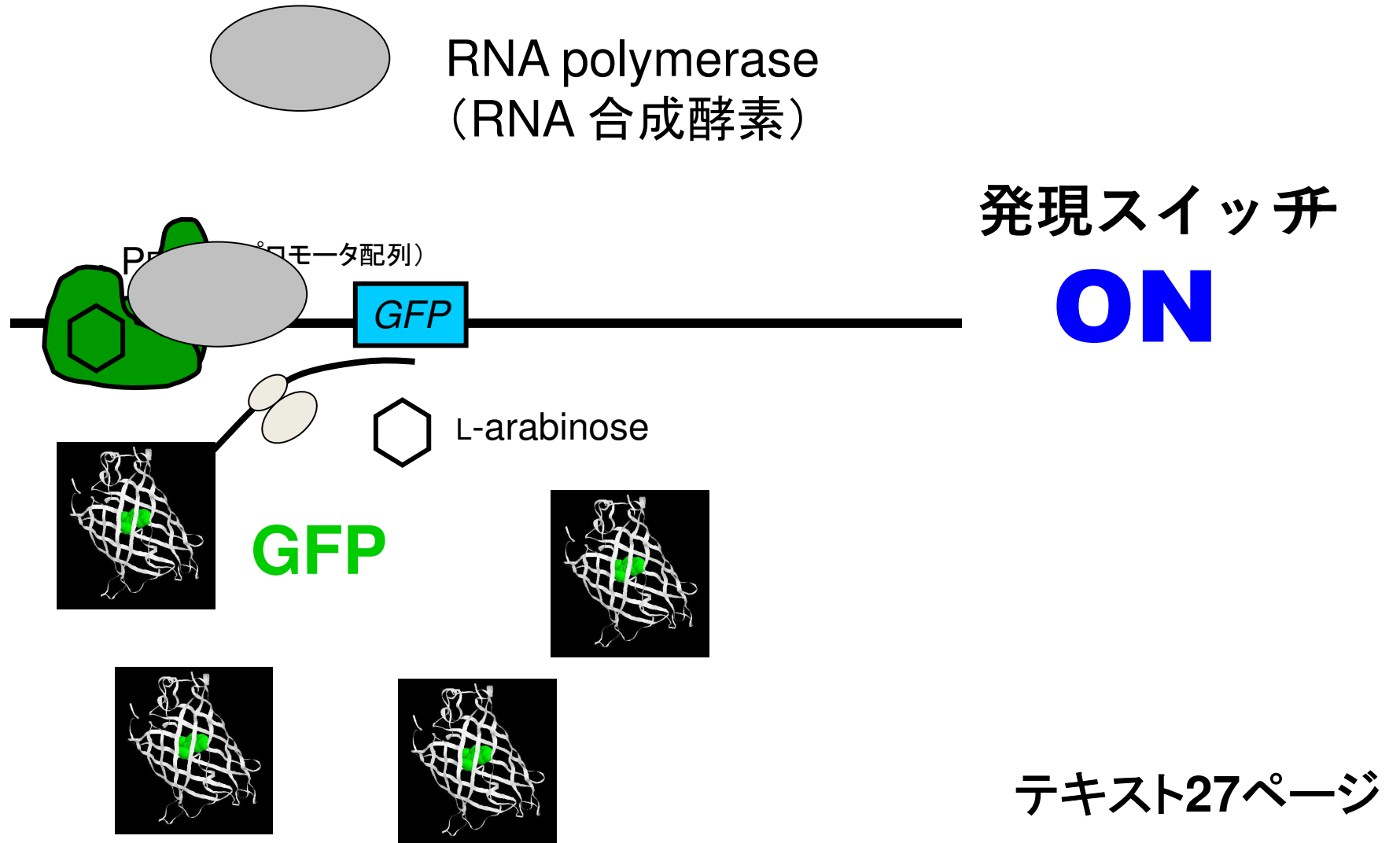
Gene

AraC遺伝子、GFP遺伝子とプロモータ配列

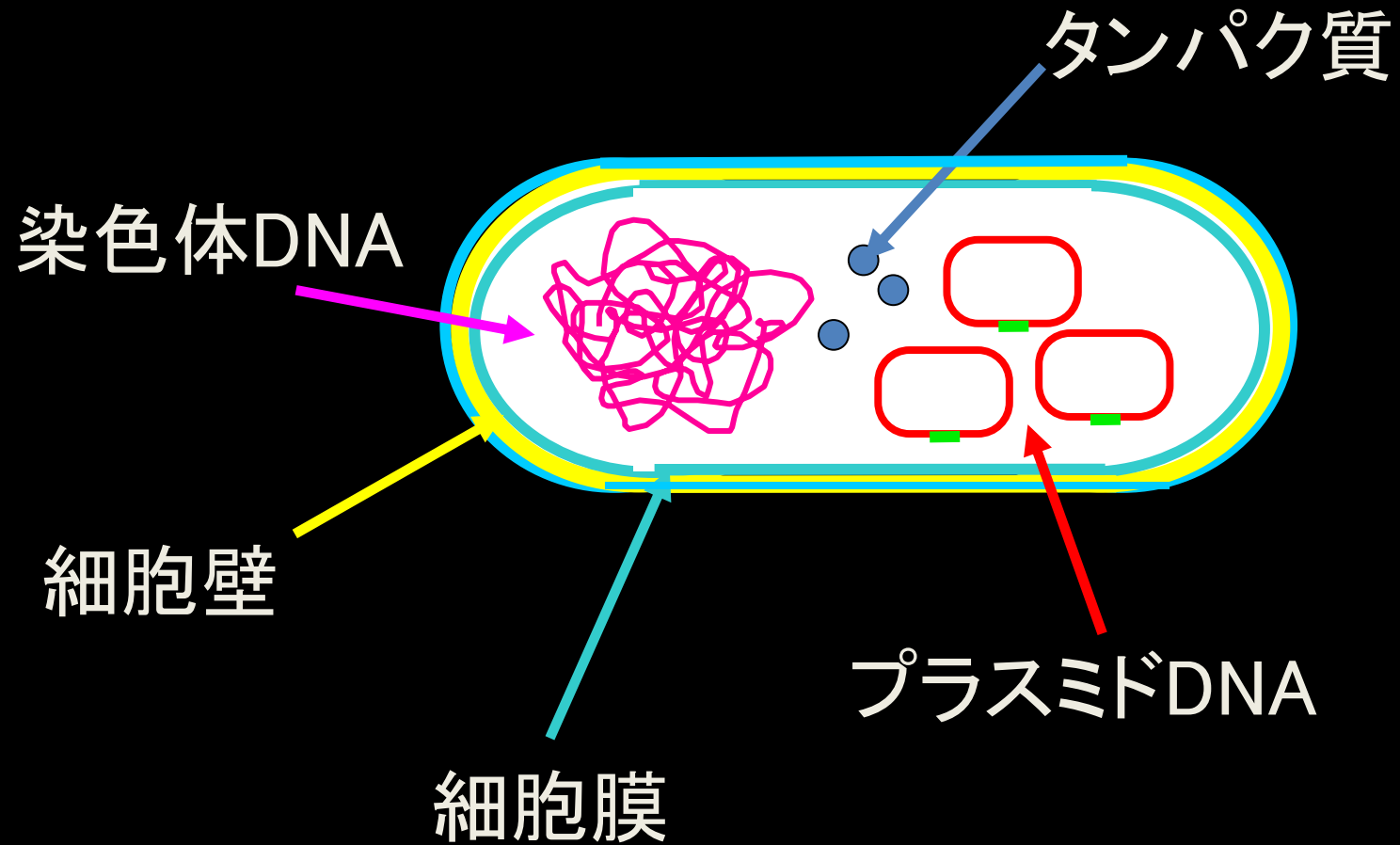


テキスト27ページ

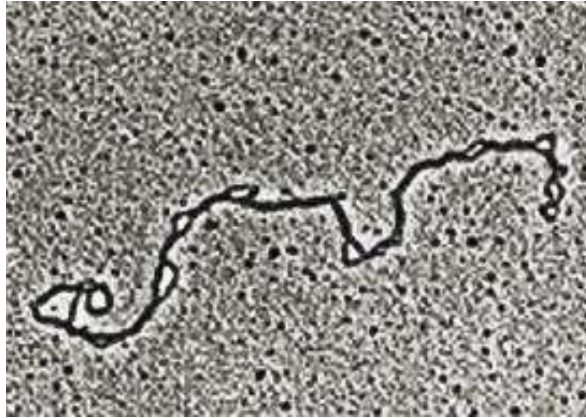
GFPタンパク質の発現調節



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

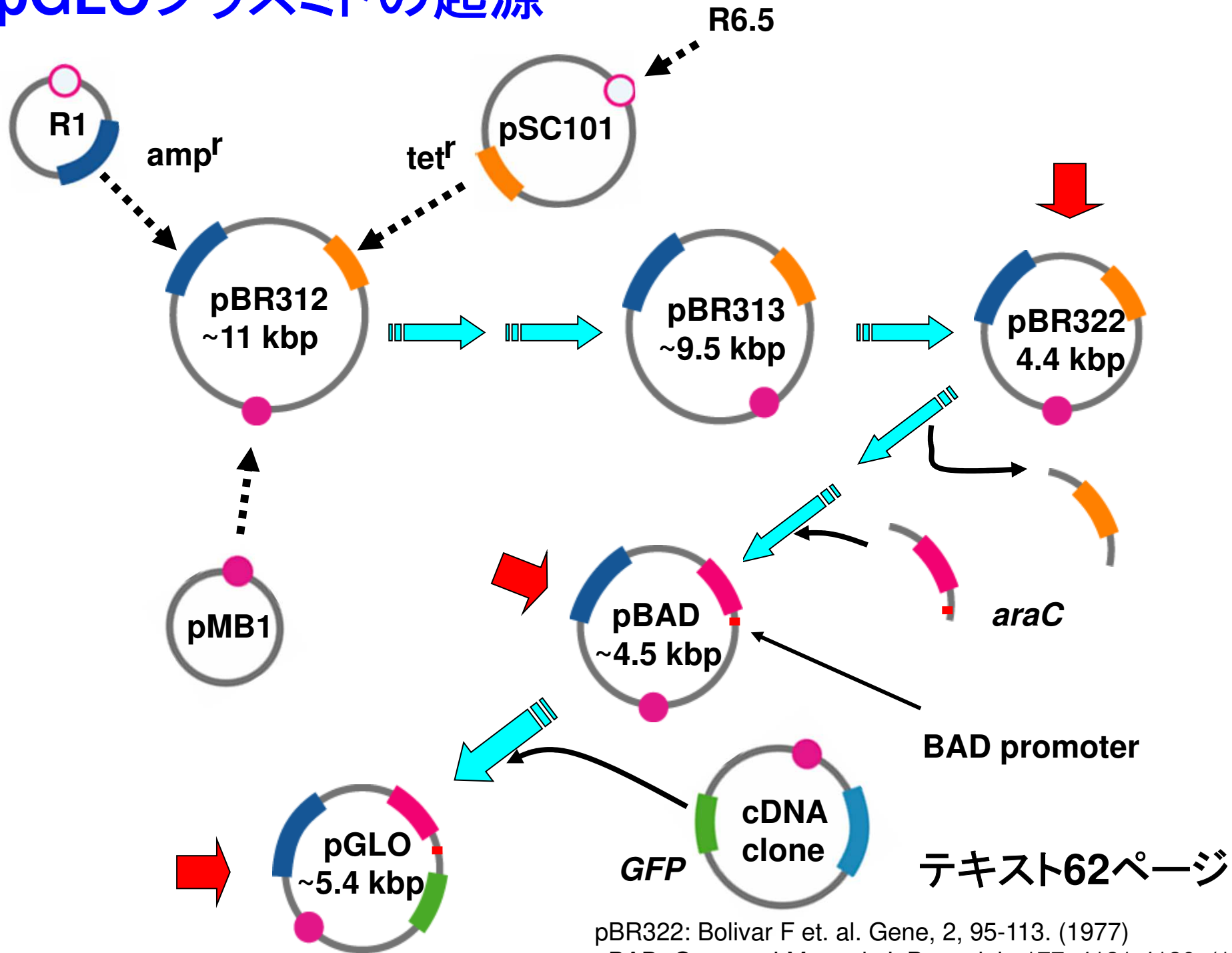
DNA分解酵素により切断され環状から
直線状となったDNA(直鎖状DNA)



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)

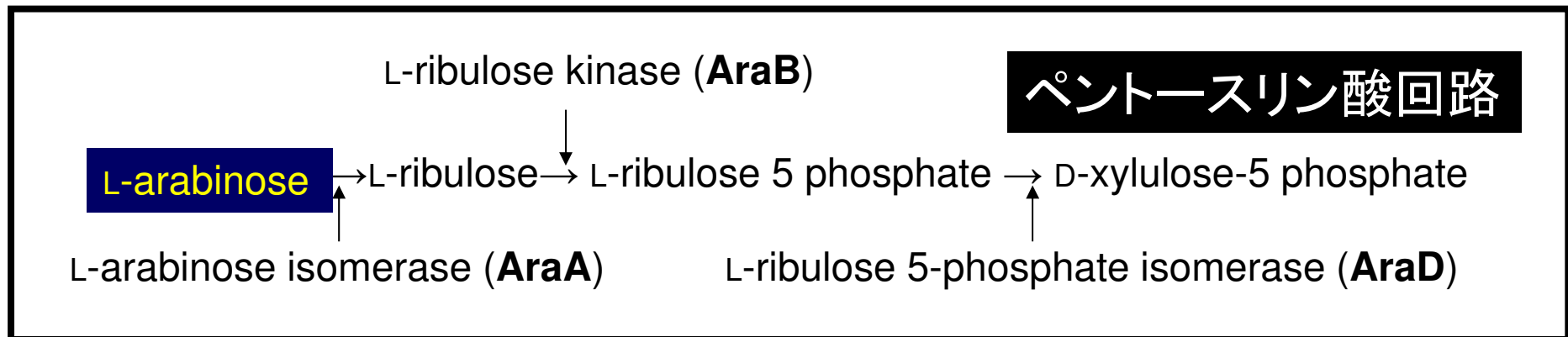
pGLOプラスミドの起源



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

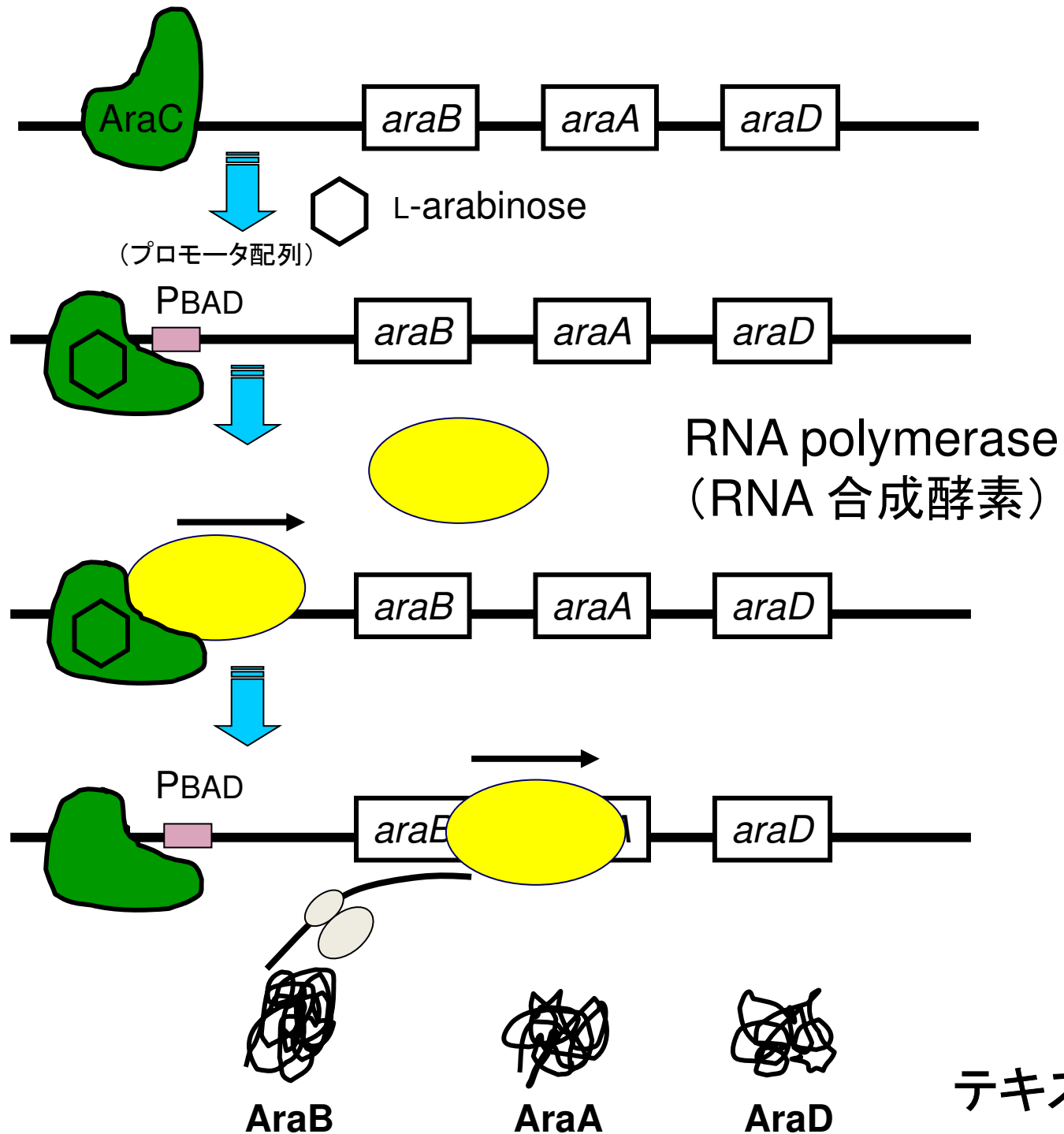
テキスト62ページ

アラビノースの代謝



テキスト26ページ

アラビノースオペロンと遺伝子発現



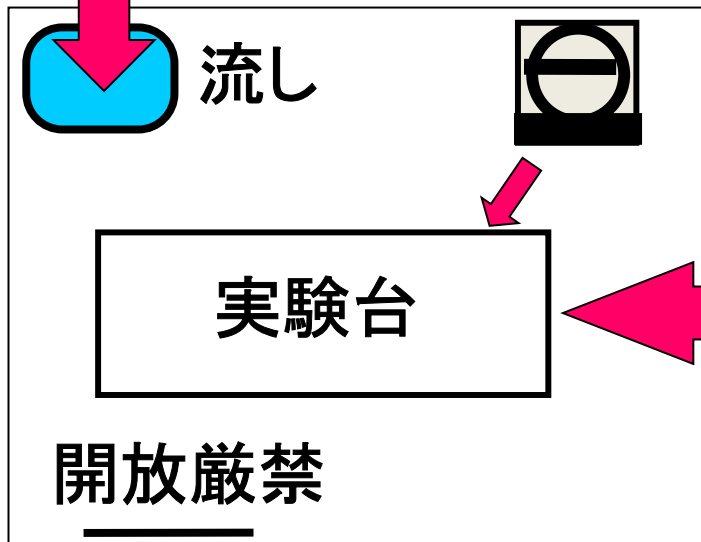
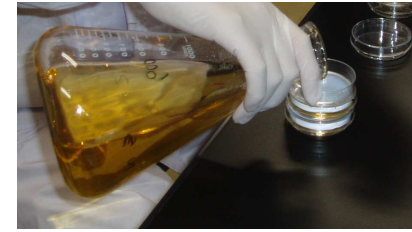
実験操作のポイント

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



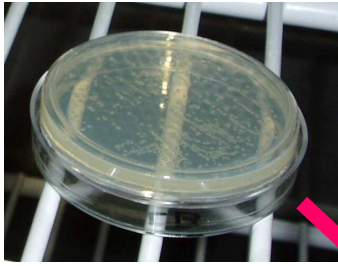
70%エタノール等で殺菌

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



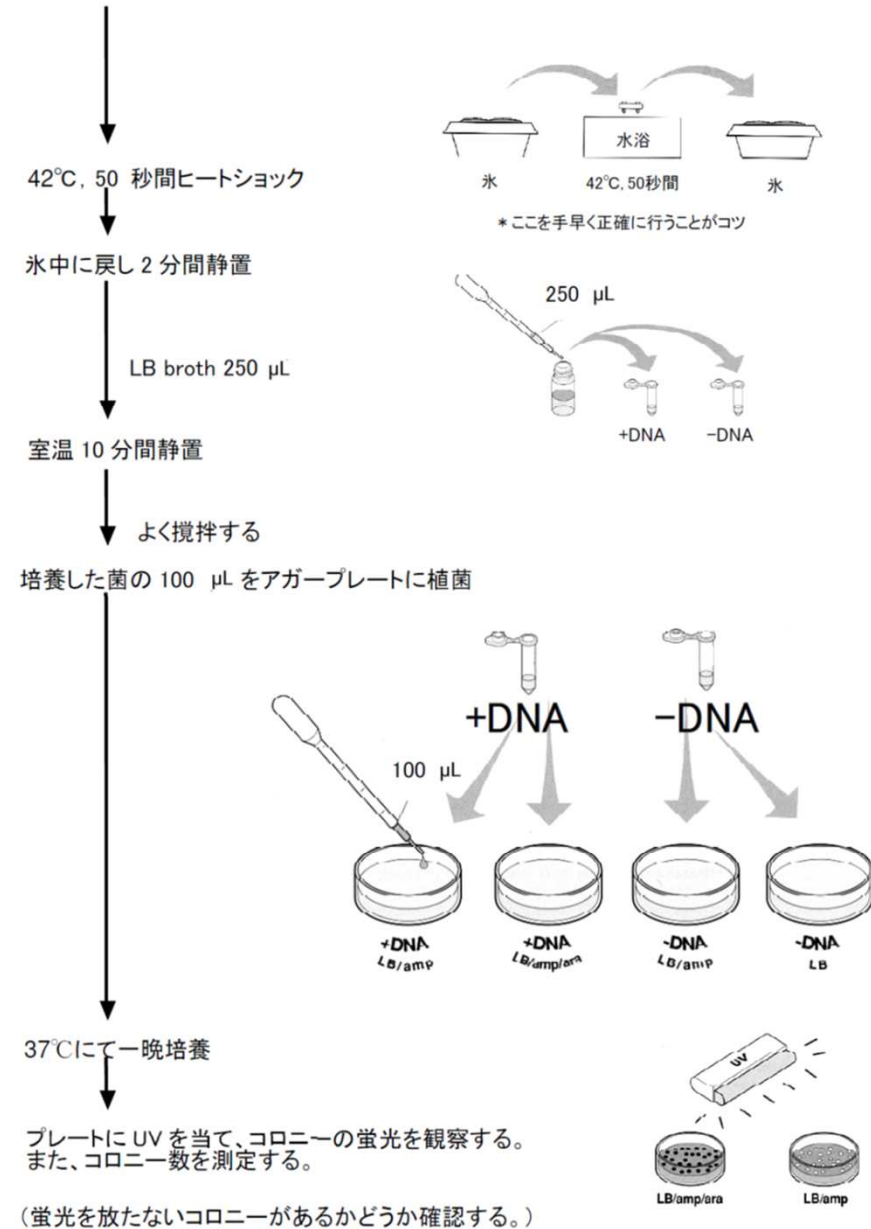
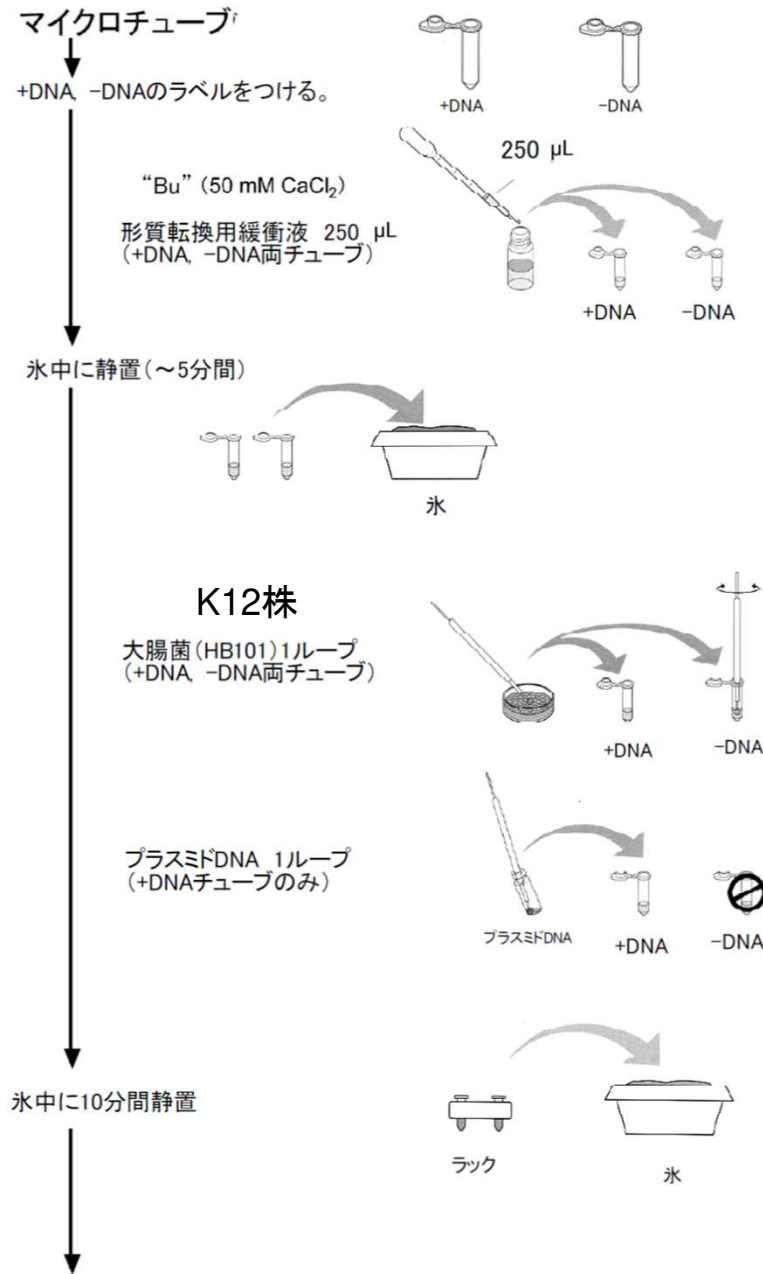
オートクレーブバッグ



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



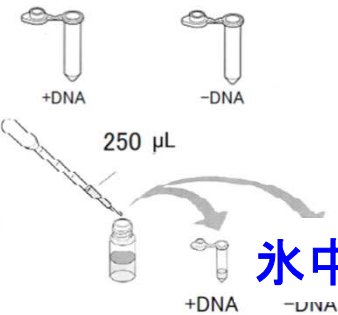
形質転換実験操作

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。

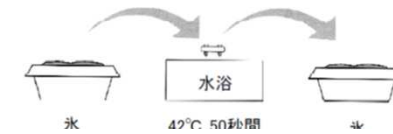
“Bu” (50 mM CaCl₂)
形質転換用緩衝液 250 μL
(+DNA, -DNA両チューブ)

氷中に静置 (~5分間)

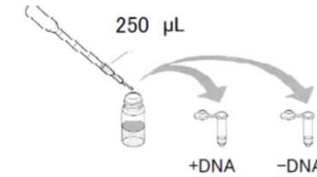


42°C. 50 秒間ヒートショック

水中⇒42°C (50秒) ⇒水中 (温度差=ヒートショック)



LB broth 250 μL

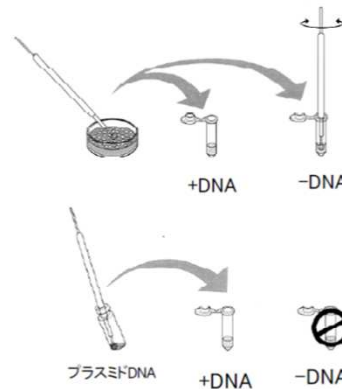


確り冷やす。
大腸菌、プラスミドDNA添加は、できるだけ氷の中で行う。

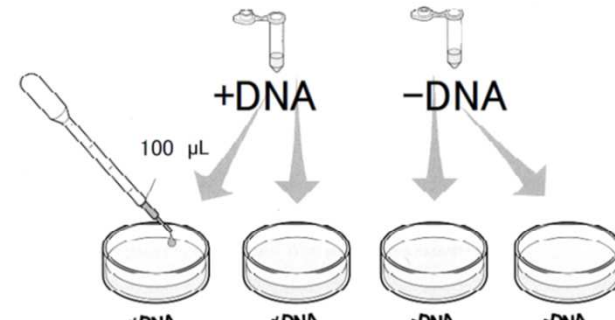
K12株

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

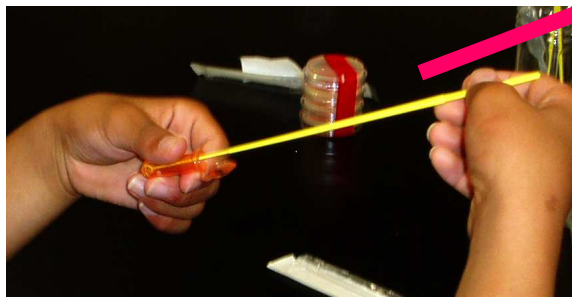


大腸菌(K12株:HB101)
添加



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

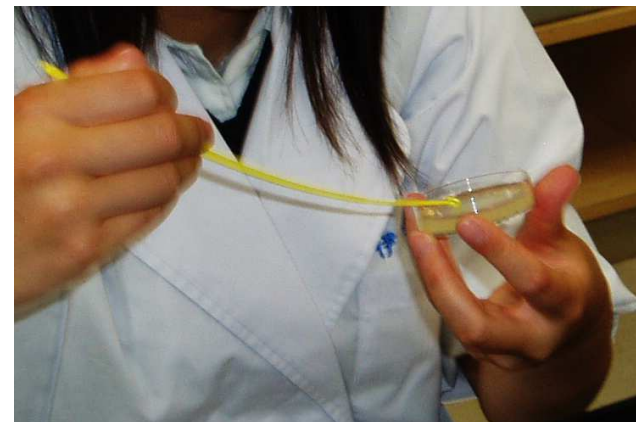
植菌



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

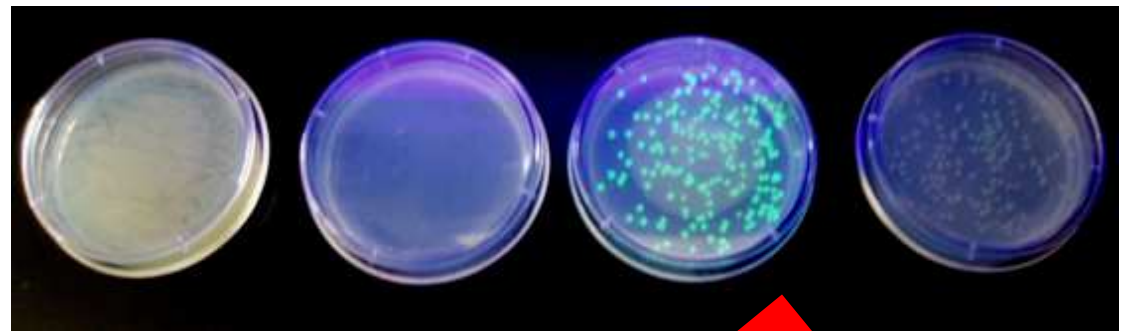


培養(裏返し)

結果観察

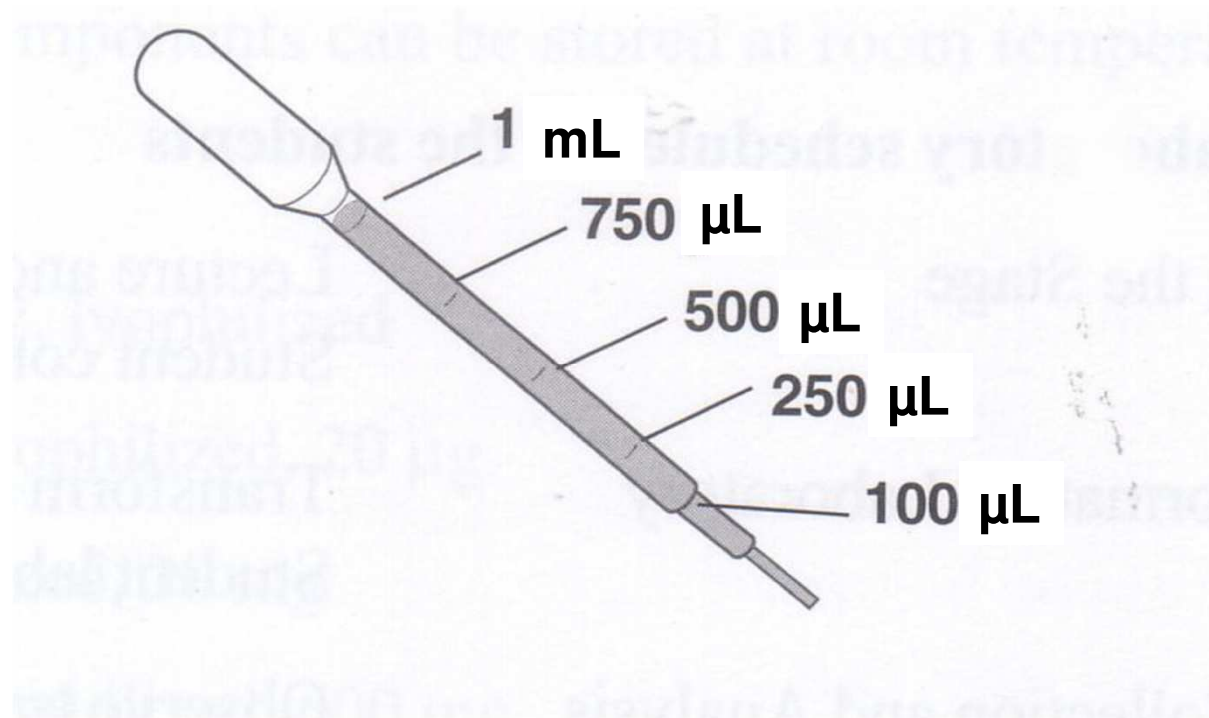


紫外線(366 nm)



コロニー数測定

① ピペットで液を採取

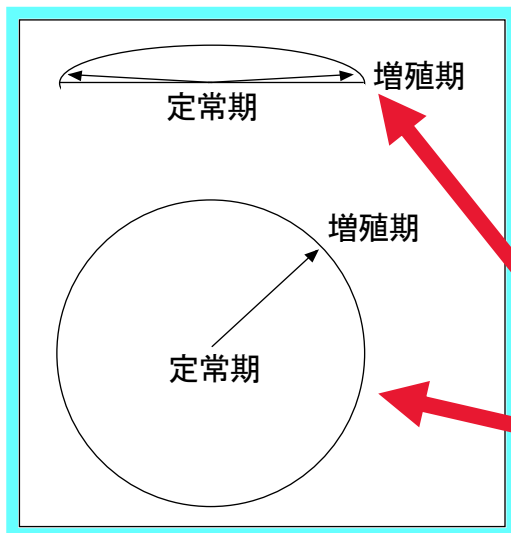
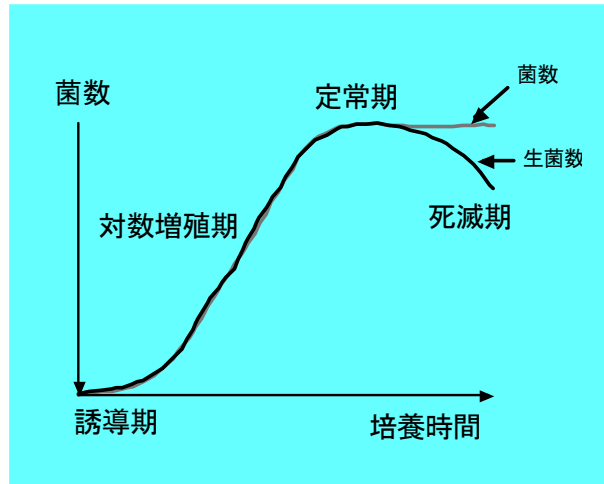


- 形質転換緩衝液添加
- LB-broth添加
- 形質転換した菌の採取

テキスト42ページ

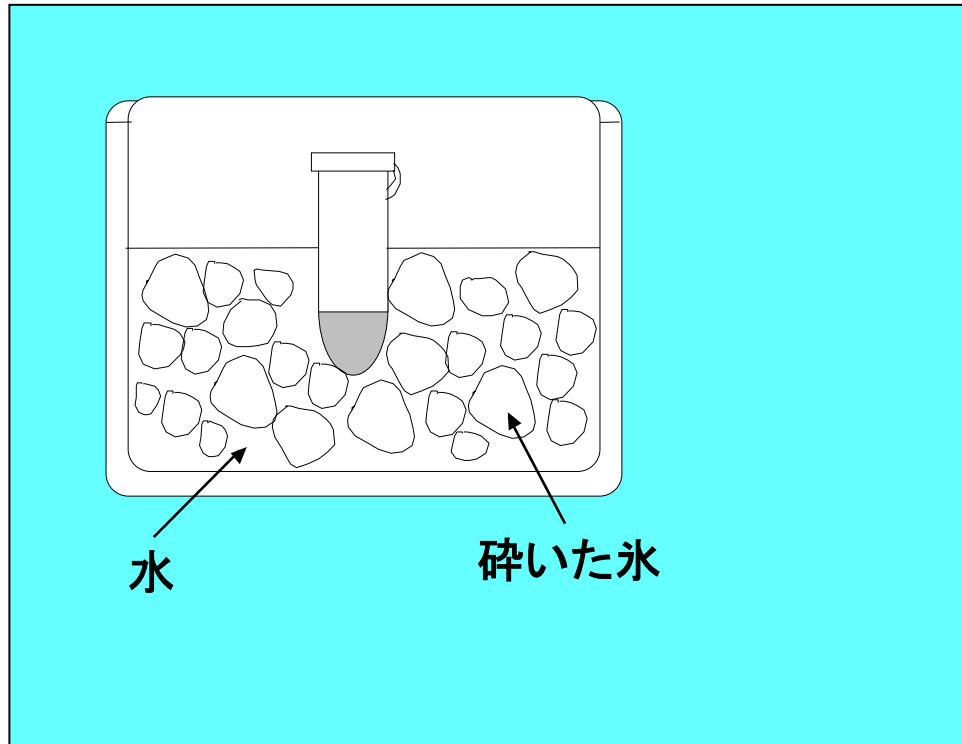
② スタータープレートから菌をしっかりと採る

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



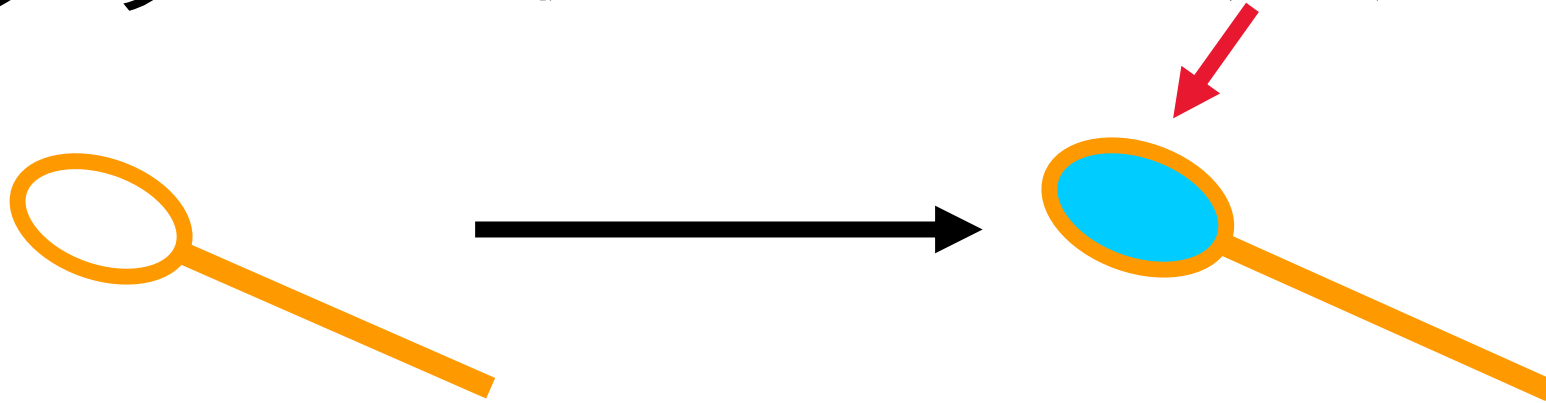
テキスト43ページ

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



テキスト44ページ

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

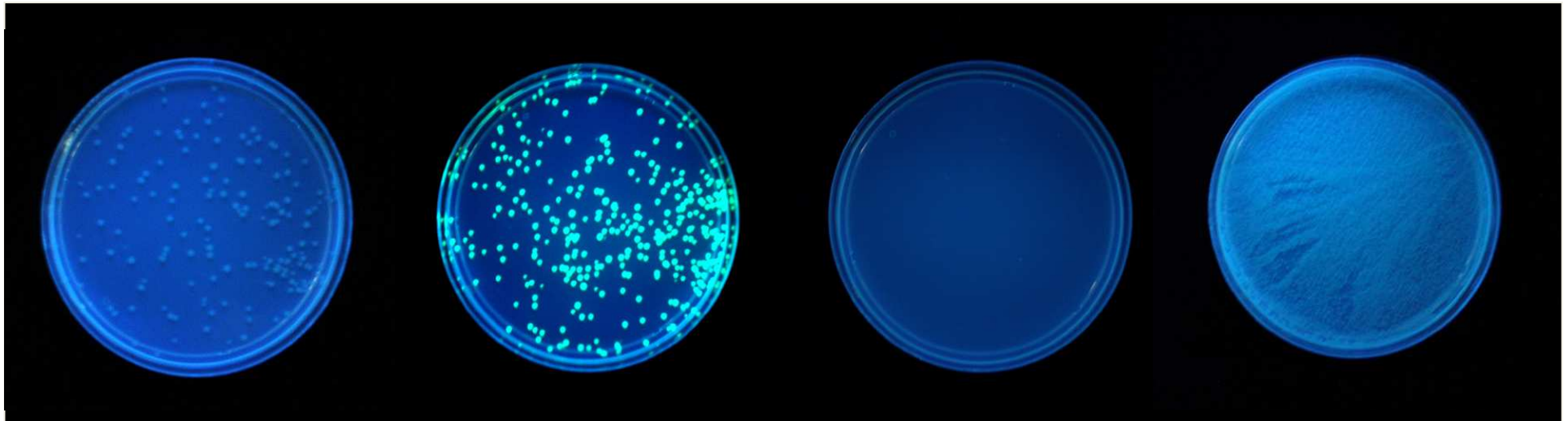
→アンピシリン分解酵素の生産
=アンピシリン耐性の獲得

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进行调整し、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200 mL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、+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300 mL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30 mgを加えて混ぜ、200 mLを16枚のプレートに分注する(LB/Ampプレート)。残りの100 mLにアラビノース600 mg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⑤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。

形質転換実験 結果と考察



2022年7月29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

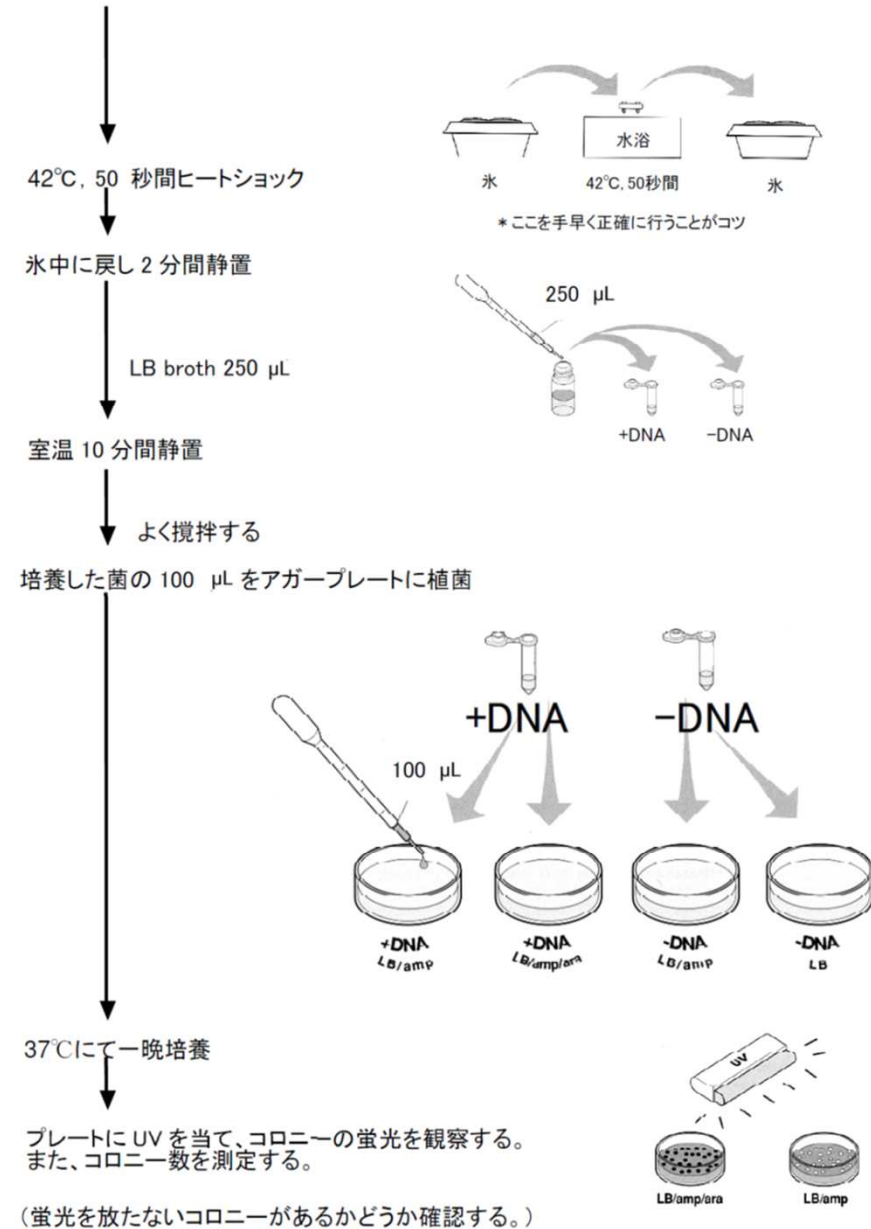
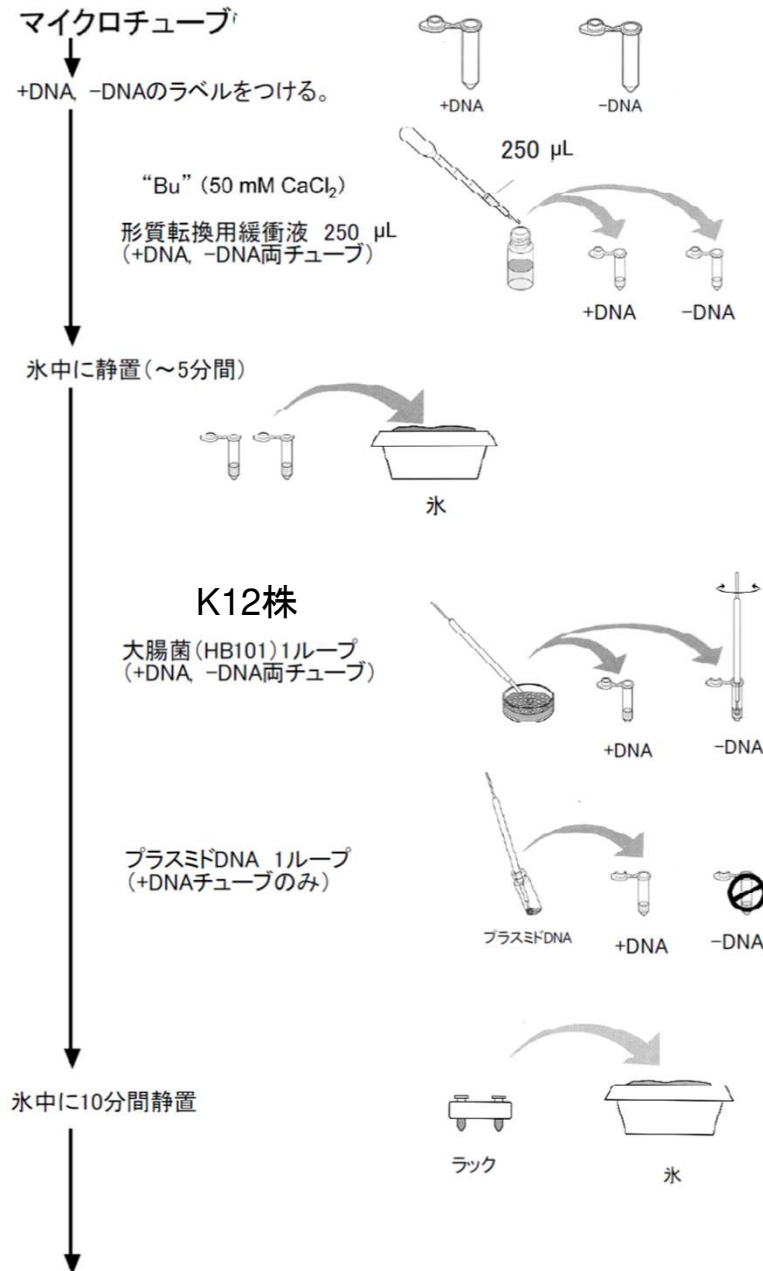
GFP遺伝子発現実験

実験の準備方法(器具、プレート、試薬)

廃棄物処理方法

形質転換実験操作

テキスト38-39ページ



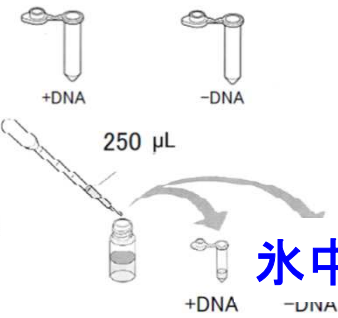
形質転換実験操作

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。

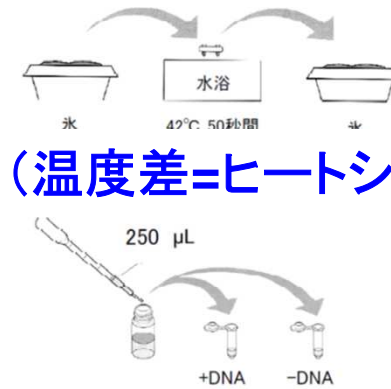
“Bu” (50 mM CaCl₂)
形質転換用緩衝液 250 μL
(+DNA, -DNA両チューブ)

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

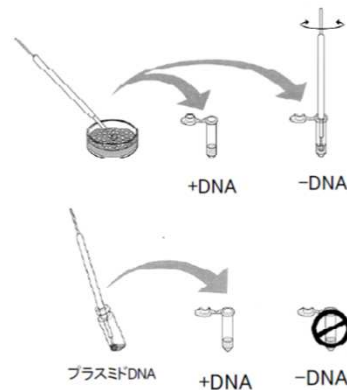
確り冷やす。

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

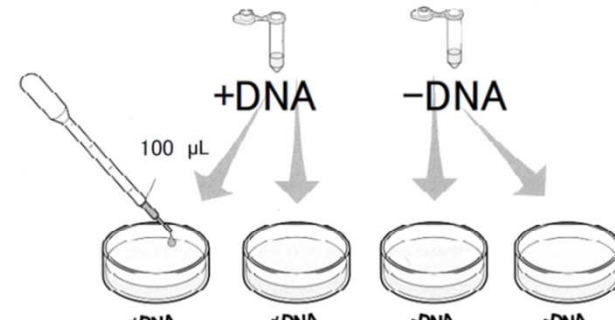
大腸菌 (HB101) 1ループ
(+DNA, -DNA両チューブ)

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



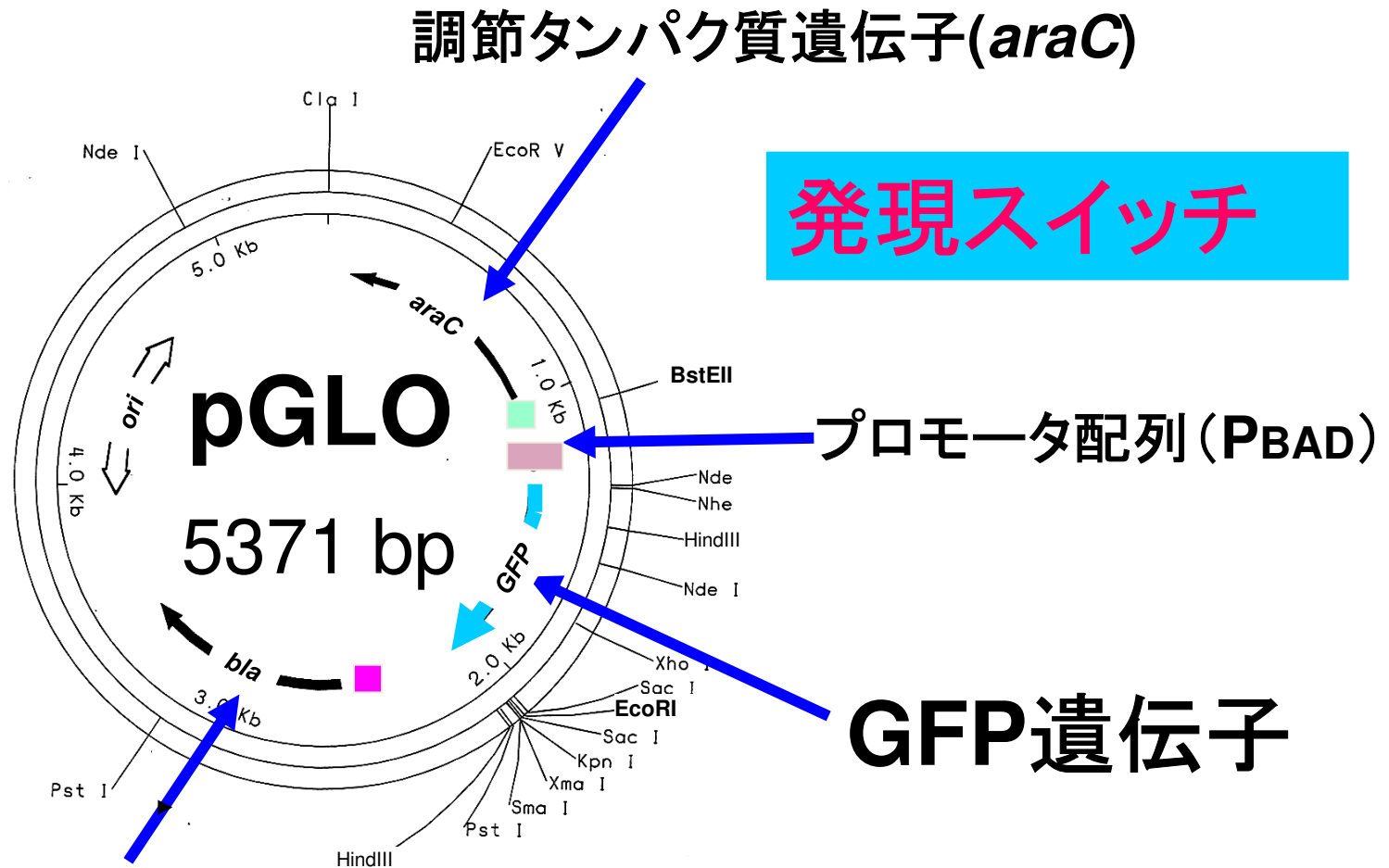
植菌の前にチューブを攪拌して菌を分散させる。

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。



プラスミドDNA pGLOの構造



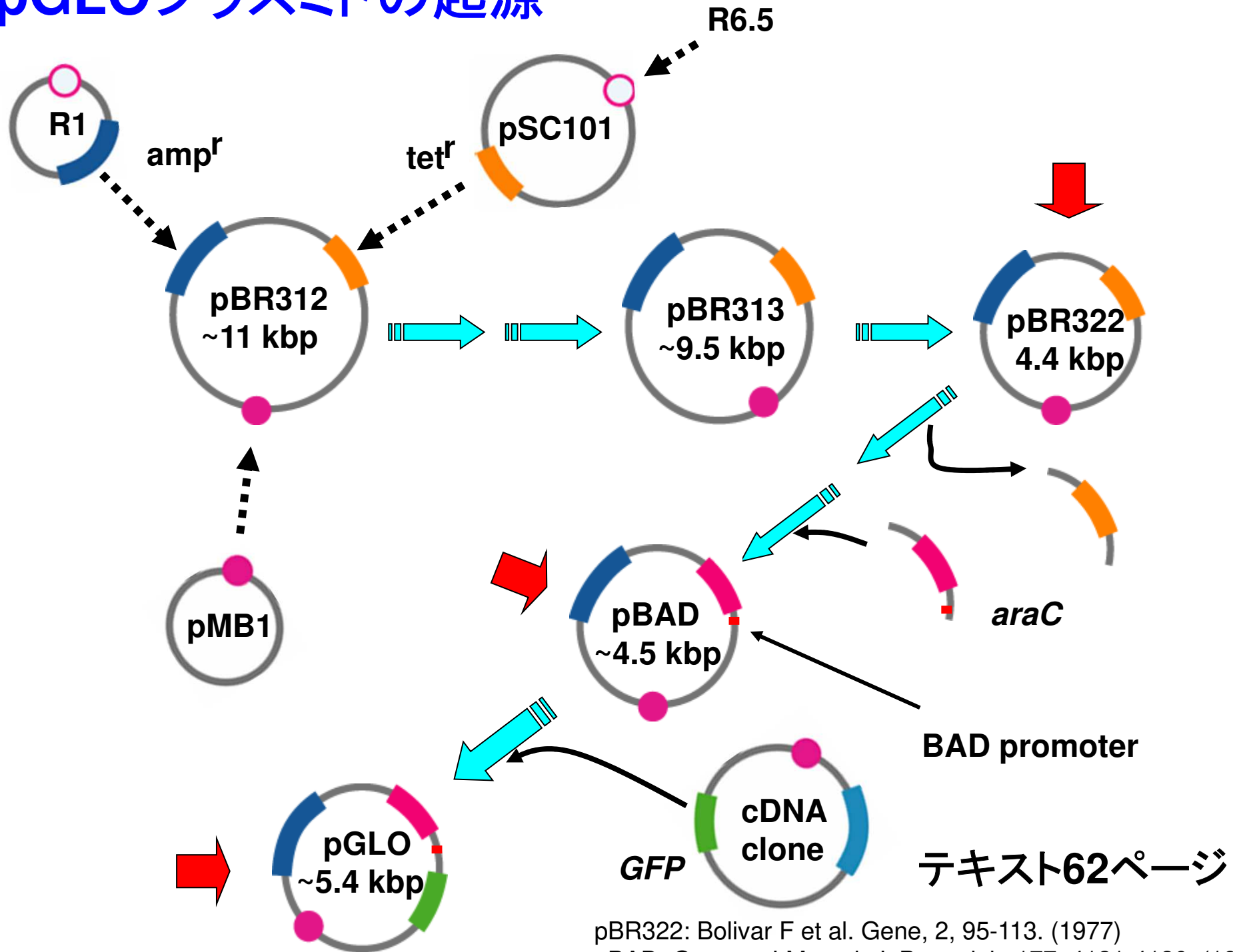
アンピシリン耐性遺伝子

(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

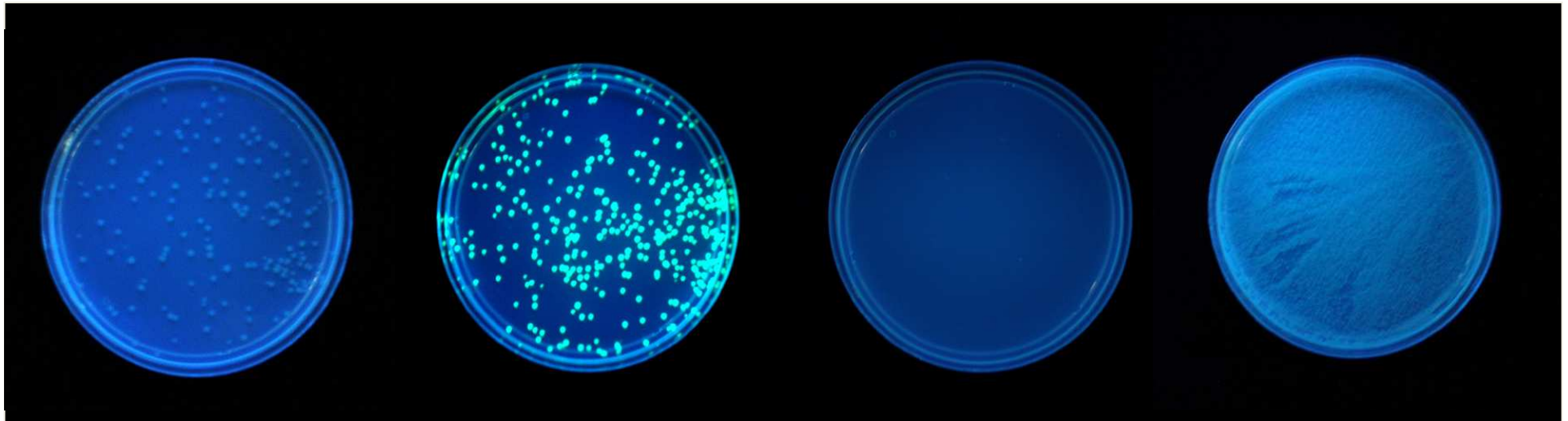
遺伝

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

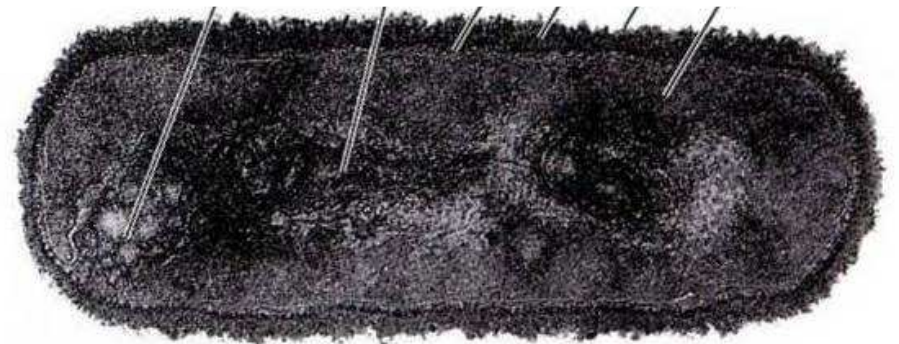
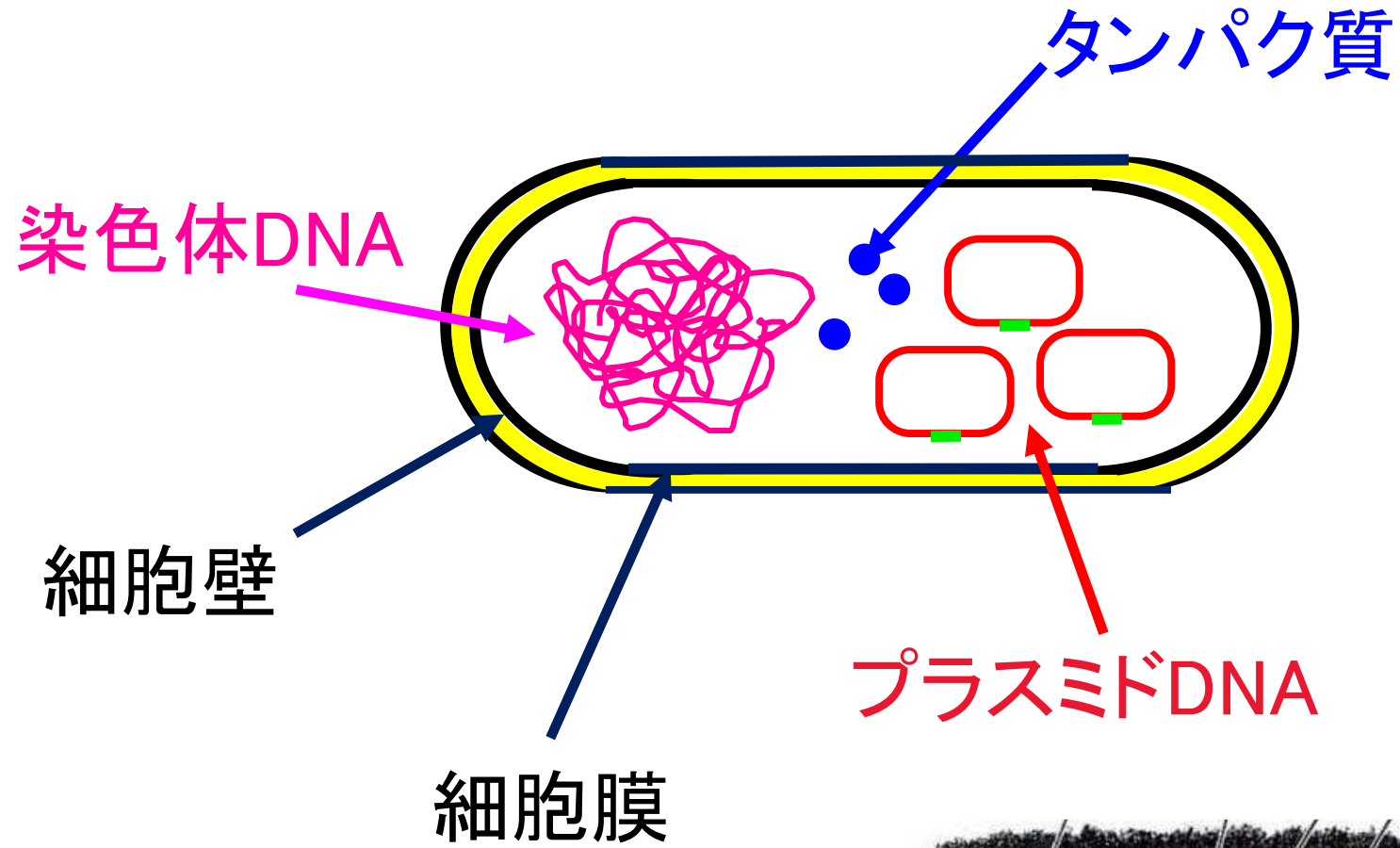
-DNA

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

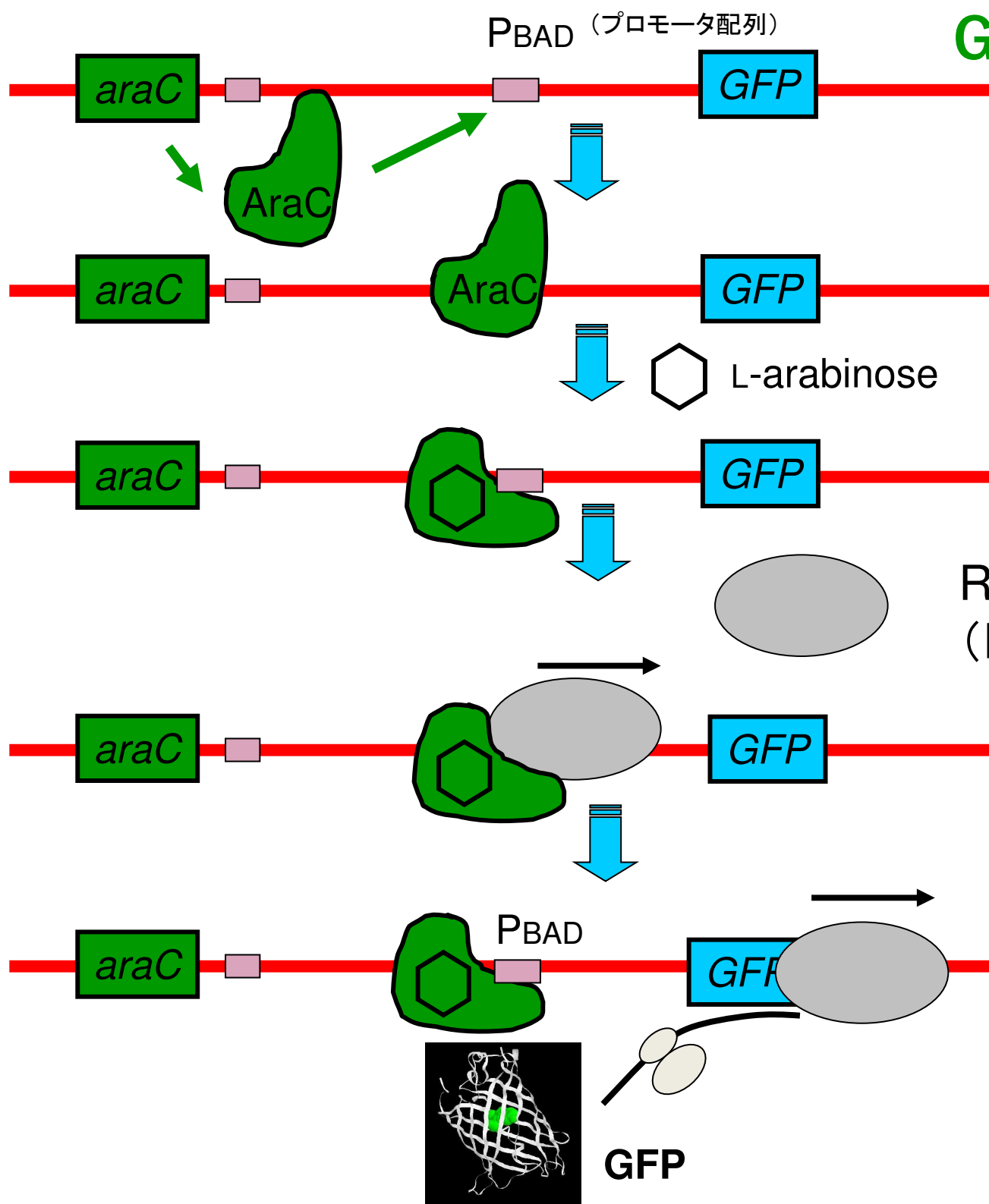


GFPタンパク質の発現

発現スイッチ

OFF

(負の制御)



RNA polymerase
(RNA 合成酵素)

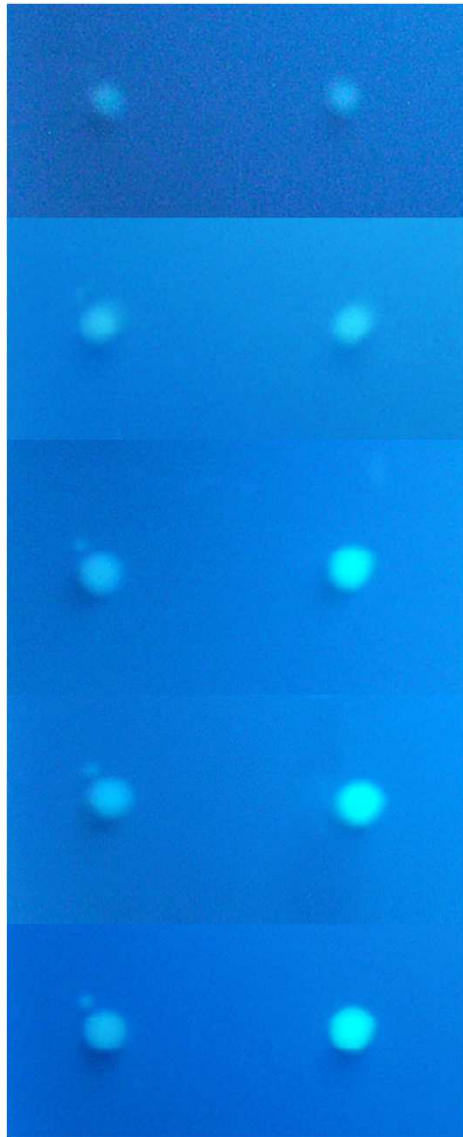
発現スイッチ

ON

(正の制御)

テキスト27ページ

GFPの発現



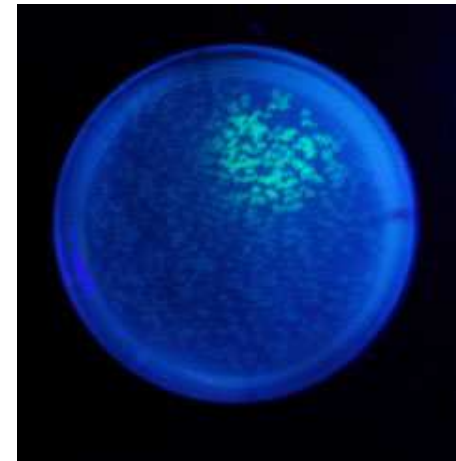
0時間

1時間

2時間

4時間

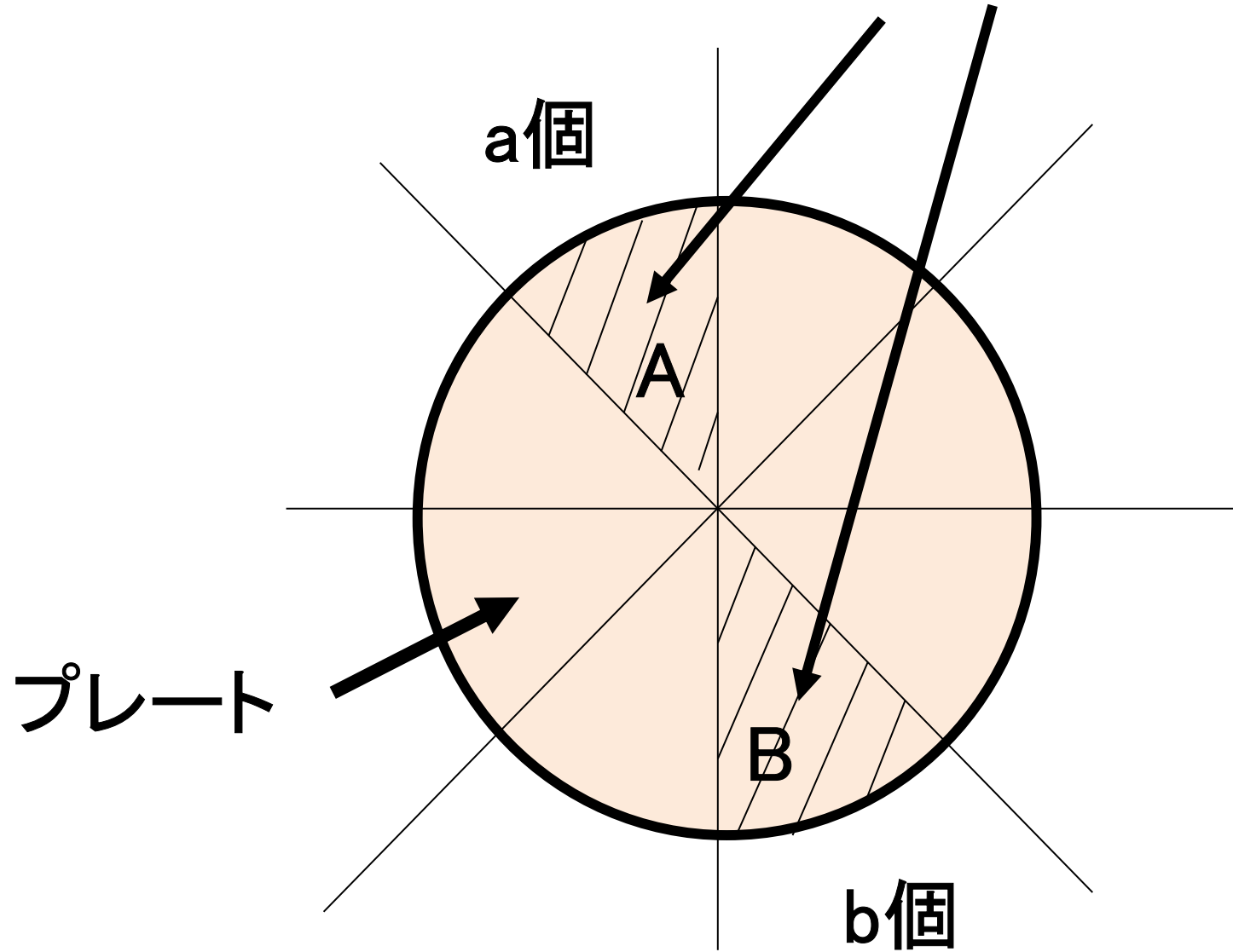
6時間



テキスト49ページ

コロニー数の測定

プレートを8等分し、A,B 2箇所のコロニー数を測定

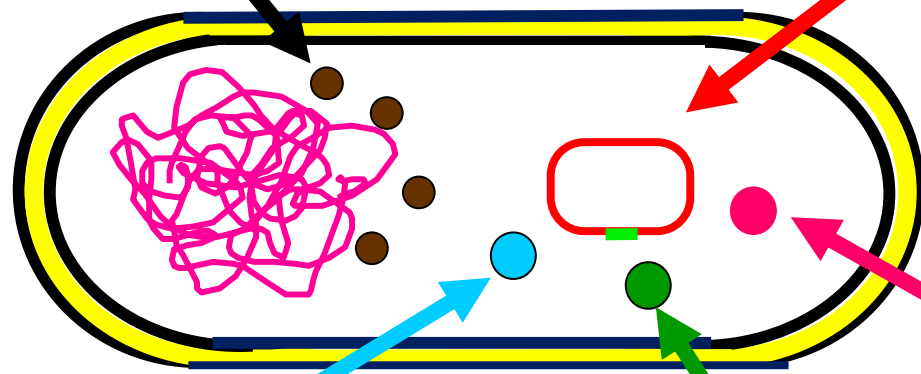


全コロニー数 = $4 \times (a + b)$ 個

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

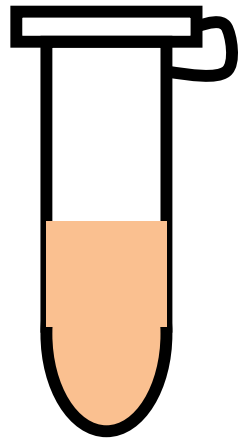


AraCタンパク質

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

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

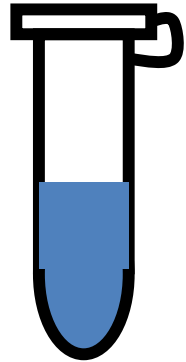
20 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}$:1 バイアル

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

↑
プラスミドDNA 1 μg 当たりのコロニー数

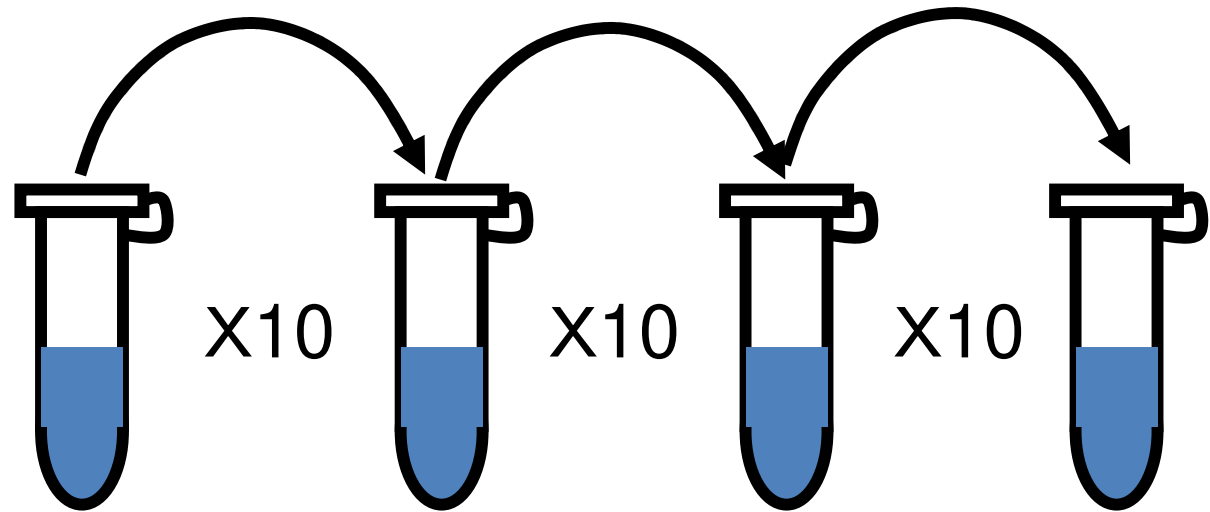
形質転換頻度の推定

(菌数測定による形質転換頻度の推定)



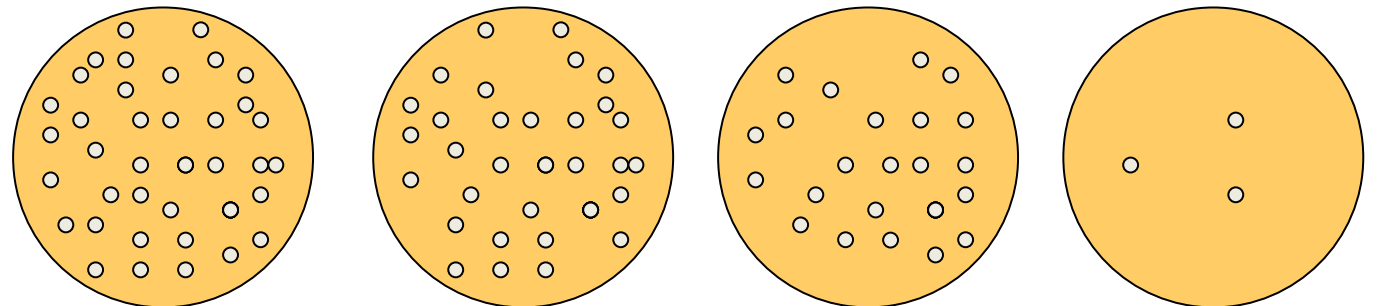
250 μ L TF soln. (*E. coli*)
250 μ L LB broth
10 μ L pGLO soln.] 510 μ L

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

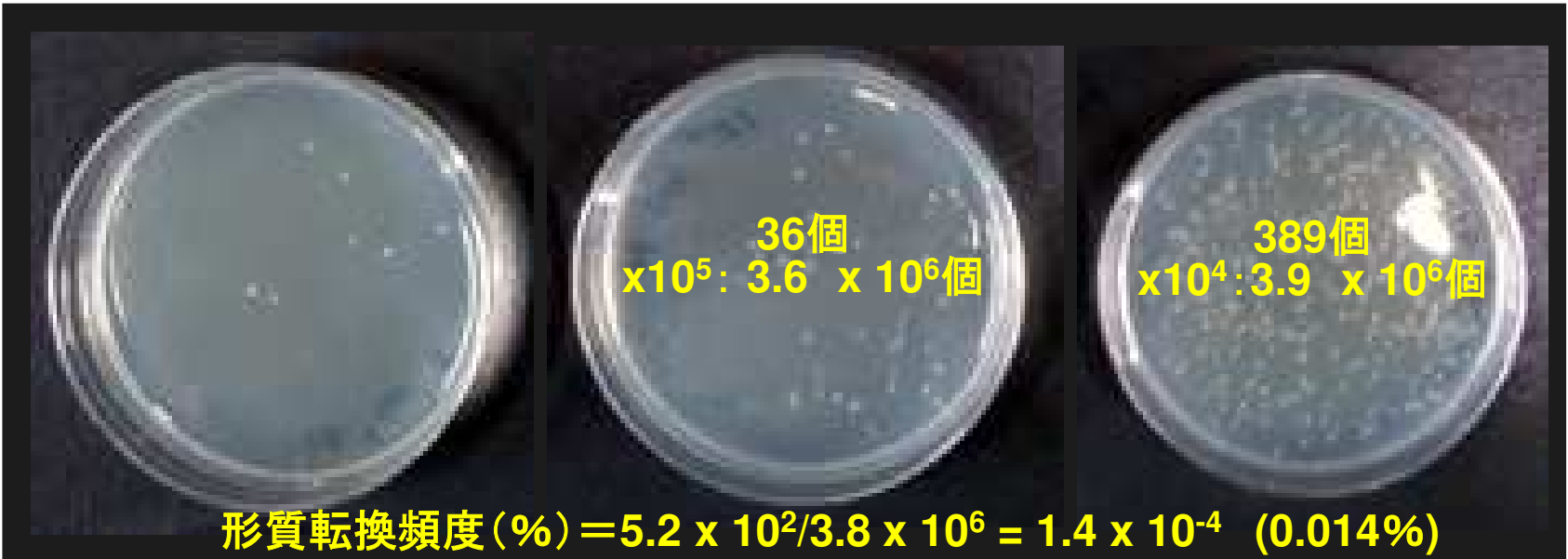
x 1



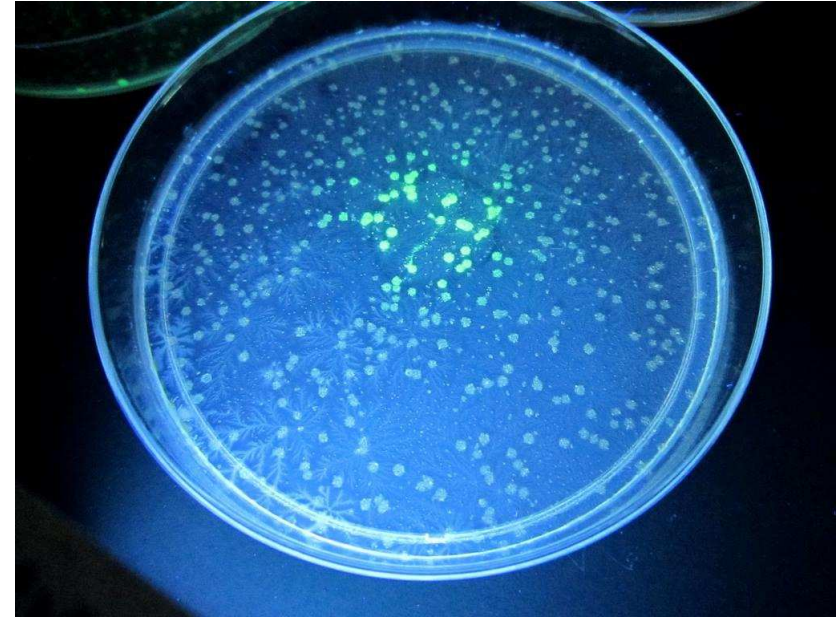
x10⁶

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

□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。

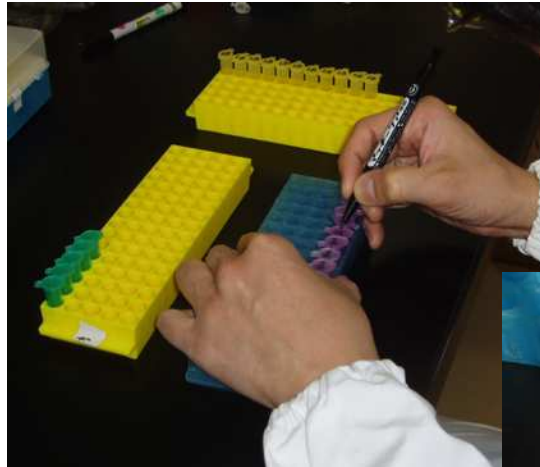
プラスミドDNA溶液は、確実にループで採取する必要があるため、多少希釈されても十分な容量がよい。

□形質転換用溶液(Transformation buffer: "Bu")

0.8 mL/1チューブ

テキスト33ページ

実習の準備2: 試薬分注



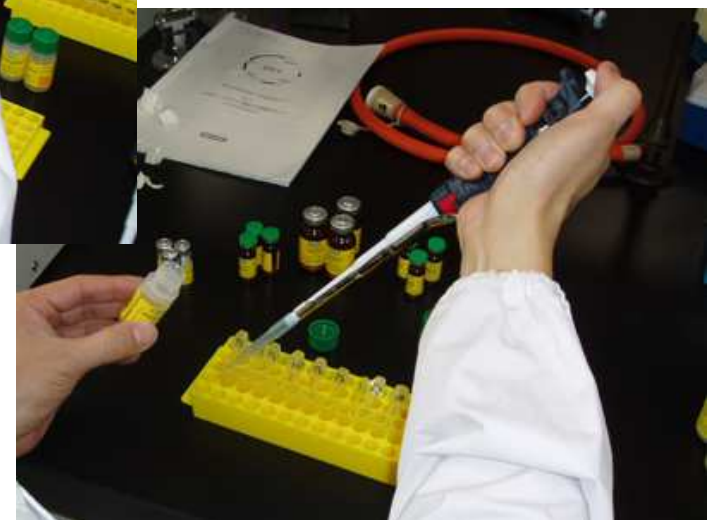
ラベル表示

凍結乾燥品の溶解

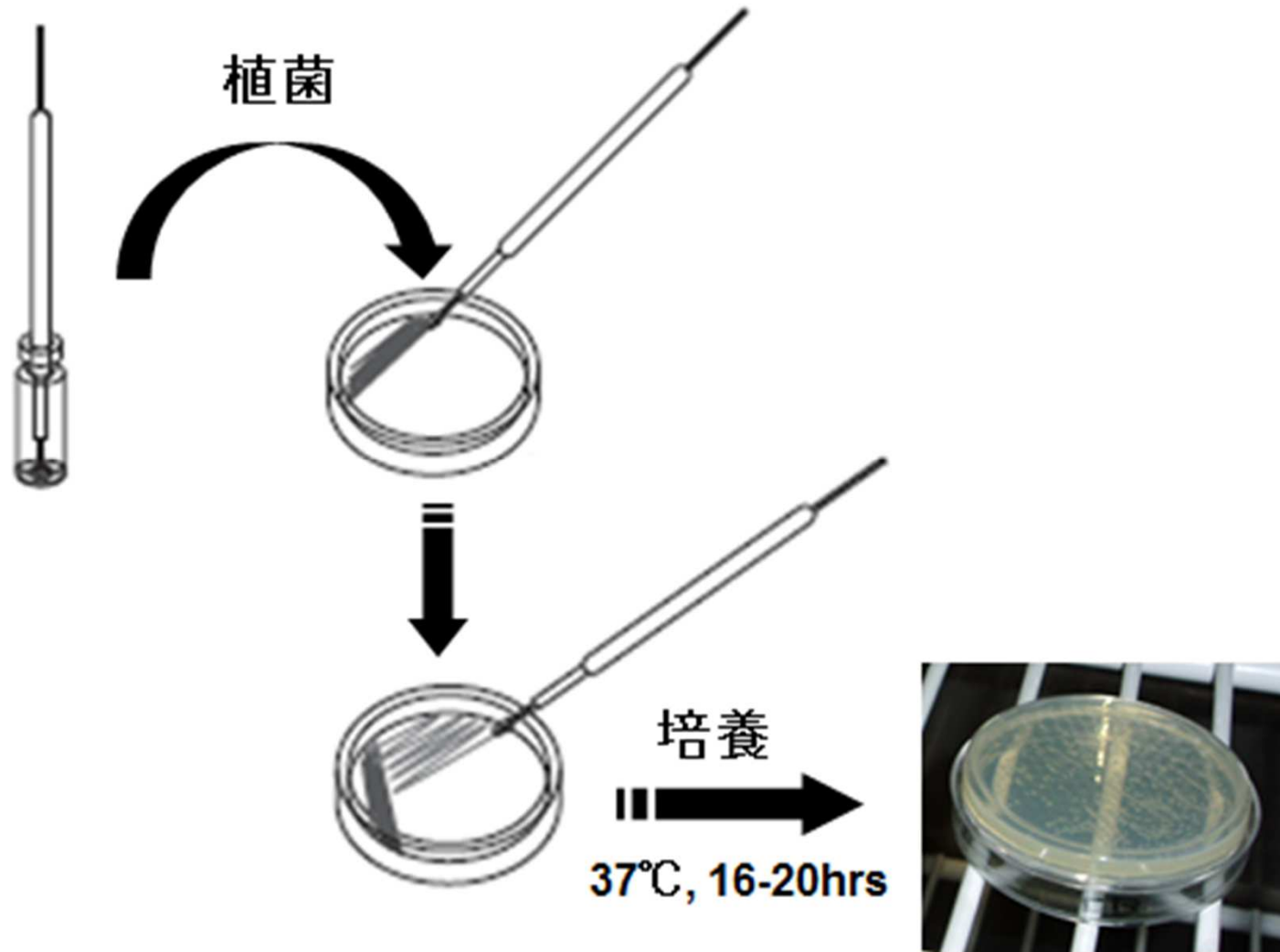


攪拌

分注

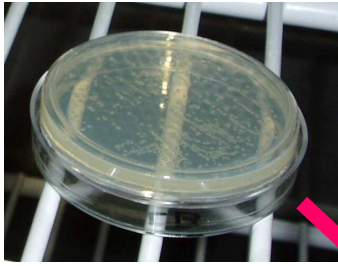


スタータープレートの作製



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！



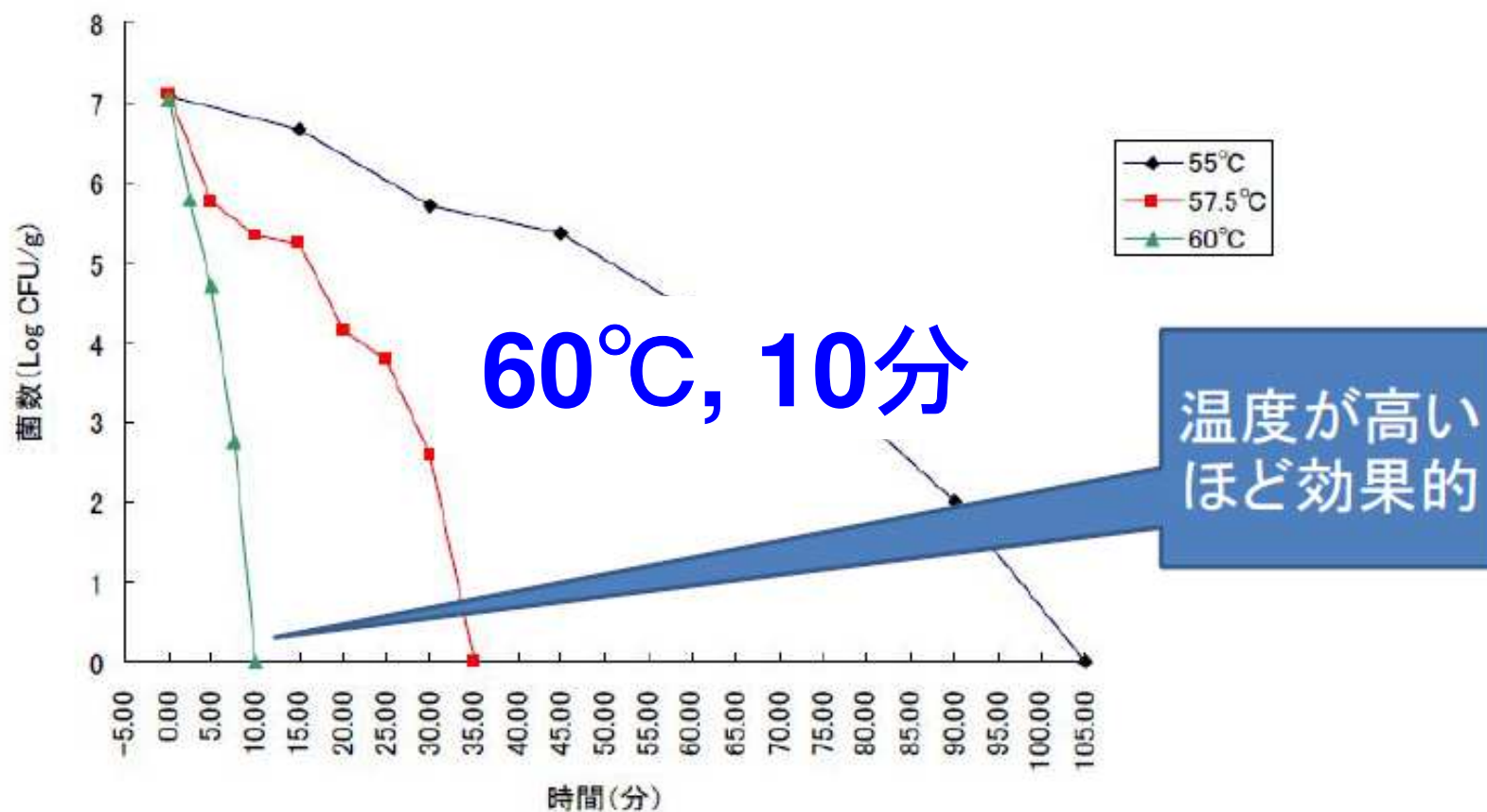
スーパーの袋（不透明）
で代用可能



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ち入り禁止」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。

